

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Marijana M. Ponjavić

Sinteza, karakterizacija i primena biodegradabilnih
blok kopolimera na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) i
poli(etilen-oksida)

Doktorska disertacija



Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Marijana M. Ponjavić

Synthesis, characterization and application of
biodegradable block copolymers based on poly(ϵ -
caprolactone) and poly(ethylene oxide)

Ph. D. Dissertation



Belgrade, 2017.

Mentor: _____

Dr Jasna Đonlagić, red. prof., TMF, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije: _____

Dr Marija S. Nikolić, van. prof., TMF, Univerzitet u Beogradu

Dr Branko Dunjić, viši naučni saradnik, TMF, Univerzitet u Beogradu

Dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik, IMGGI, Univerzitet u Beogradu

Dr Sanja Stevanović, naučni saradnik, IHTM, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je rađena na Katedri za Opštu i neorgansku hemiju, u laboratoriji za Hemiju makromolekula, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj istraživačkoj grupi, sreća je sarađivati i sresti toliko posvećene, profesionalne, a pre svega dobre ljude i prijatelje. Mom mentoru, profesorki Jasni Đonlagić, veliko hvala za savete, pomoć i podršku tokom celokupnog školovanja na Tehnološko-metalurškom fakultetu, osobe kao Vi su danas prava retkost. Profesoru Mariji Nikolić koja je takođe dala veliki doprinos u izradi ove teze, za mene ste uvek bili motivacija da ne odustanem i podrška kada je bilo najpotrebnije. Velika zahvalnost i doktoru Branku Dunjiću za sve korisne savete i interesovanje za izradu ove teze, Vaša kritika i mišljenje su uvek bili dragoceni. Dragom kolegi Milošu Tomiću (Lošmiju), hvala što sam od momenta ulaska u našu kancelariju imala iskrenog prijatelja i kolegu sa kojim sam kroz smeh prolazila kroz sve faze doktorata.

Želim da se zahvalim i svim kolegama sa katedre za Opštu i neorgansku hemiju za uspešnu saradnju tokom proteklih godina!

Dragim devojkama sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (doktoru Jasmini Nikodinović-Runić i doktoru Sanji Jeremić), bez čijih sjajnih ideja i pomoći izrada ove teze bi bila mnogo komplikovanija. Jas, hvala za sve! Hvala i doktoru Sanji Stevanović za bezbroj snimljenih uzoraka, a pre svega za prijateljstvo i podršku!

Mojim dragim prijateljima (Dukiju, Stefanu, Vladimiru, Saši, Bilji, Peri, Jeleni, Željku, Nemanji Jelić) za nesebičnu podršku za svaku moju odluku, bili ste tu i za lepe i manje lepe trenutke. Mojoj Olji, znam da si ponosna na mene, a ja sam srećna što te imam za prijatelja. Mari, za sve naše trenutke, razgovore, životne prekretnice koje smo zajedno izgurale. Jeci, kada smo upisale fakultet, želele smo još tada da postanemo doktori nauka, i uspele smo – najbolje znamo koliko upornosti, rada i truda je bilo potrebno, srećna sam što sam sa tobom delila mnoge trenutke!

Nemanji (Aleksiću), uspešno si "preživeo" još jedan doktorat, stoički izdržao sve moje padove i bio podrška, a radovao se svim mojim uspesima više i od mene.

Naravno, najveća zahvalnost mojoj porodici, Gogi, Nemanji, mami i tati, uz vašu podršku i ljubav, sve izgleda veoma lako. Doktorsku disertaciju posvećujem vama, mama i tata, nije što ste moji, ali ste najbolji na svetu i bez vas bi sve ovo bilo neizvodljivo. Verovali ste u moje snove i ciljeve, i uvek ćete verovati, i reč "Hvala" je mala za roditelje kao što ste vi.

Abstract

Three series of block copolymers based on poly(ϵ -caprolactone), PCL, and poly(ethylene oxide), PEO, were generated as new environmentally friendly polymeric material (production of packaging) suitable for biomedical application. Two series of triblock copolymers with different PCL and PEO blocks lengths and one series of diblock copolymers were prepared by ring-opening polymerization of monomer ϵ -caprolactone, in bulk, catalized with tin(II) octoate. The dihydroxy and monohydroxy poly(ethylene oxide) used in those reactions served as macroinitiators. PEO block length was fixed both in triblock copolymer series (M_n 1000 g/mol and 400 g/mol) and diblock copolymer series (M_n 1020 g/mol), while the PCL block lengths (M_n 10000 - 40000 g/mol) were tailored by changing weight ratio of ϵ -CL/PEO. The influence of a low content of PEO segment (4.8 wt% and lower) on the thermal, surface and morphological properties, as well as their biodegradation behavior, of PCL block copolymers was investigated. The structure and composition of copolymers were examined by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H and quantitative ^{13}C NMR) while their molecular weights were determined by Gel Permeation Chromatography (GPC). Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetric analysis (TGA) confirmed that thermal properties and degradation behaviour of the prepared block copolymers were strongly dependant on polymer composition, PEO content and PCL block lengths, but also on the position of PEO segment. Surface morphology of the copolymer films was investigated using optical microscopy and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis, showing that copolymers crystallize in the form of spherulites with different diameters. Despite the small hydrophilicity of the block copolymer samples and negligible degradation ability under controlled hydrolytic conditions, degradation under controlled enzymatic and composting conditions indicated significant destruction of polymer samples, especially in the case of polymers with higher PEO content and small molecular weight. Diblock copolymers had better degradation properties compared to triblock copolymers. For the enzymatic degradation experiments, cell-free extract which contained *Pseudomonas* lipases was used for the first time. According to results of model composting tests, synthesized block copolymers could be considered as environmentally friendly materials since they could be degraded by microorganisms normally present in soil. The overall goal was to prepare triblock copolymer microspheres suitable as ibuprofen carriers in drug delivery systems. Microspheres with PEO content less than 2 wt% were prepared by oil in water (o/w) solvent evaporation technique. The ibuprofen-loaded microspheres were characterized in terms of size, morphology,

encapsulation efficiency and drug loading. The presence of hydrophilic PEO segment in PCL chains caused the decrease in particle size, which further had a great impact on the drug release kinetics. Therefore, initially faster release and significantly higher quantity of released drug compared to neat PCL was obtained for polymer microspheres with the highest PEO content. *In vitro* cytotoxicity tests using healthy human fibroblasts (MRC5) revealed that empty PCL and triblock copolymer microspheres were not toxic at concentrations of 750 µg/mL and were only mildly toxic in concentrations of up to 3 mg/mL. The greatest cytotoxicity exhibited ibuprofen-loaded triblock copolymer microspheres which showed the highest release of ibuprofen and their cytotoxicity correlated with the cytotoxic effects of the comparable amounts of ibuprofen. Due to their tailorable properties that could be easily achieved, triblock copolymers with a low PEO content are promising candidates as ibuprofen carriers in the effective treatment of chronic painful arthritis for which sustained drug release is essential.

Keywords: PCL diblock and triblock copolymers, thermal properties, surface morphology, hydrolytic degradation, enzymatic degradation, ibuprofen, drug delivery, cytotoxicity.

Scientific area: Chemistry

Scientific sub-area: Chemistry

Izvod

Tri serije blok kopolimera na bazi mpoli(ϵ -kaprolaktona), PCL, i poli(etilen-oksida), PEO su sintetisane kao novi polimerni materijal pogodan za zaštitu životne sredine (izrada biodegradabilne ambalaže) i za primenu u biomedicini. Dve serije triblok kopolimera sa različitim dužinama PCL i PEO blokova i jedna serija diblok kopolimera su sintetisane reakcijom polimerizacije otvaranja prstena monomera ϵ -kaprolaktona (ϵ -CL), u masi, katalizovanu kalaj(II)-oktoatom. Dihidroksi i monohidroksi poli(etilen-oksid) korišćeni u ovim reakcijama su imali ulogu makroinicijatora. Dužina PEO blokova je bila konstantna, kako u serijama triblok kopolimera (M_n 1000 g/mol i 400 g/mol), tako i u seriji diblok kopolimera (M_n 1020 g/mol), dok je dužina PCL blokova (M_n 10000 - 40000 g/mol) podešavana menjanjem masenog odnosa ϵ -CL/PEO. Ispitivan je uticaj malog sadržaja PEO bloka u blok kopolimerima (< 4,8 mas.%) na termička, površinska i morfološka svojstva, kao i na njihovu biodegradabilnost. Struktura i sastav kopolimera su ispitivani ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, dok su vrednosti molarnih masa određene pomoću GPC analize. DSC i TG analize su potvrdile da termička svojstva i termička stabilnost dobijenih blok kopolimera umnogome zavise od sastava polimera, udela PEO i dužine PCL blokova, ali i od položaja PEO segmenta u lancu makromolekula. Morfologija kopolimernih filmova je ispitana otpičkom mikroskopijom i AFM analizom, čime je potvrđeno da blok kopolimeri kristališu u formi sferulita različitih dimenzija. Uprkos maloj hidrofilnosti blok kopolimerna i nezatnoj podložnosti hidrolitičkoj degradaciji, enzimaska degradacija i degradacija u kompostu pod kontrolisanim uslovima su pokazale značajnu destrukciju polimernih uzoraka, naročito u slučaju polimera sa većim sadržajem PEO i manjom molarnom masom. Diblok kopolimeri su pokazali veću degradacionu sposobnost u poređenju sa triblok kopolimerima. Za eksperimente enzimske degradacije, po prvi put je korišćen ćelijski ekstrakt ("cell-free") koji je sadržao enzime *Pseudomonas* lipaze. Na osnovu rezultata testova kompostiranja, sintetisani blok kopolimeri se mogu smatrati materijalima koji ne zagađuju životnu sredinu jer se razgrađuju pod dejstvom mikroorganizama iz spoljašnje sredine. Drugi cilj ovog istraživanja je bio priprema mikrosfera od triblok kopolimera kao matrica za isporuku aktivne supstance, ibuprofena. Mikrosfere od triblok kopolimera sa sadržajem PEO bloka ispod 2 mas.% su pripremljene postupkom otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije "ulje u vodi" (o/v). Mikrosfere sa ibuprofenom su karakterisane u pogledu veličine, morfologije, efikasnosti inkapsulacije i sadržaja inkapsuliranog leka. Prisustvo PEO segmenta u kopolimerima je dovelo do smanjenja veličine mikrosfera, što je dalje imalo veliki uticaj na

kinetiku otpuštanja leka. Stoga, brže otpuštanje leka i značajno veća količina otpuštenog leka u odnosu na PCL je dobijeno za polimerne mikrosfere sa najvećim sadržajem PEO. *In vitro* testovi ispitivanja citotoksičnosti korišćenjem zdravih humanih fibroblasta (MRC5) su pokazali da prazne mikrosfere na bazi PCL i triblok kopolimera nisu toksične u koncentraciji od 750 $\mu\text{g/mL}$ i da su blago toksične u koncentraciji do 3 mg/mL . Najveću citotoksičnost su pokazale mikrosfere od triblok kopolimera sa ibuprofenom koje su ujedno pokazale najveći procenat otpuštenog ibuprofena. Zahvaljujući mogućnosti da se svojstva mogu podešavati lako variranjem strukture, triblok kopolimeri sa malim sadržajem PEO su dobri kandidati za nosače ibuprofena u efikasnoj terapiji hroničnog artritisa za koji je neophodno dugotrajno otpuštanje leka.

Ključne reči: PCL diblok i triblok kopolimeri, termička svojstva, površinska morfologija, hidrolitička degradacija, enzimaska degradacija, ibuprofen, isporuka lekova, citotoksičnost.

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Hemija

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	4
2.1. Pojam biodegradabilnih polimera i klasifikacija	4
2.2. Poli(ϵ -kaprolakton), PCL	6
2.3. Sinteza PCL-a	7
2.3.1. Katalizatori sa kalajem kao centralnim atomom.....	10
2.3.2. Enzimska polimerizacija otvaranja prstena (ϵ -ROP)	14
2.4. Sinteza PCL/PEO blok kopolimera upotrebom različitih katalizatora	16
2.5. Termička svojstva PCL-a.....	18
2.6. Biodegradabilnost	23
2.6.1. Mehanizmi degradacije alifatskih poliestara	24
2.6.2. Faktori koji utiču na biodegradabilnost	27
2.6.3. Hidrolitička i enzimaska degradacija PCL i PCL/PEO blok kopolimera.....	29
2.6.4. Hidrolitička degradacija.....	29
2.6.5. Enzimska degradacija	32
2.7. Mikrobiološka degradacija PCL-a	35
2.7.1. Ispitivanje biodegradabilnosti u kompostu	37
2.7.2. Kompostiranje PCL-a	39
2.8. Primena PCL/PEO blok kopolimera.....	40
2.8.1. Postupci pripreme mikro i nanosfera sa inkapsuliranim lekom unutar PCL/PEO kopolimerne matrice	43
2.8.2. Priprema mikročestica postupcima iz emulzije	44
2.8.3. Druge tehnike pripreme mikro/nanočestica	45
2.8.4. Svojstva leka koja određuju postupak mikroinkapsulacije i otpuštanja leka.....	47
2.8.5. Koncept kontrolisanog otpuštanja leka iz polimerne matrice.....	49
2.8.6. Mehanizmi oslobađanja aktivnih komponenti (lekova) iz polimerne matrice.....	51
2.8.7. Kinetika otpuštanja leka iz polimerne matrice.....	53
2.8.8. Inicijalno brzo otpuštanje leka iz polimerne matrice ("burst effect"): značaj i uzroci ..	54
2.9. Primena matematičkih modela u cilju određivanja mehanizma otpuštanja leka iz polimerne matrice	56
2.9.1. Drugi parametri kojima se karakteriše otpuštanje leka iz polimerne matrice.....	59

2.10. PCL i PCL/PEO blok kopolimerne mikrosfere	60
3. Eksperimentalni deo	65
3.1. Reaktanti	65
3.2. Katalizator.....	65
3.3. Rastvarači.....	66
3.4. Uzgajanje ćelijske kulture.....	66
3.5. Postupak sinteze blok kopolimera	66
3.5.1. Sintaza poli(ϵ -kaprolaktona)	67
3.5.2. Primer sinteze triblok kopolimera PCEC-2	68
3.6. Pripremanje uzoraka PCL i blok kopolimera za karakterizaciju	69
3.7. Karakterizacija PCL-a i blok kopolimera	69
3.7.1. NMR spektroskopija	69
3.7.2. Gel-propusna hromatografija (GPC).....	70
3.7.3. Određivanje graničnog viskozitetnog broja	70
3.7.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA). 71	
3.7.5. Difrakcija rendgenskih zraka na velikim uglovima (WAXS).....	71
3.7.6. Apsorpcija vode i vlage	72
3.7.7. Određivanje vrednosti kontaktnog ugla sa vodom ("Water contact angle - WCA").....	73
3.8. Dinamičko-mehanička analiza.....	73
3.8.1. Dinamičko-mehanička analiza na čvrstim uzorcima	73
3.8.2. Dinamičko-mehanička analiza u stanju rastopa.....	73
3.8.3. Priprema polimernih uzoraka za dinamičko-mehaničku analizu.....	74
3.9. Ispitivanje degradacije polimera	74
3.9.1. Hidrolitička degradacija.....	74
3.9.2. Priprema ćelijskog ekstrakta za enzimsku degradaciju	74
3.9.3. Ispitivanje enzimske degradacije u vodenom medijumu	75
3.9.4. Degradacija polimera na agar šoljama	75
3.9.5. Biodegradacija PCL i blok kopolimera u kompostu.....	75
3.10. Karakterizacija polimernih uzoraka nakon testova degradacije	76
3.10.1. ATR-infracrvena spektroskopija (ATR-FTIR)	76
3.10.2. Optička mikroskopija (OM).....	76
3.10.3. Mikroskopija atomskih sila (atomic force microscopy - AFM)	76

3.11. Priprema PCL i blok kopolimernih mikrosfera kao nosača leka (ibuprofena) i njihova karakterizacija.....	77
3.11.1. Izrada polimernih mikrosfera postupkom otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije "ulje u vodi" ("oil in water", O/W)	77
3.11.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	77
3.11.3. Ultraljubičasta spektrofotometrija u vidljivom delu spektra (UV-Vis).....	78
3.11.4. Određivanje efikasnosti inkapsulacije (EE%) i sadržaja leka.....	78
3.11.5. In-vitro otpuštanje ibuprofena iz polimerne matrice	78
3.12. Ispitivanje in-vitro citotoksičnosti polimernih mikrosfera	79
4. Rezultati i diskusija.....	80
4.1. Sinteza PCEC triblok kopolimera.....	81
4.2. Optimizacija uslova sinteze PCL/PEO diblok kopolimera.....	82
4.3. Karakterizacija sintetisanih triblok i diblok kopolimera NMR analizom.....	83
4.4. GPC analiza triblok i diblok kopolimera	87
4.5. Određivanje graničnog viskozitetnog broja sintetisanih kopolimera.....	89
4.6. Termička svojstva PCL-a i sintetisanih blok kopolimera.....	89
4.6.1. Termička stabilnost sintetisanih polimera	92
4.7. Difrakcija rendgenskih zraka na velikim uglovima (WAXS) sintetisanih blok kopolimera	97
4.8. Ispitivanje apsorpcije vode i apsorpcije vlage PCL-a i sintetisanih blok kopolimera	101
4.9. Određivanje vrednosti kontaktnog ugla sa vodom (WCA).....	103
4.10. Dinamičko-mehanička analiza PCL i blok kopolimera u čvrstom stanju i stanju rastopa	104
4.11. Degradacija PCL-a i sintetisanih triblok i diblok kopolimera	111
4.11.1. Hidrolitička degradacija sintetisanih polimera	112
4.11.2. FTIR analiza uzoraka nakon hidrolitičke degradacije	114
4.11.3. GPC analiza PCL i triblok kopolimera nakon hidrolitičke degradacije	117
4.11.4. Enzimska degradacija sintetisanih polimera.....	118
4.11.5. FTIR analiza polimera nakon enzimske degradacije	121
4.11.6. GPC analiza polimera nakon enzimske degradacije	122
4.12. Morfologija površine sintetisanih polimera pre i posle enzimske degradacije.....	126
4.12.1. Optička mikroskopija nedegradiranih polimernih filmova.....	126
4.12.2. AFM analiza nedegradiranih polimernih filmova.....	128

4.12.3. Optička mikroskopija polimernih filmova nakon enzimske degradacije	131
4.12.4. AFM analiza polimernih filmova nakon enzimske degradacije	133
4.13. Biokompostiranje PCL i sintetisanih blok kopolimera.....	136
4.13.1. FTIR analiza i optička mikroskopija polimernih filmova nakon ogleda biokompostiranja.....	139
4.14. Primena triblok kopolimera kao matrica za kontrolisano otpuštanje ibuprofena	140
4.14.1. Efikasnost inkapsulacije ibuprofena	141
4.14.2. DSC analiza dobijenih mikrosfera	143
4.14.3. FTIR analiza dobijenih mikrosfera	145
4.14.4. Morfologija PCL i PCEC mikrosfera	148
4.14.5. Optička mikroskopija mikrosfera	148
4.14.6. SEM analiza mikrosfera.....	150
4.14.7. In vitro otpuštanje ibuprofena iz PCL i PCEC polimerne matrice	153
4.14.8. Primena matematičkim modela na profile otpuštanja ibuprofena iz PCL i PCEC polimerne matrice	157
4.15. In vitro testovi ispitivanja citotoksičnosti dobijenih mikrosfera sa ibuprofenom.....	159
5. Zaključak	162
6. Literatura	168
7. Prilog	168

1. Uvod

Tokom poslednje tri decenije, napravljen je veliki pomak u razvoju biodegradabilnih polimernih materijala. Ekspanzija u razvoju biodegradabilnih polimera posledica je nedostataka i problema nagomilavanja polimernog otpada nastalih prilikom jednokratne primene nedegradabilnih polimernih materijala. Najveća primena biodegradabilnih polimera je u oblasti biomedicine, ali i sa ekološkog stanovišta, ovi polimeri, kao zamena nedegradabilnih polimera za jednokratnu namenu, mogu doprineti zaštiti životne sredine i smanjenju zagađenosti Zemlje polimernim otpadom. Glavne prednosti biodegradabilnih polimera su: podležu procesu kompostiranja kao organski otpad; njihova primena ne smanjuje samo ugroženost životne sredine uzrokovanu deponijama konvencionalnih polimera koji se koriste u svakodnevnom životu, već redukuje i odlaganje laboratorijskog otpada jer se može degradirati prirodnim putem; njihovom razgradnjom se rasterećuju deponije jer se ukupna količina otpada smanjuje; mogu se reciklirati do upotrebljivih monomera i oligomera mikrobiološkim i enzimskim tretmanom.

U oblasti biomedicine, biodegradabilni polimerni materijali imaju veliki potencijal u razvoju terapijskih pomagala kao što su proteze, trodimenzionalne porozne strukture ("scaffolds") u inženjerstvu tkiva, i u sistemima kontrolisane isporuke lekova kao nosači aktivnih supstanci. Za bilo koju od navedenih primena, potrebno je da materijali imaju specifična fizička, hemijska, biološka, mehanička i degradaciona svojstva kako bi se obezbedila efikasna terapija. Ispitan je veliki broj kako prirodnih tako i sintetskih polimera koji podležu degradaciji (hidrolitičkoj ili enzimskoj) kao potencijalnih kandidata u biomedicinskoj primeni. Alifatski poliestri su prepoznati kao važna klasa biodegradabilnih polimernih materijala jer su veoma podložni biološkom napadu. U grupu najviše ispitivanih alifatskih poliestara kao biodegradabilnog materijala spadaju poli(3-hidroksibutirat), PHB, poli(ϵ -kaprolakton), PCL, poli(butilen-sukcinat), PBS, i poli(mlečna kiselina), PLA. Biodegradabilni poliestri mogu biti prirodni (poli(hidroksialkanoati)) i hemijski sintetisani poliestri. Hemijski sintetisani poliestri mogu biti poreklom iz obnovljivih izvora (poli(mlečna kiselina)) ili iz petrohemijskih izvora (poli(ϵ -kaprolakton), poli(butilen-sukcinat)).

Zahvaljujući prisustvu hidrolizabilne estarske veze u lancima alifatskih poliestara, ovi polimeri mogu podleći degradaciji. Ispitivanje biodegradabilnosti i mehanizma biodegradacije ima bitnu ulogu u razvoju biodegradabilnih poliestara. Razumevanje mehanizma degradacije može biti veoma korisno u smislu smanjenja neželjenih efekata do kojih može doći nakon što ovi polimeri dospeju u okolinu. Poli(ϵ -kaprolakton), PCL, semi-

kristalinični i hidrofobni alifatski poliestar sa karakterističnom sporom degradacijom, se pokazao kao odlična polimerna matrica u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova. Biodegradabilnost PCL-a se može poboljšati povećanjem njegove hidrofилности, odnosno uvođenjem hidrofилnih polietarskih segmenata u polimerne lance. Hidrofилni poli(etilen-oksид), PEO, zbog svojih hidrofилnih, netoksičnih, antigenskih i imunogenih svojstava, najščešće se koristi za kopolimerizaciju sa PCL-om. Amfifilni PCL/PEO blok kopolimeri, pokazuju veću hidrofилnost, a samim tim i biodegradabilnost, čime se proširuje njihova primena u biomedicini. Takođe, PCL i njegovi blok kopolimeri sa PEO, spadaju u grupu retkih polimernih materijala koji se, pored primene u biomedicini, mogu koristiti i za izradu ambalaže i drugih predmeta za jednokratnu upotrebu, koji se za razliku od biostabilnih materijala mogu biološki razgraditi.

Predmet ove doktorske disertacije je bila sinteza, karakterizacija i ispitivanje biodegradabilnosti diblok i triblok kopolimera na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) i poli(etilen-oksida) kao centralnog bloka kod triblok kopolimera i kao lateralnog bloka kod diblok kopolimera. Izražena hidrofobnost i kristaliničnost homopolimera PCL obezbeđuju njegovu sporu degradaciju, što ga čini dobrom matricom za kontrolisano otpuštanje lekova. Sa druge strane, ova svojstva mogu značajno ograničiti širu primenu PCL-a. Uloga hemijski vezanog amorfноg, mekog, hidrofилnog centralnog segmenta PEO u triblok i kao lateralnog bloka u diblok kopolimeru je da povećava hidrofилnost, a time i biodegradabilnost polimerne matrice. Za sintezu kopolimera je korišćena reakcija polimerizacije otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona, inicirana hidroksilnim grupama na krajevima prepolimera, poli(etilen-oksida), PEO, odnosno metoksi-poli(etilen-oksida), m-PEO. Reakcija polimerizacije je izvođena u rastopu u prisustvu katalizatora, kalaj-2-etilheksanoata, Sn(Oct)₂. Poli(etilen-oksид) sa završnim hidroksilnim grupama molarne mase 400 i 1000 g/mol, koji je korišćen u ovim sintezama, predstavlja unutrašnji segment triblok kopolimera, dok m-PEO molarne mase 1020 g/mol predstavlja lateralni segment diblok kopolimera. Blok kopolimeri različitih molarnih masa (u opsegu od 20000 do 40000 g/mol) sintetisani su podešavanjem molskog odnosa početne reakcione smeše, pri čemu je dužina PEO i m-PEO segmenata bila konstantna, a varirane su dužine PCL blokova.

Nakon sinteze tri serije blok kopolimera različite konfiguracije i sastava, ispitan je uticaj uvođenja hidrofилnog, mekog PEO segmenta u lance PCL na termička, morfološka i degradaciona svojstva blok kopolimera. Struktura, sastav i stepen polimerizacije sintetisanih polimera su određeni pomoću ¹H NMR i kvantitativne ¹³C NMR spektroskopije, a molarne mase i raspodela molarnih masa viskozimetrijom razblaženih rastvora i gel-propusnom

hromatografijom (GPC). Temperature topljenja sintetisanih kopolimera određene su diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC), a termička stabilnost dobijenih polimera termogravimetrijskom analizom (TGA). Stepenn kristaliničnosti uzorka izračunat je na osnovu difraktograma snimljenih rendgenskom difrakcijom na velikim uglovima (WAXS). Kako je jedan od osnovnih ciljeva ovog istraživanja bio da se uvođenjem hidrofilnog, mekog PEO segmenata u malom procentu, kao centralnog ili lateralnog segmenta, poboljša degradabilnost kopolimera, a istovremeno zadrže dobra mehanička i termička svojstva i preradljivost karakteristična za homopolimer PCL, reološka svojstva sintetisanih kopolimera su ispitivana u čvrstom stanju i rastopu pomoću dimaničko-mehaničke analize (DMA). Hidrofilnost diblok i triblok kopolimera određena su merenjem procenta apsorpcije vode i vlage. Za ispitivanje morfoloških svojstava polimera korišćena je optička mikroskopija, kao i mikroskopija atomskih sila (AFM). Hidrolitička degradacija sintetisanih polimernih filmova je testirana u fosfatnom puferu (pH 7,4) na 37 °C tokom osam nedelja. Za ispitivanje enzimske degradacije kopolimera tokom 2 i 4 nedelje po prvi put je korišćen bakterijski ekstrakt kulture *Pseudomonas* PAO1 koji sadrži enzime lipaze, i druge esterase. Praćenje stepena enzimske degradacije je vršeno gravimetrijski, merenjem gubitka mase nakon degradacije, kao i AFM analizom, dok je promena molarne mase kopolimera određena GPC analizom. Biodegradabilnost sintetisanih diblok i triblok kopolimera ispitana je i u model kompost sistemu, koji je sadržao komercijalni substrat obogaćen kulturom bakterijskog soja *P. aeruginosa* PAO1, tokom 4 nedelje na 37 °C.

Drugi deo istraživanja je bio usmeren na pripremu blok kopolimernih mikrosfera za kontrolisano otpuštanje leka i njihova primena u biomedicini. Kao aktivna supstanca (model leka) korišćen je ibuprofen (u koncentracijama od 10 i 20 mas.%), nesteroidni antiinflamatorni lek koji se koristi u terapiji reumatoidnog artritisa, osteoartritisa i kao analgetik. Mikrosfere PCL-a i triblok kopolimera sa kraćim PEO blokom su dobijene postupkom otparavanje lako isparljivog rastvarača iz emulzije, potom su karakterisane DSC, FTIR i SEM analizom. Kontrolisano otpuštanje leka u fosfatnom puferu (pH 7,4) je praćeno pomoću UV/Vis spektrofotometrije. Kinetika otpuštanja ibuprofena iz polimernih mikrosfera je analizirana pomoću različitih matematičkih modela. Citotoksični efekti dobijenih mikrosfera su ispitani korišćenjem humanih ćelija fibroblasta pluća (MRC5).

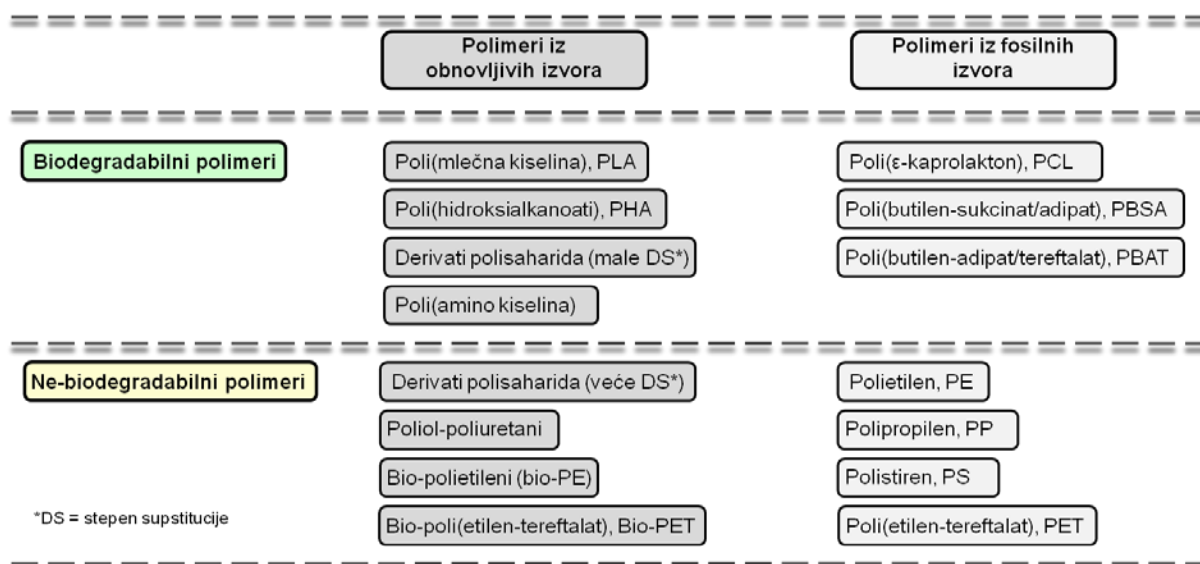
2. Teorijski deo

2.1. Pojam biodegradabilnih polimera i klasifikacija

U današnje vreme, polimeri su najviše korišćeni materijali i predstavljaju važnu sirovinu zbog svoje široke primene u različitim oblastima; za izradu ambalažnog materijala za hranu (najveća zastupljenost), u izradi odeće, automobilske industriji i brojnim drugim granama industrije. Na svetu se godišnje generiše oko 34 miliona tona polimernog otpada, od čega 93 % završi u zemljištu i okeanima. Uprkos zabrani odlaganja polimernog otpada u zemljište u pojedinim zemljama članicama Evropske Unije, oko 50 % ovog otpada ipak dospe u zemljište. Razvijene zemlje kao što su Nemačka, Holandija, Švedska, Danska i Austrija uspešno recikliraju od 80 do 100 % polimernog otpada, ali je to samo 28 % od ukupne količine na svetskom nivou. Dok se u državama Evropske Unije radi na pronalaženju drugih načina za odlaganje otpada, ali i primeni reciklaže, zemlje u razvoju (Kina, Indonezija, Filipini, Vijetnam, Šri Lanka), koje generišu više od 50 % polimernog otpada, i dalje koriste konvencionalan način odlaganja otpada, na deponijama. U cilju zaštite životne sredine i smanjenja zagađenja polimernim otpadom, proizvodnja biopolimera postaje sve popularnija.

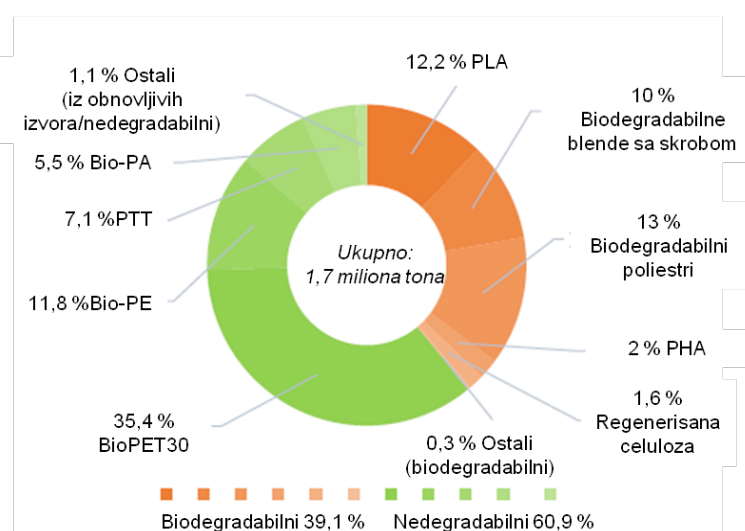
Polimerni materijali se mogu klasifikovati na osnovu biodegradabilnih svojstava i na osnovu porekla, odnosno sirovine iz koje su dobijeni (Slika 2.1.). Polietilen (PE), poli(propilen) (PP) i poli(etilen-tereftalat) (PET) su klasični predstavnici nedegradabilnih polimera koji se dobijaju iz fosilnih izvora ("oil-based"). Dok je većina polimera dobijenih iz fosilnih sirovina nedegradabilna, poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), poli(butilen-sukcinat/adipat) (PBSA) i poli(butilen-adipad/tereftalat) (PBAT) spadaju u grupu biorazgradivih polimernih materijala.

Derivati polisaharida sa velikim stepenom supstitucije, kao što je acetat-celuloze, ne mogu se razgraditi kada dospeju u okolinu, iako je celuloza prirodni polisaharid koji se potpuno razlaže dejstvom enzima, celulaza. Takođe, bio-PE nije biorazgradiv, iako se dobija iz bio-etanola, koji nastaje fermentacijom glukoze. U poslednje vreme, bio-PET se proizvodi iz biomase upotrebom bio-baziranog etilen-glikola, a sadržaj biomase u bio-PET je oko 30 %, i ovaj polimer spada u grupu nedegradabilnih polimera. Pojam "biopolimera" je veoma opširan i vrlo često pogrešno shvaćen upravo zbog činjenice da polimeri dobijeni iz obnovljivih izvora ne moraju biti istovremeno i biodegradabilni. [1-4]



Slika 2.1. Klasifikacija polimernih materijala. [4]

U 2014. godini, na svetu je proizvedeno oko 1,7 miliona tona biodegradabilnih polimernih materijala, a očekuje se da će njena proizvodnja dostići 6,2 miliona tona do 2018. godine (Slika 2.2.). Do 2012. godine, proizvodnja PLA i blendi sa skrobom je iznosila 47 i 41 %, i to su bili najčešće korišćeni biopolimeri, dok je kroz par godina njihova proizvodnja smanjena više nego duplo u odnosu na ukupnu proizvodnju biopolimera. Godišnja proizvodnja polimera dobijenih iz petrohemijskih izvora (fosilni izvori) dostigla je 300 miliona tona u 2015. godini, a porast proizvodnje biodegradabilnih polimera se pripisuje njihovim dobrim svojstvima, a pre svega jer su ekološki prihvatljivi. [5]



Slika 2.2. Grafički prikaz proizvodnje biopolimera u svetu u 2014. godini. [6]

Uprkos prisustvu miliona tona polimernog otpada koji uglavnom čine nedegradabilni polimerni materijali, proizvodnja biodegradabilnih polimera predstavlja mali deo ukupne svetske proizvodnje polimernih materijala. Biodegradabilni polimerni materijali se većinom koriste za jednokratnu primenu, a upravo polimerni materijali su prisustni u svakodnevnom životu i zbog njihove široke upotrebe se javlja problem odlaganja polimernog otpada. Zbog toga je glavni cilj savremene proizvodnje i sinteze novih polimera realna primena biodegradabilnih i zamena biostabilnih polimernih materijala.

2.2. Poli(ϵ -kaprolakton), PCL

Poli (ϵ -kaprolakton), PCL, je alifatski, sintetski poliestar koji se sastoji iz heksanoatne ponavljajuće jedinice. PCL je semikristaliničan polimer sa stepenom kristaliničnosti koji može dostići i 69 %, kristališe u obliku ortorombične kristalne ćelije sa dimenzijama $a = 7.496 \pm 0,002 \text{ \AA}$, $b = 4,974 \pm 0,001 \text{ \AA}$, $c = 17,297 \pm 0,023 \text{ \AA}$. [7] Fizička, hemijska i termička svojstva PCL-a zavise od njegove molarne mase i stepena kristaliničnosti, a neka od svojstava i opseg njihovih vrednosti su prikazana u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Pojedine karakteristike PCL-a. [8-10]

Svojstva	Opseg vrednosti
Srednja vrednost molarne mase (M_n , g/mol)	530 - 630000
Gustina (ρ , g/cm ³)	1,071-1,200
Temperatura ostakljivanja (T_g , °C)	(-65) - (-60)
Temperatura topljenja (T_m , °C)	56 - 65
Temperatura razgradnje (°C)	300-350
Inherentna viskoznost (η_{inh} , cm ³ /g)	100 - 130
Zatezna čvrstoća (σ , MPa)	4 - 785
Young-ov modul (E , GPa)	0,21 - 0,44
Izduženje pri kidanju (ϵ , %)	20 - 1000

Na sobnoj temperaturi, PCL je dobro rastvoran u hloroformu, dihlormetanu, ugljen-tetrahloridu, benzenu, toluenu, cikloheksanonu i 2-nitropropanu; slabo je rastvoran u acetonu, 2-butanonu, etil-acetatu, dimetilformamidu i acetonitrilu, dok je potpuno nerastvoran u alkoholima, petroletru, dietil-etri i vodi. Jedno od važnih svojstava PCL-a je njegova mešljivost sa drugim polimerima, kao što su poli(vinil-hlorid), poli(stiren-akrilonitril), sa polikarbonatima, nitratom celuloze i celuloza-butiratom, a kompatibilan je sa polietilenom, poli(propilenom), prirodnom gumom, poli(vinil-acetatom) i poli-(etilen-propilenom).

Sa razvojem biodegradabilnih polimera, PCL je postao predmet brojnih istraživanja. Iako je na početku privlačio pažnju istraživača, PCL je ubrzo pao u zaborav zbog sve veće

popularnosti drugih polimera kao što su polilaktidi i poliglikolidi, koji su se mogli resorbovati u organizmu nakon kratkog vremena. Ovi polimeri su predstavljali dobre polimerne matrice u sistemima gde je bilo potrebno postići kratkoročno kontrolisano otpuštanje leka tokom nekoliko dana ili nedelja, a za njihovu potpunu resorpciju je bilo potrebno 2 – 4 meseca nakon implantacije. PCL ne ispunjava navedene uslove, a ne poseduje ni dovoljno dobra mehanička svojstva da bi se koristio kao implant. Takođe, sa medicinskog aspekta i aspekta kontrolisanog otpuštanja lekova, smatralo se da polimeri koji se brže resorbuju imaju manje neželjenih svojstava u poređenju sa dugim vremenom degradacije PCL-a (3 – 4 godine). Međutim, u poslednje dve decenije, zabeležen je porast broja objavljenih radova koji se odnose na primenu PCL u oblasti biomaterijala. Ponovno interesovanje za PCL kao biomaterijala počelo je sa razvojem nove oblasti – inženjerstva tkiva, jer je PCL usled dobrih reoloških i viskoelastičnih svojstava mogao da se preradi u razne potpore ćelijskom matriksu, tzv. "scaffolde". Njegova prednost u odnosu na druge sintetske poliestre jeste to što je proces proizvodnje relativno jeftin, a i odobren je od strane FDA ("Food and Drug Administration"). [11]

2.3. Sinteza PCL-a

Postoje dva načina sinteze poli(ϵ -kaprolaktona): reakcijom polikondenzacije hidroksikarboksilne kiseline (6-hidroksiheksanonska kiselina) i polimerizacijom otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona (ϵ -CL).

Sinteza PCL-a reakcijom polikondenzacije

Sinteza poli(ϵ -kaprolaktona) polikondenzacijom se veoma retko koristi jer se dobija PCL malih molarnih masa. Reakcijom polikondenzacije 6-hidroksiheksanske kiseline (pod sniženim pritiskom, na 150 °C) su dobijeni oligomeri PCL-a, pri čemu je bilo neophodno efikasno uklanjanje vode koja nastaje kao sporedni proizvod u ovoj ravnotežnoj reakciji, kako bi se favorizovala direktna reakcija, u smeru nastajanja polimera. [12]

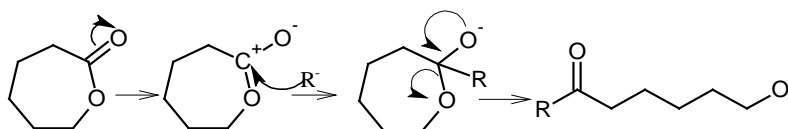
Kao katalizator u reakcijama polikondenzacije se mogu koristiti i enzimi. Tako je polimerizacijom 6-hidroksikapronske kiseline pomoću lipaza iz soja *Candida antarctica* sintetisan PCL molarne mase, M_n , oko 9000 g/mol i polidisperznosti oko 1,5. [13] Upotrebom lipaza iz soja *Pseudomonas*, sintetisan je PCL iz etil-6-hidroksiheksanoata sa srednjom molarnom masom oko 5400 g/mol (indeks polidisperznosti 2,26). [14]

Polimerizacija otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona

Reakcije polimerizacije otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona se mogu odigravati različitim mehanizmima: anjonski, katjonski, aktivacijom monomera i koordinaciono-insercionim mehanizmom, u zavisnosti od vrste katalizatora koji se koristi. Kao katalitički sistemi se mogu koristiti organski katalizatori, metalni katalizatori i enzimi. Polimerizacije otvaranja prstena se najčešće koriste za sintezu PCL-a jer se dobijaju polimeri većih molarnih masa, veći je stepen konverzije i blaži su reakcioni uslovi.

- **Anjonska ROP**

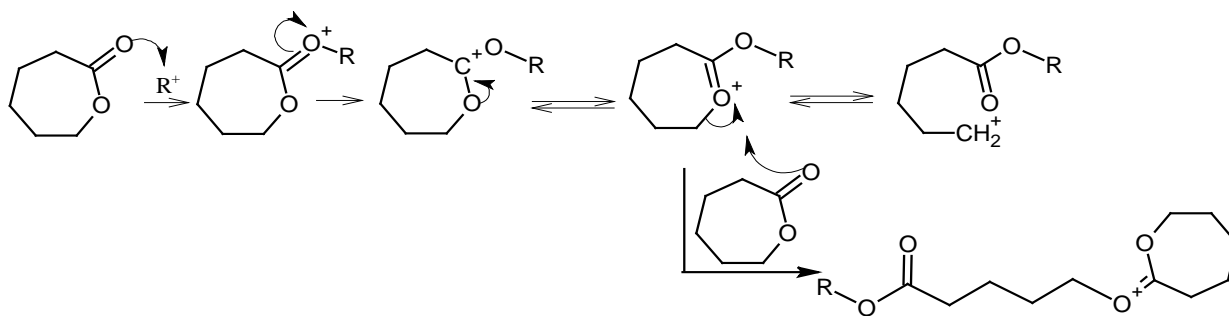
Tokom anjonske polimerizacije dolazi do stvaranje anjonskih vrsta koje napadaju karbonilni ugljenikov atom monomera i dolazi do otvaranja prstena ϵ -CL (Shema 2.1.). Do otvaranja prstena monomera dolazi raskidanjem veze između kiseonika i ugljenika iz acil-grupe pri čemu nastaje alkoksid. [15] Glavni nedostatak ovog načina polimerizacije je pojava intramolekulske transesterifikacije (Shema 2.5.) u sledećoj fazi polimerizacije, koja se još i naziva "back-biting", usled čega može doći do nastanka polimera manjih molarnih masa ili cikličnih oligomera. Kod anjonskih ROP, koriste se katalizatori na bazi alkalnih metala, kao što su litijum-diizopropilamid, LDA, natrijum-ciklopentadienil, kako u polarnim, tako i u nepolarnim rastvaračima, ili u masi. Pored sporednih reakcija transesterifikacije, koje su glavni nedostatak anjonske ROP, katalizatori na bazi alkalnih metala imaju tendenciju da stvaraju agregate smanjujući tako rastvorljivost, što predstavlja dodatni nedostatak ovog načina sinteze.



Shema 2.1. Mehanizam inicijalnog koraka anjonske ROP. [16]

- **Katjonska ROP**

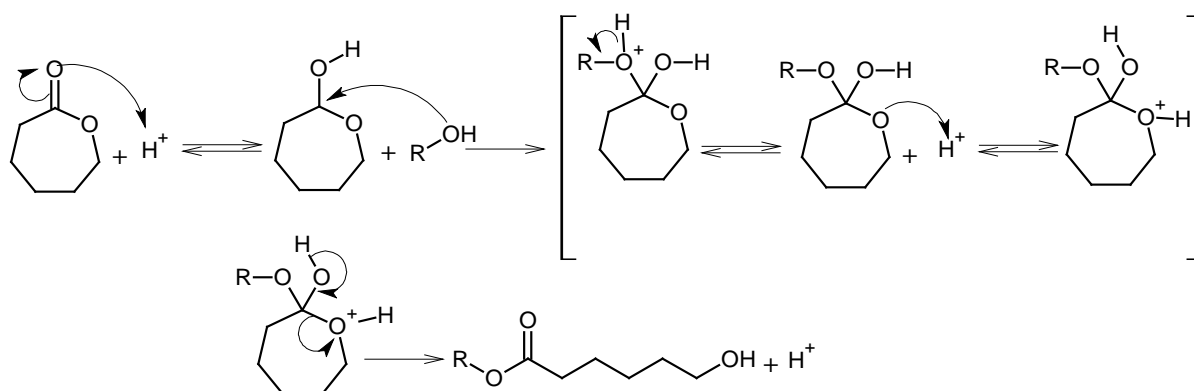
Katjonska polimerizacija otvaranja prstena (Shema 2.2.) podrazumeva nastajanje katjonskih vrsta koje bivaju napadnute od strane karbonilnog kiseonika monomera kroz reakciju bimolekularne nukleofilne supstitucije (S_N2).



Shema 2.2. Mehanizam inicijalnog koraka katjonske ROP. [15]

- **ROP aktivirana monomerom**

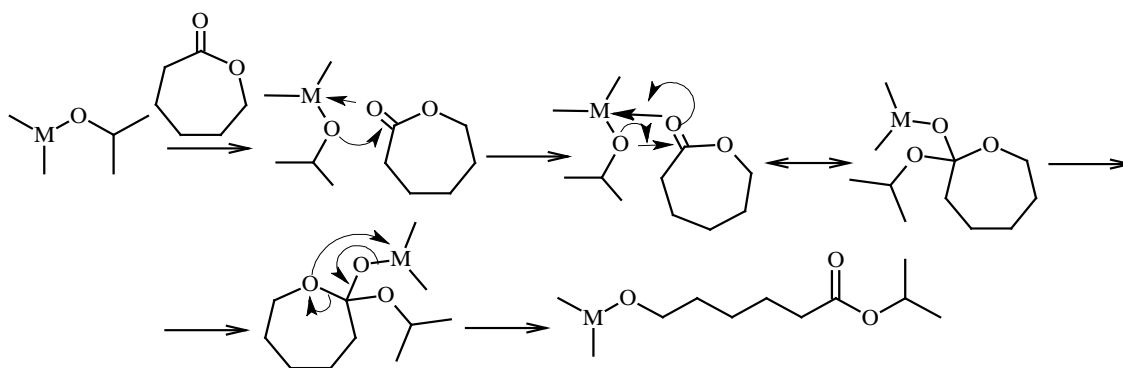
Polimerizacija otvaranja prstena aktivirana monomerom (Shema 2.3.) uključuje aktivaciju molekula monomera katalizatorom, nakon čega dolazi do napada ovako aktiviranog monomera na kraj polimernog lanca. [17]



Shema 2.3. Mehanizam inicijalne faze ROP aktiviranim monomerom.[17]

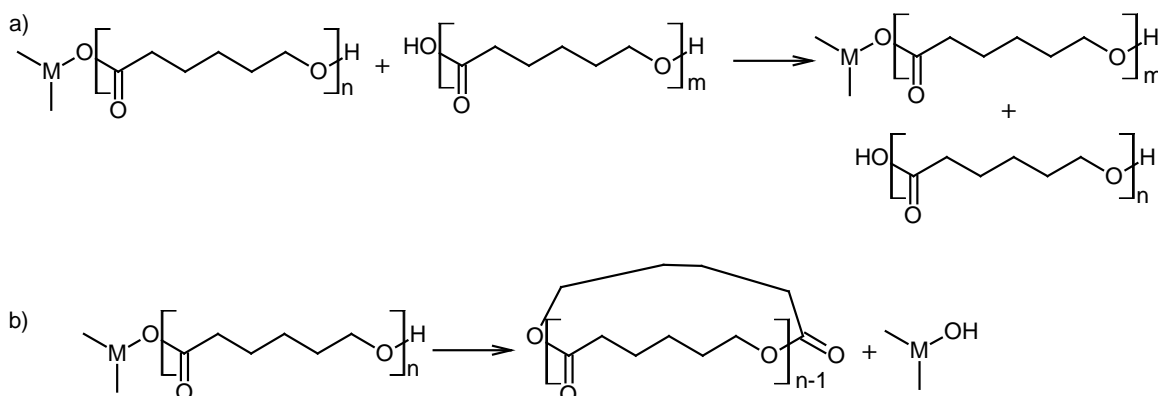
- **Koordinaciono-inserciona ROP**

Koordinaciono-inserciona polimerizacija otvaranja prstena (Shema 2.4.) je najčešći način polimerizacije otvaranja prstena. Naziva se još i pseudo-anjonska ROP. Propagacija se odigrava koordinacijom monomera za katalizator i insercijom molekula monomera između veze metala i kiseonika iz katalizatora. Tokom propagacije, rastući lanac je zakačen za metal gradeći alkoksid. [15]



Shema 2.4. Mehanizam inicijalnog koraka koordinaciono-insercije ROP. [15, 16]

Tokom reakcije polimerizacije otvaranja prstena ϵ -CL uz upotrebu katalizatora i inicijatora, može doći do pojave sporednih reakcija. Kao sporedne reakcije se odigravaju intermolekulska transesterifikacija (Shema 2.5.a) i intramolekulska transesterifikacija (Shema 2.5.b). Ove reakcije se generalno odigravaju tokom kasnijih faza polimerizacije, najčešće na višim temperaturama, što ima za posledicu povećanje polidisperznosti i nemogućnost kontrole reakcije polimerizacije.



Shema 2.5. Moguće sporedne reakcije kod reakcija ROP PCL-a: a) intermolekulska transesterifikacija, b) intramolekulske transesterifikacije. [16]

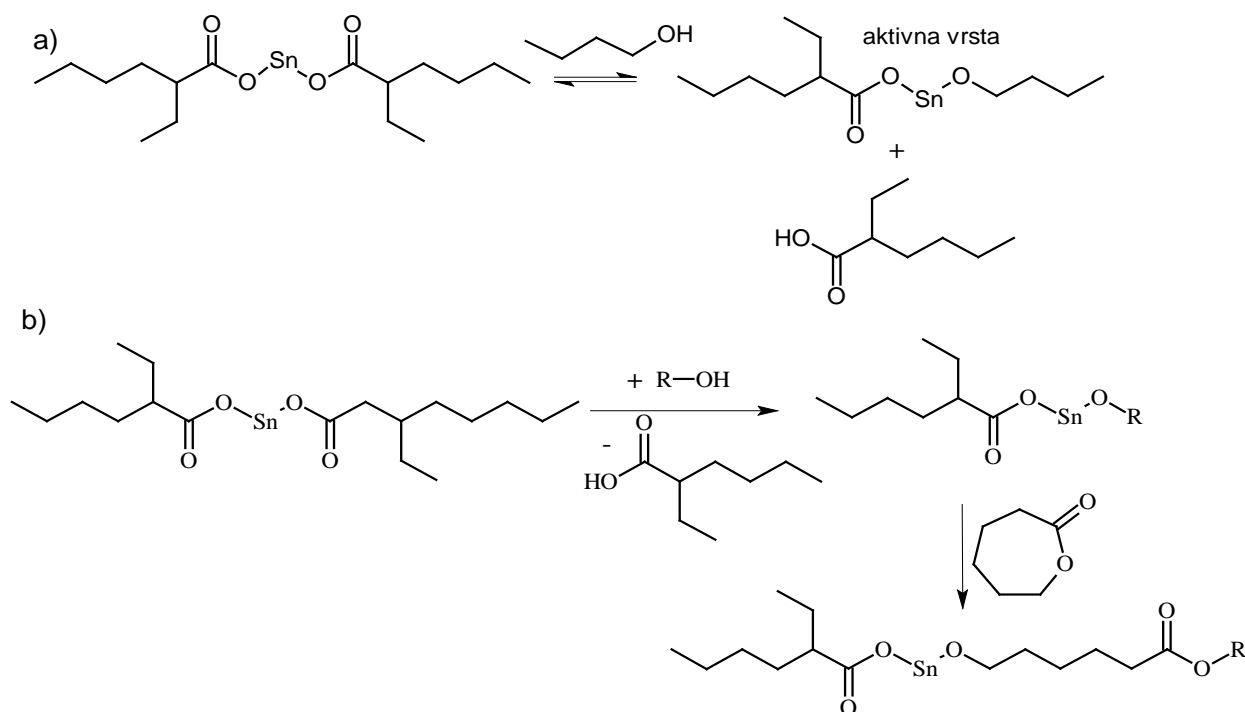
U reakcijama polimerizacije otvaranja prstena ϵ -CL se koristi veliki broj različitih katalizatora, kao što su: katalizatori na bazi alkalnih metala (litijum-diizopropilamid, LDA), katalizatori na bazi zemnoalkalnih metala (kalcijuma i magnezijuma), katalizatori na bazi slabih metala (aluminijuma i kalaja; trietil-aluminijumom i kalaj-oktoat).

2.3.1. Katalizatori sa kalajem kao centralnim atomom

Kalaj(II)-etilheksanoat (ili kalaj-oktoat, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$) je svakako najviše korišćen katalizator u reakcijama polimerizacije otvaranja prstena ϵ -CL. Efikasan je, komercijalno

dostupan, lak za rukovanje i rastvoran u najčešće korišćenim organskim rastvaračima. [18] Katalizator kalaj-oktoat je neophodno koristiti zajedno sa nekim nukleofilnim jedinjenjem (alkohol) za iniciranje reakcije ukoliko se teži kontrolisanoj sintezi polimera. Glavni nedostatak ovog katalizatora jeste zahtev za visokom temperaturom koja pospešuje inter- i intramolekulsku esterifikaciju što dalje utiče na veću polidisperznost dobijenog polimera.

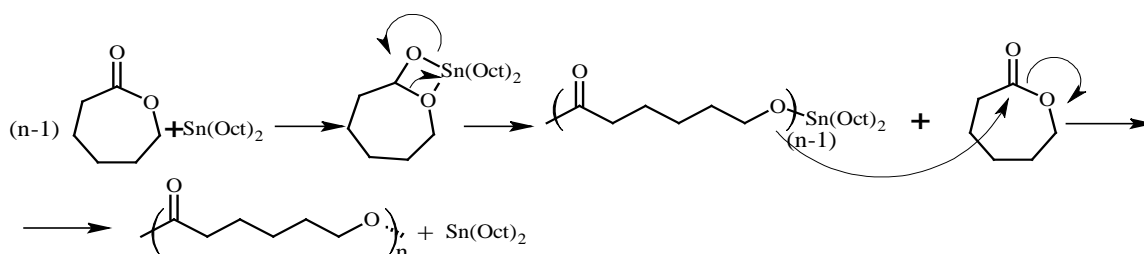
Kowalski i saradnici su detaljno ispitivali mehanizam polimerizacije cikličnih estara korišćenjem $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ kao katalizatora, kao i uticaj reakcionih uslova na stepen polimerizacije. [19] Polimerizacija samo pomoću $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ je veoma spor proces i da bi se ubrzala reakcija potrebno je da se kalaj-oktoat aktivira sa, na primer, hidroksilnom grupom, najčešće nekog alkohola (reakcija koja se još naziva i preinicijacija i stvaranje stvarnog katalizatora), nakon čega sledi faza inicijacije. Polimerizacija cikličnih estara u prisustvu kalaj(II)-oktoata zahteva prvo stvaranje alkoksidne veze između kalaja i kiseonika iz hidroksilne grupe (Shema 2.6.a). Nastali alkoksid dalje inicira reakciju insercije prvog monomera nakon čega sledi propagacija kao drugi korak polimerizacije (Slika 2.6.b). [20-22].



Shema 2.6. a) Stvaranje aktivnih vrsta kod ROP ϵ -CL pomoću kalaj-oktoata kao katalizatora; b) Inicijalni korak ROP ϵ -CL inicirane alkoholom i katalizovane kalaj-oktoatom. [23]

Prilikom sinteze blok kopolimera (diblok i triblok) na bazi PCL-a i PEO, dve terminalne hidroksilne grupe PEO kod triblok, odnosno jedna iz metoksi-PEO kod diblok

kopolimera, reaguju sa $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ pri čemu dolazi do stvaranja alkoksida koji dalje služi kao inicijatorska grupa u sintezi ovih blok kopolimera. U sintezi homopolimera PCL-a, reakcija polimerizacije se odigrava bez preinicijacije kalaj(II)-oktoata, ali se pretpostavlja da se reakcija odigrava zahvaljujući minimalnom prisustvu hidroksilnih nečistoća u katalizatoru i monomeru. Kod koordinacione polimerizacije otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona (uz upotrebu kalaj-oktoat, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, kao katalizatora) prvo dolazi do koordinovanjem monomera ϵ -kaprolaktona za aktivno mesto inicijatora pri čemu nastaje četvoročlano prelazno stanje (Shema 2.7.). Nakon toga se raskida veza kiseonika i ugljenika iz acil-grupe i dolazi do insercije odnosno umetanja između veze metal-kiseonik. Reakcija se nastavlja napadom kiseonika koordinovanog za inicijator na karbonilni ugljenik iz laktonskog prstena. Često se za opisani način polimerizacije sreće naziv koordinaciono-insercionna jer prvo dolazi do reakcije koordinovanja, a zatim insertovanja. Srednja vrednost molarna mase, M_n , PCL polimera dobijene ovim načinom sinteze varira od 3000 do 80000 g/mol. Prema literaturnim navodima u prisustvu kalaj-oktoata ostvarena je sinteza PCL sa molarnom masom od čak 1×10^6 g/mol.

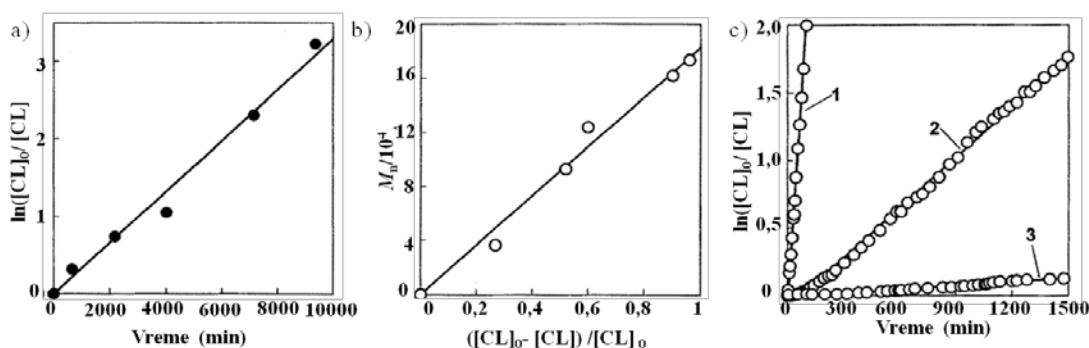


Shema 2.7. Mehanizam sinteze poli(ϵ -kaprolaktona) u prisustvu kalaj-oktoata, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ kao katalizatora.

Reakcija polimerizacije ϵ -kaprolaktona, CL, pomoću $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ se odigrava kao "živa" polimerizacija (temperatura od 80°C , THF kao rastvaraču), na šta ukazuje linearna zavisnost vrednosti $\ln[M_0]/[M]$ od vremena (Slika 2.3.a). Zavisnost molarne mase, M_n , nastalih poliestara u funkciji konverzije monomera je, takođe, linearna (Slika 2.3.b) što je dodatna potvrda odigravanja "žive" polimerizacije ϵ -CL. U navedenim uslovima odigravanja reakcije, nije detektovano postojanje reakcija transfera (osim reakcije transesterifikacije) ili ireverzibilne terminacije. [23] Sporedna reakcija intramolekulske transesterifikacije ("back-biting") vodi nastajanju cikličnih oligomera i pod kontrolisanim uslovima sinteze se može uspešno sprečiti nastajanje ciklika. [24]

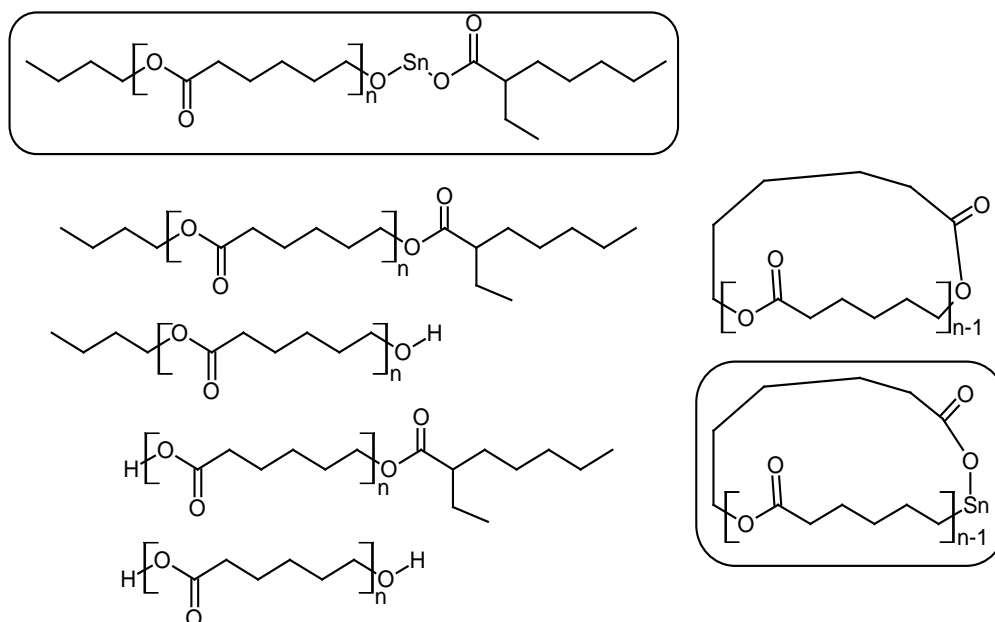
Dokazano je da brzina odigravanja reakcije polimerizacije ϵ -CL zavisi od čistoće upotrebljenog $\text{Sn}(\text{Oct})_2$; što je veći stepen čistoće, manja je brzina odigravanja polimerizacije.

[25] Kinetika reakcije polimerizacije kada se koristi prečišćeni kalaj-oktoat je prikazana na Slici 2.3.c (prava označena brojem 2). Dodatkom alkohola butanola, BuOH, reakcija se značajno ubrzava u poređenju sa reakcijom koja se odigrava bez BuOH (Slika 2.3.c, prava 1). Brzina reakcije raste za oko 20 puta, dok stepen polimerizovanja opada više od 100 puta, ukazujući da BuOH ima ulogu inicijatora. Kako dolazi i do smanjenja stepena polimerizovanja, BuOH ima ulogu i transfer agensa u reakciji transfera koja se javlja kao jedna od sporednih reakcija. Uvođenjem anhidrovane 2-etilheksanonske kiseline u sistem (Slika 2.3.c) prava 3), u koncentraciji koja je deset puta manja od početne koncentracije kalaj-oktoata, brzina reakcije opada više od 20 puta. Na osnovu vrednosti dobijenih molarnih masa je utvrđeno da oktanska kiselina nije ni inicijator, niti agens u reakciji transfera, jer se smanjuje brzina reakcije a molarna masa se ne menja. Oktanska kiselina zapravo smanjuje koncentraciju trenutno nastalih rastućih centara i ova deaktivacija može biti reverzna. [23]



Slika 2.3. a) Kinetika polimerizacije ϵ -kaprolaktona inicirana $\text{Sn}(\text{Oct})_2$: $[\text{CL}]_0 = 2 \text{ mol/L}$, $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]_0 = 0,15 \text{ mol/l}$, THF, $80 \text{ }^\circ\text{C}$, b) M_n u zavisnosti od konverzije monomera (ϵ -CL), c) kinetika polimerizacije ϵ -kaprolaktona: $[\text{CL}]_0 = 2 \text{ mol/l}$, $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]_0 = 0,05 \text{ mol/l}$; 1- dodat BuOH, 2- bez aditiva, 3- dodata 2-etilheksanonska kiselina. [23]

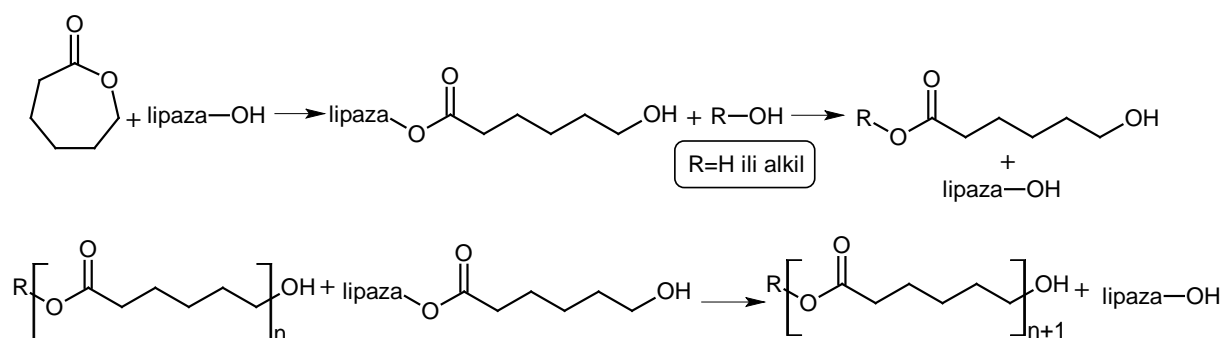
Alkoholi imaju ulogu inicijatora kada se dodaju u istoj ili duplo većoj količini u odnosu na katalizator. Kada se doda u višku, igra ulogu transfera. Ukoliko se reakcija odigrava bez prisustva alkohola sa terminalnim OH grupama, nečistoće prisutne u kalaj(II)-oktoatu (oko 1,8 mol% OH grupa nakon dve uzastopne destilacije pod sniženim pritiskom) imaju ulogu inicijatora. Bez obzira na sve, ukoliko nije dodato neko nukleofilno jedinjenje, čak i da se polimerizacija odigrava, nije kontrolisana. Alkoholi kao što je etanol (EtOH) se mogu koristiti za kontrolu molarne mase polimera. Kowalski i saradnici su pokazali, pomoću MALDI-TOF analize, da postoji nekoliko vrsta jedinjenja koja nastaju tokom reakcije polimerizacije (Slika 2.4.), od kojih dva u najvećem procentu. [26]



Slika 2.4. Različiti polimeri koji nastaju tokom ROP ϵ -CL inicirane 1-butanolom u prisustvu kalaj(II)-oktoata kao katalizatora; uokvirena jedinjenja nastaju u višku. [26]

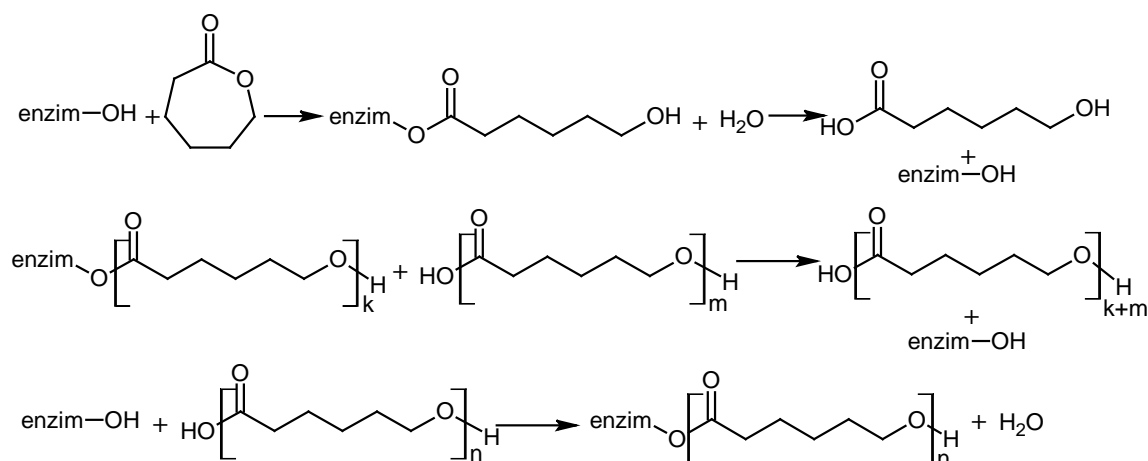
2.3.2. Enzimska polimerizacija otvaranja prstena (ϵ -ROP)

Jedan od načina dobijanja poli(ϵ -kaprolaktona) jeste i reakcija polimerizacije otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona u prisustvu enzima, najčešće lipaza, koje katališu ovaj proces. U prvom koraku enzimske polimerizacije otvaranja prstena pomoću lipaza, enzim koji poseduje slobodnu hidroksilnu grupu (aktivno mesto enzima je najčešće aminokiselina serin) reaguje sa monomerom pri čemu nastaje aktivirani kompleks lipaza- ϵ -CL (estara koji je zapravo enzimski aktiviran monomer). Faza inicijacije se odigrava nukleofilnim napadom vode, koja se najčešće nalazi u enzimima, na ugljenikov atom iz acil grupe pri čemu nastaje 6-hidroksiheksanska kiselina, najkraći segment koji dalje učestvuje u propagaciji (Shema 2.8.). U fazi propagacije, terminalne hidroksilne grupe nastalog intermedijera (koji započinje propagaciju) napadaju aktivirani kompleks enzim- ϵ -CL, i polimer se produžava za još jednu jedinicu. Faza reakcije koja kontroliše proces polimerizacije je nastajanje kompleksa enzim-monomer. [27]



Shema 2.8. Mehanizam enzimske polimerizacije otvaranja prstena ϵ -CL. [27, 28]

Kod reakcija enzimske ROP, prisustvo vode ima važnu ulogu u procesu sinteze: sadržaj vode u reakcionoj smeši ne sme biti ni mnogo veliki ni mnogo mali kako bi se dobili polimeri velikih molarnih masa i male polidisperznosti (u slučaju korišćenja *Pseudomonas* lipaza). U skladu sa tim, Dong je predložio malo drugačiji mehanizam polimerizacije ϵ -CL pomoću *Pseudomonas* lipaza, pri čemu se otvaranje prstena ϵ -CL događa u ranoj fazi polimerizacije a zatim dolazi do linearne kondenzacije (Shema 2.9.). [29]



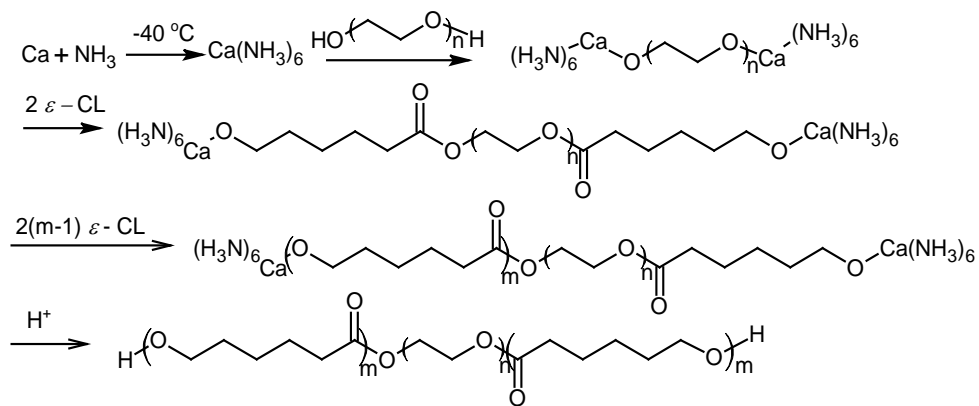
Shema 2.9. Mehanizam enzimske polimerizacije otvaranjem prstena ϵ -CL. [29]

Do sada je ispitan veliki broj enzima koji se mogu koristiti kao katalizatori u ROP polimerizacijama laktona, pre svega ϵ -CL, a među njima: *Aspergillus niger* (lipaza A), *Candida cylindracea* (odnosno *Cylindracea rugosa*, lipaza B), *C. antarctica* (lipaza CA), *Pseudomonas aeruginosa* (lipaza PA), *Pseudomonas cepacia* (još se sreće i naziv *Burkholderia cepacia* lipaza PS-30), *Pseudomonas fluorescens* (lipasa P i PF), *Rhizopus delemer* (lipaza RD), *Rhizopus japonicus* (lipaza RJ), itd. Izborom odgovarajućih uslova

sinteze (rastvarača, pH vrednosti, temperature) mogu se dobiti polimeri velikih molarnih masa, sa malim vrednostima indeksa polidisperznosti. [8]

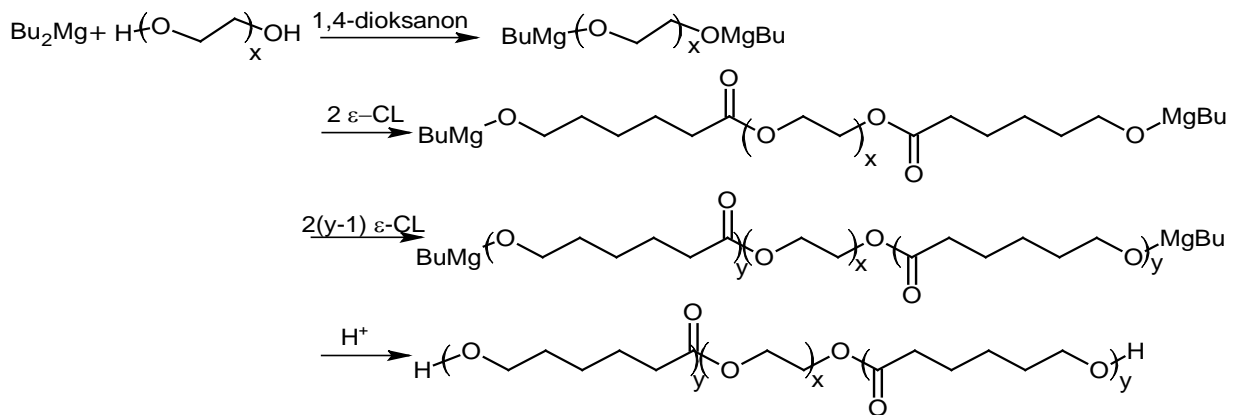
2.4. Sinteza PCL/PEO blok kopolimera upotrebom različitih katalizatora

Pored sinteza PCL i PCL/PEO blok kopolimera reakcijom polimerizacije otvaranja prstena monomera ϵ -kaprolaktona, pomoću $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ kao katalizatora, sintezu triblok kopolimera PCL/PEO/PCL moguće je izvršiti i pomoću kalcijum-amino kompleksa kao katalizatora takođe polimerizacijom otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona inicirana terminalnim OH-grupama PEO različitih molarnih masa (Shema 2.10.). Reakcija započinje građenjem alkoksidne veze metala (kalcijumom) sa poli(etilen-oksidom) u prvoj fazi reakcije, a zatim napadom kiseonikovog atoma iz alkoksidne veze na karbonilni C atom iz ϵ -kaprolaktonskog prstena. [30]



Shema 2.10. Sinteze PCL/PEO/PCL triblok kopolimera u prisustvu kalcijum-amino kompleksa kao katalizatora. [30]

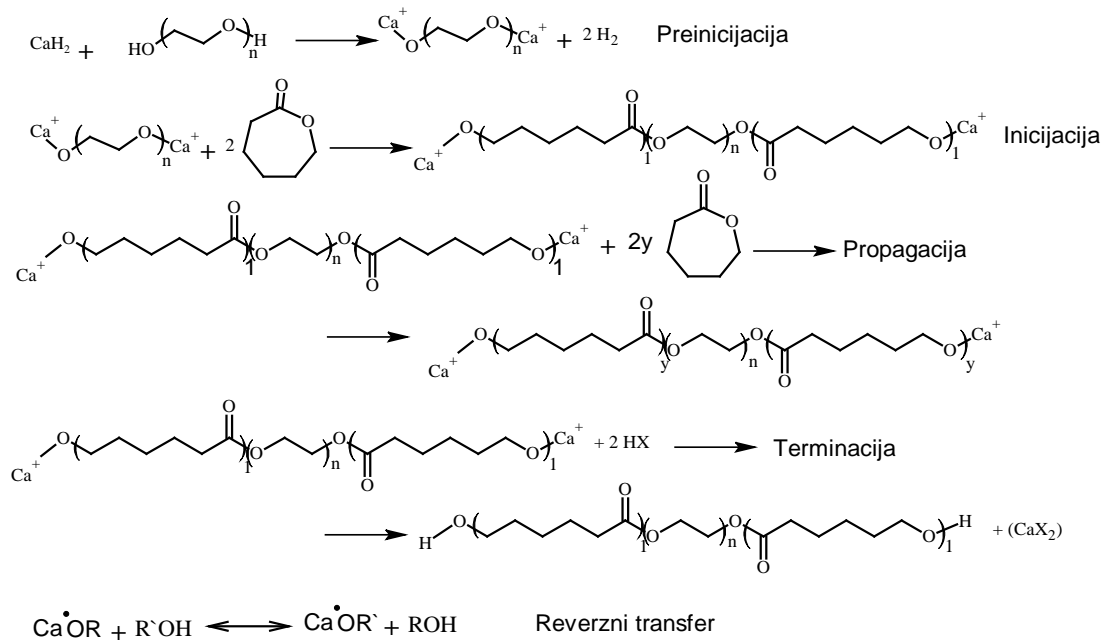
Kako je potpuno uklanjanje katalizatora iz polimera teško ili nemoguće, netoksični katalizatori kao što su Ca-, Fe-, Mg-katalizatori se najčešće koriste za sintezu polimera namenjenih za medicinske i farmaceutske svrhe, jer su ovi metali (Ca, Mg) normalno uključeni u metaboličke procese. Wei i saradnici [31] su koristili butil-magnezijum kao katalizator za sintezu triblok kopolimera sa različitim dužinama PCL i PEO segmenata (Shema 2.11.). Mehanizam odigravanja ove reakcije je veoma sličan mehanizmu sa kompleksom kalcijuma kao metala, samo što je korišćen magnezijum koji u ovom slučaju gradi alkoksidnu vezu sa PEO i dalje inicira reakciju.



