

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Marija Jevtić, dipl.fiz.hem.

**Sonohemijska sinteza i karakterizacija hidroksiapatita i poli(d,l-
laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozita**

-Magistarska teza-

Beograd

2008.

Mentori:

1. dr Dragoljub Uskoković, naučni savetnik

Institut tehničkih nauka SANU, Beograd

2. dr Nikola Cvjetičanin, docent

Fakultet za fizičku hemiju, Beograd

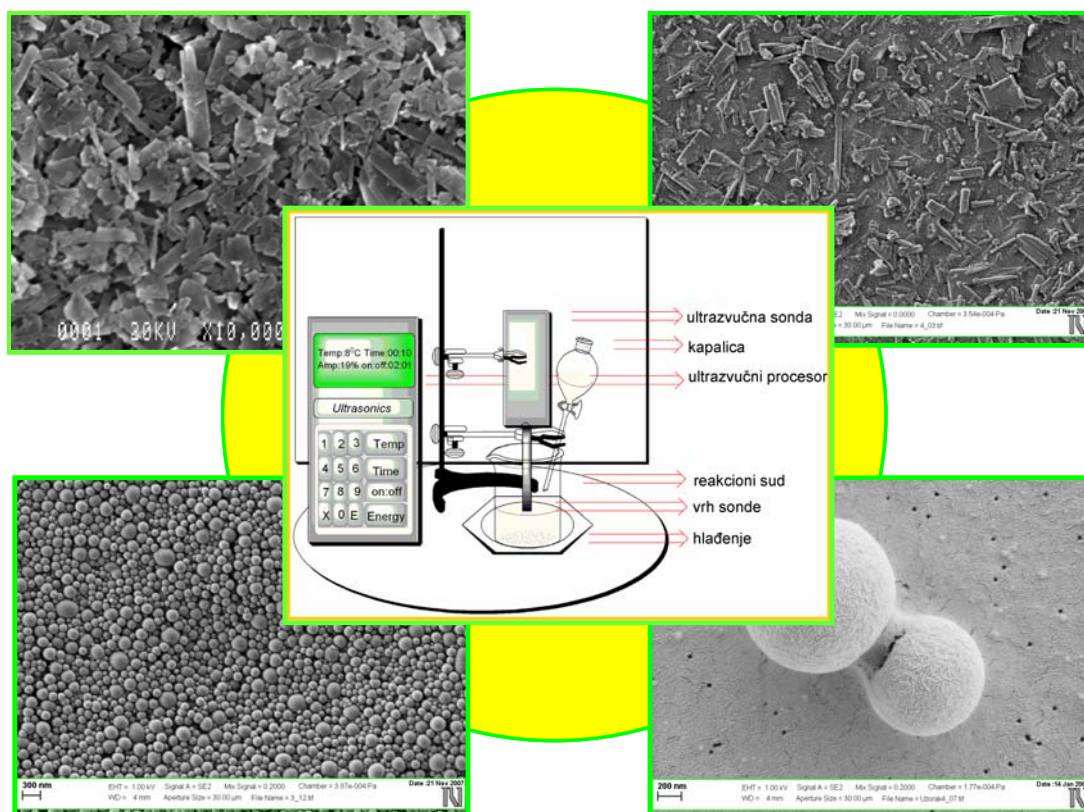
Članovi komisije:

dr Nenad Ignjatović, viši naučni saradnik

Institut tehničkih nauka SANU, Beograd

dr Gordana Ćirić- Marjanović, docent

Fakultet za fizičku hemiju, Beograd



Slika 1: Sonohemijaska metoda i mikroskopski analizirana morfologija hidroksiapatita i poli(d,l-laktid-koglikolid)/hidroksiapatit kompozita

Science is not formal logic—it needs the free play of the mind in as great a degree as any other creative art. It is true that this is a gift which can hardly be taught, but its growth can be encouraged in those who already possess it. —

Max Born (1882-1970) German Physicist. Nobel Prize, 1954.

Predgovor

Istraživanja izvršena u okviru ovog magistarskog rada ostvarena su najvećim delom kroz projekat 142006 pod nazivom "Sinteza funkcionalnih materijala sa kontrolisanom strukturom na molekulskom i nano nivou", dok je deo realizovan kroz program bilateralne međunarodne saradnje "Dizajniranja funkcionalnih materijala na molekulskom i nano nivou" Instituta tehničkih nauka SANU i Instituta Jožef Stefan koji vode prof. dr Dragoljub Uskoković i prof. dr Danilo Suvorov. Ovom prilikom želela bih da im se zahvalim na stručnoj pomoći i ukazanoj prilici da u okviru projekata koje vode realizujem ovaj magistarski rad.

Naročitu zahvalnost dugujem dr Nenadu Ignjatoviću, višem naučnom saradniku Instituta tehničkih nauka i vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Nišu, i dr Magdaleni Stevanović, naučnom saradniku Instituta tehničkih nauka SANU, na izuzetno korisnim sugestijama koje su mi omogućile da u okviru ove magistarske teze nastavim da razvijam koncept koji je postavljen u njihovim istraživanjima.

Veliku zahvalnost dugujem dr Nikoli Cvjetićaninu, docentu Fakulteta za fizičku hemiju, koji je kao mentor ovog magistarskog rada pomogao u njegovoj realizaciji i koncipiranju. Takođe bih želela se zahvalim i dr Gordani Ćirić-Marjanović, docentu Fakulteta za fizičku hemiju, na stručnoj pomoći i korisnim savetima.

Rendgenostrukturalna proučavanja koja su obavljena u okviru ovih istraživanja izvršena su zahvaljujući velikoj pomoći dr Miodraga Mitrića, naučnog savetnika Instituta nuklearnih nauka "Vinča". Jedan deo mikroskopskih merenja urađen je na Biološkom fakultetu u Novom Sadu zahvaljujući saradnji sa dr Milošem Bokorovim, dok je drugi deo urađen u Institutu Jožef Stefan uz pomoć dr Sreća Škapina, dr Boštjana Jančara i Ines Bračko kao i mr Gregora Kapuna sa Nacionalnog hemijskog instituta iz Ljubljane. Infracrvena spektroskopska analiza rađena je na Institutu za opštu i fizičku hemiju zahvaljujući pomoći Aleksandre Radulović. Dr Kristoffer Krnel, sa Instituta Jožef Stefan, je pomogao u DLS merenjima, dok su prof. dr Janez Plavec i dr Ema Žagar sa Nacionalnog hemijskog instituta iz Ljubljane pomogli u realizaciji i analizi rezultata NMR spektroskopskih i GPH merenja. Svim saradnicima koji su mi pomogli u ovim istraživanjima želela bih da zahvalim na velikom trudu i dobroj saradnji.

Istakla bih veliku zahvalnost saradnicima Instituta tehničkih nauka SANU na kolegijalnosti, pomoći i podršci. Posebno bih pomenula pomoć Milice Ševkušić, bibliotekara Instituta tehničkih nauka SANU, na veoma korisnoj tehničkoj pomoći i lekturi.

SADRŽAJ

IZVOD	8
ABSTRAKT	9
I TEORIJSKI DEO	11
Uvod	12
1.1 ULTRAZVUK	15
1.2 SONOHEMIJA.....	16
1.2.1 Akustična kavitacija- homogeni i heterogeni sistemi	17
1.2.2 Hemijski i fizički efekti ultrazvuka.....	19
1.3 SONOHEMIJA U NAUCI O MATERIJALIMA	22
1.3.1 Sonohemija u sintezi i modifikaciji nanostrukturnih materijala.....	22
1.3.2 Sonohemija u oblasti organske hemije.....	24
1.3.3 Sonohemija u oblasti polimera- sintetičkih i bioloških	25
1.3.4 Sonohemija i formiranje kompozitnih materijala.....	29
1.4 BIOMATERIJALI.....	32
1.4.1 Hidroksiapatit	34
1.4.2 Poli(laktid-ko-glikolid).....	40
1.4.3 Materijali za rekonstrukciju koštanog tkiva.....	48
II CILJ RADA	52
III EKSPERIMENTALNI DEO	55
3.1 IZBOR EKSPERIMENTALNE METODE.....	56
3.2 MATERIJAL	58
3.3 HOMOGENA SONOHEMIJSKA PRECIPITACIJA HIDROKSIAPATITA (HAp) I FORMIRANJE POLI(LAKTID-KO-GLIKOLID)/HIDROKSIAPATIT (DLPLG/HAp) KOMPOZITA	59
3.3.1 Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita (HAp)- $Ca_5(PO_4)_3OH$	59
3.3.2 Ultrazvučno usitnjavanje čestica hidroksiapatita	60
3.3.3. Ultrazvučno procesiranje DLPLG polimera i formiranje DLPLG/HAp kompozita.....	60
3.4 METODE KARAKTERIZACIJE.....	63
3.4.1 Karakterizacija hidroksiapatita (HAp)	63
3.4.2 Karakterizacija DLPLG/HAp kompozita	65
IV REZULTATI	70
4.1 HOMOGENA SONOHEMIJSKA PRECIPITACIJA HIDROKSIAPATITA	71
4.1.1 Uticaj uree kao precipitacionog agensa homogene precipitacije.....	71
4.1.2 Strukturna analiza sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita.....	75
4.2 ULTRAZVUČNO USITNJAVANJE ČESTICA HIDROKSIAPATITA	83
4.3 ULTRAZVUČNO PROCESIRANJE POLI(D,L-LAKTID-KO-GLIKOLIDA).....	85

4.4 FORMIRANJE DLPLG/HAP KOMPOZITA U POLJU ULTRAZVUKA.....	87
4.4.1 DLPLG/HAp kompozitni materijal sa različitim sadržajem polimerne i keramičke faze.....	88
4.4.1 Uticaj snage ultrazvučnog polja	94
4.4.2 Uticaj udela polimerne i keramičke faze na morfologiju DLPLG/HAp kompozita.....	95
4.4.3 Uticaj temperature na proces oblaganja hidroksiapatita polimerom	97
4.4.4 Uticaj različitih stabilizatora	100
4.4.5 Uticaj redosleda koraka u procesu formiranja DLPLG/HAp kompozita.....	101
4.4.6 Morfologija hidroksiapatita u kompozitu.....	102
V DISKUSIJA.....	104
5.1 HOMOGENA SONOHEMIJSKA PRECIPITACIJA HIDROKSIAPATITA	105
5.2 PROCESIRANJE DLPLG/HAP U POLJU ULTRAZVUKA	107
VI ZAKLJUČAK.....	115
SADRŽAJ TABELA	121
LITERATURA	122

Izvod

U radu predstavljenom u ovoj magistarskoj tezi ultrazvučna metoda je iskorišćena za sintezu hidroksiapatita (HAp), usitnjavanje dobijenih aglomerata ultrazvučnim poljem visokog intenziteta i njihovo oblaganje poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-om (DLPLG) u cilju dobijanja poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/ hidroksiapatit kompozitnog materijala (DLPLG/HAp).

Optimizacijom parametara metode homogene sonohemijske precipitacije utvrđena je koncentracija uree, agensa homogene precipitacije, neophodna za potpunu transformaciju smeše oktakalcijum-fosfata (OCP) i hidroksiapatita do monofaznog HAp-a. Ovako dobijene čestice hidroksiapatita gradile su pločaste aglomerate mikronskih dimenzija izgrađene iz submikronskih paralelno orijentisanih i bočno spojenih štapića. Daljom analizom ustanovljeno je da su ovi štapići monokristali sa preferentnim pravcem rasta duž c-ose. Ultrazvučnim sitnjenjem dobijenih suprastruktura u inernom medijumu postignuta je njihova deaglomeracija. Visoka adhezivnost i male dimenzije ovih kristala doprineli su tome da su ovi štapići u najvećem meri bili deaglomerisani u sistemu koji je neposredno nakon sitnjenja obložen polimerom, što su rezultati mikroskopskih analiza i pokazali. Morfologija poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozitnog materijala dalje je modifikovana optimizacijom parametara prilikom oblaganja apatita polimerom. Ustanovljeno je da parametri poput udela keramičke i polimerne komponente, snage ultrazvučnog polja, temperature medijuma, vrste stabilizatora i koraka u procesu oblaganja imaju veoma veliki uticaj na finalnu morfologiju kompozitnih čestica. Rezultat ove optimizacije su sferne čestice DLPLG/HAp kompozita uske raspodele veličina, veoma pravilnog oblika i glatkih površina i sa karakterističnom planarnom prostornom organizacijom sfera. Parametri koji omogućavaju ovakvu morfologiju čestica DLPLG/HAp kompozita su: udeo polimerne i keramičke faze 90:10 (mas. %), snaga ultrazvučnog polja od 142.5 W, niska temperatura medijuma (8°C), poli(vinil-pirolidon) (PVP) kao stabilizator i neophodno dispergovanje apatita u rastvoru polimera u cilju formiranja fine suspenzije čvrstih čestica u rastvoru kako bi se postigla homogenost neposredno pre precipitacije polimera i oblaganja apatita.

Strukturu i međusobni raspored komponenti unutar kompozita je veoma teško direktno odrediti obzirom na termičku nestabilnost i degradaciju polimernog dela kompozita. Međutim, obzirom na to da je primećena isključivo sferna morfologija kompozitnih čestica nasuprot štapićastom apatitu, primenom ultrazvučnog procesiranja formiraju se sferne strukture izgrađene iz poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a kao omotača unutar koga su raspoređeni štapići hidroksiapatita.

Abstrakt

In the work presented in this thesis, the ultrasound method was applied for the synthesis of hydroxyapatite (HAp), breaking down of obtained superstructures (by high-intensity ultrasonic field) and their coating with poly(d,l-lactide-co-glycolide) (DLPLG) with the aim to formulate poly(d,l-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite material.

The concentration of urea, as homogeneous precipitation agent, required for the complete transformation of the mixture of octacalcium-phosphate (OCP) and HAp to monophase HAp, was determined by the optimisation of parameters within the homogeneous precipitation method. Hydroxyapatite obtained in this manner consisted of plate-like superstructures of micrometer dimensions formed by parallelly organized and laterally connected submicron rods. Further analysis showed that the rods were monocrystals with preferred growth direction along c-axis. Deagglomeration of the obtained superstructures was achieved by ultrasonic graining in inert medium. High adhesivity and small dimensions of these crystals result in the highest degree of deagglomeration in the system coated by the polymer right after ultrasonic graining, which was confirmed by microscopic measurements. The morphology of DLPLG/HAp composite was further modified by the optimisation of parameters applied during the process in which apatite was coated by the polymer. It has been noticed that parameters, like ceramic-to-polymer part ratio, ultrasonic field power, temperature of the medium, type of stabilizer, sequence of the steps during the coating process, have great influence on the final morphology of composite's particles. The results of this optimisation are sphere-like particles of DLPLG/HAp composite with uniform size distribution, highly regular shapes, smooth surfaces and characteristic planar spatial organization. Such a morphology was obtained with the following set of parameters: 90:10 polymer-to-ceramic part ratio, low temperature of the medium (8°C), poly(vinyl-pyrrolidone) (PVP) used as stabilizer and dispersing apatite within the polymer solution, as a necessary precondition for obtaining a fine suspension of solid particles within the solution in order to achieve homogeneity before the precipitation of the polymer and during its deposition over apatite.

Due to thermal instability and degradation of the polymeric part of the composite, it was very difficult to determine the structure and internal organization of the component parts within the composite through the direct method. However, the fact that only sphere-like morphology of the composite material, as opposed to rod-like apatite crystals, was detected,

we may presume that the application of ultrasonic processing resulted in core-shells of DLPLG with hydroxyapatite distributed inside them.

I

Teorijski deo

Uvod

Hemijski efekti ultrazvuka prvi put su primećeni još 1927. godine^[1], ali njihova primena nije usledila iz tehničkih razloga koji su uspešno rešeni tek osamdesetih godina prošlog veka. Obzirom na dizajniranje nove, praktične i ekonomične ultrazvučne opreme, primene fenomena registrovanog tridesetih godina prošlog veka i istraživanja njegovih daljih mogućnosti, osnivačima metode sonohemije smatraju se prof. dr Kenneth S. Suslick i njegovi saradnici.^[2] Obnavljanjem ovog fenomena i nastankom koncepta sonohemije počinje ekspanzija istraživanja u ovoj oblasti. Sa eksperimentalnim otkrićem sonoluminiscencije u pojedinačnom kavitacionom mehuriću 1992^{[3],[4]} godine, mnogi istraživači su pokušavali da objasne ovaj fascinantni fenomen pretvaranja zvuka u svetlost preko jednog mehurića mikronskih dimenzija. Osnovni fenomeni ove metode kao i mogućnosti njene primene još uvek se ispituju i proširuju.

Poslednjih godina veliki potencijal ultrazvuka frekvencije od 20 do 100 kHz intenzivno se primenjuje u hemiji u okviru nauke o materijalima, aerogelova, prehrambene i ekološke («*green*») hemije, a svoju primenu proširuje i na ostale oblasti istraživanja. Značaj koji sonohemija dobija potiče upravo od netipičnih mogućnosti koje njena primena pruža, a koje se ogledaju u povećanju brzine, prinosa i selektivnosti hemijskih reakcija, uslovima za dobijanje netipičnih produkata i korišćenju različitih neklasičnih prekursora kao i mogućnosti promene pravca reakcije u cilju postizanja veće selektivnosti.^[5]

Kada je reč o sonohemiji u okviru nauke o materijalima, najinteresantniji aspekt njene primene je uticaj na morfologiju materijala. Primećeno je da se morfologija nekih materijala veoma razlikuje u zavisnosti od toga da li je materijal sintetisan sonohemijski ili nekom od klasičnih metoda. Jedno od objašnjenja ovakvih pojava odnosi se na pozitivan uticaj ultrazvuka na proces kristalizacije (sonokristalizacija) koji se ogleda u značajnom smanjenju perioda inicijacije, uslova prezasićenja i širine metastabilne zone. Na ovaj način se mogu postići: (a) brža primarna nukleacija, (b) relativno lakša nukleacija u slučaju materijala koji teško grade nukleuse, (c) inicijacija sekundarne nukleacije i (d) proizvodnja manjih kristala uniformnije raspodele veličina u odnosu na klasičnu kristalizaciju. Sa druge strane, pokazano je da adekvatna primena ultrazvuka inhibira aglomeraciju ili pak omogućava deaglomeraciju. Variranjem parametara, kao što su frekvencija, intenzitet, snaga i geometrija ultrazvučnog uređaja, omogućava se ciljana upotreba navedenih uticaja ultrazvuka. Na ovaj način moguće je dizajnirati dve najznačajnije osobine materijala- oblik i raspodelu veličina čestica.^{[6],[7],[8]}

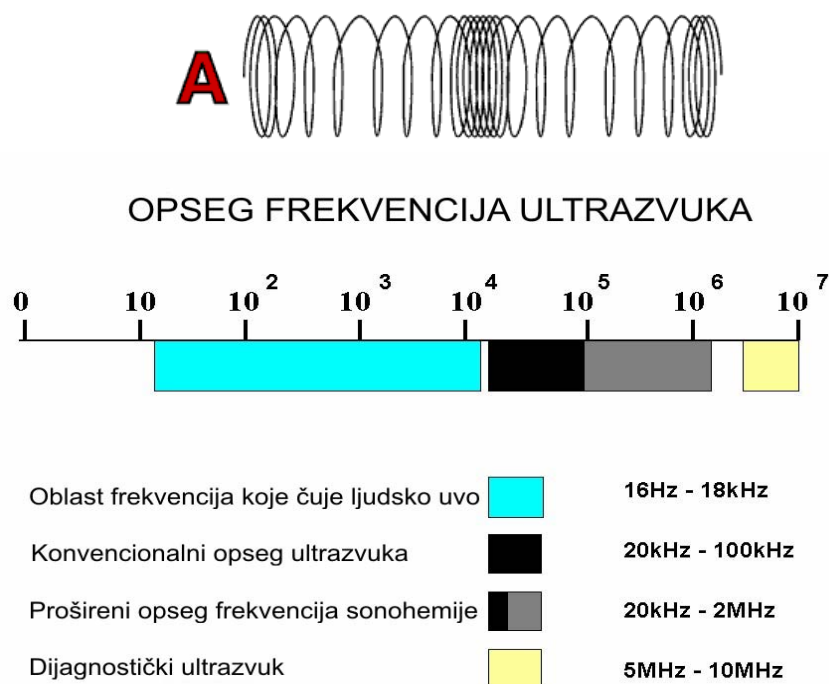
Treba napomenuti da je u dugom nizu godina veoma veliki broj rezultata postignut primenom ultrazvučnih metoda u Institutu tehničkih nauka SANU. Sa primenom efekata ultrazvuka u sintezi i dizajniranju morfoloških osobina materijala krenulo se primenom indirektno ultrazvučne metode- ultrazvučne sprej-pirolize (aerosol sinteze). U okviru ove metode prvenstveno se koriste fizički efekti ultrazvuka za raspršivanje rastvora i formiranje što sitnijih kapi tečnosti (reaktanata) koje će biti pojedinačni reaktori u okviru kojih će se odvijati hemijske reakcije. Primenom ove metode, sintetisani su mnogi materijali kao što su barijum titanat (BaTiO_3)^[9], cink oksid (ZnO)^[10] i njegove supstituisane forme^{[11],[12]}, nikl oksid (NiO)^[13], aluminijum oksid (Al_2O_3)^[14], mulit^[15], kordierit^[16], silicijum karbid (SiC)^[16], titanijum dioksid (TiO_2)^[18], nikl (Ni)^[19], litijum gvožđe fosfat (LiFePO_4)^[20], litijum manganat (LiMn_2O_4) i njegove supstituisane forme^[21], cirkonijum oksid ZrO_2 ^[22], srebro jodid AgI ^[23] kao i dopirani sistemi poput $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}$ ^[24], $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}:\text{Ce}^{3+}$ ^[25] i $\text{YAG}:\text{Ce}$ ^[26]. Na ovaj način dobijeni su nanometerski i nanostrukturni materijali sfernih čestica (šuplje sfere TiO_2 ^[27]). Kada je reč o kalcijum fosfatima i njihovim kompozitnim materijalima, ova metoda je primenjena za dobijanje Ca-hidroksiapatit/titanijumskih supstrata (Ca-HAp/Ti)^[28], Ca-hidroksiapatit karbonata (Ca-HAp-CO_3)^[29] i bifaznog kalcijum fosfata i njegovog kompozita sa polimerom (BCP i BCP/PLGA)^[30]. Nakon dugogodišnje primene ove indirektno metode, počinje se sa primenom ultrazvučne sonohemije - direktno ultrazvučne metode koja obuhvata i fizičke i hemijske efekte ultrazvuka. Jedan od zanimljivih primera je deaglomeracija barijum titanata (BaTiO_3) u polju ultrazvuka^[31] kao i sinteza litijum gvožđe fosfata^[20] i njegovog kompozita sa ugljenikom ($\text{LiFe PO}_4/\text{C}$)^[32].

Dalja primena ultrazvučne metode za sonohemijsku sintezu hidroksiapatita (HAp) i formiranje njegovog kompozita sa polimerom (DLPLG/HAp) u polju ultrazvuka odnosi se na temu ovog rada. DLPLG je polimerni materijal odobren od Svetske zdravstvene organizacije i Američke agencije za kontrolu hrane i lekova kao materijal koji se može koristiti u medicini i farmaciji (fiksacija koštanih fraktura, izrada konaca za ušivanje organa i rana, izrada sistema za kontrolisanu dostavu medikamenata, itd.) U okviru naše laboratorije do sada su rađena istraživanja za dobijanje čestica DLPLG fizičko hemijskom rastvarač/nerastvarč metodom uz korišćenje tehnike centrifugalnog procesiranja a u cilju dobijanja sistema za kontrolisanu dostavu različitih medikamenata (askorbinske kiseline, folne kiseline, itd)^{[33],[34],[35]}. Osim toga, dugogodišnje proučavanje materijala za reparaciju i rekonstrukciju koštanog tkiva koje se kod nas sprovodi, pokazalo je izuzetne rezultate vezane za *in vitro* i *in vivo* analize DLPLG/HAp kompozitnog materijala.^[36] Primenom ultrazvučne metode u procesiranju ovog materijala očekuje se unapređenje njegove morfologije što bi moglo direktno da utiče na njegovu

biomedicinsku aplikativnost uključujući i mogućnost njegovog korišćenja kao nosača za kontrolisanu dostavu medikamenata.

1.1 Ultrazvuk

Ultrazvuk je periodični zvučni talas frekvencije iznad gornje granice detekcije ljudskog uva. Frekvencije zvuka od 20 kHz do 2 MHz i odgovarajuće talasne dužine od 10 do 0.01 cm pripadaju oblasti ultrazvuka. Prirodu ovih talasa odlikuje nelinearnost koja se ogleda u njihovim periodičnim skupljanjima i širenjima (slika 1.1).^{[37],[38]}



Slika 1.1: Model prostiranja ultrazvučnog talasa i opseg frekvencija ultrazvuka^{[37],[38]}

Široka primena ultrazvuka u svakodnevnom životu većinom je vezana za njegovu dijagnostičku i terapijsku upotrebu u medicini. Obzirom na to da se radi o nedestruktivnom i nejonizujućem zračenju kratkog dometa, ultrazvuk je jedna od glavnih dijagnostičkih metoda savremene medicine. Primer dijagnostičke tehnike je ultrasonografija - metoda koja stvara 4D sliku mekog tkiva. U terapijske svrhe koristi se niskofrekventno, dozirano ultrazvučno zračenje čija se primena kreće od higijene i stimulacije rasta zuba i ostalog koštanog tkiva kod dece, liposukcije gojaznih osoba, sinergičkog antibakterijskog dejstva sa antibioticima, detekcije i razbijanja tromba u krvnim sudovima do kombinacije fokusirajuće ultrazvučne hirurgije (FUS) sa nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR) u tretiranju benignih i malignih tumora ultrazvučnim zračenjem niske frekvencije i visokog intenziteta.^[39]

U poslednje vreme intenzivno se razmišlja i o primeni ultrazvuka za lociranu dostavu terapijskih agenasa kao što su genetski materijal, proteini i hemoterapijski agensi. Naime,

kavitacioni mehurići su dobri medijatori koji pomoću sila usmerenih ka ćelijskoj membrani stimulišu njenu permeabilnost što oslobađa put vezikulama koje su nosioci željenih lekova. Kada je reč o dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNK), ona se direktno kači za mikro-mehurić ili pak za liposome ispunjene gasom i u tom obliku transportuje do željenih ćelija. Do sada je na ovaj način urađena dostava genetskog materijala do srčanog mišićnog tkiva, pa čak i do ćelija fetusnog tkiva i tumora. Kada je reč o proteinima, ultrazvuk se najčešće koristi za transdermalnu dostavu insulina, što je za osobe koje boluju od dijabetesa daleko bezbolniji način za svakodnevnu primenu terapije. Hemoterapijski agensi se dostavljaju unutar micela ili lipozoma izloženih poljem ultrazvuka. Uloga ultrazvuka u ovom procesu je najpre u transportu usled povećanja permeabilnosti ćelijskih membrana i kapilara, a zatim u otpuštanju leka obzirom da ultrazvuk omogućava otvaranje nosača.^{[40],[41],[42]}

Jedna od najprofitabilnijih strana ultrazvuka je njegova primena u industriji. On se koristi kao nedestruktivno sredstvo za merenje debljine i detekciju šupljina na površinama kompaktnih konstrukcija industrijskih mašina. Više frekvencije ultrazvuka koriste se za testiranje metalnih i plastičnih, a niže za tretiranje drvenih, betonskih i drugih poroznih konstrukcija. U industriji se ultrazvuk koristi i za prenos toplote kroz tečnosti kao i za proizvodnju ekološkog biogoriva. Obzirom na činjenicu da su poslednjih godina alternativni izvori energije u žiži interesovanja, proizvodnja goriva iz biomase procesom suvog ultrazvučnog mlevenja biootpada ima veliki potencijal.^[39]

Ultrazvučni ili supersonični čistači danas se intenzivno koriste za čišćenje različitih površina kao što su nakit, sočiva i drugi optički elementi, satovi, stomatološki i hirurški instrumenti.^[39]

Poslednjih godina visoki potencijal ultrazvuka frekvencije od 20 do 100 kHz intenzivno se primenjuje u hemiji u okviru sonohemije.