Shema 2.11. Mehanizam sinteze PCL/PEO/PCL triblok kopolimera u prisustvu butil-magnezijuma kao katalizatora. [31]

Triblok kopolimeri, PCL/PEO/PCL, mogu se uspešno sintetisati i bez upotrebe katalizatora, samo u prisustvu dihidroksi-poli(etilen-oksida) kao makroinicijatora, a strukturnom analizom (kvantitativna ^{13}C NMR analiza) je potvrđeno kvantitativno inkorporiranje $\varepsilon\text{-CL}$ monomera. [32, 33]

Kao katalizator u sintezi triblok kopolimera izgrađenih iz PCL-a i PEO blokova se može koristiti i kalcijum-hidrid, CaH_2 (Shema 2.12.). Moguće reakcije transesterifikacije su svedene na minimum ali je i brzina polimerizacije bila veoma mala i na datoj temperaturi je bilo potrebno nekoliko dana da se postigne molarna masa od 10000 g/mol. Reakcija polimerizacije se veoma sporo odigravala, u poređenju sa drugim kalcijum-alkoksidnim sistemima, kao posledica nastajanja malih količina kalcijum-alkoksida koji inicira reakciju. [34]

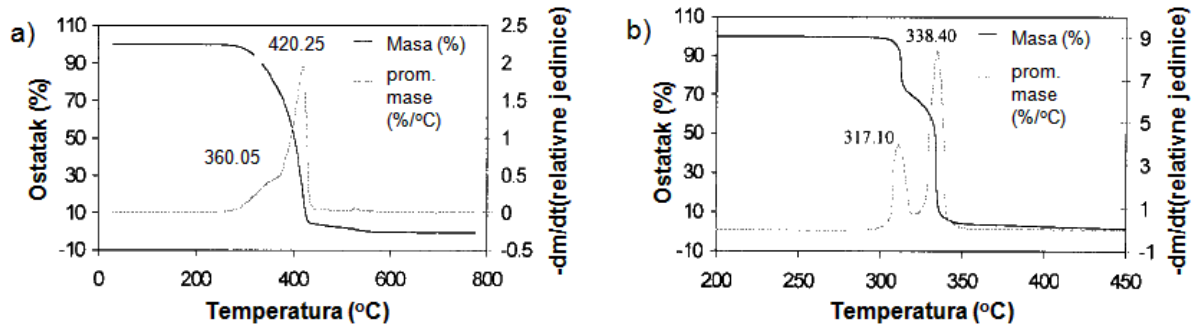


Shema 2.12. Sinteza PCL/PEO/PCL triblok kopolimera pomoću CaH_2 kao katalizatora. [34]

2.5. Termička svojstva PCL-a

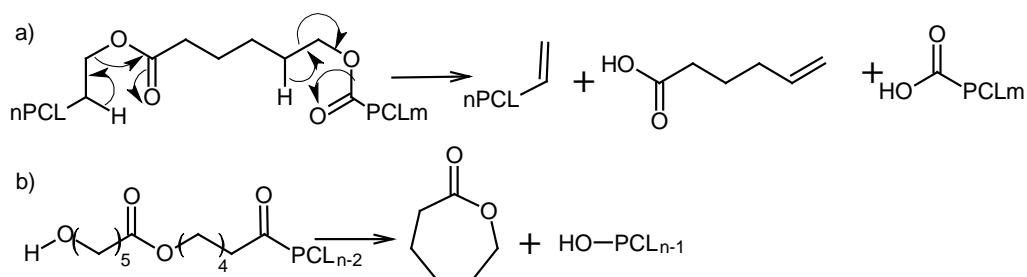
Poli(ϵ -kapolakton) je privukao pažnju istraživača pre svega zbog svoje biodegradabilnosti, biokompatibilnosti i termoplastičnih svojstava. Međutim, ispitivanje i razumevanje njegove termičke stabilnosti i termičke degradacije je veoma važno zbog preradivosti, primene i termičke reciklaže.

Ispitivanjem termičke degradacije PCL-a standardnom termogravimetrijskom analizom, u termogramu se uočava glavni stupanj degradacije na 420°C ukazujući da PCL degradira u jednom koraku (Slika 2.5.a). Međutim, na DTGA krivoj se zapaža postojanje manjeg pika na 360°C što može davati naznake da se termička degradacija ipak odvija u dva uzastopna koraka. Termogravimetrijskom analizom visoke rezolucije pouzdanije je utvrđen mehanizam degradacije PCL (M_n 22500 g/mol), odnosno, utvrđeno je da se PCL termički razgrađuje u dva koraka, na šta jasno ukazuju postojanje dva pika u termogramu: na 317 i 338°C (Slika 2.5.b).



Slika 2.5. a) TGA termogram PCL (M_n 22500 g/mol), brzina zagrevanja $20^\circ\text{C}/\text{min}$; b) TGA visoke rezolucije PCL, brzina zagrevanja $30^\circ\text{C}/\text{min}$. [35]

Prisustvo dva različita pika u prikazanim termogramima dovodi do zaključka da se termička degradacija PCL odigrava u dva koraka, različitim mehanizmima i na različitim temperaturama. U prvom degradacionom koraku nastaju voda, CO_2 i karboksilne kiseline kao glavni proizvodi. Poznato je da estri kod kojih alkil grupa ima β -vodonikov atom mogu podleći pirolizi, dajući odgovarajuće kiseline i olefin, mehanizmom eliminacije preko šestočlanog prelaznog stanja. U slučaju poliestarskih lanaca, kao što je PCL, piroliza dovodi do nasumičnog raskidanja veza duž celog lanca. Nakon pirolize između dve estarske veze u polimernom lancu, kao jedan od reakcionih proizvoda nastaje 5-heksenska kiselina koja je nestabilna i lako podleže razgradnji. Oslobođanje CO_2 se dešava nakon dekarboksilacije 5-heksenske kiseline (Shema 2.13.a). Nastajanje vode tokom termičke razgradnje se može objasniti kondenzacijom hidroksilnih i/ili karboksilnih kiselina nastalih *in situ* na visokoj temperaturi.



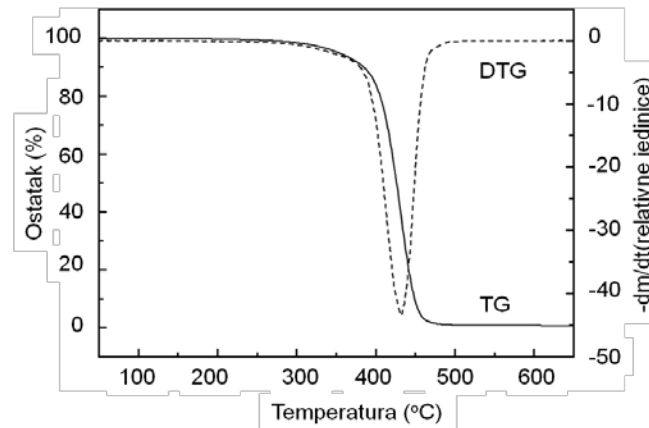
Shema 2.13. a) Nasumično raskidanje lanca PCL prilikom termičke degradacije; b) Drugi degradacioni korak PCL mehanizmom depolimerizacije sa krajeva lanaca.[35]

Piroliza nastavlja da se odigrava i na visokim temperaturama, pa voda, CO_2 i 5-heksenska kiselina nastaju i u drugom degradacionom koraku, ali u drugom degradacionom koraku dolazi i do nastajanja monomera ϵ -kaprolaktona. Na višim temperaturama

(430 °C), PCL lanci se raskidaju mehanizmom depolimerizacije (Shema 2.13.b), odnosno raskidanje veza sa krajeva lanaca. Za odigravanje ove reakcije potrebno je prisustvo hidroksilnih završnih grupa jer se depolimerizacija ne može odigrati direktno sa krajeva lanaca generisanih pirolizom estara, tj. olefinske i karboksilne završne grupe. Termička degradacija PCL-a, na osnovu TGA visoke rezolucije se odigrava prema mehanizmu gde u prvom koraku dolazi do nasumičnog raskidanja PCL lanaca i *cis*-eliminacije, dok u dugom koraku proces *cis*-eliminacije prati i raskidanje lanaca sa krajeva. [35]

Kada se govori o uticaju molarne mase na termičku degradaciju PCL-a, manje vrednosti molarne mase značajno smanjuju termičku stabilnost poliestarskih lanaca. Shodno tome, prvi degradacioni korak se odigrava na nižim temperaturama, npr. početak degradacije za PCL M_n 1800 g/mol je detektovan na 230 °C, a za PCL od M_n 42450 g/mol na 335 °C. Ovakvo ponašanje se može objasniti statističkim raskidanjem lanaca procesom pirolize u prvom degradacionom koraku. Verovatnoća nastajanja fragmenata male molarne mase koji su nestabilni na ovoj temperaturi (340 °C) raste sa smanjenjem molarne mase PCL lanaca. [35]

Sa druge strane, postoje tvrdnje da se PCL termički degradira u jednom koraku. Tačnije, u termogramima TGA i DTGA komercijalnog PCL homopolimera (M_n 80000 g/mol) se uočava jedan degradacioni pik bez ostataka (Slika 2.6.). DTG kriva pokazuje jedan pik čiji se maksimum nalazi na 432 °C kada PCL degradira maksimalnom brzinom. Tokom celog procesa degradacije, detektuje se prisustvo CO₂ i heksanske kiseline (detektovane FTIR analizom) na osnovu čega se može zaključiti da se raskidanje PCL lanaca odigrava nasumično *cis*-eliminacijom. [36] Praćenjem kinetike ovog procesa, uočeno je da se energija aktivacije (E_a) tokom degradacije ne menja, što je još jedna potvrda jednostepenog mehanizma degradacije PCL-a. Ipak, Aoyagi i ostali navode da tvrdnje o degradaciji PCL-a u dva koraka, različitim mehanizmima, nisu neosnovane, i da se standardnom TG analizom ne mogu detektovati dve različite, međusobno bliske, temperature na kojima dolazi do različitih načina razgradnje PCL-a, kao što je to detektovano TGA visoke rezolucije. [9]

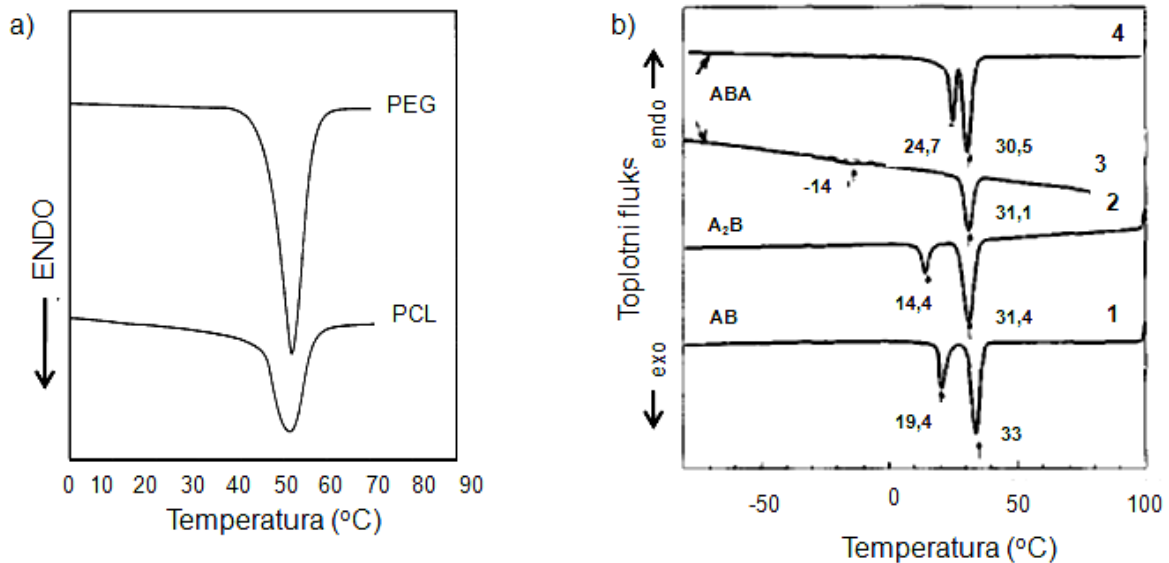


Slika 2.6. TGA/DTG krive PCL homopolimera na 20 °C/min u atmosferi azota.[36]

Zbog postojanja navedenih oprečnih tvrdnji, a u cilju razjašnjenja mehanizma degradacije PCL-a, ispitana je termička degradacija pri uslovima ne-izoternskog zagrevanja (brzina zagrevanja, 5 °C min⁻¹, u intervalu od 50 do 800 °C) i izoternskog zagrevanja (zagrevanje do određenih temperatura: 320, 340, 360 °C, i držanje na datoj temperaturi određeno vreme). Na osnovu eksperimentalnih podataka, bilo je očigledno da se degradacija PCL-a odigrava kroz dva mehanizma: nasumično raskidanje lanaca i specifično raskidanje lanaca sa krajeva. Praćenjem kinetike tokom ova dva procesa, a na osnovu promene mase koja se beleži i u ranoj fazi degradacije, utvrdilo se da je mehanizam specifičnog raskidanja prisutan i na početku degradacije, odnosno da se proces *cis*-eliminacije i depolimerizacija PCL lanaca dešavaju istovremeno, kao dva paralelna procesa, a ne jedan za drugim, kako je ranije navođeno. Iako se dešavaju paralelno, nasumično raskidanje lanaca se dominantno odigrava na početku (na nižim temperaturama), dok specifično raskidanje sa krajeva lanaca dominira u kasnijoj fazi degradacije (na višim temperaturama). [37, 38] Dok je termička degradacija PCL-a bila predmet studija i postoje brojna istraživanja na ovu temu, o termičkoj degradaciji PCL blok kopolimera sa PEO se malo zna i uglavnom su ispitivanja termičkih svojstava ovog tipa kopolimera bila usmerena na ispitivanje DSC analizom.

Termička svojstva blok kopolimera na bazi PCL i PEO zavise od njihove konfiguracije, molarne mase segmenata, sastava kopolimera (pre svega odnosa PCL/PEO). Poznato je da PEO kristališe i pokazuje višestruke endotermne pikove pri DSC analizi kada je njegova molarna masa veća od 2000 g/mol, što se može pripisati stvaranju nekoliko različitih kristalnih formi. PEO molarne mase 2000 g/mol pokazuje jedan pik na DSC termogramima, dok PEO molarne mase iznad 3000 g/mol daje dva pika. [39] PCL malih molarnih masa (molarne mase manje od 5000 g/mol) i PEO koji kristališe (Slika 2.7.) imaju slične temperature topljenja, u opsegu između 50 i 60 °C. Kristaliničnost PEO je veća od PCL

homopolimera (84,3 % u odnosu na 61,2 %). Kristaliničnost PEO homopolimera je veća nego PCL jer PEO homopolimer brže i lakše kristališe u poređenju sa PCL-om. [40]



Slika 2.7. a) DSC krive topljenja PEO ($M_n = 2000$ g/mol) i PCL ($M_n = 1500$ g/mol) homopolimera; [41] b) DSC krive hlađenja PCL/PEO blok kopolimera (A-B: PCL-PEO = 20500-5000; (A)₂B: (PCL)₂-PEO = (9000)₂-5000; A-B-A: PCL-PEO-PCL = 9000-4000-9000 g/mol)[42].

Kada je odnos PCL/PEO konstantan, dužina segmenata i način njihovog povezivanja određuju kristalizaciona svojstva i termičko ponašanje blok kopolimera. Tri različite konfiguracije blok kopolimera (diblok, AB, razgranati, A₂B i triblok, A-B-A) pokazuju različito termičko ponašanje, pri čemu PCL prvi kristališe i određuje konačnu strukturu kopolimera na taj način ometajući kristalizaciju PEO segmenta. [42] Pri konstantnim dužinama PEO segmenata, sa porastom dužine PCL segmenata u triblok kopolimerima dolazi do smanjenja kristalizacije PEO segmenta koji je na dva kraja kovalentno vezan za PCL što ometa njegovu kristalizaciju, a ukoliko su PCL segmenti dovoljno dugi, pik topljenja i kristalizacije PEO bloka potpuno nestaje. [30]

Promena odnosa PCL/PEO i kod diblok kopolimera (gde je dužina PEO segmenta iznosila 5000 g/mol) značajno menja njihova termička svojstva. Kristalisanje PCL segmenata zavisi od odnosa PCL/PEO na sledeći način: kod diblok kopolimera gde je odnos CL/EO manji od 1 postoje dva pika u DSC termogramu koja potiču od dve kristalne faze, PCL i PEO; dok temperature topljenja kopolimera kod kojih je CL/EO veće od 1, rastu sa porastom vrednosti CL/EO i pokazuju sve veću sličnost sa kristalisanjem homopolimera PCL. [43]

Podlašavanjem konfiguracije, sastava, molarne mase, dužine segmenta i odnosa PCL/PEO u diblok i triblok kopolimerima, mogu se dobiti polimeri sa tačno određenim, željenim termičkim svojstvima što umnogome proširuje njihovu potencijalnu primenu.

2.6. Biodegradabilnost

Biodegradacija je prirodan proces tokom kojeg se organska jedinjenja iz okoline pretvaraju u prostija jedinjenja, mineralizuju i uključuju u metaboličke cikluse (ciklus ugljenika, azota ili sumpora). Proces biodegradacije se može odigravati samo unutar biosfere jer je za odvijanje ovog procesa neophodno prisustvo mikroorganizama. Po uopštenoj definiciji to je proces unutar kojeg bakterije, gljivice i njihovi enzimi koriste organska jedinjenja kao izvor hrane, a njihova prvobitna forma nestaje. [44]

Ne postoji usaglašen stav o tome šta su biodegradabilni polimeri. Kada se govori o polimerima, treba imati na umu da nešto što je biodegradabilno ne mora biti i bioresorptivno. To znači da ako se polimer degradira i uklanja sa mesta delovanja *in vivo*, ne znači da će biti uklonjen iz organizma. Nasuprot tome, bioresorptivnost je pojam koji podrazumeva potpunu eliminaciju početnog, stranog materijala iz organizma i degradaciju proizvoda manjih molarnih masa bez sporednih produkata. Po Vert i saradnicima, [45] tačne definicije ovih pojmova glase:

Biodegradabilnim se smatraju čvrsti polimerni materijali i strukture koje podležu makromolekulske degradaciji sa dispergovanjem *in vivo* ali ne postoje dokazi o eliminaciji iz organizma (ova definicija isključuje razgradnju bakterijama i gljivama, kao i prirodnu degradaciju). Biodegradabilni polimerni sistemi ili strukture mogu biti napadnuti od strane bioloških elemenata i integrisani u sistem pri čemu kao posledica toga mogu nastati manji fragmenti ili sporedni proizvodi degradacije. Ovi fragmenti mogu biti uklonjeni sa mesta delovanja ali ne i iz organizma.

Bioresorptivnim se smatraju polimerni materijali i strukture koji podležu degradaciji u masi i dalje se resorbuju *in vivo*; npr. polimeri koji se iz organizma eliminišu prirodnim putem, bilo jednostavnom filtracijom sporednih produkata ili nakon uključivanja u metaboličke procese. Bioresorptivnost je pojam koji podrazumeva potpunu eliminaciju početnog, stranog materijala kao i sporednih produkata degradacije iz mase (jedinjenja malih molarnih masa) bez sporednih efekata. Termin "bioresorptivan" se koristi kada je eliminacija polimernog materijala iz organizma potpuna.

Erodabilnim se smatra čvrst polimerni materijal i strukture koje podležu površinskoj degradaciji i resorbuju se *in vivo*. Bioerozija je pojava koja, takođe, podrazumeva totalnu eliminaciju početnog, stranog materijala kao i sporednih produkata površinske degradacije.

Bioadsorbilnim se smatraju polimerni materijali ili strukture koji se rastvaraju u telesnim tečnostima bez raskidanja polimernih lanaca i smanjenja molarne mase. Na primer slučaj sporog rastvaranja implantanata u telu koji su vodorastvorni. Bioadsorbilan polimer može biti bioresorptivan ako su dispergovani makromolekuli izlučeni iz organizma.

Biodegradabilni alifatski poliestri su dobra zamena nedegradabilnih polimernih materijala, među njima i PCL, sintetski alifatski poliestar kao jedan od najobećavajućih. PCL može biti degradiran u vodenom medijumu ili od strane živih organizama kao što su bakterije i gljivice, ali nije biodegradabilan u životinjskom i ljudskom organizmu usled nedostatka odgovarajućih enzima. [46] To ne znači da PCL nije bioresorptivan, već da radije podleže hidrolitičkoj degradaciji koja zahteva duži vremenski period.

2.6.1. Mehanizmi degradacije alifatskih poliestara

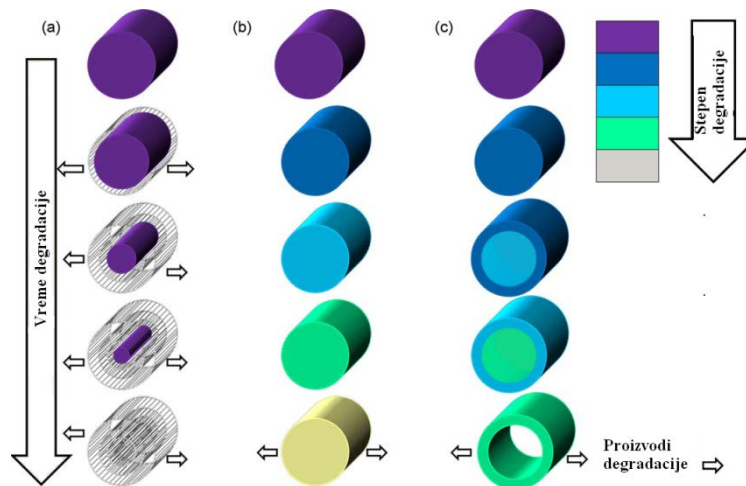
Degradacija polimernih materijala koji poseduju hidrolizabilne veze u svom lancu može se odvijati kao hidrolitička degradacija ili enzimski katalizovana (često se sreće i kombinovani načini).

Biološki agensi kao što su bakterije, gljivice i njihovi enzimi koriste neke polimere kao izvor hrane. Pod odgovarajućim uslovima: vlažnost, temperatura, dostupnost kiseoniku, biodegradacija je relativno brz proces. Enzimski katalizovana degradacija se može odigravati izlaganjem polimera bakterijama i gljivicama koje luče enzime odgovorne za raskidanje odgovarajućih veza u polimernom lancu ili upotrebom izolovanih, prečišćenih enzima kako se obično radi u laboratorijskim uslovima kada se ispituje biodegradabilnost polimernih materijala (*in vitro*).

Postoje dva mehanizma degradacije alifatskih poliestara:

- a) površinska degradacija
- b) degradacija u masi.

Shematski prikaz mehanizama degradacije se nalazi na Slici 2.8.



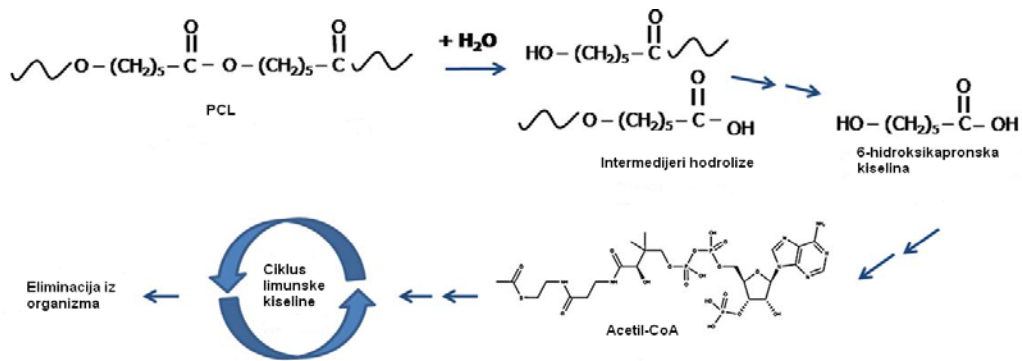
Slika 2.8. Mehanizmi degradacije: a) površinska erozija, b) degradacija u masi ("bulk"), c) autokatalizovana degradacija u masi. [11]

Proces degradacije se odigrava kao posledica kompeticije reakcije hidrolize estarskih veza i difuzije molekula vode kroz polimernu matricu. Površinska degradacija ili erozija podrazumeva hidrolitičko raskidanje veza u polimeru samo na površini. Do površinske degradacije dolazi kada je brzina hidrolitičkog raskidanja veza i stvaranja oligomera i monomera, koji difunduju u okruženje, veća od brzine prolaska vode u polimernu matricu. Rezultat ovakvog načina degradacije jeste da polimer postaje sve tanji sa vremenom dok molarna masa unutrašnjeg dela polimera ostaje nepromenjena tokom degradacije (Slika 2.8.a). Prednost odvijanja procesa degradacije mehanizmom erozije polimernog matriksa jeste u predvidivosti samog procesa, što polimerne materijale čini pogodnim nosačima lekova jer brzina oslobađanja leka može biti unapred određena. Enzimaska degradacija polimera se u najvećem broju slučajeva odigrava mehanizmom površinske erozije, usled specifične interakcije enzim – supstrat (polimer), pri čemu dolazi do raskidanja hidrolizabilnih veza sa površine. Degradacija u masi je proces koji se odigrava usled prodiranja vode unutar polimerne matrice izazivajući hidrolizu celokupnog polimernog uzorka (Slika 2.8.b). Dolazi do nasumične hidrolize, odnosno raskidanja estrarskih veza u polimernim lanacima i smanjenja molarne mase.

Ukoliko molekuli vode mogu neometano da difunduju kroz polimernu masu, raskidaju estarske veze unutar polimernog lanca i tako omogućе monomerima i oligomerima da difunduju izvan polimerne matrice, erozija će se odvijati postepeno i postićiće se ravnoteža reakcija hidroliza - difuzija. Međutim, ukoliko se ova ravnoteža naruši, mehanizam degradacije može biti autokatalizovan završnim karboksilnim i hidroksilnim grupama prisutnim u sporednim proizvodima degradacije. Dok oligomeri koji se nalaze na površini i karboksilne grupe mogu slobodno da difunduju u okruženje (kod površinske degradacije), u

slučaju degradacije u masi, koncentracija produkata autokatalize unutar polimernog matriksa može proizvesti kiseli gradijent kao posledicu akumuliranja novonastalih karboksilnih grupa (nastalih raskidanjem estarskih veza) sa krajeva lanaca. Ovo ubrzava unutrašnju degradaciju u poređenju sa površinskom, pri čemu dolazi do smanjenja molarne mase spoljašnjeg sloja dok je unutrašnji deo, polimerna masa, potpuno degradiran (Slika 2.8.c). Kao posledica ovakvog načina degradacije, polimeri nastali tokom degradacije imaju bimodalnu raspodelu molarnih masa. Kada oligomeri u unutrašnjosti postanu dovoljno mali, difunduju kroz spoljašnji sloj, što je praćeno gubitkom mase i smanjenjem brzine kidanja polimernog lanca pri čemu se stvaraju prstenaste strukture veće molarne mase. Veoma brzo oslobađanje oligomera nastalih na ovaj način i kiselih sporednih produkata, može izazvati inflamatorne procese *in vivo*, kada se radi o bioresorptivnim strukturama. Štaviše, ukoliko okolno tkivo nije sposobno da se prilagodi promeni pH vrednosti usled slabe cirkulacije ili slabe lokalne metaboličke aktivnosti, trenutni poremećaj može imati teže posledice. [11]

PCL homopolimer se potpuno degradira u živim organizmima u vremenskom intervalu od 2 do 4 godine, u zavisnosti od početne molarne mase. [47] Proces hidrolize se može ubrzati kopolimerizacijom sa laktonima ili glikolidima. Degradacija PCL-a se odvija u dve faze: prva faza, ne-enzimsko hidrolitičko raskidanje estarskih grupa i druga faza kada polimer (veće kristaliničnosti i molarne mase manje od 3000 g/mol) podleže intracelularnoj degradaciji. Da polimer podleže intracelularnoj degradaciji dokazano je proučavanjem fragmenata PCL-a koji su se nalazili u fagozomima makrofaga i unutar fibroplasta, čime je potvrđeno da PCL može biti potpuno resorbovan i degradiran unutar ćelija kada je molarna masa redukovana na 3000 g/mol i manje. Intracelularna degradacija polimera PCL-a malih molarnih masa se odigrava brzo i PCL se apsorbuje u roku od 13 dana, pri čemu, kao proizvod degradacije, nastaje 6-hidroksikapronska kiselina. 6-hidroksikapronska kiselina se dalje metaboliše do *Acetil-CoA* i uključuje u ciklus limunske kiseline nakon čega se eliminiše iz organizma (Slika 2.9.). [11, 48]



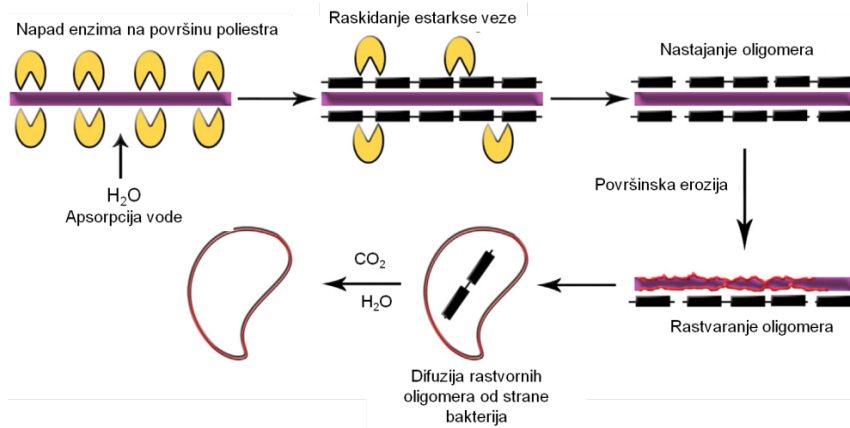
Slika 2.9. Degradacija PCL-a preko intermedijera 6-hidroksi-kapronske kiseline i Acetil-koenzima A, koji se eliminiše iz organizma preko ciklusa limunske kiseline. [11]

2.6.2. Faktori koji utiču na biodegradabilnost

Biodegradabilnost polimera prvenstveno zavisi od vrste veza koje se nalaze u polimernom lancu. Kako bi polimer podlegao biodegradaciji, u svojoj strukturi mora imati hidrolizabilne i/ili hemijske veze podložne oksidaciji. Polimeri koji u strukturi poseduju hidrolizabilne veze (estarske, ortoestarske, karbonatne, amidne, uretanske) su veoma podložni biorazgradnji. Polimeri sa ugljeničnim nizom (vinilni polimeri), nisu podložni hidrolizi i ukoliko i dođe do njihove biodegradacije, mora joj prethoditi proces oksidacije ili fotooksidacije. Pored vrste veze u polimernom lancu, stepen biodegradacije zavisi i od sastava i vrste ponavljajuće jedinice, molarne mase, morfologije (kristaliničnost, veličina sferulita), hidrofilnosti, itd. [49, 50]

Uticaoj strukture polimera

Većina sintetskih alifatskih poliestara koji sadrže hidrolizabilne veze podleže procesu biodegradacije aktivnošću mikroorganizama, odnosno hidrolizabilnih enzima koje luče. Proteolitički enzimi specifično katališu hidrolizu peptidne veze na tačno određenom mestu, odnosno vezuju se specifično za supstrat, a najčešće za karakteristične funkcionalne grupe kao što su benzilne, hidroksilne, karboksilne, metil ili fenil grupe. Zbog toga su polimeri koji u svojoj strukturi poseduju ove funkcionalne grupe podložniji razgradnji, odnosno napadu enzima (Slika 2.10.). Najveću reaktivnost, a samim tim i najbrža razgradnja polimera koji poseduju ove vrste veza u svojoj strukturi, imaju ortoestarske veze, a zatim estarske i amidne. Pored reaktivnosti, važan je i sterni efekat, odnosno postojanje bočnih supstituenata koji mogu usporavati ili ubrzavati proces degradacije. Tako, na primer, spora degradacija poli(mlečne kiseline) se objašnjava upravo sternim efektom, odnosno prisustvom voluminozne alkil grupe koja ometa napad molekula vode. [51]

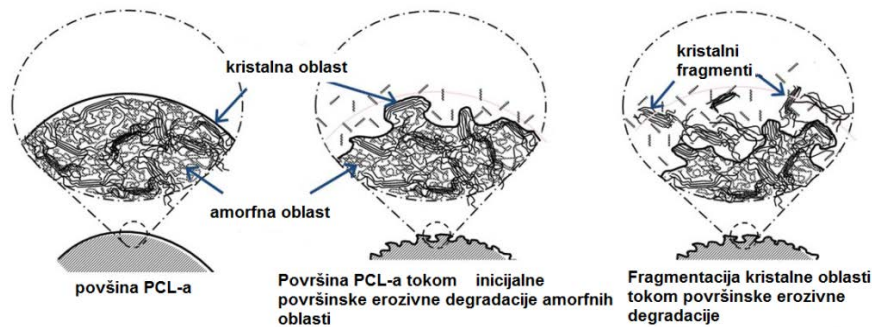


Slika 2.10. Shematski prikaz enzimske degradacije alifatskih poliestara. [52]

Kako se većina enzimski katalizovanih reakcija odigrava u vodenom medijumu, hidrofilno-hidrofobni katarakter sintetskih poliestara značajno utiče na njihovu biorazgradnju. Polimeri koji u svom sastavu imaju i hidrofilne i hidrofobne segmente, u većoj meri podležu razgradnji u odnosu na polimere koji su samo hidrofobni ili samo hidrofilni. Pored same strukture polimera, važno je da polimerni lanac bude dovoljno fleksibilan kako bi se vezao za aktivno mesto enzima i dalje podlegao degradaciji. Polimeri koji u svom sastavu sadrže aromatični prsten su rigidni i bioinertni. [44]

Uticaoj morfologije polimera

Sintetski polimeri uglavnom imaju kratke ponavljajuće jedinice što omogućava njihovu kristalizaciju. U kristaliničnim polimerima, usled uređene strukture, hidrolizabilne grupe su slabo dostupne napadu enzima ili molekula vode. Zbog toga neki polimeri sa dužom ponavljajućom jedinicom, usled manje kristaliničnosti, lakše podležu biorazgradnji. Kristaliničnost polimera tokom degradacije u prvoj fazi naglo raste kao posledica selektivne degradacije amornih regiona u semikristalnim polimerima, pa se udeo kristalne faze povećava. Nakon degradacije amorfne regije, dolazi do degradacije i kristalnih oblasti. Tokom mikrobiološke i enzimske degradacije PCL-a, koja se odigrava mehanizmom površinske erozije, dolazi do promena u kristalnoj strukturi zahvaljujući prisustvu i amorfne i kristalne faze (Slika 2.11.). Kao posledica ovoga, dolazi do naizmeničnog povećanja i smanjenja kristaliničnosti tokom degradacionog perioda. Selektivni napad enzima na amornu fazu polimera se pripisuje manjoj uređenosti amorfne oblasti što omogućava lakši prilaz enzima polimernom lancu. Veličina, oblik i broj kristalita utiču na mobilnost polimernog lanca u amorfnoj oblasti, što dalje ima uticaj na stepen degradacije. [44, 53]



Slika 2.11. Shematski prikaz fragmentacije kristalinične strukture PCL-a. [53]

Uticao molarne mase

Molarna masa polimera je, takođe, jedan od faktora koji određuje njihovu biodegradaciju. Generalno, polimeri velikih molarnih masa ostaju relativno rezistentni na napad mikroorganizama, za razliku od polimera malih molarnih masa koji mogu prodrati u ćelije mikroba gde se vezuju za acetil-koenzim-A i dalje metabolišu. Polimeri većih molarnih masa, zbog svoje veličine ne mogu ući u ćelije mikroba pa je neophodno da prethodno budu degradirani, bilo fotodegradacijom, bilo hemijski. Polimeri derivati alkena koji u svom sastavu imaju više od 30 C atoma ne mogu se spontano degradirati već biodegradaciji mora prethoditi foto- ili hemijska degradacija, dok polimeri sa 24 do 30 C atoma u svojoj strukturi (polietileni, parafini) veoma sporo degradiraju. [44] Alifatski poliestri zbog prisustva hidrolizabilne estarske veze podležu biorazgradnji, a uticaj molarne mase se odražava na stepen i brzinu degradacije. Poliestri manjih molarnih masa brže se razgrađuju i u većem procentu dezintegrišu, dok je za poliestre veće molarne mase potrebno duže izlaganje dejstvu enzima. [54]

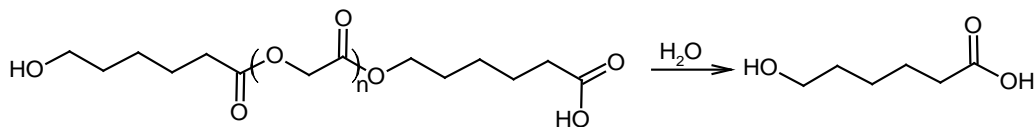
2.6.3. Hidrolitička i enzimaska degradacija PCL i PCL/PEO blok kopolimera

In vitro degradacija PCL-a, njegovih blendi i kopolimera (koja se još naziva i hemijska degradacija) može se odigravati pasivno hidrolitički ili aktivno dejstvom enzima, a simultani način degradacije se sreće u *in vivo* uslovima. Prisustvo hidrolizabilne estarske veze u lancu PCL i PCL/PEO kopolimera omogućava njihovu razgradnju. Hidrolitička razgradnja je spora reakcija dok prisustvo enzima koji raskidaju hidrolizabilne veze značajno ubrzava degradaciju. [55, 56]

2.6.4. Hidrolitička degradacija

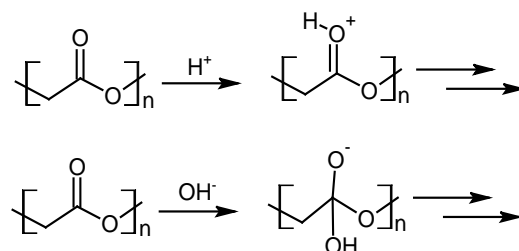
Hidrolitička degradacija alifatskih poliestara je veoma složen proces koji se odigrava najčešće mehanizmom degradacije u masi usled nasumičnog raskidanja polimernih lanaca.

Kod abiotske degradacije, kako se hidroliza često naziva, prvo dolazi do apsorpcije vode unutar polimernog matriksa i hidratacije polimernih lanaca. Funkcionalne grupe prisutne u lancima poliestara određuju stepen apsorpcije vode, a samim tim i degradaciju. Prilaz molekula vode u velikoj meri određuje stepen degradacije, a dostupnost polimera molekulima vode zavisi od kristaliničnosti, molarne mase, hidrofobnosti, temperature ostakljivanja, dimenzija uzorka. Molekuli vode napadaju dominantno amorfne oblasti polimera, koje su usled manje uređenosti dostupnije napadu molekula vode. Raskidanjem estarskih veza u lancu PCL-a, dolazi do skraćivanja dužine lanca, a kao proizvod hidrolize nastaje karboksilna kiselina, 6-hidroksikapronska kiselina (6-hidroksiheksanska kiselina, Shema 2.14.). Karboksilne kiseline koje nastaju kao sporedni proizvodi degradacije, ukoliko se ne uklone, mogu povećati kiselost medijuma u kojem se odigrava hidroliza i na taj način autokatalisati proces degradacije, tj. ubrzati je. [51, 57]



Shema 2.14. Hidrolitička degradacija PCL-a i nastajanje 6-hidroksikapronske kiseline. [57]

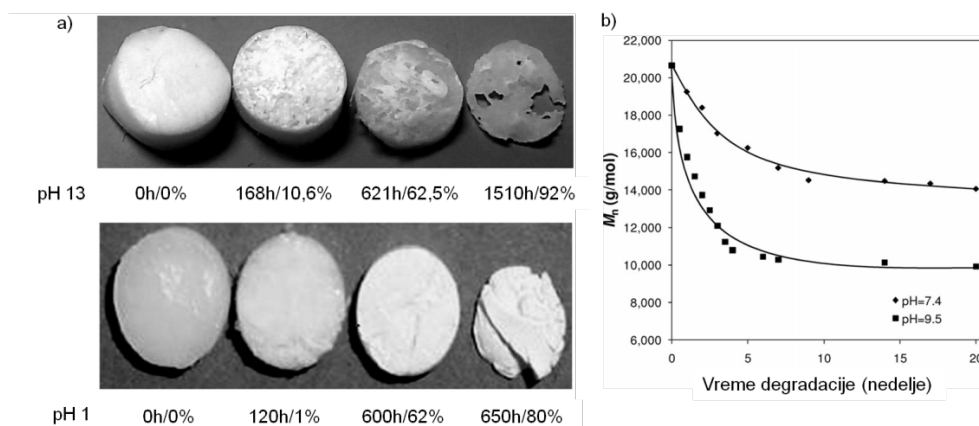
Molarna masa PCL je jedan od faktora koji utiče na stepen i brzinu hidrolitičke degradacije. Generalno, zahvaljujući svojoj hidrofobnoj i semikristalnoj prirodi, PCL je veoma otporan na abiotsku hidrolizu, koja se najčešće testira u fosfatnom puferu (pH 7,4). Hidrolizom PCL tokom 65 nedelja, gubitak mase je bio oko 20 % i detektovane su veoma male promene u kristalnoj strukturi, dok je tokom 18 meseci degradacije (PCL molarne mase 65000 g/mol) došlo do promena i u kristalnoj strukturi.[58, 59] Stepen degradacije zavisi od pH vrednosti medijuma u kojem se vrši ispitivanje, pa je promena pH vrednosti jedan od načina da se ubrza inače spora hidroliza PCL. Hidroliza estarske veze može biti kiselo ili bazno katalizovana (Shema 2.15.). Pored promene pH vrednosti, kopolimerizacijom PCL-a sa hidrofilnim polimerima (kao što je PEO), značajno se može uticati na stepen i brzinu degradacije.



Shema 2.15. Kiselo i bazno katalizovana hidroliza alifatskih poliestara. [60]

Degradacija PCL u uslovima velike baznosti ili kiselosti (na pH 13 i pH 1), tokom dužeg vremena (tokom 2 meseca) pokazuje veće gubitke mase, promene u kristalnoj strukturi, molarnoj masi i mehaničkim svojstvima. Takođe, degradacija se intenzivnije odigravala u uslovima gde je pH vrednost iznosila 13 (Slika 2.13.a), a na osnovu promena u kristalnoj strukturi i molarnoj masi se zaključilo da su mehanizmi bazne i kisele hidrolize različiti: na pH =13 se hidroliza odigrava mehanizmom površinske erozije, a na pH = 1 dominira mehanizam degradacije u masi. [61]

Promenom pH vrednosti degradacionog medijuma, takođe se ubrzava proces hidrolize blok kopolimera (PCL/PEO). Gubitak mase PCL/PEO blok kopolimera (udeo PEO 15 mas%) na vrednosti pH 7,4 i 9,5 raste sa vremenom degradacije usled raskidanju estarskih veza u lancima kopolimera prvenstveno između PCL i hidrofilnog PEO segmenta. Ipak, nakon 20 nedelja ispitivanja na pH vrednosti od 7,4, gubitak mase je bio oko 6 %, dok je u baznoj sredini (pH 9,5) gubitak mase bio veći (10 mas%) (Slika 2.13.b). Degradacija na većim pH vrednostima je ubrzana i odigrava se u većem stepenu usled prisustva OH⁻ jona koji katalizuju raskidanje estarskih veza u lancima kopolimera. [62]

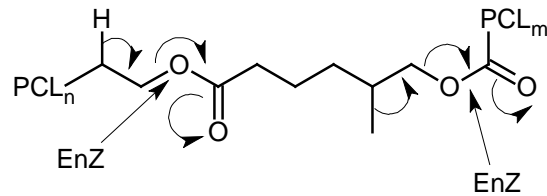


Slika 2.13. a) Fotografije PCL filmova nakon različitih vremenskih intervala na pH 13 i pH 1 [61], b) Promena molarne mase PCL/PEO kopolimera (15 mas.%, PEO) tokom hidrolize na pH 7,4 i 9,5 [62]

Hidrolitička degradacija PCL (bilo da je kiselo ili bazno katalizovana, ili u fosfatnom puferu) se odigrava u većem stepenu ukoliko je kopolimerizivan sa PEO kao hidrofilnim segmentom, ali stepen degradacije i promene u molarnoj masi i strukturi zavise i od sastava kopolimera. Veći udeo PEO segmenta za posledicu ima veći procenat gubitka mase usled povećanja hidrofilnosti uzorka. [63]

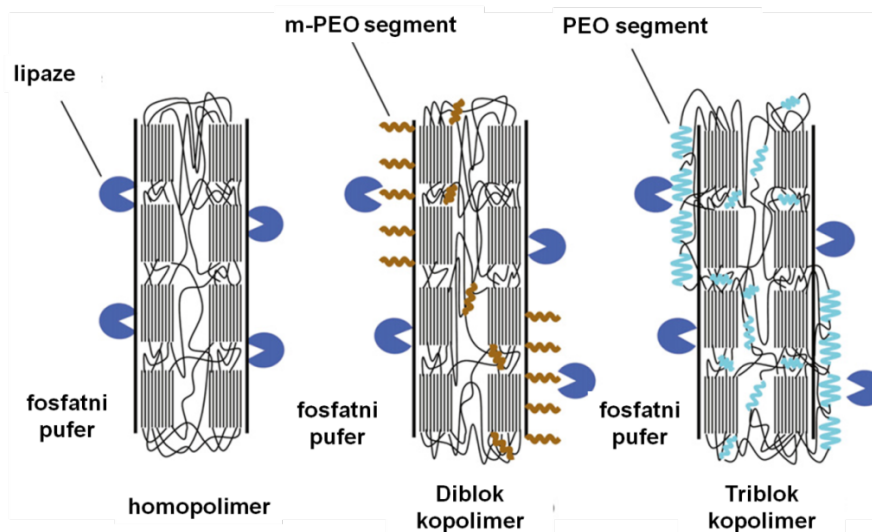
2.6.5. Enzimaska degradacija

Poli(ϵ -kaprolakton) se veoma sporo razgrađuje u abiotskim uslovima (hidrolitički), ali u prisustvu enzima (najčešće lipaza) proces degradacije se značajno ubrzava. Veliki broj enzima izolovanih iz bakterija i gljivica je pokazao katalitičku aktivnost u odnosu na PCL kao supstrat (*Candida rugosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Novozym 435*, *Pseudomonas*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium funiculosum* i dr.). [64, 65] Jedna od najčešće korišćenih lipaza je lipaza iz soja *Pseudomonas* zbog velike katalitičke aktivnosti i sposobnosti raskidanja estarskih veza hidrofobnog supstrata. [66] Homopolimer PCL može biti potpuno razgrađen nakon 4 dana inkubiranja u fosfatnom puferu koji sadrži aktivne *Pseudomonas* lipaze. [67] Efikasnost enzimske degradacije i brzina degradacije zavise od brojnih faktora među kojima su: katalitička aktivnosti čistih enzima, medijuma u kojem se izvodi degradacija (vodeni ili organski rastvarači), temperature, vremena degradacije, ali i elemenata strukture polimera kao što su molarna masa i kristaliničnost. Nasuprot hidrolitičkoj degradaciji koja se odigrava mehanizmom degradacije u masi pri čemu se beleže promene u molarnoj masi i male promene u gubitku mase, enzimaska degradacije se odvija mehanizmom površinske erozije koji se manifestuje velikim gubitkom mase i neznatnim promenama molarne mase uzorka. I dok je degradacija u masi pretežno homogen proces, degradacija erozijom je heterogen proces. [51, 68] Enzimaska degradacija PCL se odigrava u nekoliko koraka: prvo dolazi do adsorpcije enzima na polimerni supstrat; drugi korak je stvaranje prelaznog kompleksa između enzima i polimera; i na kraju specifično raskidanje polimernih lanaca. Lipaze raskidaju PCL lance na specifičnim mestima (Shema 2.16.) pri čemu nastaju specifični proizvodi degradacije (FTIR analiza je pokazala prisustvo estara, R-COOR', kiselina, -COO⁻, alkohola, -OH). [65, 69] Već je rečeno da se enzimaska degradacija odigrava mehanizmom površinske erozije, a raskidanje estarskih veza lipaznom aktivnošću se odigrava i nasumičnim raskidanjem polimernih lanaca, ali i specifičnim raskidanjem lanaca sa krajeva. Zapravo, pokazano je da tokom enzimske razgradnje PCL u toluenu u prisustvu lipaza, u ranoj fazi hidrolize degradacija se odigravala nasumičnim kidanjem lanaca, dok je nakon nekoliko sati degradacije kao degradacioni proizvod detektovan ϵ -kaprolakton ukazujući da se proces degradacije odigravao i specifičnim raskidanjem PCL lanaca sa krajeva, tj. depolimerizacijom. [70]



Shema 2.16. Specifična mesta napada enzima na PCL. [65]

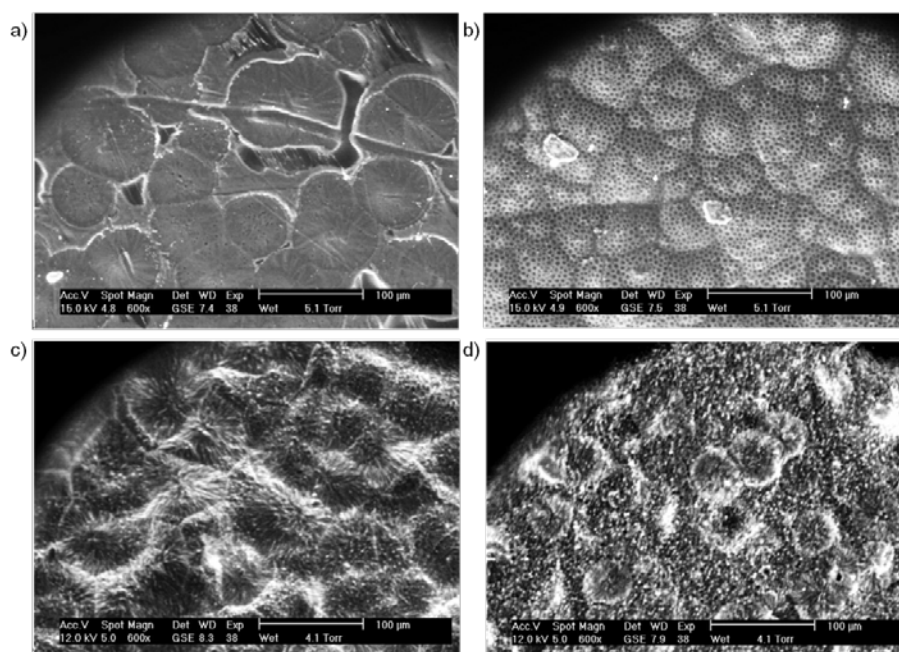
Praćenjem promene stepena kristaliničnosti tokom enzimske degradacije PCL-a, pomoću DSC analize, utvrđeno je da stepen kristaliničnosti raste sa vremenom degradacije usled efikasnije degradacije amorfnih oblasti, zbog čega raste udeo kristalne faze. [71] Amorfne oblasti polimera su podložnije napadu enzima usled lakšeg prilaza enzima (stereospecifičnost enzima), stoga se prvo razlažu amorfne, a potom kristalne regije (Slika 2.14.). Degradacija PCL se može ubrzati uvođenjem mekih, hidrofilnih segmenata, PEO i m-PEO, pri čemu nastaju blok kopolimeri. Uvođenjem ovih segmenata u lance PCL, degradacija se odvija prvenstveno napadom na PEO, odnosno m-PEO, zbog veće fleksibilnosti i pokretljivosti ovih segmenata koji su samim tim dostupniji napadu enzima. Takođe, enzimska degradacija započinje vezivanjem lipaza na površinu polimera, a kako su lipaze rastvorne u vodi, prvenstveno će napasti hidrofilne segmente kopolimera sa kojima uspostavljaju interakcije, što je pored sternih efekata, dodatno objašnjenje zbog čega degradacija PCL/PEO kopolimera počinje raskidanjem estarske veze između PCL i PEO blokova. [72]



Slika 2.14. Grafički prikaz enzimske degradacije PCL homopolimera, diblok i triblok kopolimera. [73]

Kopolimerizacijom PCL sa hidrofilnim PEO se može ubrzati degradacija nastalih blok kopolimera, ali enzimska degradacija dobijenih diblok i triblok kopolimera određena je i njihovim sastavom. Ispitivanjem uticaja sastava diblok i triblok kopolimera na stepen degradacije (odnosno gubitak mase) u prisustvu lipaze iz *Pseudomonas*-a, pokazano je da sastav ispitivanih kopolimera nije imao značajan uticaj na proces degradacije. Zapravo, prilikom razgradnje PCL/PEO diblok i PCL/PEO/PCL triblok kopolimeri čija je dužina hidrofilnog segmenta iznosila oko 5000 g/mol dolazi do rastvaranja relativno dugog PEO bloka, tako da enzimi degradiraju samo PCL segment. Promena hemijskog sastava nakon degradacije, praćena na osnovu odnosa [CL]/[EO] diblok i triblok kopolimera, nije zabeležena ukazujući da se dejstvom enzima degradira samo PCL segment, a da rastvorni PEO blok migrira iz mase i rastvora se u degradacionom medijumu. [74]

Kako se proces enzimske degradacije odigrava mehanizmom erozije površine polimera, promene morfologije površine polimernih uzoraka tokom enzimske degradacije mogu se detektovati pomoću ESEM analize (**E**nvironmental **S**canning **E**lectron **M**icroscopy). Prilikom kristalizacije homopolimera PCL, zapažaju se različiti načini kristalisanja u formi sferulita u zavisnosti od izloženosti površine filma vazduhu ili staklu: gornja strana (izložena vazduhu tokom isparavanja rastvarača) pokazuje veliki broj sitnijih sferulita sa jasnim granicama (Slika 2.15.a) i suprotno njoj, druga strana, izložena staklu tokom otparavanja rastvarača, gde se sferuliti uočavaju kao kupaste, suđeraste strukture (Slika 2.15.b). Promene u morfologiji površine PCL filmova su jasno uočljive nakon degradacije: na strani PCL polimernog filma okrenutog ka vazduhu su i dalje vidljivi sferuliti ali bez jasno definisanih granica, površina je erodirana i hrapava, dok se na donjoj strani (okrenutoj ka staklu) jedva oučava forma sferulita. Veoma slične promene u morfologiji polimernih filmova su detektovane i za PCL/PEO diblok i triblok kopolimere. [66, 74, 75]



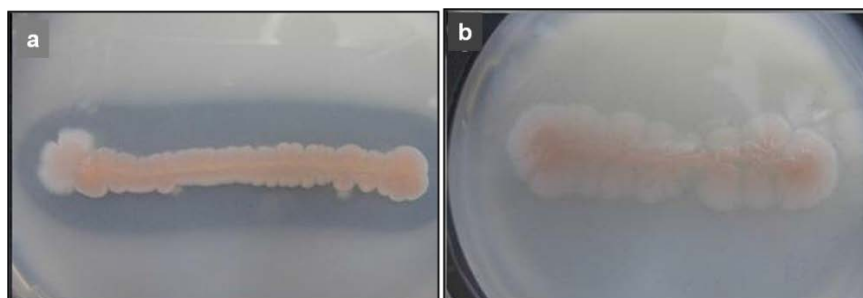
Slika 2.15. ESEM mikrografi PCL: a) pre degradacije (strana vazduh), b) pre degradacije (strana staklo), c) posle degradacije (strana vazduh) i d) posle degradacije (strana staklo). [75]

2.7. Mikrobiološka degradacija PCL-a

Razvoj biodegradabilnih poliestara predstavlja važan korak u rešavanju problema uzrokovanim nagomilavanjem polimernog otpada. Sposobnost degradacije poliestara od strane mikroorganizama koji se nalaze u okolini, jedan je od glavnih razloga zamene biostabilnih polimera biodegradabilnim. Različite vrste mikroorganizama kao što su bakterije i gljivice mogu izazvati degradaciju u različitim uslovima. Na ovaj način se smanjuje kontaminacija životne sredine polimernim otpadom i njihovo nagomilavanje, a mikrobiološka degradacija može biti veoma uspešan način reciklaže biodegradabilnog otpada jer se aktivnošću enzima, koje luče mikroorganizmi, biodegradabilni polimeri razlažu na metabolite (oligomere, CO_2 i H_2O). [76]

Pored razvoja novih biodegradabilnih materijala, neophodno je ispitati i koje vrste mikroorganizama su sposobne da razlažu ove polimere. Metod prosvetljene zone ("zone of clearance") na agar šoljama je dosta korišćena tehnika ispitivanja potencijalne degradacije polimera od strane mikroorganizama. Agar šolje sadrže emulgovani polimer kojem su dodati određeni mikroorganizmi, a dokaz mogućnosti degradacije polimera ovim mikroorganizmima je pojava takozvanih "clear halo" zona oko kolonija mikroorganizama (Slika 2.16.). Do pojave "clear" zona dolazi kada mikroorganizmi luče ekstracelularne enzime koji difunduju kroz agar i razlažu polimer do proizvoda rastvornih u vodi. Na ovaj način je određen veliki

broj bakterijskih sojeva koji mogu razložiti PCL polimer. [1] Nekada je polimer i jedini izvor ugljenika za bakterijski soj, a nekada se test odvija u prisustvu drugih hranljivih sastojaka.

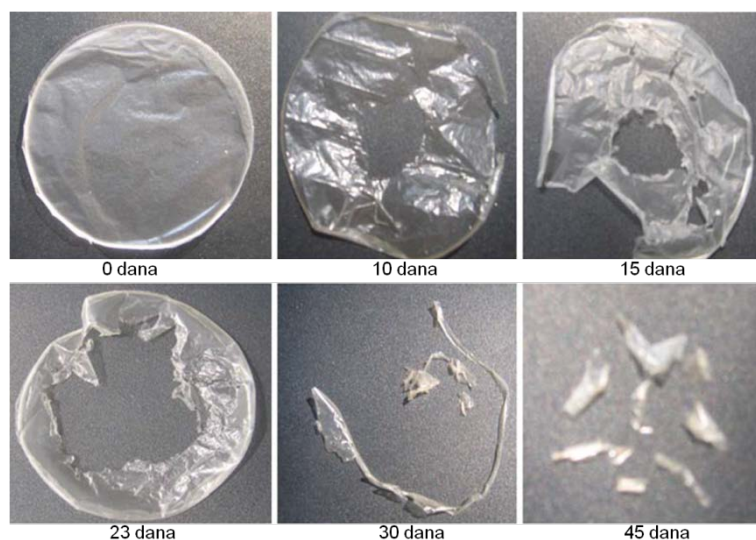


Slika 2.16. "Clear" zone formirane na agar šoljama sa: a) emulgovanim PCL-om i b) emulgovanim PLA. [77]

Do sada je potvrđeno da se PCL degradira u prisustvu mikroorganizama koji luče enzime: esteraze, kutinaze i lipaze. Bakterijski soj, *Roseateles depolymerans* TB-87 koji luči esteraze, izolovan iz sveže vode, može da razlaže alifatske poliestre, među kojima i PCL. Velika aktivnost enzima i supstratna specifičnost u degradaciji PLC-a je otkrivena i za *Leprothrix* TB-71 soj. Pronađeno je i za neke kutinaze, koje luče gljivice, kao što je *Pseudozyma antarctica* JCM 10317 soj, da mogu da razlažu PCL filmove. [77] Bakterijski soj *Brevundimonas* sp. MRL-AN1 izolovan iz zemljišta, koji luči depolimeraze (esteraze) tokom 10 dana izlaganja homopolimera PCL (M_n 80000 g/mol) degradiralo je više od 80 % njegove mase, a termofilne bakterije iz soja *Ralstonia* sp. MRL-TL tokom 10 dana degradiraju oko 50 % PCL-a.[78, 79]

Biodegradacija PCL u prisustvu mikroorganizama zavisi od brojnih parametara, kao što su molarna masa polimera i njegova kristaliničnost, debljina polimernog filma i uslovi testiranja degradacije. Što je veća vrednost molarne mase polimera, degradacija se sporije odigrava, pa tako PCL molarne mase $M_n = 160000$ g/mol u prisustvu *Lysinibacillus* soja 70038, gubi oko 9 mas.% nakon 30 dana. [80] U slučaju degradacije PLC-a, većih molarnih masa, vreme izlaganja dejstvu enzima koje luče bakterije mora biti duže (Slika 2.17. jasno prikazuje veću dezintegraciju PCL filma sa vremenom).[81]

Da bi efikasnost degradacije bila velika, enzimi moraju biti blizu površine polimernih supstrata kako bi ispoljili svoju aktivnost. Enzimi veoma lako dolaze u kontakt sa supstratima rastvornim u vodi u poređenju sa nerastvornim. Generalno, polimere karakteriše mala kontaktna efikasnost sa molekulima enzima, ali zahvaljujući specifičnosti ka supstratu (polimeru), enzimi se adsorbuju na površinu polimernih filmova i na taj način ih degradiraju.[82]



Slika 2.17. Forografije PCL filmova posle 0, 10, 15, 23, 30 i 45 dana izloženosti bakterijama. [81]

2.7.1. Ispitivanje biodegradabilnosti u kompostu

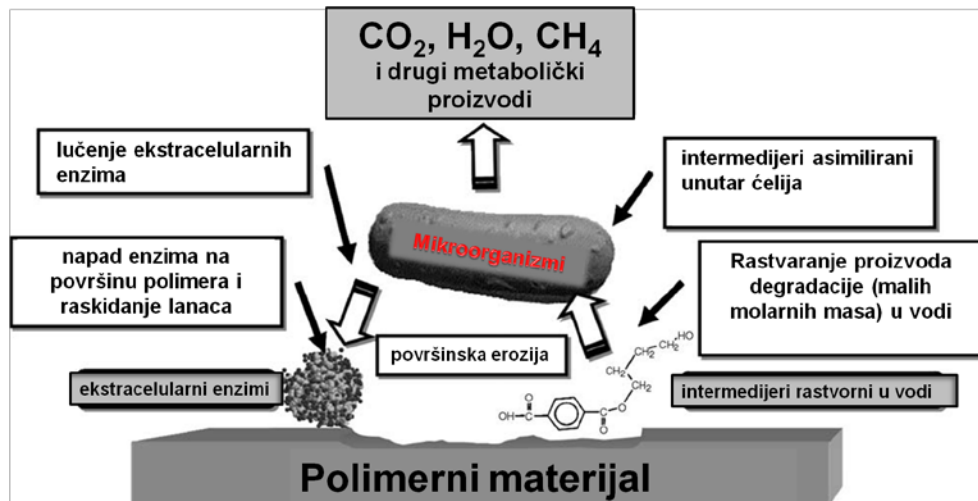
Biodegradabilnost polimernih materijala nakon upotrebe zavisi od načina njihovog daljeg procesuiranja i fizičko-hemijskih uslova (prisustvo kiseonika, temperatura, prisustvo svetlosti, prisustvo specifičnih mikroorganizama, itd.). Postoji nekoliko načina skladištenja i/ili uništavanja biodegradabilnog otpada:

- reciklaža (ponovno dobijanje)
- spaljivanje
- biološki tretman polimernog otpada – kompostiranje
- zakopavanje u zemlju

Sa stanovišta zaštite životne sredine, biokompostiranje pod kontrolisanim uslovima (vlažnost, temperatura, prisustvo kiseonika) jedan je od favorizovanih načina skladištenja biodegradabilnog otpada. Kompostiranje je proces biološke razgradnje heterogene organske materije usled aktivnosti mikroorganizama (bakterije, gljivice), u aerobnim uslovima (prisustvo kiseonika), određene vlažnosti. Proizvodi degradacije u ovakvim uslovima su voda, ugljen-dioksid i biomasa (veoma sličan humusu).[83] U zavisnosti od vrste supstrata i uslova biokompostiranja (anaerobni uslovi), kao proizvod degradacije može nastati metan (CH_4), koji doprinosi efektu staklene bašte i kontaminacije životne sredine. Da bi se ovaj potencijalni problem izbegao, veoma je važno da se kompostiranje odigrava u kontrolisanim uslovima (temperatura, vlažnost, aerobni uslovi). [84] Jedina razlika između procesa prirodne razgradnje i kompostiranja jeste što je proces kompostiranja kontrolisan.

Tokom procesa kompostiranja prvo dolazi do raskidanja hidrolizabilnih veza u polimernom lancu usled aktivnosti mikroorganizama (bakterije, alge, gljivice koje luče

enzime), zatim dolazi do mineralizacije odnosno konverzije nastalih intermedijera do CO_2 , H_2O i biomase (Slika 2.18.)[85]



Slika 2.18. Princip mikrobiološke degradacije. [86]

Faktori koji utiču na proces kompostiranja

Efikasnost procesa kompostiranja zavisi od brojnih faktora među kojima su najvažniji: temperatura, prisustvo kiseonika (aeracija), sadržaj vlage, pH vrednost, odnos C/N.

- Uticaj temperature

Temperatura je jedan od najvažnijih parametara prilikom podešavanja uslova kompostiranja. Sam proces biokompostiranja je egzoterman, a zavisi od početne temperature i biodegradabilnosti supstrata. Tokom biokompostiranja, temperatura sistema raste kao posledica ubrzane biodegradacije supstrata od strane mikroorganizama. Organske materije nastale degradacijom mogu imati neželjena dejstva na ljude i životinje jer sadrže patogene mikroorganizme. Da bi se izbeglo nastajanje patogena i postigli sanitarno prihvatljivi uslovi, najpogodnije je da temperatura kompostiranja bude preko $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ jer se na ovoj temperaturi eliminišu patogeni i paraziti. Sa druge strane, temperatura kompostiranja ne sme biti ni previše visoka (preko 65 do $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) jer se na taj način mogu uništiti mikroorganizmi, a na temperaturi preko $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ dolazi do inaktivacije gljivica, aktinomiceta i većine bakterija.

- Odnos C/N

Tokom kompostiranja, mikrobi razgrađuju organska jedinjenja kako bi obezbedili nutrijente (C, N, P, K) i energiju potrebnu za metaboličke procese. Mikroorganizmima su za aktivnost najpotrebniji ugljenik, azot, fosfor i kalijum, a najvažniji su ugljenik i azot: ugljenik koriste kao izvor energije a azot koriste za izgradnju ćelijske strukture. Ukoliko je količina azota

ograničena, rast mikroba je smanjen čime se indirektno smanjuje razgradnja organske materije. Takođe, ukoliko je količina azota iznad one koja je mikrobima neophodna, višak azota će se oslobađati u vidu gasa, amonijaka. Zbog toga je veoma važan odnos C/N jer je pokazatelj stepena degradacije organske materije (ugljenik iz sistema odlazi kao CO₂ usled oksidacije). Odnos C/N tokom kompostiranja opada jer je manji stepen iskorišćenja azota od strane mikroba u odnosu na ugljenik, jer mikroorganizmi 30 puta brže koriste raspoloživi ugljenik nego što konvertuju azot.

- Aeracija

Aeracija je takođe bitan faktor koji utiče na proces kompostiranja. U osnovi, kompostiranje je aeroban proces u kojem se kiseonik troši, a oslobađa se vodena para (H₂O) i ugljen-dioksid (CO₂). Stepem aeracije utiče na kvalitet komposta i mikrobiološku aktivnost tokom kompostiranja. Aeracijom se obezbeđuje neophodna količina O₂ za oksidaciju organskog materijala i uklanja se (isparava) višak vlage. Nedostatak kiseonika tokom kompostiranja dovodi do nastajanja anaerobnih uslova razgradnje kada nastaju proizvodi koji su štetni za okolinu, dok višak kiseonika za posledicu ima sniženje temperature sistema koja je neophodna za postizanje optimalnih uslova kompostiranja.

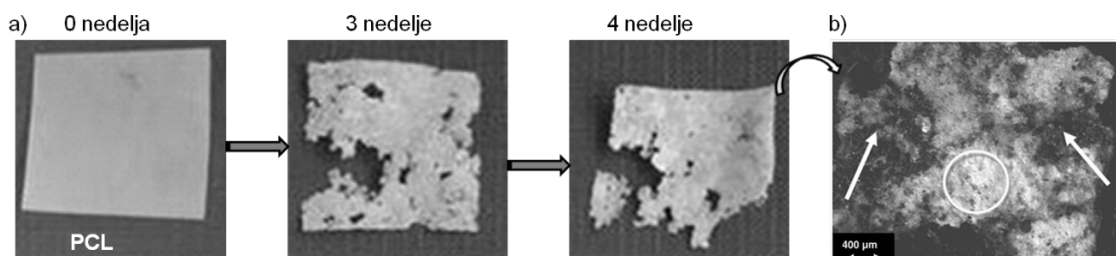
- Sadržaj vlage

Sadržaj vlage u kompostu utiče na stepen vezivanja kiseonika, mikrobiološku aktivnost i temperaturu proseca. Optimalni sadržaj vlage neophodan za efektivnu degradaciju zavisi od vrste supstrata i kreće se u opsegu od 40 do 70 % računato na masu komposta. Sa porastom sadržaja vlage, opada difuzija gasova i vezivanje kiseonika postaje nedovoljno za metaboličke aktivnosti mikroorganizama što može dovesti do anaerobnih uslova kompostiranja. Vlaga i temperatura su u direktnoj vezi: porast temperature dovodi do smanjenja vlažnosti. Vlaga je neophodna i za distribuciju rastvornih nutrienata koji su potrebni za metabolizam mikroba. Mali procenat vlažnosti dovodi do dehidracije supstrata, odnosno sprečava se proces kompostiranja i razgradnje organske materije. [84]

2.7.2. Kompostiranje PCL-a

Poli(ε-kaprolakton), njegovi kopolimeri i kompoziti, veoma lako mogu degradirati u različitim uslovima, u prisustvu mikroorganizama. Tokom tri i četiri nedelje kompostiranja na 40 °C, PCL filmovi su značajno dezintegrisani (Slika 2.19.a). Kako se degradacija odigrava dejstvom enzima koje luče mikroorganizmi, mehanizam degradacije je površinska erozija polimernih filmova. Mehanizam površinske erozije je potvrđen mikroskopijom (Slika

2.19.b) koja jasno pokazuju veliku degradiranost površine, pri čemu su neke oblasti više degradirane (označene strelicom na slici), a neke manje (označene krugovima) ukazujući da se proces degradacije odigrava nehomogenim mehanizmom. Nehomogenost procesa enzimske degradacije se objašnjava dominantnim napadom enzima na amorfne oblasti polimera, a zatim na kristalne, ali i potencijalno boljim kontaktom komposta u više degradiranim oblastima i/ili nehomogenog rasta mikroorganizama na površini uzoraka. [87, 88]



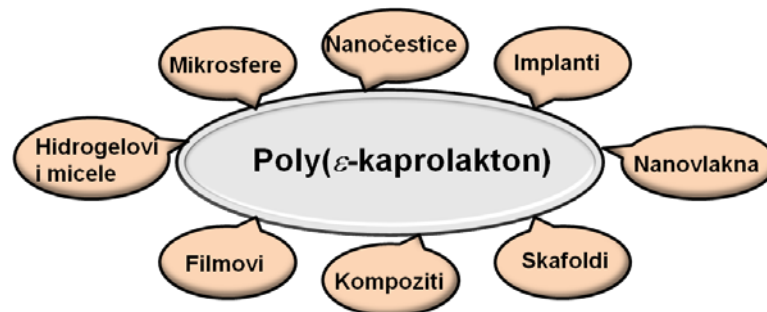
Slika 2.19. a) Fotografije PCL filmova pre i posle 3 i 4 nedelje degradacije u kompostu; b) Optički mikrofotografiji PCL filma posle 6 nedelja u kompostu. [88]

Stepen biodegradacije u kompostu zavisi kako od temperature na kojoj se izvodi eksperiment, tako i od oblika samih uzoraka.[89, 90] Degradacija polimera na nižim temperaturama (sobna, 24 °C) je veoma spora, a PCL polimer ($M_n \sim 50000$ g/mol) nije degradirao na ovoj temperaturi ni posle 300 dana. U ovom slučaju, uticaj hemijske strukture i kristaliničnosti polimera na biodegradaciju je veoma mali. U zemljištima, polimeri degradiraju aktivnošću različitih mikroorganizama, uključujući bakterije i gljivice. Na povišenim temperaturama (46 °C) pojedini mikroorganizmi više rastu, naročito ako koriste polimer kao izvor nutritienata, i postaju aktivniji što može ubrzati proces degradacije. Specifična površina uzoraka utiče na proces biodegradacije usled različitog kontakta između mikroba/enzima i uzorka. Što je veća površina izložena dejstvu mikroba, brži je proces biodegradacije. Za PCL je dokazano da je brzina biodegradacije nezavisna od dimenzija kada su uzorci u obliku filmova, dok uzorci koji su u obliku praha mnogo brže degradiraju. [90]

2.8. Primena PCL/PEO blok kopolimera

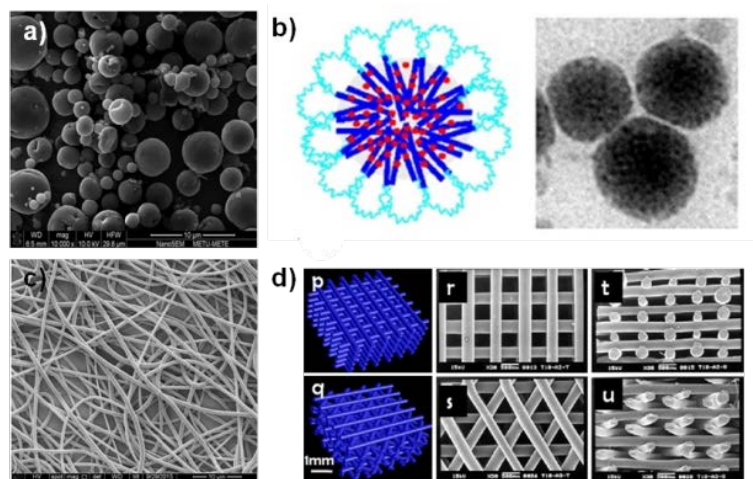
Poslednjih decenija istraživanja su usmerena na razvoj novih polimernih biomaterijala zbog potrebe da se biostabilni (koji se ne razgrađuju) zamene biodegradabilnim materijalima. Danas, polimerni biomaterijali imaju važnu ulogu u oblasti medicine: u hirurgiji (izrada protetičkih sistema za fiksiranje preloma, za izradu konaca za ušivanje rana), u farmakologiji

kao matrice za kontrolisano otpuštanje lekova i u inženjerstvu tkiva.[46, 91] Biodegradabilne polimerne matrice (nosači lekova) mogu biti u formi mikro i nanočestica, implanata, nanovlakana, filmova, hidrogelova, micela, itd. (Slika 2.20.) i mogu biti dizajnirane tako da se postigne kontrolisana i ciljana isporuka leka. [92]



Slika 2.20. Primena PCL i njegovih kopolimera: različite formulacije.

Polimerni biomaterijali u formi nanovlakana, zbog dobrih mehaničkih svojstava, pogodni su u inženjerstvu tkiva kao potporni matriks (skafoldi, trodimenzionalni supstrati ćelija) ili analozi koštanom tkivu. Novi polimerni nanomaterijali mogu imitirati nativni ekstracelularni koštani matriks, a mogu se primeniti i za regeneraciju kostiju. [93-95] Različite forme polimera na bazi PCL-a su prikazane na Slici 2.21.

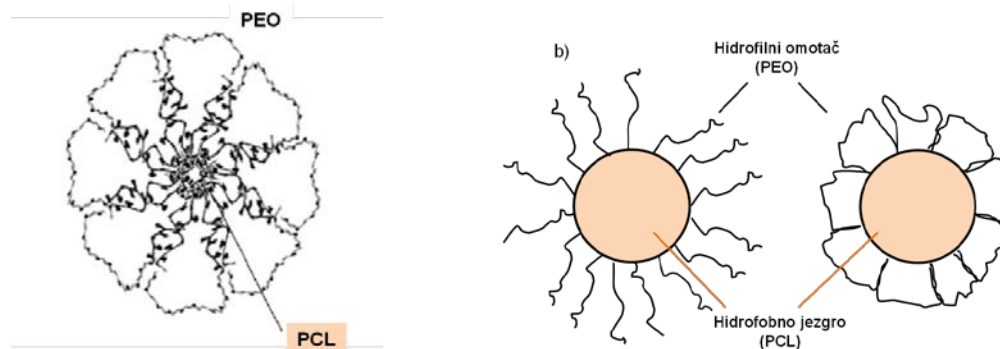


Slika 2.21. Primena PCL u biomedicini i inženjerstvu tkiva: a) mikrosfere, b) micelle, c) nanovlakna, d) skafoldi. [11, 96-98]

Amfifilni diblok i triblok kopolimeri (PCL/PEO) imaju karakteristična svojstva zahvaljujući kombinaciji hidrofilnih i hidrofobnih segmenata. Zbog svoje biodegradabilnosti i biokompatibilnosti, ali i karakteristične konfiguracije, našli su primenu u sistemima za

kontrolisano otpuštanje lekova, kao nosači aktivne supstance. [99] Najveći broj istraživanja je usmeren na dobijanje mikro i nanosfera i micela. Prednost isporuke medikamenata na ovaj način jeste u načinu aplikacije: mogu se uzimati oralno ili injektovati. Takođe, mogu se napraviti u takvoj formi da se postigne ciljano oslobađanje u organizmu. [100] Poslednjih godina postoji veliko interesovanje za razvoj polimernih nanočestica kao efikasnih nosača lekova koji neće biti prepoznati u organizmu kao strani materijal, i kao takav brzo biti izlučen iz krvotoka. Veličina čestica i površinske karakteristike su dva najvažnija parametra koja definišu kinetiku i raspodelu čestica u organizmu. Veličina čestica mora biti dovoljno mala (manja od 200 nm). Uprkos malim dimenzijama, većina konvencionalnih nanočestica biva prepoznata od strane organizma kao strano telo i eliminiše se iz organizma. Oblaganjem koloidnih čestica hidrofilnim polimernim omotačem kao što je poli(etilen-oksidi) umnogome se može povećati njihova stabilnost u krvotoku. Hidrofilni omotač daje koloidnim česticama "nevidljivost" za krvne proteine, čime se sprečava imuni odgovor. [32]

Zahvaljujući fizičko-hemijskim i biološkim svojstvima (hidrofilnost, rastvorljivost u vodi i organskim rastvaračima, odsustvo toksičnosti, antigenosti i imunogenosti), PEO se najčešće koristi kao unutrašnji segment triblok kopolimera koji se koriste u kontrolisanom otpuštanju lekova. Amfifilni triblok kopolimeri mogu graditi micelle nano- dimenzija u vodenoj sredini. Hidrofobni segmenti blok kopolimera čine jezgro micelle, dok hidrofilni PEO blok formira omotač (Slika 2.22.a). Veličina micela je najčešće dovoljno mala da može proći kroz kapilare i tako izbeći filtraciju kroz pluća i slezinu. Ovakve micelle su potencijalni nosači lekova jer biodegradabilno jezgro (PCL blok) služi kao rezervoar leka, a poli(etilen-oksidni) omotač povećava stabilnost micelle u biološkom okruženju. Zbog činjenice da je veliki broj lekova nerastvoran u vodi, jasno je zbog čega su micelle triblok kopolimera koje poseduju ovakvu strukturu našle široku primenu u sistemima za isporuku lekova. Lek kao hidrofoban molekul može biti inkapsuliran u jezgro (PCL blok) micelle bilo hemijskim vezivanjem ili fizičkim zarobljavanjem. [32]



Slika 2.22. a) Shematski prikaz micela triblok kopolimera u vodenoj sredini [30], b) Micela sa različitom konfiguracijom PEO omotača: PEO vezan jednih krajem (diblok kopolimeri) i PEO vezan za oba kraja (triblok kopolimeri).

Prednost amfifilnih triblok kopolimera za kontrolisano otpuštanje lekova u odnosu na diblok kopolimere istog sastava je u konfiguraciji PEO omotača i načina njegovog vezivanja za hidrofobno jezgro (Slika 2.22.b). Kod diblok kopolimera, PEO segment je vezan za jezgro preko jedne terminalne grupe, dok je kod triblok kopolimera PEO segment vezan preko obe terminalne grupe. Kada protein priđe miceli, PEO segment vezan preko obe terminalne grupe mnogo efikasnije sprečava njegovu aktivnost zbog konformacije PEO omotača u triblok kopolimernoj miceli. [32]

2.8.1. Postupci pripreme mikro i nanosfera sa inkapsuliranim lekom unutar PCL/PEO kopolimerne matrice

Kada se govori o primeni polimernih nosača u biomedicini, veličina čestica manja od 1000 nm se naziva nanočesticama, dok se o nanočesticama u nauci o materijalima podrazumevaju čestice veličine do 200 nm. Takozvane mikročestice su čestice čija veličina iznosi nekoliko stotina mikrometara. Ukoliko se biodegradabilni polimeri koriste kao nosači u sistemima za kontrolisano otpuštanje lekova, svojstva mikro/nanočestica (veličina čestica, oblik, molekulska struktura i molarna masa) su veoma važna. Navedena svojstva određuju mesto aplikacije jer utiču na raspodelu leka u organizmu, vreme koje je potrebno da polimer i lek stignu na mesto dejstva, kontrolisano otpuštanje, terapijske doze, itd. Zbog svega ovoga je neophodno razviti odgovarajući metod za pripremu mikro/nanočestica za biomedicinsku aplikaciju. [55] Postoji veliki broj tehnika pripreme mikro/nanočestica, a koja će tehnika biti primenjena zavisi pre svega od vrste leka (hidrofilan ili hidrofoban) i polimera unutar kojeg se lek inkapsulira (Tabela 2.2). O najčešće primenjenim tehnikama će biti reči u nastavku teksta.

Tabela 2.2. Tehnike pripreme mikro/nanočestica sa inkapsuliranim lekom.

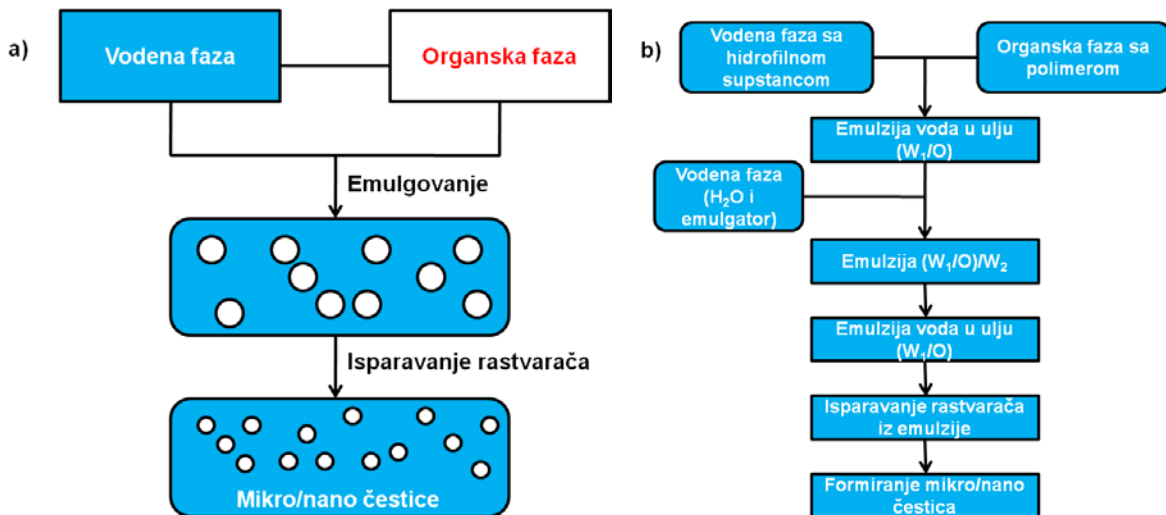
<i>Iz emulzije</i>
"ulje u vodi" (oil in water, O/W)
"voda u ulju u vodi" (water in oil in water, W/O/W)
"ulje u ulju" (oil in oil, O/O)
"čvrsto u ulju u vodi" (solid in oil in water, S/O/W)
"čvrsto u ulju u ulju" (solid in oil in oil, S/O/O)
<i>Druge tehnike</i>
"spray drying" i "spray – freezing" metode
Elektrosprej metoda
Dijaliza
Metode u kojima se koriste superkritični fluidi (SCF)
<i>In situ</i> formiranje mikročestica
Amonoliza
Tehnike topljenja

2.8.2. Priprema mikročestica postupcima iz emulzije

Postupak otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije je često korišćen postupak za pripremu mikro/nanočestica inkapsuliranog leka u polimernu matricu usled mogućnosti primene na veliki broj polimernih sistema i inkapsulacije kako hidrofilnih tako i hidrofobnih supstanci. Tehnika se zasniva na emulgovanju u cilju stvaranja malih kapljica organske faze u vodenoj fazi, a zatim uklanjanja lako isparljivog rastvarača otparavanjem.

- ***tehnika "ulje u vodi" (oil in water, O/W)***

Veliki broj lekova je hidrofoban, tj. nerastvoran u vodi, a rastvoran u organskim rastvaračima koji se ne mešaju sa vodom. Najjednostavniji metod za inkapsulaciju hidrofobne komponente unutar polimernog matriksa je metoda otparavanja rastvarača iz emulzije "ulje u vodi", O/W, i najčešće je korišćen za pripremu polimernih mikro/nanočestica (Slika 2.23.). Postupak se izvodi tako što se prvo rastvori lek i biodegradabilni polimer u lako isparljivom organskom rastvaraču (kao što je dihlormetan ili etil-etar), zatim se organska faza disperguje u vodenoj fazi koja sadrži surfaktante i/ili stabilizatore i intenzivno meša. Nakon toga, organske kapljice se pretvaraju u mikro/nanosfere kako organski rastvarač isparava. [55] Isparljivi rastvarači se mogu ukloniti otparavanjem na vazduhu ili pomoću gasa koji se propušta kroz emulziju. Veliki broj različitih hidrofobnih lekova je inkapsulirano primenom ove metode: antihipertenzivi, antidepresivi, kortikosteroidi, antiinflamatorni lekovi, itd. [101]



Slika 2.23. Priprema mikro/nanočestica postupkom otparavanja lako isparljivog rastvarača iz: a) emulzije "ulje u vodi", O/W i b) emulzije "voda u ulju u vodi", W/O/W. [55]

- **tehnika "voda u ulju u vodi" (water in oil in water, W/O/W)**

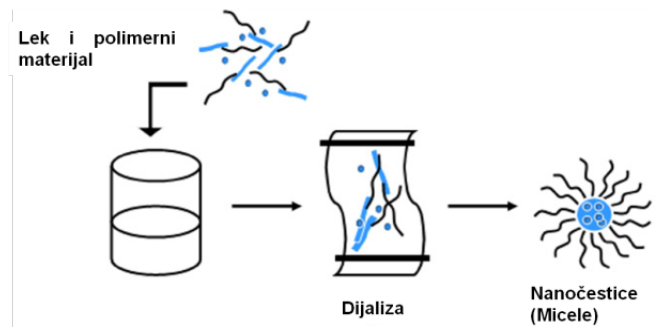
Pored postupka dobijanja mikročestica iz emulzije "ulje u vodi", najčešće korišćena tehnika za inkapsulaciju hidrofilnih supstanci je tehnika pripreme iz emulzije "voda u ulju u vodi", W/O/W. Ovom metodom se postiže visoka efikasnost inkapsulacije hidrofilnih komponenti u biodegradabilne mikročestice, pre svega peptida i proteina. U poređenju sa jednostavnom O/W tehnikom, prednost ove metode jeste u finalnom uklanjanju uljane faze ispiranjem u nekoliko koraka, ali i sprečavanje agregacije čestica tokom primene. Kod W/O/W metoda, prvo se vodeni rastvor hidrofilne komponente (proteina, npr.) disperguje u organskoj fazi u kojoj je rastvoren polimer (rastvor polimera u dihlormetanu) pri čemu nastaje prva emulzija W_1/O . (Slika 2.23.b) Nakon toga, nastala emulzija se disperguje u velikoj zapremini vode u kojoj se nalazi emulgator, kao što je poli(vinil alkohol), PVA, pri čemu dolazi do stvaranja emulzije W/O/W. Do formiranja mikročestica dolazi ukljanjanjem rastvarača iz emulzije bilo otparavanjem ili njegovom ekstrakcijom. Prilikom ekstrakcije rastvarača, emulzija W/O/W se tretira velikom količinom vode ili ko-rastvarača (acetona ili alkohola). [102]

2.8.3. Druge tehnike pripreme mikro/nanočestica

- **metoda dijalize**

Metoda dijalize se intenzivno koristi za dobijanje mikro/nanočestica ali pre svega za dobijanje micela nano dimenzija. Uobičajena procedura se sastoji u tome da se prvo polimer i lek rastvore u organskom rastvaraču koji je mešljiv sa vodom (DMSO ili DMF) a zatim se dijalizuje u vodi (Slika 2.24.). Tokom procesa dijalize dolazi do samoorganizovanja polimera

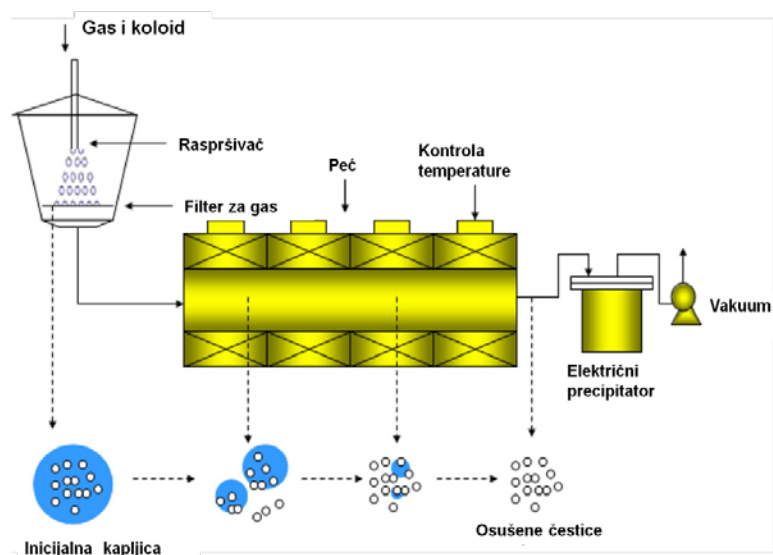
i lek se inkapsulira unutar jezgra micle. Istovremeno, polupropustljiva membrana omogućava uklanjanje leka koji se ne inkapsulira. [101]



Slika 2.24. Priprema nanočestica metodom dijalize.[55]

- **"spray-drying" tehnika**

Priprema mikročestica "spray-drying" tehnikom se najčešće primenjuje za inkapsulaciju proteina kako bi se povećala stabilnost ovih biomakromolekula, ali se može koristiti i za pripremu čestica unutar kojih se inkapsuliraju hidrofobni lekovi. Koloidni rastvor se pomoću pumpe ubacuje u raspršivač, nakon čega dolazi do atomizacije pomoću komprimovanog vazduha, pri čemu se tečnost razara (raspršuje) na sitne kapljice. Nastale kapljice zajedno sa toplim vazduhom dolaze u peć/komoru gde rastvarač isparava i odlazi iz sistema. Suvi proizvod se na kraju sakuplja u kolektorskoj boci (precipitatoru) (Slika 2.25.). Ovom tehnikom se mogu dobiti čestice mikrometarskih dimenzija, najviše se primenjuje za pripremu velikih količina mikročestica ("scale up"), i tehnika je nezavisna od rastvorljivosti leka i polimera. Prednost ove metode je kontrola svojstava mikročestica podešavanjem parametara tokom tehnološkog procesa, a glavni nedostatak jeste rad na visokim temperaturama. [101, 103]



Slika 2.25. Priprema mikro/nanočestica "spray-drying" tehnikom.[55]

2.8.4. Svojstva leka koja određuju postupak mikroinkapsulacije i otpuštanja leka

Pre nego što se primeni u određenoj terapiji, potrebno je ispitati kako fizičko-hemijska svojstva leka (rastvorljivost, lipofilnost, pKa vrednost, propustljivost i stabilnost), tako i farmako-kinetički parametre (apsorptivnost, distribucija, metabolisanje, izlučivanje). [104] Prilikom inkapsulacije leka u polimernu matricu, neophodno je uzeti u razmatranje sledeće parametre:

- rastvorljivost leka u vodi i organskim rastvaračima
- stabilnost leka
- interakcije između polimera i leka
- svojstva leka u čvrstom stanju

Termin hidrofobni lek se pre svega odnosi na grupu molekula koji su nerastvorni u vodi, a uglavnom rastvorni u većini organskih rastvarača. Slabo rastvornom supstancom se smatra supstanca čija je rastvorljivost 1 – 10 mg/ml, veoma slabo rastvorljivom supstanca čija je rastvorljivost 0,1 – 1 mg/ml, a nerastvornom supstanca kada se manje od 0,1 mg ove supstance rastvara u 1 ml određenog rastvarača. Mikročestice se najčešće pripremaju emulzionim postupcima koji podrazumevaju prisustvo vodene faze (najčešće vodeni rastvor poli(vinil-alkohola), stabilizator emulzije), stoga je važno prethodno definisati rastvorljivost leka u vodi. Kod lekova koji imaju mogućnost jonizacije, potrebno je definisati i pH vrednost rastvora. Pored vodene faze, u emulzionim tehnikama je prisutna i organska faza, što zahteva određivanje rastvorljivosti leka i u određenim organskim rastvaračima (metilenhloridu ili etil-acetatu).

Prilikom mikroinkapsulacije lekova, lek se rastvara u organskoj fazi (emulzioni postupci) a često se isparavanje rastvarača odvija na višim temperaturama, pa lek mora biti stabilan u organskim rastvaračima ali i otporan na izlaganje visokim temperaturama. Pored termičke stabilnosti, lek mora biti otporan i na fotodegradaciju, proces oksidacije, vlažnost. Ukoliko lek sadrži hidrolizabilne veze, kao što su estarske, može doći do njegove razgradnje tokom procesa mikroinkapsulacije, pri čemu do degradacije leka može doći i kao posledica prisustva degradacionih proizvoda polimerne matrice nastalih tokom pripreme mikročestica. [105]

Sposobnost nekog leka da uspostavi interakcije sa polimernom matricom može dovesti do degradacije polimera ukoliko lek u svojoj strukturi ima amino ili karboksilne funkcionalne grupe. Potencijalne interakcije koje se uspostavljaju između leka i polimera mogu dovesti do toga da se lek ne otpušta iz polimerne matrice.

Pre nego što se inkapsulira u polimernu matricu, lek je u čvrstom stanju, i može biti amorfan ili kristaliničan. Tokom inkapsulacije, lek se rastvara ili disperguje u rastvaraču tako da u mikročesticama može biti dispergovan ili može formirati amorfne ili kristalne oblasti. Ukoliko se inkapsulirani lek u polimernoj matrici nalazi u kristalnom obliku, to se može odraziti i na profile otpuštanja leka iz matrice, pa je neophodno uraditi termičku analizu mikrosfera u kojima je inkapsuliran lek. [101, 106]

Ibuprofen

Ibuprofen, derivat fenil-propionske kiseline, spada u grupu nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAID) koji se najviše koristi u terapiji reumatoidnog artritisa, osteoartritisa i kao analgetik. Otkrio ga je *Dr Stewart Adams* 50-tih godina XX veka u Velikoj Britaniji, a prvi put je bio dostupan u slobodnoj prodaji 1969. godine. Tablete ibuprofena su još poznate i pod komercijalnim nazivom *Advil*, *Brufen*, *Nurofen* i *Motrin*. Njegova molekulska formula je $C_{13}H_{18}O_2$, a IUPAC-ov naziv za ibuprofen je 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanska kiselina (Slika 2.26.); to je bela kristalna supstanca, temperatura topljenja ibuprofena se kreće u intervalu od 75 do 77,5 °C, dobro se rastvara u većini organskih rastvarača, veoma se dobro rastvara u alkoholu, dok je njegova rastvorljivost u vodi 21 mg/dm³. Ibuprofen se smatra jednim od NSAID sa najmanje neželjenih efekata i sa velikom tolerancijom, ali ukoliko dođe do ispoljavanja neželjenih efekata (veoma retko), to su najčešće akutna oštećenja jetre i intestinalnog trakta. [107] U manjim dozama, 0,6 do 1,2 g na dan, može se koristiti kao antipiretik (za snižavanje temperature), kod migrena i za smanjenje osećaja bola, dok su za efektivnu terapiju hroničnog, upalnog artritisa potrebne

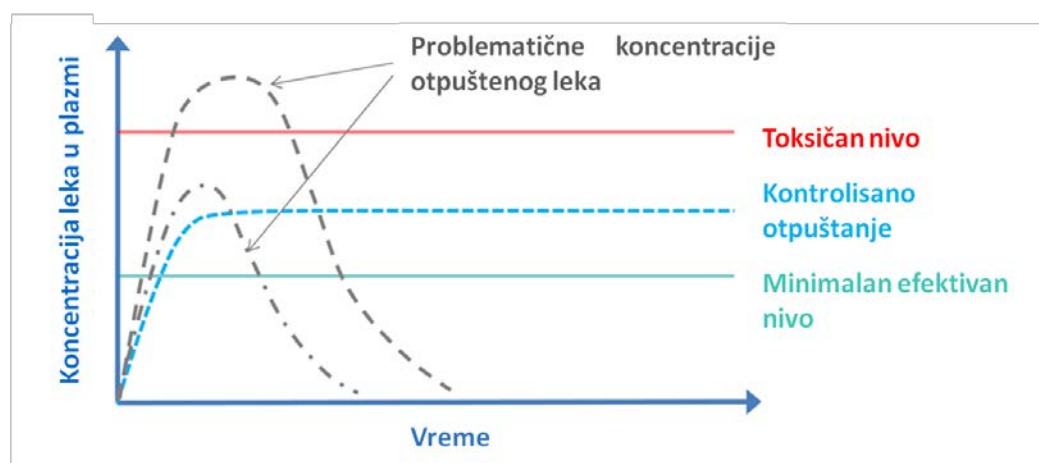
dnevne doze od 1,6 do 2,4 g na dan tokom dužeg vremenskog perioda. Uzimanje odgovarajuće doze leka u konvencionalnim formulacijama (tablete), ibuprofen se veoma brzo apsorbuje, a koncentracija leka u krvnoj plazmi (serumu) se dostiže za 1 do 2 h, nakon čega je potrebno uzeti novu dozu leka. U cilju prevazilaženja kratkog vremena održavanja koncentracije ibuprofena, dugotrajna isporuka ibuprofena se može ostvariti inkapsulacijom leka unutar biodegradabilne polimerne matrice, kao što je PCL. [108, 109] U ovoj studiji, u okviru ispitivanja potencijalne primene PCL/PEO triblok kopolimera kao matrica za otpuštanje leka, kao model lek će biti korišćen upravo ibuprofen.



Slika 2.26. Struktura ibuprofena.

2.8.5. Koncept kontrolisanog otpuštanja leka iz polimerne matrice

Konvencionalni sistemi za isporuku lekova (tablete i intravenozne injekcije) isporučuju celokupnu dozu leka odjednom što za rezultat ima visoku, često i toksičnu, koncentraciju leka koja može izazvati neželjene efekte. Zavisnost koncentracije leka u krvnoj plazmi pacijenta od vremena je prikazana na Slici 2.27. gde se uočavaju tri oblasti: neefektivan nivo (kada je koncentracija leka nedovoljna da bi se ostvario terapijski efekat), terapijski nivo (postignuta je dovoljna koncentracija leka) i toksični nivo (koncentracija leka je visoka i izaziva neželjene efekte). Kratka vremena dejstva lekova zahtevaju česta i ponovna unošenja leka usled čega dolazi do pojave promenljivog nivoa leka u organizmu označenih kao problematične koncentracije. Tradicionalna isporuka leka je nepredvidiva i neefikasna; najčešće je potrebno prisustvo velike količine leka kako bi se dostigla efektivna, terapijska koncentracija leka na ciljanom mestu. U nekim slučajevima, početna koncentracija unetog leka može dostići toksičan nivo. Terapijski efekat se ne postiže jednokratnom isporukom leka već održavanjem određene koncentracije leka tokom dužeg vremenskog perioda. Sistem produžene isporuke lekova se karakteriše kontrolisanim oslobađanjem leka u cilju postizanja odgovarajuće koncentracije leka u plazmi za duži vremenski period i mestu gde je taj lek potreban. [100]



Slika 2.27. Grafički prikaz otpuštanja leka kao funkcija zavisnosti koncentracije leka u plazmi kod pacijenta od vremena isporuke leka. [110]

Sistemi za kontrolisanu isporuku leka obezbeđuju terapijsku koncentraciju leka tokom dužeg vremena, ali i redukuju neželjene efekte leka. Takođe, formulacije koje se koriste kao sistemi za isporuku lekova mogu povećati efikasnost nestabilnih lekova, koji bi se nakon konvencionalne isporuke, razgradili prilikom prolaska kroz fiziološke barijere. Labilne aktivne supstance (peptidi, enzimi, proteini) mogu izgubiti aktivnost prilikom prolaska kroz metaboličke puteve ili usled izloženosti kiselosti u želucu. Biodegradabilni polimeri mogu imati zaštitnu ulogu, inkorporirana aktivna supstanca je zaštićena od fiziološke degradacije dok ne dođe na željeno mesto dejstva. Potencijalno toksični lekovi, kao što su antikancer agensi, mogu se isporučiti u visokoj koncentraciji na ciljano, tumorom zahvaćeno mesto, čime se povećava terapijska efikasnost, ali se istovremeno minimizira sistemsko izlaganje dejstvu leka i sprečavaju se neželjena dejstva. [100]

Postoji nekoliko različitih formulacija koji se koriste za izradu sistema za kontrolisano otpuštanje lekova, koriste se različiti nosači, a samim tim se i lek otpušta drugačijim mehanizmima:

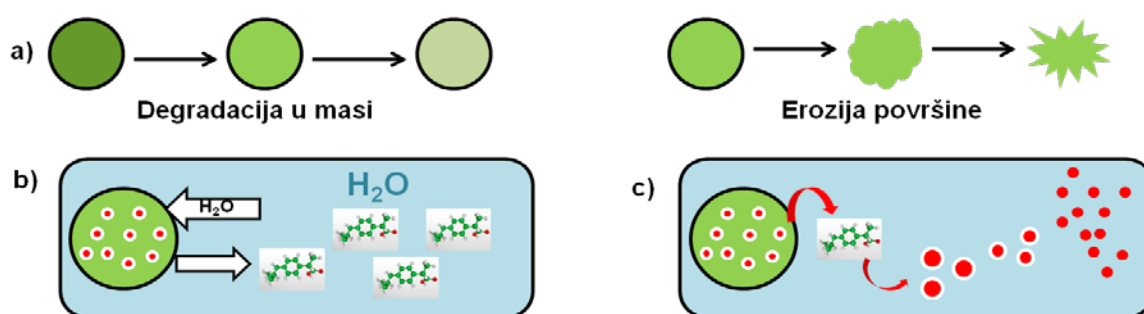
- difuziono kontrolisane membrane koje služe kao rezervoari leka
- masti, kreme i flasteri namenjeni za transdermalnu upotrebu gde se procesom difuzije aktivna supstanca oslobađa iz rezervoara i prolazi kroz kožu
- razni implatni koji služe kao rezervoari iz kojih se lek oslobađa osmozom
- pro-lekovi – sistemi gde je aktivna supstanca hemijski vezana za polimer i konvertuje se u formu leka u tačno određenom tkivu pod dejstvom enzima
- hidrogelovi – umreženi hidrofilni polimeri, nerastvorni u medijumu u kojem se nalaze; lek se oslobađa procesom difuzije

- lipozomalni sistemi – vezikule koje su zakačene/vezane za bimolekularne fosfolipidne slojeve. Monolamelarni sistemi sadrže jedan sloj unutar kojeg je zarobljen lek, dok su višelamelarni sistemi sastavljeni od više koncentričnih slojeva.
- polimerni nosači – biodegradabilne ili u vodi rastvorne polimerne matrice, najčešće u formi mikrosfere i nanosfera, filmova. Aktivna supstanca je zarobljena unutar polimerne matrice ali nije hemijski vezana. Lek se oslobađa iz matrice procesom difuzije, rastvaranjem ili degradacijom polimera i rastvaranjem leka u medijumu. [111, 112]

2.8.6. Mehanizmi oslobađanja aktivnih komponenti (lekova) iz polimerne matrice

Lek se iz polimerne matrice unutar koje je dispergovan može osloboditi u spoljni medijum na nekoliko načina:

- degradacijom polimernog matriksa (Slika 2.28.a)
- difuzijom molekula leka kroz polimerni matriks (Slika 2.28.b)
- rastvaranjem leka u medijumu u kojem se nalazi polimer sa inkapsuliranim lekom (Slika 2.28.c) [113]



Slika 2.28. Mehanizmi oslobađanja leka iz polimerne matrice: a) degradacijom polimera (degradacija u masi i/ili erozijom površine), b) procesom difuzije i c) rastvaranjem leka u ispitivanom medijumu.

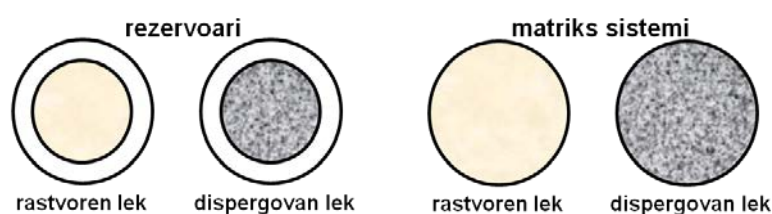
Molekuli leka zarobljeni unutar polimerne matrice mogu biti oslobođeni usled degradacije polimera, a mehanizam degradacije polimera u bilo kojoj formulaciji indirektno utiče na profile otpuštanja inkapsuliranog leka. U slučaju otpuštanja leka procesom difuzije, koncentracioni gradijent je vučna sila ovog procesa, i molekuli leka difunduju kroz polimerni matriks u spoljni medijum. Treći mehanizam oslobađanja leka je važan u slučaju kada se lek u inicijalnoj fazi (faza inkubacije) nalazi unutar polimernog matriksa blizu površine ili je adsorbovan na površini pa dolazi do njegovog rastvaranja u medijumu koji ga okružuje.

Kojim mehanizmom će se lek oslobađati iz polimerne matrice zavisi od izabranog sistema polimer-lek, a pre svega zavisi od hidrofилности polimera, sposobnosti njegove degradacije, molarne mase, kristaliničnosti polimera, veličine, oblika i poroznosti polimerne matrice. [92]

Na osnovu mehanizma koji kontroliše oslobađanje leka, sistemi za isporuku lekova se mogu klasifikovati na sledeći način:

- a) difuziono kontrolisani sistemi: rezervoari (membranski sistemi) i matriks (monolitički sistemi)
- b) hemijski kontrolisani sistemi: bioerodabilni i biodegradabilni sistemi
- c) sistemi koji su aktivirani rastvaračem: osmotski kontrolisani sistemi i sistemi koji bubre

U većini sistema za isporuku lekova, prisutan je najčešće kombinovani mehanizam oslobađanja leka. U difuzionim sistemima, lek difunduje kroz polimernu matricu ali može se istovremeno odigravati i degradacija polimera, što takođe doprinosi otpuštanju leka iz matriksa. Postoje dva tipa difuziono kontrolisanih sistema: membranski sistemi koji se ponašaju kao rezervoari i monolitski matriks sistemi (Slika 2.29.). Sistemi rezervoara su dizajnirani tako da se u unutrašnjoj šupljini, jezgri, nalazi rastvoren ili suspendovan lek, koji je okružen polimernom membranom. Oslobađanje leka iz ovako dizajnirane polimerne matrice je kontrolisano procesom difuzije leka kroz membranu. Prolazak leka kroz membranu odigrava se kombinovanim mehanizmom, procesom rastvaranja, a zatim difuzije: prvo dolazi do rastvaranja leka u membrani sa jedne strane, potom se odigrava proces difuzije kroz membranu i desorpcije sa druge strane membrane. U matriks sistemima, lek je uniformno rastvoren ili dispergovan unutar polimerne matrice. Ovakve sisteme je lako dobiti, za njih je karakteristično inicijalno otpuštanje veće količine leka u poređenju sa rezervoarima, a mogu biti napravljeni tako da tokom vremena oslobađaju skoro konstantnu količinu leka. [114]



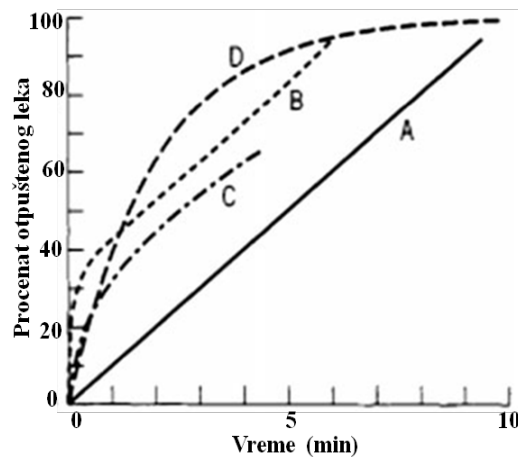
Slika 2.29. Grafički prikaz difuzionih sistema za kontrolisano otpuštanje leka.

Kinetika otpuštanja leka je određena i fizičkim svojstvima leka, pre svega molarnom masom leka i rastvorljivosti u vodi. Difuzija leka kroz polimernu matricu zavisi od

rastvorljivosti leka u polimernoj matrici, veličine molekula leka, kao i njegovoj distribuciji unutar polimernog matriksa. U slučaju inkapsulacije leka u PCL polimernu matricu, hidrofobni lekovi su uglavnom uniformno dispergovani unutar polimerne matrice, dok hidrofilni lekovi imaju tendenciju migriranja ka površini matrice i najčešće ostaju adsorbovani na površini polimerne formulacije. Što je veći afinitet leka ka polimernoj matrici (hidrofoban lek ima afinitet ka PCL), veća je efikasnost inkapsulacije. [115]

2.8.7. Kinetika otpuštanja leka iz polimerne matrice

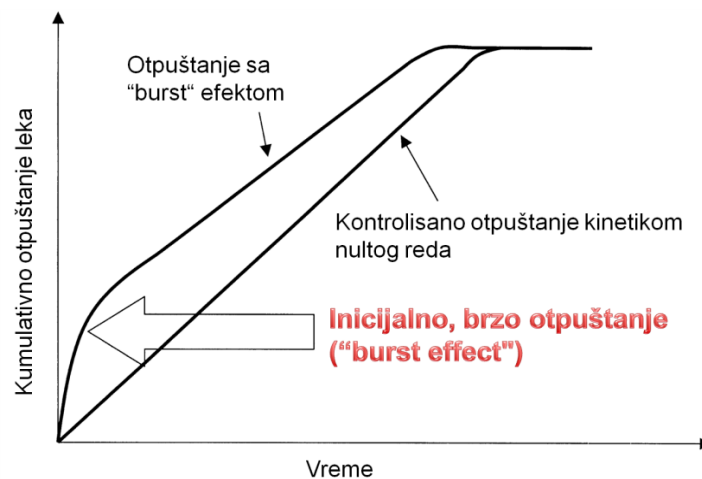
Otpuštanje aktivne supstance (leka) iz polimerne matrice koja se ne degradira za kratko vreme (neerodabilnih formulacija polimera) se može odvijati na nekoliko načina. Teorijske krive (A, B, C, D) koje opisuju četiri različite kinetike otpuštanja leka iz polimerne matrice su prikazane na Slici 2.30. Kriva A prikazuje otpuštanje aktivne supstance iz neerodabilnih polimera u kojima se inkapsuliran materijal oslobađa kontinuiranom difuzijom kroz omotač uniformne debljine, odnosno otpuštanje iz rezervoarskih sistema koji su već opisani. Brzina otpuštanja leka ostaje konstantna sve dok je koncentracija inkapsulirane supstance unutar mikrokapsule i van nje konstantna, čime i koncentracioni gradijent kroz membranu ostaje konstantan. Kod ovog sistema izostaje inicijalno, brzo otpuštanje leka. Ukoliko jedan deo inkapsuliranog leka migrira kroz membranu mikrosfera tokom skladištenja, kao posledica neravnomernog dispergovanja unutar polimerne matrice, dolazi do inicijalnog ubrzanog otpuštanje kao što je prikazano krivom B (prisutan tzv. "burst" efekat). Otpuštanje inkapsuliranog leka prikazano krivom C se odigrava po *Higuchi* – jevom modelu u slučaju kada je polimerni matriks inertan prema inkapsuliranom leku, i ovaj model se primenjuje kada procenat otpuštenog leka iznosi maksimalno 60 % od ukupne količine leka. U ovom slučaju, procenat oslobođenog leka iz polimerne matrice je proporcionalan kvadratnom korenu vremena t . Oslobođanje aktivne supstance iz polimerne matrice se može odvijati i kinetikom prvog reda kao što je prikazano krivom D. [116]



Slika 2.30. Teorijske krive kontrolisanog otpuštanja: (A) membranski rezervoar bez odlaganja i ubrzanog otpuštanja, (B) sa početnim ubrzanim otpuštanjem, (C) otpuštanje iz matrice sa zavisnošću od kvadratnog korena vremena, (D) sistem sa kinetikom prvog reda [116]

2.8.8. Inicijalno brzo otpuštanje leka iz polimerne matrice ("burst effect"): značaj i uzroci

U sistemima koji se koriste za kontrolisano otpuštanje lekova, često otpuštanje leka počinje odmah, neposredno nakon stavljanja formulacije sa inkapsuliranim lekom u medijum u kojem se prati otpuštanje. U ovoj početnoj fazi se otpusti znatno veća količina leka u odnosu na količinu leka koja se postigne u stabilnoj, konstantnoj fazi otpuštanja. Ovaj fenomen se definiše kao inicijalno, brzo otpuštanje, odnosno "burst release" i dešava se u kratkom vremenskom intervalu u poređenju sa celokupnim vremenom otpuštanja. Posledica pojave ovog fenomena je veća količina otpuštenog leka u početku (Slika 2.31.), što dalje može smanjiti "životni vek" formulacije u kojoj je lek inkapsuliran. [117]



Slika 2.31. Shematski prikaz inicijalnog, brzog otpuštanja ("burst" efekta) kod kinetike nultog reda. [117]

Inicijalno brzo otpuštanje nije uvek negativna posledica u sistemima za dugotrajno kontrolisano otpuštanje leka. U nekim slučajevima je poželjno da se brzo otpuste veće količine leka u početnoj fazi (Tabela 2.3.). Inicijalno brzo otpuštanje leka može biti optimalan mehanizam isporuke u slučaju terapije povreda i rana kada je na početku neophodna veća količina leka, a zatim manje koncentracije leka tokom dužeg perioda lečenja. [117] Najveći problem sa pojavom "burst effect" jeste njegova nepredvidivost, čak i kada je poželjna pojava ovog efekta, količine oslobođenog leka ne mogu se kontrolisati.

Tabela 2.3. Primena sistema za isporuku lekova: prednosti i mane "burst effect" – a. [117]

<i>Sistemi kod kojih je poželjno inicijalno, brzo otpuštanje</i>	<i>Negativni efekti brzog otpuštanja</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Tretman povreda i rana (neophodna početna veća količina leka, a zatim manje količine) • Inkapsulacije aroma • Ciljana isporuka leka • Pulsno oslobađanje leka 	<ul style="list-style-type: none"> • Lokalna ili sistemska toksičnost (usled visoke koncentracije leka) • Kratak polu-život leka <i>in vivo</i> • Ekonomski i terapijski gubitak leka • Skraćeni profili otpuštanja; zahteva često doziranje

Ipak, najveći napor su usmereni na prevenciju i smanjenju pojave inicijalnog, brzog otpuštanja leka, koje je karakteristično za male molekule (lekove malih molarnih masa i male veličine), a koje može dovesti do postizanja koncentracija leka *in vivo* koje su bliske ili iznad toksičnih. [118]

Inicijalno brzo otpuštanje leka iz matriks (monolitskih) sistema u kojima je lek dispergovan, može biti uzrokovano:

- samim uslovima pripreme (inkapsulacije) formulacije
- geometrijom uzorka
- površinskim svojstvima materijala koji se koristi kao matrice
- interakcijama lek-polimer
- morfologijom i poroznom strukturom materijala; heterogenošću polimernog materijala

Jedno od objašnjenja pojave inicijalnog brzog otpuštanja leka iz matrice jeste da pojedini lekovi budu zarobljeni na površini unutar polimerne matrice tokom preseca pripreme, naročito u slučaju visokog sadržaja leka, i zbog toga dolazi do njihovog naglog otpuštanja čim dođu u kontakt sa ispitivanim medijumom. [119, 120] Migracija leka tokom

sušenja i skladištenja pripremljenih formulacija može rezultovati heterogenom distribucijom leka unutar polimernog matriksa, i dalje dovesti do pojave "burst effect"-a.

Drugi važan faktor koji utiče na pojavu inicijalnog brzog otpuštanja leka su uslovi pripreme formulacija, a pre svega se misli na maseni odnos polimer/lek. Sa smanjenjem količine polimera korišćenog za inkapsulaciju, pojava ovog efekta je izraženija jer su mikročestice dobijene na ovaj način manje kompaktne. Heterogenost matrice je takođe jedan od uzroka pojave "burst effect"-a, usled čega je lek neravnomerno dispergovan i može migrirati. Lek se inicijalno, brzo otpušta iz polimernih mikročestica ukoliko su one porozne i postoje šupljine, a morfologija mikročestica je određena između ostalog načinom i uslovima pripreme (tehnika pripreme, vrsta korišćenog rastvarača, temperatura reakcione smeše, itd.) [117]

Sistemi za kontrolisanu isporuku lekova bi bili idealni ukoliko bi se otpuštanje leka odigravalo kontinuirano tokom vremena i bez pojave inicijalnog brzog otpuštanja leka. Postoje nekoliko novih tehnika kojima bi se sprečila pojava "burst effect"-a (pravljenje dvostrukog omotača mikrosfera od erodabilnih polimera ili modifikacijom površine mikrosfera sa inkapsuliranim lekom), ali njihova primena može uticati na smanjenje sadržaja inkapsuliranog leka i ekonomski je neisplativa.

2.9. Primena matematičkih modela u cilju određivanja mehanizma otpuštanja leka iz polimerne matrice

U cilju ispitivanja mehanizma otpuštanja leka iz polimerne matrice, mogu se primeniti različite metode od kojih su neke statističke ili metode koje se zasnivaju na modelima. Metode koje zavise od izabranog modela predstavljaju različite matematičke funkcije kojima se opisuju profili rastvaranja/otpuštanja leka. Najčešće korišćeni modeli su: model otpuštanja leka prikazani kinetikom nultog i prvog reda, Higuchi-jev model, Hixson-Crowell, Korsmayer-Peppas, Baker-Lonsdale, Weibull, Hophenberg, Gomperty i regresioni modeli. [121]

Model otpuštanja leka opisan kinetikom nultog reda

Sporije otpuštanje leka iz određenih formulacija može se opisati sledećom jednačinom:

$$M_0 - M_t = K_0 t \quad (2.9.1.)$$

odnosno

$$M_t = M_0 - K_0 t \quad (2.9.2.)$$

gde je M_t količina leka oslobođena u vremenu t , M_0 je početna količina leka u rastvoru (najčešće je $M_0 = 0$) a K_0 je konstanta oslobađanja leka prikazana kinetikom nultog reda

izražena u jedinicama koncentracija / vreme. Otpuštanje leka opisano kinetikom prvog reda javlja se kod slabo rastvornih lekova koji se nalaze u formi tableta ili inkapsuliranih u matricu. [122, 123]

Model otpuštanja leka opisan kinetikom prvog reda

Otpuštanje leka kinetikom prvog reda se može prikazati jednačinom:

$$\frac{dC}{dt} = -Kc \quad (2.9.3.)$$

odnosno
$$\log C = \log C_0 - Kt/2.303 \quad (2.9.4.)$$

U datim jednačinama, K (odnosno k) je konstanta brzine prvog reda, C_0 je početna koncentracija leka, t je vreme praćenja otpuštanja leka. Ovaj model se može primeniti za otpuštanje leka rastvornog u vodi iz formulacija kao što su porozne matrice. [121, 124]

Higuchi-jev model

Jedna od najpoznatijih i najčešće korišćenih matematičkih jednačina, kojom se opisuje otpuštanje leka iz matrice, je *Higuchi*-jeva jednačina, koja je prvi put objavljena 1961. godine. [125] U početku je bila primenljiva samo za planarne sisteme, a modifikacijom osnovne jednačine moguće ih je primeniti na različite sisteme i geometrije, uključujući i porozne sisteme. Higuchi-jev model se uglavnom primenjuje na sisteme kada je lek (rastvoran u vodi ili slabo rastvoran) inkorporiran u čvrstu matricu. Osnovna jednačina *Higuchi*-jevog modela ima oblik:

$$\frac{M_t}{A} \sqrt{D(2c_0 - c_s)c_s t} \quad (2.9.5.), \quad \text{za } c_0 > c_s$$

gde je M_t kumulativna količina leka oslobođena u vremenu t , A je površina formulacije izložena medijumu u koji se oslobađa lek, D je difuzivnost leka u polimernom nosaču, a c_0 i c_s su početna koncentracija leka i rastvorljivost leka u polimeru, redom. Ova jednačina može

biti pojednostavljena i predstavljena u obliku:
$$\frac{M_t}{M_\infty} = \sqrt{\frac{Dt}{\pi\delta^2}} = K^t \sqrt{t} \quad (2.9.6.)$$

U jednačini (2.9.6.) parametar M_t predstavlja ukupnu količinu leka otpuštenog u vremenu t , M_∞ - ukupna količina leka otpuštenog u beskonačnom vremenu (koja može biti jednaka količini inkapsuliranog leka unutar sistema za vreme $t = 0$); k je konstanta kontrolisanog otpuštanja, t je izmereno vreme, δ - debljina polimernog filma. Na osnovu *Higuchi*-jeve jednačine se zaključuje da frakcija leka oslobođenog tokom vremena t je proporcionalna kvadratnom korenu vremena. [126]

Najveća prednost primene Higuchi-jevog modela je njegova jednostavnost, ali zbog pretpostavki na kojima se ova metoda zasniva (početna koncentracija leka u sistemu je mnogo veća od rastvorljivosti leka; matematička analiza se zasniva na jednodimenzionalnoj difuziji; bubrenje i rastvaranje polimerne matrice je zanemarljivo; difuzivnost leka je konstantna), nije primenljiva na veliki broj sistema za isporuku lekova. Ipak, primenom ove metode se može dobiti delimičan uvid u mehanizam isporuke leka iz polimerne matrice.

Ritger-Peppas-ov model

Još jedna veoma jednostavna semi-empirijska jednačina koja se koristi za opisivanje otpuštanja lekova iz polimerne matrice jeste *stepeni zakon* (često se naziva i *Ritger-Peppas-ov model* [127]):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (2.9.7.)$$

gde je M_t – ukupna količina leka otpuštenog u vremenu t , M_∞ je ukupna količina leka otpuštenog u beskonačnom vremenu (koja može biti jednaka količini inkapsuliranog leka unutar sistema za vreme $t = 0$); k je konstanta kontrolisanog otpuštanja, t je izmereno vreme, a n je difuzioni eksponent koji određuje mehanizam transporta. Teorijski, ovaj model se može primeniti na prvih 60 % oslobođene frakcije leka. Vrednosti parametra n na osnovu kojeg se može odrediti mehanizam otpuštanja leka iz polimernih sistema zavisi od geometrije polimerne matrice (Tabela 2.4.). [128]

Tabela 2.4. Mehanizmi oslobađanja leka iz polimerne matrice u zavisnosti od vrednosti parametra n . [126]

Tanak film	Cilindar	Sfera	Mehanizam isporuke
0,50	0,45	0,43	<i>Fikova difuzija</i>
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	<i>Anomalni transport</i>
1,0	0,89	0,85	<i>Tip – II transporta (ne-Fikov difuzioni mehanizam)</i>

Na osnovu jednačine (2.9.7.) i izračunate vrednosti parametra n , postoje dva granična slučaja na osnovu kojih se definiše mehanizam transporta leka: kada je vrednost $n = 0,43$ mehanizam otpuštanja leka je Fikova difuzija ili slučaj – I transporta (Tip – I), otpuštanje leka je difuziono kontrolisano, i kada je $n = 0,85$ (otpuštanje leka je kontrolisano procesom bubrenja polimerne matrice). Kada n ima vrednost 0,85, brzina otpuštanja leka je nezavisna od vremena. Ovaj slučaj odgovara kinetici nultog reda. Za sferne sisteme, kada se govori o polimerima, ovaj mehanizam transporta se označava i kao *Tip-II transporta* i odgovara ne-Fikovoj difuziji. Tokom ove vrste transporta, dolazi do relaksacije makromolekulskih lanaca

usled ulaska vode u sistem koja se ponaša kao plastifikator i smanjuje temperaturu ostakljivanja polimera. Usled smanjenja T_g , polimer prelazi iz staklastog u gumoliko stanje, čime se povećava mobilnost polimernih lanaca. Vrednost n između 0,43 i 0,85 ukazuju na postojanje oba fenomena (ne-Fikova difuzija, anomalni transport), odnosno da se lek otpušta kombinovanim mehanizmom. Ovaj način otpuštanja leka iz polimerne matrice se javlja kada se lek otpušta iz polimera koji bubre i staklastih polimernih matrica. Dve ekstremne vrednosti za eksponent n , 0,85 i 0,43 su jedino validne za sfernu geometriju (mikro i nanosfere). Za oblike ploča (filma) i cilindra, vrednosti parametra n imaju druge vrednosti i prikazane su u Tabeli 2.4. [116, 126]

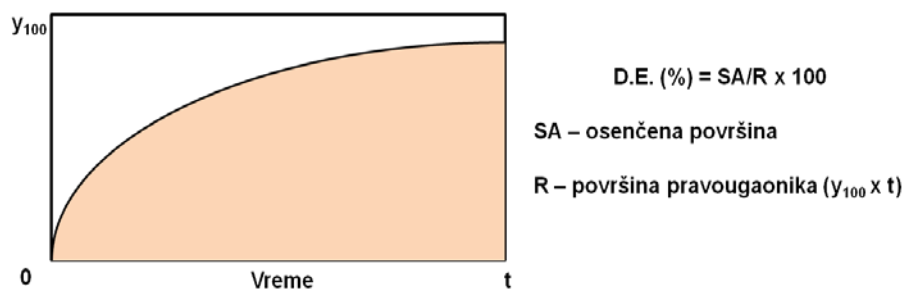
Primenom opisanih matematičkih modela se dobijaju kinetički parametri na osnovu kojih se može dobiti uvid u mehanizam otpuštanja leka iz polimerne matrice.

2.9.1. Dodatni parametri kojima se karakteriše otpuštanje leka iz polimerne matrice

Pored pomenutih matematičkih modela, postoje i drugi parametri (najčešće korišćeni u farmaceutskim istraživanjima) kojima se mogu okarakterisati profili otpuštanja leka: specifično vreme otpuštanja leka, $t_{x\%}$, i efikasnost rastvaranja, DE%. Parametar specifično vreme, $t_{x\%}$, predstavlja vreme potrebno da se otpusti određeni procenat leka (na primer $t_{20\%}$, $t_{50\%}$, $t_{60\%}$) i vreme koje je potrebno da se određena količina leka rastvori (na primer $t_{20 \text{ min}}$, $t_{50 \text{ min}}$, $t_{90 \text{ min}}$). Efikasnost rastvaranja se definiše kao odnos površine ispod krive (Slika 2.31.) za ispitivano vreme t , i površine pravougaonika definisanog maksimalnom količinom leka (100 %) u vremenu t . Vrednost DE% se može izračunati na osnovu sledeće jednačine:

$$D.E. = \frac{\int_0^t y \times dt}{y_{100} \times t} \times 100\% \quad (2.9.8.)$$

gde je y procenat leka rastvoren nakon vremena t . [124, 129]



Slika 2.31. Izračunavanje efikasnosti rastvaranja, DE%.

2.10. PCL i PCL/PEO blok kopolimerne mikrosfere

Mikročestice su polimerne formulacije sfernog oblika, veličine u opsegu od 50 µm do 2 mm, unutar kojih je inkapsuliran lek. Aktivna supstanca se iz mikrosfera oslobađa erozijom polimernog materijala kod matriks sistema, a procesom difuzije lek može biti oslobođen i kod matriks i kod rezervoar sistema. Najveća prednost inkorporacije leka u polimernu matricu u formi mikrosfera jeste u odnosu površine i zapremine, odnosno velika razvijena površina polimernog materijala. [121] Različite vrste aktivnih supstanci mogu biti inkapsulirane unutar polimernog matriksa PCL i PCL blendi i kopolimera: antihipertenzivi, antibiotici, proteini (enzimi, antigeni, nukleotidi i drugi biomolekuli), hormoni, antikancer lekovi i dr. [130-133] Struktura i sastav polimera, vrsta emulgatora upotrebljenog u procesu pripreme mikrosfera, kao i maseni odnos lek/polimer imaju najveći uticaj na efikasnost inkapsulacije, veličinu čestica i kinetiku otpuštanja leka.

Uticaj vrste emulgatora

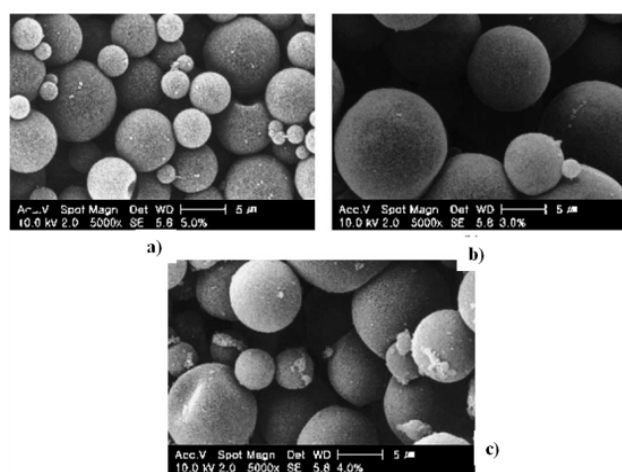
Promenom stabilizatora (emulgatora) značajno se može uticati na morfologiju mikrosfera, prečnik čestica i efikasnost inkapsulacije (Tabela 2.5.). PCL mikrosfere (molarna masa PCL 10000 g/mol, procenat inkapsuliranog leka 3 %) dobijene upotrebom PVA kao emulgatora su malih dimenzija u poređenju sa mikrosferama gde je kao emulgator korišćen Polaxamer-237 (triblok kopolimer sastavljen od centralnog hidrofobnog segmenta – poli(propilen-oksida) i dva hidrofilna segmenta – poli(etilen-oksida)) ili želatin. Sa druge strane, efikasnost inkapsulacije opada sa smanjenjem prečnika čestica, stoga su mikrosfere pripremljene u prisustvu želatina kao emulgatora imale najveći procenat inkapsulacije. [134]

Tabela 2.5. Uticaj vrste emulgatora na prečnik sfera i efikasnost inkapsulacije. [134]

Vrsta metode	Organska faza	Emulgator	Prečnik (µm)	Efikasnost inkapsulacije (%)
Emulzioni postupak "ulje u vodi", O/W	Dihlormetan, DCM	Želatin	9,09 ± 1,50	73,5 ± 4,7
		Tween 80	7,19 ± 1,22	68,3 ± 5,2
		PVA	5,53 ± 1,84	61,3 ± 6,4
		Pol 237	8,86 ± 0,53	69,7 ± 4,9

Vrsta, ali i koncentracija emulgatora određuje veličinu čestica i njihovu raspodelu. Pri istim koncentracijama (5%) različitih emulgatora (PVA, želatin i span 80 – sorbitan monooleat), mikrosfere sa inkapsuliranim eritromicinom su bile najmanje u slučaju korišćenja PVA kao emulgatora (60 µm), dok je veličina sfera pripremljenih sa želatinom bila najveća. Sa povećanjem koncentracije emulgatora, veličina mikrosfera se smanjuje (Slika

2.32.). Tako prosečna veličina mikrosfera opada od 68 do 6 μm , kako se koncentracija želatina povećava u opsegu od 1 do 5 mas.%, dok sa 6 mas.% rastvora emulgatora veličina čestica iznosi 14 μm . Dobijeni rezultati ukazuju na dobru efikasnost emulgatora dispergovanog u organskoj fazi i dobru stabilizaciju dispergovanih čestica, a što je rastvor emulgatora koncentrovaniiji, dobijaju se manje i stabilizovanije čestice. Međutim, pri koncentracijama emulgatora većim od navedenih, dolazi do njegove agregacije oko sfera i pojave suprotne dispergovanju, što za posledicu ima nastajanje sfera neujednačenih dimenzija. [135]



Slika 2.32. SEM slike PCL mikrosfera: a) 3 mas.% želatina, b) 4 mas.% i c) 5 mas.% želatina.[135]

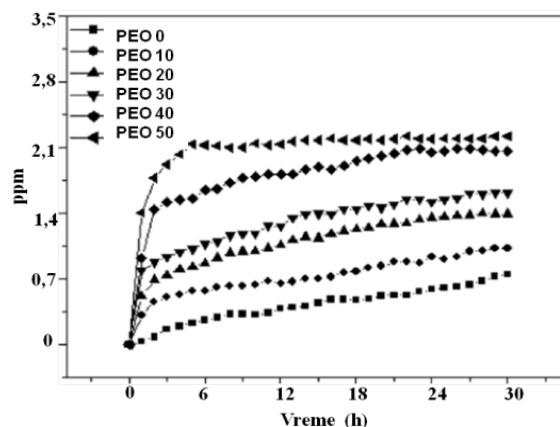
Uticaj sastava polimera i masenog odnosa polimer-lek na efikasnost inkapsulacije i profile otpuštanja leka

Otpuštanje leka iz polimerne matrice PCL kopolimera može biti diktirano njihovim sastavom. Sadržaj PEO u PCL/PEO blok kopolimerima ima uticaj kako na efikasnost inkapsulacije, tako i na kinetiku otpuštanja leka iz mikrosfera (Tabela 2.6. i Slika 2.33.). Efikasnost inkapsulacije hidrofobnog leka unutar polimerne matrice (polimerna blenda poli(mlečne kiseline), PLA, i PCL/PEO kopolimera različitog sastava) zavisi od sadržaja hidrofilnog PEO segmenta, i sa povećanjem udela PEO u kopolimerima, efikasnost inkapsulacije se povećava. [136]

Tabela 2.6. Sastav kopolimera i efikasnost inkapsulacije, EE%, dobijenih mikrosfera. [136]

Polimer	[CL/LA/EO]	M_w ($\times 10^{-4}$)	Sadržaj leka (%)	EE (%)
PCEL-0	12,6/87,4/0	14,9	10	75,2
PCEL-14	12,4/73,2/14,4	7,0		78,9
PCEL-30	9,5/59,9/30,6	2,2		80,9
PLA	-	0,7		90,8

Sadržaj hidrofilnog PEO segmenta u PCL/PEO blok kopolimerima menja kinetiku otpuštanja leka u odnosu na otpuštanje leka iz PCL polimerne matrice. Aktivna supstanca se iz polimerne matrice u čijem sastavu je PEO otpušta brže i u većim koncentracijama, sa pojavom inicijalnog brzog otpuštanja leka, u poređenju sa sporom, kontinuiranom kinetikom otpuštanja leka iz PCL matrice (Slika 2.33.). Sa porastom udela PEO segmenata (od 20 do 50 mas.%), inicijalno otpuštanje leka je sve brže, a kod polimera sa 50 mas.% PEO oko 100 % leka je otpušteno u prvih 25 h. Hidrofilni PEO segment poboljšava interakciju između mikrosfera i hidrofilnog medijuma u kojem se prati otpuštanje leka (najčešće fosfatni pufer) usled čega dolazi do bržeg otpuštanja leka iz polimernog matriksa potvrđujući da se brzina i procenat oslobođenog leka mogu kontrolisani sastavom, odnosno sadržajem PEO bloka. [135]

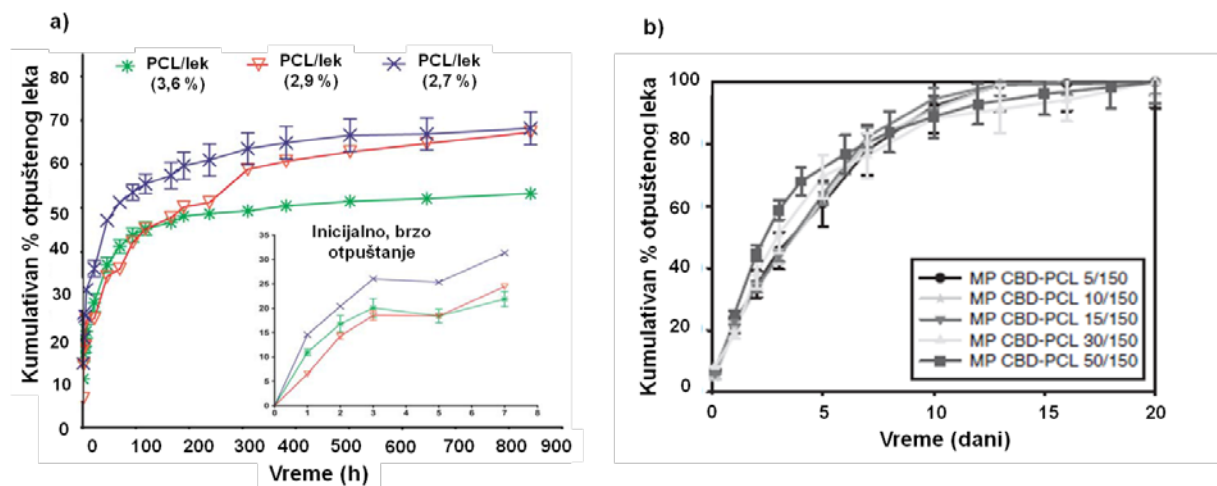


Slika 2.33. Otpuštanje leka iz PCL/PEO mikrosfera sa različitim sadržajem PEO. [135]

Promenom koncentracije PCL polimernog matriksa, menja se odnos polimer/lek, sa povećanjem koncentracije polimera dolazi do smanjenja sadržaja leka. Promenom odnosa polimer/lek se utiče i na veličinu čestica, efikasnost inkapsulacije, i dalje na kinetiku otpuštanja leka. Povećanjem odnosa polimer/lek, efikasnost inkapsulacije se povećava jer sa povećanjem koncentracije polimera, raste viskoznost rastvora polimera sa lekom, čime se redukuje zaostajanje leka u spoljašnjoj fazi (vodenoj ili uljanoj u zavisnosti od svojstva leka)

tokom procesa pripreme iz emulzije. Sa druge strane, podešavanjem odnosa polimer/lek, može se kontrolisati i kinetika otpuštanja leka (Slika 2.34.a). U prvih nekoliko sati, kinetika otpuštanja leka je nezavisna od odnosa polimera i leka; za sva tri različita odnosa je prisutno inicijalno, brzo otpuštanje leka ("burst effect"), dok se u kontinualnoj fazi zapaža porast kumulativnog procenta otpuštenog leka sa porastom koncentracije leka. [137]

U nekim slučajevima, usled velike hidrofobnosti i semikristaliničnosti PCL polimerne matrice, usled čega PCL sporo razgrađuje u vodenom medijumu, otpuštanje leka je difuziono kontrolisano i bez obzira na odnos leka i polimera, kinetika otpuštanja leka je nezavisna od ovog odnosa (Slika 2.34.b).[138]



Slika 2.34. *In vitro* profil otpuštanja: a) kvercetina i b) kanabidiola iz PCL mikrosfera sa različitim masenim odnosom lek/polimer. [137, 138]

Uticaj molarne mase polimerne matrice

Molarna masa polimerne matrice je još jedan od parametara kojim se uspešno može kontrolisati efikasnost inkapsulacije, veličina čestica i profili otpuštanja leka. Povećanje molarne mase PCL polimerne matrice dovodi do povećanja efikasnosti inkapsulacije usled povećanja viskoznosti rastvora, slično kao u slučaju povećanja koncentracije rastvora, tako da je difuzija leka u spoljašnju, vodenu fazu, minimizirana tokom procesa formiranja mikrosfera. Ovakav trend se može objasniti i kristaliničnošću polimerne matrice. Kako je kristalna faza polimera nepropustljiva za vodu, inkapsulacija se većinom odigrava u amorfnoj oblasti polimerne matrice, tako da sa porastom udela kristalne faze, opada efikasnost inkapsulacije, i obrnuto. Tako PCL polimerni matriks najmanje molarne mase (oko 10000 g/mol) pokazao je najveću kristaliničnost (na osnovu rezultata DSC analize), a kao posledica toga, efikasnost inkapsulacije je bila najmanja, čime je dokazano da je kristaliničnost

polimernog matriksa (određenja molarnom masom u ovom slučaju) jedan od važnih faktora koji određuju EE. [134]

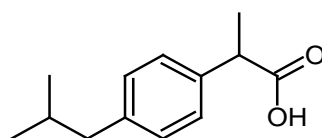
3. Eksperimentalni deo

3.1. Reaktanti

- Monomer ϵ -kaprolakton, ϵ -CL, proizvod firme Acros Organics (SAD), čistoće 99% je prečišćen destilacijom pod sniženim pritiskom nakon sušenja iznad kalcijum-hidrida, CaH_2 . Sakupljena je frakcija koja ključa na $90\text{ }^\circ\text{C}$, pri pritisku od $0,4\text{ mm Hg}$.
- α,ω -dihidroksi-poli(etilen-oksidi), PEO, molarne mase $M_n = 400\text{ g/mol}$ i molarne mase $M_n = 1000\text{ g/mol}$, proizvodi su firme Fluka (Švajcarska). Prilikom propačuna, korišćena su njihove molarne mase definisane specifikacijom proizvođača. Metoksi-poli(etilen-oksidi), m-PEO, molarne mase $M_n = 1020\text{ g/mol}$, proizvod je firme BASF (Nemačka). Molarna masa m-PEO je određena na osnovu $^1\text{H NMR}$ analize, na osnovu čega je izračunato da je $M_n = 990\text{ g/mol}$, što je u dobroj saglasnosti sa M_n vrednošću datoj u specifikaciji proizvoda.

Voda iz pretpolimera je uklanjana azeotropskom destilacijom u prisustvu toluena. Sakupljena je frakcija koja destiliše na $110\text{ }^\circ\text{C}$.

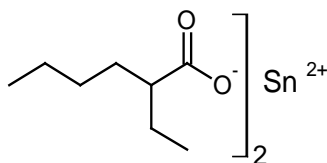
- Rastvor poli(vinil-alkohola), PVA, $0,5\text{ mas.}\%$, je pripremljen rastvaranjem 5 g PVA (Mowiol® 18-88, Sigma Aldrich, Belgija) u 995 g destilovane vode.
- Ibuprofen, IB, (čistoće $99,9\text{ }\%$) ili 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanska kiselina (IUPAC-ov naziv) je poklon Hemofarm kompanije (Srbija). Struktura ibuprofena je prikazana na Slici 3.1.



Slika 3.1. Strukturna formula ibuprofena.

3.2. Katalizator

Kalaj-bis-(2-etilheksanoat), tj. kalaj-oktoat, ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), proizvod firme Sigma Aldrich (Belgija), čistoće 99% , je korišćen bez prečišćavanja. Struktura katalizatora je prikazana na Slici 3.2.



Slika 3.2. Strukturna formula kalaj-oktoata.

Za sintezu blok kopolimera je korišćen rastvor katalizatora u toluenu, koji je pripremljen rastvaranjem 4,02 g kalaj-oktoata u 10 cm³ toluena. Koncentracija katalizatora je iznosila 0,992 moldm⁻³. Rastvor katalizatora je čuvan u frižideru i korišćen za sve sinteze.

3.3. Rastvarači

- Toluen, proizvod firme Sigma Aldrich, korišćen je nakon sušenja iznad molekulskih sita (4Å) za pripremu rastvora katalizatora, Sn(Oct)₂ i sušenje prepolimera PEO i m-PEO.
- Hloroform, proizvod firme Lack-Ner (Češka) je korišćen je bez prethodnog prečišćavanja.
- Metanol, proizvod firme Lachema (Češka), koji je korišćen za pretaložavanje polimera nakon sinteze, pre upotrebe nije dodatno prečišćavan.
- Rastvor fosfatnog pufera, PBS, (pH 7,4) je pripremljen rastvaranjem 71,2 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O i 36,4 g KH₂PO₄ u 1000 ml destilovane vode (Ph. Eur.V).

3.4. Bakterijski soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Bakterijski soj je nabavljen iz kolekcije American Type Culture Collection (ATCC) pod brojem ATCC 15692. Enzimaska degradacija uzoraka je izvođenja u prisustvu bakterijskog ekstrakta ("*cell-free extract*") koji je sadržao enzime *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692). Bakterijski soj je uzgajan u MSM tečnom medijumu (Mineral Salts Medium) koji se sastojao od 9,0 g/dm³ Na₂HPO₄ × 12 H₂O (AppliChem, Nemačka); 1,5 g/dm³ KH₂PO₄ (Acros Organics, Belgija); 0,2 g/dm³ MgSO₄ × 7 H₂O (Acros Organics, Belgija); 0,002 g/dm³ CaCl₂ (Merck, Nemačka); 1,0 g/dm³ NH₄Cl (Merck, Nemačka) i 1 mL rastvora soli [139], suplementiranog kazamino kiselinama (0,7 %, w/v; Sigma Aldrich, SAD) i maslinovim uljem (1%, v/v; Sigma Aldrich, SAD). Ovako uzgajana kultura je korišćena u ogledima bakterijske i enzimske degradacije polimernih uzoraka u tečnom medijumu i u kompostu.

3.5. Postupak sinteze blok kopolimera

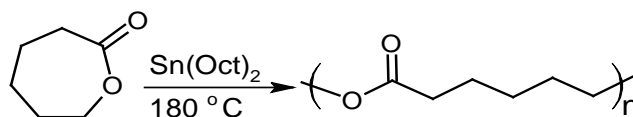
Za sintezu triblok kopolimera, PCEC, je korišćen postupak polimerizacije otvaranja prstena ε-kaprolaktona, iniciran završnim hidroksilnim grupama na krajevima prepolimera, poli(etilen-oksida), PEO, dok je za sintezu diblok kopolimera inicijator bila terminalna hidroksilna grupa iz metoksi-poli(etilen-oksida), m-PEO. Reakcija se izvodi u rastopu u prisustvu katalizatora kalaj-oktoata, (Sn(Oct)₂). Količina dodatog katalizatora iznosila je 1 ×

10^{-4} mol katalizatora na 1 mol monomera. Triblok i diblok kopolimeri različitih molarnih masa u opsegu od 20000 do 40000 g/mol su sintetisani podešavanjem molskog udela reaktanata u reakcionoj smeši kao što je prikazano u Tabeli 3.1. Isti postupak je korišćen prilikom sinteze svih uzoraka, uključujući i homopolimer PCL koji je korišćen u komparativne svrhe.

Tabela 3.1. Početni sastav reakcione smeše pri sintezi kopolimera.

Polimer	M_{PEO} , g/mol	PEO		$M_{PCL(bloka)}$, g/mol	ϵ -CL		T, °C	Vreme, h
		g	mmol		g	mol		
PCEC-1		2,50	2,50	10000				
PCEC-2	1000	1,67	1,67	15000	50	0,438	180	3
PCEC-3		1,25	1,25	20000				
PCEC-4		1,00	2,50	10000				
PCEC-5	400	0,67	1,67	15000	50	0,438	180	3
PCEC-6		0,50	1,25	20000				
PCL/PEO-1		2,04	2,00	20000				
PCL/PEO-2	1020	1,36	1,33	30000	40	0,351	140	24
PCL/PEO-3		1,02	1,00	40000				

3.5.1. Sinteza poli(ϵ -kaprolaktona)

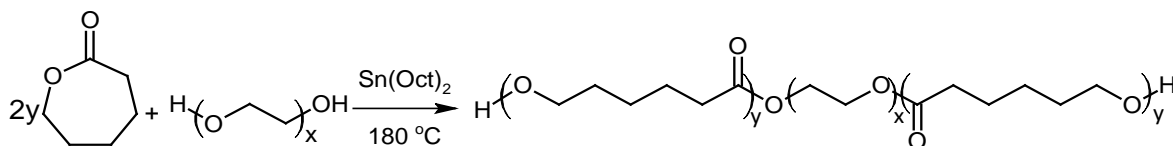
Shema 3.1. Sinteza poli(ϵ -kaprolaktona).

U trogri balon od 250 ml koji je opremljen kondenzatorom, nastavkom za uvođenje azota, magnetnim zrnom za mešanje i termometrom, odmereno je 50 g (0,438 mol) ϵ -kaprolaktona i zagrevano do postizanja temperature od 150 °C. Nakon toga je dodato 44,2 μ l ($0,4386 \times 10^{-4}$ mol) rastvora katalizatora kalaj-oktoata. Reakciona smeša je mešana pomoću magnetne mešalice i grejana preko silikonskog uljanog kupatila. Temperatura uljanog kupatila je regulisana termoregulatorom. Po dodatku katalizatora, temperatura je povećavana na svakih 10 minuta za 10 °C do postizanja temperature od 180 °C (Shema 3.1.). Kada je dostignuta temperatura od 180 °C, reakcija je ostavljena da se odigrava naredna 3 h uz stalno praćenje temperature i mešanje. Nakon 3 h, reakcija je prekinuta i ostavljena da se ohladi u atmosferi azota. Kada je temperatura reakcione smeše dostigla 60 °C, dodato je 250 ml hloroforma. Sintetisani homopolimer je pretaložavan ukapavanjem rastvora polimera u

hladan metanol (oko 2-3 dm³). Zatim se staloženi polimer profiltrira na guču pod vakuumom i potom suši u sušnici na sobnoj temperaturi do postizanja konstantne mase. Dobijen je polimer bele boje. Prinos je iznosio 96 %.