1.2 Sonohemija

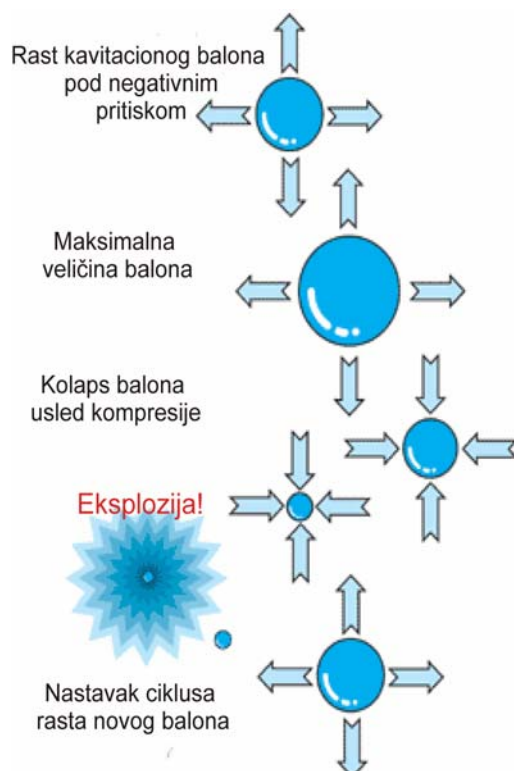
Osnovni princip sonohemije je interakcija ultrazvučnog talasa sa materijom koja se ne odvija na molekulskom nivou, obzirom na talasnu dužinu koja daleko prevazilazi dimenzije molekula, već preko nekoliko drugih fizičkih mehanizama koji zavise od prirode sistema. Primena sonohemije podrazumeva iskorišćenje ekstremnih hemijskih i fizičkih efekata koji nastaju u interakciji ultrazvuka sa materijom.^[2]

1.2.1 Akustična kavitacija- homogeni i heterogeni sistemi

Ispitivanje sonohemije podrazumeva razumevanje efekata koji nastaju u interakciji ultrazvučnih talasa, frekvencije od 20 do 100 kHz, sa hemijskim sistemom.

U gasovitim i većini čvrstih supstanci javlja se intenzivno propuštanje ultrazvučnih talasa, dok sa druge strane, u tečnostima postoji kontinualno propuštanje ovih talasa dok god je njihova amplituda mala. Sa povećanjem amplitude talasa period njihovog širenja pri prolasku kroz tečni medijum dovodi do pojave negativnog pritiska u oblastima širenja koji u jednom momentu postaje dovoljno veliki da uzrokuje lokalne poremećaje u tečnosti - fenomen poznat kao kavitacija.

Kavitacioni mehurići nastaju na mestima širanja talasa usled nastalog negativnog pritiska i to najpre kao nukleusi-male tačke u tečnosti ispunjene vazduhom.. Ako je intenzitet ultrazvučnog polja mali, ovi nukleusi će najpre rasti (širiti se) u toku periode akustičnog



ciklusa u kojoj je pritisak negativan i kompresovati se u periodama u kojima je pritisak pozitivan.^[43] Pri ovom procesu širenje je intenzivnije od kompresije i nukleus raste do mehurića mikronskih dimenzija. Ako je intenzitet ultrazvučnog polja veliki, nukleusi će inercijalno rasti bez kompresije.

Kada kavitacioni mehurić dostigne rezonantnu veličinu, absorbuje energiju iz ultrazvučnog polja i eksplodira. Nastaje udarni talas koji se radijalno prostire kroz medijum. Ovo je glavni razlog zbog koga su hemijski efekti ultrazvuka primećeni samo u tečno-gasovitim, tečno-tečnim i čvrsto-tečnim sistemima, dok efekti u čvrsto-gasovitim i

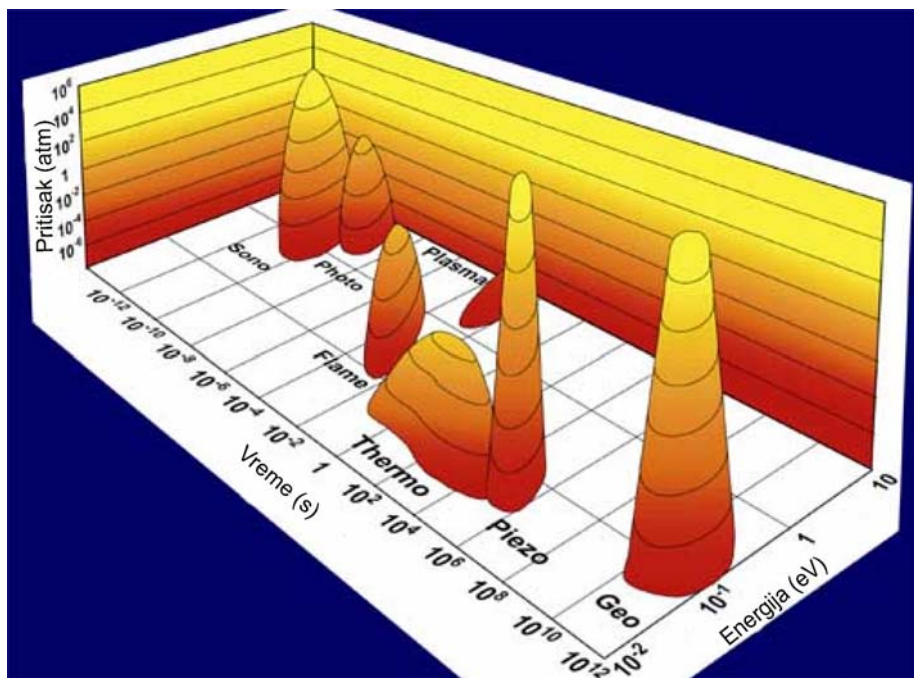
čvrsto-čvrstim sistemima još nisu zabeleženi.

Slika 1.2: Shematski prikaz mehanizma interakcije ultrazvuka sa neelastičnim medijumom^[38]

Dakle, pod pojmom akustične kavitacije podrazumeva se formiranje, rast i kolaps mehurića (Slika 1.2) nastalih kao posledica interakcije talasa sa medijumom kroz koji prolazi.

Dinamika rasta i eksplozije mehurića strogo je zavisna od lokalnog okruženja.^[44] U toku kavitacije, kolaps mehurića uzrokuje vruće tačke koje odlikuju ekstremni parametri kao što su

intenzivno lokalno zagrevanje ($T \sim 5000^\circ\text{C}$), visok pritisak ($p \sim 1000\text{atm}$) velika brzina hlađenja ($\Delta T \sim 10^{10}\text{K/s}$) i vrlo kratko vreme života intermedijernih vrsta. Poređenje sonohemijskih parametara i parametara koji se koriste u drugim hemijskim metodama prikazano je na slici 1.3. [45]



Slika 1.3: Sonohemijski parametri u poređenju sa parametrima drugih hemijskih metoda [45]

Neki od ultrazvučnih parametara su eksperimentalno određeni direktnom metodom jednomolekulskog reaktora dok su ostali određeni posredno preko sonoluminiscencije. [46] Za tu namenu korišćena je temperaturski zavisna reakcija supstitucije metalnih karbonila. Identifikovani produkti ukazivali su na dva mesta sonohemijske aktivnosti i to u gasu unutar mehurića i u tečnosti u njihovoj okolini, nastalih usled lokalno razvijenih temperatura u ovim regionima [47],[48],[49]

Prilikom prolaska ultrazvuka kroz tečnosti, pored opisanih hemijskih efekata, dešava se i emisija svetlosti. Ova pojava poznata je pod nazivom sonoluminiscencija (Slika 1.4) [45] i posledica je emisije svetlosti usled relaksacije pobuđenih elektronskih stanja pojedinih molekulskih vrsta u toku poslednje faze kavitacije u kojoj se postižu opisani ekstremni parametri. Utvrđeno je da je trajanje sonoluminiscentne emisije veoma kratko i može biti kraće od stotinak pikosekundi odnosno milioniti deo trajanja akustične kavitacije. Precizirano je da ova kratka emisija potiče od formiranja udarnog talasa. [3]



Slika 1.4: Sonoluminiscencija eksperimentalno registrovana u ultrazvučnoj sondi visokog intenziteta^[45]

Za razliku od kavitacije koja se javlja u tečno—tečnim i tečno—gasovitim sistemima, akustična kavitacija u tečno—čvrstim sistemima je nešto drugačija. Dok su u tečno-tečnim sistemima kavitacioni mehurići sferni, u tečno—čvrstim se oni u blizini čvrste površine gradijentno deformišu do kolapsa koji generiše brze mikromlazeve tečnosti. Mikromlazevi stvaraju talas koji udara u čvrstu površinu. Obzirom na veliku količinu energije koja se prenosi na ovaj talas u momentu eksplozije mehurića, on stiže ogromne brzine (čak i do nekoliko stotina metara u sekundi) što omogućava oštećenje čvrste površine ili lomljenje čvrstog materijala. Ovaj efekat prvi put je registrovan na osnovu snimaka laserski indukovane kavitacije brze mikro-kamere.^[50] Uticaj mikromlazeva i udarnog talasa na okruženje intenzivno se koristi u procesu ultrazvučnog čišćenja i heterogene hemijske reakcije.

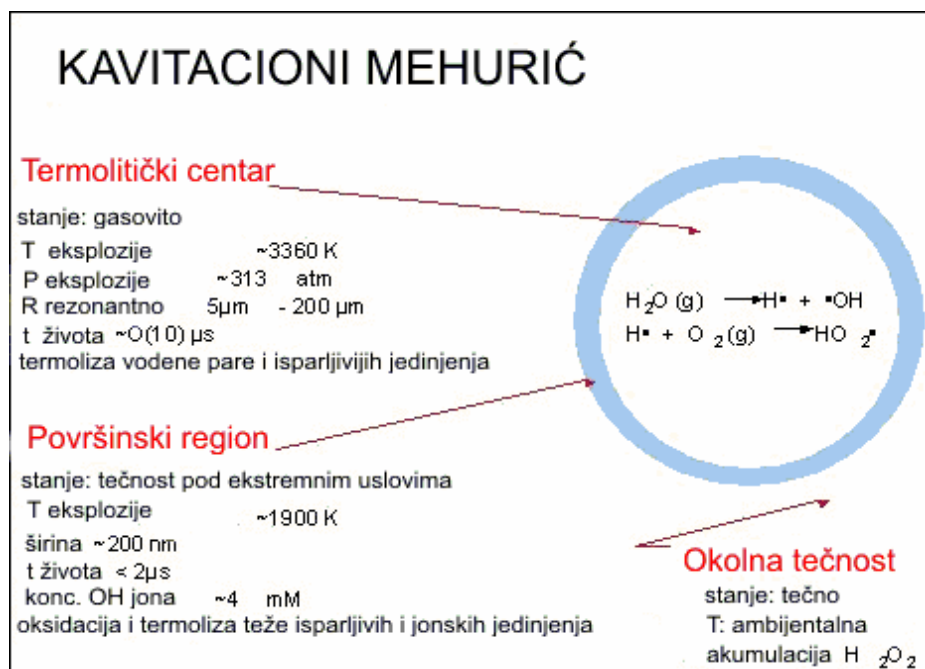
Ako je čvrsta faza u obliku praha (čestice čvrste faze do $\sim 0.200 \mu\text{m}$) dispergovanog u tečnosti, tada kavitacija i talas koji ona stvara ne izazivaju eroziju površine već ubrzavaju sitne čvrste čestice do velikih brzina.^[51] Ovako ubrzane čestice se međusobno sudaraju i prenose ogromnu energiju u toku sudara. Rezultat toga su promena morfologije, reaktivnosti i sastava.

Ovi ekstremni uslovi koji nastaju kao posledica interakcije ultrazvučnog talasa sa materijom su osnov za fizičke i hemijske efekte ultrazvuka.

1.2.2 Hemijski i fizički efekti ultrazvuka

Visoko-intenzitetsko polje ultrazvuka indukuje niz fizičkih i hemijskih efekata. Generalno, oni se mogu podeliti na homogenu sonohemiju tečnosti, heterogenu sonohemiju u sistemima tečnost-tečnost i tečnost—čvrsto stanje kao i sonokatalizu (koja se dešava u sva tri pomenuta sistema).^[52]

Hemijski efekti ultrazvuka u vodenim rastvorima su vezani za primarne produkte sonolize vode, molekule vodonika (H_2) i vodonik-peroksida (H_2O_2). Ostali visoko energetski intermedijeri mogu uključivati superoksid (HO_2), radikal atoma vodonika ($H\bullet$), hidroksi radikal ($OH\bullet$) i solvatisane elektrone (e_{aq}^-). Postoje tri regiona u kojima se odvijaju hemijski procesi u toku sonolize: (a) unutar vruće tačke, (b) na površini vruće tačke i (c) u tečnosti između vrućih tačaka koja se nalazi na sobnoj temperaturi, a u koju radikali difunduju iz ostalih regiona (slika 1.5).^[53] Formiranje radikala i njihovo prisustvo potvrđeni su metodom elektronske paramagnetne rezonance (EPR).^[54] Sonoliza vode proizvodi produkte koji su jaka redukciona i oksidaciona sredstva. Oni se međusobno rekombinuju ili reaguju sa drugim supstancama i sekundarno izazivaju reakcije oksido-redukcije u sistemu.^[55]



Slika 1.5: Kavitacioni regioni i njihovi parametri^[53]

Hemijski efekti ultrazvuka u organskim rastvorima su nešto složeniji. Dok god je ukupan napon pare dovoljno nizak da omogući efektivnu akustičnu kavitaciju, skoro svi organski rastvarači formiraju slobodne radikale (nenaelektrisane reaktivne intermedijere koji sadrže nesparene elektrone). Na taj način nastaje sredina sa veoma velikim brojem različitih hemijskih vrsta. Poređenja radi, sonoliza ugljenih hidrata omogućava istu vrstu produkata kao i proces visokotemperaturske pirolize.^{[56],[57]}

Pored kvalitativne analize ultrazvučno formiranih radikala urađena je i kvantitativna analiza ispitivanjem sonoluminiscencije u pojedinačnom kavitacionom mehuriću. Rezultati

ukazuju na visoku dinamičnost sredine u polju ultrazvuka. ^[58] Ilustrativni deo rezultata predstavljen je u tabeli 1.1.

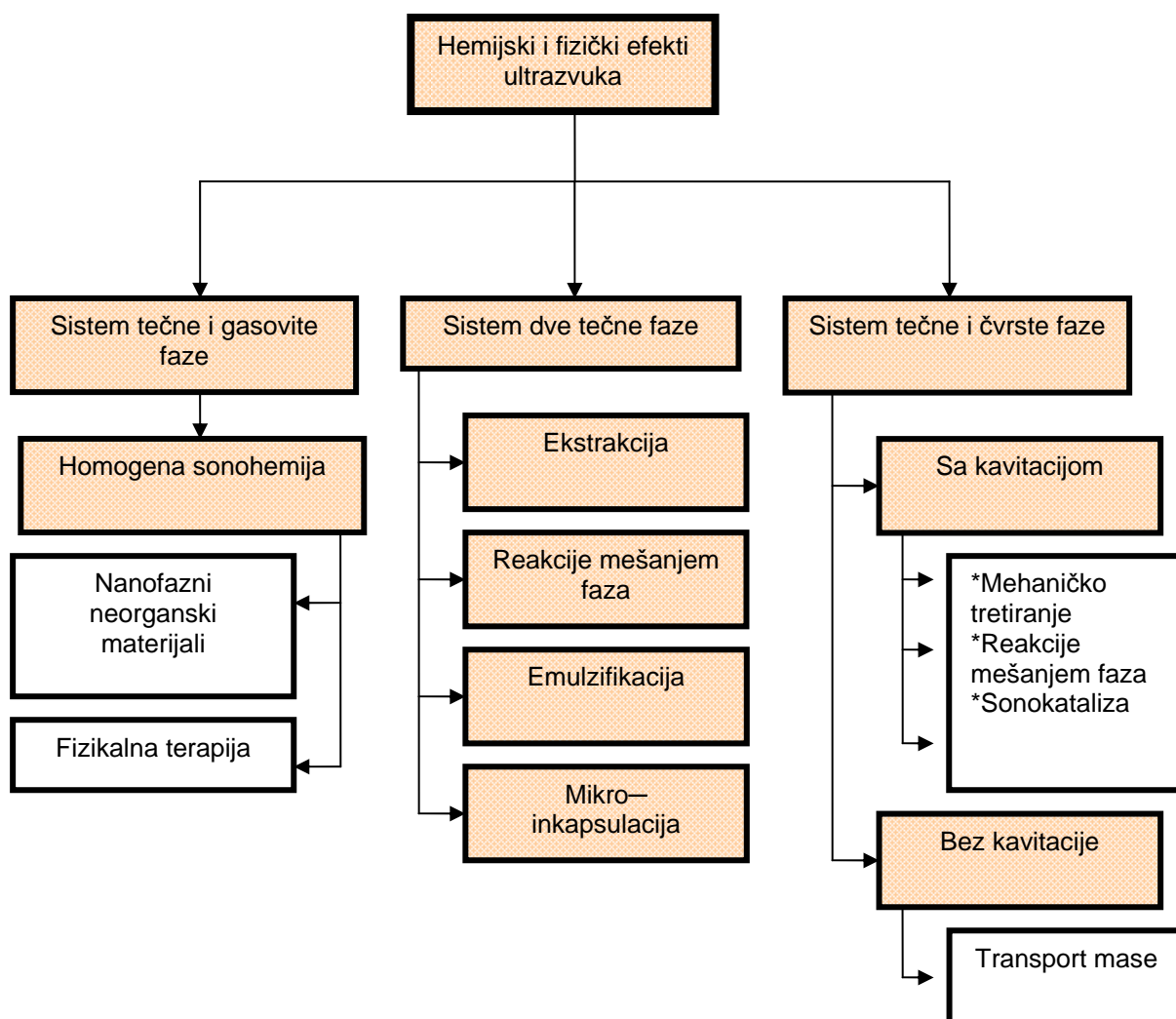
Tabela 1.1: Kvantitativna analiza sonohemije pojedinačnog kavitacionog mehurića na 52 kHz. ^[58]		
Uslovi	22°C	3°C
R_{\max} (μm)	28.9	30.5
Broj OH radikala po ciklusu	$6.6 \cdot 10^5$	$8.2 \cdot 10^5$
Broj fotona po ciklusu	$8.1 \cdot 10^3$	$7.5 \cdot 10^4$
Broj NO_2^- jona po ciklusu	$3.7 \cdot 10^6$	$9.9 \cdot 10^6$
$E_{\text{potencijalna na } R_{\max}}$ (eV)	$6.4 \cdot 10^{10}$	$7.5 \cdot 10^{10}$
$E_{\text{formiranja OH radikala}}$ (eV po ciklusu)	$3.4 \cdot 10^6$	$4.3 \cdot 10^6$
$E_{\text{formiranja NO}_2^- \text{ jona}}$ (eV po ciklusu)	$1.6 \cdot 10^6$	$4.2 \cdot 10^6$
$E_{\text{fotona (200-750 nm)}}$ (eV po ciklusu)	$2.7 \cdot 10^4$	$2.6 \cdot 10^5$
Energ. efikasnost sonoluminiscencije	$4.3 \cdot 10^{-7}$	$3.5 \cdot 10^{-6}$
Energetska efikasnost sonohemije	$7.8 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$

Fizički efekti ultrazvuka, koji obično imaju hemijske konsekvence, uključuju transport mase, emulzifikaciju, homogenizaciju, dispergovanje, zagrevanje itd. Za razliku od hemijskih efekata, oni su dominantni u oblasti oko kavitacionih mehurića. Postoji pretpostavka da se u ovoj oblasti prostire gradijent električnog polja koji podstiče nastanak ovih efekata. Osim toga, vrtložno kretanje tečnosti izazvano eksplozijom kavitacionih mehurića stvara gradijent smicanja i istezanja koji su posledica veoma brzog proticanja molekula rastvarača oko kavitacionih mehurića. Ovi efekti su posebno važni za sonohemiju polimera.

Kada je reč o fizičkim efektima u heterogenim, tečno-čvrstim sistemima, oni se mogu podeliti na: (a) transport mase usled vrtložnog kretanja tečnosti i strujanja u akustičnom polju, (b) površinska oštećenja čvrstih površina usled udara talasa i mikro mlazeva, (c) međučestične sudare visoko ubrzanih čestica i (d) fragmentaciju lomljivih čvrstih čestica u cilju povećanja kontaktne površine i reaktivnosti ^{[59],[60],[61]} i (e) disperziju i deaglomeraciju prahova u rastvoru. ^[62] Smatra se da uslovi poput sonifikacione snage, kontaktnog vremena i temperature imaju veoma važnu ulogu u sitnjenju čestica. Veća snaga polja uzrokuje veći broj kavitacija usled formiranja većeg broja kavitacionih mehurića što povećava efekat sitnjenja. ^[61]

1.3 Sonohemija u nauci o materijalima

Sonohemija ima veoma širok spektar primena i prožima se kroz brojne grane hemije. Generalno, njena primena se može podeliti na sintezu i modifikaciju neorganskih, organskih i kompozitnih materijala. Detaljnija klasifikacija primene sonohemije u oblasti materijala data je na slici 1.6.



Slika 1.6: Shematski prikaz klasifikacije hemijskih i fizičkih efekata ultrazvuka i nekih njihovih primena

1.3.1 Sonohemija u sintezi i modifikaciji nanostrukturnih materijala

Kod neorganskih materijala u polju ultrazvuka dolazi do morfoloskih modifikacija, sa jedne i hemijskih modifikacija, sa druge strane.

Morfološke modifikacije podrazumevaju modifikaciju površine (Ni, Cu, Cr, Mo, W) ^[63], fragmentaciju čestica usled sudara ^{[60],[64]} i njihovo međusobno sjedinjavanje - "efekat vrata" (Zn) ^[51]. Na ovaj način se povećava aktivna površina tako da se stvaraju uslovi da

morfološke modifikacije budu ispraćene hemijskim konsekvencama. Ova vrsta modifikacija koristi se u procesima dobijanja nanostrukturnih materijala koji mogu biti nanoamorfni ili nanokristalni.

Kada se za ultrazvučnu sintezu nanoamorfni materijala koriste lako isparljivi prekursori, dominantna je reakcija u gasovitoj fazi, tako da se ove strukture formiraju unutar kavitacionih mehurića. Za razliku od njih, mehanizam formiranja nanokristalnih struktura nije potpuno objašnjen, ali se smatra da je osnovni razlog njihovog formiranja brza kinetika koja ometa rast nukleusa pri čemu se u toku svake kavitacione eksplozije formiraju novi nukleusi čiji je rast limitiran kratkim vremenom kolapsa.

Kada su prekursori manje isparljivi, prilikom ultrazvučne sinteze nanostrukturnih materijala dominantna je reakcija koja se odvija u oblasti oko kavitacionih mehurića na rastojanju od oko 200 nm^[47] od njihove površine i dešava se u tečnoj fazi pod uticajem sekundarnih sonohemijskih efekata. Produkti su nekada amorfni, a nekada kristalni zavisno od temperature u ovoj oblasti.

U skladu sa navedenim podacima, u skoro svim sonohemijskim reakcijama u kojima se dobijaju neorganski produkti formiraju se nanostrukturni materijali. Oni se razlikuju po veličini, obliku, strukturi i kristalnosti, ali su uvek nano dimenzija.^[65]

Amorfni materijali koji se proizvode u procesu ultrazvučnog tretiranja lakše isparljivih organometalnih jedinjenja prelaznih metala (Fe(CO)₅, Ni(CO)₄, Co(CO)₃NO)^{[66],[67],[68]} su metali (Au^[69], Fe^[70]), legure (Fe/Co^[71], Co/Ni^[72], Fe/Ni^[73]) i metalni koloidi (ferofluidi)^[74]. Sonohemijski dobijeni nanoamorfni materijali su sastavljeni iz nanometarskih klastera koji grade visoko porozne agregate izuzetno velike aktivne površine. Postojanje ovih struktura navodi na mogućnost njihovog zarobljavanja pre procesa aglomeracije dodatkom odgovarajućih surfaktanata ili pak matrice. Kada se kao surfaktanti koriste polimerni materijali proizvode se stabilni nanofazni metalni koloidi. Kao alternativa mogu se koristiti i neorganski surfaktanti poput aluminijum i silicijum oksida^[59]. Ostali nanostrukturni materijali koji su dobijeni sonohemijski mogu se svrstati u karbidne (Mo₂C, W₂C), nitridne (Fe₂₋₃N), sulfidne (CdS^[75], MoS₂) i oksidne materijale (oksidi elemenata retkih zemalja, prelaznih metala, Ca₅(PO₄)₃OH- hidroksiapatit). Oni se dobijaju iz organometalnih jedinjenja koji su direktni prekursori za željene produkte ili pak jedinjenja koja se u polju ultrazvuka razgrađuju i na taj način obezbeđuju uslove, kao što je pH, koji su neophodni za hemijsku reakciju (urea na primer). Ova grupa sonohemijski dobijenih materijala ima zanimljivu morfologiju. Mogu se formirati porozne strukture izgrađene iz sitnih čestica u okviru kojih se održava prirodna struktura materijala izgrađena na dosta nižoj skali veličina (npr. CdS ima interkalatnu strukturu

koja u polju ultrazvuka postoji u mikroformi u okviru porozne makroskopske strukture). Ove interkalatne strukture imaju promenjene optičke, električne i katalitičke osobine i kao takve imaju široku primenu kao katalizatori, (litijumske) baterije i čvrsti lubrikanti.