3.5.2. Primer sinteze triblok kopolimera PCEC-2

U trogrli balon od 250 ml opremljen kondenzatorom, nastavkom za uvođenje azota, termometrom i magnetnim zrnom za mešanje, odmereno je 1,67 g (1,67 mmol) poli(etilen-oksida) molarne mase $M_n = 1000$ g/mol i dodato 20 ml toluena. Reakciona smeša je mešana pomoću magnetne mešalice i grejana preko silikonskog uljanog kupatila. Kada je temperatura u reakcionom balonu iznosila 110 °C, toluen je počeo da destiluje. Toluen sa vodom gradi azeotropsku smešu i na taj način se uklanja voda iz poli(etilen-oksida) koji je vrlo higroskopan. Kada veći deo toluena predestiluje (oko 19 ml), poli(etilen-oksid) je dodatno sušen pod vakuumom narednih 30 minuta. Reakciona smeša se ohladi do 60 °C i doda 50,00 g (0,438 mol) predestilisanog ϵ -kapolaktona u kojem je prethodno rastvoreno 44,2 μ l rastvora katalizatora kalaj-oktoata. Nakon dodavanja monomera, temperatura reakcione smeše je postepeno povećavana na svakih 10 minuta za po 10 °C do postizanja temperature od 180 °C na kojoj se reakcija odigrava naredna tri sata (Shema 3.2.). Temperatura se prati na svakih 10 minuta. Po isteku 3 h od početka reakcije, grejanje se prekida i reakciona smeša se ostavlja da se hladi do temperature od 60 °C. Zatim se doda 250 ml hloroforma uz intenzivno mešanje dok se polimer ne rastvori. Kako ne bi došlo do kristalisanja polimera uz zidove balona, vrši se grejanje fenom. Polimer se pretaložava ukapavanjem rastvora polimera u hladan metanol (deset puta veća zapremina metanola, 2-3 dm³) uz intenzivno mešanje. Izdvojeni polimer se suši u eksikatoru pod vakuumom, a zatim suši u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi do postizanja konstantne mase. Dobijen je polimer bele boje a prinos reakcije je bio 92 %.



Shema 3.2. Sintaza triblok kopolimera.

Pre sinteze serije diblok kopolimera, određeni su optimalni uslovi sinteze pri čemu su menjani temperatura i vreme izvođenja reakcije. Kako bi se izbegla visoka temperatura odigravanja reakcije, a time sprečila potencijalna termička degradacija nastalog polimera, na

modelu diblok kopolimera su urađene tri sinteze: na temperaturi od 160 °C vreme odigravanja reakcije je bilo 5 h, na 140 °C vreme trajanja reakcije je bilo 24 h i na 180 °C reakcija je trajala 3 h. Nakon karakterizacije dobijenih polimera istog sastava a sintetisanih pod različitim uslovima, određeno je da su za ovu vrstu diblok kopolimera optimalni uslovi sinteze na 140 °C tokom 24 h.

3.6. Pripremanje uzoraka PCL i blok kopolimera za karakterizaciju

Filmovi sintetisanih diblok i triblok kopolimera su pripremani izlivanjem rastvora polimera u hloroformu (1,5 g polimera u 25 ml hloroforma) u staklene Petri šolje (prečnika 10 cm). Rastvarač je odstranjen sušenjem na vazduhu, a zatim su polimerni filmovi sušeni 24 h u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi. Nakon dve nedelje kondicioniranja na sobnoj temperaturi, kada se smatra da je dostignut ravnotežni stepen kristaliničnosti, polimerni filmovi su čuvani u eksikatoru i dalje korišćeni za karakterizacije. Za ispitivanje apsorpcionih svojstava, kao i za testove hidrolitičke i enzimske degradacije, polimerni filmovi su sečeni u obliku pravougaonika dimenzija 20 × 10 mm, debljine oko 200 μm, dok su za WAXS analizu pravljeni pastile polimera koje su zatim sečene prema dimenzijama kalupa (1,5×1×2 mm³). Pastile ispitivanih polimera su pripremljene topljenjem 0,8 g polimera na temperaturi od 80 °C, tokom 30 minuta, a zatim izlagane pritisku od 1,5 MPa na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta.

3.7. Karakterizacija PCL-a i blok kopolimera

3.7.1. NMR spektroskopija

Hemijska struktura i sastav sintetisanih polimera su određeni na osnovu NMR spektroskopije. Uzorci su rastvarani u deuterisanom hloroformu CDCl₃ (Merck, Nemačka), a kao referentni standard je korišćen tetrametilsilan. Serija triblok kopolimera sa centralnim segmentom PEO od 1000 g/mol, kao i serija diblok kopolimera su snimane na instrumentu Bruker Avance III 500 instrument (¹H NMR na 500 MHz, ¹³C NMR na 125 MHz), dok je serija triblok kopolimera sa centralnim segmentom PEO od 400 g/mol, snimana pomoću instrumenta Bruker Ascend 400 instrument (¹H NMR na 400 MHz, ¹³C NMR na 100 MHz). Kvantitativni ¹³C NMR spektri serije triblok i diblok kopolimera su snimani pod sledećim uslovima: vreme između pulseva neophodno za relaksaciju ¹³C 10 s, vreme detekcije raspada slobodne indukcije 1,10 s, širina pulsa 16,8 μs, spektralna širina 29,8 kHz a broj prolaza je bio u intervalu od 7000 do 21000, dok su za seriju triblok kopolimera (PEO 400 g/mol)

uslovi bili sledeći: vreme između pulseva neophodno za relaksaciju ^{13}C 10 s, vreme detekcije raspada slobodne indukcije 1,36 s, širina pulsa 10,0 μs , spektralna širina 24,1 kHz, broj prolaza oko 16000.

3.7.2. Gel-propusna hromatografija (GPC)

Homopolimer PCL kao i serije triblok i diblok kopolimera su karakterisane gel-propusnom hromatografijom na instrumentu Waters 600E, korišćenjem diferencijalno-refraktometrijskog detektora Waters 410. GPC analiza sintetisanih uzoraka je izvedena u hloroformu. Pri analizi polimera kao mobilna faza je korišćen hloroform pri protoku od 1,0 cm^3/min . Za razdvajanje su korišćenje redno vezane kolone na bazi umreženog polistirena, Styragel (HR2, HR3, HR4, HR5E), sa veličinama pora od 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} m. Radna temperatura je iznosila 30 $^{\circ}\text{C}$. Za analizu je korišćeno 200 μl rastvora odgovarajućeg uzorka u hloroformu (koncentracije 5 mg/cm^3). Kalibracija je urađena korišćenjem polistirenskih standarda sa vrednostima M_n u opsegu od 1200 do $3,79 \times 10^6$ g/mol. Očitane su eluacione zapremine pikova, V_e , i konstruisana je kalibraciona kriva $\log M_{\text{pika}} = f(V_e)$, gde je M_{pika} – molarna masa pika odgovarajućeg standarda. Kalibracija polistirenskim standardima je omogućila određivanje molarnih masa srednjih po brojnoj (M_n) i masenoj (M_w) zastupljenosti sintetisanih polimera. GPC analiza je takođe korišćena za praćenja promene molarne mase uzoraka nakon osam nedelja hidrolitičke, odnosno nakon dve i četiri nedelje enzimske degradacije.

3.7.3. Određivanje graničnog viskozitetnog broja

Serije triblok i diblok kopolimera, kao i homopolimer PCL, okarakterisane su metodom viskozimetrije razblaženih rastvora. Granični viskozitetni brojevi, $[\eta]$, sintetisanih polimera su određeni na osnovu izmerenog vremena proticanja, t , rastvora polimera u hloroformu kao rastvaraču, na temperaturi od $25 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$. Koncentracije polimera u rastvoru kretale su se od 0,5000 do 1,000 g/dl. Pri pravljenju rastvora kopolimera, uzorci su mešani na magnetnoj mešalici dok se potpuno ne rastvore. Za određivanje graničnog viskozitetnog broja korišćen je Übbelohde-ov viskozimetar. Srednja vrednost od tri uzastopna merenja, t , koja se međusobno ne razlikuju za više od 0,2 s, uzimana je za izračunavanje relativnog viskoziteta $\eta_r = t / t_0$, gde je t_0 – vreme proticanja rastvarača. Na osnovu relativnog viskoziteta računat je specifični viskozitet $\eta_{sp} = \eta_r - 1$. Redukovani viskozitet je izračunat po formuli:

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / c \quad (3.1.)$$

gde je c – koncentracija uzoraka uzražena u g/dl.

Postupkom ekstrapolacije zavisnosti η_{red} od različitih koncentracija rastvora polimera, na nultu koncentraciju, određeni su granični viskozitetni brojevi.

3.7.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija kuplovana sa termogravimetrijskom analizom, DSC – TG, PCL i uzoraka kopolimera je izvedena na aparatu TA Instruments SDT Q600 u temperaturnom opsegu od 25 do 600 °C, pri brzini zagrevanja od 10 °C/min, u atmosferi azota sa protokom od 0,1 dm³/min. Mase uzoraka su iznosile oko 10 mg. Na osnovu maksimuma glavnih endotermnih pikova u DSC termogramima (prvi prolaz) su određena vrednosti temperatura topljenja blok kopolimera, T_m , dok su vrednosti površina ispod endotermnih pikova predstavljale promenu entalpije topljenja, ΔH_m . Na osnovu vrednosti promene entalpije topljenja, izračunate su vrednosti relativnog i ukupnog stepena kristaliničnosti. Vrednosti ukupnog stepena kristaliničnosti su izračunate bez uzimanja u obzir vrednosti masenog udela PCL segmenata izračunatih na snovu NMR analize. Relativni stepen kristaliničnosti PCL segmenata, X_c^{PCL} , sintetisanih triblok i diblok kopolimera je izračunat korišćenjem jednačine:

$$X_c^{PCL} = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0 \cdot w_{PCL}} \quad (3.2.)$$

gde je:

ΔH_m – promena entalpije topljenja sintetisanih uzoraka

w_{PCL} – maseni udeo PCL segmenata izračunat iz ¹H NMR spektara

ΔH_m^0 – teorijska vrednost promene entalpije topljenja idealno kristaliničnog PCL homopolimera, izračunata na osnovu doprinosa grupa ($\Delta H_m^0 = 136,1$ J/g) [41].

Kako bi se ispitao uticaj inkapsuliranja leka u polimernu matricu na termička svojstva polimera, DSC analiza polimernih mikrosfera je urađena u temperaturnom opsegu od 20 do 100 °C, a mase uzoraka su bile oko 5 mg. U cilju određivanja stepena kristaliničnosti dobijenih mikrosfera, korišćena je, takođe, jednačina 3.2. vodeći računa o sadržaju lek u polimernoj matrici.

3.7.5. Difrakcija rendgenskih zraka na velikim uglovima (WAXS)

Difraktogrami sintetisanih polimera dobijeni su merenjem na instrumentu "ItalStructure APD2000" sa Bragg-Brentano geometrijom korišćenjem CuK- α zračenja ($\lambda = 0,1541-0,1544$ nm) sa bakarne anode, sa korakom od 0,02 ° i vremenom zadržavanja od 0,5 s. Merenja su

izvedena za vrednosti Bragg-ovog ugla 2θ od 5 do 50 °. Metodom rendgenske difrakcije na velikim uglovima određen je stepen kristaliničnosti sintetisanih blok kopolimera.

Vrednosti stepena kristaliničnosti, $X_{c(WAXS)}$, izračunate su po formuli:

$$X_c = \frac{I - I_A}{I} \quad (3.3.)$$

gde je:

I – ukupna površina difraktograma

I_A – površina amorfne haloa

$I - I_A$ – površina refleksije koja potiče od kristalne faze.

Korišćenjem programa PeakFit 4.12 za dekonvoluciju krivih, izračunate su površine pikova. Površina difraktograma predstavlja zbir površina pikova. Pikovi su aproksimirani pikovima čiji je oblik odgovarao obliku Voigt-ove raspodele. Krive su fitovane sve dok procenat greške nije bio manji od 1 %. Maksimumi fitovanih pikova odgovarali su maksimumima odgovarajućih pikova u difraktogramima.

3.7.6. Apsorpcija vode i vlage

Testovi apsorpcije vode i vlage su rađeni na polimernim filmovima dimenzija 20×10 mm, debljine oko 210 μ m. Određivanje vrednosti apsorpcije vode je ispitano potapanjem polimernih filmova u rastvor fosfatnog pufera (pH = 7,4), tokom 72 h pri čemu je temperatura bila konstantna (37 °C). U odgovarajućim vremenskim intervalima (5 h, 7 h, 24 h, 48 h i 72 h) merena je masa uzorka, m , nakon uklanjanja viška puferskog rastvora sa površine uzoraka pomoću filter papira. Vrednosti apsorpcije vode su izračunate korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{apsorpcija vode (vlage)} = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100 \quad (3.4.)$$

gde je m -masa polimernog filma nakon potapanja u vodi, a m_0 - početna masa polimernog filma.

Eksperiment određivanja vrednosti apsorpcije vlage su izvođeni izlaganjem polimernih filmova u eksikatoru parama zasićenog rastvora kalijum-sulfata (K_2SO_4) relativne vlažnosti 97 % tokom 96 h, na sobnoj temperaturi. U određenim vremenskim intervalima (4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) merena je masa uzorka, m . Procenat apsorpcije vlage je izračunat korišćenjem prethodno prikazane jednačine za izračunavanje vrednosti apsorpcije vode.

U oba eksperimenta, vrednosti apsorpcije vode i vlage su izračunate kao srednja vrednost tri paralelno izvedena eksperimenta.

3.7.7. Određivanje vrednosti kontaktnog ugla sa vodom ("Water contact angle - WCA")

Merenje kontaktnog ugla (WCA) PCL i blok kopolimernih filmova (dimenzija 20×10 mm) je izvedeno na instrumentu Krüss DSA100 primenom "sessile drop" metode. Pojedinačne kapi destilovane vode zapremine $20 \mu\text{l}$ su nanošene na površinu filmova i vrednosti kontaktnog ugla su merene posle 30 s na temperaturi od 25 ± 1 °C. U svim slučajevima, najmanje pet merenja je urađeno, a metoda *Tangente* je korišćena za određivanje oblika kapi vode. Za svaki uzorak, vrednosti kontaktnog ugla su izračunate kao srednja vrednost pet uzastopnih merenja kontaktnog ugla.

3.8. Dinamičko-mehanička analiza

3.8.1. Dinamičko-mehanička analiza na čvrstim uzorcima

Dinamičko-mehanička analiza PCL i blok kopolimernih uzoraka u čvrstom i stanju rastopa je izvedena na instrumentu Discovery Hybrid Rheometer HR2 (TA Instruments). Reološka merenja pri ogledima uvijanja (smicanja) su rađena na čvrstim uzorcima u obliku epruveta u temperaturnom opsegu od -100 do 70 °C pri amplitudi deformacije $0,1$ % i frekvenciji od 1 Hz. Reološka svojstva PCL-a i blok kopolimera su prikazana kao mehanički spektri zavisnosti modula sačuvane (G') i modula izgubljene energije (G''), kao i faktora prigušenja ($\tan\delta$) od temperature pri frekvenciji od 1 Hz. Relaksaciona jačina je definisana kao $\Delta G' = G'_o - G'_\infty$, gde je G'_o modul sačuvane energije u staklastom stanju, a G'_∞ je modul sačuvane energije u gumolikom stanju.[140]

3.8.2. Dinamičko-mehanička analiza u stanju rastopa

Reološka ispitivanja u stanju rastopa su rađena na uzorcima u obliku pastila korišćenjem geometrije paralelnih ploča. Parametri dobijeni na osnovu ovog merenja, modul sačuvane (G'), modul izgubljene energije (G'') i kompleksna viskoznost (η^*), su određene u opsegu frekvencije $0,01$ - 100 rad/s, na temperaturi od 60 do 145 °C (korak 5 °C), pri deformaciji od $2,0$ %. U skladu sa principom superpozicije vreme-temperatura (TTS), dobijene krive su pomerene ka referentnoj temperaturi (100 °C) za vrednosti reološkog parametra frekvencije horizontalno (a_T), dok krive nisu vertikalno pomerane. Dobijene zbirne krive su dalje korišćene za analizu reoloških svojstava polimera u stanju rastopa.

3.8.3. Priprema polimernih uzoraka za dinamičko-mehaničku analizu

Za određivanje dinamičko-mehaničkih svojstava sintetisanih polimera su korišćeni uzorci u obliku epruveta i pastila. Epruvete i pastile su pripremane topljenjem uzoraka polimera (na 80 °C oko 30 minuta) do stanja rastopa u trodelnim kalupima. Zatim su uzorci izlagani pritisku od 1,5 MPa tokom 20 min na sobnoj temperaturi. Za pravljenje epruveta i pastila je korišćeno oko 1,1 g polimera. Pastile polimernih uzoraka su bile prečnika 25 mm, a njihova debljina je iznosila oko 1,2 mm, dok su dimenzije epruveta bile $63 \times 12,3 \times 1,0 \text{ mm}^3$.

3.9. Ispitivanje degradacije polimera

3.9.1. Hidrolitička degradacija

Za testove hidrolitičke degradacije je korišćen fosfatni pufer, pH 7,4, kako bi se imitirali fiziološki uslovi. Polimerni filmovi su potapani u 10 ml fosfatnog pufera i termostatirani na 37 °C tokom osam nedelja koliko je ispitivana degradacija. Fosfatni pufer je menjan na svakih sedam dana sa sveže napravljenim rastvorom. Pre merenja gubitka mase u određenim vremenskim intervalima, ispitivani uzorci su ispirani destilovanom vodom, sušeni u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Za svaki uzorak polimera su rađena istovremeno dva eksperimenta.

Gubitak mase nakon degradacije je određen gravimetrijski, na osnovu odnosa razlike mase pre i posle degradacije ($m_{pre} - m_{posle}$) i mase pre degradacije, (m_{pre}), korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{gubitak mase (\%)} = \frac{m_{pre} - m_{posle}}{m_{pre}} \times 100 \quad (3.5.)$$

3.9.2. Priprema bakterijskog ekstrakta za enzimsku degradaciju

Nakon inkubacije tokom 48 h (na 30 °C, mešanje 180 o/min), bakterijska kultura (opisana u poglavlju 3.4.) je centrifugirana na 5000 o/min tokom 10 minuta (GS-3 rotor, Sorvall Centrifuge, DuPont Instruments, Delaware, SAD). Odvojeni su supernatant i ćelijski pelet. Ćelijski ekstrakt ("cell-free extract") je pripremljen iz peleta pomoću reagensa za ekstrakciju prema proceduri proizvođača (BugBuster Protein Extraction Reagent, Novagen, Wisconsin, SAD). Ukupna koncentracija proteina u supernatantu i "cell free extract" – u su određene pomoću reagensa koji boji CBB G-250 (BioRad Protein Assay, BioRad Laboratories, SAD) na osnovu Bradford-ove metode [141].

U cilju određivanja ukupne lipazne aktivnosti enzima u *P. aeruginosa* PAO1 bakterijskom ekstraktu, rađeni su kvantitativni testovi korišćenjem *p*-nitrofenilpalmitata (Sigma-Aldrich, SAD) [142].

3.9.3. Ispitivanje enzimske degradacije u vodenom medijumu

Eksperimenti bakterijske enzimske degradacije su izvođeni u 20 mM rastvoru fosfatnog pufera pH 7,4 (5 mL), u koji su dodati PCL, diblok i triblok kopolimerni filmovi i ćelijski ekstrakt koji je sardžao enzime *P. aeruginosa* PAO1 (1,8 do 2 mg ukupnih proteina/mL). Polimerni uzorci su inkubirani na 37 °C uz konstantno mešanje (180 o/min) tokom četiri nedelje. Pre izlaganja polimernih filmova aktivnosti enzima, uzorci su sterilisani etanolom (70 %, v/v) i osušeni. Ćelijski ekstrakt je dodavan u tačno određenim vremenskim intervalima (1 ml poznate koncentracije proteina): četiri puta tokom dvonedeljne degradacije. Na kraju ogleda degradacije, polimerni filmovi su pažljivo obrisani pamučnim ubrusom i etanolom (70 %, v/v). Testovi enzimske degradacije su rađeni u triplikatima.

3.9.4. Degradacija polimera na agar šoljama

Degradacija na agar šoljama je ispitana za sve uzorke. Pripremljene su polimerne suspenzije rastvaranjem 100 mg polimera u 2 ml dihlormetana, zatim je dodata voda do 20 ml i uzorci su sonifikovani (60 Hz, 5 prolaza po 1 min) [27]. Polimerna suspenzija je zagrevana na 65 °C kako bi otpario dihlormetan a zatim pomešana sa agarom (konačna koncentracija 1 % w/v u 200 mM Tris-HCl pufera, pH 8,5) u odnosu 1:1, a zatim izlivena u Petri šolje. Nakon očvršćavanja na sobnoj temperaturi, napravljeni su bunari u agaru (prečnika 3 mm) koji su popunjeni uzorcima ćelijskog ekstrakta. *P. aeruginosa* PAO1 ćelijski ekstrakt (50 µl) je stavljen u bunariće u Petri šoljama koje su inkubirane 24 h na 30 °C. Nakon 24 h, još jedan alikvot ćelijskog ekstakta (50 µl) je dodat u iste bunariće, a Petri šolje su dodatno inkubirane 3 dana na 30 °C.

3.9.5. Biodegradacija PCL i blok kopolimera u kompostu

Testovi biodegradacija PCL i kopolimerih filmova su izvođeni u komercijalnoj podlozi koja se koristi za uzgajanje belih pečuraka, tokom četiri nedelje na konstantnoj temperaturi od 37 °C [143]. *P. aeruginosa* PAO1 koji je korišćen u ovim ogledima je uzgajan na način koji je prethodno opisan (poglavlje 3.4.). Bakterijska kultura je pomešana sa 100 g komposta ($\log_{10}4$ ćelija po gramu komposta) i ostavljena u Petri šolji (prečnika 120 mm, visine 30 mm). Polimerni filmovi su zatrpani u ovakvoj smeši na dubini od 1 cm. Kako bi se održao konstantan nivo bakterijske aktivnosti i vlage, svež alikvot (10 ml) *P. aeruginosa* PAO1 kulture je dodavan na kraju druge nedelje. Intenzitet biodegradacije je praćen

fotografisanjem uzoraka u određenim vremenskih intervalima. Poređen je izgled polimernih filmova na fotografijama pre i posle oglada u kompostu.

3.10. Karakterizacija polimernih uzoraka nakon testova degradacije

3.10.1. ATR-infracrvena spektroskopija (ATR-FTIR)

Promene u kristalnoj strukturi nakon hidrolitičke i enzimske degradacije su praćene pomoću FTIR analize. FTIR spektri su snimljeni na aparatu IR-Affinity spectrophotometer (SHIMADZU, Japan), TR dodatkom uz primenu dijamantskog kristala. Za snimanje ovih uzoraka je korišćen opseg od 4000 do 400 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} i broju prelaza od 100, na sobnoj temperaturi.

Na osnovu vrednosti intenziteta karakterističnih pikova u FTIR spektrima, izračunate su vrednosti karbonilnog indeksa, CI, i kristalnog indeksa. Praćenjem promena vrednosti ovih indeksa nakon degradacionih procesa, ispitane su promene u kristalnoj strukturi polimera.

3.10.2. Optička mikroskopija (OM)

Morfologija površine polimernih filmova pre i posle degradacije je analizirana optičkom mikroskopijom. Ispitivanja su vršena mikroskopom sa odbijenom svetlošću (Leica DM ILM) koji je opremljen CCD digitalnom kamerom (uvećanje od 100 puta). Dobijeni mikrografi su analizirani ImageJ softverom u pogledu određivanja veličine i raspodele veličina kristališućih sferulita PCL i blok kopolimernih filmova.

Pored uvida u morfologiju površine polimernih filmova, optička mikroskopija je korišćena za ispitivanje morfologije polimernih mikrosfera sa i bez inkapsuliranog leka. Na osnovu dobijenih mikrografa, procenjena je veličina dobijenih čestica i njihova raspodela korišćenjem ImageJ softvera. Prosečan broj merenja je iznosio oko 200 za svaki uzorak.

3.10.3. Mikroskopija atomskih sila (atomic force microscopy - AFM)

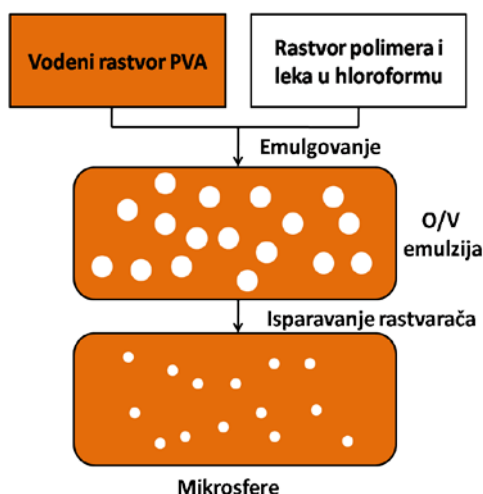
Pomoću AFM analize je dobijen detaljniji uvid u morfologiju površine polimernih filmova pre i posle enzimske degradacije. Za karakterizaciju AFM analizom je korišćen instrument NanoScope III A (Veeco Digital Instruments, USA). Merenja su izvedena primenom tapkajućeg moda za šta su upotrebljene silicijumske igle (tipovi) sa konstantnom sile od 60 N/m. Koeficijent hrapavosti polimernih filmova, RMS, kao i veličina kristališućih sferulita su određeni pomoću programa "Nanoscope image processing". Analizirana je površina od $100 \times 100 \text{ nm}^2$ za uzorke koji nisu bili predviđeni za ogleda degradacije, dok je

za polimerne filmove pripremljene za enzimsku degradaciju analizirana površina $20 \times 20 \text{ nm}^2$ pre i posle degradacije.

3.11. Priprema PCL i blok kopolimernih mikrosfera kao nosača leka (ibuprofena) i njihova karakterizacija

3.11.1. Izrada polimernih mikrosfera postupkom otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije "ulje u vodi" ("oil in water", O/W)

Polimerne PCL i PCEC mikrosfere u koje je inkapsuliran ibuprofen su pripremljene tehnikom otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije "ulje u vodi" (O/W emulzija), čiji je shematski prikaz dat na Slici 3.3. Polimer (2,000 g) i ibuprofen (10 i 20 mas. % preračunato na masu polimera) su rastvoreni u 20 ml dihlormetana, DCM, a zatim je rastvor postepeno ukapavan u 400 ml vodenog rastvora PVA (0,5 mas. %) u reaktoru zapremine od 1 dm^3 opremljenog mehaničkom mešalicom (1000 o/min). [144] Nakon 6 sati kontinuiranog mešanja, na sobnoj temperaturi, dihlormetan je potpuno ispario i formirane su mikrosfere. Dobijene čestice su filtrirane i ispirane tri puta sa 40 ml destilovane vode, nakon čega su sušene u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Radi poređenja, pripremljene su i mikrosfere polimera bez leka.



Slika 3.3. Shematski prikaz postupka pripreme mikrosfera postupkom otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije "ulje u vodi" ("oil in water", o/w).

3.11.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija površine dobijenih polimernih mikrosfera je ispitana SEM analizom. Za karakterizaciju sfera SEM-om je korišćen elektronski mikroskop (FESEM, Mira3 Tescan),

primenom napona od 10 kV. Uzorci su najpre pripremljeni tako što su fiksirani karbonskom trakom za nosače, zatim naparavani zlatom u vakuumu. Pored uvida u morfologiju čestica, SEM slike su analizirane ImageJ softverom u cilju određivanja veličine čestica i njihove raspodele. Za procenu prosečne vrednosti veličine čestica, mereno je više od 200 pojedinačnih čestica svakog uzorka.

3.11.3. Ultraljubičasta spektrofotometrija u vidljivom delu spektra (UV-Vis)

Zahvaljujući prisustvu hromofora koje apsorbuju svetlost određene talasne dužine u vidljivom delu spektra u molekulu ibuprofena, moguće je praćenje koncentracije ovog leka primenom UV-Vis spektrofotometrije. UV-Vis spektri su snimani u oblasti od 400 do 190 nm na instrumentu UV-1800, Shimadzu, Japan, a bazna linija je podešena rastvorom fosfatnog pufera. Pre snimanja uzoraka, određena je kalibraciona kriva za ispitivani sistem. Praćen je karakterističan pik ibuprofena na 221 nm.

3.11.4. Određivanje efikasnosti inkapsulacije (EE%) i sadržaja leka

Efikasnost inkapsulacije (EE) ibuprofena u mikrosferama je određena direktnom metodom. U tu svrhu je odmereno 20 mg mikrosfera sa lekom i preneto u normalan sud od 25 ml. Mikrosfere su rastvorene u minimalnoj količini dihlormetana, zatim je normalan sud dopunje do crte fosfatnim puferom (pH 7,4). Ovako pripremljena smeša je prođuvana azotom radi isparavanja dihlormetana, nakon čega je koncentracija zaostalog leka određena pomoću UV-Vis spektrofotometrije. Efikasnost inkapsulacije je izračunata na osnovu jednačine:

$$EE(\%) = \frac{c_i}{c_t} \times 100 \quad (3.6.)$$

pri čemu je c_t teorijska koncentracija inkapsuliranog leka, odnosno koncentracija leka kada bi sva količina leka bila inkapsulirana unutar polimerne matrice; c_i je koncentracija inkapsuliranog leka.

Sadržaj leka u polimernoj matrici izračunat je na osnovu efikasnosti inkapsulacije prema jednačini: $Sadržaj\ leka\ (\%) = \frac{m_{ink}}{m_p + m_{ink}} \times 100 \quad (3.7.)$

gde je m_{ink} predstavlja masu inkapsuliranog ibuprofena izračunato na osnovu vrednosti EE%; m_p je masa polimera.

3.11.5. In-vitro otpuštanje ibuprofena iz polimerne matrice

Otpuštanje leka iz polimerne matrice je ispitivano u rastvoru fosfatnog pufera, PBS (pH 7,4), na 37 °C tokom 72 h. Odmereno je 50 mg mikrosfera u plastične vijale i dodato 50 ml

PBS-a. Nakon određenih vremenskih intervala, 0,5 ml rastvora je pipetirano iz inkubiranih bočica pri čemu je ta količina nadoknađena svežim puferkim rastvorom kako bi se zapremina održala konstantnom. Koncentracija oslobođenog ibuprofena je određena UV-Vis spektrofotometrijom praćenjem karakterističnog pika ibuprofena na talasnoj dužini od 221 nm. Konačni rezultati predstavljaju srednju vrednost dve probe.

3.12. Ispitivanje in-vitro citotoksičnosti polimernih mikrosfera

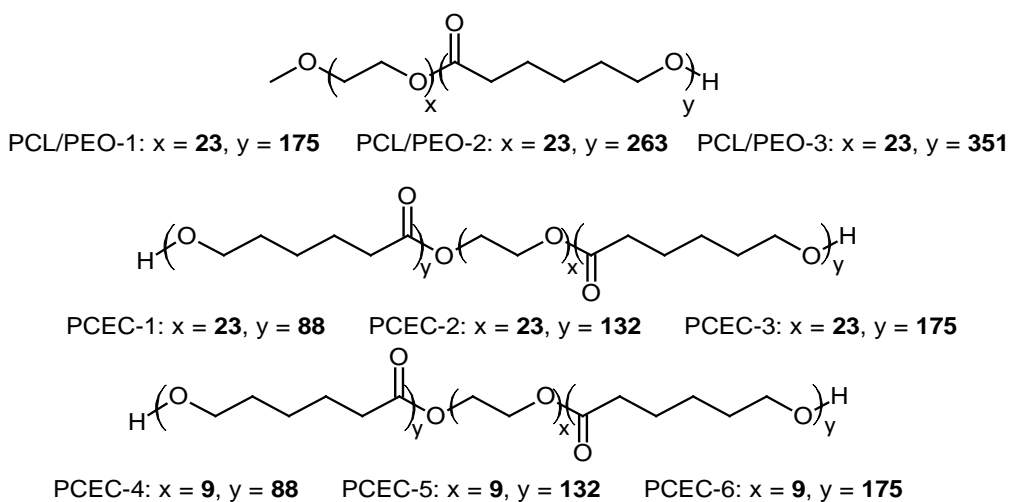
Humane ćelije fibroblasta pluća (MRC5) su dobijene iz ATCC kolekcije i održavane i čuvane po instrukcijama ATCC. Za testove citotoksičnosti, ćelije su uzgajane kao mono-sloj (1×10^4 ćelija po sloju) u vlažnoj atmosferi od 95 % vazduha i 5 % CO₂ na 37 °C. Preživljavanje ćelija je procenjena pomoću 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolin bromid (MTT) redukcionog testa.[145] Test je rađen nakon 48 h inkubacije ćelija u medijumu koji je sadržao mikrosfere i ibuprofen u različitim koncentracijama, i preživljavanje ćelija je ispitano na opisan način. [145] Uniformne suspenzije mikrosfera su pripremljene u koncentraciji 30 mg/ml u sterilnoj dejonizovanoj vodi pre korišćenja u ekperimentima ispitivanja citotoksičnosti. Rezultati su prikazani kao procenat u odnosu na kontrolne (netretirane ćelija) koje su predstavljale 100 %. Eksperimenti su izvođeni u šest ponavljanja u tri nezavisna određivanja a rezultati su prikazi kao procenat ± SD.

Izgled tretiranih ćelija je posmatran mikroskopom DM IL LED Inverted Microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) pri uvećanju 20 puta.

4. Rezultati i diskusija

Dve serije biodegradabilnih triblok kopolimera sa različitom dužinom PCL blokova (Slika 4.1) su sintetisane polimerizacijom otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona, u masi, inicirana završnim hidroksilnim grupama prepolimera PEO, u prisustvu katalizatora kalaj-oktoata, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Kako bi se ispitaio uticaj uvođenja hidrofilnog, amornog PEO segmenta u lance PCL-a na njegova svojstva, sintetisane su dve serije triblok kopolimera sa različitim dužinama PEO bloka: u prvoj seriji je PEO molarne mase M_n 1000 g/mol inkorporiran kao centralni blok, dok je centralni deo druge serije triblok kopolimera bio PEO manje molarne mase, M_n 400 g/mol. Serija diblok kopolimera sa lateralno vezanim metoksi-PEO segmentom, molarne mase M_n 1020 g/mol, je sintetisana na isti način kao serije triblok kopolimera, pri čemu su sastav i molarna masa kopolimera podešeni tako da su slični prvoj seriji triblok kopolimera (Shema 4.1). Na ovaj način je bilo moguće ispitati uticaj položaja hidrofilnog, mekog PEO segmenta na fizička, hemijska i degradativna svojstva blok kopolimera.

U sve tri serije blok kopolimera, različite dužine PCL segmenata (molarne mase u opsegu od 10000 do 40000 g/mol) su dobijene podešavanjem molskog udela reaktanata u polaznoj reakcionoj smeši. Maseni udeo hidrofilnog, mekog PEO segmenta u prvoj seriji triblok kopolimera je variran u opsegu od 2,4 do 4,8 mas.%, a u drugoj seriji od 1 do 2 mas.%, dok je u seriji diblok kopolimera udeo m-PEO iznosio od 2,5 do 4,7 mas.%.



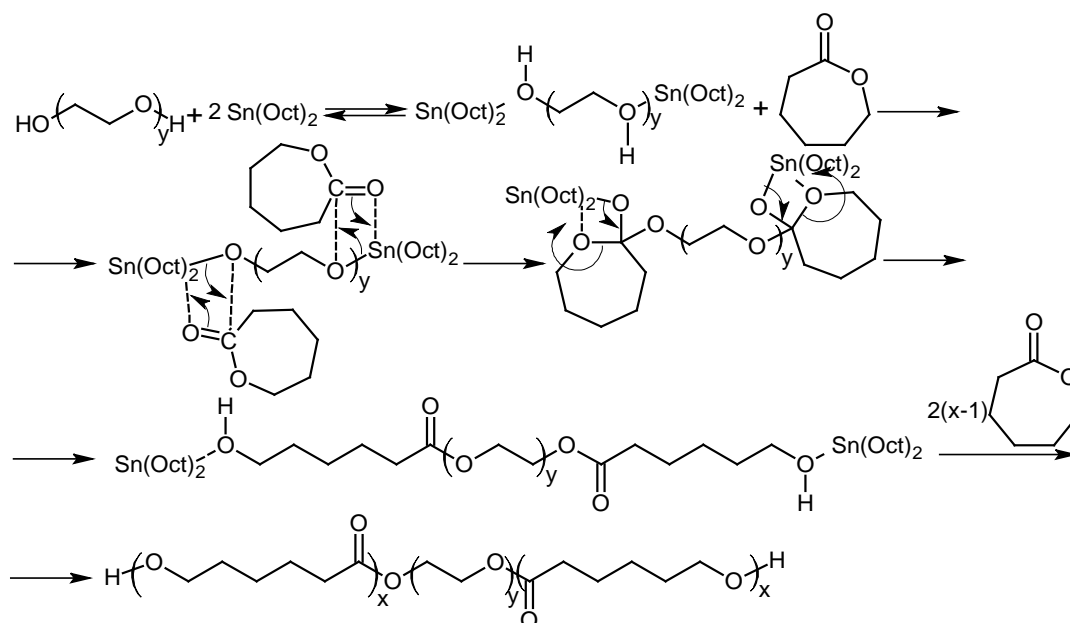
Shema 4.1. Grafički prikaz sintetisanih diblok i triblok kopolimera.

4.1. Sinteza PCEC triblok kopolimera

Kalaj-oktoat, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, je najčešće korišćen katalizator u reakcijama polimerizacije cikličnih estara zahvaljujući tome što je komercijalno dostupan, rastvoran u većini organskih rastvarača i laktona, kao i velikoj hemijskoj stabilnosti u odnosu na alkoksidge. Sam $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ne katališe reakciju polimerizacije već faza inicijacije započinje nakon aktivacije sa, na primer, hidroksilnom grupom. Ovaj faza se često naziva i faza preinicijacije kada nastaje inicijator koji dalje stupa u reakciju. Polimerizacija cikličnih estara u prisustvu kalaj-oktoata započinje stvaranjem alkoksidne veze sa kalajem. Nastali alkoksid dalje inicira reakciju insercije prvog monomera nakon čega sledi faza propagacije kao druga faza "žive" polimerizacije. [20-22]

Sinteza triblok kopolimera odvija se tzv. koordinaciono-insercionim mehanizmom otvaranja cikličnog prstena ϵ -kaprolaktona inicirana hidroksilnim grupama iz poli(etilen-oksida) u prisustvu kalaj-oktoata, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Mehanizam odigravanja ove polimerizacije prikazan je na Shemi 4.2. [146] Smatra se da se na početku reakcije uspostavlja ravnoteža između $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ i odgovarajućeg alkoksidge nastalog u reakciji $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ i jedinjenja koje ima aktivan vodonik. U ovom slučaju je to poli(etilen-oksid). Nastali alkoksid kalaj-oktoata i poli(etilen-oksidge) inicira reakciju sa ϵ -kaprolaktonom. Prvo dolazi do koordinovanja ϵ -kaprolaktone za inicijator koji gradi alkoksid sa poli(etilen-oksidom) i formiranja četvoročlanog prelaznog stanja. Sledi insercija molekula ϵ -kaprolaktone između metala (kalaj) i atoma kiseonika iz poli(etilen-oksidge). Nastaje linearan molekul kod kojeg unutrašnji blok čini poli(etilen-oksid), a spoljašnji poli(ϵ -kaprolakton) koji je koordinovan za inicijator. U daljoj reakciji sa monomerom nastaje triblok kopolimer PCEC.

Prilikom sinteze homopolimera PCL, polimerizacija se odigrava i bez prisustva prepolimera koji učestvuju u reakciji preaktivacije katalizatora kalaj-oktoata najverovatnije zahvaljujući prisustvu nečistoća (koja sadrže hidroksilne grupe) kako u katalizatoru, tako i u samom monomeru. Stepem odigravanja ove vrste polimerizacije veoma zavisi od čistoće samog katalizatora, zbog čega se u nekim slučajevima katalizator neposredno pre ubacivanja u reakcionu smešu dodatno prečisti destilacijom. [25]



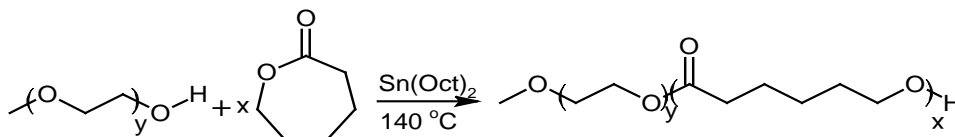
Shema 4.2. Mehanizam sinteza triblok kopolimera PCEC.

Prinos sintetisanih polimera nakon pretaložavanja u metanolu je bio u opsegu od 92 do 96 mas.% (Tabela 4.1.) Određeni procenat polimera je svakako izgubljen tokom samog pretaložavanja. Sa druge strane, reakcije polimerizacije otvaranja cikličnog prstena, u ovom slučaju ϵ -CL, nisu kvantitativne zbog mogućnosti odigravanja sporednih reakcija, kao što je intramolekulska transesterifikacija, koja podrazumeva stvaranje cikličnih oligomera kada se uspostavi ravnoteža. [24]

4.2. Optimizacija uslova sinteze PCL/PEO diblok kopolimera

U cilju optimizacije uslova sinteze diblok kopolimera PCL/PEO, reakcije su izvođene na različitim temperaturama i pri različitim vremenima odigravanja. Uticaj reakcionih uslova na molarnu masu blok kopolimera je ispitan na reakcionim smešama čiji početni sastav odgovara: M_n (PCL bloka) = 20000 g/mol i M_n (m-PEO bloka) = 1020 g/mol. Sastav reakcione smeše je bio nepromenjen, a reakcioni uslovi su bili sledeći: na temperaturi od 160 °C vreme odigravanja reakcije je bilo 5 h, na 140 °C reakcija je trajala 24 h, dok je na 180 °C reakcija izvođena tokom 3 h. Nakon sinteze, određene su vrednosti graničnih viskozitetnih brojeva, urađene su GPC i ^1H NMR analiza i na osnovu dobijenih vrednosti molarnih masa definisani su optimalni uslovi za sintezu ovih diblok kopolimera. [147]

Reakcija sinteze PCL/PEO diblok kopolimera, kao i kod triblok kopolimera, izvođena je u masi, polimerizacijom otvaranja laktonskog prstena u prisustvu katalizatora kalaj-oktoata, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (Shema 4.3.).



Shema 4.3. Sinteza diblok kopolimera PCL/PEO.

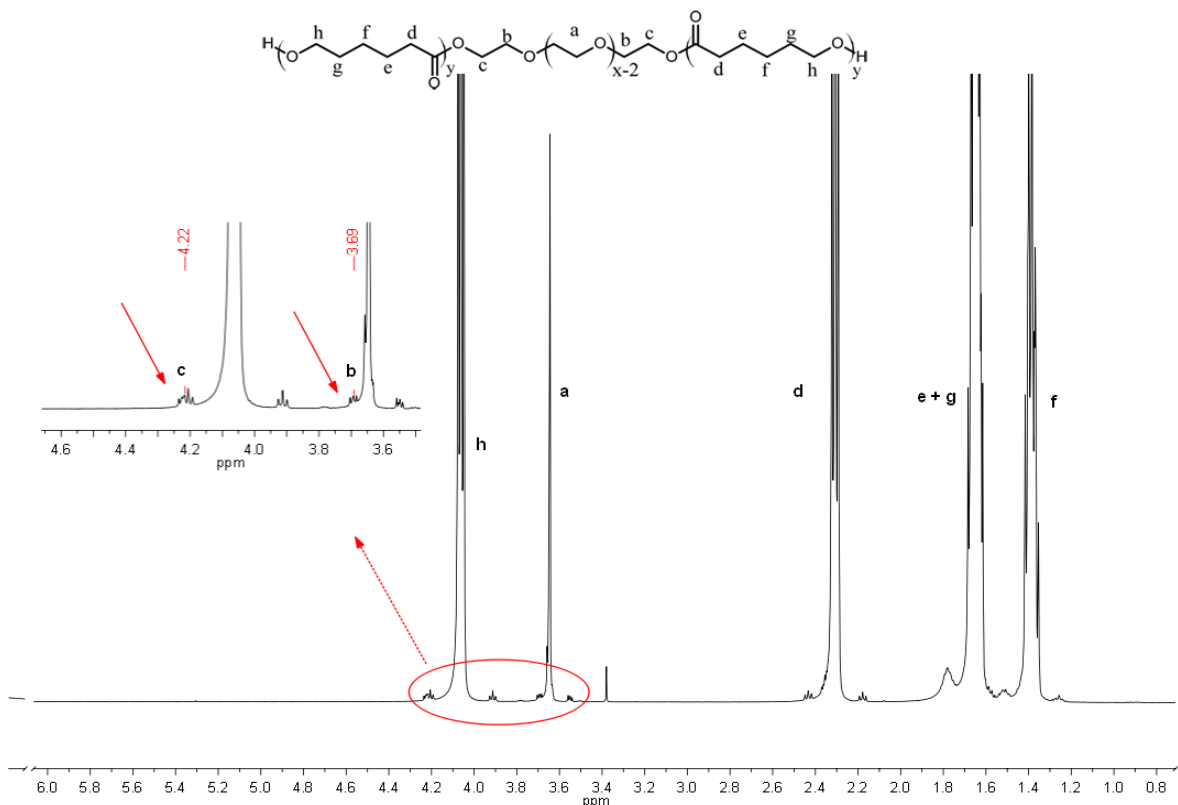
Mehanizam sinteze diblok kopolimera odvija se potpuno istim mehanizmom kao sinteza triblok kopolimera, sa tom razlikom što jedna slobodna hidroksilna grupa iz m-PEO gradi alkoxid sa kalajem iz katalizatora $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

Kako bi se dobio polimer što veće molarne mase i sa što manjim indeksom polidisperznosti, rađene su tri sinteze pod različitim reakcionim uslovima. Takođe, dodatni razlog za optimizaciju uslova sinteze jeste i izbegavanje izvođenja reakcije na 180 °C zbog potencijalne termičke degradacije polimera do koje može doći na ovako visokim temperaturama. Uzevši sve dobijene rezultate analiza u razmatranje, izabrani su temperatura od 140 °C i vreme trajanje reakcije od 24 h kao optimalni. [147] Nakon optimizacije uslova sinteze diblok kopolimera, sintetisana je serija diblok kopolimera sa različitom dužinom PCL lanca i dobijeni polimeri dalje korišćeni za dalja ispitivanja.

4.3. Karakterizacija sintetisanih triblok i diblok kopolimera NMR analizom

Hemijska struktura sintetisanih diblok i triblok kopolimera je potvrđena na osnovu ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije. Reprezentativni spektar PCEC-2 triblok kopolimera je prikazan na Slici 4.1. U spektru ovog triblok kopolimera javljaju se karakteristični signali koji potiču od centralnog metilenskog protona iz ϵ -CL bloka na hemijskom pomeranju $\delta = 1,40$ ppm (f) dok se protoni označeni sa (e) i (g) koji potiču od unutrašnjih metilenskih protona ϵ -CL javljaju na hemijskom pomeranju $\delta = 1,65$ ppm. Metilenski protoni iz ϵ -CL segmenta koji su vezani karbonilnu grupu daju signal na 2,35 ppm (d), dok se metilenski protoni vezani za kiseonik iz ϵ -CL bloka pojavljuju na 4,10 ppm (h). Protoni iz metilenske grupe PEO bloka daju signal na hemijskom pomeranju 3,65 ppm (a). Signali veoma malog intenziteta koji potiču od PEO metilenskih protona koji su direktno vezani za prvu ponavljajuću jedinicu PCL bloka mogu se videti na hemijskom pomeranju 4,22 ppm (c) i 3,69 ppm (b). [148] Odnos intenziteta

protona izražen kao $c/(a+c)$ potvrdio je da su hidroksilne grupe PEO kvantitativno hemijski vezane za PCL blokove u obe serije sintetisanih polimera, jasno ukazujući da se sav PEO ugradio kao centralni/lateralni segment u blok kopolimerima i da nema prisutnih oligomera.

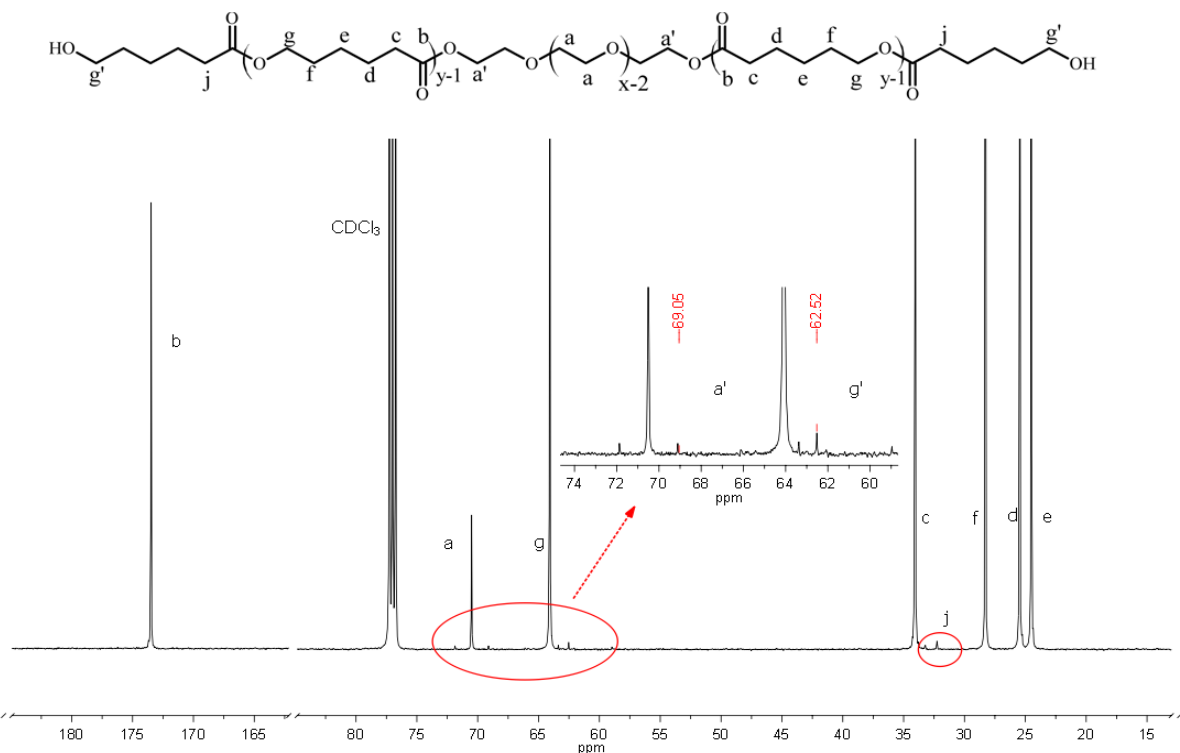


Slika 4.1. Reprezentativni ^1H NMR spektar PCEC-2.

Dodatna potvrda strukture sintetisanih blok kopolimera je dobijena na osnovu ^{13}C NMR analize. U spektru triblok kopolimera PCEC-2 (Slika 4.2.) pik na 173,8 ppm (b) potiče od karbonilnog ugljenikovog atoma dok metilenski ugljenik iz PEO segmenta pokazuje pik na hemijskom pomeranju 70,5 ppm (a). Pikovi na hemijskim pomeranjima 63,9 ppm (g), 39,9 (c), 28,3 (f), 25,5 (d) i 24,4 (e) odgovaraju metilenskim ugljenikovim atomima iz PCL segmenta. Slab signal na 69,1 ppm (a') potiče od metilenskog ugljenikovog atoma iz PEO bloka koji je direktno vezan estarskom vezom za PCL blok. U spektru se, takođe, može detektovati pik na hemijskom pomeranju 32,2 ppm (j) koji odgovara metilenskom ugljenikovom atomu iz PCL bloka koji je direktno vezan za PEO segment. [30] Upravo prisustvo ova dva pika (a' and j) je potvrda blok kopolimerne strukture sintetisanih polimera.

^1H NMR i ^{13}C NMR spektri su potvrdili da su hidroksilne grupe iz prepolimera PEO potpuno proreagovale u inicijalnoj fazi reakcije gradeći estarsku vezu sa PCL blokovima. Prisustvo još jednog signala malog intenziteta na 62,6 ppm (g') ukazuje na ugljenikov atom koji je vezan za završnu hidroksilnu grupu PCL bloka.

Kod diblok kopolimera, (reprezentativni spektar jednog diblok kopolimera je u Prilogu), spektri su veoma slični triblok kopolimernim spektrima, sa tom razlikom da svaki polimerni lanac diblok kopolimera ima jednu završnu hidroksilnu grupu i jednu metoksi grupu. Metilenski ugljenikom atoma iz završne metoksi grupe diblok kopolimera daje signal na 58,8 ppm. Na osnovu vrednosti odnosa intenziteta pikova terminalnih ugljenikovih atoma, može se zaključiti da su u finalnom, pretaloženom uzorku blok kopolimera prisutne frakcije linearnog homopolimera PCL sa završnim hidroksilnim grupama.



Slika 4.2. Reprezentativni ^{13}C NMR spektar PCEC-2 triblok kopolimera.

Pored potvrde strukture, NMR analizom se može odrediti i sastav blok kopolimera. Na osnovu odnosa integrala signala odgovarajućih metilenskih protona iz PEO i PCL ponavljajuće jedinice, iz ^1H NMR spektra moguće je dobiti vrednosti molarne mase sintetisanih polimera, kao i vrednosti molskih i masenih udela PCL blokova. Ukupni stepen polymerizovanja PCL segmenta, Y , je računat na osnovu sledećih jednačina:

$$\frac{4 \times \frac{M_{PEO}}{M_{EO}}}{2Y} = \frac{I_{PEO}}{I_{PCL}} \quad (4.3.1.)$$

gde su:

M_{EO} – molarna masa etilen-oksida

M_{PEO} – molarna masa poli(etilen-oksida)

Y – ukupni stepen polimerizovanja PCL

I_{PEO} – intenzitet pika koji potiče od metilenskih protona na hemijskom pomeranju 3,65 ppm

I_{PCL} – intenzitet pika koji potiče od metilenskih protona na hemijskom pomeranju 4,10 ppm

Molarna masa PCL grane kod triblok i diblok kopolimera se izračunava na osnovu sledeće jednačine:

$$M_{PCL-TB} = \frac{M_{CL} \times Y}{2}, \text{ odnosno } M_{PCL-DB} = M_{CL} \times Y \quad (4.3.2.),$$

gde je M_{PCL-TB} molarna masa segmenta PCL u triblok kopolimeru, a M_{PCL-DB} molarna masa segmenta PCL u diblok kopolimeru (vrednosti molarne mase PCL grane u triblok i diblok kopolimerima su u Tabeli 4.2. označene kao M_n^{PCL}).

Maseni udeo PCL-a izračunat na osnovu 1H NMR spektara jednak je:

$$W_{PCL} = \frac{M_{PCL(NMR)}}{M_{PCL} + M_{PEO}} \quad (4.3.3.)$$

Dve serije triblok i jedna serija diblok kopolimera različitih molarnih masa su uspešno sintetisane, a rezultati dobijeni na osnovu NMR analize su prikazani u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Struktura i sastav triblok i diblok kopolimera.

Polimer	Struktura $PCL_y-PEO_x-PCL_y$	w^{PEO} , mas. %	w^{PCL} , mas.%	n_{CL}/n_E o	M_n^{PCL} , g/mol	M_n , g/mol	Prinos, %
PCL							96
PCEC-1	93-23-93	4,5 (4,8)	95,5 (95,2)	8,1 (7,7)	10600 (10000)	22200	92
PCEC-2	123-23-123	3,4 (3,2)	96,6 (96,8)	10,7 (11,5)	14020 (15000)	29040	92
PCEC-3	152-23-152	2,8 (2,4)	97,2 (97,6)	13,2 (15,4)	17330 (20000)	35660	95
PCEC-4	99-9-99	1,7 (1,96)	98,3 (98,0)	22,0 (19,3)	11290 (10000)	22980	95
PCEC-5	137-9-137	1,3 (1,3)	98,7 (98,7)	30,4 (28,8)	15620 (15000)	31640	95
PCEC-6	150-9-150	1,2 (0,99)	98,8 (99,0)	33,3 (38,6)	17100 (20000)	34600	96
PCL/PEO-1	184-23	4,7 (4,8)	95,3 (95,2)	7,9 (7,6)	20980 (20000)	22000	95
PCL/PEO-2	269-23	3,2 (3,3)	96,8 (96,7)	11,7 (11,4)	30670 (30000)	31690	95
PCL/PEO-3	381-23	2,5 (2,5)	97,5 (97,5)	15,4 (15,1)	43430 (40000)	44450	96

* u zagradi su date teorijske vrednosti na osnovu sastava reakcione smeše

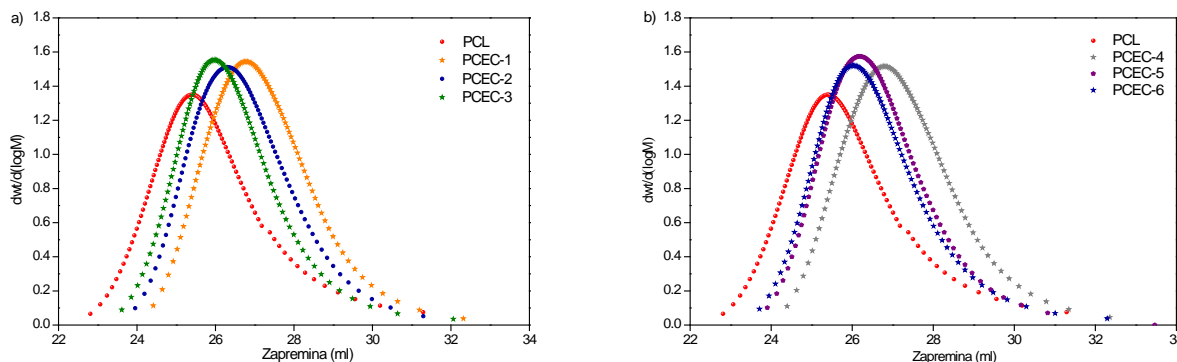
Stepen polimerizovanja PEO kod prve serije triblok kopolimera i serije diblok kopolimera je bio isti, $X = 23$, dok je kod druge serije triblok kopolimera iznosio 9. Dužina PEO

segmenta unutar jedne serije nije menjana i određena je početnim sastavom reakcione smeše, a varirana je dužina PCL blokova unutar serije. U cilju ispitivanja uticaja položaja mekog, hidrofilnog PEO segmenta na svojstva kopolimera, serija triblok kopolimera i serija diblok kopolimera su sintetisane tako da imaju iste dužine PEO blokova, i iste ukupne dužine PCL blokova. Ukupna dužina dve grane kod triblok kopolimera jednaka je dužini jednog PCL bloka kod diblok kopolimera. Stepenn polimerizovanja PCL-a u prvoj seriji triblok kopolimera ima najmanju vrednost za uzorak PCEC-1 ($Y = 93$) jer je sintetisan polimer najmanje molarne mase i to je skoro dva puta manje od vrednosti Y diblok kopolimera najmanje molarne mase ($Y = 184$). U seriji blok kopolimera stepenn polimerizovanja raste sa porastom molarne mase i u dobroj je saglasnosti sa teorijskim vrednostima dobijenim na osnovu sastava reakcione smeše.

Na osnovu ^1H NMR analize, vrednosti molarnog odnosa CL/EO u sintetisanim polimerima veoma je sličan sa vrednostima izračunatim na osnovu sastava reakcione smeše. Za većinu triblok kopolimera, a naročito u seriji diblok kopolimera, postignute su željene vrednosti molarnih masa, sadržaj PEO bloka, kao i stepenn polimerizovanja. Sa druge strane, rezultati ^1H NMR analize su pokazali da su maseni udeli PEO segmenata pojedinih sintetisanih triblok kopolimera veći (PCEC-2, PCEC-3 i PCEC-6) u odnosu na zadati sastavom reakcione smeše što može biti posledica nepotpune konverzije monomera ϵ -kaprolaktona kao i polidisperznosti polaznog PEO (M_n 1000 g/mol) pretpolimera (na osnovu GPC analize: M_n 990 g/mol, M_w 1510 g/mol, PI 1,52, M_{pika} 1610 g/mol). U drugoj seriji sa kraćim unutrašnjim PEO segmentom, dobijeni su kopolimeri veoma sličnog sastava i dužine spoljašnjih PCL segmenta, kao posledica slične konverzije i velike polidisperznosti polaznog pretpolimera PEO (M_n 400 g/mol) (GPC analiza je pokazala sledeće rezultate: M_n 46 g/mol, M_w 270 g/mol, PI 5,80, M_{pika} 210 g/mol).

4.4. GPC analiza triblok i diblok kopolimera

GPC krive sintetisanih polimera su pokazale prisustvo samo jednog pika, odnosno unimodalnu raspodelu molarnih masa. Sa porastom molarne mase, povećava se širina raspodele (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Hromatogrami PCL homopolimera i sintetisanih triblok PCEC kopolimera dobijenih GPC analizom.

Rezultati GPC analize PCL homopolimera i tri serije blok kopolimera su prikazani u Tabeli 4.2. Molarna masa srednja po brojnoj zastupljenosti, M_n , pretaloženog PCL je iznosila 62970 g/mol, koeficijent polidisperznosti 2,07. Molarna masa srednja po brojnoj zastupljenosti (M_n) kopolimera bila je u opsegu od 34500 g/mol do 48200 g/mol, dok je indeks polidisperznosti iznosio između 1,6 do 1,85. Najveća vrednost M_n u seriji triblok kopolimer dobijena je za PCEC-3, što je bilo i očekivano na osnovu početnog sastava reakcione smeše.

Tabela 4.2. Srednje vrednosti molarnih masa, M_n , M_w , masa u piku, M_{pika} , indeks polidisperznosti i granični viskozitetni broj, $[\eta]$.

Polimer	M_n , g/mol	M_w , g/mol	M_{pika} , g/mol	PI	$[\eta]$, dl/g
PCL	62970	130230	111080	2,07	1,43
PCEC -1	34490	55780	55030	1,62	0,67
PCEC-2	44260	70820	70030	1,60	0,83
PCEC-3	48170	84600	81370	1,76	1,10
PCEC-4	33950	55430	54540	1,63	0,70
PCEC-5	41240	73130	73900	1,77	0,89
PCEC-6	44550	79890	79500	1,79	0,99
PCL/PEO-1	30480	56320	53300	1,85	0,68
PCL/PEO-2	38040	64300	61740	1,70	0,70
PCL/PEO-3	33330	67360	69750	2,00	0,82

Rezultati GPC analize serije diblok kopolimera pod izabranim, optimizovanim uslovima, takođe prikazani u Tabeli 4.2., pokazali su veće vrednosti PI za diblok kopolimere u

poređenju sa triblok kopolimerima sličnog sastava. Uzorak diblok kopolimera PCL/PEO-3 je pokazao vrednost molarne mase srednje po brojnoj zastupljenosti $M_n = 33330$ g/mol, što je manje od vrednosti M_n kopolimera PCL/PEO-2, ali je njegova vrednost PI bila znatno manja, 1,70. Polidisperznost uzorka PCL/PEO-3 je najveća u poređenju sa svim sintetisanim kopolimerima i pored najveće vrednosti molarne mase srednje po masenoj zastupljenosti, $M_w = 69360$ g/mol, što ukazuje na prisustvo većeg broja frakcija manjih molarnih masa, koje imaju dominantan uticaj na pad vrednosti M_n .

4.5. Određivanje graničnog viskozitetnog broja sintetisanih kopolimera

Podaci o veličini makromolekula sintetisanih polimera, mogu se dobiti i određivanjem graničnog viskozitetnog broja. Vrednosti graničnog viskozitetnog broja sintetisanih diblok kopolimera su prikazani u Tabeli 4.2. Najveću vrednost graničnog viskozitetnog broja ima homopolimer PCL, 1,43 dl/g. U sve tri serije blok kopolimera može se uočiti porast vrednosti graničnog viskozitetnog broja sa porastom sadržaja PCL segmenata odnosno dužine polimernih lanaca. Najveće vrednosti graničnog viskozitetnog broja u seriji kopolimera imaju triblok kopolimeri PCEC-3 (1,76 dl/g) i PCEC-6 (1,79 dl/g), i diblok kopolimer PCL/PEO-3 (2,00 dl/g), što je u skladu sa njihovim molarnim masama, koja iznosi oko 40000 g/mol. Poređenjem vrednosti graničnog viskozitetnog broja prve serije triblok kopolimera sa serijom diblok kopolimera, može se zaključiti da položaj PEO segmenta ima uticaj na njegovu vrednost. Tako triblok kopolimer PCEC-1 ima manju vrednost $[\eta]$ od PCL/PEO-1 diblok kopolimera sličnog sastava, a razlikuju se po položaju mekog PEO bloka i dužini PCL segmenta - dužina PCL bloka kod diblok kopolimera je dva puta veća od dužine PCL bloka triblok kopolimernog uzorka. Ovaj trend je prisutan i kod ostalih blok kopolimera unutar serije.

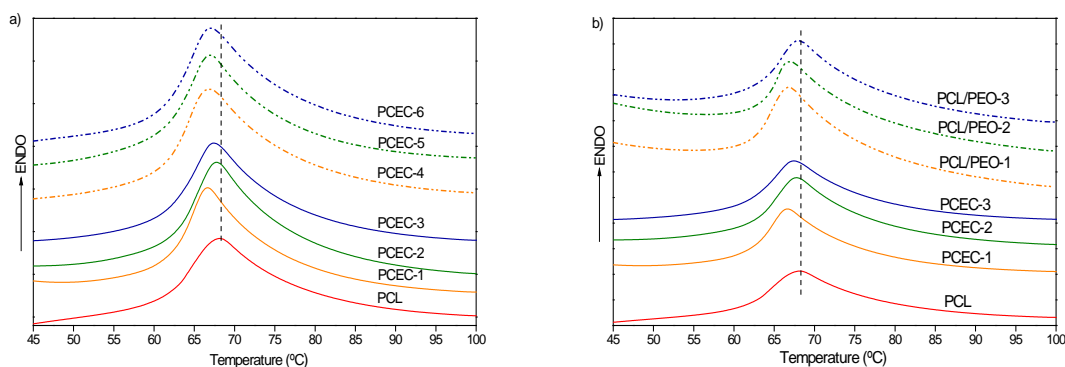
4.6. Termička svojstva PCL-a i sintetisanih blok kopolimera

Biodegradabilnost alifatskih poliestara, kao i njihova propustljivost za lekove, zavisi od brojnih faktora među kojima je i mikrokristalna struktura, odnosno kristaliničnost. PCL i PCL/PEO triblok i diblok kopolimeri su semi-kristalinični polimeri čije je kristalisanje određeno dužinom segmenata. [149, 150] Serije sintetisanih triblok i diblok kopolimera, kao i homopolimer PCL, u pogledu određivanja termičkih svojstava su ispitani diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Pomoću DSC analize su određene temperature topljenja (T_m) i

promene entalpije topljenja (ΔH_m), kao i relativni stepen kristalinišnosti (X_c^{PCL}) sintetisanih kopolimera a rezultati dobijeni analizom ovih termograma su prikazani u Tabeli 4.3.

DSC krive PCL-a i sintetisanih kopolimera su pokazale prisustvo samo jednog, endotermnog pika (Slika 4.4.), koji potiče od topljenja PCL blokova kao nosioca kristaliničnosti u kopolimerima. Zahvaljujući maloj molarnoj masi PEO segmenta, kako kod diblok tako i kod triblok kopolimera, ovaj segment se nalazi u amorfnom obliku u kopolimerima. Poznato je da poli(etilen-oksidi) molarne mase ispod 2000 g/mol ne kristališe, dok PEO molarne mase oko 2000 g/mol pokazuju jedan endotermni pik u DCS termogramu. [40, 42]

Vrednosti temperatura topljenja triblok kopolimera sa različitom dužinom PEO segmenta su bile veoma bliske i sa porastom molarne mase unutar serije se zapaža blagi porast. Kopolimeri druge serije sa veoma niskim sadržajem mekog PEO segmenta imaju skoro iste vrednosti T_m usled velikog sadržaja PCL segmenata. Razlike u temperaturi topljenja prve serije triblok kopolimera i diblok kopolimera slične molarne mase i sastava, a različitog položaja PEO segmenata su bile neznatne, negde oko 1 °C. Ovako male razlike u T_m vrednostima ukazuju na ne tako značajan uticaj prisustva malog sadržaja amorfnog PEO bloka na temperature topljenja kopolimera. Sa druge strane, homopolimer PCL je očekivano pokazao najveću vrednost temperature topljenja, 68,1 °C, u poređenju sa svim sintetisanim blok kopolimerima. Triblok kopolimer sa najvećom vrednosti molarne mase u prvoj seriji (PCEC-3) i njemu sličan diblok kopolimer (PCL/PEO-3) imaju najveće vrednosti temperature topljenja, entalpije topljenja i vrednosti stepena kristaliničnosti u serijama zahvaljujući prisustvu najvećeg sadržaja kristalnih PCL segmenata. Takođe, uprkos trendu povećanja ovih vrednosti u seriji sa porastom molarne mase i udela PCL blokova, može se zaključiti da definisane veličine (T_m , ΔH_m , X_c) za diblok kopolimere pokazuju veće vrednosti usled različitog položaja amorfnog PEO segmenta u odnosu na triblok kopolimere.



Slika 4.4. a) DSC termogrami dve serije triblok kopolimera, b) DSC termogrami triblok kopolimera i diblok kopolimera iste molarne mase.

Na osnovu određenih vrednosti temperatura topljenja svih sintetisanih blok kopolimera, moglo bi se zaključiti da bez obzira na dužinu PEO segmenta i njegov položaj, značajniji uticaj na topljenje polimera nije utvrđen. Međutim, vrednosti promene entalpija topljenja sintetisanih polimera jasno potvrđuju uticaj uvođenja PEO bloka u lance PCL na termička svojstva. Tako triblok kopolimer PCEC-1 i diblok kopolimer PCL/PEO-1 imaju najmanje vrednosti promene entalpije topljenja (85,2 i 85,4 J/g, redom) usled najvećeg udela PEO segmenta (oko 4,5 mas.%) kao i najmanje vrednosti molarne mase u seriji. Sa porastom molarne mase i većim sadržajem PCL blokova, vrednosti ΔH_m rastu, stoga triblok kopolimer PCEC-3 i diblok kopolimer PCL/PEO-3 imaju vrednosti entalpija topljenja 93,7 i 97,8 J/g, redom. Druga serija triblok kopolimera je pokazala veće vrednosti promene entalpija topljenja usled veoma malog udela PEO bloka (oko 1,7 mas.%) i dominantnog uticaja prisustva PCL segmenata. Ipak, i u ovoj seriji, uzorak sa najvećim sadržajem PEO, PCEC-4 (1,7 mas.% PEO) i najmanjom vrednosti molarne mase je imao vrednost entalpije topljenja od 94,7 J/g što je značajno veća vrednost u poređenju sa triblok i diblok kopolimerom sa najvećim udelom amorfnog segmenta. Porast molarne mase i udela PCL segmenata i u ovoj seriji dovodi do povećanja vrednosti ΔH_m , a uzorak PCEC-6 je po vrednosti entalpije najpribližniji homopolimeru PCL koji je očekivano posedovao najveću vrednost od 100,5 J/g.

Kako bi se ispitaio uticaj sastava kopolimera na kristalizaciono ponašanje polimera, izračunata je vrednost ukupnog stepena kristaliničnosti na osnovu vrednosti promene entalpije topljenja, uzimajući u obzir teorijsku vrednost 100 % kristalnog PCL homopolimera. Sintetisani homopolimer PCL ima ukupni stepen kristaliničnosti 73,4 % što je ujedno najveća vrednost u poređenju sa svim sintetisanim polimera. Vrednosti ukupnog stepena kristaliničnosti u blok kopolimernim serijama raste sa povećanjem udela PCL segmenata i kreću se u opsegu od 62,6 do 68,8 % za prvu seriju, odnosno od 69,6 do 72,7 % za drugu seriju triblok kopolimera sa kraćim PEO segmentima. Stepem kristaliničnosti serije diblok kopolimera se kretao u intervalu od 62,7 do 71,9 % i, kao i kod serija triblok kopolimera, povećanje molarne mase i smanjenje sadržaja PEO segmenata dovodi do porasta X_c . Poređenjem odgovarajuće serije triblok kopolimera sa serijom diblok kopolimera, očigledan je uticaj položaja PEO bloka na kristalizaciono ponašanje blok kopolimera. Diblok kopolimeri imaju veće vrednosti ukupnog stepena kristaliničnosti što se može objasniti položajem hemijski vezanog PEO segmenta. Kako je PEO lateralni segment diblok kopolimera, ukupna dužina PCL bloka je dva puta veća od dužine jednog segmenta PCL bloka u triblok kopolimerima kod kojih je PEO centralni segment. Dva PCL bloka u triblok

kopolimerima su odvojeni centralno vezanim PEO blokom što ima veliki uticaj na kristaliničnost ovih polimera u poređenju sa diblok kopolimernim uzorcima. Prisustvo PEO segmenta kao centralnog bloka ima mnogo veći uticaj, tj. više ometa kristalizaciju kopolimera, nego što je to slučaj sa lateralno vezanim PEO. Relativni stepen kristaliničnosti, računat u odnosu na maseni udeo PCL, X_c^{PCL} , prema jednačini 3.2. datoj u Eksperimentalnom delu, pokazuje koliki procenat PCL segmenata u kopolimerima kristališe. Za prvu seriju triblok kopolimera, njegove vrednosti su iznosile od 65,6 do 70,8 %, a u drugoj seriji od 70,8 do 73,5 %, ukazujući da PCL segmenti ne kristališu u potpunosti u kopolimerima i da su neke frakcije ovih segmenata ugrađene u amorfni region polimera. Vrednosti relativnog stepena kristaliničnosti polimera PCEC-5 i PCEC-6 su veoma slične kao posledica sličnog sastava blok kopolimera koji je potvrđen i na osnovu NMR analize. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da prisustvo dužeg i maseno zastupljenijeg PEO segmenta značajnije ometa kristalizaciju PCL-a zbog čega su vrednosti X_c i X_c^{PCL} prve serije triblok kopolimera manje u poređenju sa drugom serijom.

Tabela 4.3. Rezultati DSC i WAXS analiza sintetisanih triblok i diblok kopolimera.

Polimer	T_m , °C	ΔH_m , J/g	w_{PCL}^a , mas. %	X_c^{DSC} , %	$X_c^{PCL}(DSC)$, %	X_c^{WAXS} , %
PCL	68,1	100,5	100	73,4	73,4	49,2
PCEC-1	66,7	85,2	95,5	62,6	65,6	45,5
PCEC-2	67,9	90,2	96,6	66,3	68,6	46,8
PCEC-3	67,4	93,7	97,2	68,8	70,8	47,1
PCEC-4	66,8	94,7	98,3	69,6	70,8	46,4
PCEC-5	66,9	98,5	98,7	72,4	73,3	46,8
PCEC-6	67,0	98,9	98,8	72,7	73,5	48,2
PCL/PEO-1	66,8	85,4	95,4	62,7	65,8	45,6
PCL/PEO-2	67,0	94,1	96,8	69,1	71,4	47,1
PCL/PEO-3	68,0	97,8	97,7	71,9	73,6	48,2

^a na osnovu 1H NMR analize

Na osnovu rezultata DSC analize, dokazano je da se uvođenjem PEO segmenta, bilo kao lateralnog ili centralnog bloka u lance PCL-a, može uticati na termička svojstva blok kopolimera kao posledica ometanja kristalizacije PCL segmenata. Kristaliničnost ovih kopolimera je uslovljena kako položajem amornog PEO bloka i njegovim sadržajem, tako i sastavom i molarnom masom uzoraka.

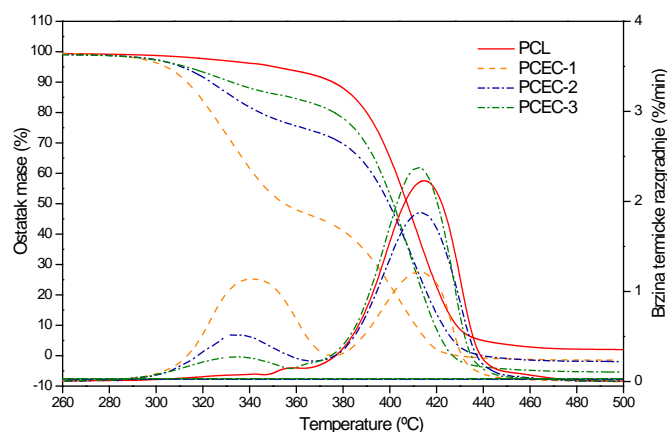
4.6.1. Termička stabilnost sintetisanih polimera

Ispitivanjem termičke stabilnosti sintetisanih blok kopolimera, pomoću termogravimetrijske analize, došlo se do zaključka o uticaju sastava kopolimera, molarne

mase, udela mekog PEO segmenta kao i njegovog položaja na termička svojstva. Termogravimetrijska analiza je pokazala da PEO segment, uveden u malom procentu u PCL lance, menja mehanizam i brzinu termičke degradacije.

Poznato je da se termička degradacija PCL-a odvija u dva koraka, koji se mogu odigravati simultano, istovremeno, ili jedan za drugim. U prvom degradacionom koraku koji se dešava na nižim temperaturama dolazi do nasumičnog raskidanja polimernih lanaca, dok se drugi degradacioni stupanj, koji se odigrava na višim temperaturama, odigrava po tzv. "unzipping" mehanizmu raskidanja lanaca sa krajeva, tj. depolimerizacijom. [35, 151]

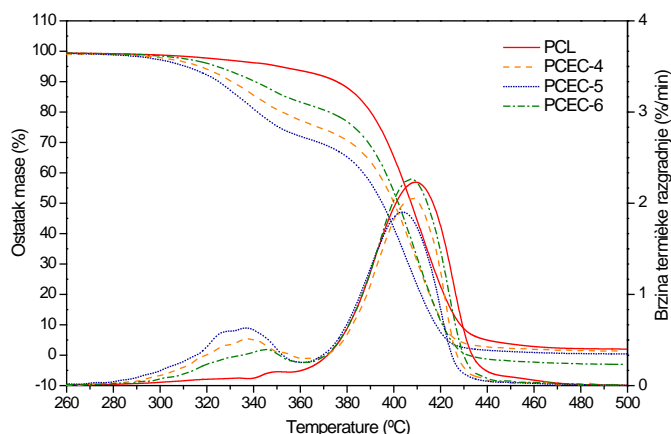
Na osnovu integralne termogravimetrijske krive, TG, i diferencijalne termogravimetrijske krive, DTG, (Slika 4.5. i 4.6.) jasno se uočavaju razlike u termičkoj stabilnosti homopolimera i triblok kopolimera sa različitim sadržajem PEO segmenta. Takođe, radi boljeg uvida u kinetiku procesa degradacije, u Tabeli 4.4. su date karakteristične temperature termičke degradacije: $T_{5\%}$, $T_{50\%}$, $T_{90\%}$ koje predstavljaju temperature na kojim ispitivani uzorak gubi 5 %, 50 % i 90 % svoje mase, a T_{max} predstavlja temperaturu na kojoj se dostiže maksimalna brzina termičke razgradnje, kao i vrednosti ostatka mase na 500 °C.



Slika 4.5. TG i DTG krive serije triblok kopolimera sa centralnim PEO segmentom (1000 g/mol).

Sa TG/DTG krivih homopolimera, PCL, uočava se da degradacija počinje na 345 °C ($T_{5\%}$) a da se maksimalna brzina degradacije dostiže na 411 °C pri brzini od 2,24 %/°C. Prisustvo samo jednog pika u DTG termogramu homopolimera ukazuje da se degradacija ovog poliestra odigrava u jednom koraku ili se dvostepena degradacija odigrava istovremeno. Sa druge strane, DTG analiza serije triblok kopolimera sa centralnim PEO segmentom (1000 g/mol) pokazala je da se degradacija ovih poliestara odigrava u dva koraka; prvi korak se odigrava na nižim temperaturama (327 do 340 °C - temperatura maksimuma prvog pika na

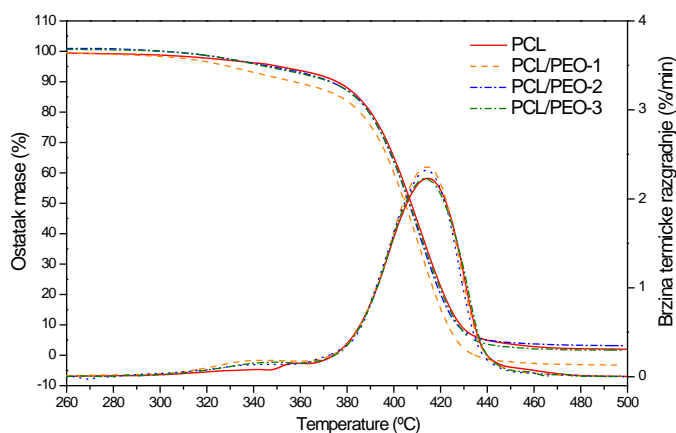
odgovarajućim DGT krivama) i može se pripisati degradaciji PEO segmenta, dok se degradacija PCL blokova odigrava u drugom koraku, na višim temperaturama (u opsegu od 409 do 413 °C - temperature koje odgovaraju maksimumima drugog pika u DTG dijagramu). Na osnovu izgleda termograma triblok kopolimera PCEC-1, moglo bi se zaključiti da je ovaj blok kopolimer nestabilniji u poređenju sa ostalim uzorcima iz serije. Takođe, vrednosti temperature na kojoj počinje degradacija ($T_{5\%}$ iznosi 304 °C) kao i vrednosti brzine na kojima se dešava degradacija maksimalnom brzinom (v_{\max} od 1,14 %/°C) nedvosmisleno ukazuju da je triblok kopolimer sa najvećim udelom PEO bloka i najmanjom molarnom masom, termički najnestabilniji. U prvom degradacionom koraku, sa porastom udela PEO segmenta, raste i brzina termičke degradacije i opada termička stabilnost. Maksimalna brzina degradacije triblok kopolimera je bila u opsegu od 0,28 do 1,14 5/°C, pokazujući da se degradacija PEO bloka u prvoj fazi odigrava duplo brže kod polimera sa većim udelom PEO bloka. Drugi degradacioni korak potiče od razgradnje PCL segmenata i odigrava se na višim temperaturama (u intervalu od 409 do 413 °C). Temperature degradacije u drugom koraku su veoma slične, dok vrednosti maksimalne brzine degradacije rastu sa porastom udela PCL frakcija u triblok kopolimerima (od 1,21 do 2,38 %/°C). Na temperaturi od 500 °C, kod triblok kopolimera nije detektovan ostatak mase, dok je ova vrednost za homopolimer PCL iznosila 2,22 %.



Slika 4.6. TG i DTG krive serije triblok kopolimera sa centralnim PEO (400 g/mol) segmentom.

Na osnovu TG i DTG analize serije triblok kopolimera sa manjim sadržajem PEO bloka (Slika 4.6.), potvrđena je termička degradacija u dva koraka, slično kao kod serije triblok kopolimera sa dužim PEO segmentom. Poredeći termograme prve i druge serije triblok kopolimera, uočava se da pik koji odgovara prvom degradacionom koraku ima manji

intenzitet kod druge serije, tj. manja je maksimalna brzina degradacije u prvom koraku. Kako je udeo PEO segmenta u drugoj seriji triblok kopolimera manji, ovakav rezultat može biti dodatna potvrda da se u prvoj fazi zaista dešava degradacija amorfnog PEO bloka, a u drugoj fazi se razgrađuju PCL segmenti. Vrednosti karakterističnih temperatura degradacije ($T_{5\%}$, $T_{50\%}$ i T_{max}) pokazuju da i veoma mali udeo PEO utiče na termičku stabilnost blok kopolimera, i da sa povećanjem udela PEO segmenta, termička stabilnost polimera opada. Tako, triblok kopolimer sa najvećim udelom PEO, PCEC-4, gubi 50 % svoje mase na temperaturi od 340 °C, dok druga dva blok kopolimera iz serije, 50 % svoje mase gube na višim temperaturama, 395 i 401 °C, redom. Najveća vrednost brzine degradacije u drugom degradacionom koraku za sva tri blok kopolimera je veoma slična, oko 408 °C, dok je ova vrednost za PCEC-6 kopolimer u prvom degradacionom koraku najveća u seriji i iznosi 345 °C usled veoma malog udela mekog PEO segmenta i najvećeg procenta PCL bloka. Ostatak mase na 500 °C jedino nije detektovan u slučaju triblok kopolimera PCEC-6.



Slika 4.7. TG i DTG krive serije diblok kopolimera.

Potpuno suprotno ponašanju triblok kopolimera tokom termičke razgradnje, na TG i DTG krivama serije diblok kopolimera (Slika 4.7.) se zapaža prisustvo samo jednog pika. Na osnovu izgleda termograma diblok kopolimera bi se moglo reći da uvođenje PEO bloka u PCL lance nema tako očigledan uticaj na mehanizam termičke degradaciju kao što je to bio slučaj kod triblok kopolimera. Ipak, poređenjem termograma triblok i diblok kopolimera, nedvosmisleno se može izvesti zaključak o uticaju položaja polietarskog, mekog PEO segmenta kako na mehanizam, tako i na termičku stabilnost blok kopolimera. Mehanizam degradacije triblok kopolimera se odigrava u dva koraka, dok se diblok kopolimeri sličnog sastava termički razlažu u jednom koraku ili se degradacija odigrava različitim mehanizmima istovremeno, na veoma bliskim temperaturama. U termogramu diblok kopolimera sa

najvećim udelom PEO bloka, PCL/PEO-1, jedva je vidljiva prevojna tačka na nižoj temperaturi, dok se druga dva diblok kopolimera u pogledu degradacije ponašaju veoma slično PCL-u. Pojava pika malog intenziteta na nižoj temperaturi kod PCL/PEO-1 blok kopolimera, koja se jedva može i detektovati, ukazuje da se degradacija odigrava u dva koraka na ne tako bliskim temperaturama, slično kao kod triblok kopolimera. Uticaj položaja PEO bloka, odnosno da li je on centralno ili lateralno vezan za lance PCL-a, na mehanizam termičke razgradnje, može se objasniti na sledeći način: kod triblok kopolimera PEO kao centralni segment gradi dve veze sa PCL blokovima koja predstavljaju "slaba" mesta u lancu, gde najpre dolazi do kidanja polimernog lanca u prvom degradacionom koraku; dok kod diblok kopolimera, PEO blok je jednom vezom hemijski vezan za PCL blok. Kao posledica ovoga, diblok kopolimeri pokazuju veću termičku stabilnost u odnosu na triblok kopolimere bez obzira na dužinu PEO bloka.

Unutar serije diblok kopolimera, uprkos tome što nije utvrđen uticaj PEO bloka na mehanizam degradacije, može se zapaziti uticaj sastava, odnosno udela PEO segmenta na termičku stabilnost. Diblok kopolimer sa najvećim udelom PEO bloka, PCL/PEO-1 (udeo PEO segmenta oko 4,7 mas%) počinje termički da se razlaže već na 328 °C, što se umnogome razlikuje od preostala dva uzorka čija degradacija započinje na 345 °C. Na osnovu vrednosti $T_{5\%}$, diblok kopolimer sa većim udelom PEO segmenta je termički nestabilniji i njegova degradacija započinje na nižoj temperaturi, dok su vrednosti ostalih karakterističnih temperatura, kao i maksimalna brzina degradacije međusobno veoma slični, a slični su i sa homopolimerom PCL.

Tabela 4.4. TGA podaci termičke degradacije sintetisanih blok kopolimera.

Polimer	$T_{5\%}$, °C	$T_{50\%}$, °C	$T_{90\%}$, °C	T_{max} , °C	v_{max} , %/min	Ostatak mase, %
PCL	345	408	429	411	2,24	2,22
PCEC-1	304	355	411	340/413	1,14/1,21	0
PCEC-2	311	399	423	334/413	0,52/1,88	0
PCEC-3	312	402	419	327/409	0,28/2,38	0
PCEC-4	316	340	421	337/408	0,52/2,06	1,78
PCEC-5	312	395	418	337/404	0,63/1,90	0,91
PCEC-6	324	401	420	345/408	0,41/2,27	0
PCL/PEO-1	328	404	423	415	2,36	0
PCL/PEO-2	345	407	427	414	2,33	3,31
PCL/PEO-3	345	406	428	413	2,22	2,00

U literaturi je zabeleženo da amfifilni triblok kopolimeri degradiraju mehanizmom koji se odvija u dva koraka pri čemu se u prvom koraku degradiraju lanci PCL-a a da drugi

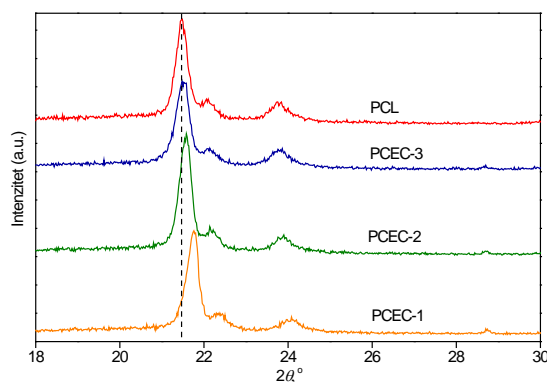
degradacioni korak odgovara razgradnji PEO bloka. [152] Potpuno suprotno ponašanje sintetisanih i ispitanih triblok kopolimera se može pripisati različitom sastavu triblok kopolimera, odnosno dužini lanaca PCL-a i malom udelu polietarskog PEO segmenta u slučaju ispitanih kopolimera. Analiziranjem svih rezultata termogravimetrijske analize, obe serije triblok kopolimera i serije diblok kopolimera, može se zaključiti da se uvođenjem PEO bloka u lance PCL-a smanjuje termička stabilnost kopolimera, i da termička stabilnost zavisi od sastava blok kopolimera - veći udeo PEO bloka, manja termička stabilnost. Položaj PEO bloka utiče na mehanizam termičke degradacije, odnosno diblok kopolimeri se degradiraju u jednom koraku ili u dva koraka koja se istovremeno odigravaju, dok se triblok kopolimeri termički razlažu u dva koraka. Takođe, veću stabilnost su pokazali PCL/PEO diblok kopolimeri u poređenju sa PCEC triblok kopolimerima.

4.7. Difrakcija rendgenskih zraka na velikim uglovima (WAXS) sintetisanih blok kopolimera

Kristalna struktura sintetisanih poliestara, PCL-a i blok kopolimera, ispitana je difrakcijom X-zraka na velikim uglovima. Na osnovu WAXS analize su dobijeni podaci o vrednostima stepena kristaliničnosti, kao i vrsti kristalne rešetke kod ove vrste polimera. Za semi-kristalne polimere su karakteristični difraktogrami sa proširenim maksimumima, odnosno sa pikovima koji su manje oštri nego za potpuno kristalne supstance, što je posledica neuređenosti kristalne rešetke. Potpuno amorfne supstance pokazuju široki maksimum, takozvani amorfni halo. Stepen kristaliničnosti polimera se može izračunati iz odnosa razlike ukupne površine difraktograma i površine ispod amornog haloa i ukupne površine difraktograma.

U difraktogramu svih sintetisanih blok kopolimera i homopolimera PCL (Slika 4.8., 4.9. i 4.10.) se nalaze tri maksimuma (pikovi) koja potiču od kristalne faze PCL-a, kao jedinog kristališućeg segmenta jer PEO segmenti molarne mase manje od 2000 g/mol ne mogu da kristališu. U slučaju kada oba segmenta, i PCL i PEO, imaju mogućnost kristalizacije, sastav kopolimera ima veliki uticaj na njihovo kristalizaciono ponašanje. U literaturi postoje podaci da kristalizacija PCL segmenata u triblok kopolimerima ometa kristalizaciju PEO bloka, dok, suprotno, kristalizacija PEO segmenata u ovim polimerima nema uticaja na kristalisanje PCL blokova. [31] U difraktogramu homopolimera PCL se mogu detektovati maksimumi (pikovi) na uglovima 2θ od 21,4; 22,1 i 23,7° koji odgovaraju refleksionim ravnima (110), (111) i (200), redom. WAXS analiza sintetisanih kopolimera

potvrdila je sličnost sa difraktogramom homopolimera PCL i prisustvo samo jedne kristalne faze koja potiče upravo od prisustva PCL bloka u kopolimerima. Uvođenjem amorfne PEO segmenta u lance PCL-a ne dolazi do promene u vrsti kristalne rešetke i svi sintetisani polimeri kristališu u obliku ortorombične jedinične ćelije sa dimenzijama: $a = 0,7496$ nm, $b = 0,4974$ nm, $c = 1,7971$ nm. [7]

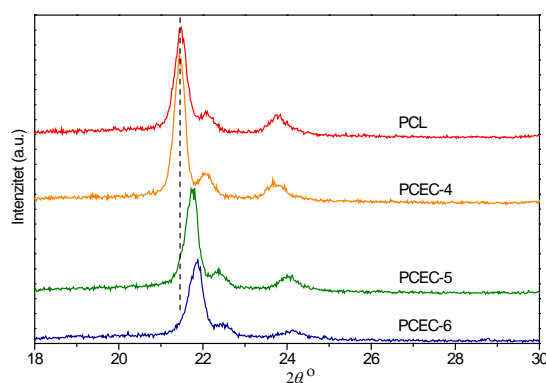


Slika 4.8. Difraktogrami serije triblok kopolimera sa dužinom PEO bloka od 1000 g/mol.

Prisustvo pikova karakterističnih za PCL je detektovano u svim difraktogramima sintetisanih blok kopolimera. Ipak, položaj ovih pikova nije isti u odnosu na homopolimer, kao ni između kopolimera. Sa povećanjem udela mekog PEO segmenta u prvoj seriji triblok kopolimera, sa PEO blokom od 1000 g/mol, karakteristični pikovi se pomeraju ka većim 2θ vrednostima u odnosu na PCL, što se može pripisati deformacijama jedinične ćelije, odnosno smanjenju dimenzija jedinične ćelije (Slika 4.8.). Pomeranje pikova u difraktogramima navodi na zaključak o uticaju uvođenja PEO segmenta na kristalizaciono ponašanje triblok kopolimera, što je u saglasnosti sa DCS analizom koja je pokazala da prisustvo PEO bloka u triblok kopolimerima ometa kristalizaciju PCL lanaca. Kod triblok kopolimer iz prve serije sa najvećim sadržajem PEO (PCEC-1, 4,5 mas.% PEO) karakteristični pikovi su najviše pomereni u poređenju sa ostalim kopolimerima iz serije. Kako raste udeo PCL segmenata u kopolimerima, položaj pikova u difraktogramu se približava položaju pikova karakterističnih za homopolimer PCL.

Pomeranje karakterističnih pikova se može zapaziti i u difraktogramima serije triblok kopolimera sa PEO segmentom od 400 g/mol (Slika 4.9.). Ovakav rezultat implicira da prisustvo PEO bloka kao centralnog segmenta veoma male dužine (400 g/mol) dovodi do drugačije kristalizacije blok kopolimera. Iz difraktograma se može videti da je položaj karakterističnih pikova triblok kopolimer sa najvećim udelom PEO bloka veoma sličan pikovima homopolimera PCL, dok se kod preostala dva kopolimera iz ove serije jasno

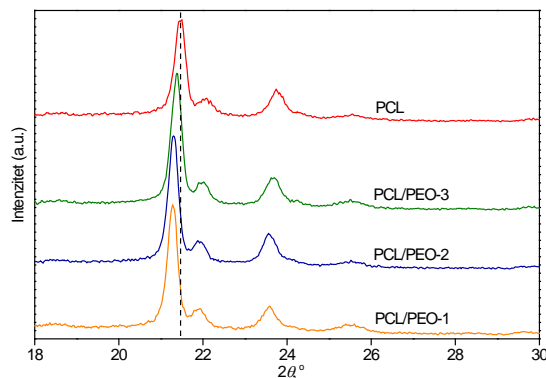
uočava pomeranje ovih pikova ka većim 2θ vrednostima. Pomeranje pikova ka većim 2θ vrednostima ukazuje na promene dimenzija kristalne jedinične ćelije, tj. njihovom smanjenju uprkos prisustvu malog sadržaja PEO segmenta u PCEC-5 i PCEC-6 kopolimerima. Dve serije triblok kopolimera istog tipa ali različitog sastava i udela PEO bloka su dale potpuno suprotne rezultate WAXS analize. U seriji sa dužim PEO blokom, pikovi u difraktogramu triblok kopolimera sa najvećim sadržajem PEO se najviše pomeraju ka većim 2θ vrednostima, dok su u seriji sa kraćim PEO segmentom pikovi uzorka PCEC-4 (najveći udeo PEO) najmanje pomereni ka nižim 2θ vrednostima. Sadržaj PEO segmenta, kao i dužina PCL lanaca mogu biti odgovorni za ovako različita kristalizaciona svojstva.



Slika 4.9. Difraktogrami serije triblok kopolimera sa dužinom PEO bloka od 400 g/mol.

Ukoliko uporedimo difraktograme sintetisanih diblok kopolimera (Slika 4.10.) sa homopolimerom PCL i serijama triblok kopolimera, zapaža se pomeranje difrakcionih pikova ka nižim vrednostima 2θ , što je potpuno suprotno ponašanju triblok kopolimera. Pomeranje pikova ka nižim vrednostima uglova nastaje kao posledica povećanja dimenzija jedinične ćelije. Položaji karakterističnih pikova diblok kopolimera su međusobno slični, a u odnosu na homopolimer pomereni ka nižim 2θ vrednostima, na osnovu čega se može zaključiti da u slučaju lateralno vezanog PEO bloka, sastav diblok kopolimera nema značajniji uticaj na dimenzije jedinične ćelije.

Rezultati WAXS analize su potvrdili da i položaj amorfno, mekog PEO segmenta, sastav blok kopolimera i dužina PCL blokova utiču na njihovo kristalizaciono ponašanje.



Slika 4.10. Difraktogrami serije diblok kopolimera.

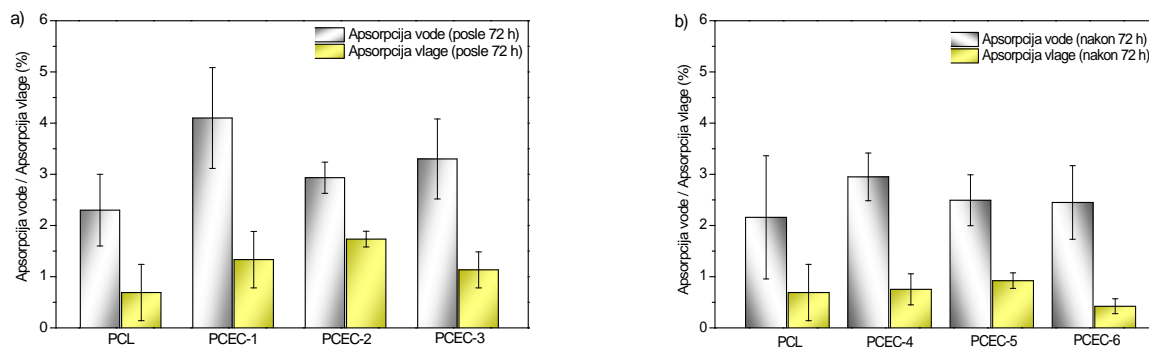
Za sve blok kopolimere kao i za homopolimer PCL je izračunata vrednost stepena kristaliničnosti na osnovu WAXS analize. Stepem kristaliničnosti se odnosi na kristalne PCL domene koji su računati na osnovu refleksije (110), (111) i (200) ravni, kako je već objašnjeno u eksperimentalnom delu. Homopolimer PCL je imao najveću vrednost stepena kristaliničnosti, 49,2 % i ova vrednost se ne razlikuje u većem procentu od vrednosti stepena kristaliničnosti izračunate za blok kopolimere (Tabela 4.3.). Vrednosti X_c blok kopolimera sa najvećom molarnom masom i najmanjim udelom PEO segmenta u serijama (PCEC-3, PCEC-6 i PCL/PEO-3) su najveće i veoma bliske vrednosti stepena kristaliničnosti PCL-a. Sa porastom udela PCL blokova, a samim tim i povećanjem molarne mase kopolimera, stepen kristaliničnosti blok kopolimera neznatno raste. Prva serija triblok kopolimera sa dužim PEO blokom ima najmanje vrednosti X_c u poređenju sa drugom serijom triblok kopolimera ali i u poređenju sa serijom diblok kopolimera. Serija diblok kopolimera istog sastava kao prva serija triblok kopolimera poseduje veće vrednosti X_c što se može pripisati različitoj dužini PCL segmenata u ovim kopolimerima. Stepem polimerizovanja PCL segmenata u triblok kopolimernoj seriji je u intervalu od 93 do 152, dok se u seriji diblok kopolimera njegova vrednost kreće od 184 do 381, što je duplo više. Kao posledica toga javljaju se razlike u vrednostima stepena kristaliničnosti ukazujući na uticaj položaja PEO bloka na kristaliničnost blok kopolimera.

Vrednosti stepena kristaliničnosti sintetisanih blok kopolimera izračunatog na osnovu WAXS analize su bile u intervalu od 45,5 do 48,2 % što je mnogo manje nego vrednosti koje su dobijene na osnovu DCS analize (od 62,6 do 72,7 %). Takođe, kristaliničnost PCL-a određena WAXS analizom (49,2 %) je manja u poređenju sa vrednosti dobijenom na osnovu DCS-a (73,4 %). Ove razlike u vrednostima X_c mogu biti posledica mogućih distorzija u kristalnoj rešetki polimera [153], kao i samoj metodi detekcije i izračunavanja.

4.8. Ispitivanje apsorpcije vode i apsorpcije vlage PCL-a i sintetisanih blok kopolimera

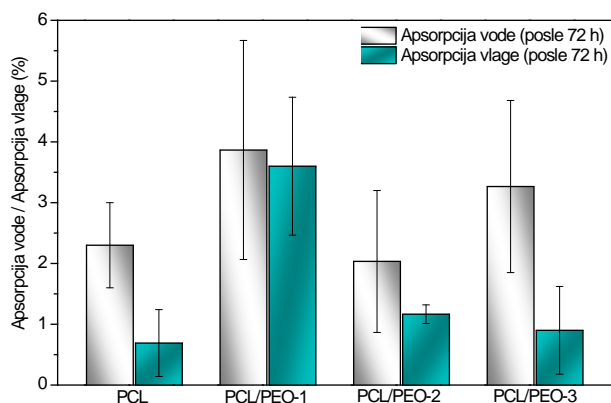
Ogledi ispitivanja apsorpcije vode i vlage sintetisanih alifatskih poliestara su rađeni u cilju ispitivanja njihove hidrofilnosti u masi i apsorpcione sposobnosti. Hidrofilnost polimernih uzoraka je jedan od važnih faktora koji određuju degradaciono ponašanje ovih polimera. Ispitivanje apsorpcije vode polimernih filmova je rađeno u fosfatnom puferu, PBS, na 37 °C tokom 72 h. Rezultati testova dve serije triblok kopolimera nakon 72 h inkubacije su prikazani na Slici 4.11., jer su nakon ovog vremena zabeležene najveće promene u vrednostima apsorpcije vode i vlage.

Homopolimer PCL poseduje najmanju vrednost apsorpcije vode, samo 2 mas.% nakon 72 h, usled njegove hidrofobnosti. U prvoj seriji triblok kopolimera (Slika 4.11.a), triblok kopolimer PCEC-1 je apsorbovao oko 4 mas% vode nakon 72 h zahvaljujući najvećem udelu hidrofilnog PEO bloka u seriji triblok kopolimera. Sa porastom udela PCL segmenta, a samim tim i molarne mase, triblok kopolimeri apsorbuju manji procenat vode. Ovako mala vrednost procenta apsorpcije vode ispitivanih uzorka, kao i male razlike u ovim vrednostima između uzoraka, posledica su prisustva veoma malog udela PEO segmenta i dominantnog uticaja PCL bloka. Homopolimer PCL se karakteriše kao veoma hidrofoban polimer jer je i nakon 110 nedelja inkubacije u PBS-u apsorbovao samo 2 mas.% vode.[154] U seriji triblok kopolimera sa kraćim PEO segmentom (Slika 4.11.b), zapaža se sličan trend u vrednostima apsorpcije vode kao kod prve serije triblok kopolimera: veći udeo hidrofilnog PEO, bolja apsorpciona sposobnost. Ipak, mala dužina hidrofilnog segmenta (400 g/mol) u drugoj seriji je uticala da i kopolimer sa najvećim udelom PEO bloka u seriji, PCEC-4, apsorbuje tek 3 mas.% vode. Druga dva blok kopolimera iz serije u manjem procentu apsorbuju vodu (2,5 mas.%) usled većeg udela PCL segmenta.



Slika 4.11. Apsorpcija vode i vlage PCL-a i: a) serije triblok kopolimera sa PEO (1000 g/mol) segmentom, b) serije triblok kopolimera sa kraćim PEO (400 g/mol) segmentom.

Iako je bilo očekivano za diblok kopolimere da apsorbuju veću količinu vode u poređenju sa triblok kopolimerima usled mobilnosti lateralno vezanog hidrofilnog m-PEO, rezultati testova apsorpcije vode su potvrdili da apsorpciona sposobnost zavisi prvenstveno od sadržaja PCL segmenata u kopolimeru. Diblok kopolimer sa najvećim udelom m-PEO (oko 4,7 mas.%) apsorbovao je 4 mas.% vode nakon 72 h i sa porastom udela PCL segmenata u diblok kopolimerima, ova vrednost je opadala (Slika 4.12.).



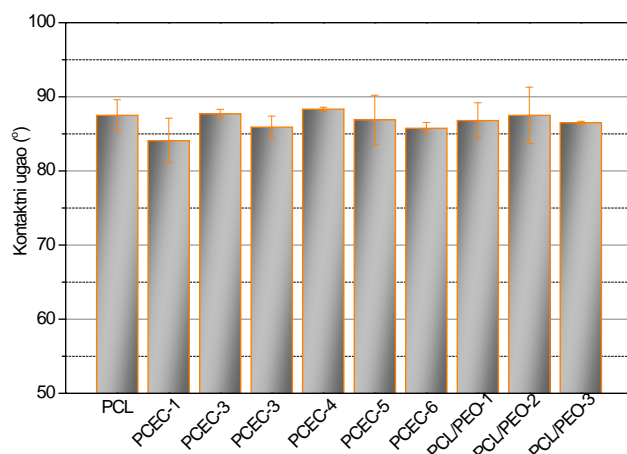
Slika 4.12. Apsorpcija vode i vlage PCL-a i diblok kopolimera.

Na osnovu ispitivanja apsorpcije vode sintetisanih polimera, može se reći da se uvođenjem kratkog, hidrofilnog PEO segmenta u lance PCL-a u maloj meri povećava hidrofilnost blok kopolimera u masi. Prethodna istraživanja su pokazala da su triblok i diblok kopolimeri sa dužim PEO blokom (M_n 5000 and 8000 g/mol) apsorbivali oko 5 mas.% vode tokom dve nedelje i samo 15 mas.% vode nakon 110 nedelja ispitivanja, pri čemu je potvrđen mali uticaj prisustva PEO segmenta u lancima PCL-a. [154] I pored malog povećanja hidrofilnosti uzoraka, utvrđeno je da je procenat apsorpcije vode određen i sastavom kopolimera. Variranjem sastava, tj. odnosa PCL/PEO ili dužinom njihovih blokova se u velikoj meri može uticati na hidrofilna svojstva kopolimera. [155] U kopolimerima gde je odnos PCL/PEO iznosio 75/25, zabeležen je porast mase od 35 mas.%, dok je za molski odnos 50/50, vrednost apsorpcije vode iznosila 100 mas.%. Pored uticaja sastava kopolimera, utvrđen je i uticaj molarne mase na hidrofilna svojstva blok kopolimera. Velika vrednost molarne mase utiče na manju pokretljivost i relaksaciju polimernih lanaca što onemogućava migriranje hidrofilnog PEO segmenta na površinu triblok kopolimernih filmova. Mali procenat apsorpcije vode triblok i diblok kopolimera (od 2 do 4 mas.%) sintetisanih u okviru ove studije ukazuju da kod kopolimera nije došlo do migracije niti segregacije PEO vrsta na površinu filma.

Dodatna potvrda neznatnog poboljšanja hidrofilnosti sintetisanih triblok i diblok kopolimera u poređenu sa PCL-om je dobijena na osnovu testova apsorpcije vlage. Vrednost apsorpcije vlage za PCL iznosila je 0,75 mas.% što je bio pokazatelj veoma hidrofobne prirode homopolimera. Serije triblok kopolimera su pokazale slično ponašanje kao PCL ili male razlike u vrednostima apsorpcije vlage (Slika 4.11. a i 4.11.b). U drugoj seriji triblok kopolimera sa kratkim hidrofilnim segmentom, ove vrednosti su bile i ispod 1 mas.% za sve uzorke. U seriji diblok kopolimera, značajnije povećanje mase polimernih filmova je detektovano za uzorak sa najvećim udelom m-PEO, PCL/PEO-1, koje je iznosilo oko 4 mas.% nakon 72 h. Razlog ovakvom ponašanju može biti bolje ispoljavanje hidrofilnih svojstava m-PEO segmenta u ovom uzorku nego u preostala dva. Generalno, male vrednosti procenta apsorpcije vlage mogu biti jedan od pokazatelja male hidrofilnosti sintetisanih polimera.

4.9. Određivanje vrednosti kontaktnog ugla sa vodom (WCA)

Površina sintetisanih polimernih filmova je okarakterisana merenjem vrednosti statičkog kontaktnog ugla sa vodom u cilju ispitivanja njihove kvašljivosti i hidrofobnosti površina. Na osnovu literaturnih podataka, vrednosti kontaktnog ugla veće od 90° ukazuju na nekvašljive i hidrofobne površine polimera.



Slika 4.13. Vrednosti kontaktnog ugla sa vodom PCL i blok kopolimera.

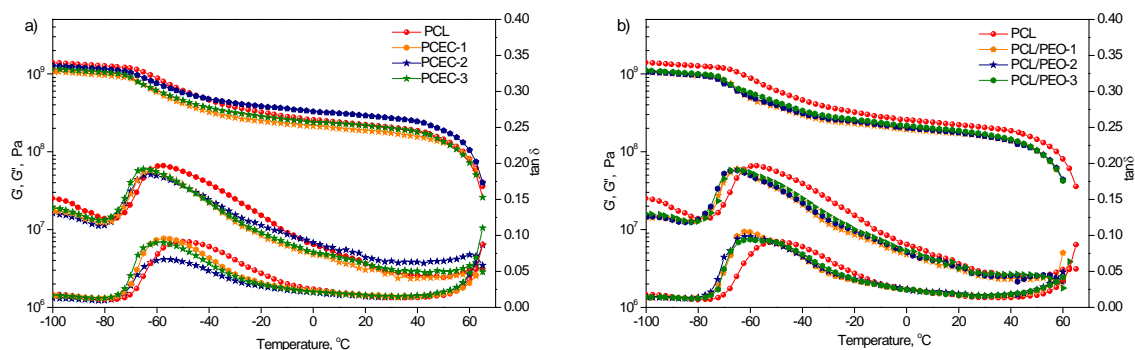
Podaci o vrednosti kontaktnog ugla homopolimera PCL na osnovu različitih ispitivanja se nalaze u opsegu od 65 do 80 stepeni u zavisnosti od vrste rastvarača iz kojih su izliveni polimerni filmovi ali i od molarne mase polimera. [156-158] Ispitivani homopolimer PCL u formi filma, koji je izliven iz rastvora hloroforma, imao je srednju vrednost WCA oko $87,5^\circ$ na osnovu čega se površina ovog uzorka može smatrati slabo hidrofilnom. Ukoliko

uporedimo vrednosti kontaktnih uglova sintetisanih blok kopolimera (diblok i triblok) grafički prikazanih na Slici 4.13., zaključuje se da nema značajnije razlike u izračunatim vrednostima WCA i one su se kretale u intervalu od 84,1 do 87,5 °. Kako bi se eliminisao uricaaj hrapavosti površine polimernih filmova, za uzorak PCL-a je pripremljena pastila iz rastopa i na tom obliku određena vrednost kontaktnog ugla. Hrapavost ovako pripremljenog uzorka je iznosila manje od 100 nm na osnovu AFM analize. Za pastilu homopolimera PCL je izmerena vrednost kontaktnog ugla sa vodom od 95,5 °, dok su vrednosti triblok i diblok kopolimera bile manje u poređenju sa PCL-om, ukazujući na blagi porast u hidrofilitnosti kopolimernih filmova. Na osnovu rezultata merenja vrednosti kontaktnog ugla sa vodom se može izvesti zaključak o malom afinitetu ispitivanih uzoraka ka polarnim tečnostima, vodi u ovom slučaju. Prisustvo hidrofilnog PEO segmenta u blok kopolimerima u malom procentu (manje od 5 mas.%) ne može značajnije poboljšati hidrofilna svojstva ovih poliestara. Povećanje hidrofilnih svojstava ove vrste blok kopolimera i veća razlika u vrednostima njihovih kontaktnih uglova može se ostvariti uvođenjem dužeg PEO bloka, ali i u ovom slučaju su vrednosti WCA određene sastavom polimera i odnosom PCL/PEO. [135]

Rezultati analize merenja WCA ukazuju da hemijski sastav blok kopolimera, morfologija površine i hrapavost polimernih filmova koja je određena načinom pripreme polimernih filmova, određuju kvašljivost i hidrofilitnost površine kopolimernih filmova.

4.10. Dinamičko-mehanička analiza PCL i blok kopolimera u čvrstom stanju i stanju rastopa

Dinamičko-mehaničkom analizom (DMA) je dobijen uvid u reološka svojstva sintetisanih poliestara u čvrstom i tečnom stanju, što je veoma važno sa aspekta njihove primene i postupka prerade iz rastopa (npr. ekstruzija i brizganje). Ispitivanje viskoelastičnih svojstava rastopa polimera je veoma značajno, jer se mogu suzbiti nestabilnosti rastopa polimera tokom procesa prerade. Viskoelastična svojstva PCL-a, triblok i diblok kopolimera u čvrstom stanju su ispitivana u ogledima uvijanja na uzorcima u obliku epruveta i predstavljena kao mehanički spektri zavisnosti modula sačuvane energije smicanja (G') i modula izgubljene energije smicanja (G''), kao i faktora prigušenja ($\tan\delta$) od temperature pri frekvenciji od 1 Hz (Slika 4.14.).



Slika 4.14. Zavisnost modula sačuvane (G') i izgubljene energije (G'') i vrednost $\tan\delta$ za: a) PCL i seriju triblok kopolimera (PEO 1000 g/mol) i b) PCL i seriju diblok kopolimera, na frekvenciji od 1 Hz.

Na krivama temperaturne zavisnosti modula sačuvane energije, modula izgubljene energije i faktora prigušenja od temperature jasno se uočavaju četiri oblasti: oblast staklastog stanja, oblast prelaska iz staklastog u plato gumolikog ponašanja, plato gumolikog ponašanja i prelazak iz gumolikog u oblast tečenja. Temperature ostakljivanja sintetisanih polimera, T_g , su određene na tri načina: 1) kao prevojna tačka modula sačuvane energije, G' , pri prelasku iz staklastog u plato gumolikog ponašanja, 2) kao maksimum pika koji se javlja na krivoj zavisnosti modula izgubljene energije, G'' , 3) kao maksimum pika koji se javlja kod krive zavisnosti $\tan\delta$ od temperature (Tabela 4.5.). Vrednosti T_g određene sa različitih krivih zavisnosti se međusobno razlikuju, a najniže vrednosti su dobijene očitavanjem sa krivih zavisnosti modula izgubljene energije od temperature. Očitavanjem ovih vrednosti sa krivih zavisnosti $G''-T$, određena je vrednost temperature ostakljivanja PCL-a od $-57,4$ $^{\circ}\text{C}$, dok su vrednosti T_g triblok kopolimera bile međusobno veoma slične, u intervalu od $-62,3$ do $-65,2$ $^{\circ}\text{C}$. Vrednosti temperature ostakljivanja serije diblok kopolimera određene na ovaj način su takođe bile slične i u opsegu od $-64,8$ do $-65,1$ $^{\circ}\text{C}$, na osnovu čega se može zaključiti da sa uvođenjem mekog, amornog PEO segmenta, bilo kao centralnog ili lateralnog bloka, dolazi do smanjenja vrednosti T_g u poređenju sa homopolimerom, PCL. Najveće vrednosti temperatura ostakljivanja su određene iz krivih zavisnosti $\tan\delta-T$, i bile su u intervalu od $-54,7$ do $-62,3$ $^{\circ}\text{C}$ za serije blok kopolimera, a najveća vrednost T_g ($-47,5$ $^{\circ}\text{C}$) je određena za homopolimer, PCL.

Vrednosti modula sačuvane i izgubljene energije na karakterističnim temperaturama su prikazane u Tabeli 4.5. U opsegu nižih temperatura, modul sačuvane energije (G') opada idući ka višim temperaturama, pikovi modula izgubljene energije (G'') se šire, kao i pikovi faktora prigušenja ($\tan\delta$). U temperaturnom opsegu od -70 do 0 $^{\circ}\text{C}$, kriva zavisnosti $\tan\delta-T$

PCL-a i blok kopolimera pokazuje maksimum u temperaturnom opsegu od $-55,4$ do $-50,1$ °C, dok je maksimum krive homopolimera PCL pomeren ka većoj vrednosti u poređenju sa blok kopolimerima. Sa porastom vrednosti stepena kristaliničnosti u serijama triblok i diblok kopolimera, dolazi do pomeranja maksimuma krivih zavisnosti $\tan\delta-T$ ka višim temperaturama, a intenzitet α -relaksacije opada. Takođe, u temperaturnom opsegu ispod -70 °C (na oko -95 °C) uočavaju se pikovi na krivama zavisnosti modula izgubljene energije i $\tan\delta$, kada dolazi do pojava β -relaksacije, što se može pripisati rotaciji manjih grupa i segmenata amornog dela polimernog uzorka (sekundarni relaksacioni procesi). Iako pikovi nisu snimljeni u celini, može se zaključiti da se položaj i oblik pikova PCL-a i sintetisanih kopolimera značajno ne menjaju. Sa druge strane, oblik α -relaksacionog pika umnogome zavisi od vrednosti stepena kristaliničnosti i asimetrično se širi. Maksimum pika α -relaksacije odgovara temperaturi ostakljivanja, odnosno pri toj temperaturi nametnuta frekvencija oglada je jednaka frekvenciji oscilovanja većih grupa i segmenata (do 50 C atoma) u amorfnoj oblasti polimernog uzorka, koja može biti ograničena kristalitima u semikristaliničnom polimeru PCL-a. [140, 159] U oblasti staklastog stanja polimernih uzoraka, najveću vrednost modula sačuvane energije, G' , ima homopolimer PCL ($1,35 \times 10^9$ Pa). Uvođenjem mekog, amornog PEO segmenta u lance PCL-a, dolazi do smanjenja vrednosti G' , pa tako triblok kopolimer sa najvećim udelom PEO segmenta (PCEC-1) ima najmanju vrednosti modula sačuvane energije ($1,01 \times 10^9$ Pa) u poređenju sa ostalim uzorcima iz serije. Vrednosti modula sačuvane energije za seriju diblok kopolimera su veoma slične, i u opsegu od $1,03$ do $1,06 \times 10^9$ Pa. Vrednosti G' za sve ispitivane uzorke su bili reda veličine 10^9 Pa (na temperaturi -90 °C), dok su vrednosti modula izgubljene energije, G'' , bile reda veličine 10^7 Pa, ukazujući da se u oblasti staklastog stanja polimera, sačuva više energije nego što se izgubi u vidu toplote. U platu kada je polimer u gumolikom stanju, moduli sačuvane i izgubljene energije su relativno konstantni, odnosno nezavisni od promene temperature (u oblasti od 0 do 40 °C). Oblast platoa gumolikog stanja je karakterističan za hemijski ili fizički umrežene polimere, ali i za amorfne polimere velike molarne mase. Modul sačuvane energije kopolimera u oblasti platoa gumolikog stanja rastu sa porastom vrednosti stepena kristaliničnosti PCL segmenata kao posledica fizičkog ojačanja kristalitima. Najveća vrednost G' u oblasti gumolikog ponašanja je određena za PCL, $2,14 \times 10^8$ Pa.

Jednačina koja definiše relaksacionu jačinu $\Delta G' = G'_0 - G'_\infty$, (gde je G'_0 modul sačuvane energije u staklastom stanju, a G'_∞ modul sačuvane energije u gumolikom stanju) se može iskoristiti za analizu viskoelastičnih svojstava polimera prilikom prelaska iz staklastog

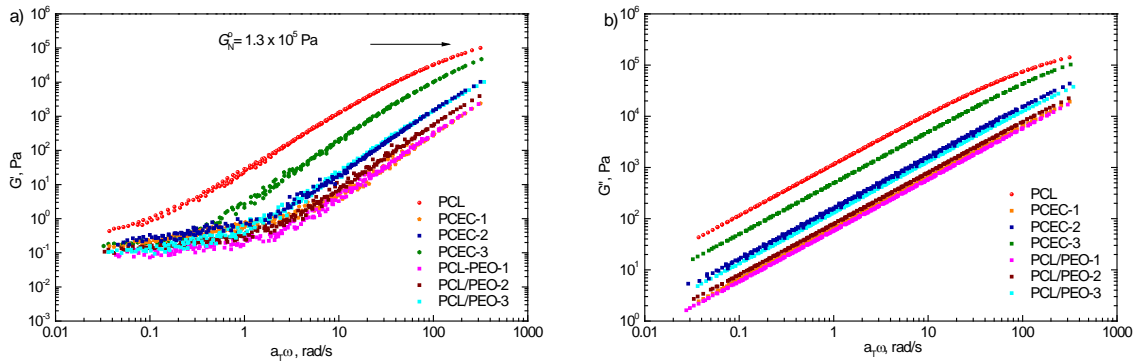
u gumoliko stanje. Relaksaciona jačina tri- i diblok kopolimera, merena na osnovu razlike između relaksacionog (G'_{∞} , niža temperatura, staklasto stanje) i nerelaksacionog (G'_{∞} , viša temperatura, plato gumolikog stanja) modula, je imala vrednosti manje u odnosu na homopolimer PCL i kao što je očekivano uglavnom opadala sa porastom vrednosti stepena kristaliničnosti (Tabela 4.5.).

Tabela 4.5. Temperatura ostakljivanja, T_g , modul sačuvane energije, G' na temperaturi od -90 i 30 °C, redom, i relaksaciona jačina sintetisanih polimera.

Polimer	w_{PCL}^a , wt %	$X_c^{\text{DSC}}, \%$	$T_g, ^\circ\text{C}$			G' -90 °C	G' +30 °C	$\Delta G'$, Pa
			G''_{max}	$G'_{\text{infl.}}$	$\tan \delta_{\text{max}}$			
PCL	1	73,4	-57,4	-55,0	-47,5	$1,35 \times 10^9$	$2,07 \times 10^8$	11,43
PCEC-1	95,5	62,6	-62,5	-60,3	-55,1	$1,01 \times 10^9$	$1,74 \times 10^8$	8,36
PCEC-2	96,6	66,3	-62,3	-60,2	-54,7	$1,21 \times 10^9$	$2,69 \times 10^8$	9,41
PCEC-3	97,2	68,8	-65,2	-65,2	-57,4	$1,10 \times 10^9$	$1,98 \times 10^8$	9,02
PCL/PEO-1	95,4	62,7	-65,1	-62,4	-62,3	$1,06 \times 10^9$	$1,58 \times 10^8$	9,02
PCL/PEO-2	96,8	69,1	-65,0	-62,2	-59,9	$1,03 \times 10^9$	$1,61 \times 10^8$	8,69
PCL/PEO-3	97,7	71,9	-64,8	-60,0	-58,1	$1,05 \times 10^9$	$1,70 \times 10^8$	8,80

^a Na osnovu ^1H NMR analize

U skladu sa principom superpozicije vreme-temperatura, dobijene su zbirne krive zavisnosti modula sačuvane i modula izgubljene energije od frekvencije na temperaturi na kojoj su ispitivani uzorci bili u stanju rastopa, 100 °C, (Slika 4.15.), u intervalu frekvencija 0,01 do 1000 rad/s. Svi ispitivani uzorci se tokom topljenja ponašaju kao homogeni polimerni materijal. Na visokim frekvencijama krive zavisnosti modula sačuvane i modula izgubljene energije se seku, i u toj tački je $G'=G''$, što predstavlja tačku u kojoj kriva zavisnosti ulazi u plato. Na prikazanim graficima zavisnosti serije triblok i diblok kopolimera, u ispitivanom intervalu frekvencija, nisu detektovane tačke preseka ove dve krive. Nemogućnost detekcije tačke preseka se može pripisati nedovoljno visokim primenjenim frekvencijama ispitivanja, na kojima je za PCL bilo moguće uočiti presek ove dve krive zavisnosti. [160] Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da nehomogeno ponašanje, kao što je pojava mikrofazne separacije, karakteristične za blok kopolimere i smeše polimera nije detektovana kod ispitivanih PCL/PEO blok kopolimera.



Slika 4.15. Krive zavisnosti: a) modula sačuvane i b) modula izgubljene energije PCL-a i serije triblok kopolimera (PEO 1000 g/mol) i diblok kopolimerne serije ($T_0 = 100$ °C).

U tački preseka, gde je $G' = G''$ krive zavisnosti ulaze u plato i u ovoj oblasti se može definisati vrednost modula G_N^0 , koji se izračunava iz krive zavisnosti δ od G^* , a na osnovu jednačine: $G_N^0 = \lim G^*$, kada $\delta \rightarrow 0$.

Vrednost G_N^0 za homopolimer PCL je iznosila $3,64 \times 10^6$ Pa, i to je bila najveća izmerena vrednost u odnosu na seriju triblok i diblok kopolimera kao posledica najveće vrednosti molarne mase PCL-a (Slika 4.17.a). Očekivano, najmanje vrednosti su izračunate za triblok i diblok kopolimere sa najmanjom vrednosti molarne mase, PCEC-1 i PCL/PEO-1 ($2,66 \times 10^6$ i $2,31 \times 10^6$ Pa, redom). Sa porastom udela PCL segmenata, a samim tim i molarne mase polimera, beleži se porast vrednosti G_N^0 .

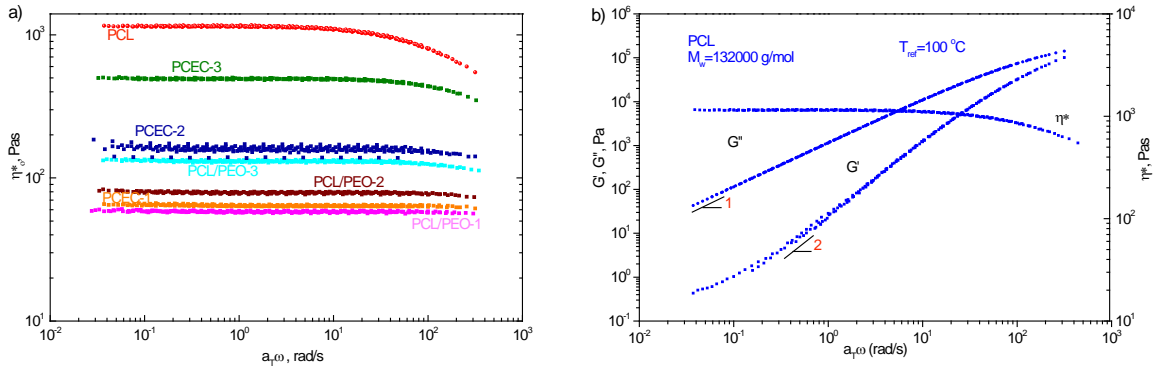
Važan faktor koji kontroliše reološko ponašanje polimera, odnosno ponašanje u stanju rastopa i mehanička svojstva u čvrstom stanju, jesu fizički prepletaji lanaca polimera. Stoga je određivanje molarne mase između prepletaja, M_e , veoma važan parametar. Vrednost M_e se definiše na osnovu vrednosti G_N^0 a prema jednačini: $M_e = \frac{\rho RT}{G_N^0}$,

gde je ρ gustina polimera na određenoj temperaturi, T , a R je univerzalna gasna konstanta. Gustina rastopa PCL na 100 °C iznosi $1,145$ g/cm³ [161]. Vrednost molarne mase između prepletaja ima najmanju vrednost za homopolimer PCL ($0,97 \times 10^3$ g/mol), dok uvođenjem mekog, amorfno PEO segmenta u lance PCL, dolazi do porasta vrednosti M_e . Vrednosti M_e za triblok i diblok kopolimere se kreću u intervalu od $1,19 \times 10^3$ do $1,58 \times 10^3$ g/mol, a unutar serije blok kopolimera, sa porastom vrednosti molarne mase kopolimera, vrednost M_e opada.

Tabela 4.6. Nulta kompleksna viskoznost, energija aktivacije tečenja PCL-a i ispitanih triblok i diblok kopolimera.

Polimer	η^* na 100 °C, Pas	E_a , kJ/mol	$-p$	m	n	G_N^0 , Pa	M_e , g/mol
PCL	1152	32,7	0,295	1,43	1,77	$3,64 \times 10^6$	$0,97 \times 10^3$
PCEC-1	65	32,6	-	0,999	1,84	$2,66 \times 10^6$	$1,33 \times 10^3$
PCEC-2	166	39,1	-	0,983	1,74	$2,84 \times 10^6$	$1,58 \times 10^3$
PCEC-3	479	35,6	0,180	0,946	1,87	$2,98 \times 10^6$	$1,19 \times 10^3$
PCL/PEO-1	60	34,2	-	0,996	1,82	$2,30 \times 10^6$	$1,54 \times 10^3$
PCL/PEO-2	80,6	34,2	-	0,996	1,97	$2,38 \times 10^6$	$1,49 \times 10^3$
PCL/PEO-3	133,5	35,5	0,088	0,987	1,87	$2,41 \times 10^6$	$1,47 \times 10^3$

Promena kompleksnog viskoziteta je ispitivana u intervalu frekvencija 0,01 do 1000 rad/s, na uzorcima u stanju rastopa (100 °C), i zavisnost vrednosti nulte viskoznosti η^* sintetisanih poliestara na 100 °C je prikazana na Slici 4.16.a. Za sve ispitivane polimere je primećena konstantnost kompleksnog dinamičkog viskoziteta u celom intervalu promene frekvencije, što ukazuje na Njutnovsko ponašanje ovih polimera u stanju rastopa na 100 °C. Međutim, homopolimer PCL se ponaša pseudoplastično u stanju rastopa pri većim brzinama smicanja, odnosno njegova viskoznost opada sa porastom frekvencije usled prisustva prepletaja u rastopu polimera velikih molarnih masa. Vrednost kompleksnog dinamičkog viskoziteta je bila najveća za homopolimer PCL, 1152 Pas (Tabela 4.6.), dok su vrednosti kompleksnih dinamičkih viskoziteta triblok i diblok kopolimera zavisile od vrednosti molarne mase i udela PEO segmenta. Triblok kopolimer i diblok kopolimer najmanje vrednosti molarne mase, istovremeno sa najvećim udelom PEO bloka, su imali najmanje vrednosti kompleksne viskoznosti: 65 Pas, odnosno 60 Pas. Sa porastom molarne mase i udela PCL segmenata u serijama blok kopolimera, vrednost η^* rastu. Nagib krivih zavisnosti dinamičke viskoznosti od frekvencije u log-log dijagramu, p , pri većim frekvencijama je bilo moguće odrediti samo za polimere većih molarnih masa: PCL, PCEC-3 i PCL/PEO-3. Tako je vrednost ovog nagiba bila najveća za PCL (-0,295) koji je imao najveću vrednost molarne mase, dok su vrednosti p za PCEC-3 i PCL/PEO-3 iznosile -0,180 i -0,088, redom. Primetno je da vrednost nagiba triblok kopolimera ima veću vrednost u odnosu na diblok kopolimer slične vrednosti molarne mase, ali su generalno i vrednosti nulte viskoznosti serije triblok kopolimera veće u odnosu na vrednosti serije diblok kopolimera sličnih molarnih masa.



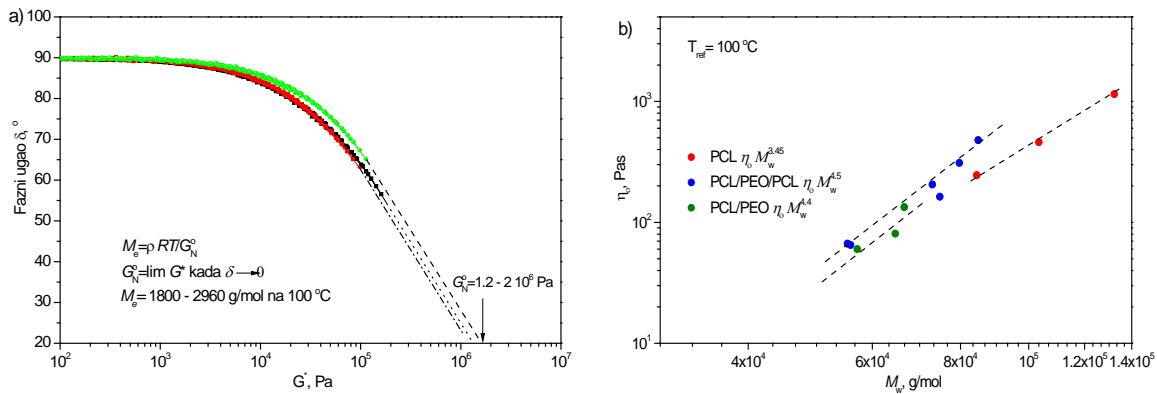
Slika 4.16. a) Zavisnost kompleksne viskoznosti od frekvencije za PCL i seriju triblok (PEO 1000 g/mol) i diblok kopolimera na referentnoj temperaturi od 100 °C, b) Zbirne krive zavisnosti modula sačuvane, modula izgubljene energije i dinamičke viskoznosti PCL-a od frekvencije na referentnoj temperaturi.

Nagibi krivih zavisnosti G' od frekvencije u oblasti niskih frekvencija (u log-log dijagramu) imaju vrednosti približno 2 (n), dok je nagib odgovarajućih krivih zavisnosti G'' približno 1 (m), što je karakteristično ponašanje homogenih rastopa homopolimera u terminalnoj viskoelastičnoj oblasti. Sa porastom vrednosti molarne mase unutar serije blok kopolimera, vrednosti nagiba m opadaju, što je naročito izraženo u seriji triblok kopolimera. U seriji diblok kopolimera, vrednosti m su veoma slične, ipak nagib krive diblok kopolimera sa najvećom vrednosti molarne mase ima najmanju vrednost.

Horizontalni faktor pomeraja, a_t , pokazuje temperaturnu zavisnost viskoznosti, a za semikristalinične polimere, na temperaturi 100 °C iznad temperature ostakljivanja, važi Arenijusova jednačina, na osnovu koje je moguće izračunati vrednosti energije aktivacije tečenja, E_a :

$$a_t = \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right]$$

gde je T vrednost apsolutne temperature u K, T_{ref} je referentna temperatura (100 °C), a R je univerzalna gasna konstanta. [161] Vrednosti energije aktivacije tečenja ispitivanih polimera, E_a , su bile veoma slične za sve uzorke i kretale su se u opsegu od 32,7 do 39,1 kJ/mol (Tabela 4.6.). Zapaža se da sa porastom molarne mase blok kopolimera u seriji, raste vrednost aktivacione energije, ali s obzirom na male razlike u vrednostima E_a između uzoraka, ne može se govoriti o značajnijem uticaju molarne mase na vrednosti energije aktivacije tečenja.



Slika 4.17. a) Zavisnost faznog ugla (δ) od kompleksnog modula (G^*) za PCL i triblok kopolimere b) zavisnost nulte kompleksne viskoznosti (η_0^*) od M_w za serije PCL, i triblok i diblok kopolimera na referentnoj temperaturi.

Na Slici 4.17.b) je prikazana zavisnost nulte kompleksne viskoznosti (η_0^*) serije PCL homopolimera i triblok i diblok kopolimera od njihove molarne mase srednje po masenoj zastupljenosti (M_w). Poznato je da većina linearnih polimera sa uskom raspodelom molarnih masa, iznad kritične molarne mase podležu stepenom zakonu sa koeficijentom u opsegu 3,4-3,6. Obe serije blok kopolimera su pokazivale veće koeficijente od 4 ($\eta_0^* \sim M_w^{4.4}$ i $\eta_0^* \sim M_w^{4.5}$, za triblok i diblok kopolimere, redom) što je u saglasnosti za već objavljenim rezultatima koji su se odnosili na PCL [161]. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da su sintetisani polimeri sa molarnim masama koje su veće od kritičnih vrednosti (M_c), tj. da su sposobni za prepletanje.

Na osnovu dobijenih rezultata dinamičko-mehaničke analize sintetisanih polimera, uočavaju se male razlike u reološkom ponašanju između serija diblok i triblok kopolimera. Ipak, u poređenju sa homopolimerom PCL, jasno je da se promenom sastava, odnosno uvođenjem amorfnog PEO segmenta u PCL lance, bilo kao lateralnog ili centralnog bloka, mogu diktirati reološka svojstva kako u rastopu tako i u čvrstom stanju ovog tipa blok kopolimera.

4.11. Degradacija PCL-a i sintetisanih triblok i diblok kopolimera

Mogućnost degradacije alifatskih poliestara, kako hidrolitičke tako i u prisustvu enzima, u velikoj meri određuje njihovu primenu kao ambalažnog materijala, izradu predmeta za jednokratnu upotrebu, ali i u oblasti biomedicine. Struktura, sastav i molarna masa polimera, najvažniji su faktori koji utiču na degradaciono ponašanje.

Hidrolitička degradacija PCL i blok kopolimera je testirana u fosfatnom puferu, pH 7,4, na 37 °C tokom osam nedelja, dok je ispitivanje enzimske degradacije rađeno u fosfatnom puferu kojem je dodat ćelijski ekstrakt ("cell-free" ekstrakt) u kojem su bili prisutni enzimi *P. aeruginosa* PAO1. Kako bi se ispitao intenzitet degradacije, kao i mehanizam po kojem se odigrava degradacioni proces, polimerni uzorci su karakterisani GPC analizom, FTIR analizom, optičkom mikroskopijom i AFM analizom.

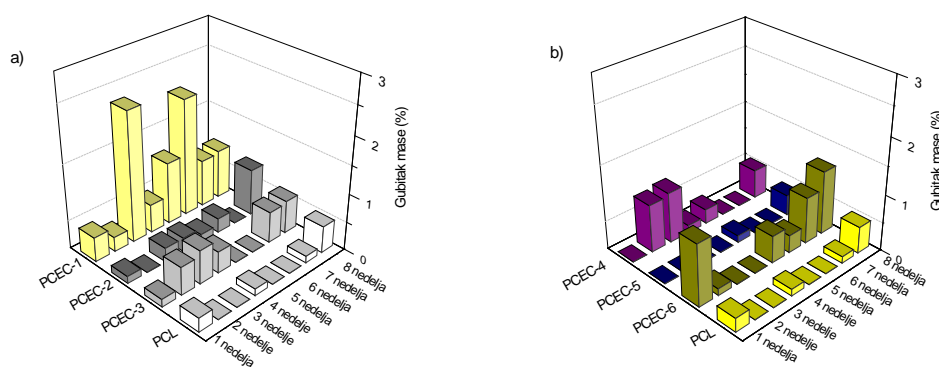
Ispitivanjem degradacije polimera u kompostu, utvrđuje se mogućnost razgradnje ovih polimera u spoljašnjoj sredini. Ukoliko polimeri koji su biorazgradivi u kompostu dospeju u prirodnu sredinu, kontaminacija životne sredine je svedena na minimum a proces biokompostiranja može predstavljati jedan od načina recikliranja biodegradabilnog otpada.

4.11.1. Hidrolitička degradacija sintetisanih polimera

Hidrolitička degradacija alifatskih poliestara je veoma složen proces tokom kojeg se dešava proces difuzije i hemijske promene; prvo dolazi do apsorpcije vode, zatim do raskidanje estarskih veza, difuzije nastalih proizvoda degradacije i rastvaranja nastalih proizvoda. Hidroliza alifatskih poliestara se može odigravati mehanizmom površinske degradacije ili degradacije u masi, oba procesa su kontrolisana difuzijom. [51] Pokazano je da je homopolimer PCL relativno stabilan tokom procesa abiotske hidrolize i da tokom ovog procesa dolazi do redukcije molarne mase u kombinaciji sa malim gubitkom mase. [68] Ogledi ispitivanja vrednosti apsorpcije vode i merenje kontaktnog ugla sa vodom otkrili su hidrofobnu prirodu sintetisanih PCEC i PCL/PEO blok kopolimera i veoma malo povećanje hidrofilnih svojstava blok kopolimera u poređenju sa PCL-om.

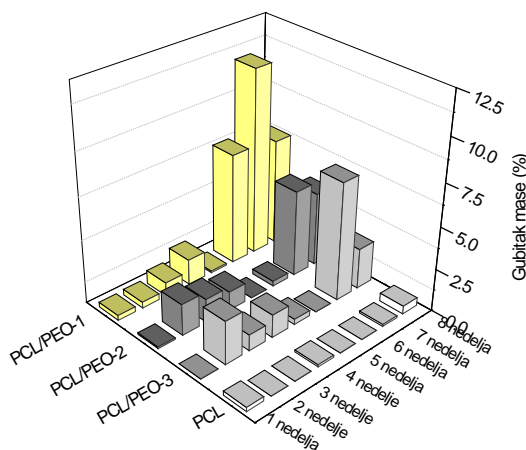
Hidrolitička degradacija dve serije triblok kopolimera sintetisanih u okviru ove studije je praćena promenom mase u određenim vremenskim intervalima tokom osam nedelja (Slika 4.18.). Zbog velike hidrofobnosti, triblok kopolimerni filmovi su izgubili samo nekoliko procenata svoje mase čak i nakon 8 nedelja degradacije. Uzorak PCEC-1, iz serije triblok kopolimera sa dužim PEO segmentom, koji sadrži najveći udeo hidrofilnog PEO pokazao je najveću vrednost gubitka mase u poređenju sa ostalim uzorcima iz serije, 1-2 mas.%, (Slika 4.18.a), ali i u odnosu na najhidrofilniji uzorak iz druge serije triblok kopolimera, sa kraćim PEO blokom. Značajniji gubici masa polimernih uzoraka se mogu detektovati nakon 4 nedelje degradacije, dok se za uzorak homopolimera PCL-a posle 8 nedelja beleži najmanja vrednost gubitka mase (manje od 0,5 mas.%) usled najmanje hidrofilnosti. Iako su dobijene vrednosti gubitka mase za ispitivane uzorke male, manje od 2 mas.%, može se reći da

prisustvo PEO bloka u triblok kopolimernim uzorcima ima za posledicu veće gubitke mase u proseku hidrolitičke degradacije. Druga serija triblok kopolimera, sa PEO molarne mase od 400 g/mol, slično se ponašala tokom hidrolize, pri čemu su gubici masa bili manji u odnosu na prvu seriju triblok kopolimera, nakon osam nedelja manje od 2 mas.% (Slika 4.18.b). Triblok kopolimer sa najvećim udelom PEO, PCEC-4, je izgubio manje od 0,5 mas.% svoje mase tokom hidrolize. Sa Slike 4.18.b bi se moglo reći da triblok kopolimer sa najvećom vrednosti molarne mase i najmanjim udelom PEO, PCEC-6, najviše gubi masu nakon 8 nedelja u fosfatnom puferu, ali kako su u pitanju vrednosti od oko 1 mas.%, može se smatrati da su dobijene vrednosti u granicama greške. Na osnovu testova hidrolitičke degradacije, zaključuje se da su triblok kopolimeri sa malim udelom hidrofilnog PEO segmenta, i sa malom dužinom PEO, veoma otporni na hidrolitičku degradaciju u kraćim vremenskim intervalima, u ovom slučaju 8 nedelja.



Slika 4.18. Gubitak mase serija triblok kopolimera: a) sa dužim PEO (1000 g/mol) segmentom, b) sa PEO (400 g/mol) segmentom tokom 8 nedelja hidrolitičke degradacije.

Ukoliko uporedimo profile gubitka mase diblok kopolimera sa triblok kopolimerima, jasno se uočava da položaj hemijski vezanog PEO segmenta ima važan uticaj na hidrolitičku degradaciju ove vrste polimera. Prisustvo lateralno vezanog PEO bloka dovodi do većeg procenta gubitka mase tokom degradacije, dok se za uzorke kod kojih je hidrofilni segment centralni deo kopolimera, degradacija u vodenoj sredini jedva može detektovati. Profili gubitka mase diblok kopolimera (Slika 4.19.) pokazuju značajne vrednosti gubitka mase nakon 4 nedelje za sva tri blok kopolimera. Tokom prve tri nedelje degradacije, diblok kopolimeri gube oko 2 mas.% svoje mase. Za diblok kopolimer PCL/PEO-1, sa najvećim procentom hidrofilnog PEO segmenta u seriji, beleži se najveći gubitak mase nakon 6 i 7 nedelja (u opsegu od 5 do 11 mas.%), dok diblok kopolimeri sa manjim udelom PEO segmenta (PCL/PEO-2 i PCL/PEO-3) degradiraju u manjem procentu (5-7 mas.%) nakon 7 nedelja.



Slika 4.19. Gubitak mase diblok kopolimera tokom 8 nedelja hidrolitičke degradacije.

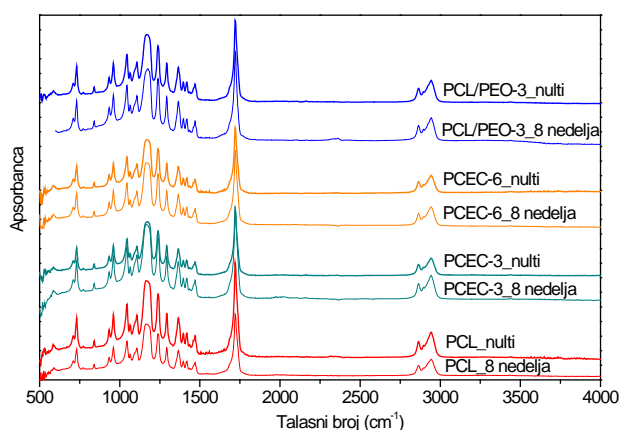
Triblok kopolimeri kod kojih je hidrofilni PEO centralni segment su veoma stabilni tokom 8 nedelja hidrolitičke degradacije i sastav kopolimera, kao i njihova molarna masa nemaju značajniji uticaj na proces degradacije. Ovaj rezultat nije neočekivan ukoliko se uporedi sa podacima iz literature gde su PCL i PCL/PEO blok kopolimeri sa dužim PEO blokom (5000 g/mol) izgubili samo 10 mas.% nakon 110 nedelja degradacije. [154] Rezultati ispitivanja diblok kopolimera pokazuju da isti sastav i molarna masa kopolimera, a različit položaj hidrofilnog dela blok kopolimera mogu biti jedan od načina podešavanja i kontrole hidrolitičke degradacije alifatskih poliestara.

Mehanizam degradacije alifatskih poliestara se odigrava u tri faze: period inkubacije (vezivanje vode), period indukcije (kada vrednost molarne mase opada) i faza erozije polimera (kada se detektuje gubitak mase uzoraka). [162] Da bi proces hidrolize započeo, polimeri prvo moraju apsorbovati vodu pri čemu dolazi do hidratacije polimernih lanaca. Prva faza procesa hidrolize, odnosno procenat apsorpcije vode, a samim tim i hidrolitičke degradacije, zavisi od vrste funkcionalnih grupa koje su prisutne u polimernim lancima. [57] U indukcionom periodu dolazi do nasumičnog raskidanja estarskih veza u polimernim lancima koje su prvenstveno podložne napadu molekula vode tokom ovog procesa. Poslednja faza, faza erozije polimernih uzoraka, najizraženija je kod diblok kopolimera i gubitak mase koji se beleži kod PCL/PEO diblok kopolimera može biti posledica rastvaranja PEO ili delova polimernih lanaca bogatih PEO frakcijom u degradacionom medijumu. [62]

4.11.2. FTIR analiza uzoraka nakon hidrolitičke degradacije

Promene u strukturi triblok i diblok kopolimera do kojih dolazi tokom procesa degradacije su ispitane FTIR spektroskopijom. FTIR spektri PCL-a i odabranih blok

kopolimera nakon 8 nedelja hidrolitičke degradacije su prikazani na Slici 4.20. U IR spektrima blok kopolimera se mogu detektovati samo pikovi koji potiču od PCL; traka na 1100 cm^{-1} koja potiče od PEO etarske vibracije nije vidljiva usled malog sadržaja PEO u blok kopolimerima. Karbonilna grupa iz PCL segmenta daje karakterističnu traku na 1720 cm^{-1} . Intenzivne trake, pored trake na 1720 cm^{-1} koja potiče od vibracija -C=O grupe, na 2943 cm^{-1} i 2864 cm^{-1} koje potiču od simetričnih i asimetričnih vibracija -CH_2 grupa u molekulu PCL-a, jasno se mogu uočiti u snimljenim spektrima. Traka na 1294 cm^{-1} potiče od C-C i C-O valencionih vibracija u kristalnoj fazi polimera PCL, dok se C-C i C-O vibracije iz amornog dela PCL-a nalaze na 1294 cm^{-1} . Identifikovana je i traka na 1239 cm^{-1} koja odgovara asimetričnim -COC vibracijama.



Slika 4.20. FTIR spektri PCL i odabranih triblok i diblok kopolimera nakon osam nedelja hidrolize.

U cilju utvrđivanja strukturnih promena do kojih je došlo tokom osam nedelja hidrolize, izračunate su vrednosti karbonilnog indeksa, CI, i kristalnog indeksa. Vrednost karbonilnog indeksa je računata na osnovu odnosa intenzitet apsorpcionih traka na 1720 cm^{-1} koja potiče od karbonilne grupe i intenziteta pika na 1398 cm^{-1} (-CH_2 vibracije).[81] Odnos intenziteta pikova na 1294 i 1167 cm^{-1} je korišćen za proračun vrednosti kristalnog indeksa.

Promene u vrednostima karbonilnog i kristalnog indeksa polimernih uzoraka nakon 8 nedelja degradacije u fosfatnom puferu su prikazane u Tabeli 4.7. Vrednosti karbonilnog indeksa PCL-a i triblok kopolimera neznatno rastu usled malog gubitka mase, tako da su ove vrednosti bliske vrednostima CI kontrolnih uzoraka (koji nisu podvrgnuti testu degradacije). Vrednosti karbonilnog indeksa za ove uzorke su bili u opsegu od 4,0 do 4,2 što je prosečno za oko 0,2 veće od vrednosti CI uzoraka pre degradacije (3,9 do 4,2), ukazujući da nije došlo do promena u strukturi polimernih uzoraka. Ovi rezultati su bili dodatna potvrda male

sposobnosti degradacije PCL-a, kao i blok kopolimera sa malim procentom gubitka mase, u fiziološkim uslovima tokom osam nedelja. Trend male promene vrednosti kristalnog indeksa zapaža se kod svih uzoraka triblok kopolimera nakon osam nedelja hidrolize, pri čemu dolazi do njegovog opadanja u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Uprkos malom procentu gubitka mase i maloj promeni vrednosti karbonilnog indeksa, promene vrednosti kristalnog indeksa ipak ukazuju da postoje određene strukturne promene u polimerima tokom degradacije, naročito kod uzorka PCL-a i PCEC-4 kod kojih vrednosti kristalnog indeksa značajno opadaju (PCL: sa 58 na 55 %; PCEC-4: sa 57 na 54 %).

Tabela 4.7. Gubitak mase, vrednosti karbonilnog (CI) i kristalnog indeksa (na osnovu FTIR analize) posle 8 nedelja hidrolitičke degradacije polimernih uzoraka.

Polimer	w_{PEO} , wt %	Gubitak mase (%)	CI ^{a,b}	Kristalni indeks ^c (%)
PCL	2,3	0,5±0,7	4,1 (3,9)	55 (58)
PCEC-1	3,8	0,87±1,2	4,0 (4,2)	57 (57)
PCEC-2	2,1	0,8±0,8	4,2 (4,0)	57 (60)
PCEC-3	3,3	0,6±0,1	4,2 (4,0)	56 (58)
PCEC-4	1,7	0,5±0,4	4,2 (4,1)	54 (57)
PCEC-5	1,3	0,4±0,5	4,2 (4,0)	54 (56)
PCEC-6	1,2	1,1±0,7	4,2 (3,9)	54 (55)
PCL/PEO-1	4,1	6,3±3,0	3,4 (4,0)	64 (60)
PCL/PEO-2	2,9	4,4±2,3	3,6 (4,1)	63 (57)
PCL/PEO-3	3,2	2,4±0,1	3,9 (3,9)	62 (58)

^a na osnovu odnosa intenziteta pikova na 1720 i 1398 cm^{-1}

^b u zagradi su date vrednosti kontrolnih uzoraka

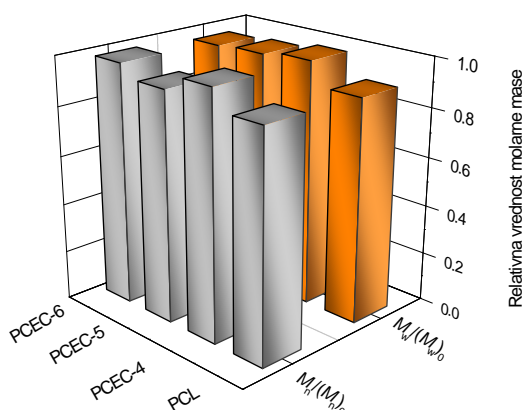
^c na osnovu odnosa intenziteta pikova na 1294 i 1167 cm^{-1}

Parametri izračunati na osnovu FTIR spektara diblok kopolimera su ukazali na njihovo drugačije ponašanje; vrednosti CI diblok kopolimera nakon degradacije opadaju, dok kod triblok kopolimera rastu. Takođe, kod triblok kopolimera se beleži smanjenje vrednosti kristalnog indeksa tokom degradacije, a kod diblok kopolimera porast ove vrednosti. Ovakav trend je dodatna potvrda različitog ponašanja diblok i triblok kopolimera tokom degradacije uzrokovan različitim položajem hidrofilnog PEO segmenta u kopolimerima i sposobnosti kristalizacije blok kopolimera tokom procesa degradacije. [163] Povećanje vrednosti kristalnog indeksa se objašnjava dominantnom razgradnjom amorfne faze diblok kopolimera (a samim tim povećanjem udela kristalne faze koja je manje podložna hidrolizi) od strane molekula vode koja je dostupnija usled lateralnog položaja amorfno PEO bloka.