Hemijske modifikacije ultrazvuka podstiču reaktivnost pojedinih metala (Mg, Li, Zn)^[76] čime povećavaju brzinu hemijskih reakcija, doprinose povećanju prinosa i sprečavaju formiranje sporednih produkata. Ovaj efekat je mnogo korisniji kod metala sa dosta niskom reaktivnošću kao što su prelazni metali. U polju ultrazvuka dolazi do povećanja njihove reaktivnosti i izvode se hemijske reakcije koje se inače dešavaju jedino pri ekstremnim parametrima.

1.3.2 Sonohemija u oblasti organske hemije

U organskoj hemiji, sonohemija se uspešno koristi u sintezi i modifikaciji kako manjih organskih molekula kao što su šećeri tako i u oblasti makromolekula. Istraživanja su pokazala da upotreba sonohemije u ovoj oblasti doprinosi povećanju brzina hemijskih reakcija kao i njihovih prinosa.^[5]

Kada je reč o manjim organskim molekulima, neke od hemijskih reakcija koje sonohemija unapređuje su supstitucija, adicija, redukcija itd. Najbolji primer koji ilustruje prednost sonohemije u odnosu na konvencionalne hemijske metode je sinteza tiokarbamida.^[77] Nakon sinteze u kavitacionim mehurićima dešava se brza migracija produkata iz gasovite u tečnu fazu usled intenzivnog mešanja prouzrokovanog interakcijom talasa sa tečnošću. Na taj način kavitaciona aktivacija veoma uspešno zaobilazi razgradnju termički nestabilnih produkata, a pri tom ipak pruža ekstremne uslove koji su neophodni za njihovu sintezu. Na ovaj način su i prinos i brzina ove hemijske reakcije znatno povećani. Sledeći primer je supstitucija alkoksi grupe šećera u polju ultrazvuka za koju je utvrđeno da je stereoselektivna, jer se dobijaju samo β izomeri, dok se konvencionalnim metodama dobija mesavina α i β izomera.^[78] Zanimljiv primer je i reakcija otvaranja prstena nezasićenih α,β -dioksalana, koja se konvencionalno dešava samo u prisustvu Grignard-ovog reagensa. U polju ultrazvuka ova reakcija se odvija u odsustvu ove Lewis-ove kiseline koja bi trebala da ima ulogu katalizatora.^[79] Kad je reč o adiciji, neverovatno brz proces dobijanja produkata u polju ultrazvuka postignut je u reakciji kondenzacije salicilaldehida i metilenindola^[80] koja obično traje par dana, dok se u polju ultrazvuka kvantitativni prinos dobija za svega par minuta.

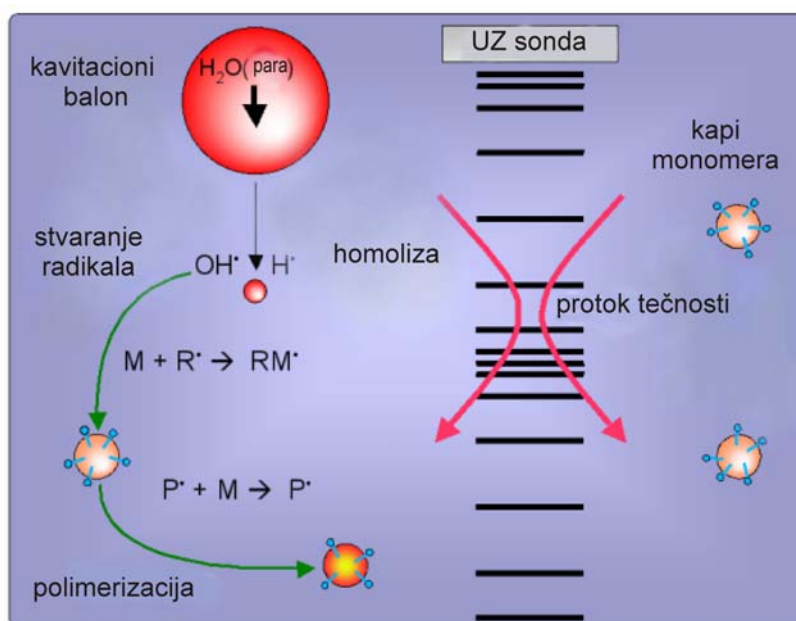
Sonifikacijom organskih rastvarača dolazi do homolize u kojoj se intenzivno proizvode vodonikovi radikali. Ovo je iskorišćeno za sintezu dihidrofulerena koji se dobijaju u reakciji C_{60} sa H radikalima dobijenih sonolizom rastvarača.^[81] Za razliku od drugih metoda

hidrogenizacije, u toku sonifikacije se ne proizvodi više različito hidratiranih produkata već samo jedna vrsta koja je obično nisko hidratirana. U konkretnom primeru to je samo $C_{60}H_2$.

1.3.3 Sonohemija u oblasti polimera- sintetičkih i bioloških

Jedna od najzanimljivijih, a ipak najmanje razvijenih tema, je primena sonohemije u oblasti polimera. Obzirom na to da polimerna industrija zahteva konstantno unapređivanje postojećih materijala, uz neophodnu ekonomičnost i efektivnost primenjenih metoda, otvoreno je široko polje za primenu sonohemije u ovoj oblasti.

Na polimerne materijale mogu uticati i hemijski i fizički efekti ultrazvuka. Kada je reč o fizičkim efektima, oni mogu biti izazvani strukturnim i morfološkim promenama usled strujanja koja nastaju kao posledica interakcije ultrazvuka sa tečnošću, intenzivnog mešanja (emulzifikacije ili dispergovanja) i lokalnog zagrevanja. Iako kavitacija nije uvek neophodna da bi do ovih efekata došlo, ona ih u većini slučajeva prati. Kao primer ovih uticaja mogu se navesti disperzija različitih komponenti unutar bazičnog polimera, inkapsulacija neorganskih čestica unutar polimera kao i modifikacija veličina čestica u polimernim prahovima.^[53]



Slika 1.7: Ilustracija hemijskih efekata ultrazvuka u toku procesa polimerizacije^[82]

Hemijski efekti ultrazvuka se mahom zasnivaju na radikalima koji nastaju pri sonolizi vode ili organskih rastvarača (Slika 1.7). Ovi radikali imaju sposobnost da modifikuju površinske grupe polimera čime utiču na njegovu morfologiju, omogućavaju inkorporaciju drugih manjih molekula gradeći nove funkcionalne polimerne materijale unapređenih karakteristika,

učestvuju u inicijaciji polimerizacije ili pak omogućavaju degradaciju polimera kidanjem lanaca i na taj način utiču na osobine polimera promenom raspodele molekulskih masa i mikrostrukture lanaca ili omogućavaju nastanak reaktivnih vrsta koje mogu u precizno kontrolisanim uslovima da grade odgovarajuće kopolimere.^[53]

Hemijski efekti koji utiču na degradaciju polimera u smislu kidanja molekulskih lanaca, su bili jedni od prvih primećenih uticaja ultrazvuka visokog intenziteta na polimere i mnoga istraživanja su urađena kako bi se ova interakcija okarakterisala. Ukratko, kod nekih polimera degradacija se dešava brže za polimerne lance većih molekulskih masa i na nižoj temperaturi, u razblaženijim rastvorima i u prisustvu lakše isparljivih rastvarača. Objašnjenje ovih uslova je vrlo jednostavno: više temperature i isparljiviji rastvarači inhibiraju kavitaciju i sredinu čine manje agresivnom. Osim toga, u razblaženim rastvorima polimerni lanci nisu zapleteni tako da mogu slobodno da se kreću u polju oko kavitacionih mehurića. Naravno, što je intenzitet ultrazvuka veći to su broj i veličina kavitacionih mehurića veći tako da je proces sonoheмиjske degradacije efektivniji. Zanimljivo je i zapažanje da se degradacija dešava do postizanja granične vrednosti raspodele molekulskih masa ($M_w \sim 30000$ Da za polistiren) nakon koje prestaje.^[83] Utvrđeno je da je ovo opšti efekat koji se javlja kod mnogih polimera i da je nezavisan od njihove hemijske prirode kao i da zavisi od dimenzija polimernog lanca u rastvoru. Međutim, brzina degradacije je usko vezana za prirodu polimera, jer se dešava u slabim tačkama lanca.^[84] Ono što je dalje jako zanimljivo je specifičnost mesta degradacije pod uticajem ultrazvuka koja se najčešće dešava na sredini polimernog lanca.^[85]

Jedna od primena objašnjenog procesa degradacije polimernih lanaca je uklanjanje dugih lanaca iz sistema čime se menja njegova polidisperznost i kontroliše raspodela molekulskih masa. Na ovaj način se postiže modelovanje željenih osobina polimera. Druga primena ovog efekta odnosi se na korišćenje sonoheмиjski stvorenih radikala za formiranje kopolimera, što se postiže ili ozračivanjem rastvora dva različita polimera ili rastvora polimera kome je dodat odgovarajući monomer. Naravno, pored korišćenja gotovih polimera u polju ultrazvuka je moguća i inicijacija polimerizacije iz monomera. Primećeno je da kod neorganskih polimera, kao što su polisilani $(RSi)_n$, ultrazvuk značajno ubrzava polimerizaciju, povećava njen prinos koji je kod konvencionalnih metoda jako nizak i omogućava monomodalnu raspodelu molekulskih masa.^[86] Većina organskih polimera proizvodi se procesom adicije monomera koji sadrže reaktivne dvostruke veze (α -olefin i vinilni monomeri). Sonoheмиja je našla intenzivnu primenu u svim ovim vrstama polimerizacije pri čemu je njen najvažniji dobitnik radikalnom mehanizmu polimerizacije. Prilikom ove polimerizacije ultrazvuk obezbeđuje potrebne radikale na dva načina: sonifikacijom monomera proizvode se radikali usled njihove

razgradnje unutar kavitacionih mehurića ili na njihovoj površini, alternativno proizvodnja radikala je ultrazvučno ubrzana sonifikacijom dodatih inicijatora kao što su peroksidi ili azo-jedinjenja.^[87] Variranjem parametara kao što su temperatura, napon pare rastvarača i intenzitet ultrazvuka može se predvideti i kontrolisati inicijacija. Merenjem kinetike procesa polimerizacije,^[88] utvrđeno je da je brzina inicijacije proporcionalna koncentraciji monomera i kvadratnom korenu intenziteta ultrazvuka kao i da je konačna raspodela molekulskih masa obrnuto proporcionalna ovim veličinama. Kada je reč o brzini inicijacije ona je proporcionalna broju kavitacionih mesta koji zavise od intenziteta ultrazvuka. Za razliku od inicijacije koja je znatno ubrzana ultrazvukom, eksperimentalni podaci pokazuju da ultrazvuk veoma slabo utiče na proces propagacije i terminacije.

Treba pomenuti i alternativni način sinteze vinilnih polimera u polju ultrazvuka koji podrazumeva formiranje emulzija ili suspenzija monomera i dodatnih supstanci (stabilizatora, dispergatora i inicijatora) u vodenoj sredini. Visok stepen kretanja u medijumu indukovano akustičnim strujanjima i građenjem kavitacionih talasa stvara izuzetno jake sile koje učestvuju u raspršivanju kapljica tečnosti i grade sitne, pravilno dispergovane kapi u vodenom medijumu koje imaju ulogu pojedinačnih reaktora. Neki od primera su ultrazvučna sinteza polistirena, poli(butil-akrilata) i poli(vinil-acetata) u kojima su sa veoma malom količinom, čak i bez, surfaktanata postignute manje čestice u poređenju sa konvencionalnim metodama. Brzina reakcije je bila uvećana i zavisila je od napona pare monomera. Pored toga, postignuta je skoro potpuna konverzija.^[89] Pored pomenutih mehanizama treba pomenuti i polimerizaciju otvaranjem prstena cikličnih monomera. Na ovaj način se proizvode mnogi poliestri iz cikličnih laktona. Kao primer moguće je navesti sintezu poli (δ -valerolakton)-a i izgradnju poli (δ -valerolakton- β -kaprolakton) kopolimera.^[90]

Jedna od prvih primena površinskih modifikacija polimera u polju ultrazvuka i njihove aplikativnosti je modifikacija poli(vilidin-difluorid)-a kod koga se nakon sonohemijskog tretmana u prisustvu jake baze grade površinske dvostruke C-C veze. Na taj način ovaj izolator dobija piezoelektrična svojstva.^[91] Uloga ultrazvuka u ovom procesu bila je u poboljšanju kontakta između čvrste površine i rastvora povećanjem kontaktnog ugla čime je omogućeno bolje kvašenje kao i bolji transport mase reagenasa, čime je ova površinska modifikacija ubrzana. Sledeći primer je polietilen koji je jako zanimljiv iz tog razloga što ima veliku praktičnu primenu, a glavni nedostatak mu je izuzetno inertna površina. Aktivacija površine se konvencionalnim metodama vrši ili hipohromnom kiselinom ili kiseoničnom plazmom. Ovo su procesi koji traju dugo i mogu oštetiti strukturu polimera. Sonohemija omogućava aktivaciju hemijske reakcije vodonik-peroksida ili olovo-persulfata sa površinskim grupama ovog

polimera. Spektroskopska analiza je pokazala da su se u tankom površinskom sloju formirale polarne grupe poput hidroksilnih i karbonilnih omogućavajući znatnu adheziju materijala kojim će ovaj polimerni materijal biti presvučen.^[92]

Primena sonohemije u proizvodnji biomaterijala je i dalje u fazi razvoja. Iako je sonohemija vodenih rastvora prilično ispitana, sonohemija sinteze biomaterijala u vodenim rastvorima je u razvoju. Pored sintetičkih, sonohemija se bavi procesiranjem i prirodnih polimera. Najzanimljivija tema iz ove ne tako puno ispitane oblasti je proteinska mikroinkapsulacija. Mikroinkapsulacija, odnosno zatvaranje različitih materijala unutar proteinskih kapsula veličine nekoliko mikrona, ima veoma važnu primenljivost koja uključuje korišćenje boja, aroma, farmaceutskih produkata za korekciju ukusa, medikamenata za kontrolisanu dostavu lekova (proteinske mikrosfere ispunjene nevodenim rastvorima) i medicinskih dijagnostičkih agenasa (šuplje proteinske mikrosfere imaju ulogu kontrastnog agensa u sonografiji i ehokardiografiji). Jedan od primera upotrebe ovih proteinskih mikrosfera za kontrolisanu dostavu lekova je inkapsulacija tetraciklina unutar albumina. Ovako formirane biokapsule testirane su na bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Rezultati su pokazali produženo baktericidno dejstvo inkapsuliranog antibiotika.^[93] Proteinske mikrosfere ispunjene nitroksidom rastvorenim u organskom rastvaraču koriste se za *in vivo* merenje koncentracije kiseonika pomoću elektronske paramagnetne rezonance (EPR). Ove proteinske mikrosfere su permeabilne za kiseonik koji se u polarnim rastvaračima veoma dobro rastvara, dok je nitroksid bioinkapsulacijom zaštićen od bioredukcije. Na ovaj način su kontrolisani biološki procesi organizma merenjem promene koncentracije kiseonika u toku anestezije, smanjenog protoka krvi i u toku disanja.^[94] Ultrazvuk visokog intenziteta se koristi za pripremanje vodenih suspenzija stabilnih proteinskih mikrosfera ispunjenih vazduhom ili nerastvornim tečnostima koje imaju medicinsku primenu^[95]. Neki od konkretnih primera su mikrosfere avidina,^[96] katalaze, albumina (BSA) i hemoglobina ispunjene vazduhom (mikromehurići)^{[97],[98]} ili nevodenim rastvorima- *n*-dekan, *n*-heksan, cikloheksan, toluen- (mikrokapsule)^[99]. Primećeno je da protein koji gradi ove šuplje sfere nije bio značajno denaturisan i imao je dobru aktivnost. Ispitivanjem ovih sistema došlo se do zaključka da je emulzifikacija sama po sebi nedovoljna za proizvodnju ovih stabilnih mikrosfera i da je za njihovo formiranje neophodna hemijska reakcija koja zahteva odgovarajuću koncentraciju kiseonika (mikroinkapsulacija u Ar ili N₂ atmosferi nije dala odgovarajuće rezultate). Jednu od uloga u ovom formiranju ima i superoksid koji grade H• i OH• radikali proizvedeni u procesu sonolize vode. Pokazano je da su ove mikrosfere međusobno povezane disulfidnim vezama koje se grade između cisteinskih ostataka ovih proteina i da je superoksid povezujući agens.

Ova konstatacija je doneta na osnovu činjenice da superoksid dizmutaza inhibira formiranje mikrosfera, dok superoksid katalaza značajno povećava preko intenzivne sinteze peroksidaze. Neophodnost cisteina u primarnoj sekvenci proteina za izgradnju mikromehurića pokazana je na taj način što od svih testiranih proteina jedino mioglobin (koji ne sadrži cistein) nije bio u stanju da izgradi mikrosfere u polju ultrazvuka. ^[98]

1.3.4 Sonohemija i formiranje kompozitnih materijala

Primena sonohemije u proizvodnji kompozitnih materijala u nekim primerima pokazuje značajnu prednost u odnosu na konvencionalne metode. Ovi materijali se sonohemijski proizvode na dva načina: unošenjem nanomaterijala u mezoporozne materijale ili depozicijom nanočestica na keramičkim ili polimernim površinama. Ovako formirani kompozitni materijali mogu se vidno razlikovati po morfologiji (slika 1.8).

Formiranjem kompozitnog materijala najčešće se unapređuju osobine početnih materijala iz kojih je on izgrađen što otvara mogućnost njegove dalje primene. Nanomaterijali su izgrađeni iz nanočestica koje imaju veoma veliku površinsku energiju usled koje teže aglomeraciji. Formiranje kompozita je jedan od načina da se ova pojava spreči i da se održi nanostruktura. Osim toga, vrlo je važno postojanje homogenosti i fine disperzije nanostrukturnog materijala u okviru materijala domaćina kao i odsustvo agregata. Svi ovi uslovi postižu se sonohemijskom inkapsulacijom nanočestica unutar polimernih ili keramičkih materijala. ^{[52], [100]}



Slika 1.8: Makroskopska promena izgleda materijala nakon ultrazvučnog formiranja kompozita^[101]

Neki od primera primene sonohemijske metode za građenje kompozitnog materijala radi očuvanja nanostrukture metala su sinteza poli(metilmetakrilat)-gvožđe i poli(metilakrilat)-gvožđe kompozita.^[102] Rezultati su najpre pokazali da je inkapsulacija koja kreće od ranije formiranog nanostrukturnog gvožđa u odnosu na $\text{Fe}(\text{CO})_5$ prekursor (pomoću kog bi u toku polimerizacije trebao da se formira amorfni metal) daleko efektivnija. Pored toga, pokazano je da je inkapsulacija u prisustvu ultrazvučnog polja nižeg intenziteta značajno manje efikasna. Analiza morfologije pokazala je uniformnu raspodelu sitnih čestica amornog gvožđa na polimernoj površini. Ovako formirane nanočestice gvožđa, obzirom na veliku kontaktnu površinu, imale su veoma izraženu katalitičku aktivnost što bi se moglo upotrebiti za bolju aktivaciju Fischer-Tropsch-ovih reakcija.

Ista grupa autora iskoristila je pomenutu metodu za formiranje poli(metilmetakrilat)-kobalt kompozita.^[103] U ovom slučaju je za izgradnju kompozita korišćen samo ranije formirani nanostrukturni kobalt. Prva razlika koja je primećena poređenjem Fe i Co kompozita je u rastvorljivosti. Pokazalo se da ova razlika potiče od različitog načina vezivanja metala za polimer. Dok se kobalt vezuje za polimer direktno, veza gvožđa sa polimerom uspostavljena je preko kompleksa. Zanimljivo je i to da formiranje poli(metilmetakrilat)-kobalt kompozita nije registrovano, što se može pripisati interakcijama kobalta sa polimernim radikalima usled kojih dolazi do inhibicije procesa polimerizacije.

Sonohemijski su sintetisani i kompoziti gvožđa sa polistirenom i poli(vinil-alkohol)-om. Pokazano je da su čestice gvožđa u polistirenu veoma malih dimenzija, ali intenzivno aglomerisane i pored prisustva polimerne matrice, kao i to da je za razliku od čistog polistirena njegov kompozit sa gvožđem pokazao mnogo bolju termičku stabilnost. Pokušaj formiranja polistiren-kobalt kompozita nije uspeo.^[104] Najbolji rezultati ultrazvučnog formiranja kompozita ovog magnetnog materijala pokazani su na primeru kompozita gvožđa i poli(vinil-alkohola). U ovom slučaju dobijene su vrlo male čestice gvožđa uniformno raspoređene na površini polimera. Unapređenje osobina ovog kompozitnog materijala ogleda se u tome što je materijal pokazivao superparamagnetne osobine što je postignuto zahvaljujući očuvanju nanodimenzija gvožđa u kompozitu.^[105]

Obzirom na to da su najbolji rezultati postignuti uz korišćenje poli(vinil-alkohol)-a kao polimerne komponente, proces formiranja kompozita je nastavljen i formiran je poli(vinil-alkohol)-CuO kompozitni materijal. Za razliku od prethodno navedenih eksperimenata u kojima su proces formiranja metala ili oksida i proces polimerizacije tekli istovremeno, u ovom slučaju proces kristalizacije CuO je tekao u prisustvu ranije formiranog polimera koji je imao funkciju disperzionog agensa. Rezultati su najpre pokazali kristalnu strukturu formiranog

kompozita u kome postoji prilično uniformna raspodela oksida unutar polimera. Pored toga, uočeni su određeni efekti nanočestica koji se odnose kako na promenu optičkih osobina kompozita tako i na temperaturnu stabilnost koja je u slučaju kompozita promenjena u odnosu na čiste komponente što ukazuje na povezanost prostorne raspodele polimernih lanaca i oksidnih čestica. Postignuta je i kontrola kristalnog rasta pa finalne čestice imaju veoma pravilne oblike.^[106]

Kada je reč o oksidima, nekoliko različitih materijala (Fe_3O_4 , Cu_2O , Cu_4O_3) je iskorišćeno za formiranje kompozita sa polianilinom uz korišćenje potpuno novog procesa oksidoredukcionog jednostepenog dopiranja nanočestica unutar polimera. Jedan od primera je mešoviti oksid bakra (Cu_4O_3) koji se dobija iz Cu^{2+} prekursora. Dobijene čestice su veličine 5-10 nm i dobro su dispergovane u polianilinskoj matrici.^[107] Pored toga, ultrazvuk je iskorišćen i za dobijanje redukcionih agenasa koji zlato redukuju do elementarnog stanja u prisustvu polianilina. Tako dobijeno zlato iskorišćeno je za formiranje zlato-polianilin (Au-PANI) kompozita. Analiza ovako formiranog materijala pokazuje znatno ubrzanje procesa sinteze i značajno povećanje prinosa, kao i poboljšanje električnih osobina, i pored toga što je kompozit imao veoma mali udeo zlata.^[108]

Za formiranje keramika/polimer kompozita koristi se ultrazvučno indukovana emulziona polimerna inkapsulaciona tehnika. Dispergujući, aktivacioni i pulverizacioni efekti ultrazvuka su iskorišćeni za ovu namenu. Jedan od prvih primera je poli(n-butyl-metakrilat)/ γ -aluminijum oksid ($\text{PBMA}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) nanokompozit. U ovom slučaju u procesu polimerizacije formirane su šuplje sfere PBMA-a u kojima je inkapsuliran Al_2O_3 . Pokazan je uticaj pH sredine, koncentracije surfaktanata i sadržaja nanočestica na morfologiju ovako dobijenog materijala.^[109] Isti polimer je iskorišćen i u procesu oblaganja nanokristalnog rutila (TiO_2). Postupak podrazumeva razgradnju agregata koje ovaj materijal formira i redispersiju nanočestica. Na ovaj način polianilin je deponovan na površini nanočestica što vodi do formiranja tzv. "core-shell" struktura.^[110] Slična pojava uočena je i u slučaju silicijum oksida, pri čemu su zapažena dva različita tipa morfologije- sferna i porozna. U prvom slučaju sferne čestice silicijum oksida su obložene polianilinom, dok je u drugom slučaju polimer oblagao šupljine poroznog silicijum oksida.^[111]

Ova nova primena ultrazvuka iskorišćena je i za oblaganje višeslojnih karbonskih nanotuba. Merenja su pokazala veoma dobru adheziju polimernog materijala i površine nanotuba na kojima se on nalazio što je doprinelo poboljšanju mehaničkih osobina ovog

materijala, odnosno povećanju Young-ovog modula za oko 35% u slučaju inkapsulacije svega 1% karbonskih nanotuba.^[112]

Treba navesti i ostale kompozitne materijale koji su dobijeni sonohemijski, a u kojima polimernu komponentu gradi poli(vinil-alkohol). Ovaj polimer je iskorišćen za dobijanje nanosfera srebro-sulfida (Ag_2S) i nano-iglica bakar-sulfida (CuS) na čijoj površini se nalazio polimerni materijal.^[113] Efekat nanometarskih veličina ovih materijala zapažen je u toku ispitivanja njihovih optičkih osobina.

Kompozitni materijal poli(vinil-pirolidon)-a koji je izgrađen u polju ultrazvuka je Ag/PVP. U ovom slučaju dobijene su polimerne čestice ispunjene srebrom za koje je pokazana mogućnost kontrole srednje veličine čestica i dobijene su veoma uske raspodele veličina. Proces formiranja ovog kompozita podrazumeva redukciju srebra u prisustvu polimera kao surfaktanta koji će sprečiti dalju aglomeraciju primarno dobijenih čestica.^[100]

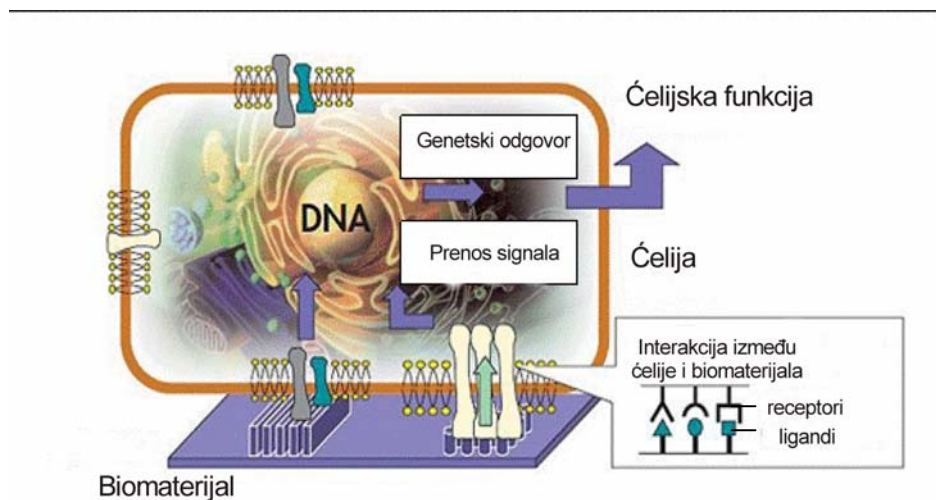
Kada je reč o sonohemijskom dopiranju nanočestica unutar keramičkih materijala, osobine i prednosti ovakvih modifikacija materijala moguće je istaći kroz nekoliko primera među kojima se najbolji odnose se na okside elemenata retkih zemalja (Eu_2O_3 , Tb_2O_3) dopirane na površini submikronskih sfera silicijum ili aluminijum oksida^[114], nanostrukturnog cirkonijum oksida ili itrijumom stabilizovanog cirkonijum oksida^[115]. Dobijeni rezultati ukazuju na veoma dobro unapređenu tehniku za sprečavanje agregacije nanočestica, omogućavanje njihove uniformne raspodele na površini keramičke matrice i poboljšanje njihovih osobina usko povezanih sa mogućnošću i zahtevima njihove primene. Pored elemenata retkih zemalja treba pomenuti i druge, kao što je gvožđe-oksidi sa zlatom na površini čestica. U ovom slučaju je postignuta dobra disperzija nanočestica zlata na gvožđe-oksidu koje je potencijalni nanonosac aktivnih agenasa sa primenom u oblasti biomedicine.^[116]

1.4 Biomaterijali

Svaki živi organizam je prirodno sastavljen iz ogromnog broja različitih biomaterijala koji imaju sebi svojstvenu funkciju unutar složenog mehanizma kakav je organizam i doprinose odvijanju i sinhronizaciji bioloških procesa. Pored prirodnih biomaterijala postoji i veliki broj veštačkih koji su sintetisani u nameri da oponašaju sastav, strukturu, osobine i funkcije prirodnih biomaterijala. Mera u kojoj je ova sličnost postignuta određivaće način na koji će organizam prihvatiti ovaj materijal odnosno potencijalnu aplikativnost sintetisanog materijala.