Vrednosti kristalnog indeksa kontrolnih uzoraka su veoma slične za sve ispitivane polimere i bile su u opsegu od 55 do 60 %. Usled malog sadržaja PEO bloka kao unutrašnjeg segmenta u triblok kopolimerima, ovi uzorci su pokazali veoma slično ponašanje kao homopolimer PCL u degradacionom medijumu. Prisustvo PEO bloka kao lateralnog segmenta diblok kopolimera za posledicu je imalo povećanje vrednosti kristalnog indeksa usled degradacije amorfne faze koja prvenstveno biva napadnuta.

4.11.3. GPC analiza PCL i triblok kopolimera nakon hidrolitičke degradacije

Mali gubici mase potvrđeni gravimetrijskom analizom nisu mogli dati precizan uvid u mehanizam hidrolitičke degradacije blok kopolimera. GPC analizom serije triblok kopolimera sa kraćim PEO (400 g/mol) blokom nakon osam nedelja degradacije je utvrđeno da pored malog gubitka mase, dolazi i do redukcije molarne mase (Slika 4.21.) što je u skladu sa rezultatima dobijenim za PCL nakon abiotske hidrolize. [68] Vrednosti relativne molarne mase srednje po brojnoj i masenoj zastupljenosti, $M_n/(M_n)_0$ i $M_w/(M_w)_0$, redom, su prikazane na Slici 4.21. Vrednost molarne mase srednje po brojnoj zastupljenosti za uzorak PCL-a opada za 8,9 % a vrednost molarne mase srednje po masenoj zastupljenosti opada za 9,9 %. Uzorak PCEC-5 je pokazao značajno smanjenje u vrednostima M_n i M_w , od 9,9 i 2,6 %, redom. Sa druge strane, iako je na osnovu sastava kopolimera, uzorak PCEC-4 najhidrofilniji, smanjenje vrednosti molarnih masa je bilo veoma malo (0,8 i 0,4, redom) pa se može reći da su molarne mase ostale skoro nepromenjene nakon hidrolize, dok je za polimer PCEC-6 dobijeno smanjenje ovih vrednosti, M_n za 1,3 % i M_w za 2,6 %.



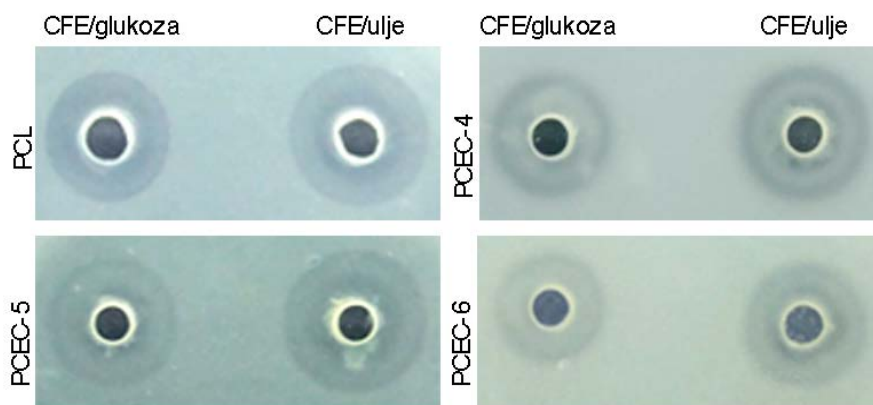
Slika 4.21. Promena u vrednosti molarne mase srednje po brojnoj ($M_n/(M_n)_0$) i masenoj zastupljenosti ($M_w/(M_w)_0$) serije triblok kopolimera sa kraćim PEO (400 g/mol) segmentom nakon osam nedelja hidrolitičke degradacije.

Male vrednosti gubitka mase ukazuju da se tokom osam nedelja ispitivanja hidrolitičke degradacije ovaj proces ne dešava dominantno mehanizmom erozije polimera, već da dolazi do nasumičnog raskidanja estarske veze u lancima PCL-a (mehanizam degradacije u masi) što za posledicu ima smanjenje molarne mase. [62] Proces degradacije se dominantno dešava u amorfnim regionima polimera u kojem su hidrolizabilne estarske veze dostupnije napadima molekula vode. Kada u procesu degradacije dolazi do gubitka PEO segmenta i oligomernih frakcija rastvornih u vodi, detektuje se gubitak mase. Na osnovu rezultata hidrolize serije triblok kopolimera, sa veoma malim sadržajem hidrofilnog i u vodi rastvornog PEO, se može zaključiti da mali gubici masa i značajniji gubici molarne mase uzoraka ukazuju na mehanizam degradacije u masi i nasumično kidanje polimernih lanaca na segmente koji su nerastvorni u vodi.

4.11.4. Enzimaska degradacija sintetisanih polimera

Eksperimenti ispitivanja enzimske degradacije PCL i blok kopolimera su po prvi put izvođeni u fosfatnom puferu (pH 7,4) koji je sadržao ćelijski ekstrakt ("cell-free extract") u kojem su bili prisutni *P. aeruginosa* PAO1 enzimi. Ispitivanja su rađena na 37 °C tokom četiri nedelje.

Pre samih oglada ispitivanja enzimske degradacije polimernih uzoraka, ispitana je sposobnost enzima prisutnih u ćelijskom ekstraktu da degradiraju uzorke PCL-a i kopolimera. U tu svrhu, polimeri su rastvoreni u hloformu i u obliku rastvora prebačeni u polu-čvrsti agar medijum, gde su formirali odgovarajuću 3D strukturu. Zone koje se formiraju oko bunara na agar šoljama potvrda su enzimske degradacije ove vrste polimera za ispitivani sistem (Slika 4.22.).



Slika 4.22. Rezultati testova na agar šoljama za seriju triblok kopolimera sa kraćim PEO (400 g/mol) blokom. CFE = "cell free extract" dobijen iz kulture gajene na ulju ili glukozi.

Sposobnost enzima prisutnih u ćelijskom ekstraktu da degradiraju polimerne uzorke suspendovane u agar medijumu kvantifikovana je merenjem prečnika formiranih zona, a trend ispitanih uzoraka je bio sledeći PCEC-5 > PCEC-4 > PCL ≥ PCEC-6. Postoji razlika u prečniku formiranih zona u zavisnosti da li je kao izvor ugljenika za rast bakterija korišćena glukoza ili ulje (Tabela 4.8.). Kao što je bilo i očekivano, veća koncentracija esteraza je postignuta upotrebom ulja kao supstrata tako da su ispitani uzorci PCL i triblok kopolimera više degradirali u prisustvu ćelijskog ekstrakta (CFE) pripremljenog na ovaj način. Ipak, kako je i u slučaju korišćenja ulja i glukoze došlo do degradacije uzoraka, vrsta korišćenog supstrata nema uticaja na sposobnost degradacije ove vrste enzima na ispitanu vrstu polimera, već na jačinu ekspresije lipaza/esteraza u ovom bakterijskom soju.

Tabela 4.8. Degradacione zone (prečnik, mm) kada je 100 µl ćelijskog ekstrakta (CFE) koji sadrži *P. aeruginosa* PAO1 uzgajanu u MSM medijumu koji sadrži glukoza i ulje kao izvor ugljenika, tokom 72 h na 30 °C, ubačen u bunare agar medijuma koji sadrži odgovarajuće polimere.

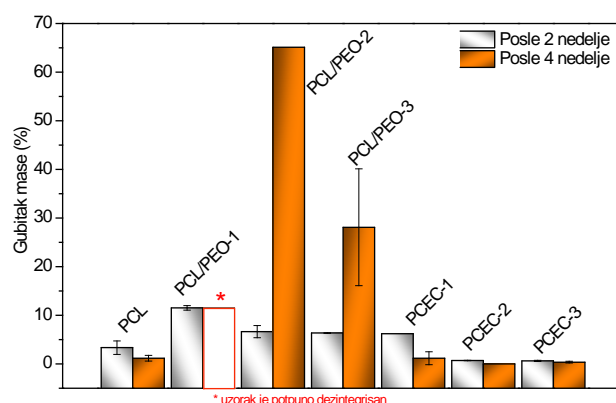
Polimer	PCL	PCEC-4	PCEC-5	PCEC-6
CFE/glukoza ^a	5	5,5	6,5	4
CFE/ulje ^b	6,5	6,5	7,5	5

^a Enzimska aktivnost 250 nmol proizvoda računato na 1 mg ukupnih proteina

^b Enzimska aktivnost 350 nmol proizvoda računato na 1 mg ukupnih proteina

Gravimetrijska analiza kontrolnih uzoraka serije triblok i diblok kopolimera sličnog sastava a različite arhitekture je pokazala zanemarljive vrednosti gubitka mase na osnovu čega se može isključiti proces hidrolitičke degradacije ili solubilizacije degradiranih uzoraka nakon dve i četiri nedelje ispitivanja. Gubitak mase polimernih filmova je bio mnogo veći u poređenju sa gubicima mase nakon hidrolize što je posledica enzimske aktivnosti tokom procesa degradacije u prisustvu ćelijskog ekstrakta (Slika 4.23.). Homopolimer, PCL, je poznat kao polimer koji sporo degradira, [81, 164] stoga su izmerene vrednosti gubitka mase od 3 mas.% nakon dve nedelje degradacije u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima. Razlika u degradacionom ponašanju između diblok i triblok kopolimera je prikazana na Slici 4.19. Na procenat gubitka mase tokom procesa degradacije utiče položaj hidrofilnog PEO segmenta, ali i sastav i dužina PCL blokova u polimernim lancima. Diblok kopolimer sa najvećim udelom PEO (PCL/PEO-1) gubi najveći procenat svoje mase (oko 12 mas.%) nakon dve nedelje degradacije, a potpuno je dezintegrisan nakon 4 nedelje. Ovakav rezultat se objašnjava većom hidrofilnošću i manjom molarnom masom u poređenju sa ostalim diblok kopolimerima iz serije. Gubici mase PCL/PEO-2 i PCL/PEO-3 uzoraka (oko 6 mas.% nakon

dve nedelje, i 65 i 36 mas.% nakon četiri nedelje, redom) ukazuju da se sa porastom molarne mase PCL segmenata, proces enzimske degradacije odigrava manjim intenzitetom. Sličan trend koji je uočen za seriju diblok kopolimera, utvrđen je i za seriju triblok kopolimera degradiranu u prisustvu enzima. Uzorak sa najvećim udelom PEO bloka u seriji triblok kopolimera je izgubio najveći procenat svoje mase, 3 do 6 mas.%, dok se proces degradacije za druga dva uzorka iz serije u maloj meri odigrao. Gravimetrijska analiza je pokazala da se kopolimeri sličnog sastava i molarne mase, a različitog položaja PEO segmenta potpuno drugačije ponašaju tokom procesa enzimske degradacije. Takođe, iako je mali sadržaj PEO bloka u blok kopolimerima, detektovane su značajne razlike i promene u masi uzoraka. Eksperiment je pokazao veću sposobnost degradacije diblok kopolimera u odnosu na triblok kopolimere sličnog sastava, iako su u literaturi opisani suprotni rezultati. [75]



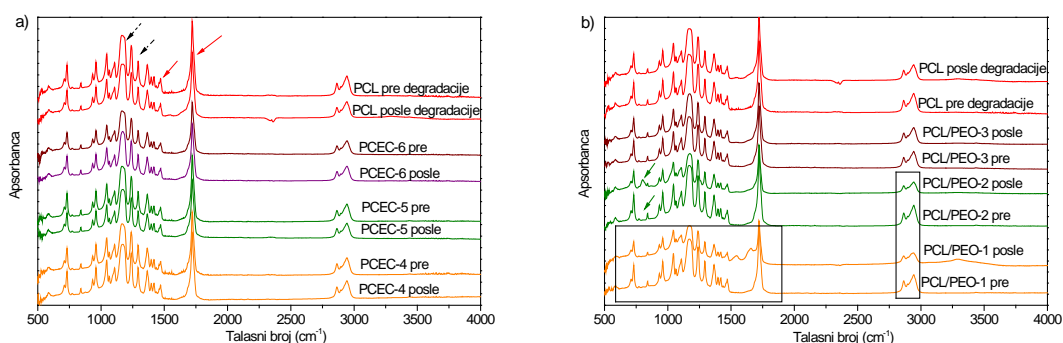
Slika 4.23. Gubici mase PCL-a, diblok i triblok kopolimera nakon dve i četiri nedelje enzimske degradacije.

Nasuprot malim gubicima mase nakon hidrolitičke degradacije, serija triblok kopolimera sa PEO segmentom (400 g/mol) je pokazala veće gubitke mase nakon dve nedelje degradacije u prisustvu ćelijskom ekstraktu, tj. u prisustvu enzima *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 4.9.). Gravimetrijska analiza polimernih uzoraka koji su bili izloženi dejstvu enzima u vodenom medijumu dala je najveću vrednost gubitka mase (11,2 mas.%) za kopolimer sa najvećim sadržajem PEO segmenta u seriji, PCEC-4. Velika vrednost gubitka mase je posledica najmanje vrednosti molarne mase triblok kopolimera kao jednog od faktora koji najviše utiču na degradacionu sposobnost polimera. Sa druge strane, poznato je da tokom procesa degradacije enzimi prvenstveno napadaju amorfne oblasti polimernog uzorka, tako da dodatno objašnjenje dobijenih rezultata može biti prisustvo PEO segmenta kao amorfne faze u najvećem procentu u ovom kopolimeru. Nakon dvonedeljnog izlaganja dejstvu

enzima, uzorci PCEC-5 i PCEC-6 su izgubili oko 5 mas.% što je manji gubitak u poređenju sa PCEC-4.

4.11.5. FTIR analiza polimera nakon enzimske degradacije

Nakon većih promena u vrednosti mase izmerenih posle enzimske degradacije, očekivane su i promene u kristalnoj strukturi polimernih filmova. Promene u vrednosti karbonilnog i kristalnog indeksa nakon dve nedelje enzimske degradacije su utvrđene FTIR analizom na uzorcima serije triblok kopolimera sa kraćim PEO segmentom i seriji diblok kopolimera. Snimljeni spektri nedegradiranih i degradiranih uzoraka su prikazani na Slici 4.20.



Slika 4.24. FTIR spektri: a) triblok kopolimera sa PEO 400 g/mol i b) diblok kopolimera nakon dve nedelje enzimske degradacije.

FTIR analiza serije ispitivanih triblok kopolimera potvrdila je promene u strukturi uzoraka nastale kao posledica enzimske aktivnosti. Smanjenje vrednosti karbonilnog indeksa je detektovano kod svih uzoraka iz triblok kopolimerne serije (Tabela 4.9.), pri čemu je najveća promena u CI vrednosti izračunata za polimer PCEC-4 (smanjenje sa 4,5 na 3,7) koji je ujedno izgubio najveći procenat svoje mase, 11,2 %. Sa smanjenjem intenziteta degradacije, odnosno sa manjim gubicima mase, vrednosti karbonilnog indeksa se nisu značajnije promenile. Dodatan dokaz promena u strukturi degradiranih uzoraka jeste promena vrednosti kristalnog indeksa i trend smanjenja njegove vrednosti kod svih uzoraka nakon enzimske degradacije. Očekivano, najveća promena vrednosti je izmerena za uzorak sa najvećim procentom gubitka mase u seriji, PCEC-4 (sa 57 na 51 %).

Promene u strukturi triblok kopolimera uočene su nakon određivanja vrednosti intenziteta karakterističnih pikova, dok se iz FTIR spektra diblok kopolimera (Slika 4.24.b) strukturne promene vide i na osnovu izgleda krivih. Tako FTIR spektralna kriva uzorka koji gubi 11,8 mas.% pokazuje vidljivo smanjenje intenziteta pikova, a dolazi i do pojave cepanja pikova (pik na 1720 cm^{-1}). Uzorak iz serije triblok kopolimera sa gubitkom mase od 11,2

mas.% pokazuje promene u vrednostima kristalnog i karbonilnog indeksa ali izgled FTIR spektra (Slika 4.24.a) je isti kao spektar kontrolnog uzorka. Ovo je dodatna potvrda različitog ponašanja blok kopolimera tokom degradacije uslovljena položajem hidrofilnog, amornog PEO segmenta.

Tabela 4.9. Gubitak mase, CI, kristalni indeks i vrednost PI serije triblok kopolimera sa kraćim PEO segmentom i serije diblok kopolimera nakon dve nedelje enzimske degradacije.

Sample	Gubitak mase, %	CI ^{a, b}	Kristalni indeks ^c	PI ^{b, d}
PCL	4,3	4,0 (3,9)	58 (58)	1,98 (1,92)
PCEC-4	11,2	3,7(4,5)	51(57)	1,52 (1,50)
PCEC-5	5,7	4,4 (4,3)	55 (56)	1,76 (1,60)
PCEC-6	5,5	4,2 (4,5)	51 (55)	1,58 (1,61)
PCL/PEO-1	11,8	2,2 (4,0)	70 (60)	2,00 (1,85)
PCL/PEO-2	5,8	3,9 (4,1)	58 (57)	1,96 (1,70)
PCL/PEO-3	6,4	3,3 (3,9)	61 (58)	2,00 (2,02)

^a na osnovu odnosa intenziteta pikova na 1720 i 1470 cm^{-1}

^b u zagradi su date vrednosti nedegradiranih uzoraka

^c na osnovu odnosa intenziteta pikova na 1294 i 1167 cm^{-1}

^d nakon dve nedelje enzimske degradacije

Drugačiji izgled spektara i različita vrednost intenziteta karakterističnih pikova su se odrazili i na vrednosti karbonilnog i kristalnog indeksa.[165] Najznačajnije promene u vrednosti karbonilnog indeksa su izmerene za diblok kopolimer sa najvećom vrednosti gubitka mase, PCL/PEO-1 (gubitak mase 11,8 mas.%, promena CI sa 4,0 na 2,2), dok sa smanjenjem procenta gubitka mase, promene u vrednosti karbonilnog indeksa bivaju sve manje. Takođe, vrednost karbonilnog indeksa za ovaj uzorak se smanjila sa 60 na 70 % nakon enzimske degradacije. Povećanje vrednosti kristalnog indeksa je bilo očekivano ukoliko se uzme u obzir da se proces degradacije dominantno odigrava u amornom delu polimernog uzorka, te nakon degradacije ostaje najmanje degradirana kristalna faza polimera.

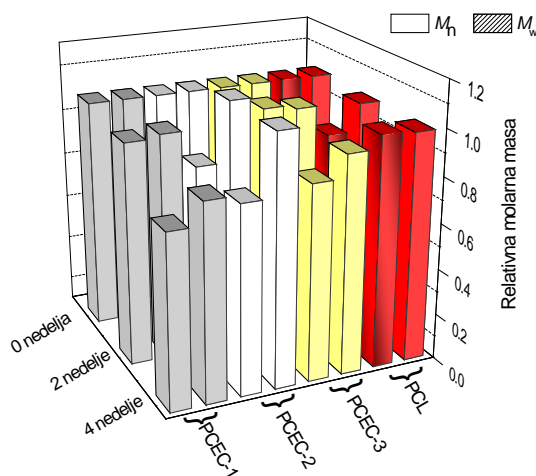
U poređenju sa PCL homopolimerom koji je pokazao male, skoro nepromenjene vrednosti CI i kristalnog indeksa, FTIR analizom je potvrđeno da se sa velikim procentima gubitka mase dešavaju i strukturne promene u blok kopolimerima i da su one izraženije ukoliko je gubitak mase veći, odnosno proces degradacije intenzivniji.

4.11.6. GPC analiza polimera nakon enzimske degradacije

Analiziranje uzoraka GPC analizom nakon enzimske degradacije je imalo za cilj da se na osnovu promena vrednosti molarne mase utvrdi mehanizam degradacije PCL-a i blok

kopolimera. Promena molarne mase serije triblok kopolimera sa PEO segmentom (M_n 1000 g/mol) i serije diblok kopolimera je određena nakon dve i četiri nedelje, dok je za seriju triblok kopolimera sa hidrofilnim PEO blokom od 400 g/mol ispitana promena molarne mase nakon dve nedelje enzimske degradacije.

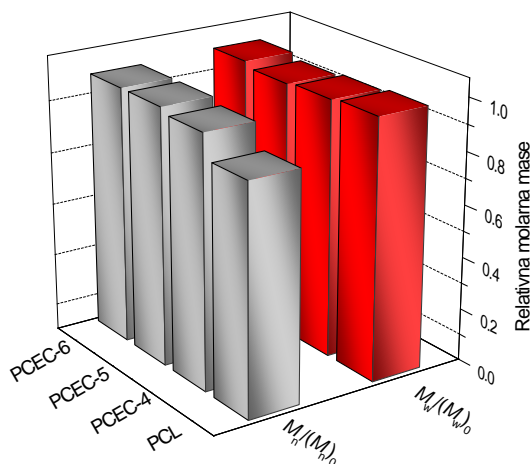
Ispitani su degradirani i nedegradirani uzorci polimera, a promene vrednosti molarne mase su predstavljene kao relativna vrednost molarne mase srednje po brojnoj zastupljenosti $M_n/(M_n)_o$ i relativna vrednost molarne mase srednje po masenoj zastupljenosti $M_w/(M_w)_o$ nakon dve i četiri nedelje, kao i vrednosti indeksa polidisperznosti, PI (M_w/M_n). Utvrđeno je smanjenje relativne vrednosti molarnih masa $M_n/(M_n)_o$ i $M_w/(M_w)_o$ sa vremenom, za sve ispitane kopolimere. Promena molarne mase homopolimera PCL je bila najmanja u poređenju sa ostalim uzorcima, što je bilo i očekivano jer se PCL pokazao kao najrezistentniji ka enzimskoj degradaciji (Slika 4.25.). GPC rezultati PCL-a su pokazali smanjenje vrednosti M_n za 13,1 % i M_w za oko 10,4 %, dok je vrednost indeksa polidisperznosti, PI, neznatno porasla sa 1,92 na 1,98, nakon dve nedelje degradacije (Tabela 4.9.). Nakon dve nedelje degradacije, kod triblok kopolimera PCEC-2 je detektovano značajno smanjenje u vrednostima M_n i M_w od 18,3 i 10,1 %, redom, dok je relativna vrednost molarne mase uzorka PCEC-3 ostala skoro nepromenjena. Nakon četiri nedelje degradacije, kod triblok kopolimera PCEC-1 se beleži veliko smanjenje u vrednosti kako M_n (oko 25,1 %) tako i M_w (15,4 %). Relativna vrednost molarne mase srednje po brojnoj zastupljenosti polimera PCEC-2 i PCEC-3 je opala za 19 %, odnosno 15,5 %, a vrednosti M_w su ostale nepromenjene.



Slika 4.25. Relativna vrednost molarne mase srednje po brojnoj $M_n/(M_n)_o$ i masenoj zastupljenosti $M_w/(M_w)_o$ za seriju triblok kopolimera sa PEO blokom (1000 g/mol), posle dve i četiri nedelje enzimske degradacije.

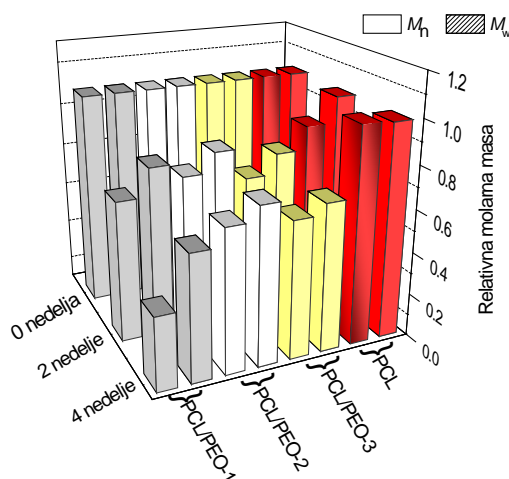
Promene u vrednosti molarne mase serije triblok kopolimera sa PEO segmentom (400 g/mol) je praćena nakon dve nedelje i rezultati su prikazani na Slici 4.26. GPC krive su

pokazale unimodalnu raspodelu ali je došlo do smanjenja vrednosti molarnih masa. Tako, za uzorak koji je najviše degradiran na osnovu vrednosti gubitka mase, PCEC-4, smanjenje molarne mase srednje po brojnoj zastupljenosti je bilo oko 4,0 %, a beleži se i promena vrednosti indeksa polidisperznosti (PI sa 1,62 na 1,60, Tabela 4.9.). Za uzorke PCEC-5 i PCEC-6, promene vrednosti M_n su bile manje, 2,3 % i 2,4 %, redom, dok su vrednosti njihovih PI porasle (sa 1,58 na 1,61 za PCEC-5 i sa 1,64 na 1,67 za PCEC-6).



Slika 4.26. Relativna vrednost molarne mase srednje po brojnoj $M_n/(M_n)_0$ i masenoj zastupljenosti $M_w/(M_w)_0$ za seriju triblok kopolimera sa kraćim PEO blokom, posle dve nedelje enzimske degradacije.

Sa druge strane, pomoću GPC analize serije diblok kopolimera za koju je na osnovu gravimetrijske analize utvrđeno da najviše podleže procesu enzimske degradacije u odnosu na triblok kopolimere i PCL, je izmerena najveća promena u vrednosti molarne mase (Slika 4.27.). Uzorak PCL/PEO-1, koji gubi najveći procenat svoje mase, nakon dve nedelje enzimske degradacije je pokazao veliko smanjenje molarne mase, i to M_n za 34,5 % i M_w za 21,5 %, kao i širenje raspodele molarnih masa, PI vrednost je porasla sa 1,67 na 1,97 (Tabela 4.9.). Nakon četiri nedelje degradacije, uzorak PCL/PEO-1 je bio fragmentiran, a degradacija je nastavila da se odigrava na šta jasno ukazuje dalje smanjenje vrednosti M_n od 66 % i M_w od 42 %. Diblok kopolimer PCL/PEO-2 je u velikoj meri pokazao smanjenje vrednosti molarne mase, M_n za 30,6 % i M_w za 19,9 %, kao i porast indeksa polidisperznosti sa 1,70 na 1,96. Drastične promene vrednosti indeksa polidisperznosti diblok kopolimera, odnosno širenje raspodele molarnih masa, su rezultat većeg smanjenja vrednosti M_n u odnosu na M_w .



Slika 4.27. Relativna vrednost molarne mase srednje po brojnoj $M_n/(M_n)_0$ i masenoj zastupljenosti $M_w/(M_w)_0$ za seriju diblok kopolimera, posle dve i četiri nedelje enzimske degradacije.

Na osnovu diskusije rezultata GPC analize se može zaključiti da dolazi do većeg smanjenja vrednosti molarne mase srednje po brojnoj zastupljenosti, M_n , što ukazuje na porast broja frakcija polimernih lanaca sa manjom molarnom masom u odnosu na kontrolni uzorak koji nije izlagan dejstvu enzima. [87, 166] Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa činjenicom da se proces degradacije PCL odigrava sa krajeva polimernih lanaca [166], nakon čega može uslediti proces hidrolize katalizovan završnim hidroksilnim grupama. Ova faza hidrolize se može odigrati kroz nasumično kidanje polimernih lanaca ili depolimerizacijom ("unzipping" mehanizmom) sa krajeva lanaca. Uprkos smanjenju vrednosti molarnih masa koji ukazuju na mehanizam degradacije iz mase, glavni mehanizam degradacije blok kopolimera na bazi PCL-a je površinska degradacija (erozija polimera), što će u nastavku biti dokazano na osnovu ispitivanja morfologije površine degradiranih polimernih filmova. Na osnovu dosadašnjih analiza, može se reći da prisustvo hidrofilnog PEO segmenta u blok kopolimerima, iako u maloj meri, povećava hidrofilnost sintetisanih polimera, što je dovoljno da poveća sposobnost degradacije u prisustvu enzima, a smanjenje vrednosti molarne mase degradiranih uzoraka su upravo to potvrdili. Veća sposobnost degradacije diblok kopolimera može se pripisati lateralnom položaju hidrofilnog, amornog PEO segmenta čime je omogućen bolji prilaz i kontakt enzim - polimer. Takođe, mogućnost i intenzitet degradacije je uslovljen kako arhitekturom blok kopolimera (konfiguracijom), tako i sastavom i molarnom masom ispitivanih uzoraka.

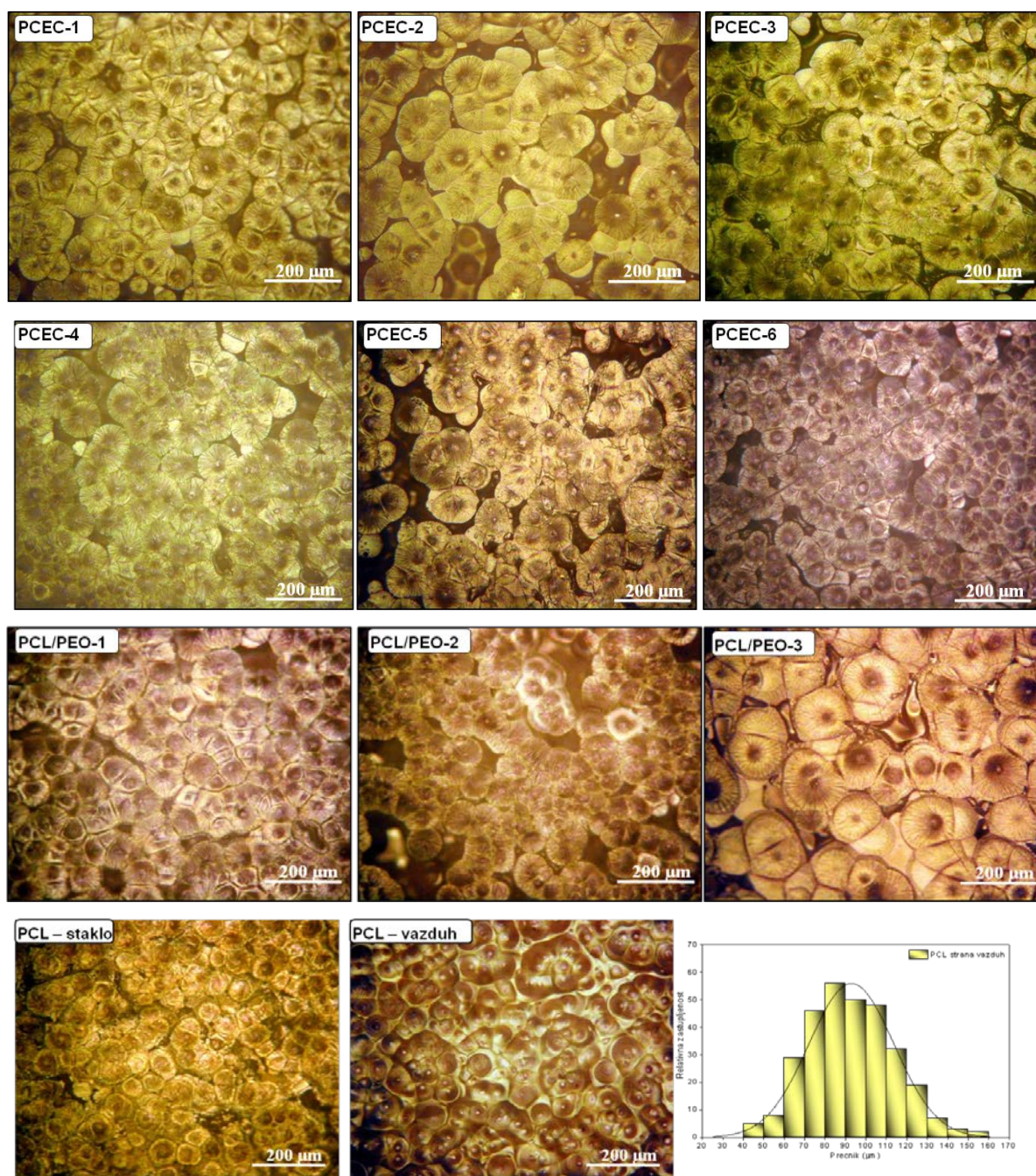
4.12. Morfologija površine sintetisanih polimera pre i posle enzimske degradacije

Poznato je da se proces enzimske degradacije alifatskih poliestara odigrava mehanizmom površinske erozije, stoga metode optička mikroskopija, OM, i mikroskopija atomskih sila, AFM, predstavljaju jednostavne i korisne tehnike za ispitivanje promena u morfologiji površine polimernih filmova podvrgnutih enzimskoj degradaciji.

4.12.1. Optička mikroskopija nedegradiranih polimernih filmova

Pre izlaganja polimernih filmova dejstvu enzima, snimljeni su optički mikrografi sintetisanih blok kopolimernih filmova kako bi se ispitao uticaj strukture, sastava i molarne mase polimera na kristalizaciju i morfologiju površina filmova. Mikrografi dobijeni optičkom mikroskopijom (Slika 4.28.) su dalje analizirani u programu Image J u cilju procene veličine kristališućih sferulita i njihove raspodele veličina. Optička mikroskopija PCL-a i diblok i triblok kopolimera je potvrdila da ovi polimera kristališu u formi sferulita kao i veliku razliku u veličini sferulita i njihovoj raspodeli između uzoraka. Kako PEO male molarne mase, 1000 g/mol i manje ne može da kristališe, kristalizacija blok kopolimera potiče od PCL segmenata. Proces kristalizacije svih polimera započinje iz centralnog dela, nukleacionih mesta i nastavlja se radijalnim rastom lamela rezultujući formiranjem sferulita. Kako bi se isključio uticaj temperature isparavanja rastvarača prilikom pravljenja polimernih filmova, uticaj koncentracije polimera i vrsta korišćenog rastvarača na kristalizaciono ponašanje polimera, [167] svi uzorci su pripremljeni na isti način: iz rasvora hloroforma koncentracije 6 mas.%, na konstantnoj temperaturi. Stoga su razlike u prečniku sferulita triblok i diblok kopolimernih filmova posledica različitog sastava i molarne mase uzoraka, odnosno prisustva PEO segmenta i dužine PCL lanaca. Vrednosti prečnika sferulita, merenih na više od 200 pojedinačnih sferulita, i vrednosti standardne devijacije su prikazane u Tabeli 4.10. Srednja vrednost prečnika sferulita homopolimera PCL je iznosila 100 μm , dok su vrednosti prečnika sferulita uzoraka triblok i diblok kopolimera bile veće ukazujući na uticaj prisustva mekog PEO segmenta u blok kopolimerima na proces kristalizacije. Uvođenjem PEO molarne mase 1000 g/mol u lance PCL-a (prva serija triblok kopolimera), vrednost prečnika sferulita je značajno porasla u odnosu na PCL, stoga se prečnik sferulita serije triblok kopolimera kreće u intervalu od 130 do 160 μm . Sa druge strane, prisustvo mekog PEO segmenta od 400 g/mol izazvalo je povećanje prečnika sferulita uzoraka PCEC-4 i PCEC-5, i njihove vrednosti su bile veoma slične, 135 μm , odnosno 130 μm . Izuzetak je triblok kopolimer PCEC-6 sa vrednošću prečnika sferulita od 70 μm što se može pripisati veoma malom sadržaju PEO i dominantnom prisustvu PCL segmenata. U seriji diblok kopolimera, sa porastom udela PCL

segmenata, a time i porastom vrednosti molarne mase uzoraka, prečnik kristališućih sferulita raste, i najveću vrednost ima uzorak PCL/PEO-3. Trend porasta prečnika sferulita u seriji diblok kopolimera prati porast vrednosti stepena kristaliničnosti unutar serije, ali i značajniji uticaj povećanja molarne mase kada je PEO segment lateralno vezan. Uočava se i velika polidisperznost vrednosti prečnika sferulita za PCL/PEO-3 diblok kopolimer, za koju je vrednost standardne devijacije iznosila 56 μm što je veće u poređenju sa devijacijama ostalih polimera koje su varirale od 21 do 30 μm .



Slika 4.28. Optički mikrofotografije homopolimera PCL i sintetisanih blok kopolimera (U = 100 puta).

Važno je napomenuti da sintetisani polimeri poseduju različitu morfologiju površine filmova u zavisnosti da li su tokom procesa kristalizacije bili izloženi vazduhu ili okrenuti ka staklu (Petri šolja) kao što je prikazano na Slici 4.28., poslednje dve fotografije. Donja strana, okrenuta ka staklu tokom isparavanja rastvarača pokazuje vidljive sferulite sa jasnim granicama, dok se na gornjoj strani okrenutoj ka vazduhu sferuliti vide u formi kupica, 3D struktura sferulita. Različit način kristalisanja i različita morfologija površine PCL-a su već objašnjene u literaturi. [74, 75] Sferuliti prilikom rasta i stvaranja lamela ograničavaju jedni druge, pa je površina PCL i blok kopolimernih filmova uglavnom kompaktna uz prisustvo nekoliko šupljina.

Tabela 4.10. Rezultati optičke mikroskopije (prečnik sferulita) i AFM-a (prečnik sferulita i hrapavost površine filmova, RMS) PCL i blok kopolimera.

Uzorak	RMS, nm staklo ^a	RMS, nm vazduh ^a	Prečnik, μm^a	Prečnik, μm^b
PCL	350	270	100	100±21
PCEC-1	250	100	140	130 ±26
PCEC-2	315	180	160	160±29
PCEC-3	320	240	100	130±25
PCEC-4	190	150	120	135±18
PCEC-5	280	250	130-140	130±22
PCEC-6	300	150	40-60	70±26
PCL/PEO-1	240	190	100	100±30
PCL/PEO-2	310	150	120	120±29
PCL/PEO-3	220	190	190	190±54

^a na osnovu AFM analize

^b na osnovu optičke mikroskopije

Pored procene veličina sferulita, određena je i raspodela njihovih prečnika i histogram raspodele za homopolimer PCL je reprezentativno prikazan na Slici 4.28. dok su ostali histogrami prikazani u Prilogu. Raspodela veličine sferulita za sve uzorke je bila unimodalna, a širina raspodele je posledica različitih dimenzija sferulita, tj. njihova neuniformna veličina.

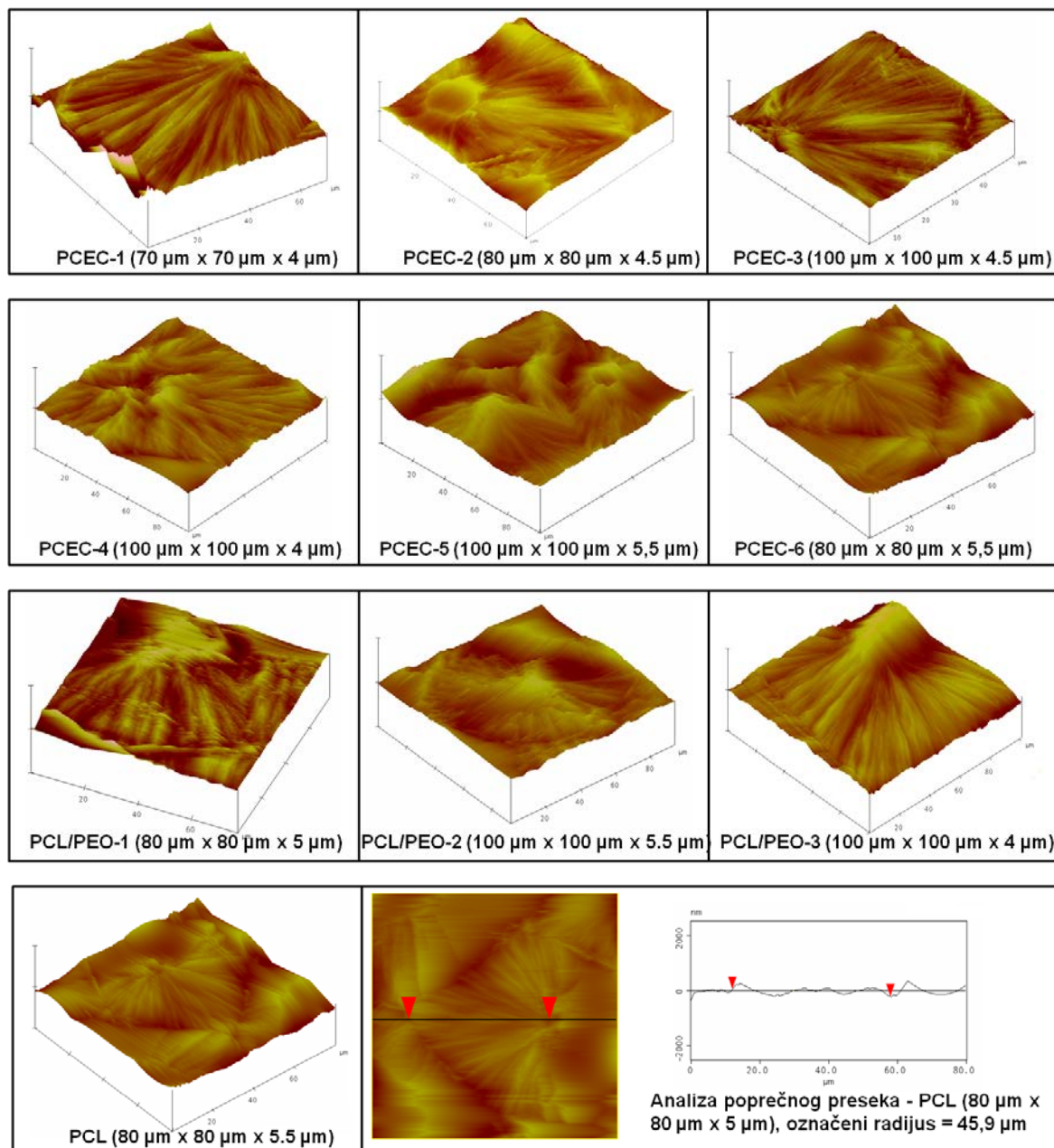
Optička mikroskopija je potvrdila da se podešavanjem strukture, sastava ali i arhitekture PCL blok kopolimera može uticati na morfologiju površine polimernih filmova, kao i da prisustvo mekog PEO segmenta u malom procentu dovodi do uočljivih promena u morfologiji.

4.12.2. AFM analiza nedegradiranih polimernih filmova

Dodatne informacije o morfologiji površine polimernih filmova su dobijene na osnovu AFM analize. Pored uvida u veličinu sferulita, izračunavanjem vrednosti hrapavosti površine

(RMS), omogućena je kvantifikacija promena u morfologiji polimernih filmova. 3D AFM slike PCL-a i triblok i diblok kopolimera su prikazani na Slici 4.29.

Morfologija površina PCL i blok kopolimernih filmova je bila u saglasnosti sa rezultatima optičke mikroskopije i potvrđeno je prisustvo sferulita. Takođe, lamelaran rast sferulita od centara nukleacije i ograničavanje njihovog rasta susednim sferulitom može se preciznije videti na AFM mikrografima. Sa porastom veličine sferulita, raste i dužina lamela što je uslovljeno porastom sadržaja PCL segmenata u blok kopolimerima. Svetlije oblasti na fotografijama su centri nukleacije, tj. centri sferulita, a ujedno predstavljaju i najviši deo kopolimernog filma. Na osnovu izmerenih vrednosti hrapavosti površina, RMS, prikazanih u Tabeli 4.10. najveću hrapavost površine ima homopolimer PCL, dok sa porastom udela PEO segmenta u kopolimerima, vrednost RMS opada. Hrapavost površine blok kopolimernih filmova zavisi od njihovog sastava i povećanje sadržaja hidrofilnog PEO segmenta čini površinu polimernih filmova glatkom. [168] Iako su Wurth i saradnici [168] došli do zaključka da uvođenjem mekog PEO bloka u lance PCL-a ne dolazi do velikog smanjenja hrapavosti površine polimernih filmova, razlike u RMS vrednostima ispitanih triblok i diblok kopolimera su iznosile oko 100 nm. Na osnovu velikih razlika u vrednostima RMS, zaključuje se da postoje dva faktora koja utiču na morfologiju polimernih filmova. Prvi je sadržaj PEO segmenta, odnosno sastav kopolimera; tako najmanju vrednost RMS od 190 nm i 250 nm imaju polimeri sa najvećim udelom PEO: PCEC-1, PCEC-4 i PCL/PEO-1. U serijama triblok kopolimera, sa porastom dužine PCL lanaca, hrapavost površine filmova raste i poslednji kopolimeri u seriji imaju vrednosti RMS bliske homopolimeru PCL. U seriji diblok kopolimera je zapažen sličan trend u vrednostima hrapavosti površine filmova, sa izuzetkom da diblok kopolimer PCL/PEO-3 ima relativno nisku vrednost RMS od 220 nm. Neočekivano niža vrednost za hrapavost površine se može objasniti zavisnošću ove vrednosti od prečnika kristališućih sferulita, koji se može označiti kao drugi faktor koji određuje RMS vrednost. Za sve ispitane blok kopolimere, hrapavost površine zavisi od veličine sferulita; sa porastom prečnika sferulita, vrednost RMS opada. Blok kopolimeri sa velikim prečnikom sferulita poseduju veoma glatku površinu. Ovo je posebno izraženo kod diblok kopolimernih uzoraka, dok u seriji triblok kopolimera sa kraćim PEO segmentom (naročito kod uzorka PCEC-6 čiji je prečnik sferulita oko 70 μm , a RMS 300 nm) dominantan uticaj ima sastav kopolimera.



Slika 4.29. 3D AFM slike homopolimera PCL i serija triblok i diblok kopolimera.

Različita morfologija površine polimernih filmova u zavisnosti da li su tokom procesa kristalizacije bili okrenuti ka vazduhu ili ka staklu, utiče i na vrednosti hrapavosti površine filmova. Tako su RMS vrednosti za stranu polimernih filmova okrenutih ka staklu manje u poređenju sa onim izmerenim za stranu okrenutu ka vazduhu.

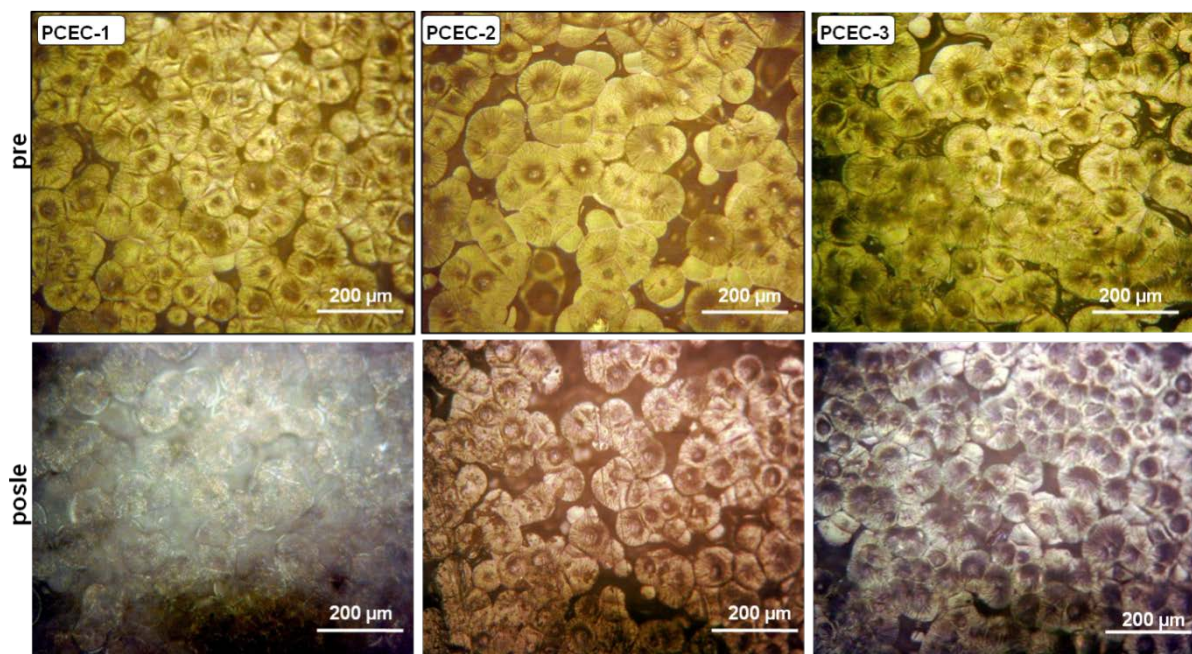
Vrednosti prečnika sferulita određene na osnovu optičke mikroskopije i AFM analizom su u saglasnosti, kako za triblok, tako i za diblok kopolimere. Zapaža se jedino odstupanje u seriji triblok kopolimera, za uzorak PCEC-3, za koji je AFM analiza pokazala manju vrednost prečnika sferulita (100 μm) u odnosu na vrednost izmerenu optičkom mikroskopijom (130

μm). Ipak, rezultati dobijeni na osnovu optičke mikroskopije se mogu smatrati pouzdanijim jer oni predstavljaju srednju vrednost više od 200 izmerenih sferulita u odnosu na vrednosti dobijene AFM analizom (manji broj merenja odabranih sferulita izmerenih sa oko 10 mikrografa).

4.12.3. Optička mikroskopija polimernih filmova nakon enzimske degradacije

Optička mikroskopija je najjednostavniji način vizualizacije promena u morfologiji površine polimernih filmova nakon enzimske degradacije koja se odigrava mehanizmom površinske erozije.[59, 165] Iako polimerni filmovi pokazuju različitu morfologiju površina sa jedne i druge strane polimernog filma, obe strane podjednako podležu enzimskoj degradaciji (kao što je prikazano za uzorak PCL-a koji se nalazi u Prilogu), što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima. [66, 74] Analizirajući snimljene mikrografe ispitivanih uzoraka, zaključuje se da ukoliko je gubitak mase nakon enzimske degradacije bio veći od 5 mas.%, promene u morfologiji površine uzoraka su jasno uočljive na osnovu optičke mikroskopije. Na mikrografima snimljenim pre degradacije sferuliti su jasno uočljivi sa definisanim granicama, dok nakon degradacije pojedinih polimernih uzoraka, granice između sferulita su jedva vidljive. Za blok kopolimere koji su najviše degradirali, sferuliti se ne mogu videti, a mogu se uočiti šupljine i dezintegrisanost filmova.

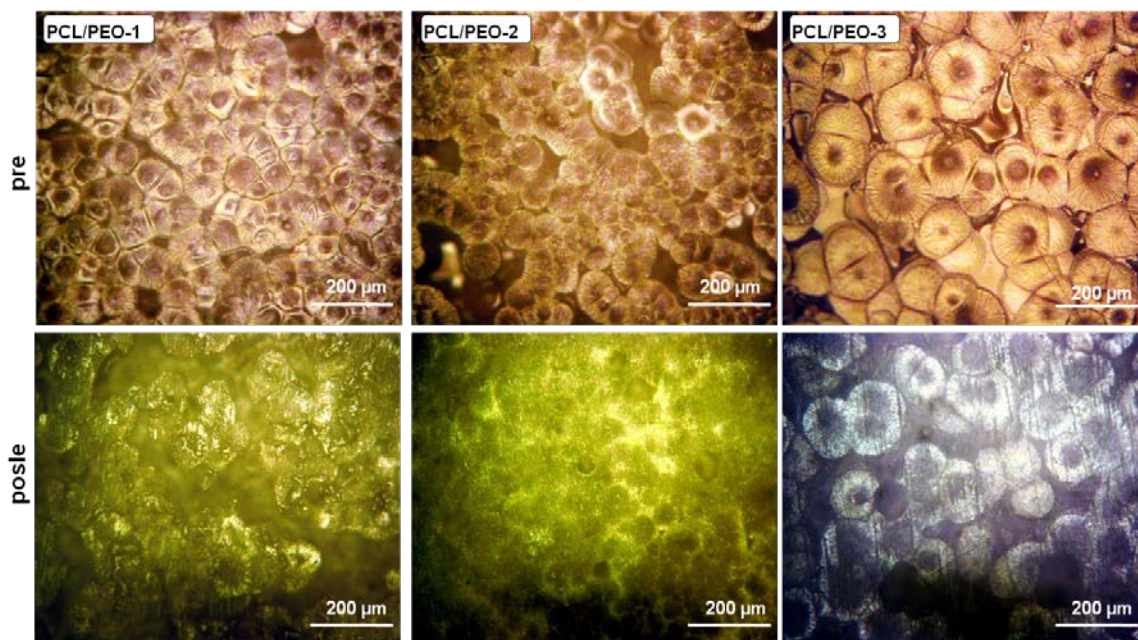
Morfologija površine homopolimera PCL, koji poseduje najveću kristaliničnost od svih ispitivanih uzoraka, ostala je skoro nepromenjena nakon enzimske degradacije. Rezultat je očekivan jer PCL nakon dve nedelje enzimske degradacije gubi 4,3 mas.%. Izgled triblok kopolimernih filmova (serija sa PEO segmentom od 1000 g/mol) pre i posle dve nedelje degradacije je prikazan na Slici 4.30. U ovoj seriji uzoraka, za uzorak sa najvećim udelom PEO i najmanjom vrednosti molarne mase, PCEC-1 (gubitak mase oko 6 mas.%) se uočava najintenzivnija erozija površine. Kod druga dva kopolimera iz serije, PCEC-2 i PCEC-3, kao posledica male vrednosti gubitka mase, erozija površine se jedva može detektovati.



Slika 4.30. Optički mikrofotografije serije triblok kopolimera sa dužim PEO blokom pre i posle dve nedelje enzimske degradacije.

Nakon izlaganja dejstvu enzima, površina filmova serije triblok kopolimera sa PEO segmentom (400 g/mol) je potpuno erodirana i dezintegrisana, tako da se sferuliti nisu mogli uočiti (Prilog). Polimer sa najvećim gubitkom mase u ovoj seriji (PCEC-4, gubitak mase 11,2 mas.%) je bio u tolikoj meri degradiran, a struktura razorena da nije bilo moguće snimiti mikrofotografije optičkim mikroskopom. Površine filmova druga dva polimera iz serije su takođe bile intenzivno degradirane, sferuliti su bili jedva uočljivi i bez definisanih granica. Prisustvo šupljina u degradiranim filmovima može biti posledica nehomogenosti mehanizma degradacije i većeg afiniteta enzima ka degradaciji amorfnih delova polimera.

Morfologija površina diblok kopolimera, zbog njihove veće sposobnosti degradacije, je intenzivno degradirana, a sferuliti jedva vidljivi (Slika 4.31.). Erozijska površina filmova je u saglasnosti sa gubicima mase: veći gubici mase rezultirali su većom erozijom površine. Na mikrofotografu najmanje degradiranog uzorka iz ove serije, PCL/PEO-3, pored intenzivno erodirane površine, zapaža se i prisustvo sferulita potvrđujući manje intenzivnu degradaciju u poređenju sa ostalim uzorcima.



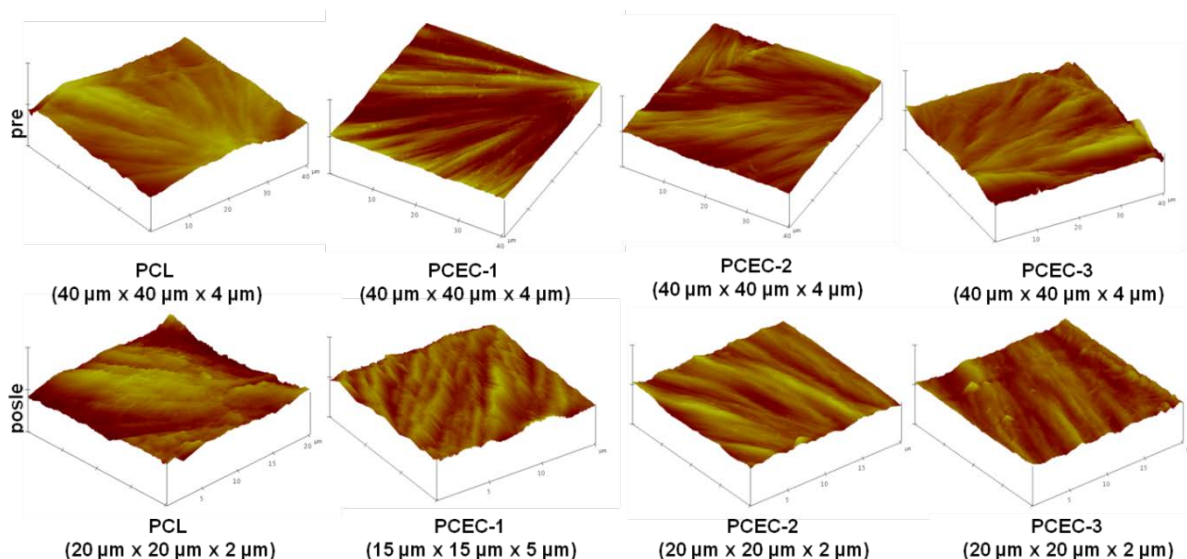
Slika 4.31. Optički mikrofotografije serije diblok kopolimera pre i posle dve nedelje enzimske degradacije.

Optičkom mikroskopijom je utvrđeno da, osim uticaja prisustva PEO segmenta u blok kopolimerima na kristalizaciono ponašanje, prisustvo amornog, hidrofilnog segmenta u lancima PCL-a utiče i na sposobnost njihove degradacije. Na osnovu mikrofotografija degradiranih polimernih filmova, uočava se da se mehanizam površinske erozije blok kopolimera odigrava nehomogeno, odnosno da amorfne oblasti uzorka polimera bivaju prvenstveno napadnute od strane enzima.

4.12.4. AFM analiza polimernih filmova nakon enzimske degradacije

Površinska erozija polimernih filmova nakon enzimske degradacije koja je ispitana optičkom mikroskopijom, dalje je kvantifikovana pomoću AFM analize degradiranih uzoraka na osnovu procene promene vrednosti RMS, odnosno promene u hrapavosti površine (Tabela 4.11.). Pomoću AFM analize je detektovana različita morfologija površine PCL i blok kopolimernih filmova (Slika 4.32. i Slika 4.33.). Pre degradacije, na 3D slikama se mogu videti sferuliti sa jasno definisanim lamelama. Objasnjeno je da hrapavost površine PCL i blok kopolimera zavisi od veličine sferulita (a prečnik sferulita je određen vrednošću molarne mase), odnosno da je kod polimernih filmova sa sferulitima većeg radijusa izmerena manja vrednost RMS i glatka površina filmova. Kao drugi faktor koji određuje RMS vrednost navodi se sadržaj mekog, hidrofilnog segmenta PEO čije prisustvo čini površinu polimernog filma glatkom. Vrednosti hrapavosti površine polimernih filmova triblok kopolimera pre degradacije se međusobno mnogo ne razlikuju i bliske su vrednosti RMS za PCL, dok su za

seriju diblok kopolimera, razlike u ovim vrednostima uočljivije. Rezultati gravimetrijske analize degradiranih uzoraka su u saglasnosti sa AFM analizom, odnosno promene u vrednostima RMS prate trend koji postoji za vrednosti gubitka mase kopolimera: veći gubitak mase, veća promena RMS vrednosti.

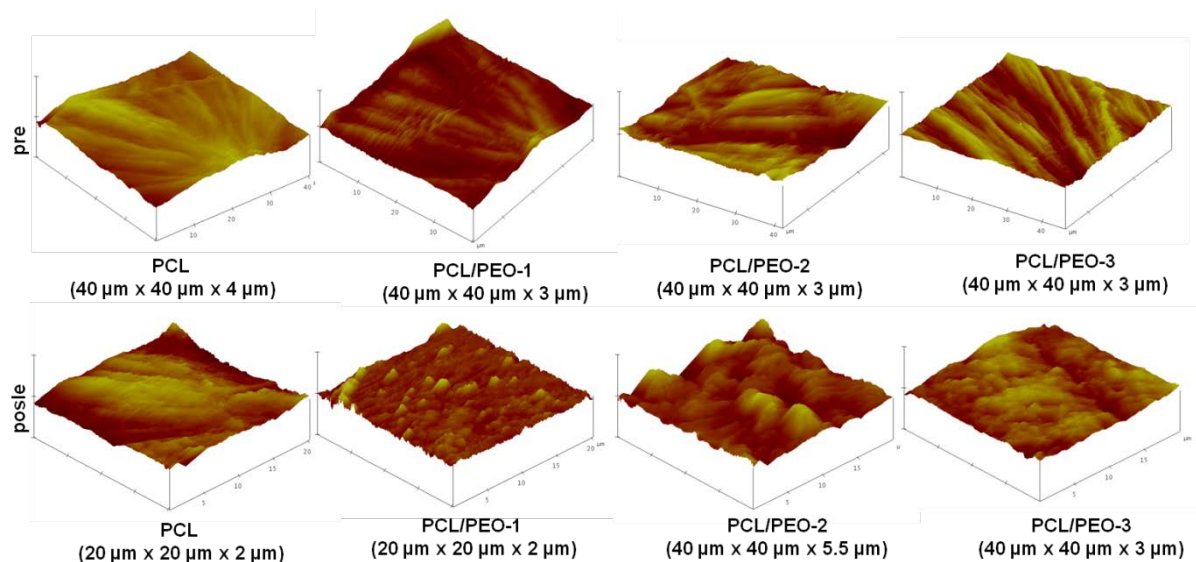


Slika 4.32. 3D AFM slike serije triblok kopolimera sa PEO blokom (1000 g/mol) pre i posle dve nedelje enzimske degradacije.

Lamelarna struktura homopolimera PCL i triblok kopolimera (Slika 4.32.) nakon degradacije je uništena, a promene u morfologiji su u saglasnosti sa stepenom degradacije: veći gubitak mase, intenzivnije promene u lamelarnoj strukturi. Stoga, RMS vrednost triblok kopolimera PCEC-1 raste sa 87 nm na 200 nm sa strane stakla, odnosno sa 51 nm na 114 nm sa strane vazduha ukazujući na veoma degradiranu površinu filma. Druga dva uzorka iz ove serije, koja gube manje od 1 mas.% nakon degradacije, pokazuju manje promene u vrednostima RMS (Tabela 4.11.).

Nakon dve nedelje enzimske degradacije serije triblok kopolimernih filmova sa kraćim hidrofilnim PEO segmentom, promene u morfologiji površine filmova, tj. u vrednosti RMS su velike i u saglasnosti sa stepenom degradacije i procentom izgubljene mase (Prilog i Tabela 4.11.). Za uzorak koji je najviše degradirao i kod kojeg je izmeren najveći gubitak mase, PCEC-4, izmereno je drastično povećanje vrednosti RMS: oko 200 nm sa strane stakla i čak 350 nm sa strane vazduha, što je mnogo veće od vrednosti RMS nedegradiranog filma (80 nm - staklo, 60 nm - vazduh). Veoma intenzivna erozija površine i velika promena u vrednosti RMS sa strane vazduha se može objasniti boljim kontaktom i lakšim prilaskom enzima površini filma koja ima manju hrapavost. Hrapavost uzorka PCEC-5 je porasla za oko

50 nm, dok je uzorak PCEC-6 imao hrapavost veću za 100 nm nakon degradacije.



Slika 4.33. 3D AFM slike serije diblok kopolimera pre i posle dve nedelje enzimske degradacije.

Zahvaljujući najvećoj sposobnosti degradacije u prisustvu enzima, erozija površine serije diblok kopolimera je bila najintenzivnija, a očekivano su izmerene i veće vrednosti RMS nakon degradacije (Slika 4.33. i Tabela 4.11.). Hrapavost diblok kopolimera PCL/PEO-1 koji gubi oko 12 mas.% i za koji se očekivalo da ima najveću promenu u vrednosti RMS, promenila se za samo 30 nm nakon degradacije što je, u poređenju sa npr. polimerom PCL/PEO-3 (gubitak mase 6,4 mas.%) za koji je izmerena promena vrednosti RMS oko 60 nm, neznatno povećanje. Za ovakav rezultat objašnjenje može biti prečnik sferulita polimera PCL/PEO-3 koji je bio najveći u seriji (oko 200 μm) i koji je dalje uzrokovao nisku vrednost RMS. Zbog relativno male vrednosti hrapavosti površine ovog kopolimernog filma, u poređenju sa drugim uzorcima, enzimima prisutnim u ćelijskom ekstraktu je olakšan prilaz i napad na površinu filma.

Tabela 4.11. Gubitak mase, hrapavost površine polimernih filmova pre i posle dve nedelje degradacije merena na $20 \times 20 \text{ nm}^2$, prečnik sferulita.

Uzorak	Gubitak mase (%)	RMS (nm) staklo ^a	RMS (nm) vazduh ^a	Prečnik (μm)
PCL	4,3	130 (100)	82 (70)	100
PCEC-1	6,2	200 (87)	114 (51)	140
PCEC-2	0,7	74 (65)	70 (60)	160
PCEC-3	0,5	80 (77)	88 (73)	100
PCEC-4	11,2	190-200 (80)	350 (60)	120
PCEC-5	5,7	150 (90)	140 (95)	130-140
PCEC-6	5,5	140 (40)	150 (54)	40-60
PCL/PEO-1	11,8	158 (120)	175 (166)	100
PCL/PEO-2	5,8	200 (113)	189 (160)	100-120
PCL/PEO-3	6,4	130 (85)	102 (60)	190

^a u zagradama su date RMS vrednosti nedegradiranih uzoraka

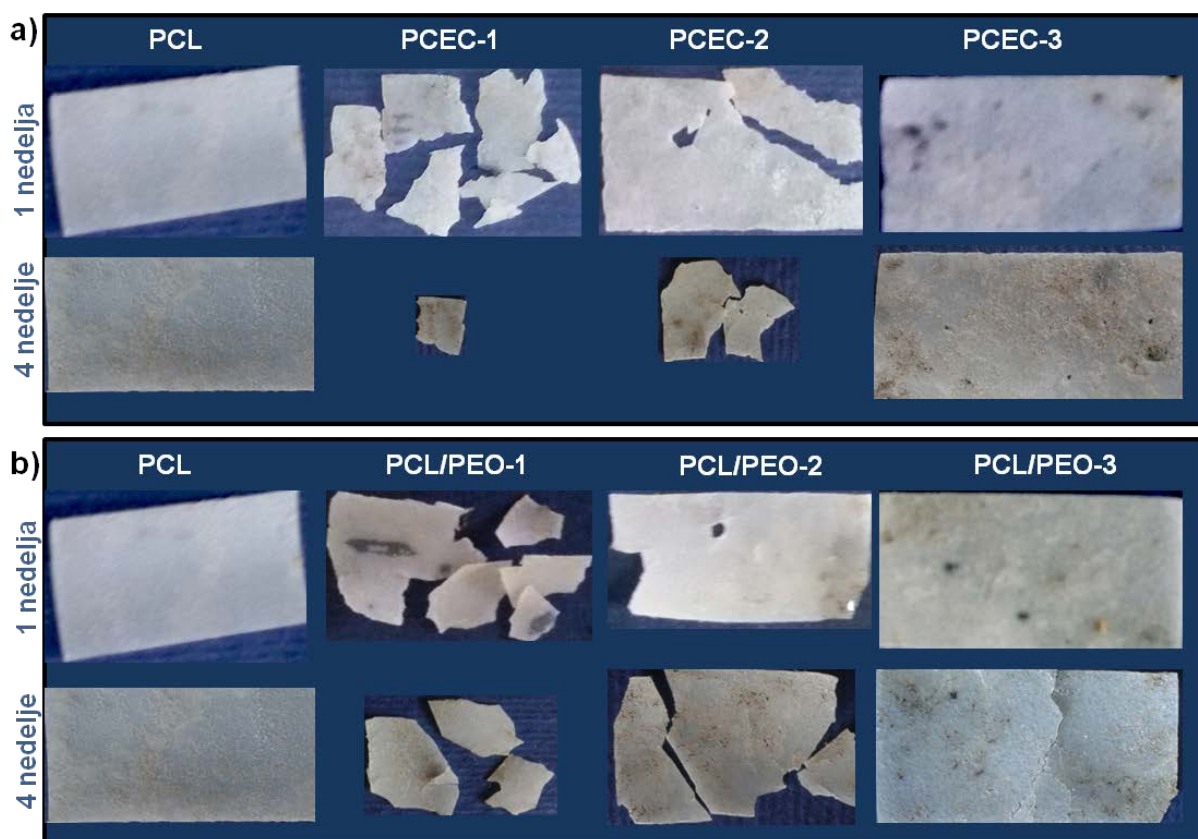
Homopolimer PCL je pokazao najmanje promene u vrednosti RMS kao posledica najmanje sposobnosti degradacije i otpornosti na aktivnost enzima. Vrednosti RMS za stranu polimernog filma ka vazduhu i ka staklu su podjednako bile promenjene nakon degradacije, u oba slučaja površina filma postaje hrapavija ukazujući da se površinska erozija odigrava sa obe strane polimernog filma. AFM analiza je potvrdila da se proces degradacije u prisustvu enzima odvija u najvećoj meri mehanizmom površinske erozije i da polimerni filmovi postaju hrapaviji zbog promenjene morfologije.

4.13. Biokompostiranje PCL i sintetisanih blok kopolimera

Nasuprot maloj podložnosti hidrolitičkoj degradaciji, poznata i pod nazivom abiotska hidroliza, u kompostu (poznata kao biotska degradacija) se postiže veći stepen degradacije kao posledica aktivnosti enzima koje luče mikroorganizmi prisutni u kompostu. Biodegradacija PCL i blok kopolimera je testirana u model sistemu komposta koji je sadržao komercijalnu smešu koja se koristi za uzgajanje belih pečuraka suplementirane kulturom *P. aeruginosa* PAO1, na 37 °C. Tokom četiri nedelje kompostiranja, neki od ispitivanih uzoraka su pokazali visok stepen površinske degradacije praćene intenzivnom dezintegracijom filmova (Slika 4.34.).

Homopolimer, PCL, je pretrpeo najmanje promene tokom degradacije u kompostu u poređenju sa blok kopolimerima. Sa snimljenih fotografija se može videti da, kod uzoraka koji su više degradirali u kompostu, neke oblasti su više oštećene i podložnije degradaciji, ukazujući da se ovaj način degradacije odigrava nehomogeno, mehanizmom erozije površine. Nehomogena degradacija polimernih uzoraka u kompostu se može objasniti boljim

kontaktoom komposta i polimera u nekim oblastima te su zbog toga neki delovi više dezintegrirani. [87] Dodatno objašnjenje može biti i nehomogeni rast mikroorganizama na površini polimernih filmova. Na stepen i intenzitet biodegradacije u kompostu može uticati i specifična površina ispitivanih polimernih uzoraka i sa povećanjem površine uzoraka koja je izložena mikroorganizama, značajno se može ubrzati proces biodegradacije. [90]

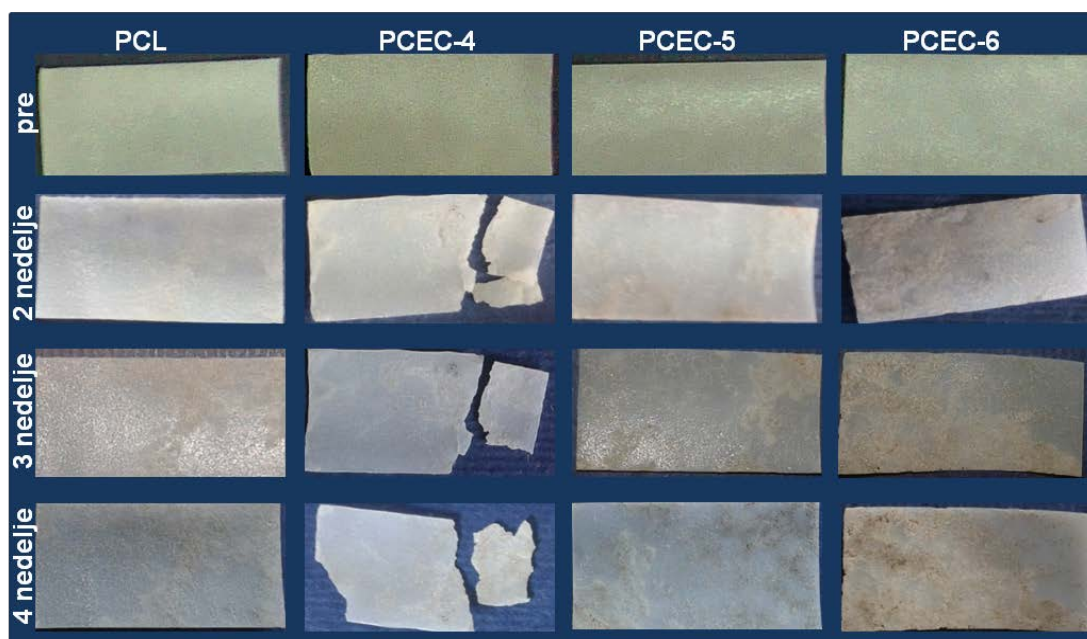


Slika 4.34. Fotografije biokompostiranih polimernih filmova: a) serije triblok kopolimera sa PEO segmentom od 1000 g/mol i b) serija diblok kopolimera.

Snimljene fotografije (Slika 4.34.) pokazuju da i nakon 4 nedelje u kompostu, PCL poseduje najveću rezistentnost na mikroorganizme, tako da i pored pojedinih degradiranih domena, polimerni film je većinom ostao kompakatan. Uzorci sa najizraženijom dezintegracijom tokom biokompostiranja su PCEC-1 i PCL/PEO-1, odnosno uzorci sa najvećim sadržajem hidrofilnog, amornog PEO, ali ujedno i uzorci najmanje vrednosti molarne mase u serijama triblok i diblok kopolimera. Ovi uzorci su skoro potpuno dezintegrirani nakon samo nedelju dana u kompostu. Proces biodegradacije u kompostu se odigrava različitim intenzitetom na polimernim filmovima pri čemu uzorci bivaju dezintegrirani, a degradacioni proizvodi polimera migriraju u kompostni medijum. Sa porastom molarne mase, blok kopolimerni uzorci su manje degradirani. Stoga triblok

kopolimer PCEC-3 i diblok kopolimer PCL/PEO-3 imaju najmanji stepen degradacije i većinom zadržavaju svoju kompaktnost nakon četiri nedelje kompostiranja.

Seriya triblok kopolimera sa PEO segmentom od 400 g/mol je imala veću otpornost na enzime prisutne u kompostu usled male dužine PEO bloka, a praćenje promena u izgledu ove serije blok kopolimera tokom četiri nedelje je prikazano na Slici 4.35. Jedino se za uzorak PCEC-4 uočava dezintegracija već nakon prve nedelje koja se nastavlja tokom vremena, a nakon 4 nedelje pojedini delovi ovog uzorka se nalaze u kompostu kao degradacioni proizvodi. Kako ostali triblok kopolimeri iz serije (PCEC-5 i PCEC-6) većinom zadržavaju kompaktnost tokom biokompostiranja, zaključuje se da dominantan uticaj na sposobnost biodegradacije ima prisustvo PEO segmenta i molarna masa.



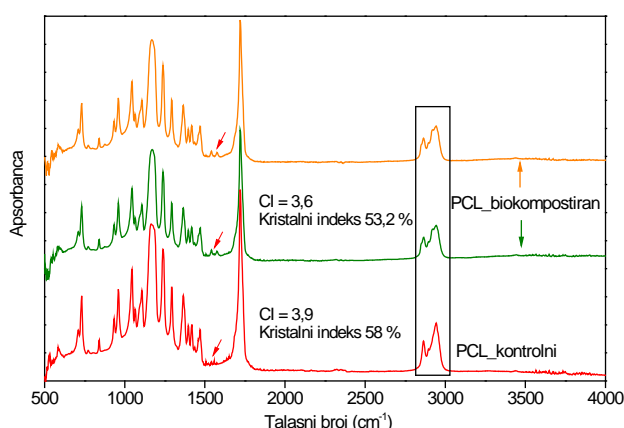
Slika 4.35. Praćenje bikompostiranja serije triblok kopolimera sa PEO segmentom od 400 g/mol tokom vremena.

Biokompostiranje PCL i blok kopolimera se odvija sa površine uzoraka ka unutrašnjosti, a promene u morfologiji površine filmova ukazuju na nehomogenu dezintegraciju i mehanizam površinske erozije. [169] Ovakav način degradacije u kompostu ukazuje na mogućnost degradacije ove vrste kopolimera u životnoj sredini aktivnošću nekih mikroorganizama koji se normalno nalaze u prirodi. Rezultati oglada biokompostiranja ispitivanih blok kopolimera su u dobroj saglasnosti sa rezultatima enzimske degradacije, naročito za seriju diblok kopolimera i triblok kopolimera sa dužim hidrofilnim segmentom koji su u oba oglada pokazali izraženu dezintegraciju i sposobnost razgradnje u prisustvu enzima iz soja *Pseudomonas*.

4.13.1. FTIR analiza i optička mikroskopija polimernih filmova nakon ogleda biokompostiranja

Nakon testova biokompostiranja, uzorke koji su pokazali najveću rezistentnost ka mikrobiološkoj aktivnosti, bilo je moguće snimiti pomoću optičke mikroskopije i analizirati pomoću FTIR. Analizom spektara i izračunavanjem karbonilnog i kristalnog indeksa pojedinih polimernih uzoraka, omogućena je kvantifikacija degradacije uzoraka, a na osnovu optičke mikroskopije je dobijen uvid u mehanizam degradacije u kompostu.

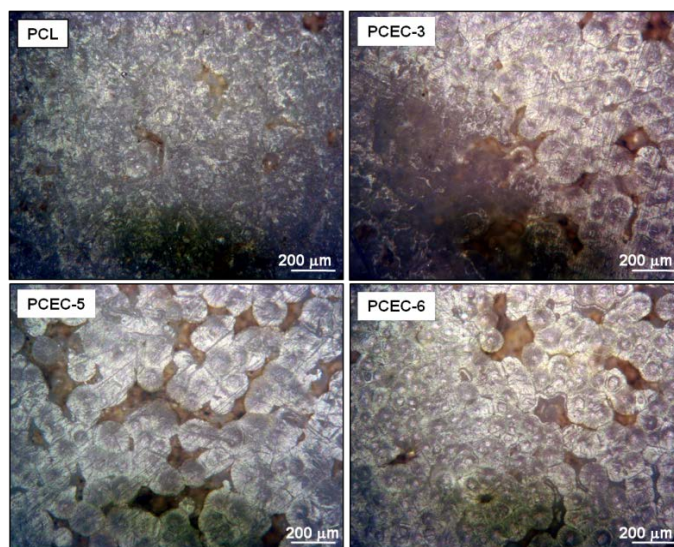
Snimljeni su FTIR spektri PCL i uzoraka iz druge serije triblok kopolimera, PCEC-5 i PCEC-6, a na Slici 4.36. je reprezentativno prikazan spektar homopolimera PCL pre i posle biokompostiranja. Vizuelno se može zapaziti pojava pikova u oblasti od 1540 do 1590 cm^{-1} kod uzoraka PCL nakon biokompostiranja, kao i manji intenzitet pika između 2750 i 3000 cm^{-1} koji je kod kontrolnog uzorka PCL oštar i većeg intenziteta. Vrednost karbonilnog indeksa biokompostiranog uzorka je iznosila 3,6 u odnosu na kontrolni čija je vrednost bila 3,9; dok je vrednost kristalnog indeksa opala sa 58 % (kontrolni) na 53,2 % (degradirani). Smanjenje vrednosti karbonilnog i kristalnog indeksa su dodatno potvrdile promene u strukturi degradiranih uzoraka koje je bilo moguće snimiti nakon degradacije u kompostu. Na Slici 4.36. su prikazan dva PCL spektra jednog istog uzorka koji je snimljen na različitom mestu polimernog filma, kako bi se utvrdile promene koje nastaju i u manje degradiranoj i u više degradiranoj oblasti (nehomogena degradacija).



Slika 4.36. FTIR analiza PCL polimernog filma pre i posle ogleda biokompostiranja.

Optička mikroskopija biokompostiranih uzoraka otkrila je da se degradacija polimernih uzoraka odigrava mehanizmom površinske erozije i da dolazi do narušavanja strukture sferulita testiranih uzoraka (Slika 4.37.). Kod PCL, koji je najviše otporan prema biotskoj

degradaciji, struktura sferulita je najviše očuvana, dok se kod uzoraka koji su pretrpeli intenzivniju degradaciju, ova struktura samo nazire jer su granice između sferulita teško uočljive.



Slika 4.37. Optički mikrografi PCL i triblok kopolimera nakon biokompostiranja.

Testovi hidrolitičke i enzimske degradacije, a pre svega u kontrolisanim uslovima degradacije u kompostu su pokazali da PCL blok kopolimeri sa poli(etilen-oksidadom) kao centralnim i lateralnim segmentom mogu naći primenu u izradi ambalažnog materijala zahvaljujući sposobnosti degradacije od strane mikroorganizama koji se nalaze u okolini, odnosno enzima koje oni luče. Ukoliko ovi kopolimeri dospeju u spoljašnju sredinu nakon jednokratne upotrebe, mogu se uspešno razgraditi prirodnim putem, a zagađenje životne sredine polimernim otpadom je na taj način svedeno na minimum.

4.14. Primena triblok kopolimera kao matrica za kontrolisano otpuštanje ibuprofena

Amfilni blok kopolimeri na bazi poli(ϵ -kapolaktona) i poli(etilen-oksida) imaju široku primenu u oblasti biomedicine, a u ovom radu je ispitana njihova potencijalna primena kao matrica za kontrolisano otpuštanje lekova. Homopolimer PCL i serija triblok kopolimera sa kraćim PEO segmentom (M_n 400 g/mol) je korišćena za pripremu polimernih mikrosfera kao nosača ibuprofena. Za pripremu mikrosfera unutar kojih je inkapsuliran ibuprofen je izabrana serija triblok kopolimera sa kratkim PEO blokom kako bi se ispitaio uticaj prisustva PEO bloka u veoma malom procentu (manje od 2 mas.%) na efikasnost inkapsulacije, veličinu dobijenih čestica, ali prvenstveno na profile otpuštanja ibuprofena kao i mehanizam njegovog otpuštanja iz polimerne matrice.

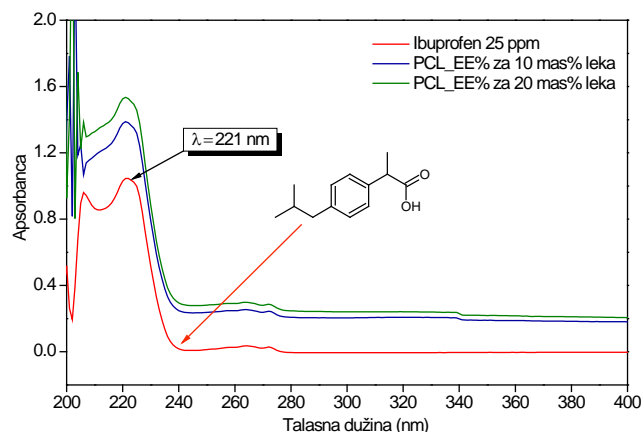
U ovoj seriji triblok kopolimera, dužina PEO segmenta je bila konstantna u svim kopolimerima (stepen polimerizovanja 9) dok je dužina PCL blokova varirana (stepen polimerizovanja u opsegu od 99 do 150).

Pripremom PCEC polimernih mikrosfera pre svega je bio cilj da se ispita uticaj kratkog, hidrofilnog PEO segmenta, različite strukture kopolimera i molarne mase, na profile otpuštanja leka iz polimerne matrice, ali i da se ispita uticaj koncentracije leka na veličinu čestica i kinetiku otpuštanja leka. Kako bi se ispitaio uticaj koncentracije ibuprofena, pripremljene su blok kopolimerne mikrosfere sa 10 i 20 mas.% leka preračunato na masu polimera, odnosno maseni odnos polimer/lek je iznosio 1:10 i 1:5, redom.

Metoda otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije je jednostavan, ponovljiv i pogodan način inkapsulacije hidrofobnog leka (ibuprofena) u polimernu matricu u formi mikrosfera. Emulzija " ulje u vodi " se dobija ukapavanjem rastvora hloroforma (u kojem su rastvoreni polimer i lek) u vodeni rastvor poli(vinil-alkohola) pri čemu se formiraju emulgovane čestice polimera unutar kojeg je inkapsuliran lek, kao posledica nemešljivosti hloroforma i vode. Odnos organske i vodene faze je iznosio 1/20, a koncentracija rastvora polimera 10 mas.%. Hloroform kao lako isparljiv rastvarač tokom vremena otparava iz emulzije na sobnoj temperaturi (25 °C i usled konstantnog mešanja 1000 o/min), a mikročestice polimera sa lekom padaju na dno reaktora. Prinosi svih dobijenih mikrosfera su bili visoki, u opsegu od 88 do 95 % ukazujući na efikasnost i pogodnost primenjene tehnike za inkapsulaciju leka (Tabela 4.12.).

4.14.1. Efikasnost inkapsulacije ibuprofena

Prilikom izrade mikrosfera, određena količina leka se ne inkapsulira u polimernu matricu već zaostaje u vodenom rastvoru, pa je potrebno odrediti efikasnost inkapsulacije leka u polimernu matricu. Efikasnost inkapsulacije leka predstavlja odnos količine leka zarobljene u mikrosferama u odnosu na ukupnu količinu leka unetog u rastvor polimera. Koncentracija leka u rastvoru se određuje pomoću UV-Vis spektrofotometrije, na osnovu apsorbanace karakterističnog pika na 221 nm (Slika 4.38.).



Slika 4.38. UV-VIS spektri ibuprofena i rastvora pufera sa zaostalim lekom nakon inkapsulacije 10 i 20 mas.% ibuprofena u PCL polimeru matricu.

Inkapsulacijom 10 mas.% ibuprofena, dostignuta je vrednost efikasnosti inkapsulacije u opsegu od 72 do 75 %, dok je za 20 mas.% inkapsuliranog leka ova vrednost bila u opsegu od 64 do 76 % (Tabela 4.12.). Relativno visok procenat efikasnosti inkapsulacije je postignut zahvaljujući hidrofobnoj prirodi ibuprofena koji, usled velike hidrofobnosti PCL i PCEC kopolimera, ostaje zarobljen unutar polimerne matrice. Efikasnost inkapsulacije može biti određena odnosom masa polimer/lek (EE% raste sa porastom vrednosti ovog odnosa) [109], ali u slučaju dobijenih mikrosfera, slične vrednosti EE% su dobijene za različite koncentracije leka (10 i 20 mas.%) najverovatnije kao posledica velikog sadržaja PCL i afiniteta ibuprofena da se inkorporira unutar ove polimerne matrice, ali i zbog postojanja međumolekulskih interakcija između ibuprofena i polimerne matrice. O postojanju ovih interakcija i načinu njihovog dokazivanja biće više reči u daljem tekstu.

Tabela 4.12. Efikasnost inkapsulacije, sadržaj leka u polimernoj matrici, prinos.

Mikrosfere	Prinos, %	EE, %	Sadržaj leka, %
PCL blank	88	-	
PCEC-4 blank	93	-	
PCEC-5 blank	92	-	
PCEC-6 blank	93	-	
PCL/10	91	72	6,7
PCEC-4/10	92	73	6,8
PCEC-5/10	92	72	6,7
PCEC-6/10	95	75	7,0
PCL/20	91	76	13,2
PCEC-4/20	91	77	13,3
PCEC-5/20	88	64	11,3
PCEC-6/20	92	72	12,6

^a teorijska vrednost

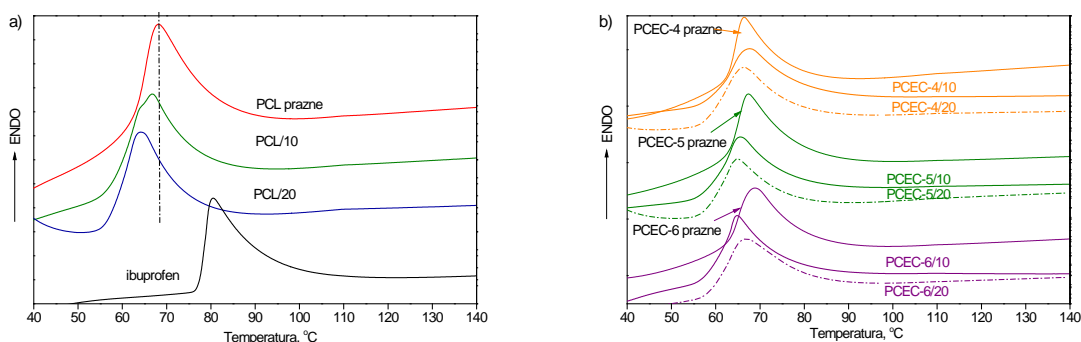
Sadržaj inkapsuliranog leka za seriju mikrosfera od 10 mas.% ibuprofena je bio u opsegu od 6,7 do 7,2 mas.%, što je blizu teorijske vrednosti od 9,1 mas% koja se odnosi na sadržaj leka pri efikasnost inkapsulacije od 100 %. U drugoj seriji dobijenih mikrosfera, gde je cilj bio inkapsulirati 20 mas.% ibuprofena, sadržaj leka je iznosio od 11,3 do 13,3 mas%, a teorijska vrednost za maksimalnu efikasnost inkapsulacije je 16,7 mas.%. Veći prinos dobijenih mikrosfera je rezultovao većom efikasnosti inkapsulacije, a samim tim i većim sadržajem inkapsuliranog leka. Prinos blok kopolimernih mikrosfera uzorka PCEC-5, sa 20 mas.% ibuprofena, je iznosio 88 %, a kao posledica manjeg prinosa u odnosu na preostale uzorke, vrednost EE% je bila manja.

4.14.2. DSC analiza dobijenih mikrosfera

Jedan od faktora koji utiče na kinetiku otpuštanja leka je kristalna struktura polimernog matriksa unutar koje je inkapsuliran lek.[170] Pomoću DSC analize je ispitan uticaj inkorporacije leka na temperaturu topljenja, T_m , entalpiju topljenja, ΔH_m , i relativni i ukupni stepen kristaliničnosti polimernih mikrosfera.

U DSC termogramima (Slika 4.39.a) se vidi oštar, intenzivan pik koji potiče od topljenja kristalnog ibuprofena, čija je temperatura topljenja 80,5 °C, a vrednost entalpije topljenja iznosi $\Delta H_m = 121,5$ J/g. Pik koji potiče od topljenja ibuprofena se ne uočava u DSC termogramima mikrosfera unutar kojih je inkapsuliran lek, što može da ukazuje na to da je inkapsuliran lek dispergovan unutar polimernog matriksa u amorfnom obliku i da ne dolazi do kristalizacije ibuprofena tokom procesa mikroinkapsulacije. Kako je PCL semikristaliničan polimer, inkapsulirani lek je dispergovan u amorfnoj oblasti polimera. U seriji praznih mikrosfera, PCL mikrosfere imaju najveću vrednost temperature topljenje, 68,1 °C, do su vrednosti entalpije topljenja bile slične za sve pripremljene mikrosfere bez leka kao posledica velikog sadržaja PCL u kopolimerima. Uvođenje kratkog, amorfnog PEO segmenta u PCL lance dovodi do smanjena vrednosti T_m , pa tako kopolimerne mikrosfere sa najvećim sadržajem PEO u svom sastavu (PCEC-5) pokazuju najmanju vrednost temperature topljenja (66,8 °C) u seriji. Takođe, malo povećanje vrednosti T_m i ΔH_m sa porastom dužine PCL segmenata ukazuje da su termička svojstva blok kopolimernih mikrosfera određena kako sadržajem PEO bloka, tako i njihovom molarnom masom. Inkapsulacijom leka u polimernu matricu dolazi do promene njihovih termičkih svojstava (Tabela 4.13.). Smanjenje vrednosti temperature topljenja prouzrokovano inkapsulacijom leka u polimernu matricu je detektovano i za 10 i za 20 mas.% leka, a najveće smanjenje vrednosti T_m se zapaža kod

PCL/20 mikrosfera, sa 68,1 na 64,1 °C. Trend smanjenja temperature topljenja usled inkorporacije leka je prisutan i kod PCEC blok kopolimera (Slika 4.39.b). Smanjenje vrednosti entalpija topljenja koje nastaje kao posledica inkapsulacije leka u polimernu matricu je bilo još izraženije u odnosu na smanjenje vrednosti T_m . Kada se 20 mas.% ibuprofena inkapsulira u PCL polimernu matricu, izračunata vrednost entalpije topljenja iznosi 74,7 J/g, što je za oko 10 J/g niže u poređenju sa praznim PCL mikrosferama. Generalno, sa porastom procenta inkapsulacije ibuprofena u mikrosferama, pik koji potiče ot topljenja polimernih mikrosfera postaje širi i pomera se ka nižim vrednostima temperature, a opada i vrednost entalpije topljenja. Dobijeni rezultati su očekivani i u skladu sa literarnim podacima ne samo za čestice unutar kojih je ibuprofen inkapsuliran, već i za druge hidrofobne lekove koji se nakon inkapsulacije nalaze u amorfnom obliku unutar polimerne matrice. [138, 171]



Slika 4.40. DSC termogrammi: a) praznih PCL i PCL/10, PCL/20 mikrosfera i ibuprofena, b) 10 mas.% i 20 mas.% ibuprofena inkapsuliranog unutar PCEC blok kopolimerne matrice.

Na osnovu rezultata DSC analize, zaključuje se da inkapsulacija leka u polimernu matricu utiče na kristalnu strukturu polimera koji je korišćen kao matrica. Kao posledica toga, beleže se promene u vrednosti relativnog i apsolutnog stepena kristaliničnosti mikrosfera sa inkapsuliranim lekom. Relativan stepen kristaliničnosti, X_c^{PCL} , PCL i PCEC mikrosfera je izračunat na sličan način kao za polimere, na osnovu jednačine 3.2. Dobijeni rezultati se nalaze u Tabeli 4.14.

Tabela 4.13. Rezultati DSC analize praznih i ibuprofenom inkapsuliranih mikrosfera.

Mikrosfere	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_m, \text{J/g}$	$w_{\text{PCL}}^a, \text{mas\%}$	$X_c, \%$	$X_c^{\text{PCL}}, \%$
Ibuprofen	80,5	121,5			
PCL prazne	68,1	86,8	100	63,8	63,8
PCL/10	66,4	87,8	92,8	64,5	69,6
PCL/20	64,1	74,7	86,8	54,9	63,3
PCEC-4 prazne	66,8	86,7	98,3	63,7	64,8
PCEC-4/10	67,4	85,1	91,5	62,6	68,4
PCEC-4/20	66,1	78,1	85,0	57,4	67,6
PCEC-5 prazne	67,0	84,1	98,7	61,8	62,6
PCEC-5/10	65,3	82,3	92,0	60,5	65,8
PCEC-5/20	64,6	69,5	87,4	51,1	58,5
PCEC-6 prazne	67,1	87,4	98,8	64,3	65,0
PCEC-6/10	64,7	85,1	91,8	62,6	68,2
PCEC-6/20	66,7	83,3	86,2	61,3	63,7

^a Na osnovu ¹H NMR analize i sadržaja leka

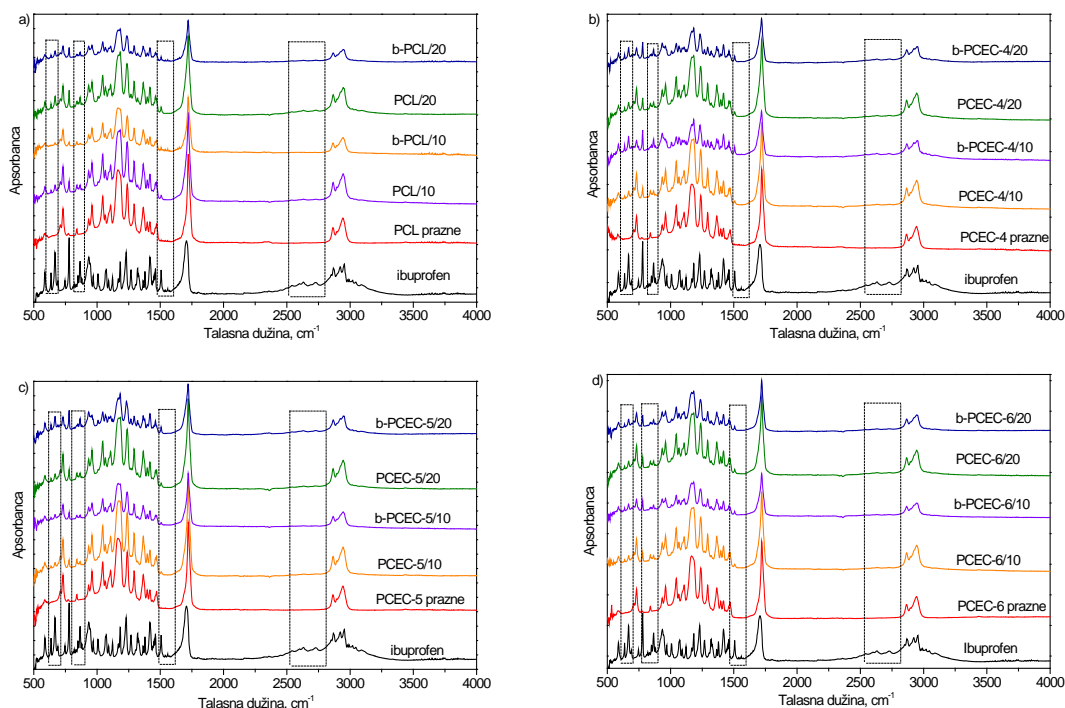
Prazne PCL mikrosfere su imale vrednost stepena kristaliničnosti 63,8 %, što je veoma slično vrednostima X_c izračunatim za prazne blok kopolimerne mikrosfere, navodeći na zaključak da prisustvo mekog, amorfno PEO bloka u veoma malom procentu, neznatno ometa kristalizaciju PCL blokova, kao jedine kristalne faze u ovim kopolimerima. Nakon inkapsulacije leka u polimernu matricu, dolazi do promene vrednosti apsolutnog stepena kristaliničnosti u poređenju sa odgovarajućim praznim mikrosferama. Smanjenje vrednosti stepena kristaliničnosti praznih PCL mikrosfera (63,8 %) na čak 54,9 % za mikrosfere PCL/20, jasno ukazuje na uticaj sadržaja inkapsuliranog leka na vrednosti apsolutnog stepena kristaliničnosti. Vrednost apsolutnog stepena kristaliničnosti X_c za prazne PCEC-4 sfere je bila 63,7 % a nakon inkapsulacije 20 mas% ibuprofena, ova vrednost se smanjila na 57,4 % i trend smanjenja stepena kristaliničnosti se zapaža i kod ostalih uzoraka iz serije.

Analizom rezultata DSC analize, zaključuje se da izračunate apsolutne vrednosti stepena kristaliničnosti (X_c) umnogome zavise od procenta inkapsuliranog leka u polimerni matriks, dok izračunate vrednosti relativnog stepena kristaliničnosti (X_c^{PCL}) ukazuju da prisustvo leka u polimernoj matrici i njegov sadržaj dovode do malih promena u kristalizacionom ponašanju PCL blokova.

4.14.3. FTIR analiza dobijenih mikrosfera

Kompatibilnost polimerne matrice i inkapsuliranog leka, interakcije koje se javljaju između njih, kao i promene u kristalnoj strukturi nakon inkapsulacije leka, mogu se ispitati

FTIR analizom. Reprezentativni FTIR spektri snimljenih mikrosfera sa i bez leka, kao i ibuprofena su prikazani na Slici 4.40.



Slika 4.40. Reprezentativni FTIR spektri mikrosfera: a), b), c), d) ibuprofen i PCL, PCEC-4, PCEC-5 i PCEC-6 blok kopolimerne mikrosfere sa 0, 10 i 20 mas.% leka i fizičke smeše praznih mikrosfera sa 10 i 20 mas.% leka (označene kao b-PCL/10, b-PCL/20, odnosno bPCEC-10, b-PCEC/20).

U FTIR spektru ibuprofena se javlja apsorpciona traka, velikog intenziteta na 1706 cm^{-1} koja potiče od C=O vibracija, a pik koji se javlja u oblasti između 2500 i 2730 cm^{-1} odgovara vibracijama –OH grupe. U spektrima PCL i PCEC mikrosfera bez leka, pik koji potiče od karbonilne C=O grupe je detektovan na 1720 cm^{-1} . Nakon inkapsulacije ibuprofena u polimerne matrice, apsorpcioni pik karbonilne grupe koja potiče iz ibuprofena se pomera ka širem karbonilnom apsorpcionom piku u oblasti između 1660 i 1763 cm^{-1} , što se može pripisati istovremeno karbonilnoj grupi polimera i leka. Ovi rezultati ukazuju na postojanje interakcija između funkcionalnih grupa ibuprofena i polimernog matriksa. Fizičke smeše 10 i 20 mas.% leka su pripremljene kako bi se uporedilo da li i u ovim smešama dolazi do interakcija između leka i polimerne matrice (Slika 4.40.). Kako nije utvrđeno širenje karbonilnog pika kod ovih smeša, to je bio dodatni pokazatelj postojanja vodoničnih veza koje se uspostavljaju između karbonilne grupe polimernog matriksa (PCL-a) i hidroksilnih grupa ibuprofena u mikrosferama koje su sadržale IB, kao što je prethodno utvrđeno od strane Baimark-a. [172] Pikovi malog intenziteta koji se javljaju u smešama polimera i leka u

oblasti između 635 i 670 cm^{-1} , kao i dva pika na 867 i 1510 cm^{-1} , redom, potiču od ibuprofena. U inkapsuliranim mikrosferama, ovi pikovi, karakteristični za IB, se javljaju i nakon inkapsulacije leka (na 635 – 670, 867 i 1510 cm^{-1}), a njihov intenzitet raste sa porastom sadržaja leka u mikrosferama, ukazujući da je lek uspešno inkapsuliran u polimernu matricu. Postojanje drugih karakterističnih pikova u FTIR spektrima PCL i PCEC je već objašnjeno u delu FTIR analize polimernih filmova i isti pikovi se javljaju i kod ovih uzoraka u formi mikrosfera. Takođe, ni u slučaju mikrosfera se ne detektuje postojanje karakterističnog pika koji potiče od etarske veze PEO (na 1100 cm^{-1}) usled njegovog malog sadržaja o čemu je već bilo reči. Spektri PCL i PCEC mikrosfera su slični, skoro identični kada govorimo o trakama koje se javljaju, jer apsorpcione trake potiču samo od PCL blokova. Ukoliko uporedimo snimljene spektre mikrosfera koje sadrže lek i bez leka, u oblasti između 2500 i 2750 cm^{-1} dolazi do pojave pikova malog intenziteta kod mikrosfera unutar kojih je inkapsuliran lek. Intenzitet ovog pika raste i postaje sve uočljiviji za polimerne mikrosfere sa 20 mas.% inkapsuliranog leka.

FTIR analizom su dobijene i informacije o kristalnoj strukturi i promenama do kojih dolazi usled inkapsulacije leka u polimernu matricu. Na osnovu intenziteta karakterističnih pikova, izračunate su vrednosti karbonilnog, CI, i kristalnog indeksa (Tabela 4.14.). Vrednosti CI su ostale nepromenjene ili neznatno smanjene za mikrosfere u kojima je inkapsuliran lek. Smanjenje vrednosti karbonilnog indeksa je bilo veće za 20 mas.% inkapsuliranog ibuprofena. Iako su određene male promene u vrednosti CI, vrednosti kristalnog indeksa nakon inkapsulacije i 10 i 20 mas.% leka su porasle za oko 3 % na osnovu čega čega se zaključuje da dolazi do strukturnih promena koje su pre svega posledica inkorporacije leka, a u manjoj meri su uzrokovane sastavom polimera.

Tabela 4.14. Rezultati FTIR analize: karbonilni indeks, CI, i kristalni indeks.

Mikrosfere	CI ^{a, b}		CI ^{a, b}		Kristalni indeks ^{b, d} , %	Kristalni indeks ^{b, d} , %
	10 mas% IB	20 mas% IB	10 mas% IB	20 mas% IB	10 mas% IB	20 mas% IB
PCL	4,4 (4,4)	4,1 (4,2)	3,7 (4,4)	4,0 (4,2)	57,6 (53,7)	57,9 (53,7)
PCEC-4	4,4 (4,5)	4,1 (4,3)	4,3 (4,5)	4,0 (4,3)	57,1 (54,6)	57,6 (54,6)
PCEC-5	4,4 (4,5)	4,0 (4,1)	4,5 (4,5)	4,1 (4,1)	58,1 (55,4)	57,9 (55,4)
PCEC-6	4,5 (4,4)	4,1 (4,3)	4,3 (4,4)	4,1 (4,3)	58,0 (54,4)	58,2 (54,4)

^a na osnovu odnosa intenziteta pikova na 1720 i 1470 cm^{-1}

^b u zagradi su date vrednosti praznih mikrosfera (bez leka)

^c na osnovu odnosa intenziteta pikova na 1720 i 1398 cm^{-1}

^d na osnovu odnosa intenziteta pikova na 1294 i 1167 cm^{-1}

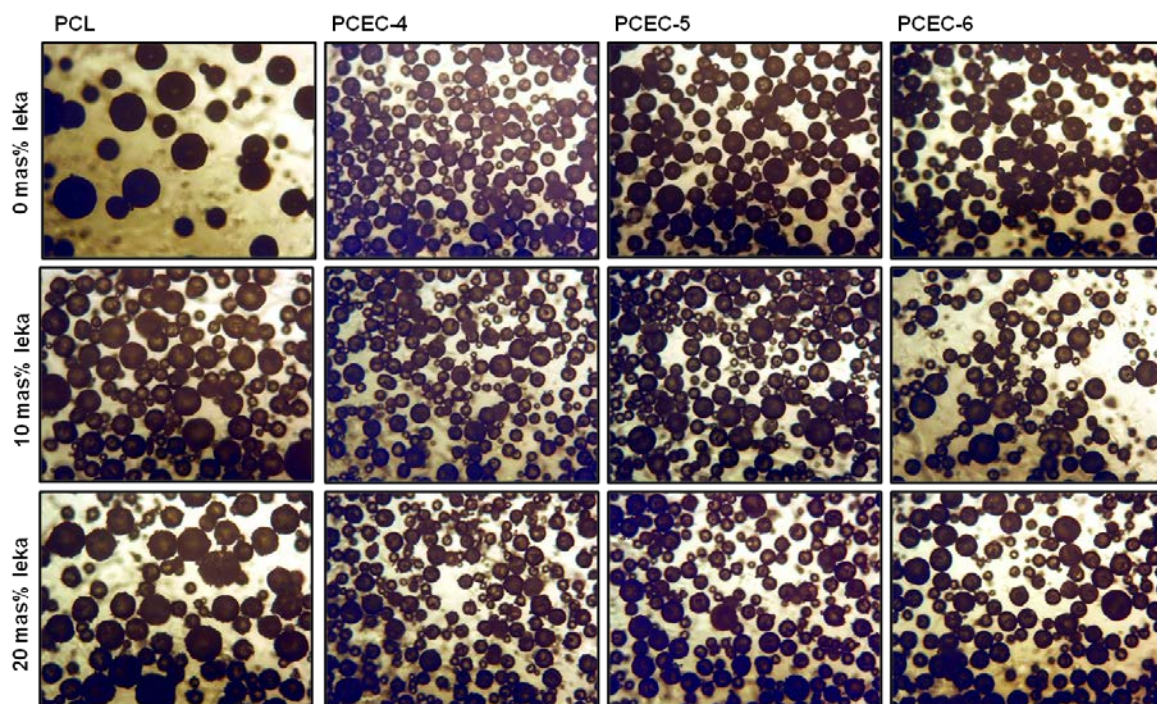
4.14.4. Morfologija PCL i PCEC mikrosfera

Jedan od parametara koji najviše utiču na kinetiku otpuštanja leka iz polimerne matrice je veličina čestica. Ispitivanje morfologije polimernih mikrosfera pomoću optičke mikroskopije i SEM analize je veoma važno za razumevanje profila otpuštanja leka. Veličina čestica zavisi od brojnih faktora među kojima su vrsta upotrebljenog emulgatora, njegova koncentracija, brzina mešanja, molarna masa i koncentracija polimera. [135, 173] U okviru ovog ispitivanja, parametri koji su menjani su bili sastav polimera, molarna masa i koncentracija leka, a uslovi pripreme mikrosfera su bili isti za sve uzorke.

4.14.5. Optička mikroskopija mikrosfera

Optička mikroskopija, kao jednostavna i dostupna metoda ispitivanja i određivanja morfologije čestica, je poslužila kao način da se dobije preliminarni uvid u izgled i veličinu dobijenih mikrosfera. Ova metoda je bila jedna od prvih koja je urađena nakon sušenja pripremljenih čestica, kako bi se utvrdilo da li su dobijene čestice sfernog oblika, da li je došlo do stvaranja agregata, kao i da se dobije informacija o veličini mikrosfera.

Snimljeni mikrografi (Slika 4.41.) prikazuju jasno definisan sferni oblik čestica, koje se međusobno nisu slepljivale i stvarale agregate, kao i izraženu polidisperznost veličine sfera. Mikrografi praznih PCL mikrosfera pokazuju da su pripremljene sfere većih dimenzija u poređenju sa serijom triblok kopolimera. Sastav kopolimera utiče na dimenzije sfera pa tako uvođenjem PEO segmenta u PCL lance, dolazi do smanjenja veličine sfera. Vrednost prečnika mikrosfera je najmanja kod uzorka sa najvećim udelom PEO, dok sa porastom dužine PCL lanaca, dimenzije sfera rastu ali ne dostižu vrednost veličine PCL mikrosfera. Izmerene vrednosti prečnika mikrosfera su prikazane u Tabeli 4.15. Na mikrografu PCL/20 uzorka se očavaju neravnine na površini sfera koje su zapravo adsorbovani kristali ibuprofena koji se nije inkapsulirao u polimernu matricu već je zaostao na površini čestica.



Slika 4.41. Optički mikrofotografije PCL i PCEC mikrosfera pre i posle inkapsulacije ibuprofena.

Fotografije snimljene optičkim mikroskopom su ukazivale da veličina dobijenih PCL i PCEC mikrosfera zavisi od sastava kopolimera, molarne mase, stepena kristaliničnosti i koncentracije inkapsuliranog leka. O uticaju svih pomenutih faktora na dimenzije čestica biće diskutovano u poglavlju SEM analize sfera.

Tabela 4.15. Srednje vrednosti prečnika polimernih mikrosfera i standardna devijacija, SD.

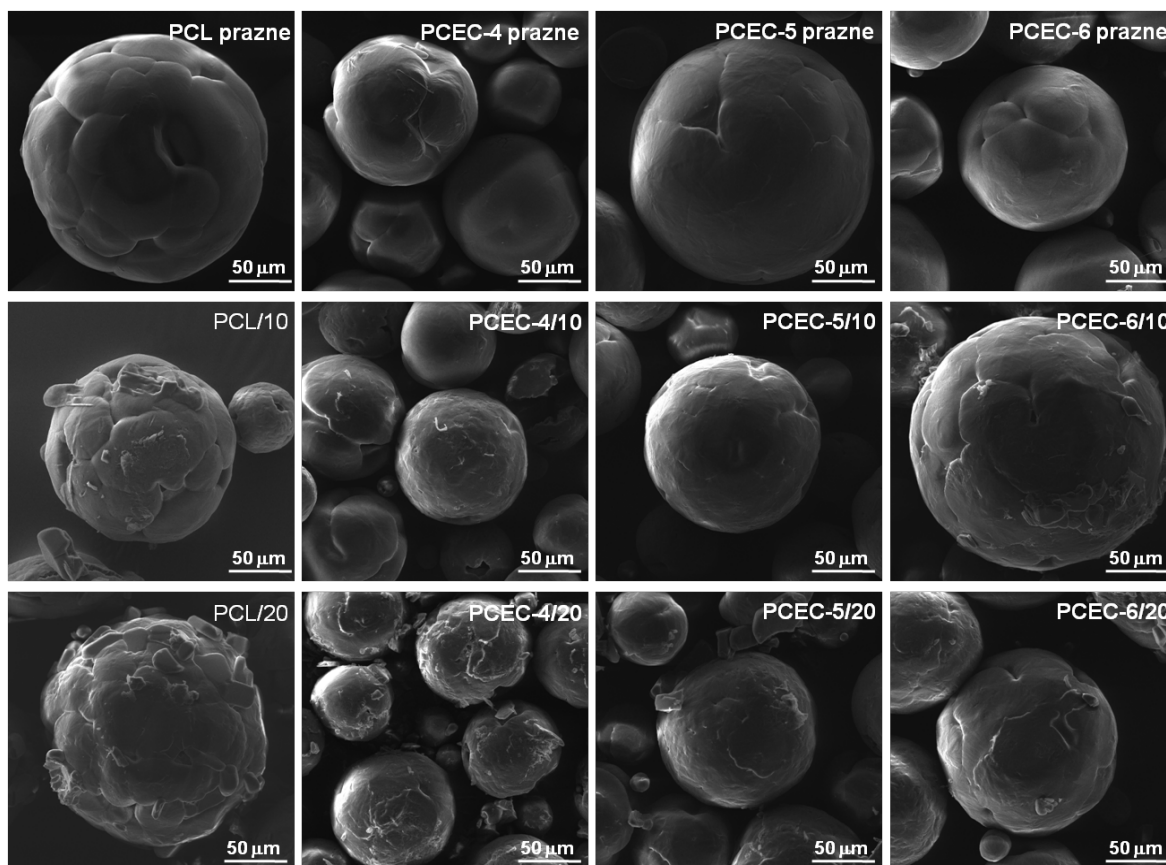
Mikrosfere	Prečnik čestica \pm SD, μm^{a}	Prečnik čestica \pm SD, μm^{b}
PCL prazne	135 ± 38	125 ± 32
PCEC-4 prazne	87 ± 19	90 ± 15
PCEC-5 prazne	110 ± 23	120 ± 23
PCEC-6 prazne	100 ± 23	110 ± 22
PCL/10	120 ± 33	130 ± 31
PCEC-4/10	89 ± 18	85 ± 15
PCEC-5/10	95 ± 22	95 ± 18
PCEC-6/10	95 ± 26	100 ± 23
PCL/20	135 ± 39	135 ± 29
PCEC-4/20	88 ± 19	80 ± 14
PCEC-5/20	90 ± 22	90 ± 14
PCEC-6/20	95 ± 24	110 ± 21

^a na osnovu optičke mikroskopije^b na osnovu SEM analize

Takođe, histogrami raspodele veličine mikročestica, koji su prikazani u Prilogu, su pokazali unimodalnu, široku raspodelu praznih čestica ali i širenje raspodele veličina mikrosfera kao posledicu inkapsulacije leka u polimerni matriks.

4.14.6. SEM analiza mikrosfera

SEM analizom je bilo omogućeno dobiti bolji uvid u morfologiju i izgled površine dobijenih mikrosfera. Snimljeni mikrografi svih uzoraka (Slika 4.42.) potvrđuju sferičan oblik, pojedinačnih, neporoznih mikročestica, kao i odsustvo aglomerata i neodređenih oblika sfera. Površina čestica je većinom glatka bez defekata, a ponegde se mogu uočiti blage neravnine, konkavnog oblika karakteristične za sfere sa manjim sadržajem leka. U slučaju mikrosfera sa 20 mas.% ibuprofena, površina čestica je hrapavija zbog prisustva kristala ibuprofena koji zaostaju na površini. Prisustvo kristala leka adsorbovanih na površini mikrosfera jedva se može uočiti za PCL/10 mikrosfere, a mnogo je izraženije za PCL/20 i PCEC-4/20 polimerne čestice. Ovakva morfologija mikrosfera se može objasniti količinom polimera koja nije bila dovoljna da se potpuno inkapsulira lek u slučaju većeg sadržaja leka (20 mas.%, maseni odnos polimer/lek = 5/1). Pored ovoga, mnogo prihvatljivije objašnjenje jeste da je rastvor polimera sa većim sadržajem leka zasićeniji, pa kao posledica toga dolazi do zaostajanja rastvorene supstance (leka u ovom slučaju) koji kristališe na površini čestica tokom brzog otparavanja rastvarača (hloroforma).[131] Kristali leka koji se izdvajaju na površini mikrosfera za posledicu imaju pojavu inicijalnog brzog otpuštanja leka, o čemu će u daljem tekstu biti detaljnije diskutovano.

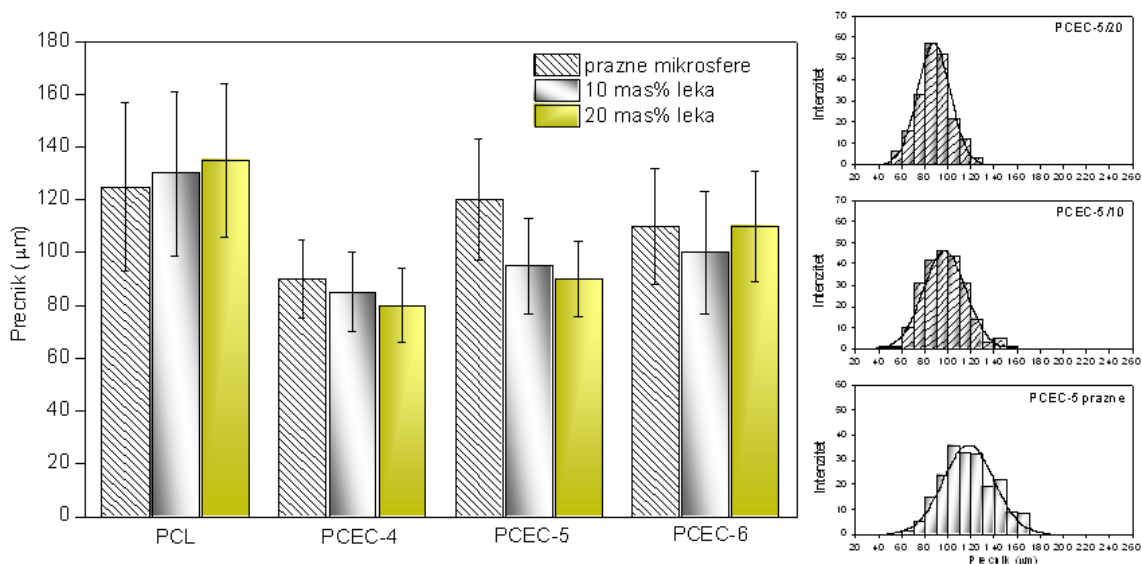


Slika 4.42. SEM mikrografi dobijenih mikrosfera sa i bez inkapsuliranog leka ($U = 1000$).

Određujući vrednosti prečnika dobijenih mikrosfera na osnovu SEM analize, došlo se do zaključka da molarna masa, prisustvo PEO segmenta, tj. sastav kopolimera i koncentracija leka imaju uticaj na veličinu čestica (Tabela 4.15.). U seriji praznih mikrosfera, PCL mikrosfere su najvećih dimenzija, 125 μm . Kako je PCL homopolimer, vrednost prečnika sfera je pre svega određena molarnom masom polimera, koja je najveća u poređenju sa blok kopolimerima (M_n , 62970 g/mol). Najmanja srednja vrednost prečnika sfera je izmerena za blok kopolimer PCEC-4 (90 \pm 15 μm) usled prisustva najvećeg sadržaja PEO (1,7 mas%) u seriji ali i najmanje vrednosti molarne mase (M_n , 33940 g/mol). Sa porastom molarne mase blok kopolimera u seriji, raste većina čestica [174], pa su tako vrednosti prečnika PCEC-5 i PCEC-6 mikrosfera 120 i 110 μm , redom. Mala razlika u veličini mikrosfera ova dva kopolimera se može objasniti malom razlikom u njihovoj vrednosti molarne mase (41240 u odnosu na 44550 g/mol). Koncentracija leka prvenstveno ima uticaja na viskoznost organske faze, što dalje može uticati na prečnik dobijenih sfera, odnosno može doći do njegovog porasta nakon inkapsulacije ibuprofena. Inkapsulacija ibuprofena u polimernu matricu prouzrokovala je neznatno smanjenje prečnika sfera kod uzorka PCEC-4/10, PCEC-4/20, dok su veličine čestica PCEC-5/10, PCEC-5/20, i PCEC-6/10, PCEC-6/20 ostale nepromenjene u

poređenje sa odgovarajućim praznim sferama. Prisustvo leka u PCL polimernoj matrici, kao i njegov veći sadržaj, takođe nisu doveli do promena u veličini čestica. Na osnovu SEM analize, otkriveno je da su promene u veličini čestica izazvane inkapsulacijom leka u polimernu matricu, prisutne u slučaju polimernih uzoraka kod kojih je procenat PEO segmenta iznosio 1,3 mas%.

Snimljeni SEM mikrofotografije su iskorišćeni za određivanje raspodele mikrosfera i na osnovu dobijenih histograma (Slika 4.43.) se uočava unimodalna, široka raspodela veličine dobijenih čestica za sve uzorke. Prikazani histogrami pokazuju da je raspodela PCL i PCEC-5 mikrosfera bez leka šira u poređenju sa ostalim sferama bez leka, ali i da PCEC-4 mikrosfere imaju najmanje čestice i najužu raspedelu. Pored male promene u vrednosti prečnika veličine PCL, PCEC-4 i PCEC-6 sfera nakon inkapsulacije ibuprofena, i njihova raspodela je ostala nepromenjena. Povećanje prečnika mikrosfera nakon inkapsulacije leka ukazuje da je lek uspešno inkapsuliran unutar polimerne matrice. [175] Kod IB inkapsuliranih mikrosfera unutar PCEC-5 polimernog matriksa, pored smanjenja vrednosti prečnika sfera u odnosu na prazne sfere, zapaža se uniformija raspodela veličine čestica kako za 10, tako i za 20 mas% inkapsuliranog leka. Sa porastom dužine PCL segmenata u seriji triblok kopolimera, dolazi do širenja raspodele veličina sfera, kao što je slučaj za uzorak PCEC-6.



Slika 4.43. Uticaj inkapsulacije leka na prečnik dobijenih mikrosfera i njihovu raspodelu.

Vrednosti prečnika mikrosfera određene na osnovu optičke mikroskopije i SEM analize su bile u saglasnosti, a raspodele veličine čestica izračunate primenom ove dve metode su bile veoma slične.

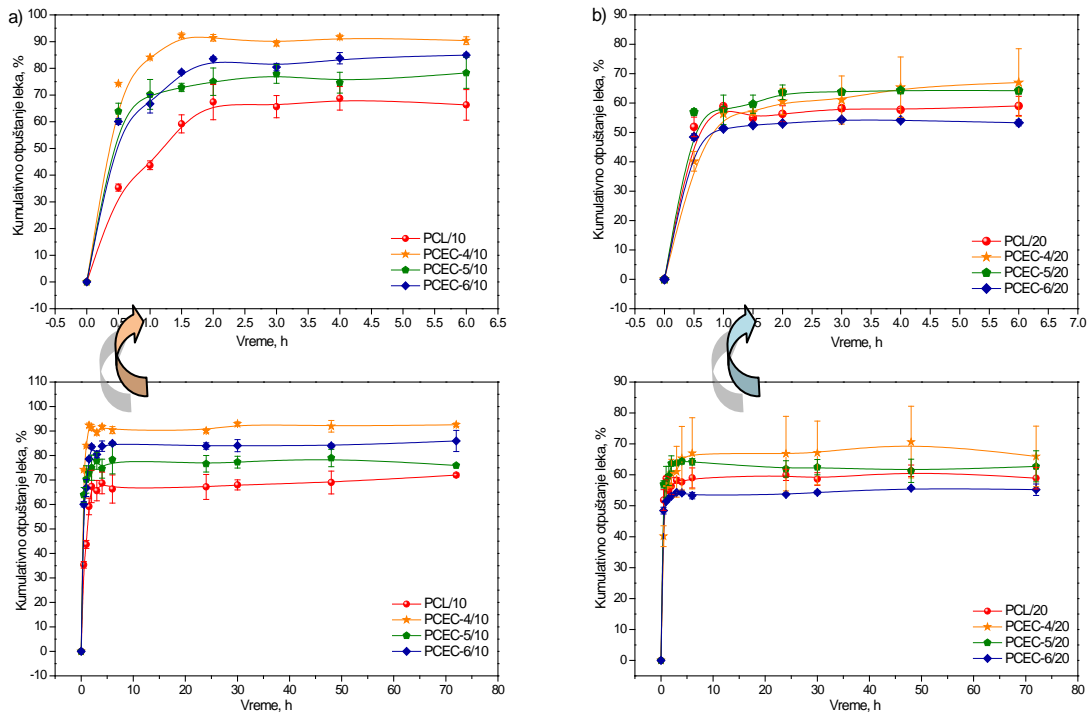
4.14.7. In vitro otpuštanje ibuprofena iz PCL i PCEC polimerne matrice

Konvencionalnim naćom isporuke lekova se ne moŹe obezbediti kontinuirana isporuka lekova na duŹi vremenski period, kao ni odrŹavanje odgovarajuće koncentracije leka konstantnom. Prilikom primena polimernih matrica kao nosaća lekova prvenstveno mora biti zadovoljen uslov kontrolisanog oslobađanja leka tokom duŹeg vremenskog perioda. Kinetika otpuštanja leka iz polimerne matrice moŹe zavistiti od mnogih faktora, kao Źto su: molarna masa polimera, kristalinićnost polimera, dispergovanost leka unutar polimerne matrice, raspodela velićine mikroćestica, i svi pomenuti parametri mogu diktirati kinetiku otpuštanja leka. [176] U realnim sistemima je teŹko postići konstantno otpuštanje leka tokom vremena i profili otpuštanja leka imaju dve oblasti: prva oblast obuhvata inicijalno, brzo otpuštanje leka, tzv. "burst effect", i oblast kada kriva otpuštanja leka ulazi u plato, i sa vremenom ne dolazi do promene koncentracije oslobođenog leka. U poćetnoj fazi, do inicijalnog, brzog otpuštanje leka dolazi kao posledica dispergovanosti leka u blizini površine ćestica, dok je proces kontinuiranog otpuštanja leka u drugoj fazi kontrolisan procesom difuzije i degradacije polimernog matriksa. [174, 177]

Profili *in vitro* otpuštanja u fosfatnom puferu (pH 7,4; na 37 °C) tokom 72 h (Slika 4.44.) prikazuju inicijalno, brzo otpuštanje leka za sve ispitivane uzorke, a ovaj tzv. "burst effect" je naroćito izraŹen kod uzoraka sa 20 mas.% inkapsuliranog ibuprofena najverovatnije usled prisustva zaostalih kristala leka na površini mikrosfera, pa se inicijalno otpušta lek sa površine sfera. Nakon inicijalno brzog otpuštanja leka u prvoj fazi, koji prati period sporijeg otpuštanja leka, kriva otpuštanja leka ulazi u plato kad je dostignuta konstantna koncentracija otpuštenog leka za sve ispitivane uzorke, i ne beleŹi se dalje otpuštanje leka tokom 72 h. Efekat inicijalnog otpuštanja leka u prvih nekoliko sati nije izraŹen kod PCL/10 mikrosfera, najverovatnije kao posledica hidrofobne prirode homopolimera PCL. Usled velike hidrofobnosti polimerne matrice, onemogućeno je prodiranje molekula vode kroz polimernu matricu, ćime se usporava proces difuzije. Analizirajući profile otpuštanja ibuprofena kada je njegov sadrŹaj u polimernoj matrici 10 mas.% (Slika 4.44.a), zakljućuje se da je kinetika otpuštanja leka određena molarnom masom polimera, velićinom ćestica, kao i stepenom kristalinićnosti. Najveća vrednost molarne koja je rezultovala najvećim dimenzijama sfera (130 µm), kao i vrednost X_c od 64,5 %, odgovorni su za kontinuirano otpuštanje leka i manje izraŹeno inicijalno otpuštanje leka iz PCL polimerne matrice u poređanju sa blok kopolimerima. U seriji mikrosfera sa 10 mas.% leka, najveći uticaj na kinetiku otpuštanja leka ima molarna masa, ali pre svega velićina ćestica

(koja je diktirana molarnom masom polimera). U slučaju inkapsulacije manjeg sadržaja leka u polimernu matricu, kristaliničnost uzoraka nije imala uticaja na kinetiku otpuštanja leka, prvenstveno jer su vrednosti stepena kristaliničnosti ovih polimernih čestica bile veoma slične. PCEC-4/10 mikrosfere imaju male vrednosti prečnika kao posledica najmanje vrednosti molarne mase polimernog matriksa u seriji blok kopolimera, čime je povećana ukupna površina mikrosfera, stoga se najveći procenat leka oslobađa upravo iz PCEC-4/10 sfera. Sa druge strane, veličina mikrosfera PCEC-5 i PCEC-6 je bila slična što se odrazilo i na profile otpuštanja ibuprofena koji su se malo razlikovali, naročito u prvih 6 h. Uprkos sinergističkom uticaju više faktora na otpuštanje ibuprofena iz ispitivanih polimernih uzoraka, zaključuje se da se lek iz blok kopolimerne matrice brže otpušta i obezbeđuje se veći sadržaj leka u ispitivanom medijumu usled prisustva PEO bloka kao centralnog segmenta u poređenju sa homopolimernom PCL matricom iz koje se lek sporije otpušta i manje je izražen "burst effect".

Iako se pretpostavljao sličan trend u profilima otpuštanja ibuprofena čiji je sadržaj bio 20 mas.%, rezultati prikazani na Slici 4.44.b ukazuju da je kinetika otpuštanja leka kontrolisana i određena stepenom kristaliničnosti polimerne matrice. Uticaj kristaliničnosti polimernog matriksa nije dominantan faktor jedino kod uzorka PCEC-4/20 gde su male dimenzije čestica i razvijena površina pre svega diktirala otpuštanje leka. Iako su PCL/20 mikrosfera bile relativno velikih dimenzija (135 μm), manja vrednost X_c (54,9 %) u odnosu na blok kopolimer PCEC-6/20 (61,3 %) uzrok je većeg procenta otpuštanja ibuprofena iz PCL polimerne matrice. Nakon inkapsulacije 20 mas.% leka u polimernu matricu, vrednost stepena kristaliničnosti PCL se drastično smanjila što je dalje uticalo na kinetiku otpuštanja leka. Uprkos semikristalnoj strukturi i hidrofobnosti PCL polimerne matrice, smanjenje stepena kristaliničnosti omogućilo je prolazak molekula vode u amorfne regije polimera i neometanu difuziju, manifestujući se bržim otpuštanjem leka.



Slika 4.44. Profili otpuštanja ibuprofena iz polimerne matrice PCL i PCEC mikrosfera: a) 10 mas.% leka b) 20 mas.% leka.

Kinetika otpuštanja leka se može opisati i pomoću parametara kao što su $t_{x\%}$, (vreme potrebno da se oslobodi određeni procenat leka, npr. $t_{50\%}$, $t_{60\%}$, $t_{70\%}$, "sampling time") i efikasnost rastvaranja, DE (dissolution efficiency). [124] Efikasnost rastvaranja se može izračunati primenom jednačine:

$$DE = \frac{\int_0^t y \times dt}{y_{100} \times t} \times 100 \quad (4.13.1.)$$

gde je $\int_0^t y \times dt$ površina ispod krive otpuštanja leka tokom određenog vremena, t , a vrednost $y_{100} \times t$ odgovara površini pravougaonika koji odgovara 100 % rastvaranja za određeno vreme; y je procenat leka rastvoren/otpušten u vremenu t .

Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.16. Ibuprofen se najbrže oslobađa iz PCEC-4/10 polimerne matrice, a čak 70 mas.% leka se oslobodi nakon samo 30 minuta. Velika količina leka oslobođena nakon samo 30 minuta je ukazivala na izražen efekat inicijalnog brzog otpuštanja leka. Efikasnost rastvaranja/otpuštanja ibuprofena za PCEC-4/10 je takođe bila velika, 91 %, u poređenju sa ostalim blok kopolimernim matricama, a mnogo veća u odnosu na PCL/10, čija je vrednost DE iznosila 68 %. Nakon 1,5 h praćenja otpuštanja leka iz PCL/10 mikrosfera, 60 mas.% ibuprofena je otpušteno što je bilo sporije u poređenju sa blok kopolimerima. Manje izraženo inicijalno brzo otpuštanje leka iz polimera je utvrđeno za PCEC-5/10 i PCEC-6/10 uzorke u poređenju sa PCEC-4/10 mikrosferama, ali je i za ove

uzorke utvrđeno da otpuste oko 60 mas.% nakon 30 minuta praćenja. Vreme za koje se otpusti 50 mas% leka iz polimerne matrice, $\tau_{50\%}$, za mikrosfere kod kojih je sadržaj leka iznosio 20 mas.%, ukazivao je inicijalno brzo otpuštanje leka prisutno kod svih uzoraka. Kako je već objašnjeno, inicijalna faza otpuštanja velikog procenta leka je posledica njegovog prisustva na površini sfera. Na osnovu dobijenih vrednosti parametara $\tau_{50\%}$, $\tau_{60\%}$, $\tau_{70\%}$ i DE su dobijene važne informacije kao što je da se 60 mas.% ibuprofena kasnije otpusti iz PCL/20 i PCEC/20 u odnosu na količinu leka koja se otpusti iz mikrosfera sa 10 mas.% leka (nakon 48 h za PCL, 2 h za PCEC-4, 1,5 h za PCEC-5 i nakon 72 h za PCEC-6 sfere). Manji procenat otpuštenog leka iz polimernog matriksa gde je njegov sadržaj veći (20 mas.%) može se objasniti zaostajanjem kristala ibuprofena na površini mikrosfera (što je i potvrđeno pomoću FTIR i SEM analize), koji, pored toga što dovodi do izraženog inicijalnog otpuštanja leka, može onemogućiti prolazak molekula vode u polimerni matriks i time otežati proces difuzije.

Tabela 4.16. Parametri koji karakterišu otpuštanje leka: vreme otpuštanja ($\tau_{50\%}$, $\tau_{60\%}$, $\tau_{70\%}$), efikasnost rastvaranja (DE); oslobođena koncentracija leka nakon 24 sata.

Mikrosfere	$\tau_{60\%}$, h	$\tau_{70\%}$, h	DE, %	c_{24h} , ppm	$\tau_{50\%}$, h	$\tau_{60\%}$, h	DE, %	c_{24h} , ppm
	10 mas.% leka				20 mas.% leka			
PCL	1,5	72	68	67,2	0,5	48	59	91,2
PCEC-4	< 0,5	0,5	91	90,1	0,5 – 1	2	67	103,0
PCEC-5	0,5	1	77	76,6	< 0,5	1,5	62	74,3
PCEC-6	0,5	1 – 1,5	84	83,9	< 0,5	> 72	54	77,3

U cilju ispitivanja i poređenja koncentracija otpuštenog ibuprofena iz različitih polimernih matrica, određena je koncentracija leka koja se otpusti u ispitivani medijum nakon 24 h praćenja, c_{24h} , kao dodatnog parametra kinetike otpuštanja ibuprofena. Parametar c_{24h} je izabran jer za ovo vreme koncentracija leka otpuštenog iz svih ispitivanih polimera ulazi u plato, odnosno nakon 24 h koncentracija leka je ostaje konstantna tokom vremena jer ne dolazi do daljeg otpuštanja leka. Za seriju pripremljenih mikrosfera sa 10 mas.% sadržaja leka, koncentracija otpuštenog leka je bila veća u slučaju blok kopolimera, ukazujući da se uvođenjem kratkog PEO segmenta u lance PCL može uticati na kinetiku otpuštanja leka iz polimerne matrice. Koncentracija oslobođenog leka iz PCEC-4/10 polimerne matrice nakon 24 h je iznosila 90,1 ppm, i ova koncentracija leka se dalje nije menjala. Sa porastom sadržaja PCL segmenta u kopolimerima, manja maksimalna koncentracija otpuštenog leka je detektovana: 76,6 ppm za uzorak PCEC-5/10 i 83,9 ppm za PCEC-6/10 mikrosfere. PCL

mikrosfere u kojima je sadržaj leka bio 20 mas%, nakon 24 h otpuste 91,2 ppm ibuprofena i ovo je maksimalna koncentracija leka zabeležena tokom 72 h ispitivanja. Veći sadržaj PEO bloka u kopolimerima, i u ovoj seriji mikrosfera, obezbeđuje najveću koncentraciju oslobođenog IB nakon 24 h, oko 103,0 ppm, dok je kod ostalih kopolimernih čestica, oslobođena koncentracija IB manja, za PCEC-5/20 iznosi 74,3 ppm, a za PCEC-6/20 77,3 ppm. Ovu rezultati ukazuju da su profili otpuštanja leka definisani različitim parametrima kao što su: vrsta polimernog matriksa, priroda leka, a pre svega rastvorljivost leka u vodenoj sredini, zatim molarna masa polimera i interakcije koje se uspostavljaju između polimera i leka. [115] Rastvorljivost ibuprofena u puferu i interakcije između polimernog matriksa i leka, kao važni parametri koji kontrolišu otpuštanje leka, su imali značajan uticaj na kinetiku otpuštanja leka iz pripremljenih mikrosfera. [109]

Važno je napomenuti da informacije dobijene na osnovu ovih parametara ne mogu jasno i precizno definisati kinetiku otpuštanja leka iz polimerne matrice, ali zajedno sa primenom matematičkih modela, o kojima će u daljem tekstu biti diskutovano, može se dobiti uvid u mehanizam otpuštanja leka iz polimera.

4.14.8. Primena matematičkim modela na profile otpuštanja ibuprofena iz PCL i PCEC polimerne matrice

Homopolimer PCL je semikristaliničan polimer koji sporo degradira u fiziološkim uslovima (pH 7,4, 37 °C), ima veliku propustljivost za lekove male molarne mase. Zbog veoma spore degradacije, [59] lek će se iz polimerne matrice oslobađati procesom difuzije pre nego usled degradacije polimernog matriksa. [178] U cilju ispitivanja mehanizma otpuštanja leka iz polimera, moguće je primeniti različite matematičke modele. [121, 126] Jedan od modela, veoma jednostavna, semi-empirijska jednačina koja može opisati kinetiku oslobađanja leka iz polimerne matrice, jeste tzv. "stepeni zakon" ("power law") ili *Peppas*-ov model [127]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4.13.2.)$$

gde je M_t – ukupna količina leka otpuštenog u vremenu t , M_∞ je ukupna količina leka otpuštenog u beskonačnom vremenu (koja može biti jednaka količini inkapsuliranog leka unutar sistema za vreme $t = 0$); M_t/M_∞ je frakcija leka oslobođena u vremenu t , k je konstanta kontrolisanog otpuštanja, t je izmereno vreme, a n je difuzioni eksponent. Za sfernu geometriju, kada je vrednost $n = 0,43$, mehanizam otpuštanja leka se odigrava Fikovom difuzijom, dok vrednost $n = 0,85$ ukazuje na ne – Fikov mehanizam difuzije leka. Vrednosti

koeficijenta difuzije između pomenute dve granične vrednosti su karakteristične za anomalni transport leka kroz polimernu matricu.

Pored jednačine koja opisuje "stepeni zakon", za određivanje kinetike otpuštanja ibuprofena će biti korišćena i Higuchi-jeva jednačina: $\frac{M_t}{M_\infty} = K\sqrt{t}$ (4.13.3.)

Matematički modeli koji su korišćeni u ovom radu mogu poslužiti za poređenje različitih profila otpuštanja leka a potpuno realno mogu opisati samo ekstremne, granične slučajeve.

Vrednosti odgovarajućih parametara izračunatih primenom matematičkih modela se nalaze u Tabeli 4.17. Vrednost korelacionog koeficijenta, R, koja je za sve uzorke bila iznad 0,99, pokazala je najbolje slaganje kod primene *Peppas* – ovog modela. Izračunata vrednost n za PCEC kopolimerne mikrosfere (ispod 0,43) ukazuje da je glavni mehanizam oslobađanja leka iz polimerne matrice Fikova difuzija. Nasuprot PCEC mikrosferama, vrednost difuzionog koeficijenta za PCL/10 mikrosfere je bila 0,5, što odgovara anomalnom transportu leka kroz polimernu matricu. Kako je vrednost $n = 0,5$ veoma bliska graničnoj vrednosti od 0,43, može se reći da je otpuštanje ibuprofena iz PCL/10 mikrosfera uglavnom difuziono kontrolisano. Konstante otpuštanja IB iz PCEC blok kopolimera su imale veće vrednosti u odnosu na PCL u seriji sa 10 mas.% sadržaja leka u polimerima, pri čemu je vrednost k rasla sa porastom udela PEO segmenta u blok kopolimerima. Kada je sadržaj leka u polimernim matricama iznosio 20 mas.%, vrednost difuzionog koeficijenta definisana na osnovu *Peppas* - ove jednačine ukazala je na Fikovu difuziju kao mehanizam otpuštanja IB iz svih ispitanih mikrosfera. Konstante otpuštanja leka za seriju sa 20 mas.% IB su bile najveće za PCL/20 i PCEC-6/20 mikrosfere, iako je bilo očekivano da najveća vrednost k bude upravo za PCEC-4 polimer koji oslobađa najveću količinu ibuprofena. Ovako neočekivan trend vrednosti k se može objasniti prvenstveno prisustvom leka na površini sfera koji dovodi do izraženog inicijalnog, brzog otpuštanja leka, ali i brojem tačaka koje su uzete za proračune, u ovom slučaju tokom prva 4 sata.

Analizom parametara izračunatih primenom *Higuchi* – jevog modela, a pre svega vrednost korelacionog koeficijenta, koji je u nekim slučajevima bio oko 0,87, može se reći da ovaj model nije najpogodniji za primenu na ispitanom sistemu i da se prvi (*Peppas*) pokazao kao bolji izbor.

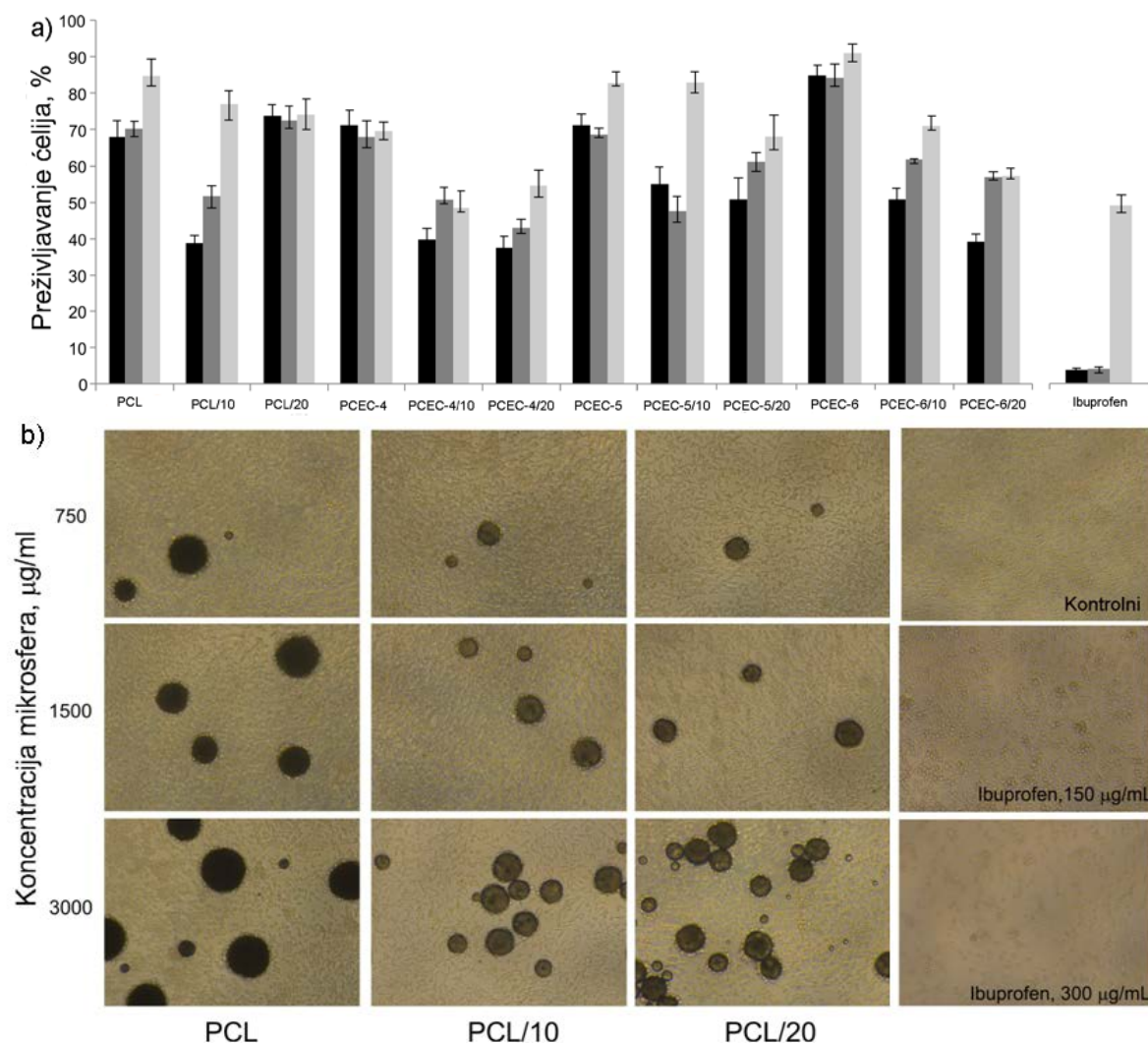
Tabela 4.17. Izračunati parametri različitih modela otpuštanja IB iz polimernih mikrosfera sa 10 i 20 mas.% leka.

Mikrosfere	<i>Peppas - ov model</i>			<i>Higuchi - jev model</i>		Mehanizam
	k	n	R	k	R	
PCL/10	0,69	0,50	0,9966	0,70	0,9966	<i>Anomalni transport</i>
PCEC-4/10	0,90	0,16	0,9988	0,82	0,9366	
PCEC-5/10	0,89	0,14	1,0000	0,80	0,9319	<i>Fikova difuzija</i>
PCEC-6/10	0,79	0,29	0,9818	0,75	0,9630	
PCL/20	0,92	0,05	0,9963	0,81	0,8739	<i>Fikova difuzija</i>
PCEC-4/20	0,77	0,27	0,9935	0,72	0,9666	
PCEC-5/20	0,87	0,08	0,9989	0,77	0,8981	
PCEC-6/20	0,94	0,07	0,9999	0,83	0,8917	

Na kraju, ovo istraživanje je potvrdilo da se PCL i PCEC blok kopolimerne mikrosfere zaista mogu koristiti kao matrice za kontrolisano otpuštanje ibuprofena i da je tzv. "burst effect" izraženiji kod kopolimera sa većim sadržajem hidrofilne komponente u svom sastavu. Otpuštanje ibuprofena iz PCL polimerne matrice se odigrava sporije, sa manje izraženim inicijalnim brzim otpuštanjem leka, ali količina oslobođenog leka je manja u poređenju sa PCEC blok kopolimerima, kao posledica hidrofobnosti PCL polimerne matrice i sporije difuzije molekula vode i leka. Pored uticaja sastava kopolimera na kinetiku otpuštanja leka, sadržaj inkapsuliranog leka, takođe, predstavlja jedan od faktora koji diktiraju otpuštanje leka iz polimerne matrice. Zaostajanje kristala leka na površini mikrosfera, koji dalje dovodi do pojave inicijalnog brzog otpuštanja leka, može se izbeći podešavanjem, kako masenog odnosa polimer-lek, tako i podešavanjem uslova pripreme mikročestica.

4.15. In vitro testovi ispitivanja citotoksičnosti dobijenih mikrosfera sa ibuprofenom

Ispitivanje citotoksičnih svojstava biodegradabilnih polimera i njihovih formulacija sa lekom je veoma važno ukoliko je krajnji cilj njihova potencijalna primena u oblasti biomedicine. Procenat preživelih ćelija nakon inkubiranja sa praznim i mikrosferama sa ibuprofenom upoređen je sa kontrolnim uzorcima, ali i sa ćelijama tretiranim samo ibuprofenom (Slika 4.45.).



Slika 4.45. Citotoksična aktivnost praznih i mikrosfera sa ibuprofenom testirana na humanim ćelijama - fibroblastima pluća: a) procenat preživelih ćelija nakon izlaganja koncentracijama od 750 (□), 1500 (▣) i 3000 µg/mL mikrosfera i 150 (□), 300 (▣) and 600 µg/mL (■); b) Morfologija ćelija nakon tretiranja tokom 48 h (uvećanje 20 puta).

Rezultati testiranja su pokazali da prazne PCL i PCEC mikrosfere nisu toksične za tretirane ćelije u koncentracijama do 3 mg/ml. Mala citotoksičnost utvrđena za veće koncentracije mikrosfera nastaje kao posledica fizičkog stresa i ograničenog prostora za rast ćelija usled prisustva mikrosfera. Ćelije izložene većim koncentracijama mikrosfera su zadržale svoju normalnu morfologiju i pri ovim koncentracijama (Slika 4.45.b). Ćelije tretirane čistim lekom, ibuprofenom, u koncentracijama od 5, 10 i 20 mas.% računato na masu mikrosfera, a to je 150, 300 i 600 µg/ml, redom, su pokazale manji stepen preživljavanja. Nakon izlaganja ćelija koncentraciji od 150 µg/ml, procenat preživelih ćelija je bio 60 %, dok je samo 5 % ćelija opstalo nakon njihovog tretmana većim koncentracijama ibuprofena (Slika 4.46.a). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ispitivanjem citotoksičnosti ibuprofena na ćelijama jetre pastrmke. [179] Najveću citotoksičnost su imale mikrosfere

PCEC-4 sa ibuprofenom, kao i PCEC-6 mikrosfere sa lekom kod kojih je procenat preživelih ćelija iznosio 50 %, odnosno 70 % pri najmanjim koncentracijama, 750 µg/ml. Ovakvi rezultati se mogu objasniti kinetikom otpuštanja leka iz PCEC-4 i PCEC-6 mikrosfera, jer se upravo iz pomenutih polimernih matrica oslobađa najveći procenat leka tokom vremena (Tabela 4.18.). Kako se iz PCEC-4 polimernih mikrosfera oslobađa veća koncentracija ibuprofena u prvih nekoliko sati, detektovana je i veća citotoksičnost za ove mikrosfere tokom 48 h. Kod blok kopolimernih mikrosfera iz kojih se otpušta manja koncentracija leka (PCEC-5/10 i PCEC-6/10), beleže se i manji citotoksični efekti.

Netoksična svojstva dobijenih mikrosfera unutar kojih je inkapsuliran ibuprofen, i njihova mala toksičnost u većim koncentracijama leka, ukazuju na mogućnost njihove primene kao nosača, ne samo ibuprofena, već i drugih hidrofobnih lekova, kada je potrebno postići oslobađanje leka tokom dužeg perioda. Kinetika otpuštanja leka iz PCL/PEO triblok kopolimera je određena i kontrolisana sastavom i strukturom kopolimera, kao i koncentracijom inkapsuliranog leka. Promena sastava i odnosa polimer/lek može predstavljati jedan od načina i pristupa u dizajniranju novih formulacija lekova.

5. Zaključak

Dve serije triblok kopolimera i jedna serija diblok kopolimera sa malim sadržajem hidrofilnog, amornog poli(etilen-oksida), kao centralnog, odnosno lateralnog segmenta su uspešno sintetisane polimerizacijom otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona u prisustvu katalizatora kalaj-oktoata, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$.

Struktura i sastav kopolimera su potvrđeni ^1H i ^{13}C NMR analizom. Vrednosti molarnih masa za sve sintetisane serije blok kopolimera su se kretale u intervalu od 22000 do 44450 g/mol, čime je utvrđeno da su dobijeni kopolimeri željenih molarnih masa i dužina segmenata. Maseni udeo hidrofilne komponente, PEO (1000 g/mol), u seriji triblok kopolimera je bio u opsegu od 2,8 do 4,5 mas%, dok je u drugoj seriji triblok kopolimera, sadržaj PEO (400 g/mol) iznosio od 1,2 do 1,7 mas%. U seriji diblok kopolimera, maseni udeo m-PEO je bio u intervalu od 2,5 do 4,7 mas%. Kvantitativnom ^{13}C NMR spektroskopijom je utvrđeno da su sve hidroksilne grupe iz pretpolimera PEO i m-PEO potpuno proreagovale gradeći estarsku vezu sa PCL lancima, na osnovu čega je potvrđena blok struktura kopolimera.

Molarna masa srednja po brojnoj zastupljenosti (M_n) sintetisanih kopolimera određena GPC analizom kretala se od 30480 do 48170 g/mol, dok je vrednost indeksa polidisperznosti kopolimera iznosila od 1,60 do 2,00. Najveću vrednost molarne mase je imao homopolimer PCL, 62970 g/mol, a vrednost indeksa polidisperznosti je bila 2,07.