Da bi materijal bio primenljiv u živom organizmu neophodno je da ispunjava određeni niz kriterijuma kako bi bio kompatibilan sa njim (slika 1.9). Biokompatibilnost materijala, u

najširem smislu, podrazumeva da se nakon njegove primene ne javlja nikakav imunološki odgovor organizma i predstavlja veoma važnu svojstvo koje se detaljno ispituje pre kliničke primene materijala. Nakon pozitivnog prihvatanja materijala od strane organizma, odnosno biokompatibilnosti, sledeća važna stavka koju materijal mora da ispuni je bioaktivnost. Pod ovim terminom se podrazumeva da materijal ima pozitivnu interakciju ili efekat na neku vrstu živih ćelija odgovarajućeg tkiva, bilo da se radi o bioaktivnom materijalu koji je dizajniran tako da reaguje sa okolnim ćelijama, ili pak bioinertnom materijalu koji na svojoj površini mora da ima aktivnu komponentu kako bi bio pozitivno prihvaćen od organizma. Ovo svojstvo sa sobom povlači sledeći zahtev podobnosti biomaterijala - netoksičnost. Interakcija biomaterijala sa zdravim ćelijama mora biti isključivo farmakološka i ne sme da prouzrokuje smrt, oštećenje, inflamaciju ili mutaciju zdravih ćelija (akcentat je na zdravim ćelijama, obzirom na činjenicu da postoji grupa biomaterijala, kao što su »smart« sistemi za kontrolisanu dostavu lekova, namenski dizajnirana tako da uništava ćelije patoloških tkiva kao što je kancerozno).



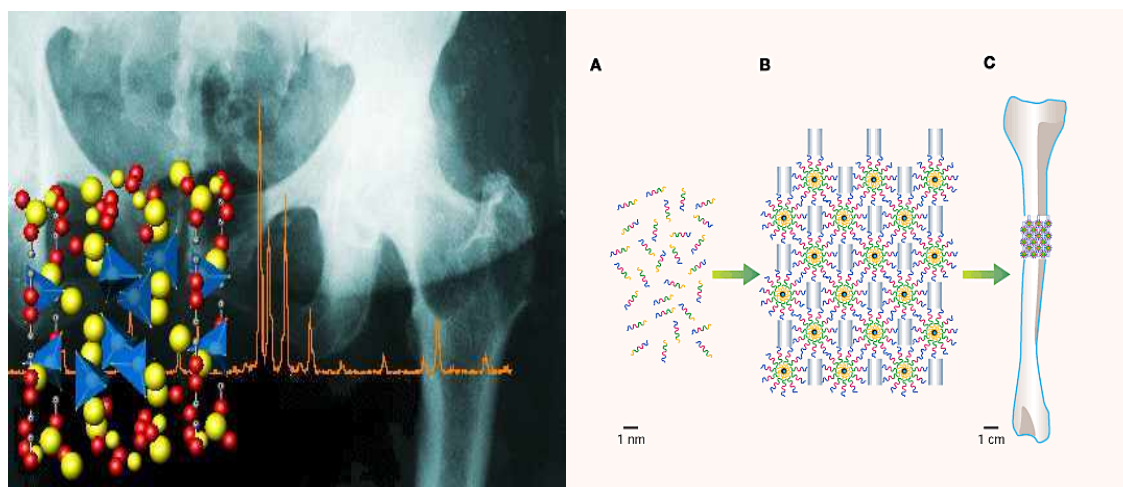
Slika 1.9: Ilustracija interakcije biomaterijala sa živom ćelijom^[117]

Danas se biomaterijali intenzivno istražuju i unapređuju u okviru nauke o biomaterijalima što i doprinosi njihovoj intenzivnoj primeni u različitim oblastima kao što su: reparacija i rekonstrukcija kostiju, izrada dentalnih implanata, rekonstrukcija krvnih sudova i srčanog mišića, kontaktna sočiva, implantati u estetskoj hirurgiji, nosači medikamenata za kontrolisanu dostavu itd.

1.4.1 Hidroksiapatit

Poreklo i osobine hidroksiapatita

Sintetički hidroksiapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) je materijal iz grupe biomaterijala nastao u procesu sinteze po uzoru na prirodne, biološke materijale. Ova biokeramika je hemijski i morfološki veoma slična mineralnoj komponenti koštanog i hrskavičavog tkiva sisara. Naime, koštano tkivo je izgrađeno iz organskog dela - čiji najveći procenat gradi protein kolagen i neorganskog dela – čiji je glavni sastojak apatit. Neorganski deo je prirodni mineral koji čini 70 % koštanog tkiva i sastoji se iz kalcijum-fosfata, kalcijum-karbonata, kalcijum-fluorida, kalcijum-hidroksiapatita, kalcijum-hidroksida i citrata. Ovakva konstrukcija koštanog tkiva je prirodno napravljena sa ciljem da omogući odgovarajuću mehaničku i potpurnu funkciju organa koje ovo tkivo gradi. ^[118] Struktura neorganskog dela koštanog tkiva je dominantno kristalna, mada u nekim regionima može da ima i amorfne domene zavisno od vrste koštanog tkiva. ^[119] Kristalna jedinična ćelija hidroksiapatita je izgrađena iz dva molekula i ima heksagonalnu, odnosno diprizmatičnu simetriju (slika 1.10).



Slika 1.10: Struktura i ilustracija primene hidroksiapatita; (a) slučajna raspodela lanaca proteina, (b) uređena struktura prilikom vezivanja za neorganske komponente i (c) održanje uređenosti na makro-nivou ^{[120],[121]}

Morfologija kristalnih čestica hidroksiapatita u koštanom tkivu je pločasta ili štapićasta. Zavisno od vrste koštanog tkiva ovi kristali su manje ili više aksijalno, međusobno paralelno, orijentisani. Slučajna orijentacija proteinskih lanaca (slika 1.10a) se nakon vezivanja za neorgansku komponentu koštanog tkiva menja u pravilnu, prostorno orijentisanu matricu (slika 1.10b) koja se održava i na makro-nivou (slika 1.10c). Dimenzije štapića hidroksiapatita unutar ove proteinske matrice su oko 8-15 nm debljine, 20- 40 nm širine i 200-400 nm dužine.

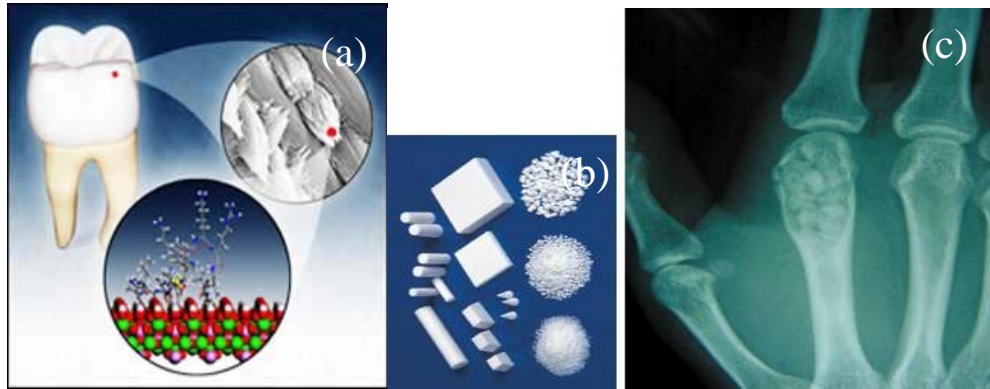
Ove dimenzije su funkcionalno vezane za vrstu kostiju koje odgovarajuće tkivo gradi što znači da se mogu bitno razlikovati u različitim delovima skeleta.^[122] Primećena je čak i razlika u veličini štapića i pločica hidroksiapatita u gleđi, dentinu i cementu zuba. Najveće dimenzije ovi kristali imaju u gleđi (dužine do 5-6 μm) koja je ujedno i najtvrdra komponenta ljudskog skeleta.

Supstiticioni mehanizmi koji se javljaju u hidroksiapatitu koštanog tkiva uključuju interkristalnu razmenu jona i rekristalizaciju usled rastvaranja i ponovnog formiranja kristala pri čemu se unose novi joni u kristalnu strukturu zamenjujući Ca^{2+} jone ili absorbujući se na kristalne površine. Iz tog razloga veliki deo apatita koštanog tkiva gradi Ca-deficitarni hidroksiapatit. Specifična gustina hidroksiapatita u koštanom tkivu je 3.08 g/cm^3 . Po Mohrovoj skali internacionalnih standarda za merenje tvrdoće u geologiji ovaj mineral ima tvrdoću 5.

Kada je reč o mehanizmu formiranja hidroksiapatita, koji je već duže glavna tema kada je reč o ovom materijalu, predložene su brojne klasifikacije mehanizma rasta ovih kristala,^{[123][124][125]} međutim jedinstveno rešenje još nije postignuto i puno je koraka koje još treba objasniti.^[126] Jedan od predloženih mehanizama za proces formiranja hidroksiapatita koji je, do sada, najviše prihvaćen je amorfni kalcijum fosfat- oktakalcijum fosfat- hidroksiapatit (ACP-OCP-HAp) transformacija. Suština ovog mehanizma je dvostepena reakcija čiji je prvi stepen prelazak amornog kalcijum fosfata u oktakalcijum fosfat koji će u toku drugog stepena biti transformisan u hidroksiapatit. Obe reakcije su izrazito zavisne od pH vrednosti, odnosno od koncentracije OH^- i H^+ jona. Jedan deo ovog mehanizma odvija se kroz reakciju u tečnom, dok se drugi odvija kroz reakciju u čvrstom agregatnom stanju.^{[127],[128][129]}

Oblasti primene sintetičkog hidroksiapatita

Sintetički hidroksiapatit odlikuje odlična biokompatibilnost, bioaktivnost, netoksičnost i sličnost osobina, poput mehaničkih, prirodnom hidroksiapatitu. U skladu sa tim, on se danas intenzivno koristi u stomatologiji (za izgradnju dentalnih implantata), maksilofacijalnoj hirurgiji, ortopediji (za reparaciju i rekonstrukciju koštanog tkiva) (slika 1.11c), kardiovaskularnoj hirurgiji (za reparaciju krvnih sudova) i farmaciji (za kontrolisanu dostavu lekova).^{[130][131][132][133]}



Slika 1.11: Ilustracija primene hidroksiapatita kao punila (a), mogućnost modelovanja materijala u cilju prilagođavanja oblika potrebama primene (b) i primer primene u rekonstrukciji koštanog tkiva šake (c).^[134]

Kada je reč o implantatima, najčešće se koriste hidroksiapatitom presvučeni metali ili metalne legure kao što su, na primer, titanijum i čelik. Na ovaj način organizam "vidi" samo apatit- materijal koji ne doživljava kao strano telo.

Hidroksiapatit se može primeniti i kao punilo ("filler"). Tada ima ulogu u popunjavanju defekata u kostima (slika 1.11a) i koristi se u obliku praha ili poroznih blokova (slika 1.11 b). Ova primena je značajna u slučaju kada je potrebno odstraniti veći deo koštanog tkiva (kod kancera kostiju na primer) kao i za potrebe maksilofacijalne hirurgije i stomatologije. Tada ovo punilo ispunjava nastalu šupljinu u kostima, interaguje sa okolnim tkivom i integriše se u njemu posle određenog vremena, stimuliše i ubrzava prirodnu regeneraciju koštanog tkiva.

Hidroksiapatit se intenzivno koristi i u obliku poroznih struktura sa kontrolisanim dimenzijama i oblikom pora ("scaffolds")^{[135],[136]} čija je prvenstvena namena upotreba u regeneraciji koštanog tkiva,^{[137],[138]} mada se u poslednje vreme intenzivno ispituje mogućnost upotrebe ovih struktura kao potencijalnih nosača za kontrolisanu dostavu medikamenata. Kada je reč o kontrolisanoj dostavi lekova, pokazano je da su kalcijum-fosfati veoma pogodni za inkapsulaciju različitih lekova poput antibiotika, kao što su tetraciklin-hidrohlid^[139] i gentamicin^[140], kao i drugih lekova koji bi se potencijalno koristili za lečenje osteoporoze, osteomijelitisa i drugih bolesti kostiju. Terapija koja se primenjuje kod ovih bolesti je dugotrajna i jako bolna. Kod nekih infekcija kostiju postoji problem teške dostupnosti leka do mesta na kom je infekcija lokalizovana. Zato se one leče dugo, nekada čak i do dve godine. Da bi se terapija unapredila, koristi se lokalno doziranje leka koji se deponuje u poli(metametakrilatnim) implantatima koji se ugrađuju u blizini inficiranog područja. Međutim, veliki problem predstavlja činjenica da ovaj nosač nije biodegradabilan tako da se

nakon završetka terapije mora hirurški izvaditi i zameniti novim koštanim tkivom. Da bi se ovaj proces pojednostavio moguće je direktno doziranje leka iz kalcijum-fosfata koji su bioresorbilni tako da vrlo lako mogu da se razgrade nakon terapije. Istovremeno bioaktivnost kalcijum-fosfata pruža mogućnost aktiviranja okolnih ćelija i reparacije koštanog tkiva nakon završene terapije.

Veoma je zanimljiva i ideja o formiranju tzv. "*in vivo*" bioreaktora koji sadrži matične ćelije čija bi namena bila proizvodnja koštanih ćelija i veštačko formiranje koštanog tkiva za potrebe transplatacije.^[141]

Pored medicinskih primena sintetičkog hidroksiapatita, postoji intenzivna primena ovog materijala i u drugim oblastima koja se mahom zasniva na sposobnosti jonske izmene kako Ca^{2+} tako i OH^- jona. U skladu sa tim, hidroksiapatit se koristi i u oblasti izmene toksičnih jona kao što su Sr^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} ^{[142],[143],[144],[145]}. Značajnu ulogu ima i u oblasti jonoizmenjivačke hromatografije gde se koristi kao adsorbent različitih vrsta supstrata kako organskih tako i neorganskih.^{[146],[147]} Među njima treba pomeniti visoko efikasnu metodu za purifikaciju proteina zasnovanu na apatitnim kolonama.^[147] Osim toga vrlo je široka primena nanostrukturnog poroznog hidroksiapatita u oblasti katalize gde se koristi za katalizaciju različitih organskih sintetskih reakcija poput Friedel-Crafts-ovog reakcionog mehanizma.^{[148],[149]}

Sintetske metode za dobijanje hidroksiapatita

Obzirom na to da je hidroksiapatit materijal koji se već dugo ispituje, razvijene su brojne metode za njegovu sintezu. Zavisno od primenjene metode, postignuta je različita morfologija, stehiometrija i stepen kristaliničnosti.^[150] Pokazalo se da su visoko kristalni stehiometrijski nano - prahovi HAp-a veoma pogodni za manipulaciju kao što je sinterovanje tako da grade sinterovane blokove unapred željenih karakteristika koji su veoma važni u procesu aplikacije ove biokeramike.

Neke od metoda koje su do sada korišćene za sintezu hidroksiapatita su: elektrohemijaska depozicija,^[151] sol-gel metoda,^[152] hidrotermalna metoda,^[153] emulziona i mikroemulziona metoda,^{[154],[155]} sinteza u polju mikrotalasnog zračenja,^[156] klasična precipitacija,^[157] mehanohemijaska sinteza,^[158] metoda raspršivanja u radiofrekventnoj plazmi,^[159] metoda raspršivanja i termičkog sušenja,^[160] citratna metoda sagorevanja,^[161] metoda napanjanja supersoničnim mlazom,^[162] metoda ultrazvučnog raspršivanja i sušenja zamrzavanjem^[163] itd.

Pored pomenutih metoda, hidroksiapatit je sintetisan i primenom klasične homogene precipitacije u prisustvu uree kao agensa precipitacije. Rezultati su pokazali neophodnost veoma dugog procesa starenja (48-120 h zavisno od temperature koja je bila u intervalu od 82-90°) kako bi bilo moguće dobiti monofazni HAp. Kraćim vremenima starenja dobijeni su višefazni sistemi izgrađene iz oktakalcijum fosfata (OCP), monetita (DCP) i HAp-a. Morfologija čestica koje su dobijene ovom klasičnom metodom bila je izgrađena iz štapića veličine 50-150 μm .^[164] Neki od rezultata pokazuju da su primenom ove metode, i nakon dugog vremena starenja (od 36 h na 90°C), dobijeni monofazni monokristali HAp-a štapićastog oblika i veoma velikih dimenzija (dužine 20-60 μm , širine 0.8-3.6 μm i debljine od 100-300 nm).^[165]

Primena hidroksiapatita zavisi od osobina kao što su oblik kristala, veličina, morfologija, kristalno uređenje, termička stabilnost i rastvorljivost, koje u velikoj meri zavise od primenjene sintetske metode.^[166]

Sinteza hidroksiapatita u polju ultrazvuka

Primenom sonohemije za sintezu hidroksiapatita korišćenjem reakcije neutralizacije pokazana je mogućnost dobijanja monofaznog sistema nakon 120 min ultrazvučnog tretmana. Ista sinteza u odsustvu ultrazvuka nije dala monofazni apatit, čime je potvrđen doprinos ultrazvuka ovoj sintezi kao i značajno smanjenje vremena potrebnog za njegovu sintezu u poređenju sa drugim metodama.^[167] Postignuta raspodela veličina čestica bila je u intervalu od 1-10 μm .

U cilju optimizacije veličine i oblika čestica hidroksiapatita koje se mogu postići ultrazvučnom tehnikom u toku sinteze reakcijom neutralizacije dodati su D-glukoza i glicerol. Na ovaj način dobijen je Ca-deficitarni hidroksiapatit, a funkcija aditiva je bila u kontroli HAp:TCP procentualnog masenog odnosa i očuvanju veličina sintetisanih čestica. Pokazalo se da su ovi aditivi veoma značajni za ovaj sistem jer su omogućili dobijanje nanostrukturnog materijala sa veličinom čestica pre kalcinacije (dakle čestica HAp-a) od oko 50 nm. Nakon kalcinacije dešava se transformacija HAp-a u veoma čist β -tri-kalcijum-fosfat (TCP) kao i bifazni-kalcijum fosfat (izgrađen iz HAp-a i TCP-a) i veličina čestica raste do mikronskih dimenzija.^[168]

Homogenom, kontrolisanom, sintezom apatita u polju ultrazvuka formiran je nanostrukturni materijal sa česticama još manjih dimenzija. Formirani nanokristali bili su iglice dužine oko 200-500 nm i dijametra od oko 20 nm.^[169] Ispitivanjem kinetike formiranja

apatita pri datim eksperimentalnim uslovima, utvrđena je aktivaciona energija od 59.9 kJ/molu koju je potrebno preneti sistemu da bi se reakcija formiranja apatita odigrala. U daljoj primeni ove metode za sintezu apatita ^[170] ista grupa autora utvrdila je uticaj nekih parametara, poput koncentracije Ca^{2+} prekursora, intenziteta ultrazvučnog polja i reakcione temperature na sastav i veličinu čestica. Na ovaj način je utvrđeno da su optimalni uslovi koji su potrebni za postizanje najsitnijih čestica čistog hidroksiapatita niska koncentracija Ca^{2+} jona, snaga od minimum 300 W i temperatura od 80°C. Pri ovim uslovima formiran je nanostrukturni materijal koji grade čestice sfernog oblika i dimenzija od oko 20 nm. Detaljnija strukturna analiza ovako dobijenog materijala nije ispitivana, ali su neki od rezultata ukazivali na nisku kristaliničnost ovako dobijenog materijala koji se verovatno nalazio u početnoj fazi kristalizacije.

Pomenuta metoda homogene sonoheмиjske precipitacije je dalje razvijena. ^[171] Ispitan je uticaj koncentracije agensa homogene precipitacije - uree koji obezbeđuje neophodnu koncentraciju OH^- jona. Praćena je promena faznog sastava sistema od smeše oktakalcijum-fosfata (OCP) i HAp-a do HAp monofaznog sistema. Dobijene su čestice hidroksiapatita veoma dobre kristalnosti. Morfologiju ovako dobijenog monofaznog sistema činili su pločasti aglomerati mikronskih dimenzija. Pločasta struktura dobijenih čestica ukazivala je na visoko adhezivni karakter dobijenog materijala što je za ispitivani sistem veoma dobra osobina.

Treba pomenuti i sonoheмиjsku sintezu hidroksiapatita u prisustvu glikozaminoglikana, ^[172] stabilizatora čija je funkcija u održanju nanostrukture i malih dimenzija sintetisanih čestica. Zavisno od koncentracije ovog stabilizatora, gradivne čestice nanostrukturnog HAp-a, ispitivane u koloidima neposredno nakon sonoheмиjske sinteze, su bile različitih dimenzija i utvrđeno je da se pri najvećoj korišćenoj koncentraciji ovog stabilizatora formira sistem izgrađen od čestica veličine svega 20 nm i prilično uniformne raspodele veličina. Nakon određenog vremena van koloida, veličina ovako dobijenih čestica se i pored stabilizacije povećava. Predložen je mehanizam za formiranje i stabilizaciju čestica koji podrazumeva građenje kompleksa vezivanjem Ca^{2+} jona i SO_4^{2-} ili COO^- grupa glikozaminoglikana. Priroda ovako postignutog sistema je i dalje imala veoma slabu kristalnu uređenost, ali je potvrđena mogućnost ultrazvučnog dobijanja veoma sitnih čestica hidroksiapatita čija veličina može biti održana dodatkom makromolekula koji bi imao funkciju surfaktanta.

Pored pomenutog saharidnog makromolekula korišćen je albumin (BSA) kao surfaktant, ^[173] obzirom na već poznate efekte koje ultrazvučno polje ima na morfologiju proteina (posebno onih koji u svojoj primarnoj sekvenci imaju cistein). Pretpostavka je bila da će se Ca^{2+} prekursorski joni vezati kako za COO^- grupe, tako i za ultrazvučno oksidovane $-\text{SH}$ grupe

cisteinskih aminokiselinskih ostataka koji bi imali ulogu mosta. Dobijeni sistem pokazivao je veoma dobre rezultate. Veličina čestica u ultrazvučno dobijenim koloidima bila je od 7- 130 nm sa maksimumom raspodele veličina čestica na ispod 20 nm. Ovako dobijen sistem bio je amorfan. Nakon kalcinacije na različitim temperaturama čestice su sa povećanjem temperature bile sve većih, mikronskih, dimenzija ali su zato dobijale sve pravilniju strukturu. Kalcinacijom na 700°C dobijene su pravilne šestougaone prizme dužine od oko 80 μm.

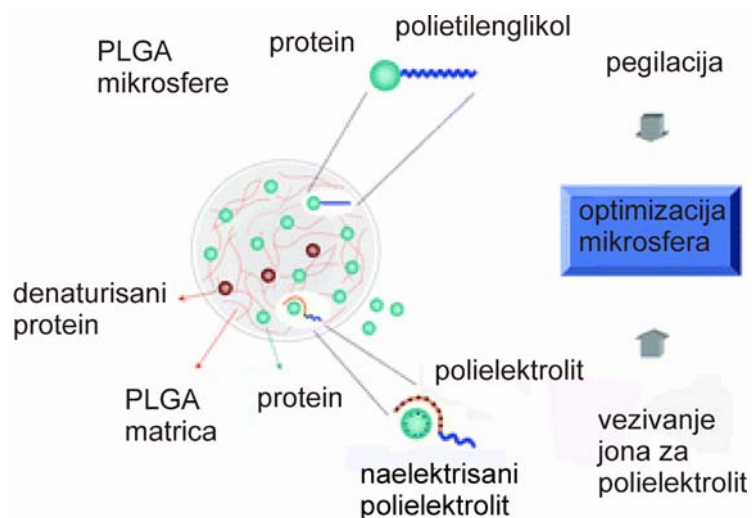
Postoje mnogi aspekti, kao što su mehanizam formiranja apatitnih čestica, sonokristalizacija, mikrostruktura i morfolologija, kao i uticaj parametara ultrazvuka na njih, koje tek treba dodatno ispitati i detaljno objasniti.

1.4.2 Poli(laktid-ko-glikolid)

Polimerni materijali imaju veliku primenu u biomedicini zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, dizajniranoj fleksibilnosti, mogućnosti površinskih izmena, promenljivom dizajnu funkcionalnih grupa, maloj težini. Pored toga imaju i zadovoljavajuće mehaničke osobine i degradacijom ne grade biotoksične produkte. Mogu se podeliti na biodegradabilne i bionedegradabilne. Neki od biodegradabilnih polimera su polilaktid (PLA), poliglikolid (PGA), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), kolagen, polikaprolakton, dok su neki od primera bionedegradabilnih polimera polietilen (PE), polietilenteraftalat (PET) i polimetilmetakrilat (PMMA).

Svojstva i primena poli(laktid-ko-glikolid)-a

U toku poslednje dve decenije veliki napor je uložen u cilju dizajniranja biokompatibilnih i biodegradabilnih materijala koji bi imali biomedicinsku aplikaciju. U polju biomedicine, glavni cilj razvoja ovih materijala je njihova upotreba u ljudskom organizmu kako za merenje, obnavljanje i unapređivanje fizioloških funkcija, tako i za očuvanje, održavanje života i poboljšanje njegovog kvaliteta. Veoma dobre rezultate i veliku aplikativnost u ovom polju dali su biokompatibilni polimeri.



Slika 1.12: Ilustracija inkapsulacije proteina u poli(laktid-ko-glikolid) za kontrolisanu dostavu^[174]

Biokompatibilni polimeri se danas najintenzivnije koriste kako za formiranje kompozitnih materijala za reparaciju i rekonstrukciju koštanog tkiva, tako i u farmaceutskoj industriji kao nosači za kontrolisanu dostavu lekova (Slika 1.12). Kako bi bili medicinski primenljivi, ovi materijali pored biokompatibilnosti moraju da pokazuju i niz drugih svojstava kao što su bioaktivnost, netoksičnost, mogućnost sterilizacije i kontrolisana stabilnost ili degradacija pod određenim biološkim uslovima- biodegradabilnost. U većini slučajeva degradabilnost je vrlo važno svojstvo polimera jer ono može predstavljati prednost primene ovog materijala u odnosu na ostale. Zato je ovoj temi neophodno posvetiti posebnu pažnju. Biokompatibilnost polimera obično definišu njegovi degradacioni produkti. Veliki broj prirodnih, sintetičkih i biosintetičkih polimera su biodegradabilni. Polimeri zasnovani na C-C lancima su u najvećem broju biološki nedegradabilni, dok polimeri sa heteroatomskim lancima uglavnom pokazuju biodegradabilnost. Zato se u bioinženjeringu polimera teži dizajniranju polimernih lanaca sa hemijskim vezama poput nezasićenih, estarskih i amino grupa, kako bi se postigla što bolja degradabilnost. Mehanizam degradacije podrazumeva hidrolizu ili enzimsku razgradnju polimernih lanaca. Mikroorganizmi mogu da iniciraju mehanička, hemijska ili enzimska oštećenja polimera u organizmu u toku prirodnog životnog procesa koji podrazumeva ishranu i varenje.

Neke od trenutno najintenzivnije proučavanih grupa polimera za biomedicinsku (hirurški materijal, implantati, punioci, veziva)^[175] i farmaceutsku aplikaciju (kontrolisana dostava lekova,^[176] proteina,^[177] gena^[177]) su biodegradabilni poliesteri: polilaktidi (PLA), poliglikolidi (PGA) kao i njihovi kopolimeri (PLGA). Oni pripadaju grupi novih sintetičkih biodegradabilnih polimera sa kontrolisanom biodegradabilnošću, odličnom

biokompatibilnošću i visokom sigurnošću (netoksičnošću). Jedini nedostatak ovih polimera, kada je reč o određenim primenama, je izražena hidrofobnost koja se rešava sintezom PLGA-PEG trimera.

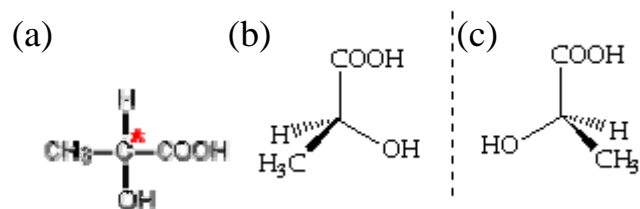
Tabela 1.2: Svojstva i primena PLA, PLG i PLGA polimera

Polimer	Kristaliničnost	T _g (°)	Brzina degradacije ^a	Tipična primena
PGA	Visokokristalan (T _m =225-230°C)	35~40	2-3 meseca	hirurški konac
l-PLA	Semikristalan (T _m =173-178°)	60~65	> 2 godine	fiksacija preloma, augmentacija ligamenata
d,l-PLA	Amorfan	55~60	12-16 meseci	kontrolisana dostava lekova
PLGA	Amorfan	45~55	1-6 meseci ^b	hirurški konac, zubni impanti, fiksacija fraktura, sfere za kontrolisanu dostavu lekova

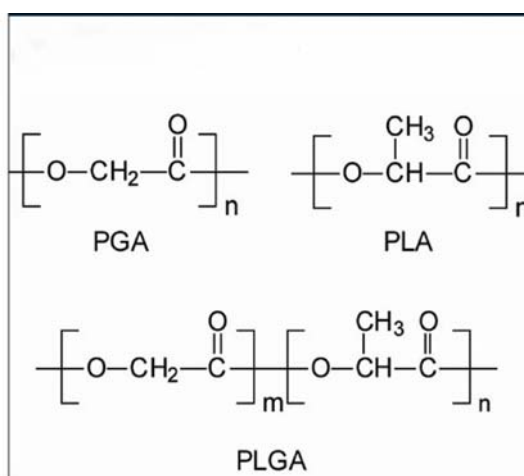
^a Brzina zavisi od molekularne mase polimera
^b Brzina se može menjati zavisno od odnosa različitih monomera

Za razliku od PLA i PGA, koji su homomeri, PLGA je heteromer i ima prilično različite osobine (Tabela 1.2). Neke od razlika odnose se na kristaliničnost, rastvorljivost, temperaturu faznog prelaza (temperaturu ostakljivanja), degradaciju i primenu. Naime, svi PLGA polimeri imaju veoma nisku kristaliničnost. Temperatura ostakljivanja im je na 45-55°C i rastvorni su u mnogim rastvaračima poput acetona, etil-acetata, tetrahidrofurana i hlorisanih organskih rastvarača.

Poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA) je kopolimer koji se dobija u procesu kopolimerizacije laktidne (hidroksi-propanonske) i glikolidne (hidroksi-acetatne) kiseline mehanizmom otvaranja prstena. Najčešći katalizatori ovog procesa su olovo(II) 2-etilenheksanoat, olovo (II) alkoksid ili aluminijum izopropoksid. Laktidna kiselina ima asimetrični C-atom (slika 1.13a) i zato može imati dva optička izomera: L (+)-laktidnu (slika 1.13b) i D (-)-laktidnu kiselinu (slika 1.13c). Vrsta izomera laktidne kiseline koji grade PLGA nekada može da bude naznačena u imenu ovog polimera. Ukoliko PLGA grade oba izomera, on će nositi naziv poli(d,l-laktid-ko-glikolid) (DLPLG), dok će prisustvo samo jednog od izomera u nazivu ovog polimera biti naznačeno kao poli(l-laktid-ko-glikolid) (LPLG) ili pak poli(d-laktid-ko-glikolid) (DPLG). U skladu sa tim DLPLG, DPLG i LPLG pripadaju grupi PLGA polimera, što i jeste najčešći način za njihovo obeležavanje. U toku polimerizacije, uspešno povezane monomerne jedinice vezane su estarskom vezom što rezultuje nastankom linearnog alifatičnog poliestra. Struktura lanca ovako dobijenog polimera predstavljena je na slici 1.14.

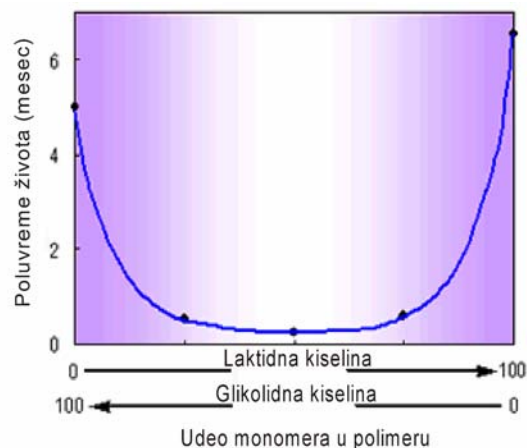


Slika 1.13: Laktidna kiselina: (a) acimetrični C-atom, (b) L (+) laktidna i (c) D(-) laktidna kiselina^{[179],[180]}



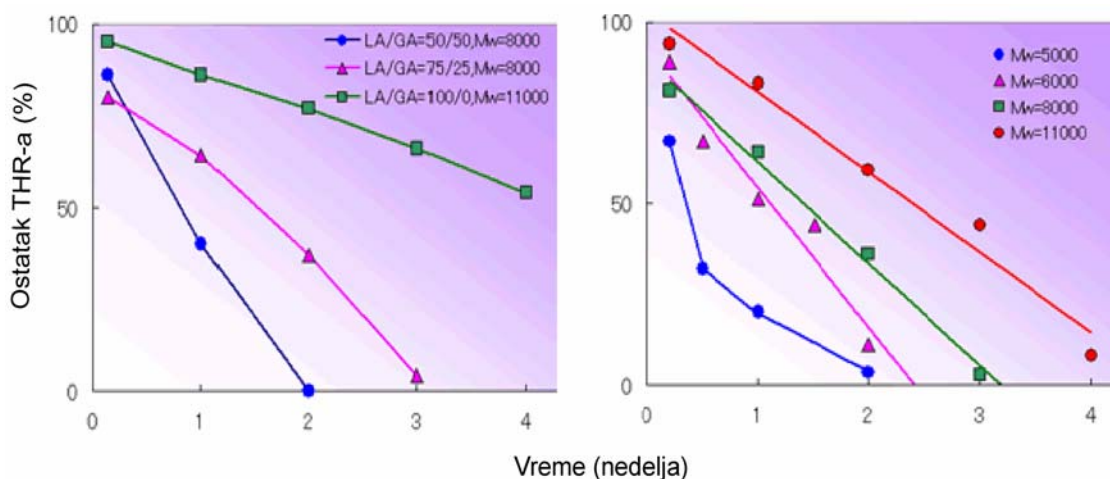
Slika 1.14: Hemijska struktura poliglikolida (PGA), polilaktida (PLA) i poli(laktid-ko-glikolida) (PLGA)^[181]

Degradacija PLGA se dešava procesom hidrolize u vodi i produkti degradacije su odgovarajuće kiseline (mlečna i glikolna) koje su inače prirodni produkti metabolizma ljudskog organizma i mogu biti uključene u prirodne metaboličke procese koje će omogućiti njihovo izbacivanje iz organizma. Ova osobina ga čini sigurnim za "in vivo" primenu.^[182] Degradacija PLGA se u organizmu menja zavisno od monomernog sastava. Kada sastav monomera odgovara odnosu 50:50 kinetika degradacije je najbrža, pri čemu se ova brzina sa povećanjem količine glikolidnog ili laktidnog monomera značajno usporava (slika 1.15).



Slika 1.15: Poluvreme života PLGA kopolimera sa različitim sastavom laktidnih i glikolidnih monomera implantiranih u tkivo pacova.^[183]

Primer koji potvrđuje kinetiku degradacije PLGA je kapacitet otpuštanja mikroinkapsuliranog tireotropin otpušajućeg hormona (TRH). Na slici 1.16a je jasno pokazano da je količina zaostalog hormona inkapsuliranog u polimerima sa različitim odnosom monomera nakon jednakih vremenskih intervala različita, odnosno da je brzina otpuštanja ovog hormona najveća u slučaju PLGA 50:50.



Slika 1.16: Krive otpuštanja TRH hormona iz PLGA mikrosfera sa različitim monomernim sastavom (a). Uticaj raspodele molekulskih masa na krive otpuštanja TRH hormona iz mikrosfera PLGA 75:25 (b)^[183]

Brzina degradacije PLGA je pored sastava usko vezana i za raspodelu molekulskih masa. Na slici 1.16b je pokazan primer brzine otpuštanja TRH hormona inkapsuliranog u PLGA

različitih raspodela molekulskih masa. Jasno se može videti da su najveća brzina degradacije i najveća efikasnost otpuštanja hormona prisutni kod polimera nižih molekulskih masa.^[184]

Metode za formiranje nanočestica PLGA

Metode koje se koriste za procesiranje polimera mogu značajno da utiču na morfologiju dobijenih čestica. Polimerni materijali mogu graditi mikro/nano sfere, filmove, cilindre, štapiće itd. Morfologija polimera je veoma značajna, jer određuje mogućnost njegove primene. Pokazano je da je za materijale koji imaju primenu u kontrolisanoj dostavi lekova i reparaciji i rekonstrukciji koštanog tkiva najpoželjnija sferna morfologija čestica. Kada je reč o formiranju materijala za reparaciju i rekonstrukciju koštanog tkiva sferan oblik čestica omogućava najgušće pakovanja i formiranja gustih, čvrstih struktura što doprinosi mehaničkim karakteristikama. Osim toga, kod kontrolisane dostave lekova morfologija čestica utiče na kinetiku otpuštanja inkapsuliranog leka. Primećeno je da je najefektivnija u slučaju otpuštanja leka iz polimernih sfernih čestica nanometarskih dimenzija zbog njihove brže degradacije u poređenju sa većim sfernim česticama^[185] kao i velike i pravilne slobodne površine sfera koja omogućava ravnomerno otpuštanje medikamenata.

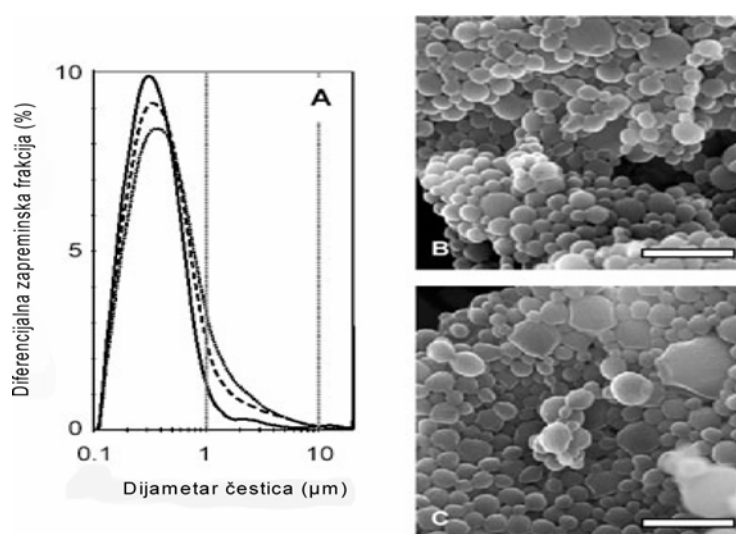
Postoji zaista veliki broj tehnika koji se danas koristi za dobijanje mikro- ili nano- sfera PLGA. Neke od njih su: metoda spontane emulzifikacije difuzijom rastvarača^{[186], [187]}, metoda preletne filtracije^[188], nanoprecipitacija^[189], metoda izoljavanja^[190], emulziono- evaporacioni postupak^[191], metoda površinskog raspršivanja tečnosti^[192].

Zanimljiv primer je formiranje PLGA-PEG-PLGA polimernih micela. Ovaj ambifilni triblok kopolimer sagrađen je iz hidrofobnog-PLGA i hidrofilnog-PEG dela. Zahvaljujući ovoj veoma dobroj osobini on je u stanju da izgradi tzv. "core-shell" strukturne micide kod kojih se PEG nalazi na površini, a PLGA u unutrašnjosti micela. Na ovaj način se postižu u vodi rastvorni, biokompatibilni nano- nosači veličine od 10-100 nm za koje je pokazano da su veoma efikasni za dostavu hidrofobnih lekova.^[193]

PLGA u polju ultrazvuka

Emulzifikacija i homogenizacija su esencijalne operacije u mnogim granama industrije poput farmaceutske, kozmetičke, hemijske, prehrambene itd. Pokazano je da one imaju veoma veliki značaj i u procesiranju polimera. Obzirom na to da one predstavljaju osnovne fizičke efekte koji nastaju u interakciji ultrazvuka sa tečnim medijumom, razvijen je novi koncept tretiranja PLGA čija je primarna ideja podrazumevala unapređenje već dobro poznate metode

ekstrakcije/evaporacije rastvarača tretiranjem u polju ultrazvuka^{[194],[195]}. Suština ove metode je emulzifikacija rastvora polimera i organskog rastvarača u, obično, vodenom nerastvaraču koji predstavlja protočnu ekstrakcionu fazu. Pokazano je da veličina ovako dobijenih čestica dosta zavisi od uslova emulzifikacije. Suština korišćenja ultrazvuka je u formiranju što finijih emulzija, odnosno formiranju što sitnijih kapljica rastvora polimera u nerastvaraču kako bi se dobile čestice manjih dimenzija. Primenjena ultrazvučna metoda podrazumevala je beskontaktno mešanje tečnosti u polju ultrazvuka. Ultrazvučni talasi prenosili su se indirektno sa ultrazvučnog prenosnika preko tečnog medijuma na preletnu cev kroz koju je proticao tretirani rastvor polimera. Kao rastvarač polimera korišćen je dihlormetan, kao stabilizator poli(vinil-alkohol), a konačno dobijene čestice su odvojene od supernatanta metodom sušenja zamrzavanjem. Snaga ultrazvučnog polja koja je u ovim eksperimentima korišćena bila je veoma niska kako bi se postigao primarno željeni efekat emulzifikacije i homogenizacije bez hemijskih i mehaničkih efekata koji bi eventualno narušili sistem. Korišćene su vrednosti snage ultrazvučnog polja od 32 i 25 W. Prosečna veličina čestica dobijenih u ultrazvučnom polju snage 25 W bila je 0.7 μm i raspodela veličina čestica bila je prilično široka. Sa druge strane, u polju ultrazvuka snage 32 W primećeno je značajno smanjenje veličina čestica čiji je prosek bio 0.49 μm (slika 1.17). Vremene tretiranja rastvora polimera ultrazvukom je bilo 7 i 14 s i primećena je samo neznatna promena u veličini čestica. Korišćeni su 2 i 5 % rastvori PLGA, pri čemu su se iz razblaženijih rastvora dobijale manje čestice. Za razliku od pravilnih sfera glatkih površina dobijenih iz razblaženih rastvora, iz koncentrovanijih rastvora su dobijene sfere deformisanog oblika i hrapavih površina.^[196]



Slika 1.17: Raspodela veličina sfernih čestica PLGA formiranih u polju ultrazvuka.

Bar na SEM mikrografijama je 1 μm .^[196]

Dalja primena ultrazvučne metode u procesu formiranja mikro-/nano- sfernih čestica nastavljena je inkapsulacijom različitih medikamenata i proteina u PLGA polimernim nano-sfernim matricama za koje je već dobro poznato da su odlični nosači za kontrolisanu dostavu lekova. Jedan od primera je inkapsulacija albumina (BSA) u PLGA upotrebom preletne ultrazvučne emulzifikacije. Metoda inkapsulacije je podrazumevala korišćenje PLGA rastvora u dihlormetanu i BSA rastvora u fosfatnom puferu (PBS-u) (koji je za PLGA nerastvarač). Dobijene su sferne čestice PLGA-BSA veličine 15-40 μm sa odličnom efikasnošću inkapsulacije BSA od čak 70 %.^[197] Takođe treba navesti i inkapsulaciju jednog oblika stafilokinaze (DGR) u PLGA nanosfernim matričnim nosačima za kontrolisanu dostavu. Primenjena je emulziono/ekstrakciona metoda u polju ultrazvuka. Korišćeni su rastvor PLGA u metilen-hloridu, rastvor DGR u fosfatnom puferu i PVA kao stabilizator. NaCl i $\text{Mg}(\text{OH})_2$ su dodati u cilju efikasnije inkapsulacije. Za razliku od prethodne metode, u ovom slučaju izvor ultrazvuka bila je ultrazvučna sonda. Parametri ultrazvučnog polja su bili snaga ultrazvučnog polja od 80 W i vreme ultrazvučnog tretiranja od 40 i 30 s. PLGA-DGR sfere bile su mikronskih dimenzija sa dijametrom od 75-98 μm i efikasnošću inkapsuliranog DGR od 7 do čak 85 %. Pokazano je da PVA pored NaCl-a takođe ima određenu ulogu u efikasnosti inkapsulacije.^[198]

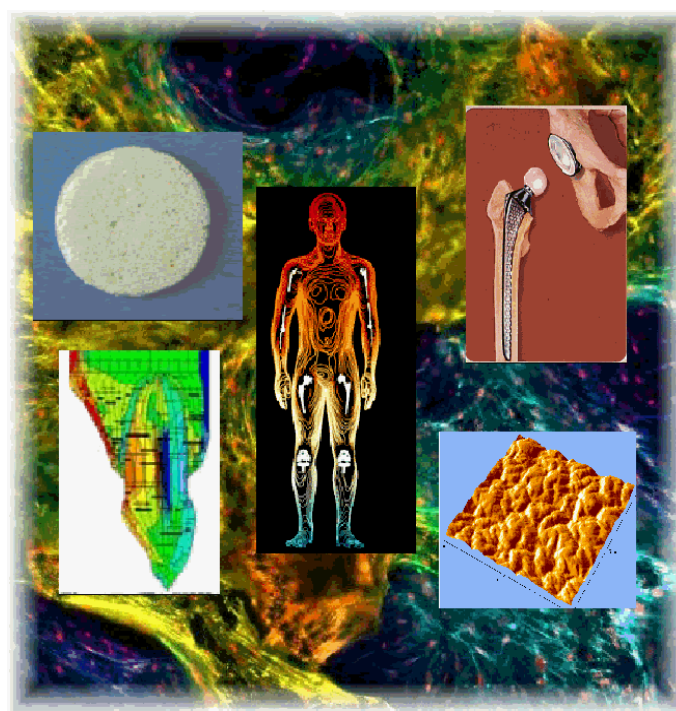
Nešto drugačiji pristup ultrazvučnog tretiranja PLGA i inkapsulacije u polju ultrazvuka koristi metoda ultrazvučnog raspršivanja. Ova metoda zapravo predstavlja modifikaciju "spray-dry" metode. Oprema je tako konstruisana da atomizer poseduje nastavak kroz koji se tečnost ultrazvučno intenzivno raspršuje iz unutrašnje cevi i na taj način se omogućava formiranje veoma sitnih kapljica čijim sušenjem se dobijaju veoma fine sferne čestice. Prvenstvena namena ove metode bila je u inkapsulaciji proteina i peptida unutar polimera. Veličina dobijenih mikrosfera bila je od 0.1 do 100 μm i mogla je biti dobro kontrolisana preko viskoznosti tečnosti u atomizeru.^[199] Rezultati su pokazali da se primenom ove metode u procesu inkapsulacije albumina (BSA) u PLGA dobijaju dosta sitnije čestice veličine od 13-24 μm , ali niže efikasnosti inkapsulacije (60 %) i sa prilično velikim gubicima prinosa.^[200]

Spoj poslednje dve navedene metode je nova metoda ekstrakciono/evaporaciona mikroinkapsulacija u ultrazvučnom atomizeru. Princip metode podrazumeva raspršivanje rastvora polimera u organskom rastvaraču (PLGA) i vodenog rastvora komponente koja će biti inkapsulirana (lizozoma). Sudarom ovako raspršenih, finih kapljica dolazi do njihovog sjedinjavanja i formiranja mikro- reakcionog rezervoara. Na ovaj način dobijene čestice PLGA sa inkapsuliranim lizozomima su sfere veličina od 40 do 100 μm .^[201]

1.4.3 Materijali za rekonstrukciju koštanog tkiva

Poli(laktid-ko-glikolid)-hidroksiapatit biokompozit

Trenutno postoji veoma veliki broj materijala koji su posledica dugogodišnjeg rada na ispunjavanju svih potrebnih zahteva kako bi materijal bio podesan za reparaciju i rekonstrukciju prirodnog koštanog tkiva. Pored već navedenih svojstava biokompatibilnosti, bioaktivnosti i netoksičnosti, ovaj materijal bi trebalo da ispunjava veoma stroge zahteve koji se tiču mehaničkih osobina kako bi izdržao sva opterećenja i bio odgovarajuća potpora organizmu isto tako dobro kao i prirodne kosti (slika 1.18).



Slika 1.18: Ilustracija svojstava i primene biokompozita za rekonstrukciju koštanog tkiva^[202]

Svi materijali koji su do danas razvijeni za ovu namenu mogu se podeliti na keramičke, polimerne, metalne i kompozitne. Grupa materijala koja najviše obećava zbog svojih osobina su organsko-neorganski kompoziti, hibridni i nanokompozitni materijali koji uključuju kombinaciju polilaktida, poliglikolida, poli(laktid-ko-glikolida) i drugih bioresorbilnih polimera sa biokeramičkim materijalima poput hidroksiapatita (HAp), 3-kalcijum-fosfata (TCP) ili bioaktivnog stakla. Klasifikacija ovih materijala sa nekoliko najvažnijih primera data je u tabeli 1.3.

Tabela 1.3: Klasifikacija biomaterijala za reparaciju koštanog tkiva					
^a polilaktid, poliglikolid, poli(laktid-ko-glikolid, polikaprolakton, poli(metil-metakrilat), poli(etilen-tereftalat)					
	metal ili legura	keramika	polimer	kompozit	nanokompozit
glavne mehaničke osobine	Young-ov modul 110-210 GPa zatezna čvrstoća 300-1274 MPa kompresivna čvrstoća 550-860 MPa zamor materijala 200-600 MPa	Young-ov modul 80-390 GPa zatezna čvrstoća 0.05-0.4 MPa kompresivna čvrstoća 0.4-3.9 MPa zamor materijala 0.7-12 MPa	Young-ov modul 0.4-2.85 GPa zatezna čvrstoća 16-61 MPa	zavise od vrste kompozita	zavise od vrste nanokompozita
prednosti	jaki, čvrsti i elastični	otporni kada su obloženi bioinertni (Al ₂ O ₃ , ZrO), bioaktivni (HAp, Bio- keramika), bioresorbilni (TCP)	fleksibilni, elastični, površinski promenljivi, promenljivih hemijskih grupa	jaki, dizajnirano fleksibilni, mehanički pouzdati	velika slobodna površina, reaktivni, relativno jakih međupovršinskih veza, dizajnirane fleksibilnosti, pružaju mehaničku pouzdanost
mane	gusti, mogu da korodiraju	lomljivi, slabe istegljivosti, meki, neotporni	slabi, toksičnost nekih produkata degradacije	osobine mogu biti različite zavisno od sintetske metode	nema dovoljno optimizovane tehnike za procesiranje materijala
primena	koštane pločice, veštačka srž za koštane implante, dentalni mostovi, zubne proteze	veštački kuk i srž kostiju, koštani filer, orbitalni i alveolarni implant, maksilofacijalna rekonstrukcija	porozni deo koštanog tkiva, koštana veziva, koštane pločice, koštani i zubni fileri, kontrolisana dostava lekova	porozni deo koštanog tkiva, koštane regenerativne membrane, kontrolisana dostava lekova	veliki deo ortopedije, tkivno inženjerstvo, kontrolisana dostava lekova
primeri	Ti, ^{[203],[204]} Ti legure ^[205] nerđajućí čelik ^[206] , Co-Cr legure ^[207]	Al ₂ O ₃ , ^[208] ZrO ₂ , ^[209] biostaklo ^[210] , TCP ^[211] HAp ^[212]	kolagen ^[213] , želatin ^[214] , PLA ^[215] , PGA ^[216] , PLGA ^[217] , PCL ^[218] , PMMA ^[219]	HAp/kolagen ^[220] HAp/želatin ^[221] HAp/PLGA ^[230] HAp/PLLA ^[222] HAp/PE ^[223]	n-HAp/kolagen ^[224] n-HAp/želatin ^[221] n-HAp/PLLA ^[233] n-HAp/PLGA ^[225]

Biodegradabilni polimer/biokeramika kompoziti su perspektivna grupa materijala i iz tog razloga se intenzivno proučavaju. Glavna ideja za formiranje ovakvih materijala je da se u procesu sinteze, po ugledu na prirodne materijale i načine njihove primene, formiraju

nanostrukturni keramički materijali, poput TCP-a i HAp-a, koji će biti uniformno dispergovani unutar polimerne matrice i tako graditi nano- biokompozite.