DSC analiza je pokazala male razlike u temperaturama topljenja blok kopolimera, ali i da sa porastom PCL segmenata u kopolimerima, vrednost T_m u seriji raste. Prisustvo amornog PEO segmenta male dužine nije imalo velikog uticaja na topljenje blok kopolimera i T_m je zavisila od sadržaja PCL segmenata. Vrednosti entalpija topljenja sintetisanih polimera potvrdile su da uvođenje PEO bloka u lance PCL, uprkos malom sadržaju, ima uticaja na termička svojstva. Blok kopolimeri sa najvećim sadržajem PEO segmenta imaju najmanje vrednosti entalpije topljenja, dok sa porastom dužine PCL segmenata, vrednost entalpije topljenja raste. Na osnovu vrednosti stepena kristaliničnosti blok kopolimera, zaključeno je da kristaliničnost sintetisanih uzoraka ne zavisi samo od sastava i udela PEO i PCL segmenata, već i od položaja amornog PEO bloka. Najmanju vrednost X_c imaju diblok i triblok kopolimeri sa najvećim udelom PEO bloka, dok sa porastom dužine PCL segmenata, raste i vrednost stepena kristaliničnosti. Triblok i diblok kopolimeri istog sastava i iste molarne mase pokazali su razlike u kristalizacionom ponašanju usled različitog položaja PEO segmenta. Diblok kopolimeri su imali veću vrednost X_c zbog lateralnog položaja PEO blok

koji tako vezan manje ometa kristalizaciju PCL u poređenju sa triblok kopolimerima. Homopolimer PCL je pokazao najveću vrednost T_m , entalpije topljenja i stepena kristaliničnosti.

Najveće razlike između sintetisanih triblok i diblok kopolimera su potvrđene na osnovu termogravimetrijske analize. Prisustvo jednog pika u DTG termogramu PCL-a ukazuje da se ovaj homopolimer termički razlaže u jednom koraku, ili se dva degradaciona koraka odigravaju istovremeno: nasumično raskidanje lanaca i raskidanje polimernih lanaca sa krajeva. Svi triblok kopolimeri, bez obzira na dužinu PEO, degradiraju u dva koraka: u prvom stupnju dolazi do degradacije PEO bloka, a u drugom degradacionom koraku dolazi do raskidanja veza unutar PCL lanaca. Nasuprot triblok kopolimerima, diblok kopolimeri se termički razgrađuju u jednom koraku, slično PCL-u. Pored različitog mehanizma degradacije triblok i diblok kopolimera, diblok kopolimeri pokazuju veću stabilnost u odnosu na triblok kopolimere.

WAXS analizom je potvrđeno da je PCL jedina kristalna faza u blok kopolimerima ali i da, u zavisnosti od položaja PEO segmenta, dolazi do pomeranja karakterističnih pikova. Karakteristični pikovi u difraktogramima triblok kopolimera se pomeraju ka većim vrednostima 2θ , dok se pikovi diblok kopolimera pomeraju ka nižim vrednostima 2θ kao posledica promena dimenzija kristalne jedinične ćelije. Vrednosti X_c određene na osnovu WAXS analize su bile najmanje za kopolimere sa najvećim udelom PEO, dok je vrednost stepena kristaliničnosti rasla sa porastom dužine PCL segmenata.

Rezultati DMA analize su pokazali da sintetisani polimeri u rastopu ispoljavaju jednostavno reološko ponašanje i uniformnu temperaturnu zavisnost. Za sve reološke parametre je važio princip superpozicije vreme-temperatura, što je omogućilo konstrukciju njihovih zbirnih krivih zavisnosti. Za sve polimerne uzorke u oblasti niskih frekvencija, zavisnost modula elastičnosti i modula izgubljene energije od frekvencije, $G' \sim \omega^2$ i $G'' \sim \omega$, koja važi za homogene rastope je potvrđena. Reološka ispitivanja su pokazala da uvođenje PEO segmenata u polimerne lance povećava viskoznost rastopa i energiju aktivacije tečenja. Viskoznost rastopa triblok kopolimera je bila veća u poređenju sa diblok kopolimerima. Zavisnost viskoznosti rastopa polimera od molarne mase je potvrdila da svi sintetisani polimeri imaju molarne masu veću od kritične molarne mase, M_c , tj. da su sposobni za prepletaje. Sintetisani PCL/PEO blok kopolimeri poseduju niže temperature ostakljivanja i manje module sačuvane energije na sobnoj temperaturi u odnosu na homopolimer PCL. T_g sintetisanih polimera se povećavala sa povećanjem stepena kristaliničnosti, dok se intenzitet

α -prelaza smanjivao. Na temperaturama ispod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ uočene su kod svih uzoraka β -relaksacije tj. sekundarni relaksacioni prelazi.

Testovi ispitivanja apsorpcionih svojstava, apsorpcije vode i vlage, ukazali su na malu hidrofilnost sintetisanih blok kopolimera. Triblok kopolimer sa najvećim sadržajem PEO (1000 g/mol) je apsorbovao oko 4 mas.% vode posle 72h, a vrednost apsorpcije vode je opadala sa porastom udela PCL segmenata. Diblok kopolimerna serija uzoraka je imala bolja hidrofilna svojstva u poređenju sa triblok kopolimernim filmovima, pa je i diblok kopolimer sa najmanjim udelom PEO apsorbovao oko 3 mas.% vode. Test apsorpcije vlage potvrdio je malu hidrofilnost ispitanih uzoraka, ≤ 2 mas.% vlage je apsorbovano nakon 72 h za sve ispitivane kopolimere. Očekivano, PCL je imao najmanji procenat apsorbovane vode i vlage. Izmerene vrednosti kontaktnog ugla sa vodom su bile malo niže od 90° , što je ukazivalo na skoro nekvašljivu i hidrofobnu prirodu površine polimernih filmova, kao i da prisustvo PEO segmenta u procentu manjem od 5 mas.% ima mali uticaj na hidrofilnost blok kopolimernih filmova.

Ispitivanjem hidrolitičke degradacije blok kopolimera je utvrđeno da stepen degradacije zavisi od sastava i molarne mase uzoraka, kao i položaja hidrofilnog PEO bloka. Najveći gubitak mase u seriji triblok kopolimera ima uzorak sa najvećim sadržajem PEO segmenta (1000 g/mol), oko 2 mas.% posle osam nedelja hidrolize, a da sa porastom molarne mase i dužine PCL segmenata, stepen hidrolize opada. Druga serija triblok kopolimera sa PEO (400 g/mol), imala je još manje gubitke mase nakon hidrolize kao posledica malog sadržaja, < 2 mas.% PEO segmenta. Diblok kopolimeri su pokazali veću sposobnost hidrolitičke degradacije usled lateralnog položaja PEO, a gubitak mase najhidrofilnijeg uzorka u seriji je iznosio oko 11 mas.%. Vrednosti kristalnog indeksa (FTIR analiza) triblok kopolimera se smanjuju u odnosu na kontrolne uzorke, dok se vrednosti CI diblok kopolimera povećavaju. Smanjenje vrednosti molarne mase do koje dolazi tokom 8 nedelja hidrolize, određene na osnovu GPC analize, bile su potvrda da se ispitani blok kopolimeri tokom hidrolize degradiraju mehanizmom degradacije u masi.

Enzimska degradacija je po prvi put testirana u prisustvu bakterijskog ekstrakta koji je sadržao enzime *P. aeruginosa* PAO1, tokom četiri nedelje. Veći procenat izgubljene mase blok kopolimera nakon enzimske degradacije dokazuje veću sposobnost degradacije ispitivanih uzoraka u prisustvu enzima. Blok kopolimeri sa najvećim sadržajem PEO bloka gube najveći procenat mase, a nakon četiri nedelje degradacije, najhidrofilniji diblok kopolimer je bio potpuno dezintegriran. Velike promene u gubicima mase su praćene i

promenama u kristalnoj strukturi blok kopolimera, što je potvrdila FTIR analiza. Na osnovu GPC analize je utvrđeno da dolazi do promene u vrednosti molarne mase degradiranih uzoraka, ali da veliki gubici mase ukazuju da se degradacija odigrava u većem stepenu mehanizmom površinske erozije.

Optička mikroskopija polimernih filmova pre degradacije je otkrila morfologiju sferulita na površini čije su dimenzije određene sastavom i molarnom masom blok kopolimera. Uvođenjem PEO segmenta u lance PCL-a dolazi do ometanja kristalizacije PCL što za posledicu ima povećanje prečnika kristališućih sferulita. Povećanje molarne mase u seriji dovodi takođe do porasta prečnika sferulita što je naročito izraženo za seriju diblok kopolimera. AFM analiza polimernih filmova je potvrdila morfologiju sferulita na površini i njihovu lamelarnu prirodu. Dužina lamela raste sa porastom udela PEO segmenata u blok kopolimerima.

Optička mikroskopija polimernih filmova nakon enzimske degradacije je ukazala na mehanizam površinske degradacije kod svih ispitivanih uzoraka. Intenzitet degradacije i promena morfologije su određeni sastavom i strukturom uzoraka, tako da se površinska erozija lako uočava kod uzoraka koji gube preko 5 mas.% nakon degradacije, dok su promene u morfologiji površne filmova sa manjim gubicima bile jedva uočljive. AFM analizom je proces površinske erozije kvantifikovan u smislu određivanja hrapavosti površine nakon degradacije. Veći stepen degradacije, veći gubici masa, rezultovali su u velikim promenama u hrapavosti, tako da su površine filmova bile hrapavije nakon izlaganja dejstvu enzima. Na AFM mikrografima degradiranih uzoraka se jasno uočava oštećenje lamela i nestajanje sferulita, što je uočljivo za sve uzorke.

Ogledi biokompostiranja, u kompost model sistemu na 37 °C obogaćenim enzimima *P. aeruginosa* PAO1, su ukazali na mogućnost degradacije PCL i PCL/PEO blok kopolimera usled aktivnosti mikroorganizama koji se normalno nalaze u životnoj sredini. Degradacija u kompostu se odigrava nehomogeno, mehanizmom površinske erozije, a najveću rezistentnost ka mikroorganizmima je pokazao homopolimer PCL. Triblok i diblok kopolimeri sa najvećim udelom PEO segmenta i najmanjom vrednošću molarne mase najviše podležu procesu degradacije u uslovima kompostiranja.

U cilju ispitivanja potencijalne primene ovih blok kopolimera u oblasti biomedicine, serija triblok kopolimera (PEO molarne mase 400 g/mol) je korišćena za pripremu polimernih mikrosfera za inkapsulaciju ibuprofena postupkom otparavanja lako isparljivog rastvarača iz emulzije. Pripremljene su mikrosfere u kojima je sadržaj leka iznosio 10 i 20 mas.%. Prinos dobijenih mikrosfera je bio visok, preko 90 %, dok je efikasnost inkapsulacije leka bila u

proseku oko 70 %. DSC analizom dobijenih mikrosfera je utvrđeno da nakon inkapsulacije leka u polimernu matricu dolazi do smanjenja temperature topljenja polimerne matrice koje je izraženije za veći sadržaj leka. Nakon inkapsulacije 10 mas.% ibuprofena u polimernu matricu, dolazi do smanjenja vrednosti promene entalpije topljenja, dok se inkapsulacijom 20 mas.% leka entalpija topljenja drastično smanjuje. Vrednosti X_c PCEC mikrosfera sa ibuprofenom su manje u poređenju sa praznim mikrosferama, ali vrednost relativnog stepena kristaliničnosti se neznatno menja, ukazujući da se inkorporacijom leka u polimernu matricu ne ometa kristalizacija PCL segmenata.

FTIR analizom je utvrđeno postojanje interakcija između funkcionalnih grupa ibuprofena i polimerne matrice, odnosno postojanje vodoničnih veza koje se uspostavljaju između karbonilne grupe PCL-a i hidroksilne grupe ibuprofena. Takođe, prisustvo pikova karakterističnih za ibuprofen je detektovano u spektrima inkapsuliranih mikrosfera ukazujući da je lek uspešno inkapsuliran u polimernu matricu.

Sferna morfologija, bez prisutnih aglomerata i neodređenih oblika, dobijenih čestica je dokazana SEM analizom. Utvrđeno je da su prečnici dobijenih sfera određeni sastavom polimera, sadržajem hidrofilnog PEO segmenta, molarnom masom, ali i koncentracijom leka. Mikrosfere najmanjih dimenzija su dobijene iz blok kopolimera najmanje molarne mase i najvećeg sadržaja PEO, dok sa porastom udela PCL segmenata u kopolimeru, prečnik sfera raste. Inkapsulacijom leka, veličina sfera se povećava, a raspodela veličina čestica se širi. SEM mikrografi mikrosfera koje sadrže 20 mas.% leka su potvrdili zaostajanje kristala leka adsorbovanih na površini sfera.

Profili otpuštanja leka imaju dve oblasti: prvo inicijalno brzo otpuštanje leka, koje je najmanje izraženo za PCL/10 mikrosfere, i drugu fazu postepenog otpuštanja leka nakon čega kriva zavisnosti ulazi u plato, koncentracija leka tokom vremena se ne menja jer se lek više ne otpušta iz polimerne matrice. Blok kopolimer sa najvećim udelom PEO i najmanjom molarnom masom, otpušta najveću količinu ibuprofena već u prvih nekoliko sati testiranja (više od 80 mas% leka je otpušteno tokom 72 h). Prisustvo PEO segmenta u blok kopolimerima je uzrok inicijalnog brzog otpuštanja ibuprofena iz polimerne matrice ali i dostizanja većeg sadržaja leka u ispitivanom medijumu nakon 72 h u odnosu na PCL za seriju sa 10 mas.% leka. U seriji sa 20 mas.% ibuprofena, kristali leka koji zaostaju na površini sfera dovode do inicijalnog brzog otpuštanja leka, i ovaj efekat je prisutan kod svih ispitivanih mikrosfera. Otpuštanje leka iz polimerne matrice je određeno sastavom polimera, molarnom masom, koncentracijom leka, veličinom čestica i stepenom kristaliničnosti. Primenjeni matematički modeli su pokazali da je otpuštanje leka iz polimerne matrice

difuziono kontrolisano, odnosno da se lek iz polimerne matrice otpušta mehanizmom Fikove difuzije.

Testovi citotoksičnosti ispitani na humanim ćelijama fibroblasta pluća (MRC5) su dokazali netoksična svojstva praznih mikrosfera, kao i manju toksičnost mikrosfera sa inkapsuliranim ibuprofenom pri manjim koncentracijama. Citotoksični efekti su bili u skladu sa profilima otpuštanja leka, pa je detektovana veća citotoksičnost kod mikrosfera sa ibuprofenom koje u većem procentu otpuštaju lek.

Ova studija je pokazala da se blok kopolimeri na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) i poli(etilen-oksida) mogu koristiti kao nosači leka, ibuprofena, i kao takvi naći svoju primenu u kontrolisanoj isporuci ibuprofena u terapiji hroničnog artritisa, kada je potrebno postići određenu koncentraciju ovog leka tokom dužeg vremenskog perioda.

Najveći doprinos ove disertacije je u tome što je pokazano da se sintetisani polimeri mogu koristiti za izradu ambalažnog materijala, pre svega diblok kopolimeri koji su pokazali bolju sposobnost biorazgradnje, dok se se triblok kopolimeri pokazali kao pogodniji za primenu u oblasti biomedicine, kao nosači lekova.

Dalji pravci istraživanja, zasnovan na ovoj doktorskoj disertaciji, jeste sinteza novih, razgranatih poliestara na bazi PCL-a, sa različitim brojem grana (3R, 4R, 6R) i ispitivanje uticaja broja grana i vrste amorfno jezgra na termička, površinska i morfološka svojstva. Krajnji cilj je primena ove vrste razgranatih PCL poliestara kao matrica u sistemima otpuštanja lekova, ispitivanje uticaja broja grana i vrste jezgra na efikasnost inkapsulacije, veličinu čestica i kinetiku otpuštanja leka. Jedan od pravaca je i zamena hlorovanih rastvarača u postupku pripreme mikrosfera ekološki prihvatljivim, kao što je to etil-laktat, optimizacija metode i uslova pripreme polimernih mikrosfera sa ovim rastvaračem.

6. Literatura

1. Tokiwa Y, Calabia B, Ugwu C, Aiba S (2009) Biodegradability of Plastics. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 3722
2. Jayasekara R, Harding I, Bowater I, Lonergan G (2005) Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation. *J. Polym. Environ.* 13: 231-251
3. A.B. Queirozi F P C-Q (2009) Innovation and Industrial Trends in Bioplastics. *J. Macromol. Sci. C: Polym. Rev.* 49: 65-78
4. Iwata T (2015) Biodegradable and Bio-Based Polymers: Future Prospects of Eco-Friendly Plastics. *Angew. Chem. Int. Edit.* 54: 3210-3215
5. Emadian S M, Onay T T, Demirel B (2017) Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Manage.* 59: 526-536
6. <http://en.european-bioplastics.org/technologymaterials/materials/> European bioplastic
7. Bittiger H, Marchessault R H, Niegisch W D (1970) Crystal structure of poly- ϵ -caprolactone. *Acta Crystallogr. B* 26: 1923-1927
8. Labet M, Thielemans W (2009) Synthesis of polycaprolactone: A review. *Chem. Soc. Rev.* 38: 3484-3504
9. Aoyagi Y, Yamashita K, Doi Y (2002) Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ϵ -caprolactone], and poly[(S)-lactide]. *Polym. Degrad. Stabil.* 76: 53-59
10. Lam C X F, Teoh S H, Hutmacher D W (2007) Comparison of the degradation of polycaprolactone and polycaprolactone-(β -tricalcium phosphate) scaffolds in alkaline medium. *Polym. Int.* 56: 718-728
11. Woodruff M A, Hutmacher D W (2010) The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog. Polym. Sci.* 35: 1217-1256
12. Braud C, Devarieux R, Atlan A, Ducos C, Michel V (1998) Capillary zone electrophoresis in normal or reverse polarity separation modes for the analysis of hydroxy acid oligomers in neutral phosphate buffer. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. App* 706: 73-82
13. Mahapatro A, Kumar A, Gross R A (2004) Mild, solvent-free ω -hydroxy acid polycondensations catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Biomacromolecules* 5: 62-68
14. Dong H, Wang H-d, Cao S-g, Shen J-c (1998) Lipase-catalyzed polymerization of lactones and linear hydroxyesters. *Biotechnol. Lett.* 20: 905-908
15. Stridsberg K M, Ryner M, Albertsson A-C (2002) In., Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 41-65.
16. Khanna A, Sudha Y S, Pillai S, Rath S S (2008) Molecular modeling studies of poly lactic acid initiation mechanisms. *J. Mol. Model.* 14: 367-374
17. Kim M S, Seo K S, Khang G, Lee H B (2005) Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone by Poly(ethylene glycol) by an Activated Monomer Mechanism. *Macromol. Rapid Comm.* 26: 643-648
18. Möller M, Känge R, Hedrick J L (2000) Sn(OTf)₂ and Sc(OTf)₃: Efficient and versatile catalysts for the controlled polymerization of lactones. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 38: 2067-2074
19. Kowalski A, Duda A, Penczek S (1998) Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate, 1: Polymerization of ϵ -caprolactone. *Macromol. Rapid Comm.* 19: 567-572

20. Penczek S, Duda A, Kowalski A, Libiszowski J, Majerska K, Biela T (2000) On the mechanism of polymerization of cyclic esters induced by tin(II) octoate. *Macromol. Symp.* 157: 61-70
21. Penczek S, Cypryk M, Duda A, Kubisa P, Słomkowski S (2007) Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers. *Prog. Polym. Sci.* 32: 247-282
22. Storey R F, Sherman J W (2002) Kinetics and Mechanism of the Stannous Octoate-Catalyzed Bulk Polymerization of ϵ -Caprolactone. *Macromolecules* 35: 1504-1512
23. Kowalski A, Duda A, Penczek S (1998) Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate, 1. Polymerization of ϵ -caprolactone. *Macromol. Rapid Comm.* 19: 567-572
24. Duda A, Biela T, Libiszowski J, Penczek S, Dubois P, Mecerreyes D, Jérôme R (1998) Block and random copolymers of ϵ -caprolactone. *Polym. Degrad. Stabil* 59: 215-222
25. Biela T, Kowalski A, Libiszowski J, Duda A, Penczek S (2006) Progress in Polymerization of Cyclic Esters: Mechanisms and Synthetic Applications. *Macromol. Symp.* 240: 47-55
26. Kowalski A, Duda A, Penczek S (2000) Mechanism of Cyclic Ester Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. 2. *Macromolecules Fitted with Tin(II) Alkoxide Species Observed Directly in MALDI-TOF Spectra.* *Macromolecules* 33: 689-695
27. Kobayashi S (1999) Enzymatic polymerization: A new method of polymer synthesis. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 37: 3041-3056
28. Kobayashi S, Uyama H, Kimura S (2001) Enzymatic polymerization. *Chem. Rev.* 101: 3793-3818
29. Dong H, Cao S-G, Li Z-Q, Han S-P, You D-L, Shen J-C (1999) Study on the enzymatic polymerization mechanism of lactone and the strategy for improving the degree of polymerization. *J. Pol. Sci. Pol. Chem.* 37: 1265-1275
30. Piao L, Dai Z, Deng M, Chen X, Jing X (2003) Synthesis and characterization of PCL/PEG/PCL triblock copolymers by using calcium catalyst. *Polymer* 44: 2025-2031
31. Wei Z, Liu L, Yu F, Wang P, Qi M (2009) Synthesis and characterization of poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymers with dibutylmagnesium as catalyst. *J. Appl. Polym. Sci.* 111: 429-436
32. Ge H, Hu Y, Jiang X, Cheng D, Yuan Y, Bi H, Yang C (2002) Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. *J. Pharm. Sci.* 91: 1463-1473
33. Cerrai P, Tricoli M, Andruzzi F, Paci M, Paci M (1989) Polyether-polyester block copolymers by non-catalysed polymerization of ϵ -caprolactone with poly(ethylene glycol). *Polymer* 30: 338-343
34. Colwell J M, Wentrup-Byrne E, George G A, Schué F (2015) A pragmatic calcium-based initiator for the synthesis of polycaprolactone copolymers. *Polym. Int.* 64: 654-660
35. Persenaire O, Alexandre M, Degée P, Dubois P (2001) Mechanisms and kinetics of thermal degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Biomacromolecules* 2: 288-294
36. Su T T, Jiang H, Gong H (2008) Thermal stabilities and the thermal degradation kinetics of poly(ϵ -caprolactone). *Polym - Plast Technol* 47: 398-403
37. Sivalingam G, Karthik R, Madras G (2003) Kinetics of thermal degradation of poly(ϵ -caprolactone). *J. Anal. Appl. Pyrol.* 70: 631-647
38. Sivalingam G, Madras G (2003) Thermal degradation of poly (ϵ -caprolactone). *Polym. Degrad. Stabil.* 80: 11-16

39. Cheng S Z D, Chen J, Barley J S, Zhang A, Habenschuss A, Zschack P R (1992) Isothermal thickening and thinning processes in low molecular-weight poly(ethylene oxide) fractions crystallized from the melt. 3. Molecular weight dependence. *Macromolecules* 25: 1453-1460
40. An J H, Kim H S, Chung D J, Lee D S, Kim S (2001) Thermal behaviour of poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) tri-block copolymers. *J. Mater. Sci.* 36: 715-722
41. Jiang Y, Mao K, Cai X, Lai S, Chen X (2011) Poly(ethyl glycol) assisting water sorption enhancement of poly(ϵ -caprolactone) blend for drug delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* 122: 2309-2316
42. Bogdanov B, Vidts A, Van Den Bulcke A, Verbeeck R, Schacht E (1998) Synthesis and thermal properties of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) copolymers. *Polymer* 39: 1631-1636
43. Xu Y, He Y, Wei J, Fan Z, Li S (2008) Morphology and melt crystallization of PCL-PEG diblock copolymers. *Macromol. Chem. Phys.* 209: 1836-1844
44. R. Chandra R R (1998) Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 23: 1273-1335
45. Vert M, Li S M, Spenlehauer G, Guerin P (1992) Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci. - Mater. M.* 3: 432-446
46. Vert M (2009) Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *J. Mater. Sci. - Mater. M.* 20: 437-446
47. Middleton J C, Tipton A J (2000) Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21: 2335-2346
48. Woodward S C, Brewer P S, Moatamed F, Schindler A, Pitt C G (1985) The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone). *J. Biomed. Mater. Res. B* 19: 437-444
49. Ann-Christine Albertsson I K V (2002) Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications. *Adv. Polym. Sci.* 157: 1-40
50. Nair L S, Laurencin C T (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32: 762-798
51. Göpferich A (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17: 103-114
52. Bikiaris D N (2013) Nanocomposites of aliphatic polyesters: An overview of the effect of different nanofillers on enzymatic hydrolysis and biodegradation of polyesters. *Polym. Degrad. Stabil.* 98: 1908-1928
53. C. X. F. Lam M M S, S.H. Teoh, D. W. Hutmacher (2008) Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomed. Mater.* 3: 034108
54. Marten E, Müller R-J, Deckwer W-D (2003) Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polym. Degrad. Stabil.* 80: 485-501
55. Wei X, Gong C, Gou M, Fu S, Guo Q, Shi S, Luo F, Guo G, Qiu L, Qian Z (2009) Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int. J. Pharmaceut.* 381: 1-18
56. Boffito M, Sirianni P, Di Rienzo A M, Chiono V (2015) Thermosensitive block copolymer hydrogels based on poly(ϵ -caprolactone) and polyethylene glycol for biomedical applications: State of the art and future perspectives. *J. Biomed. Mater. Res. A* 103: 1276-1290
57. Bosworth L A, Downes S (2010) Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds. *Polym. Degrad. Stabil.* 95: 2269-2276

58. Peña J, Corrales T, Izquierdo-Barba I, Doadrio A L, Vallet-Regí M (2006) Long term degradation of poly(ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids. *Polym. Degrad. Stabil.* 91: 1424-1432
59. Castilla-Cortázar I, Más-Estellés J, Meseguer-Dueñas J M, Escobar Ivirico J L, Marí B, Vidaurre A (2012) Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly(ϵ -caprolactone) network. *Polym. Degrad. Stabil.* 97: 1241-1248
60. Jung J H, Ree M, Kim H (2006) Acid- and base-catalyzed hydrolyses of aliphatic polycarbonates and polyesters. *Catal. Today* 115: 283-287
61. Sailema-Palate G P, Vidaurre A, Campillo-Fernández A J, Castilla-Cortázar I (2016) A comparative study on Poly(ϵ -caprolactone) film degradation at extreme pH values. *Polym. Degrad. Stabil.* 130: 118-125
62. Loh X J (2013) The effect of pH on the hydrolytic degradation of poly(ϵ -caprolactone)-block-poly(ethylene glycol) copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 127: 2046-2056
63. Li S M, Chen X H, Gross R A, McCarthy S P (2000) Hydrolytic degradation of PCL/PEO copolymers in alkaline media. *J. Mater. Sci. Mater. M.* 11: 227-233
64. Pastorino L, Pioli F, Zilli M, Converti A, Nicolini C (2004) Lipase-catalyzed degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Enzyme Microb. Tech.* 35: 321-326
65. Sivalingam G, Chattopadhyay S, Madras G (2003) Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone), poly (vinyl acetate) and their blends by lipases. *Chem. Eng. Sci.* 58: 2911-2919
66. Liu L, Li S, Garreau H, Vert M (2000) Selective Enzymatic Degradations of Poly(l-lactide) and Poly(ϵ -caprolactone) Blend Films. *Biomacromolecules* 1: 350-359
67. Gan Z, Liang Q, Zhang J, Jing X (1997) Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases. *Polym. Degrad. Stabil.* 56: 209-213
68. Hakkarainen M (2002), Aliphatic polyesters: Abiotic and biotic degradation and degradation products. *Adv. Polym. Sci.* 113-138.
69. Sivalingam G, Chattopadhyay S, Madras G (2003) Solvent effects on the lipase catalyzed biodegradation of poly (ϵ -caprolactone) in solution. *Polym. Degrad. Stabil.* 79: 413-418
70. Aris M H, Annuar M S M, Ling T C (2016) Lipase-mediated degradation of poly- ϵ -caprolactone in toluene: Behavior and its action mechanism. *Polym. Degrad. Stabil.* 133: 182-191
71. Khan I, Ray Dutta J, Ganesan R (2017) Lactobacillus sps. lipase mediated poly (ϵ -caprolactone) degradation. *Int. J. Biol. Macromol.* 95: 126-131
72. Jiang N, Jiang S, Hou Y, Yan S, Zhang G, Gan Z (2010) Influence of chemical structure on enzymatic degradation of single crystals of PCL-b-PEO amphiphilic block copolymer. *Polymer* 51: 2426-2434
73. Peng H, Ling J, Liu J, Zhu N, Ni X, Shen Z (2010) Controlled enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers in the presence of porcine pancreatic lipase. *Polym. Degrad. Stabil.* 95: 643-650
74. Li S, Garreau H, Pauvert B, McGrath J, Toniolo A, Vert M (2002) Enzymatic degradation of block copolymer prepared from ϵ -caprolactone and poly(ethylene glycol). *Biomacromolecules* 3: 525-530
75. He F, Li S, Vert M, Zhuo R (2003) Enzyme-catalyzed polymerization and degradation of copolymers prepared from ϵ -caprolactone and poly(ethylene glycol). *Polymer* 44: 5145-5151
76. Tokiwa Y, Jarerat A (2003) Microbial degradation of aliphatic polyesters. *Macromol. Symp.* 201: 283-290

77. Shah A, Kato S, Shintani N, Kamini N, Nakajima-Kambe T (2014) Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 3437-3447
78. Nawaz A, Hasan F, Shah A A (2015) Degradation of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) by a newly isolated *Brevundimonas* sp. strain MRL-AN1 from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 362: 1-7
79. Shah A A, Nawaz A, Kanwal L, Hasan F, Khan S, Badshah M (2015) Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by a thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. strain MRL-TL isolated from hot spring. *Int. Biodeter. Biodegr.* 98: 35-42
80. Xu S, Yamaguchi T, Osawa S, Suye S-I (2007) Biodegradation of Poly (ϵ -Caprolactone) Film in the Presence of *Lysinibacillus* sp.70038 and Characterization of the Degraded Film. *Biocontrol. Sci.* 12: 119-122
81. Khatiwala V, Shekhar N, Aggarwal S, Mandal U K (2008) Biodegradation of Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) Film by *Alcaligenes faecalis*. *J. Polym. Environ.* 16: 61-67
82. Shinozaki Y, Morita T, Cao X-h, Yoshida S, Koitabashi M, Watanabe T, Suzuki K, Sameshima-Yamashita Y, Nakajima-Kambe T, Fujii T, Kitamoto H (2013) Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization. *Appl. Microbiol. Biot.* 97: 2951-2959
83. Rujniæ-Sokele M, Pilipoviæ A (2017) Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. *Waste Manage. Res.* 35: 132-140
84. Onwosi C O, Igbokwe V C, Odimba J N, Eke I E, Nwankwoala M O, Iroh I N, Ezeogu L I (2017) Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. *J. Environ. Manage.* 190: 140-157
85. Briassoulis D, Dejean C, Picuno P (2010) Critical Review of Norms and Standards for Biodegradable Agricultural Plastics Part II: Composting. *J. Polym. Environ.* 18: 364-383
86. Mueller R-J (2006) Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochem.* 41: 2124-2128
87. Fukushima K, Tabuani D, Abbate C, Arena M, Ferreri L (2010) Effect of sepiolite on the biodegradation of poly(lactic acid) and polycaprolactone. *Polym. Degrad. Stabil.* 95: 2049-2056
88. Fukushima K, Abbate C, Tabuani D, Gennari M, Rizzarelli P, Camino G (2010) Biodegradation trend of poly(ϵ -caprolactone) and nanocomposites. *Mater. Sci. Eng. C - Bio S* 30: 566-574
89. Lotto N T, Calil M R, Guedes C G F, Rosa D S (2004) The effect of temperature on the biodegradation test. *Mater. Sci. Eng. C - Bio S* 24: 659-662
90. Yang H-S, Yoon J-S, Kim M-N (2005) Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Polym. Degrad. Stabil.* 87: 131-135
91. Vert M (2007) Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. *Prog. Polym. Sci.* 32: 755-761
92. Dash T K, Konkimalla V B (2012) Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J. Control. Release* 158: 15-33
93. Venugopal J, Low S, Choon A T, Ramakrishna S (2008) Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B* 84B: 34-48
94. Szot C S, Buchanan C F, Gatenholm P, Rylander M N, Freeman J W (2011) Investigation of cancer cell behavior on nanofibrous scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C - Bio S* 31: 37-42
95. Jang J-H, Castano O, Kim H-W (2009) Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61: 1065-1083

96. Sultanova Z, Kaleli G, Kabay G, Mutlu M (2016) Controlled release of a hydrophilic drug from coaxially electrospun polycaprolactone nanofibers. *Int. J. Pharmaceut.* 505: 133-138
97. Erdemli Ö, Usanmaz A, Keskin D, Tezcaner A (2014) Characteristics and release profiles of MPEG-PCL-MPEG microspheres containing immunoglobulin G. *Colloid Surface B* 117: 487-496
98. Zhang L, He Y, Ma G, Song C, Sun H (2012) Paclitaxel-loaded polymeric micelles based on poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymers: in vitro and in vivo evaluation. *Nanom. - Nanotechnol.* 8: 925-934
99. Kang J, Beers K J (2009) Macromolecular transport through nanostructured and porous hydrogels synthesized using the amphiphilic copolymer, PCL-b-PEO-b-PCL. *Eur. Polym. J.* 45: 3004-3009
100. Edlund U, Albertsson A C (2002), Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery, *Adv. Polym. Sci* 157: 67-112.
101. Wischke C, Schwendeman S P (2008) Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharmaceut.* 364: 298-327
102. Ye M, Kim S, Park K (2010) Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J. Control. Release* 146: 241-260
103. Wagenaar B W, Müller B W (1994) Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. *Biomaterials* 15: 49-54
104. Alsenz J, Kansy M (2007) High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 546-567
105. Li L, Schwendeman S P (2005) Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres. *J. Control. Release* 101: 163-173
106. Dubernet C (1995) Thermoanalysis of microspheres. *Thermochim. Acta* 248: 259-269
107. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/IBUPROFEN#section=Top>
108. Brabander C D, Vervaet C, Bortel L V, Remon J-P (2004) Bioavailability of ibuprofen from hot-melt extruded mini-matrices. *Int. J. Pharmaceut.* 271: 77-84
109. Thompson C J, Hansford D, Higgins S, Rostron C, Hutcheon G A, Munday D L (2007) Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. *Int. J. Pharmaceut.* 329: 53-61
110. Ward M A, Georgiou T K (2011) Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* 3: 1215
111. Davis S S, Illum L, Stolnik S (1996) Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1: 660-666
112. Wood D A (1980) Biodegradable drug delivery systems. *Int. J. Pharmaceut.* 7: 1-18
113. Langer R S, Peppas N A (1981) Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials* 2: 201-214
114. Bajpai A K, Shukla S K, Bhanu S, Kankane S (2008) Responsive polymers in controlled drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* 33: 1088-1118
115. Wang X, Wang Y, Wei K, Zhao N, Zhang S, Chen J (2009) Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release. *J. Mater. Process. Tech.* 209: 348-354
116. Carreras N, Acuña V, Martí M, Lis M J (2013) Drug release system of ibuprofen in PCL-microspheres. *Coll. Polym. Sci.* 291: 157-165
117. Huang X, Brazel C S (2001) On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J. Control. Release* 73: 121-136
118. Jeong B, Bae Y H, Kim S W (2000) Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *J. Control. Release* 63: 155-163

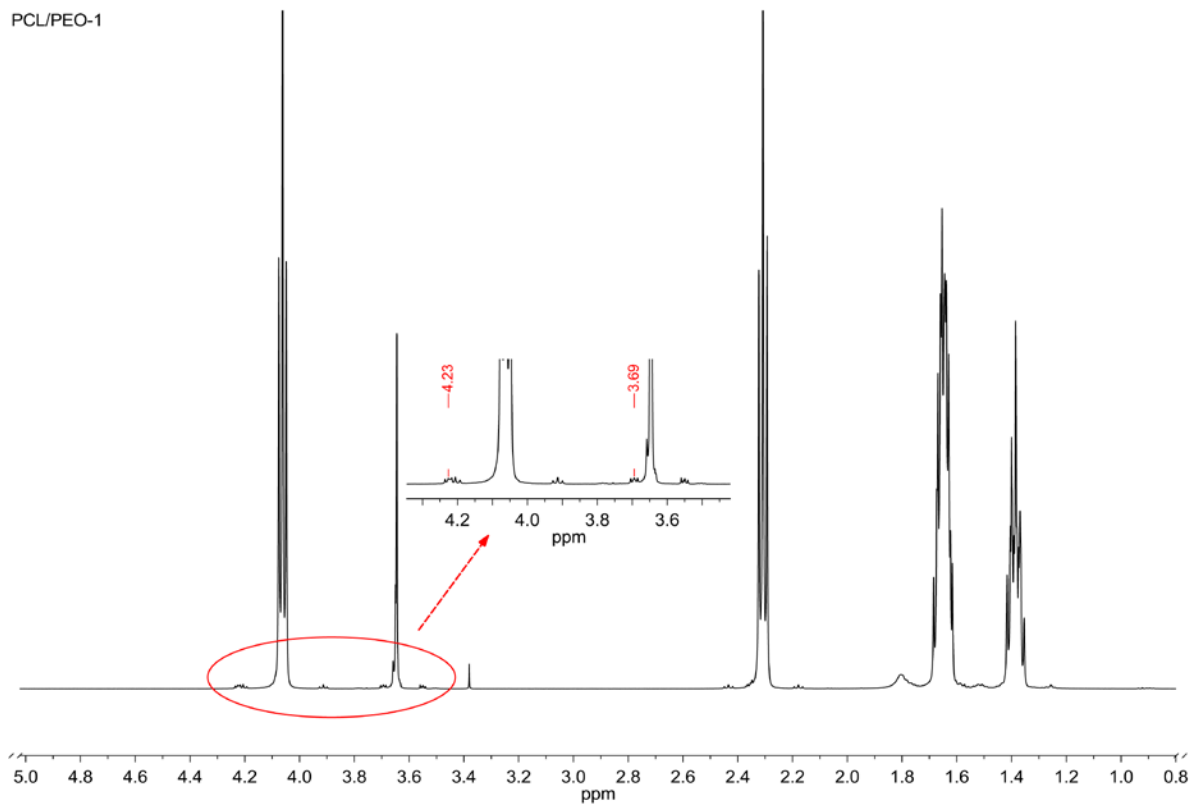
119. Batycky R P, Hanes J, Langer R, Edwards D A (1997) A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J. Pharm. Sci.* 86: 1464-1477
120. Brazel C S, Peppas N A (1999) Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer* 40: 3383-3398
121. Dash S, Murthy P N, Nath L, Chowdhury P (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* 67: 217-223
122. Yang L, Fassihi R (1996) Zero-order release kinetics from a self-correcting floatable asymmetric configuration drug delivery system. *J. Pharm. Sci.* 85: 170-173
123. Freitas M N, Marchetti J M (2005) Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. *Int. J. Pharmaceut.* 295: 201-211
124. Costa P, Sousa Lobo J M (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13: 123-133
125. Higuchi T (1961) Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* 50: 874-875
126. Siepmann J, Peppas N A (2001) Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48: 139-157
127. Peppas N A, Ritger, P.L (1987) A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release* 5: 37-42
128. Ritger P L, Peppas N A (1987) A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* 5: 23-36
129. Pillay V, Fassihi R (1998) Evaluation and comparison of dissolution data derived from different modified release dosage forms: an alternative method. *J. Control. Release* 55: 45-55
130. Gou M L, Qian Z Y, Wang H, Tang Y B, Huang M J, Kan B, Wen Y J, Dai M, Li X Y, Gong C Y, Tu M J (2008) Preparation and characterization of magnetic poly(ϵ -caprolactone)- poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J. Mater. Sci. Mater. M.* 19: 1033-1041
131. Dai M, Xu X, Song J, Fu S, Gou M, Luo F, Qian Z (2011) Preparation of camptothecin-loaded PCEC microspheres for the treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis and tumor growth in mice. *Cancer Lett.* 312: 189-196
132. Ryu J-G, Jeong Y-I, Kim I-S, Lee J-H, Nah J-W, Kim S-H (2000) Clonazepam release from core-shell type nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol)/poly(ϵ -caprolactone) triblock copolymers. *Int. J. Pharmaceut.* 200: 231-242
133. Huang M J, Gou M L, Qian Z Y, Dai M, Li X Y, Cao M, Wang K, Zhao J, Yang J L, Lu Y, Tu M J, Wei Y Q (2008) One-step preparation of poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for plasmid DNA delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* 86A: 979-986
134. Kim B K, Hwang S J, Park J B, Park H J (2005) Characteristics of felodipine-located poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J. Microencapsul.* 22: 193-203
135. Park S-J, Kim K-S, Kim S-H (2005) Effect of poly(ethylene oxide) on the release behaviors of poly(ϵ -caprolactone) microcapsules containing erythromycin. *Colloid. Surface B* 43: 238-244
136. Li G, Cai Q, Bei J, Wang S (2003) Morphology and levonorgestrel release behavior of polycaprolactone/ poly(ethylene oxide)/Polylactide tri-component copolymeric microspheres. *Polym. Adv. Technol.* 14: 239-244

137. Natarajan V, Krithica N, Madhan B, Sehgal P K (2011) Formulation and evaluation of quercetin polycaprolactone microspheres for the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Pharm. Sci.* 100: 195-205
138. Hernán Pérez de la Ossa D, Ligresti A, Gil-Alegre M E, Aberturas M R, Molpeceres J, Di Marzo V, Torres Suárez A I (2012) Poly- ϵ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. *J. Control. Release* 161: 927-932
139. Schlegel H G, Kaltwasser H, Gottschalk G (1961) Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Archiv. Mikrobiol.* 38: 209-222
140. Harrison K L, Jenkins M J (2004) The effect of crystallinity and water absorption on the dynamic mechanical relaxation behaviour of polycaprolactone. *Polym. Int.* 53: 1298-1304
141. Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
142. Willerding A L, Oliveira L A D, Moreira F W, Germano M G, Chagas A F (2011) Lipase activity among bacteria isolated from amazonian soils. *Enzyme Res.* 2011
143. Šašek V, Vitásek J, Chromcová D, Prokopová I, Brožek J, Náhlík J (2006) Biodegradation of synthetic polymers by composting and fungal treatment. *Folia Microbiol.* 51: 425-430
144. Pepic D, Nikolic M S, Grujic S, Lausevic M, Djonlagic J (2013) Release behaviour of carbamazepine-loaded poly(ϵ -caprolactone)/ poly(ethylene oxide) microspheres. *J. Microencapsul.* 30: 151-160
145. Hansen M B, Nielsen S E, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119: 203-210
146. Chen S, Pieper R, Webster D C, Singh J (2005) Triblock copolymers: Synthesis, characterization, and delivery of a model protein. *Int. J. Pharmaceut.* 288: 207-218
147. Babucic I (2015.) Sinteza i karakterizacija asimetričnih poli(etilen-oksid)-poli(ϵ -kaprolakton) diblok kopolimera. TMF, Beograd Master rad
148. Kim I Y, Yoo M K, Kim B C, Park I Y, Lee H C, Cho C S (2008) Thermogelling behaviors of poly(caprolactone-b-ethylene glycol-b-caprolactone) triblock copolymer in the presence of hyaluronic acid. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 46: 3629-3637
149. He C, Sun J, Deng C, Zhao T, Deng M, Chen X, Jing X (2004) Study of the Synthesis, Crystallization, and Morphology of Poly(ethylene glycol)-Poly(ϵ -caprolactone) Diblock Copolymers. *Biomacromolecules* 5: 2042-2047
150. Yu J, Wu P (2007) Crystallization process of poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) investigated by infrared and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Polymer* 48: 3477-3485
151. Su T-T, Jiang H, Gong H (2008) Thermal Stabilities and the Thermal Degradation Kinetics of Poly(ϵ -Caprolactone). *Polym.-Plast. Technol.* 47: 398-403
152. Lapi A M, Altomare A, Alderighi M, Corti A, Dessy A, Chiellini F, Solimando A, Solaro R (2013) Multiblock copolymers of ϵ -caprolactone and ethylene glycol containing periodic side-chain carboxyl groups: Synthesis, characterization, and nanoparticle preparation. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 51: 3800-3809
153. Zong X-H, Wang Z-G, Hsiao B S, Chu B, Zhou J J, Jamiolkowski D D, Muse E, Dormier E (1999) Structure and Morphology Changes in Absorbable Poly(glycolide) and Poly(glycolide-co-lactide) during in Vitro Degradation. *Macromolecules* 32: 8107-8114

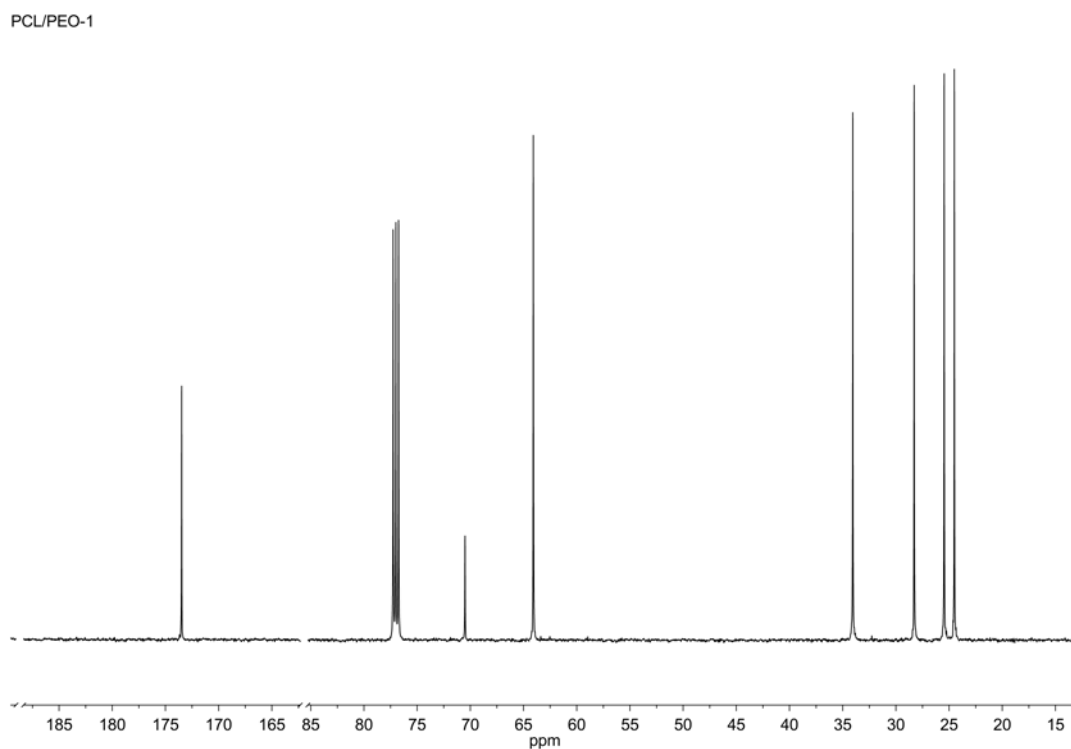
154. Huang M-H, Li S, Hutmacher D W, Coudane J, Vert M (2006) Degradation characteristics of poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers and blends. *J. Appl. Polym. Sci.* 102: 1681-1687
155. Cometa S, Bartolozzi I, Corti A, Chiellini F, De Giglio E, Chiellini E (2010) Hydrolytic and microbial degradation of multi-block polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) segments. *Polym. Degrad. Stabil.* 95: 2013-2021
156. Park S-J, Yang Y-J, Lee H-B (2004) Effect of acid–base interaction between silica and fragrant oil in the PCL/PEG microcapsules. *Colloid. Surface B* 38: 35-40
157. Erbil H Y, Yaşar B, Süzer Ş, Baysal B M (1997) Surface Characterization of the Hydroxy-Terminated Poly(ϵ -caprolactone)/Poly(dimethylsiloxane) Triblock Copolymers by Electron Spectroscopy for Chemical Analysis and Contact Angle Measurements. *Langmuir* 13: 5484-5493
158. Min Y, Lee S, Park J-K, Cho K Y, Sung S-J (2008) Effect of composition and synthetic route on the microstructure of biodegradable diblock copolymer, poly(ϵ -caprolactone-co-L-lactide)-b-poly(ethylene glycol). *Macromol. Res.* 16: 231-237
159. Boyd R H (1985) Relaxation processes in crystalline polymers: experimental behaviour - a review. *Polymer* 26: 323-347
160. Ugartemendia J, Muñoz M, Sarasua J, Santamaria A (2014) Phase behavior and effects of microstructure on viscoelastic properties of a series of polylactides and polylactide/poly(ϵ -caprolactone) copolymers. *Rheol. Acta* 53: 857-868
161. Noroozi N, Thomson J, Noroozi N, Schafer L, Hatzikiriakos S (2012) Viscoelastic behaviour and flow instabilities of biodegradable poly (ϵ -caprolactone) polyesters. *Rheol. Acta* 51: 179-192
162. Lee J-W, Gardella J A (2001) In Vitro Hydrolytic Surface Degradation of Poly(glycolic acid): Role of the Surface Segregated Amorphous Region in the Induction Period of Bulk Erosion. *Macromolecules* 34: 3928-3937
163. Żenkiewicz M, Richert A, Malinowski R, Moraczewski K (2013) A comparative analysis of mass losses of some aliphatic polyesters upon enzymatic degradation. *Polym. Test.* 32: 209-214
164. Abou-Zeid D-M, Müller R-J, Deckwer W-D (2001) Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *J. Biotechnol.* 86: 113-126
165. Chang H-M, Prasanna A, Tsai H-C, Jhu J-J (2014) Ex vivo evaluation of biodegradable poly(ϵ -caprolactone) films in digestive fluids. *Appl. Surface Sci.* 313: 828-833
166. Lefebvre F, David C, Vander Wauven C (1994) Biodegradation of polycaprolactone by micro-organisms from an industrial compost of household refuse. *Polym. Degrad. Stabil.* 45: 347-353
167. Causa A, Filippone G, Acierno D, Domingo C, Salerno A (2015) Surface Morphology, Crystallinity, and Hydrophilicity of Poly(ϵ -caprolactone) Films Prepared Via Casting of Ethyl Lactate and Ethyl Acetate Solutions. *Macromol. Chem. Phys.* 216: 49-58
168. Wurth J J, Blumenthal N R, Shastri V P (2014) Hydrophilization of Poly(Caprolactone) Copolymers through Introduction of Oligo(Ethylene Glycol) Moieties. *PLOS ONE* 9: e99157
169. Fukushima K, Feijoo J L, Yang M-C (2013) Comparison of abiotic and biotic degradation of PDLLA, PCL and partially miscible PDLLA/PCL blend. *Eur. Polym. J.* 49: 706-717
170. Miyajima M, Koshika A, Okada J i, Ikeda M, Nishimura K (1997) Effect of polymer crystallinity on papaverine release from poly (l-lactic acid) matrix. *J. Control. Release* 49: 207-215

171. Lin M, Meng S, Zhong W, Li Z, Du Q, Tomasik P (2008) Novel biodegradable blend matrices for controlled drug release. *J. Pharm. Sci.* 97: 4240-4248
172. Baimark Y (2009) Surfactant-free nanospheres of methoxy poly(ethylene glycole)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) for controlled release of ibuprofen. *J. Appl. Sci.* 12: 2287-2293
173. Lin M, Meng S, Zhong W, Cai R, Du Q, Tomasik P (2009) Novel drug-loaded gelatin films and their sustained-release performance. *J. Biomed. Mater. Res. B* 90B: 939-944
174. Jeong J-C, Lee J, Cho K (2003) Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *J. Control. Rel.* 92: 249-258
175. Chang L, Liu J, Zhang J, Deng L, Dong A (2013) pH-sensitive nanoparticles prepared from amphiphilic and biodegradable methoxy poly(ethylene glycol)-block-(polycaprolactone-graft-poly(methacrylic acid) for oral drug delivery. *Polym. Chem.* 4: 1430-1438
176. Freiberg S, Zhu X X (2004) Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharmaceut.* 282: 1-18
177. Le Corre P, Le Guevello P, Gajan V, Chevanne F, Le Verge R (1994) Preparation and characterization of bupivacaine-loaded polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres. *Int. J. Pharmaceut.* 107: 41-49
178. Hombreiro Pérez M, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, Bodmeier R, Maincent P (2000) The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J. Control. Release* 65: 429-438
179. Schnell S, Kawano A, Porte C, Lee L E J, Bols N C (2009) Effects of ibuprofen on the viability and proliferation of rainbow trout liver cell lines and potential problems and interactions in effects assessment. *Environ. Toxicol.* 24: 157-165

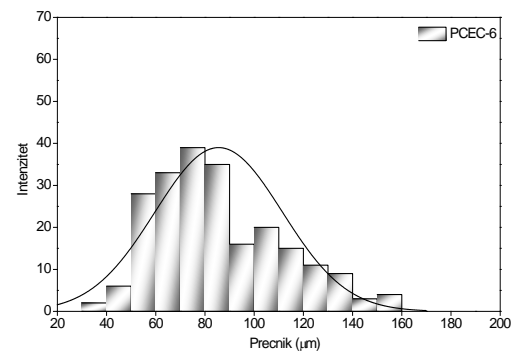
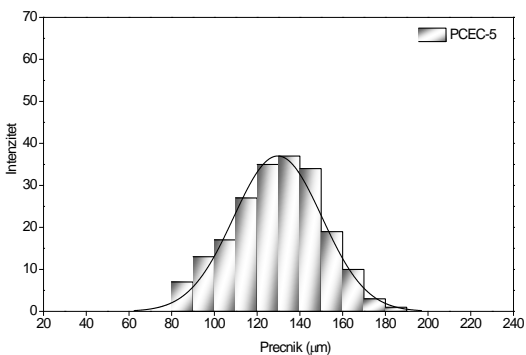
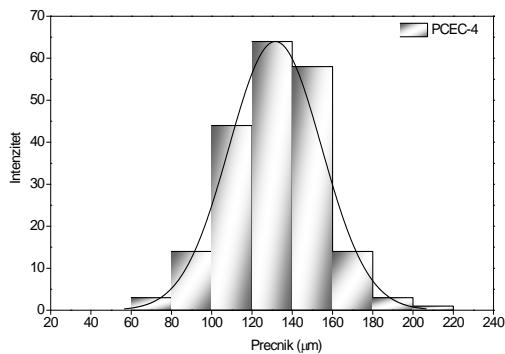
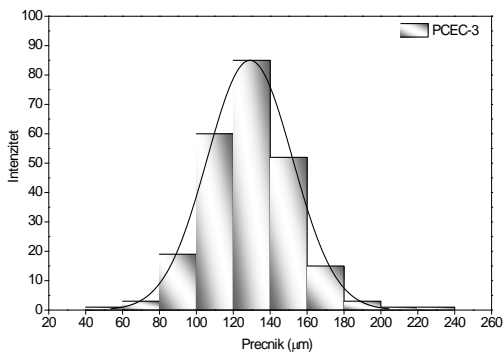
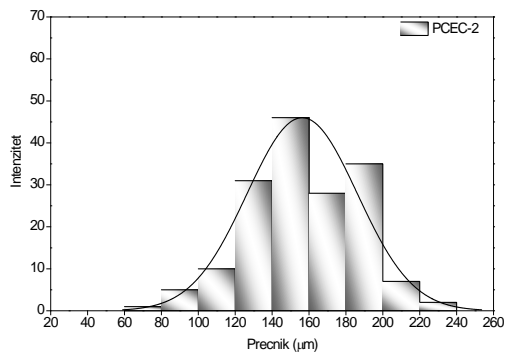
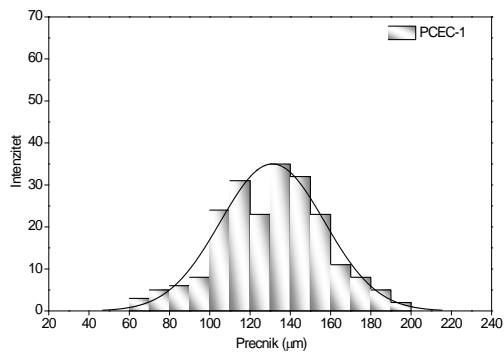
7. Prilog



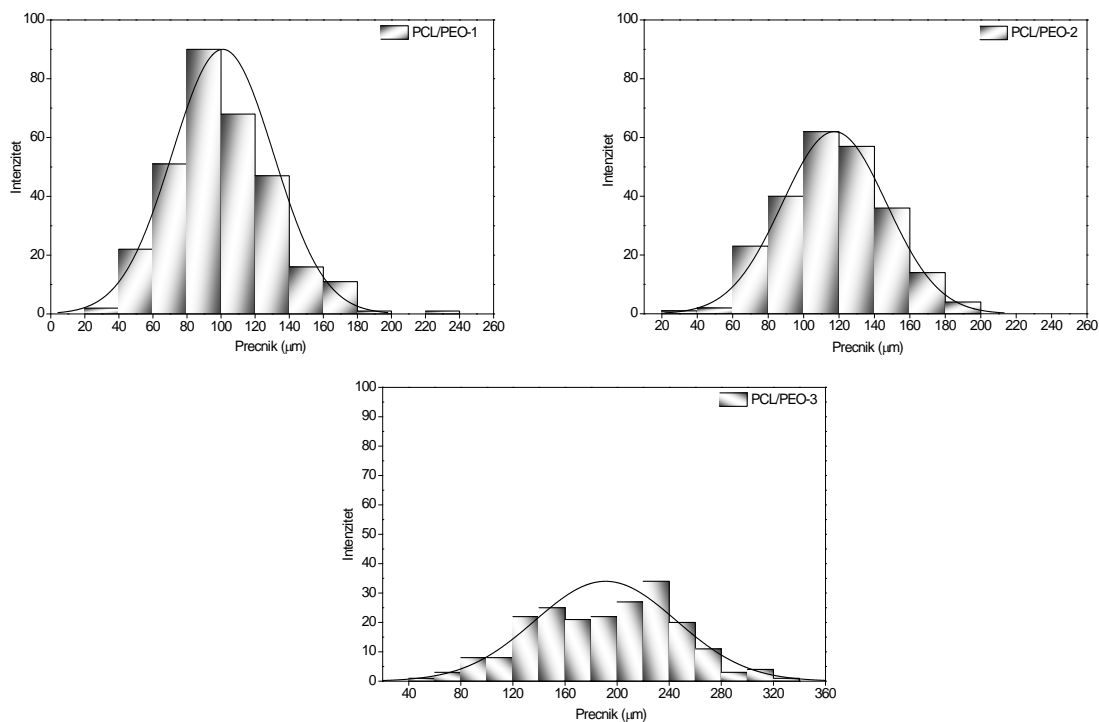
Slika 7.1. Reprezentativni ^1H NMR spektar diblok kopolimera PCL/PEO-1.



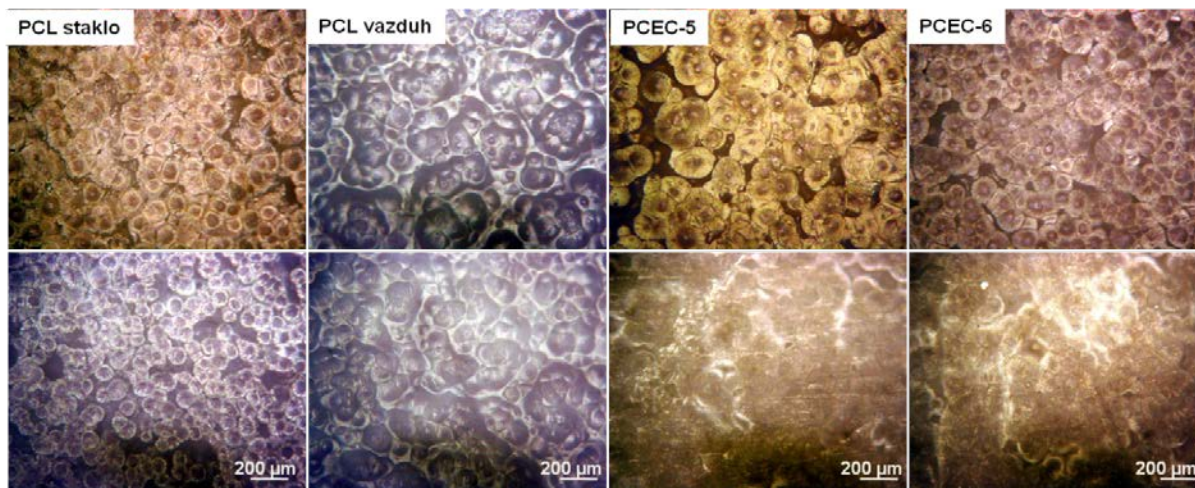
Slika 7.2. Reprezentativni ^{13}C NMR spektar diblok kopolimera PCL/PEO-1.



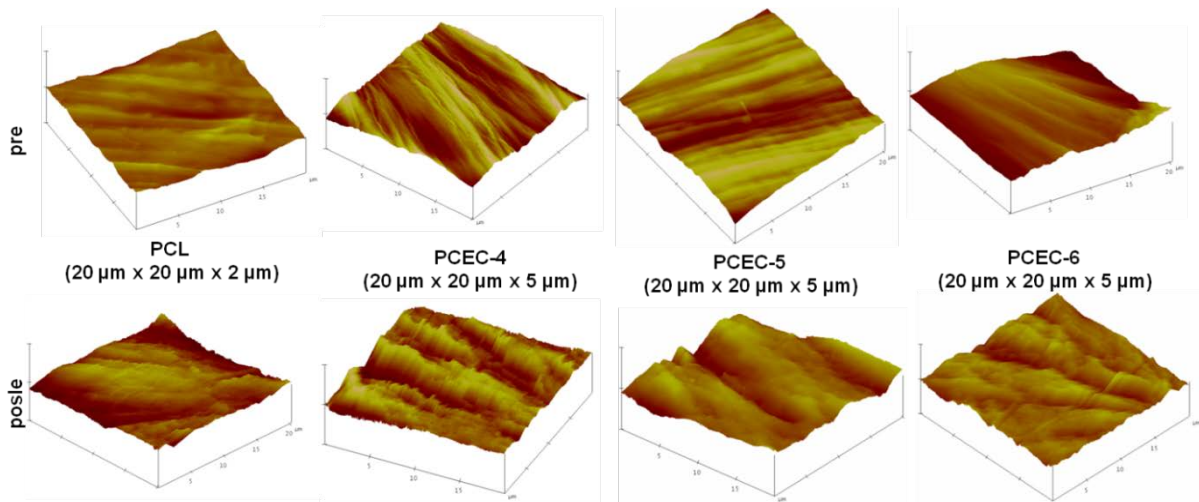
Slika 7.3. Histogrami raspodele veličine sferulita serija triblok kopolimera.



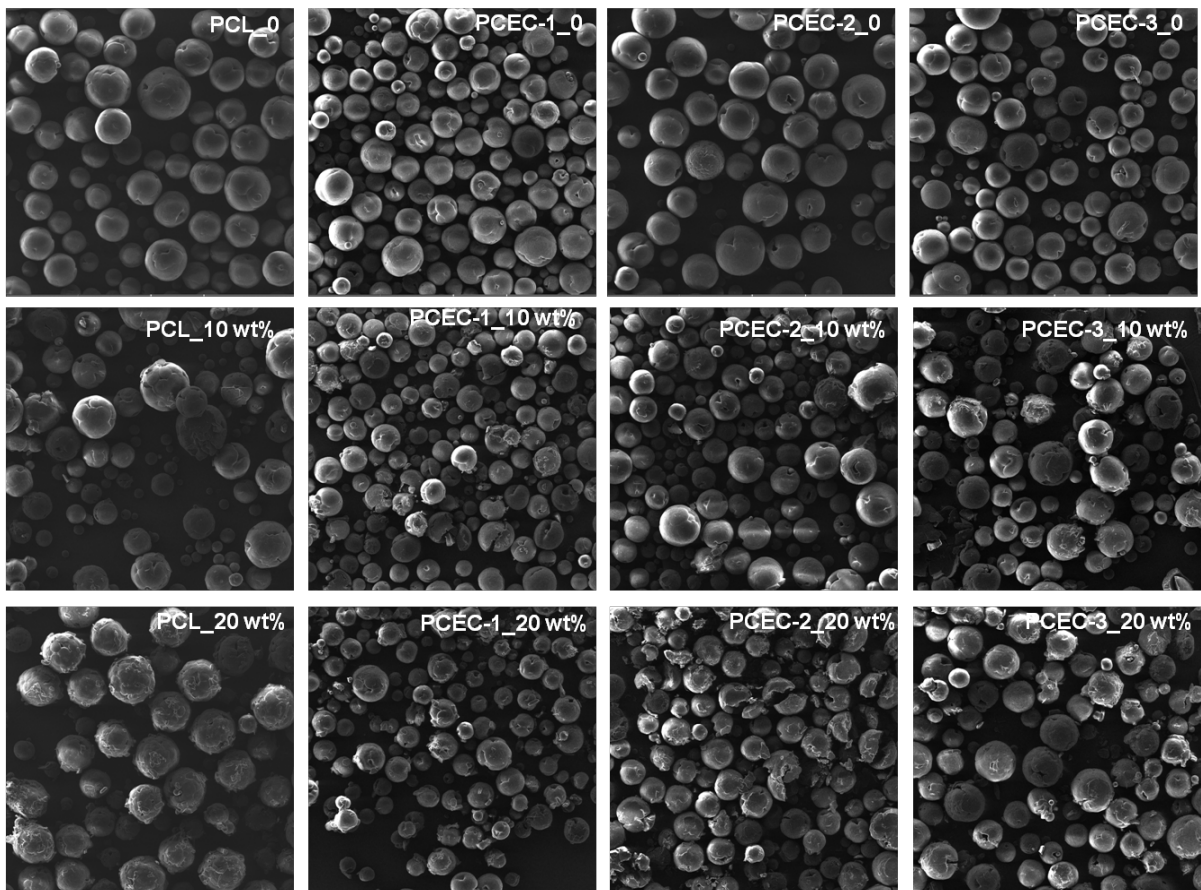
Slika 7.4. Histogrami raspodele veličine sferulita serije diblok kopolimera.



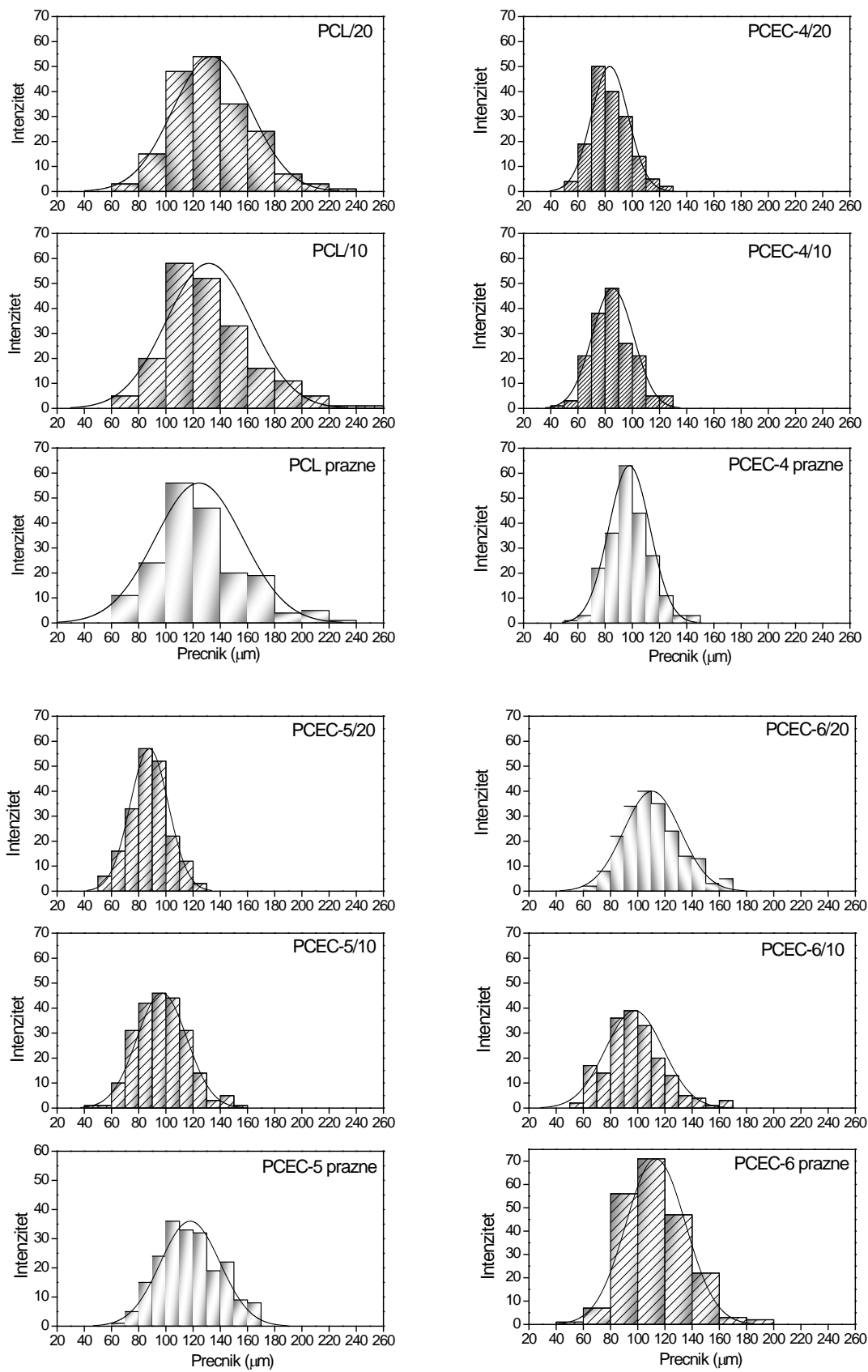
Slika 7.5. Optički mikrografi serije triblok kopolimera sa kraćim PEO blokom pre i posle dve nedelje enzimske degradacije.



Slika 7.6. 3D AFM slike serije triblok kopolimera sa kraćim PEO blokom pre i posle dve nedelje enzimske degradacije.



Slika 7.7. SEM mikrografi dobijenih mikrosfera sa i bez inkapsuliranog leka ($U = 100$).



Slika 7.8. Histogrami raspodele veličina dobijenih mikrosfera sa i bez inkapsuliranog leka (na osnovu SEM analize).

Biografija Marijane Ponjavić, diplomiranog hemičara i master inženjera tehnologije

- ❖ Rođena je 30. jula 1987. godine u Gornjem Milanovcu gde je završila osnovnu školu.
- ❖ Srednju medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, je završila u Čačku.
- ❖ Školske 2006. godine upisuje Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Istraživanje i razvoj.
- ❖ Diplomirala je na Katedri za Organsku hemiju 2011. godine kod mentora prof. dr Bogdana Šolaje.
- ❖ Master studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Hemijsko inženjerstvo, upisala je 2012. godine.
- ❖ Master rad iz oblasti biodegradabilnih polimera pod mentorstvom prof. dr Jasne Donlagić je odbranila 2013. godine.
- ❖ Školske 2013/2014. godine upisuje Doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Hemija, takođe kod mentora prof. dr Jasne Donlagić.
- ❖ Od decembra 2013. godine je zaposlena na Tehnološko-metalurškom fakultetu kao istraživač pripravnik, a naučno zvanje istraživač saradnik stiče februara 2017. godine.
- ❖ Tokom izrade doktorske disertacije, Marijana Ponjavić je angažovana kao istraživač na fundamentalnom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, pod nazivom "Sinteza i karakterizacija novih funkcionalnih polimera i polimernih nanokompozita", rukovodilac prof. dr Ivanka Popović.
- ❖ Od školske 2013/2014. godine je angažovana u nastavi, za izvođenje eksperimentalnih vežbi iz predmeta "Opšta hemija I" i "Opšta hemija II" na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.
- ❖ Do sada, Marijana Ponjavić je objavila dva rada, od kojih je jedan u časopisu vrhunskog međunarodnog značaja (M21a), jedan rad u časopisu istaknutog međunarodnog značaja (M22). Učestvovala je sa četiri saopštenja na skupovima od međunarodnog značaja (M34) i sa pet naučnih saopštenja od nacionalnog značaja (M64), od toga jedno štampano u celini.
- ❖ Na Četvrtoj konferenciji mladih hemičara Srbije, održanoj 5. novembra 2016. godine u Beogradu, dobila je nagradu za najbolje usmeno saopštenje na temu " Mikrosfere na bazi triblok kopolimera PCL/PEO/PCL za kontrolisano otpuštanje ibuprofena".
- ❖ Marijana Ponjavić je član Srpskog hemijskog društva. Govori i piše engleski i nemački jezik.

Spisak objavljenih radova i saopštenja

Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja – M20

Naučni radovi štampani u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja – M21

1. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Nikodinović-Runić J., Jeremić S., Stevanović S., Djonlagić J.: *Degradation behavior of PCL/PEO/PCL and PCL/PEO block copolymers under controlled hydrolytic, enzymatic and composting conditions*. Polymer Testing, 2017, Vol 57, 66-77, ISSN: 0142-9418 (IF =2,464)

Naučni radovi štampani u istaknutim časopisima međunarodnog značaja – M22

1. **Ponjavić M.**, Nikolić M.S., Jeftić S., Rogan J., Stevanović S., Djonlagić J.: *Influence of a low content of PEO segment on the thermal, surface and morphological properties of triblock and diblock PCL copolymers*, Macromolecular Research, 2016, Vol. 24, 323-335. ISSN: 1598-5032 (IF = 1,405)

Zbornici međunarodnih naučnih skupova – M30

Naučni radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu – M34

1. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Đonlagić J., Synthesis and characterization of biodegradable diblock and triblock copolymers based on PCL and PEO, 13th Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering, Belgrade, 10-12 December, 2014, Book of Abstracts, p 30, ISBN: 978-86-80321-30-1.

2. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Nikodinović-Runić J., Jeremić S., Stevanović S., Đonlagić J., Surface properties, hydrolytic and enzymatic degradation of biodegradable PCL/PEO/PCL triblock copolymers, European Polymer Congress, Dresden, 21-26 June, 2015, Book of Abstracts, p 206, ISBN: 978-3-936028-89-8.

3. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Đonlagić J., Thermal and rheological properties of biodegradable diblock and triblock copolymers based on PCL and PEO, European Polymer Congress, Dresden, 21-26 June, 2015, Book of Abstracts, p 52, ISBN: 978-3-936028-89-8.

4. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Nikodinovic-Runic J., Ilic-Tomic T., Djonlagic J., "Controlled drug release systems based on PCL/PEO/PCL triblock copolymers with a low PEO content", European Polymer Congress, Lion, July 2-7, 2017.

Zbornici skupova nacionalnog značaja – M60

Naučni radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u celini – M63

1. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Nikodinović-Runić J., Jeremić S., Stevanović S., Đonlagić J., Pređenje hidrolitičke, enzimске i degradacije u kompostu PCL/PEO diblok kopolimera, 53. Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, Kragujevac, 10-11. jun, 2016, Kratki izvodi radova, str. 86, ISBN: 978-86-7132-061-0.

Naučni radovi saopšteni na skupu nacionalnog značaja štampani u izvodu – M64

1. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Đonlagić J., Nikodinović-Runić J., Jeremić S., Hidrolitička i enzimska degradacija PCL-PEO-PCL blok kopolimera, 51. Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, Niš, 5-7. jun, 2014, Kratki izvodi radova, str. 84, ISBN: 978-86-7132-054-2.

2. **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Jeftić S., Rogan J., Stevanović S., Đonlagić J., Triblok i diblok PCL kopolimeri sa malim sadržajem PEO segmenta: termička, površinska i morfološka svojstva, 52. Savetovanje Srpskog Hemijskog Društva, Novi Sad, 29-30. maj, 2015, Kratki izvodi radova, str. 111, ISBN: 978-86-7132-056-6.

3. Jelić H., **Ponjavić M.**, Nikolić M. S., Đonlagić J., Kontrolisano otpuštanje ibuprofena iz polimernih PCL/PEO/PCL mikrosfera, Treća konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 24. oktobar, 2015. Kratki izvodi radova, str. 75, ISBN: 978-86-7132-059-7.

Izjava o autorstvu

Potpisana : Marijana Ponjavić

broj indeksa: 4020/2013

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Sinteza, karakterizacija i primena biodegradabilnih blok kopolimera na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) i poli(etilen-oksida)

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskoim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Marijana Ponjavić

Broj indeksa: 4020/2013

Studijski program: Hemija

Naslov rada: **Sinteza, karakterizacija i primena biodegradabilnih blok kopolimera na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) i poli(etilen-oksida)**

Mentor: prof. Jasna Đonlagić

Potpisana: _____

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Sinteza, karakterizacija i primena biodegradabilnih blok kopolimera na bazi poli(ϵ -kaprolaktona) i poli(etilen-oksida)

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____