Utvrđeno da je nanometarska dimenzija neorganske komponente unutar prirodnog koštanog tkiva veoma važna jer unapređuje njegove mehaničke osobine. Postignuta osteokonduktivnost je daleko bolja ako sintetička keramika ima što sličniji sastav i morfologiju neorganskom delu kostiju. Pokazana je značajno bolja adsorpcija proteina i adhezija osteoblasti na nanostrukturnim keramičkim materijalima. Ove prednosti su svakako mnogo bolje kod organsko/neorganskih nanokompozita.

Kada je reč o PL(G)A/HAp kompozitu, koriste se različite metode pripreme zavisno od željenih karakteristika koje zahteva njegova potencijalna primena. Kada je reč o poroznom materijalu za veštačko koštano tkivo ("scaffolds"), jedna od metoda je termički indukovano razdvajanje faza (TIPS). Ona podrazumeva nekoliko koraka: sintezu HAp-a procesom precipitacije, formiranje sfernih čestica NaCl-a odgovarajućih dimenzija procesom mlevenja i njihovo presovanje, mešanje ultrazvučno napravljene suspenzije HAp-a u etanolu sa presovanim NaCl-om, sušenje ovako dobijene smeše i na kraju dodavanje rastvora PLLA u mešavinu prahova HAp/NaCl uz uparavanje rastvarača pri sobnim uslovima. Ovako dobijeni kompozit se ispira u destilovanoj vodi kako bi se rastvorio NaCl i formirala porozna struktura.^[226] Ista metoda korišćena je i za dobijanje PLGA/HAp poroznog materijala i postignuta je 95 % poroznost.^[227] Dalja ispitivanja su pokazala mogućnost primene ovako formiranih poroznih struktura za kontrolisanu dostavu medikamenata.

Zanimljiva morfologija PLGA/HAp kompozita postignuta je primenom nove metode za dobijanje vlaknastih struktura polimernih ili kompozitnih materijala u električnom polju. Princip metode je da jedna elektroda ima ulogu kapilare u kojoj se nalazi suspenzija polimera ili kompozita, dok druga ima ulogu kolektora formiranih niti. Zavisno od viskoznosti suspenzije, u trenutku uspostavljanja električnog polja mogu se formirati kapi (elektro-raspršivanje) ili niti («electrospining»). Dobijene niti su ravnomernih dimenzija jer njihova širina zavisi od dijametra kapilare, a dužina od viskoznosti suspenzije. Primena ove metode omogućila je formiranje PLGA/HAp materijala sa inkapsuliranim faktorom rasta kostiju-BMP-2 plazmid DNK. Obzirom na veliku slobodnu površinu nastalih vlaknastih struktura, napravljen je sistem koji je bio pogodan za kontrolisanu dostavu medikamenata, što je *in vitro* potvrđeno i uzorci su pokazivali pozitivan odgovor ljudskih matičnih ćelija i vezivanje proteina.^[228] Ispitivanja su nastavljena *in vivo* i rađena su na miševima. Rezultati su pokazali veoma dobar odgovor organizma na kontrolisanu dostavu ovog faktora rasta iz PLGA/HAp

kompozita što najbolje pokazuje novoformirano koštano tkivo i izlječenje koštanih defekata. Ovi rezultati ukazuju na materijal koji će se potencijalno koristiti za liječenje bolesti kostiju.^[229]

Jedna od tipičnih metoda koja se koristi, u manje ili više modifikovanom obliku, za formiranje PLGA-HAp kompozitnog materijala je emulzijska metoda. Ova metoda omogućava sintezu mikro-/nano- strukturnog PLGA-HAp kompozita. Metoda se zasniva na dispergovanju precipitacijom sintetisanog hidroksiapatita u etanolu kome se u kapima dodaju rastvor polimera i vodeni rastvor PVA koji ima ulogu stabilizatora.^{[230],[231],[232],[233]}

Kompozitni materijal izgrađen iz poli(propilen-fumarata) (PPF) unutar PLGA i sa hidroksiapatitom kao neorganskim punilom bio je materijal formiran u procesu precipitacije i presovanja ovako formiranog materijala sa mehaničkim osobinama koje su omogućavale formiranje biodegradabilnih koštanih pločica koje se koriste za fiksaciju fraktura.^[234]

Znatno poboljšanje mehaničkih osobina postignuto je metodom koja se zasnivala na transformaciji trikalcijum fosfata (TCP) u Ca-nezasićeni HAp hidrolizom iz presovanog TCP-PLGA-NaCl prekompozita. Mehaničke osobine ovako dobijenog HAp-PLGA kompozita su: zatezna čvrstoća- 13.3 MPa, Young-ov modul- 2.8 GPa i savitljivost- 24.8 MPa. Ovako dobijene vrednosti mehaničkih osobina bile su skoro dvostruko bolje u poređenju sa prekompozitnim materijalom i imale su znatno poboljšanu vrednost zatezne čvrstoće dok je Young-ov modul bio mali. Ova svojstva su zavisila od temperature hidrolize i sastava kompozita. Sve mehaničke promene povezane su sa mikrostrukturom kompozita koja je određena morfološkim promenama strukture polimera na temperaturi staklastog prelaza i stepenom hidrolize TCP-a u HAp.^[235]

II

CILJ RADA

Rekonstruktivna medicina se već godinama razvija sintezom novih i usavršavanjem postojećih biomaterijala koje ova grana medicine koristi. Do sada je primenom različitih metoda sintetisan niz kompozitnih materijala čiji je primarni cilj da se u procesu aplikacije postignu efekti što približniji ponašanju prirodnog koštanog tkiva. Obzirom na činjenicu da najveći procenat neorganske faze koštanog tkiva čini hidroksiapatit, upravo ovaj materijal je najpogodniji za njegovo oponašanje. Ovaj materijal je do sada sintetisan brojnim metodama i zavisno od primenjene metode i uslova sinteze pokazuje veoma različite strukturne i morfološke karakteristike. Njegova primenljivost usko je vezana za uređenost strukture.

Cilj ovog rada je:

(1) Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita i karakterizacija ovako dobijene keramike.

U okviru toga je bilo potrebno:

- ❖ *Ispitati uticaj uree, kao agensa homogene precipitacije, na proces formiranja monofaznog hidroksiapatita u polju ultrazvuka.*
- ❖ *Ispitati strukturu sonohemijski dobijenih kristala hidroksiapatita i mehanizam njihovog rasta i objasniti doprinos ultrazvuka nastaloj morfologiji.*

(2) Ispitivanje mogućnosti formiranja kompozita sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita sa poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-om (DLPLG/HAp) primenom ultrazvučnog procesiranja i karakterizacija tako dobijenog kompozitnog materijala.

U okviru toga bilo je potrebno:

- ❖ *Ispitati morfologiju hidroksiapatita nakon deaglomeracije ultrazvučnim poljem visokog intenziteta.*
- ❖ *Ispitati mogućnost procesiranja DLPLG polimera ultrazvučnim poljem većeg intenziteta.*
- ❖ *Optimizovati eksperimentalne parametre pri procesiranju DLPLG/HAp kompozita u polju ultrazvuka i pratiti njihov uticaj na morfologiju finalnog DLPLG/HAp kompozitnog materijala.*

Ovaj magistarski rad je imao za cilj da se primenom ultrazvuka dobiju visoko uređene strukture DLPLG/HAp kompozita- jednog od najpogodnijih sintetičkih materijala za

rekonstrukciju koštanog tkiva i objasni mehanizam njihovog formiranja, o čemu ne postoje nikakvi podaci u literaturi i u osnovi predstavlja potpunu istraživačku novinu.

III

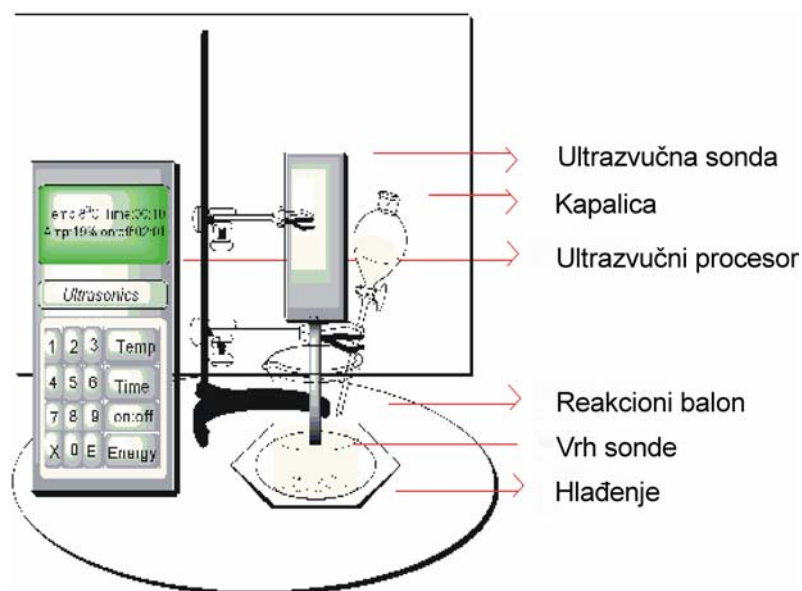
EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Izbor eksperimentalne metode

Metoda koja je korišćena u procesu sinteze hidroksiapatita i njegovog daljeg oblaganja polimerom u cilju formiranja DLPLG/HAp kompozita je sonohemijaska sinteza. Kao što je već pomenuto, ovo je nova sintetska metoda koja je omogućila dobijanje velikog broja različitih nanostrukturnih materijala, među kojima su i brojni kompoziti. Ovako sintetisani materijali imali su veoma specifične morfološke karakteristike. Otuda i ideja o primeni ove metode u sintezi hidroksiapatita i njegovom oblaganju polimerom.

Primarne osobine ove metode su ekstremni eksperimentalni uslovi kao što su veoma visoka lokalna temperatura (do 5000 °C) i visok pritisak (oko 500 bara) u kombinaciji sa kratkim vremenom života intermedijernih jedinjenja i izrazito velikom brzinom hlađenja ($>10^9$ K/s) koji obezbeđuju jedinstvene uslove za odvijanje hemijskih reakcija. Kao takva, ova metoda ima veliki uticaj na strukturu i morfologiju formiranog jedinjenja.

U sintezi uzoraka korišćena je Sonics Vibra Cell ultrazvučna sonda visokog intenziteta (Ultrasonic Processors for High Volume Applications VCX 750, Newtown, Connecticut, USA). Shematski prikaz aparature predstavljen je na slici 3.1.



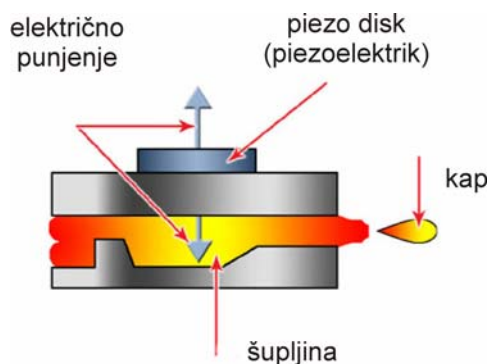
Slika 3.1: Shematski prikaz aparature koja je korišćena u procesu sonohemijiske sinteze hidroksiapatita i njegovog oblaganja polimerom u cilju formiranja DLPLG/HAp kompozita

Aparatura je sastavljena iz sledećih komponenti:

- (1) Suslikov reakcioni balon sa tri bočna ulaza ili staklena čaša
- (2) Kapalica zapremine 100 ml
- (3) Kondenzator trbušastog tipa
- (4) Ultrazvučna sonda ($P = 750 \text{ W}$)
- (5) Vrh sonde ($\varnothing = 13 \text{ mm}$)
- (6) Termopar
- (7) Ultrazvučni procesor
- (8) Regulator temperature

Ultrazvučna sonda sadrži generator koji konvertuje električnu energiju naizmenične struje frekvencije 50 Hz u električnu energiju ultrazvučne frekvencije.

Piezoelektrični prenosnik konvertuje naizmeničnu električnu energiju u mehaničku korišćenjem piezoelektričnog efekta koji podrazumeva da određeni materijali (piezomaterijali) menjaju dimenzije kada se nađu pod naponom. Posledica vibriranja piezomaterijala je formiranje ultrazvuka (Slika 3.2).



Slika 3.2: Shematski prikaz piezoelementa ^[236]

Puls se podešava na procesoru i predstavlja brzinu uključivanja i isključivanja ultrazvučnog polja, odnosno smenjivanje radnog režima i pauze.

Suslikov reakcioni balon korišćen je za sintezu apatita zbog neophodnosti da sistem bude zatvoren zbog zadržavanja neophodnog amonijaka, dok je u procesu oblaganja apatita polimerom korišćena staklena čaša. Pored toga, ugljen-dioksid koji se oslobađao pri razgradnji uree odvođen je iz reakcionog balona preko kondenzatora koji je takođe bio neophodan samo za sintezu apatita.

3.2 Materijal

Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita vršena je pomoću sledećih prekursora: kalcijum-nitrat tetra-hidrata ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) i amonijum-dihidrogenfosfata ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) proizvođača "Zorka" Šabac. Kao agens homogene precipitacije korišćena je urea (NH_3CONH_2) proizvođača "Kemika" Zagreb.

U procesu oblaganja keramike polimerom korišćeni su sledeći reagensi: komercijalne granule poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a (DLPLG) sa molarnim udelom laktidne i glikolidne kopolimerne komponente 50 : 50, srednje molarne mase 38400 Da i specifične gustine 0.37 dl/g proizvođača »Absorbable Polymers International« SAD, aceton (CH_3COCH_3) kao rastvarač i etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) kao nerastvarač polimera nabavljača »Superlab« Beograd i stabilizatori poli(vinil-alkohol) (PVA) srednje molarne mase 72000 Da i stepena hidrolize 98 % proizvođača "Merck" Nemačka i poli(vinil-pirolidon) (PVP) srednje molarne mase 29000 Da i stepena hidrolize 98 % proizvođača "Sigma" Nemačka.

Primenjeni DLPLG polimer komercijalno je sintetisan iz laktidne (hidroksi-propanonske) i glikolidne (hidroksi-acetatne) kiseline. Prilikom sinteze DLPLG-a korišćena su oba izomera, tako da ovaj polimer sadrži i d- i l- laktidne monomerne jedinice- što je u okviru njegovog naziva i naglašeno.

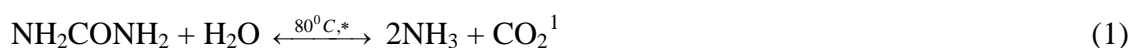
3.3 Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita (HAp) i formiranje poli(laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit (DLPLG/HAp) kompozita

U okviru ove magistarske teze eksperimentalni rad se sastojao iz tri dela. U prvom delu urađena je sonohemijska sinteza hidroksiapatita i njegova karakterizacija. Ovako formirani hidroksiapatit korišćen je u daljem radu za formiranja kompozita. Druga faza eksperimenta bilo je sitnjenje sintetisanih čestica keramike u polju ultrazvuka visokog intenziteta, dok je u trećoj fazi, ovako tretirani apatit, iskorišćen za formiranje DLPLG/HAp kompozitnog materijala.

3.3.1 Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita (HAp)- $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$

Postupak sinteze hidroksiapatita počinje rastvaranjem $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ u po 50 ml destilovane vode uz mešanje na mešalici pri 1200 rpm-a do postizanja homogenih rastvora. Vodeni rastvor $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ je imao koncentraciju $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$, dok je koncentracija $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ izabrana tako da molarni odnos reakcionih prekursora bude $\text{Ca} : \text{P} = 2 : 1$. Koncentracije su izabrane tako da izvor kalcijuma bude razblaženi rastvor i da molarni odnos prekursora bude veći od stehiometrijske vrednosti (koja iznosi $\text{Ca} : \text{P} = 1.67 : 1$) kako bi jedan od prekursora bio u višku. Ovako pripremljeni rastvori izmešani su u reakcionom balonu i zagrevani dok termopar nije pokazao temperaturu od $88\text{ }^\circ\text{C}$. Grejanjem se postiže preduslov za termičko razlaganje uree koja će biti dodata u sledećem koraku. Nakon postizanja željene temperature, uspostavljeno je ultrazvučno polje u kome je počeo proces homogene precipitacije.

Razlaganje uree, kao agensa homogene precipitacije, predstavljeno je reakcijom 1:



Dodavanjem 12% rastvora uree zapremine 5, 6, 8, 10 i 15 ml u kapima i njenom postepenom razgradnjom, koja je određena brzinom razlaganja uree u polju ultrazvuka na datoj temperaturi (reakcija(1)), obezbeđivali su se OH^- joni koji su neophodni za homogenu precipitaciju, odnosno kontrolisana je regulacija pH vrednosti u sistemu.

¹ Oznaka * označava razgradnju uree u polju ultrazvuka.

U cilju praćenja procesa sinteze, koncentracija uree u reakcionom sudu (jedan od ključnih parametara u sistemu) je postepeno povećavana uz detektovanje nastalih faza, identifikovanja intermedijerne, metastabilne faze i praćenja njenog postepenog smanjivanja do finalnog jednofaznog sistema čiji sadržaj je činio samo apatit (Tabela 3.1).

Svi uzorci su imali period starenja od 12 h nakon čega su centrifugiranjem na 4000 rpm-a odvojeni od supernatanta i sušeni pri atmosferskim uslovima.

Tabela 3.1: Parametri ultrazvučnog polja i koncentracije rastvora uree u toku procesa sinteze hidroksiapatita

Uzorak	C_{uree} (M) 10^{-2}	T (°C)	t (min)	Amp (%)
1	1.0	60 - 90	120	80
2	1.2	82 - 90	180	80
3	1.6	80 - 90	180	80
4	2.0	80 - 90	180	80
5	3.0	80 - 90	180	85

3.3.2 Ultrazvučno usitnjavanje čestica hidroksiapatita

Nakon sonohemijske sinteze i perioda starenja od 12 h, hidroksiapatit je tretiran poljem ultrazvuka visokog intenziteta u cilju sitnjenja dobijenih kristala. Sitnjenje je rađeno na sobnoj temperaturi pri sledećim parametrima ultrazvuka: amplituda Amp = 80%, snaga P = 600 W, period radnog i relaksacionog režima 02 : 01 s, vreme tretiranja t = 10, 20 i 30 min. Medijum u kome je rađeno ultrazvučno usitnjavanje bio je etanol i korišćena je zapremina od 15 ml.

3.3.3. Ultrazvučno procesiranje DLPLG polimera i formiranje DLPLG/HAp kompozita

U trećem delu eksperimentalnog rada formiran je kompozit čija je keramička faza hidroksiapatit, dok polimernu fazu gradi poli(d,l-laktid-ko-glikolid). Za deo eksperimenata koji su rađeni sa ultrazvučnom sondom korišćena je ista aparatura kao u procesu sinteze keramike, dok je za drugi deo eksperimenata korišćeno ultrazvučno kupatilo.

Proces oblaganja keramike polimerom sumiran je u tabeli 3.2 i imao je sledeći tok:

Komercijalno dobijene granule poli(laktid-ko-glikolida), sa udelom laktidne i glikolidne kopolimerne komponente u odnosu 50 : 50, rastvorene su u acetonu. Proces rastvaranja trajao je do formiranja homogenog rastvora u toku 120 min. Korišćen je 2 % rastvor DLPLG-a u acetonu. Kao taložno sredstvo korišćen je etanol koji je dodavan u višku u odnosu na aceton u

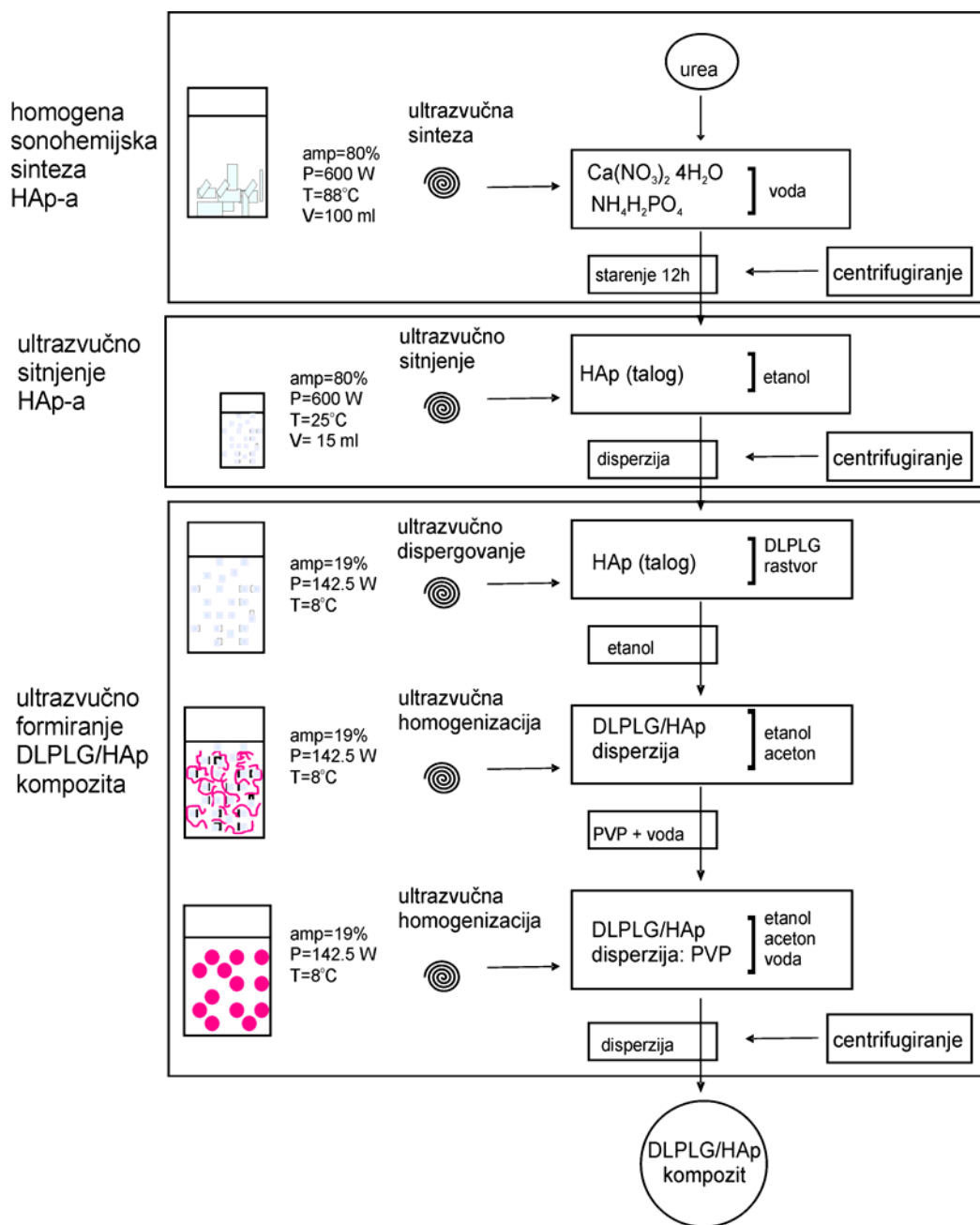
cilju potpunog istiskivanja rastvarača i taloženja polimera. U cilju stabilizacije dobijenih čestica korišćena su dva stabilizatora: poli(vinil-alkohol)- PVA i poli(vinil-pirolidon)- PVP.

Sonohemijski usitnjene čestice hidroksiapatita bile su pripremljene za oblaganje polimerom. Dodate su rastvoru polimera i ultrazvučno dispergovane u njemu do postizanja fine, homogene i stabilne disperzije. Svaka čestica disperzije apatita trebala je da bude nukleaciono mesto za taloženje polimera po dodatku etanola. Dodatkom etanola kao nerastvarača, postepeno je uklonjen rastvarač iz rastvora polimera što je uz prisustvo čvrste, dispergovane faze stvorilo uslove za izdvajanje čvrste faze polimera. Obzirom na očekivano veliko površinsko naelektrisanje dobijenih čestica usled kog bi stepen aglomeracije bio izuzetno visok, disperzija, čiju je čvrstu fazu gradio kompozit keramike i polimera, je ukapavana u rastvor stabilizatora (PVA ili PVP) uz ultrazvučno mešanje. Parametri ultrazvuka tokom polimernog oblaganja apatita su: amplituda $A = 19\%$, snaga $P = 142.5 \text{ W}$, period radnog režima i pauze (01 : 04) s, vreme tretiranja $t = 10 \text{ min}$. U jednoj grupi eksperimenata oblaganje apatita polimerom je rađeno na sobnoj dok je u drugoj, hlađenjem reaktora pomoću leda, postignuta temperatura od $8 \text{ }^\circ\text{C}$. Centrifugiranjem na 4000 rpm-a u toku jednog sata i dekantovanjem odvojen je talog od supernatanta. Talog je, dalje, sušen na sobnoj temperaturi.

Tabela 3.2: Eksperimentalni uslovi u procesu formiranja DLPLG/HAp kompozita

Uzorak	C_{DLPLG} (%)	DLPLG:HAp (%)	Vrsta stabilizatora	$C_{\text{stabiliz.}}$ (%)	T ($^\circ\text{C}$)	$P_{\text{ultrazvuka}}$ (W)	Vrsta disperzije
1	2	90 : 10	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	8	142.5	DLPLG/HAp
2	2	75 : 25	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	8	142.5	DLPLG/HAp
3	2	90 : 10	PVA	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	142.5	DLPLG/HAp
4	2	90 : 10	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	142.5	DLPLG/HAp
5	2	75 : 25	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	142.5	DLPLG/HAp
6	2	75 : 25	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	50.0	DLPLG/HAp
7	2	90 : 10	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	142.5	Etanol/HAp
8	2	100 : 0	PVA	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	142.5	-
9	2	100 : 0	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	50.0	-
10	2	100 : 0	PVP	$2 \cdot 10^{-2}$	~25	142.5	-

Kako bi se ispitaio uticaj intenziteta ultrazvuka na proces formiranja kompozita, jedan deo eksperimenata rađen je u ultrazvučnom polju niskog intenziteta. Parametri ultrazvuka bili su: amplituda $A = 100 \%$, snaga $P = 50 \text{ W}$, kontinualno radni režim, vreme tretiranja $t = 10 \text{ min}$ po koraku.



Slika 3.3: Šematski prikaz toka eksperimenta sa naznačenim koracima u ultrazvučnom procesiranju u kojima se dobijaju međuprodukti na putu do kompozitnog materijala²

S druge strane, radi ispitivanja važnosti postepenog uklanjanja rastvarača iz polimernog rastvora prilikom izdvajanja njegove čvrste faze i uticaja na morfologiju dobijenih čestica, u jednom delu eksperimenata promenjen je redosled tako da je umesto postepenog dodavanja etanola suspenziji apatita u rastvoru polimera, polimerni rastvor dodavan suspenziji apatita u etanolu (Tabela 3.2).

² Eksperimentalni parametri ultrazvučnog polja odnose se na uzorak 1 iz tabele 3.2 i varirani su u skladu sa njom.

Ukupan eksperimentalni tok homogene sonohemijske sinteze hidroksiapatita, ultrazvučnog sitnjenja i formiranja DLPLG/HAp kompozitnog materijala (1) iz tabele 3.2 sumiran je u šemi na slici 3.3.

3.4 Metode karakterizacije

3.4.1 Karakterizacija hidroksiapatita

Karakterizacija hidroksiapatita vršena je primenom sledećih metoda:

- (a) Rendgeno-strukturne analize (XRD)
- (b) Infracrvene spektroskopije (IC)
- (c) Skanirajuće elektronske mikroskopije (SEM)
- (d) Transmisiona elektronske mikroskopije (TEM, HRTEM i SAED)

(a) Rendgeno-strukturna analiza (XRD)

Metoda difrakcije x-zraka je u karakterizaciji sintetisanih prahova imala višestruku ulogu. Najpre je to bila metoda kvalitativne analize koja je omogućila identifikaciju komponenti čvrste faze pri postepenom određivanju sadržaja uree do konačno dobijenog jednokomponentnog sistema koji je sadržao čist apatit. U ovom procesu ona je omogućila identifikaciju i praćenje sadržaja metastabilnog intermedijera na osnovu koga je pretpostavljen mehanizam sinteze apatita u polju ultrazvuka. Onog trenutka kada se došlo do konačnog jednokomponentnog sistema, metoda je iskorišćena za njegovu strukturnu analizu. Urađeno je utičnjavanje strukture u programskom paketu "FoolProof"^[237] uz primenu Ritveldove metode^[238]. Na ovaj način dobijeni su strukturni parametri kristalne rešetke. U cilju analize veličine kristalnih domena sintetisanih kristala, korišćenjem iste metode, rađeno je fitovanje difrakcionih pikova pomoću Thompson- Cox-Hastings (THC) modifikovane pseudo-Voigt funkcije^[239]. Na ovaj način je procesom dekonvolucije uklonjeno instrumentalno širenje linija. Primenom Ritveldove procedure na LaB₆ standard, uz korišćenje iste THC funkcije, omogućeno je izdvajanje Lorencovog ($\beta_{L,s}$) i Gausovog ($\beta_{G,s}$) integralnog širenja instrumentalnog profila. Vrednosti komponenti integralnog širenja iskorišćene su za dobijanje integralnog širenja profila uzorka. Konačno, dobijene vrednosti omogućavaju računanje ukupnog integralnog širenja celokupne posmatrane TCP modifikovane pseudo-Voigt funkcije ($\beta_{G,v}$). Ovo širenje je iskorišćeno za izračunavanje prosečnih vrednosti veličina kristalnih domena za svaku pojedinačnu refleksiju.

U računu je korišćena sledeća proporcionalnost:

$$\langle D_{hkl} \rangle \sim 1 / (\beta_v) \quad (2)$$

Svi difraktogrami snimljeni su na difraktometru Philips PW-1050 tipa sa Ni filtrom $\text{CuK}\alpha$ zračenja. Podaci su snimani u opsegu 2θ od 10° do 120° , sa korakom od 0.02° i vremenom od 10 s po koraku.

(b) Infracrvena spektroskopija (IC)

Sledeći korak u karakterizaciji finalno dobijenog jednokomponentnog uzorka hidroksiapatita bila je metoda infracrvene spektroskopije. Ova metoda je korišćena radi potvrđivanja identifikacije konačno sintetisanog praha čistog apatita primenom dve uporedne kvalitativne metode. IC spektri su dobijeni primenom KBr tehnike. Uzorak je izmešan sa KBr u molarnom odnosu 1 : 1 i presovan u vidu tablete. Simanje je rađeno u opsegu od 450 do 4000 cm^{-1} sa rezolucijom od 4 cm^{-1} . Snimljeni spektar je rezultat usrednjavanja 64 skaniranja.

IC analiza je urađena na MIDAC M 2000 FTIR spektrometru sa duplim mehaničkim ležištem, linearnim motorom, rezolucijom 0.5-32 cm^{-1} , spektralnom oblašću za KBr od 7.8 do 400 cm^{-1} i tačnošću nižom od 0.01 cm^{-1} .

(c) Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Mikroskopska analiza uzorka sa čistim sadržajem hidroksiapatita najpre je rađena skanirajućom elektronskom mikroskopijom. Ova metoda je urađena u cilju određivanja veličine i oblika sintetisanih čestica.

Pripremanje uzorka pre snimanja podrazumevalo je dispergovanje praha u vodi uz upotrebu ultrazvučnog kupatila. Uzorak je snimljen na JEOL JXA 840 skanirajućem elektronskom mikroskopu.

(d) Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM i HRTEM)

U cilju dalje strukturne analize čistog apatita posmatranjem na nižoj skali dimenzija, uzorak je snimljen metodom transmisiona elektronske mikroskopije kako bi se posmatrala njegova unutrašnja struktura. S druge strane, snimanjem na visokorezolucionom transmisionom elektronskom mikroskopu omogućilo je posmatranje i analizu kristalne strukture.

Uzorak je pripremljen za snimanje dispergovanjem praha u acetonu u ultrazvučnom kupatilu. Za snimanje je korišćena metoda postepenog ukapavanja disperzije na trakasti karbonski film sa bakarnom mrežicom od 300 Mesh-a. Snimanje je rađeno na JEM-2010F tipu visokorezolucionog transmisionog elektronskog mikroskopa.

3.4.2 Karakterizacija DLPLG/HAp kompozita

DLPLG/HAp kompozit karakterisan je primenom sledećih metoda:

- (a) Infracrvenom spektroskopijom (IC)
- (b) Difrakcijom x-zraka
- (c) Gel propusnom hromatografijom (GPH)
- (d) Nuklearnom magnetnom rezonantnom spektroskopijom (C^{13} - NMR)
- (e) Skanirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM i FE SEM)
- (f) Metodom rasejanja laserskog snopa
- (g) Transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM)

(a) Infracrvena spektroskopija (IC)

Metoda infracrvene spektroskopije primenjena je kao kvalitativna metoda kojom je na osnovu položaja, intenziteta i širine traka izvršena identifikacija vibracija grupa. Ovom metodom analizirani su svi ultrazvučno sintetisani kompozitni sistemi kao i sistemi sa čistim sadržajem polimera tretiranog ultrazvukom.

Uslovi snimanja uzorka i karakteristike uređaja su identični kao i u prethodno navedenom slučaju IC snimanja čistog hidroksiapatita (3.4.1).

(b) Difrakcija x-zraka

Metoda difrakcije x-zraka urađena je kao potvrдна identifikaciona metoda, s jedne strane, i kao metoda koja bi mogla da pokaže veličinu kristalita sintetisanih čestica, sa druge strane, čije je poznavanje od velikog značaja za dalja mikroskopska merenja.

Primenom ove metode snimljeni su difraktogrami kompozitnih materijala sa različitim masenim udelom polimerne i keramičke komponente kompozita (DLPLG : HAp = 90:10 i 75:25).

Tip difraktometra i uslovi snimanja, tj. opseg vrednosti 2θ odgovaju prethodno navedenim uslovima snimanja čistog hidroksiapatita (3.4.1).

(c) Gel-propusna hromatografija (GPH)

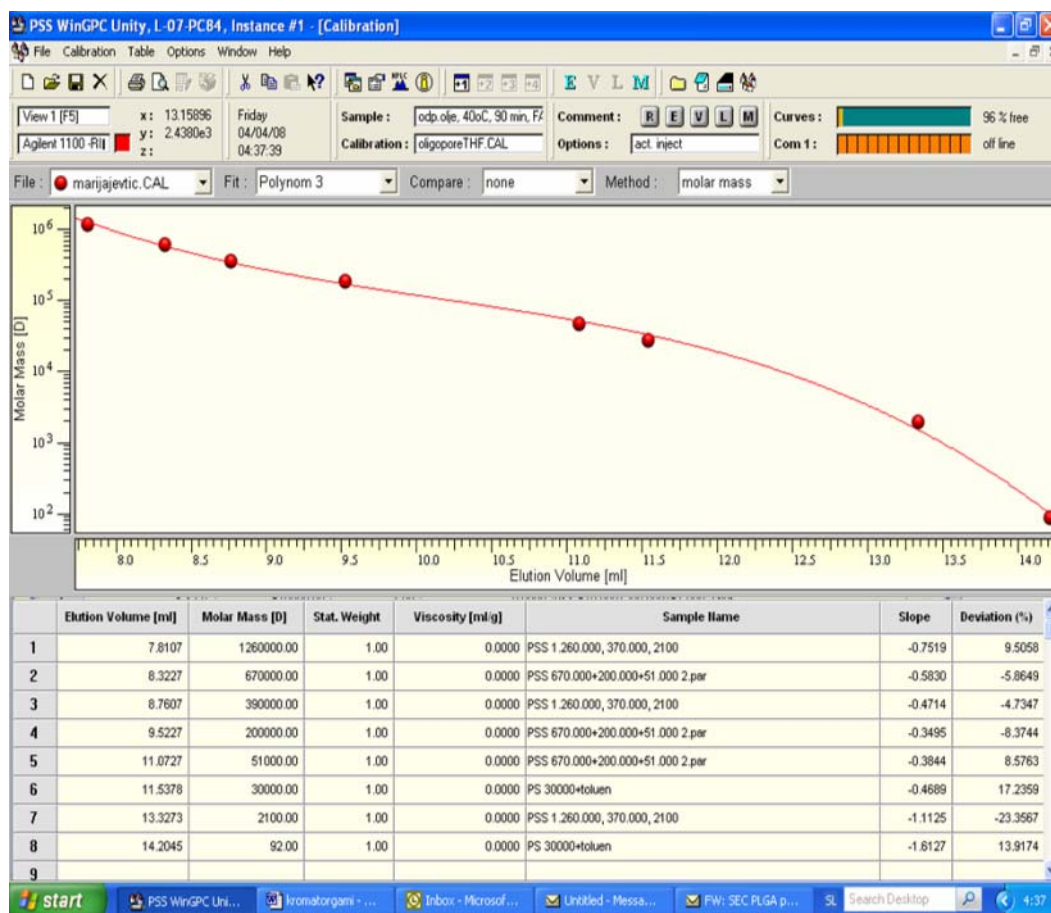
Metoda gel-propustne hromatografije primenjena je u cilju određivanja raspodela molekulskih masa, srednje brojne vrednosti molekulskih masa (\overline{M}_n), srednje masene vrednosti molekulskih masa (\overline{M}_w) i indeksa polidisperznosti ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$). Na ovaj način trebalo je odrediti eventualnu pojavu degradacije polimera u polju ultrazvuka i kvantifikovati je. Analizirani su sledeći uzorci: čist DLPLG tretiran poljem ultrazvuka pri temperaturi medijuma od 8 i 25 °C, kao i kompozit sa udelom DLPLG:HAp 90:10 i 75:25 procesirani poljem ultrazvuka na istim temperaturama (8 i 25°C).

Tabela 3.3: Kalibraciona tabela korišćena u GPH metodi

Uzorak standarda	Molarna masa (kD)	Zapremina eluiranja (ml)	Nagib	Devijacija (%)
PSS 1260000, 370000, 2100	1.260.000	7.81	-0.75	9.51
PSS 670000, 200000, 51000	670.000	8.32	-0.58	-5.86
PSS 1260000, 370000, 2100	390.000	8.76	-0.47	-4.73
PSS 670000, 200000, 51000	200.000	9.52	-0.35	-8.37
PSS 670000, 200000, 51000	51.000	11.07	-0.38	8.58
PS 30000, toluene	30.000	11.54	-0.47	17.24
PSS 1260000, 370000, 2100	2.100	13.33	-1.11	-23.36
PS 30000, toluene	0.092	14.20	-1.61	13.92

GPH merenja su urađena na Hewlett Packard 1100 Series hromatografu sa RI Agilent 1100 detektorom. Korišćene su AM GPC Gel Linear (American Polymers Standards Corporation) kolona i predkolona dimenzija 300x7.5 mm. Analiza je rađena na temperaturi od 30°C korišćenjem tetrahidrofurana (THF) kao eluenta sa brzinom protoka od 1 mL/min. Zapremina uzorka je bila 100 µL. Standardi koji su omogućili formiranje kalibracione krive pomoću koje su određene relativne vrednosti srednjih molekulskih masa i raspodele molekulskih masa bili su PSS (polistirenski standardi) 1260000, 670000, 390000, 200000, 51000, 30000, 2100 u

toluenu. Tabela 3.3 predstavlja kalibracionu tabelu, dok je odgovarajuća kalibraciona kriva prikazana na slici 3.4.



Slika 3.4: Kalibraciona kriva korišćena u GPH metodi

(d) Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (C^{13} -NMR spektroskopija)

C^{13} -NMR spektroskopija je rađena u cilju određivanja udela laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica u polimeru/polimernom delu kompozita nakon ultrazvučnog procesiranja na dvema različitim temperaturama ($8^{\circ}C$ i $25^{\circ}C$).

C^{13} -NMR spektri su snimani na Varian Unity Inova 300 MHz NMR spektrometru. Snimanja su rađena u s2 pulsnom modu. Pre snimanja masa uzoraka od 0.04585 g rastvorena je u acetonu zapremine 400 μ l. Integracija pikova rađena je pomoću VNMRJ rev. 1.1D programskog paketa.

Računanje udela monomernih jedinica u DLPLG kopolimeru rađeno je pomoću sledećih jednačina:

$$R_{lak} = \frac{I_{lak}}{I_{lak} + I_{glik}} \quad (3)$$

$$R_{glik} = \frac{I_{glik}}{I_{lak} + I_{glik}} \quad (4)$$

U jednačinama (3) i (4) R_{lak} i R_{glik} su udeli laktidnih odnosno glikolidnih komonomernih jedinica u DLPLG kopolimeru. I_{lak} i I_{glik} su integrali dobijeni integracijom pikova laktidnih odnosno glikolidnih monomernih jedinica u DLPLG kopolimeru. Udeli komonomernih jedinica su računati pomoću integrala pikova grupa bez protona (integral C=O grupa laktidnih monomera- $I(C=O)_{lak}$ i integral C=O grupa glikolidnih monomera- $I(C=O)_{glik}$), kao i pomoću integrala pikova grupa sa protonima (integral CH grupe laktidnih monomera- $I(CH)_{lak}$ i integral CH_2 grupa glikolidnih monomera- $I(CH_2)_{glik}$).^[240] Poređenjem vrednosti R_{lak} i R_{glik} izračunatih na osnovu grupa sa i bez protona bilo je moguće proveriti eventualnu razliku u rezultatima usled pomeraja koji mogu nastati prilikom sprežanja C^{13} sa okolnim protonima.

(e) Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM i FE SEM)

Skansirajuća elektronska mikroskopija je korišćena za analizu veličine i oblika kako ultrazvučno procesiranog HAp-a tako i DLPLG polimera i DLPLG/HAp kompozitnog materijala pri različitim parametrima koji su varirani u toku dizajniranja morfologije.

SEM mikrografije su snimljene na JEOL JSM 5300 skansirajućem elektronskom mikroskopu. Za ova snimanja uzorak je pripremljen nanošenjem praha na nosače i naparavanjem zlatom.

Obzirom na veličinu čestica i osetljivost DLPLG-a na skaniranje elektronskim snopom, neki od uzoraka snimljeni su pomoću FE SEM-a kako bi se postigla bolja rezolucija i izbegla deformacija morfologije polimera u toku skaniranja. Uzorci su najpre dispergovani u etanolu ili su uzimani delovi uzoraka odmah nakon sinteze i filtrirani na polikarbonatnim membranama sa veličinom pora od 50 do 100 nm. Ovako pripremljeni uzorci naparavani su ugljenikom. Snimanje je rađeno na SUPRA 35 VP Carl Zeiss modelu visokorezolucionog skansirajućeg elektronskog mikroskopa.

(f) Metoda rasejanja laserskog snopa

U cilju određivanja raspodela veličina čestica u uzorcima kompozitnih materijala sa različitim sadržajem keramičke i polimerne komponente, korišćena je metoda rasejanja laserskog snopa. Za tu namenu uzoci su dispergovani u etanolu blagim ultrazvukom. Za

određivanje raspodela veličina čestica korišćen je 110900I referentni indeks refrakcije. Raspodela je određivana po zapremini. Model uređaja koji je služio za određivanje ovih raspodela je CILAS 1180 sa opsegom merenja 0.04-2.5 μm .

(g) Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

U cilju analize morfologije hidroksiapatita nakon sitnjenja visoko-intenzitetskim poljem ultrazvuka kao i morfologije apatite u kompozitnom materijalu, uzorci su snimljeni na transmisionom elektronskom mikroskopu.

Za snimanje je korišćena metoda postepenog ukapavanja disperzije na polikarbonatnu membranu sa bakarnom mrežicom od 300 mesh-a. Snimanje je rađeno na JEM-2010F tipu visokorezolucionog transmisionog elektronskog mikroskopa.

IV

REZULTATI

4.1 Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita

Karakterizacija hidroksiapatita dala je dve vrste podataka. Prvi se odnose na uticaj uree, kao jednog od ključnih faktora za precipitaciju, na proces sinteze hidroksiapatita preko intermedijera do čistog produkta, dok se drugi odnose na strukturnu analizu konačnog produkta posmatranog na širokoj skali veličina.

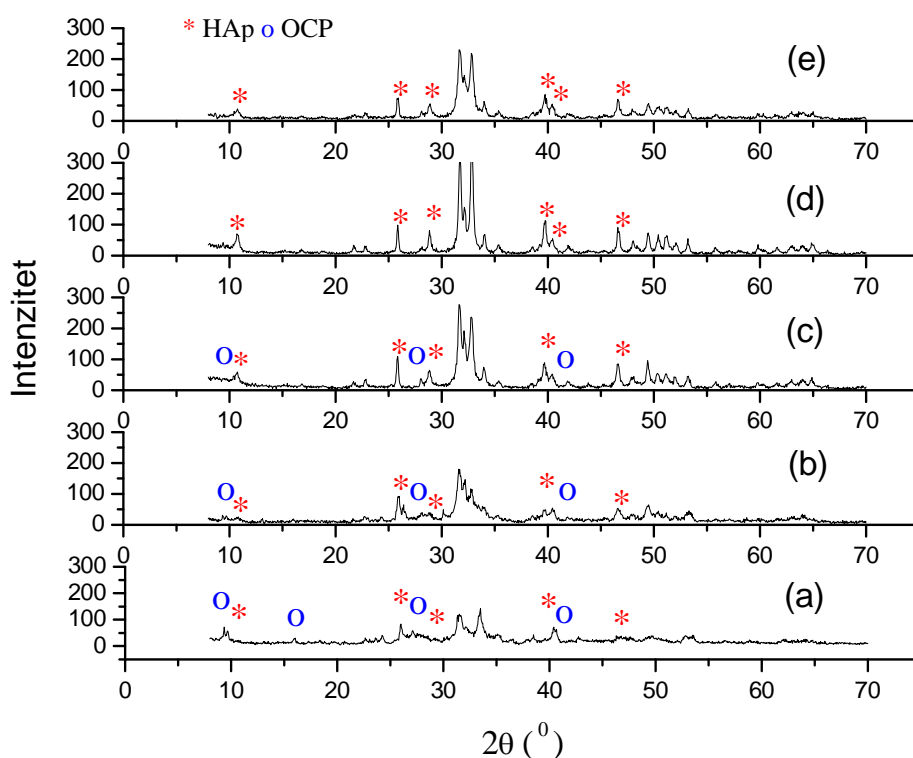
4.1.1 Uticaj uree kao precipitacionog agensa homogene precipitacije

U cilju analize uticaja uree na homogenu sonohemijsku precipitaciju hidroksiapatita, sintetisana je serija uzoraka u kojima je koncentracija uree postepeno povećavana od $1\text{-}3\cdot 10^{-2}\text{M}$ (Tabela 3.1). Nakon sinteze urađena je karakterizacija dobijenih prahova.

(a) Difrakcija x-zraka i analiza rezultata

Difraktogrami uzoraka 1-5 sintetisanih u prisustvu $(1.0, 1.2, 1.6, 2.0 \text{ i } 3.0)\cdot 10^{-2}\text{ M}$ rastvora uree (videti tabelu 3.1) predstavljeni su na slici 4.1a,b,c,d,e respektivno. Na ovoj slici naznakom "*" obeleženi su difrakcioni pikovi hidroksiapatita, dok su sa "o" označeni pikovi oktakalcijum fosfata. Identifikacija hidroksiapatita rađena je na osnovu poređenja pikova sa ICPDS (kartica broj 240033).

Kvalitativna analiza jasno pokazuje prisustvo dve faze u uzorcima 1-3. Ove faze su identifikovane kao hidroksiapatit (HAp) i oktakalcijum-fosfat (OCP). S druge strane, uzorci 4 i 5 su monofazni i njihovom identifikacijom je utvrđeno prisustvo samo hidroksiapatita. Procenom sadržaja sistema utvrđeno je da se sa povećanjem koncentracije uree u sistemu sadržaj HAp-a povećava, a OCP-a smanjuje. Iz predstavljenih rezultata određena je minimalna koncentracija uree ($2\cdot 10^{-2}\text{ M}$) neophodna za sintezu čistog hidroksiapatita u datim uslovima. Nakon postizanja ove koncentracije precipitacionog agensa, odnosno donje granice pH na kojoj je HAp najstabilnija faza, sistem je ostajao jednofazan. Ova vrednost pH iznosila je 7.4 i odgovara fiziološkoj vrednosti.

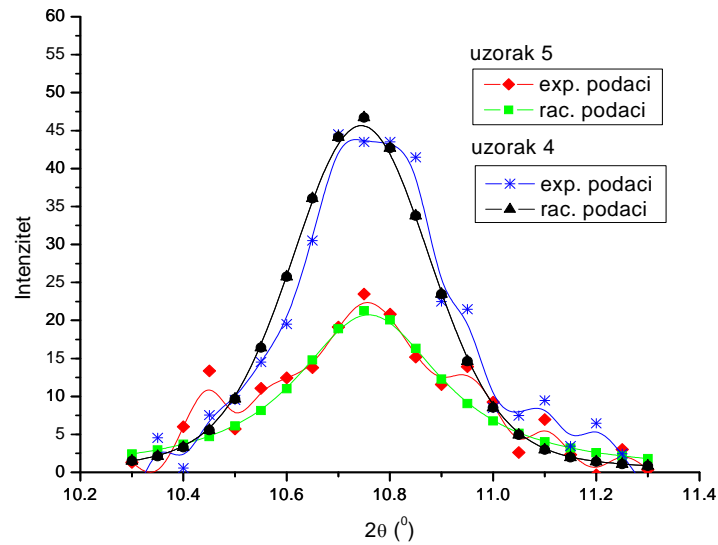


Slika 4.1: Difraktogrami uzoraka 1-5 (Tabela 3.1) sintetisanih u prisustvu različitih koncentracija uree: (a) $1.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, (b) $1.2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, (c) $1.6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, (d) $2.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, (e) $3.0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

Obzirom na činjenicu da su uzorak 4 i 5 monofazni, pri čemu je u sintezi prvog korišćena minimalna potrebna, a u drugom nešto veća koncentracija uree, proveren je uticaj ove promene na veličinu kristalita. Procena je rađena na osnovu analize pika na $2\theta = 10.7^\circ$ koji odgovara (010) Milerovoj familiji ravni. Fitovanje ovog pika rađeno je pomoću pVoigt funkcije u programu Peak Fit. Ovo je omogućilo određivanje širine pika na polovini maksimalnog intenziteta (FWHM) i izračunavanje odgovarajuće veličine kristalita (D_{010}) uz upotrebu Scherrer-ove formule. Dobijene vrednosti su sumirane u tabeli 4.1 i grafički predstavljene na slici 4.2.

Tabela 4.1: Promena veličine kristalita sa porastom koncentracije uree

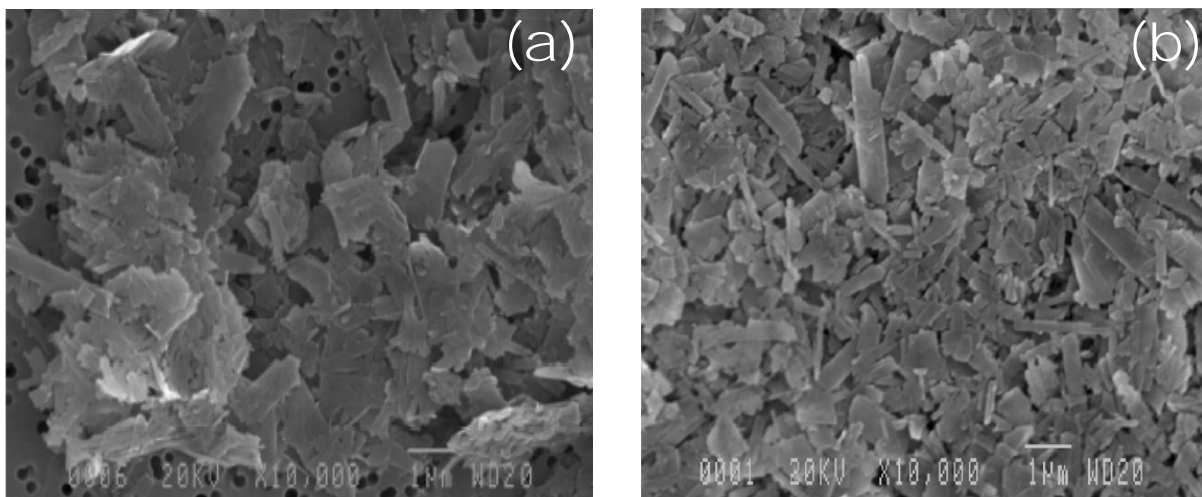
Uzorak	$C_{uree} \text{ (M)} \cdot 10^{-2}$	FWHM ($^\circ$)	$D_{010} \text{ (}\text{Å}\text{)}$
4	2.0	0.33	244
5	3.0	0.31	246



Slika 4.2: Grafički prikaz eksperimentalnih i fitovanjem izračunatih vrednosti difrakcionog pika sa Millerovim indeksima (010) za uzorke 5 i 4 sa različitim sadržajem uree.

(b) Skanirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skansirajuća elektronska mikroskopija iskorišćena je za analizu morfologije uzoraka 5 i 4 koji su u toku homogene sonohemijske precipitacije u prisustvu koncentracije uree od $3 \cdot 10^{-2}$ i $2 \cdot 10^{-2}$ M proizveli sisteme za koje je identifikacijom, primenom metode difrakcije x-zraka, pokazano da sadrže čisti hidroksiapatit.



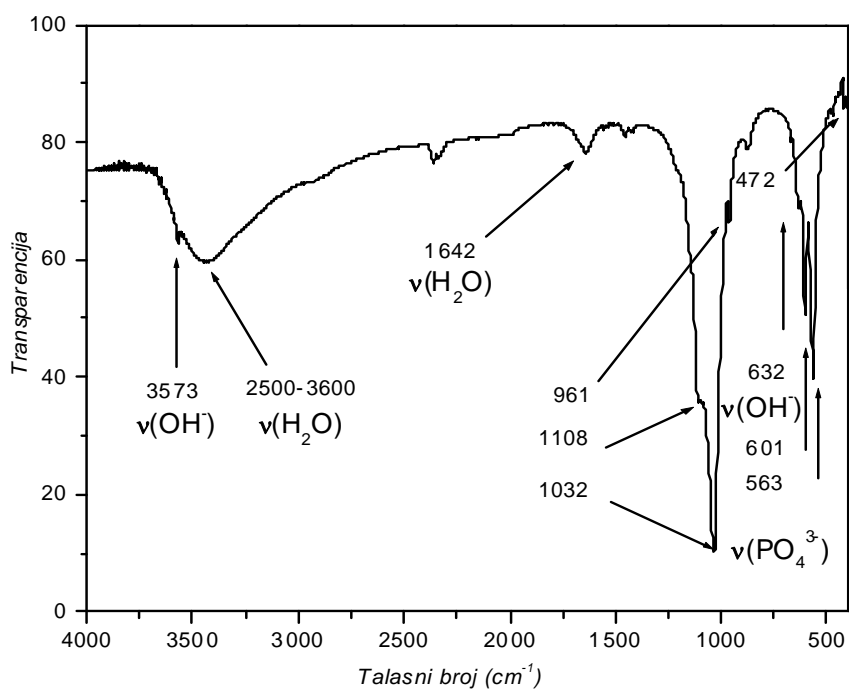
Slika 4.3: SEM mikrografije monofaznih apatitnih čestica sintetisanih u prisustvu različite koncentracije uree koja je iznosila : (a) $3 \cdot 10^{-2}$ M (uzorak 5) i (b) $2 \cdot 10^{-2}$ M (uzorak 4).

SEM mikrografije ovih uzoraka predstavljene su na slici 4.3. Slika 4.3a predstavlja morfologiju čestica hidroksiapata sintetisanog u prisustvu veće koncentracije uree od $3 \cdot 10^{-2}$ M dok slika 4.3b predstavlja morfologiju čestica sintetisanih u prisustvu manje koncentracije uree od $2 \cdot 10^{-2}$ M. Na osnovu ovih slika može se primetiti pločasta morfologija čestica hidroksiapatita. Ove pločice su u oba slučaja mikronskih dimenzija. Oblik dobijenih pločastih struktura je dosta pravilniji u slučaju uzorka sintetisanog u prisustvu niže koncentracije uree (slika 4.3 b). Ovi rezultati dodatno upućuju na povezanost koncentracije uree korišćene u procesu homogene sonohemijske precipitacije hidroksiapatita sa veličinom dobijenih kristala.

Prikazani rezultati omogućili su usmeravanje daljeg toka eksperimentalnog rada ka detaljnijoj analizi sistema sintetisanog u prisustvu koncentracije uree za koju je određeno da predstavlja minimalnu koncentraciju ($2 \cdot 10^{-2}$ M) koja je pri korišćenim uslovima bila neophodna za dobijanje monofaznog hidroksiapatita i čija morfologija je izgrađena iz čestica manjih dimenzija i sa manjom veličinom kristalita.

(b) Infracrvena spektroskopija (IC)

Uzorak sintetisan u prisustvu minimalne granične koncentracije uree dalje je karakterisan metodom infracrvene spektroskopije. Odgovarajući IC spektar predstavljen je na slici 4.4. Primećena je pojava PO_4^{3-} karakterističnih traka na položajima: 472, 583, 601, 961, 1032 i 1108 cm^{-1} .^[241] Traka na 472 cm^{-1} odgovara ν_2 savijajućoj vibraciji. Trostruko degenerisana ν_4 savijajuća vibracija pripisana je trakama na 583 i 601 cm^{-1} . Traka na 961 cm^{-1} odgovara ν_1 , a trake na 1032 i 1108 cm^{-1} ν_3 vibracijama PO_4^{3-} grupe. Traka slabog intenziteta na 874 cm^{-1} (ν_2) i bimodalni pikovi na 1415 (ν_3) i 1455 cm^{-1} (ν_3) odgovaraju vibracijama CO_3^{2-} grupe.^[242] Pojava ovih traka ukazuju na supstituciju PO_4^{3-} grupe apatita CO_3^{2-} grupama, odnosno na formiranje hidroksiapatita sa karbonatima (tip B). Široka traka veoma velikog intenziteta u opsegu od 2500 do 3600 cm^{-1} potiče od ν_3 i ν_1 istežućeg moda molekula vode, dok traka na 1642 cm^{-1} potiče od ν_2 savijajućeg moda ovog molekula.^[243] Sa druge strane, oštar pik na 3573 cm^{-1} odgovara istežućim vibracijama OH^- grupe, dok traka na 632 cm^{-1} odgovara ometenoj rotaciji O-H grupe.^[243] Položaji svih detektovanih traka kao i njihova asignacija sumirani su u tabeli 4.2.



Slika 4.4: IC spektar uzorka 5 sintetisanog u prisustvu granične koncentracije uree od $2 \cdot 10^{-2}$ M na kome su naznačene identifikovane trake hidroksiapatita

Tabela 4.2: Asignacija traka detektovanih u IC spektru hidroksiapatita

Grupa	Talasni broj vibracije (cm ⁻¹)		
PO ₄ ³⁻	472 (v ₂)	601 (v ₄)	1032 (v ₃)
	583 (v ₄)	961 (v ₁)	1108 (v ₃)
OH ⁻	3573		632
H ₂ O	2500-3600 (v ₁),(v ₃)		1642 (v ₂)
CO ₃ ²⁻	874 (v ₂)	1415 (v ₃)	1455 (v ₃)

4.1.2 Strukturna analiza sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita

Rezultujući difraktogram hidroksiapatita sintetisanog primenom homogene sonohemijske precipitacije u prisustvu minimalne potrebne koncentracije agensa homogene precipitacije ($2 \cdot 10^{-2}$ M), pokazao je da je uzorak monofazan, odnosno da nema drugih difrakcionih maksimuma izuzev onih koji odgovaraju strukturi hidroksiapatita (videti prethodno poglavlje, slika 3.3d). Dalja analiza ovako dobijenog hidroksiapatita urađena je Ritveldovim utačnjavanjem strukture i mikroskopskom analizom (TEM).

(a) Ritveldova analiza

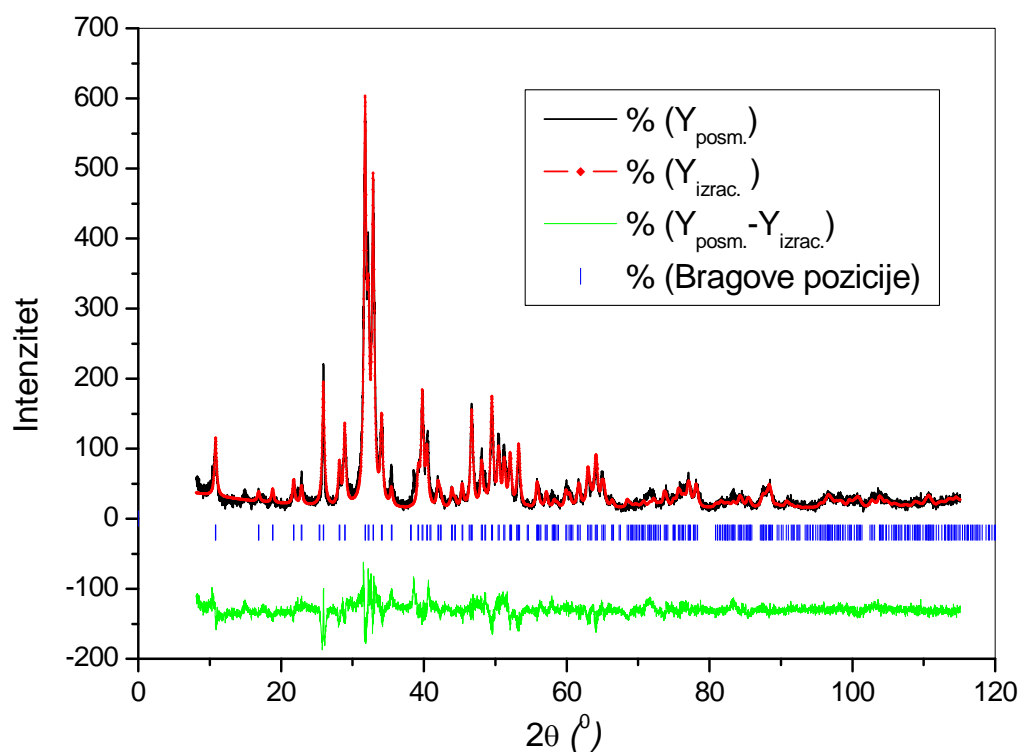
Struktura sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita utaćnjena je, primenom Ritveldove metode, u prostornoj grupi $P_{6/m}$ (176. grupa simetrije) (slika 4.5) sa sledećom pozicijom jona: OH^- jonu je odgovarala $4e$ $[0,0,z]$ kristalografska pozicija sa $3m$ lokalnom simetrijom; P^{5+} je lokalizovan na $6h$ $[x,y, \frac{1}{4}]$ kristalografskoj poziciji sa lokalnom simetrijom m ; Ca^{2+} jonu su odgovarale dve kristalografske pozicije- jedna na $6h$ $[x,y, \frac{1}{4}]$ sa lokalnom simetrijom m i druga na poziciji $4f$ $[\frac{1}{3}, \frac{2}{3}, z]$ sa $4f$ lokalnom simetrijom; O^{2-} je lociran na dvema različitim $6h$ $[x,y, \frac{1}{4}]$ pozicijama sa lokalnom simetrijom m , i na opštoj kristalografskoj poziciji $12i$ $[x,y,z]$ sa lokalnom simetrijom 1 . Atomske parametri, fiksne i utaćnjene atomske koordinate predstavljeni su u tabeli 4.3. Bragov R_B faktor iz ove tabele potvrđuje kvalitet utaćnjenih vrednosti obzirom na dobijenu vrednost koja je ispod 10%. Ternalni B faktori pokazuju uobičajene vrednosti. One su u skladu sa jonskim/atomskim dijametrima, odnosno imaju veće vrednosti za lakše i manje za teže jone).

Tabela 4.3: Pozicije jona i utaćnjeni parametri sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita (uzorak 5).

	x	y	z	B (Å^2)
Ca^{2+} (4f)	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{3}$	0.0137(6)	0.78(3)
Ca^{2+} (6h)	0.2369(2)	0.9840(3)	$\frac{1}{4}$	0.78(3)
P^{5+} (6h)	0.3885(1)	0.3671(1)	$\frac{1}{4}$	0.91(1)
O^{2-} (2) (6h)	0.3989(2)	0.5097(3)	$\frac{1}{4}$	2.78(8)
O^{2-} (1) (6h)	0.6674(3)	0.4896(2)	$\frac{1}{4}$	2.78(8)
O^{2-} (3) (12i)	0.3488(2)	0.2791(2)	0.0576(2)	2.78(8)
OH^- (3m)	0.00000	0.00000	0.1928 (8)	2.78(8)
	$R_B=8.2\%$			

Utaćnjene vrednosti strukturnih parametara jedinične ćelije rešetke su $a = 0.94330(4)$ nm, $c=0.68765(3)$, dok je izračunata vrednost zapremine jedinične ćelije $0.5304(4)$ nm³. Poređenjem ovih podataka sa ekvivalentnim vrednostima u standardnim, visoko čistim materijalima ^{[245],[246],[247]} moguće je primetiti manje povećanje parametra rešetke u pravcu c-ose i smanjenje parametra u pravcu a-ose što je pregledno dato u tabeli 4.4. Ove promene prouzrokuju povećanje zapremine jedinične ćelije. Parametri rešetke HAp-a dobijenog iz

različitih prirodnih izvora i sintetskih metoda u poređenju sa ultrazvučno sintetisanim pokazuju povećanje oba parametra.^[248]



Slika 4.5: Grafički prikaz rezultata Ritveldove metode: eksperimentalni (—% $Y_{posm.}$), izračunat (---% $Y_{izrac.}$) i rezultati (—% $Y_{posm.} - Y_{izrac.}$) razlike difrakcionih podataka (/ % Bragove pozicije).

Tabela 4.4: Strukturni parametri jedinične ćelije rešetke odgovarajućih standarda i sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita

Uzorak	a (nm)	c (nm)
HAp-SRM ³	0.94238(9)	0.68854(6)
HAp-SRM ⁴	0.94244(2)	0.68854(2)
HAp-SRM ⁵	0.94174(2)	0.68853(2)
HAp ⁶	0.94330(4)	0.68765(3)

³ Ref. [245]

⁴ Ref. [246]

⁵ Ref. [247]

⁶ Rezultati utučnjavanja strukture sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita (uzorak5)

Mikrostrukturna analiza bazirana na utačnjenim strukturnim parametrima kao ulaznim podacima dala je vrednosti veličine kristalita za svaku pojedinačnu refleksiju sa ciljem da se radi veće preciznosti uzme u obzir vrednost anizotropnog širenja pikova. Neke od najznačajnijih izračunatih vrednosti predstavljene su u tabeli 4.5.

Tabela 4.5: Mikrostrukturni parametri utačnjeni primenom Ritveldove metode

2θ (°)	D_{hkl}^7 (nm)	hkl
10.8172	11.6	010
16.8274	6.4	101
18.7922	10.5	110
21.7322	13.5	200
22.8325	9.8	111
25.3279	8.1	021
25.8682	15.7	002
28.8818	12.8	210
28.1117	15.0	012
35.4097	7.0	031
39.1571	9.6	212
41.9307	7.3	131

Najveća prosečna vrednost veličine kristalita odgovara pravcu duž c-ose i ima vrednost $D_{002} = 15.7$ nm dok vrednost veličine kristalita u pravcu normalnom na pravac c-ose. D_{110} iznosi 10.2 nm. Odnos vrednosti veličine kristalita duž c-ose (D_{002}) i u pravcu a-b ravni (pravcu normalnom na c-osu) (D_{002}) ima sledeću vrednost: $R(D_{hkl}) = D_{002} / D_{110} = 1.5$. Ovaj odnos je manji u poređenju sa standardima^[245]. Obzirom na to da je vrednost $R(D_{hkl})$ manja od 2, može se reći da su čestice sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita cilindričnog (štapicaastog) oblika. Ovaj rezultat je kasnije potvrđen i mikroskopskom analizom. Prosečna vrednost veličine kristalita i standardna devijacija (anizotropija) su takođe izračunate. Dobijena srednja vrednost veličine kristalita je oko 10 nm, dok je izračunata vrednost anizotropije 3 nm. Izračunata vrednost veličine kristalita u pravcu preferentnog kristalnog rasta, tj. duž c-ose, je 16 nm.

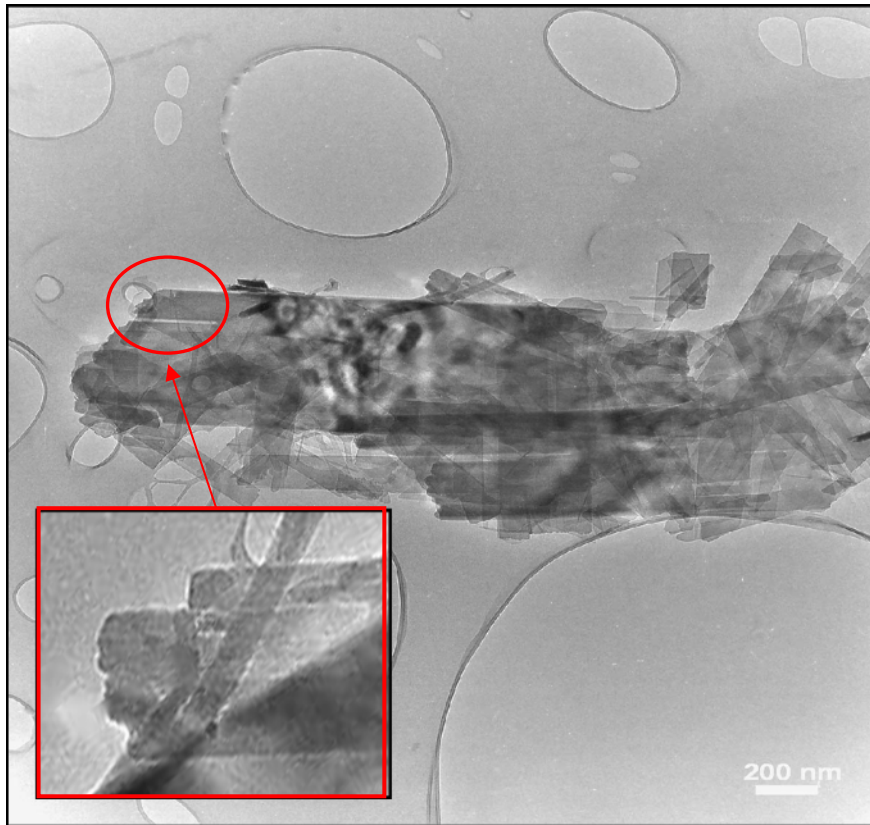
⁷ Veličina kristalita individualnih refleksija

(b) Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Dalja analiza čestica hidroksiapatita dobijenog homogenom sonohemijskom precipitacijom urađena je pomoću transmisione elektronske mikroskopije (TEM). Ova analiza je urađena u cilju ispitivanja veličine i morfologije sonohemijski sintetisanih čestica hidroksiapatita sa jedne strane, kao i prostorne organizacije ovih čestica sa druge strane. U skladu sa tim, prikazane su TEM mikrografije uzorka hidroksiapatita sa različitim uvećanjem kako bi omogućila posmatranje i analizu morfologije čestica od veće ka manjoj skali veličina.

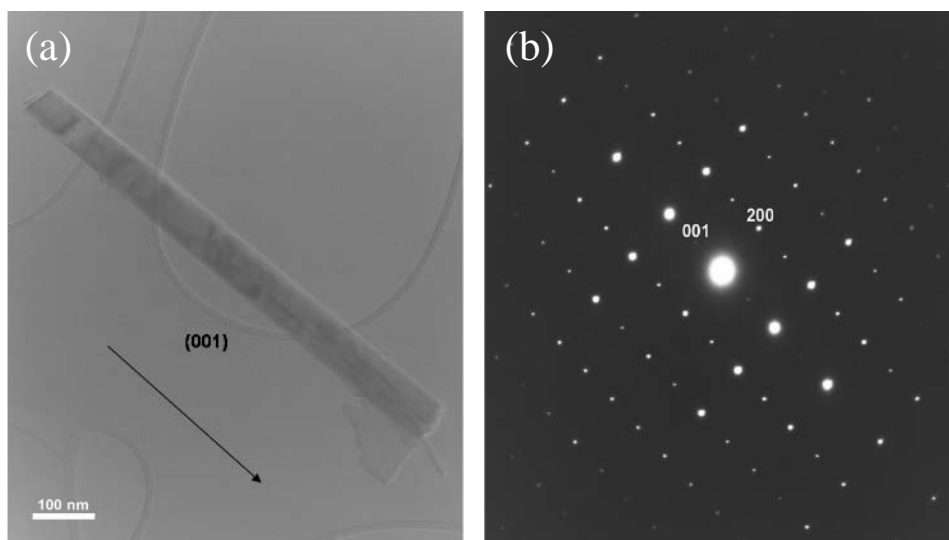
TEM mikrografija sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita predstavljena je na slici 4.6. Ova slika je snimljena na nešto manjem uvećanju kako bi predstavila morfologiju većeg dela uzorka. Insert na ovoj slici predstavlja deo iste mikrografije koji se odnosi na uvećani segment slike koji predstavlja ivicu strukture koja se sa ove slike može videti. Ovaj insert je dodat u cilju lakšeg zapažanja i isticanja primećene prostorne organizacije čestica.

Na slici 4.6 uočena je najpre veličina i oblik detektovanih čestica apatita. Kao što je moguće primetiti, najveći deo uzorka izgrađen je iz nanočestica štapičaste forme. Sintetisani nanoštapići hidroksiapatita imaju prosečnu širinu od oko 100 i dužinu od oko 500 nm. Ovi kristali su prilično homogene širine i geometrijski pravilnog oblika. Nakon toga, uočena je prostorna organizacija štapića. Primećen je zanimljiv vid pravilnosti u uzajamnom položaju ovih štapića. Ova pravilnost ogleda se u tome da je većina ovih nanoštapića orijentisana u istom pravcu, usko bočno povezana i gradi pločaste strukture (videti insert na slici 4.6) koje podsećaju na pločaste suprastrukture koje je bilo moguće videti na SEM mikrografijama (videti prethodno poglavlje, slika. 4.3).



Slika 4.6: TEM mikrografija sonohemijski sintetisanih štapićastih kristala hidroksiapatita. Umetnuti insert predstavlja uvećani segment ivice strukture koji je na slici zaokružen.

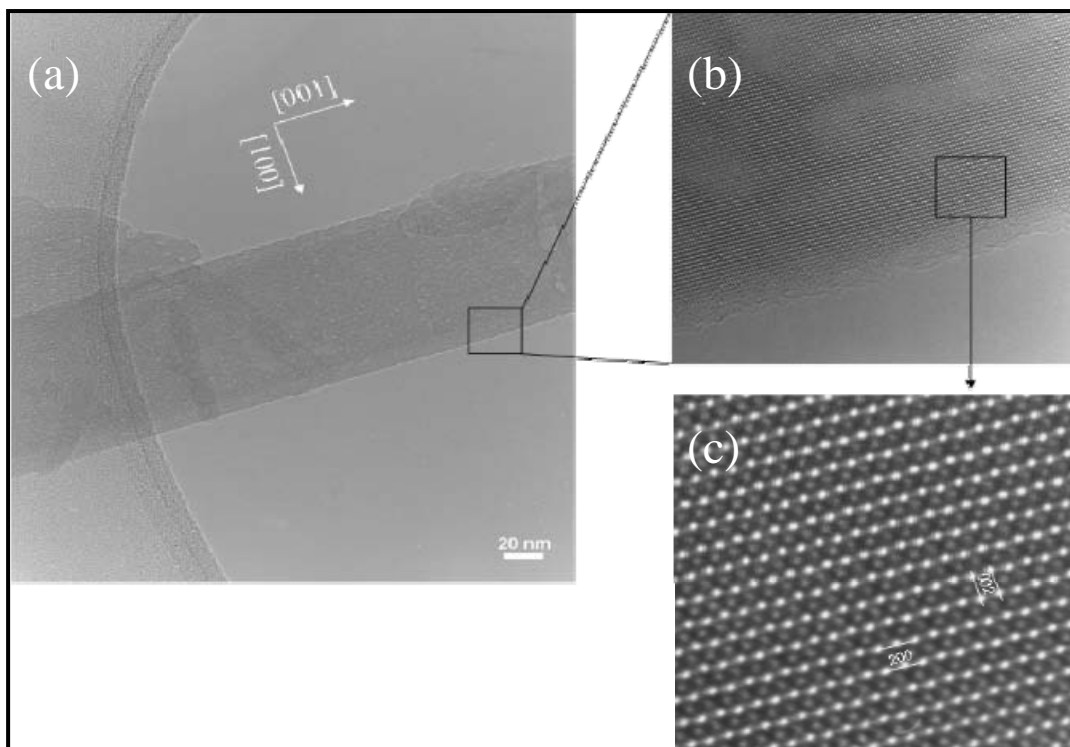
Strukturalna analiza sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita urađena je elektronskom difrakcijom u slučajno izabranoj tački. Elektronska difrakcija urađena je u nekoliko različitih slučajno izabranih tačaka duž jednog štapića apatita. Slika 4.7 predstavlja TEM mikrografiju pojedinačnog štapića hidroksiapatita (a) i grafik elektronske difrakcije koja je na njemu rađena (b). Sa grafika elektronske difrakcije identifikovane su [001] i [200] kristalografske orijentacije ravni koje odgovaraju strukturi hidroksiapatita. Kristalografski pravac [001] je paralelan pravcu c-ose i normalan na [200] pravac koji leži u ravni a-b osa heksagonalnog hidroksiapatita. Dakle, nanoštapići imaju heksagonalnu strukturu hidroksiapatita, prema pozicijama i recipročnim interplanarnim rastojanjima, kao i anizotropan rast sa preferentnim pravcem rasta duž c-ose. Na slici 4.7 ovaj preferentni pravac rasta naznačen je strelicom. Grafik elektronske difrakcije pokazuje oštre difrakcione tačke bez difuznih zamućenja što je indikacija dobro uređene monokristalne strukture hidroksiapatita.



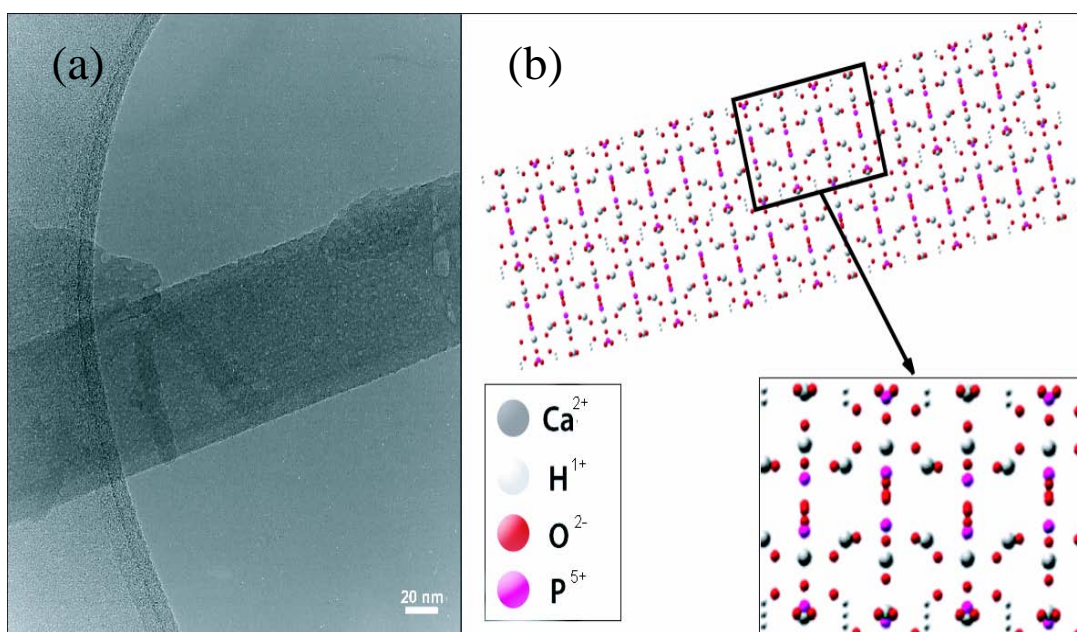
Slika 4.7: TEM mikrografija (a) i grafik elektronske difrakcije (b) pojedinačnog nanoštapića hidroksiapatita sintetisanog homogenom sonohemijskom precipitacijom.

Dobro uređena kristalna struktura sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita dalje je potvrđena visokorezolucionom elektronskom mikroskopijom (HRTEM) koja je omogućila bliži uvid u mikrostrukturu nanoštapića hidroksiapatita. Slika 4.8 predstavlja TEM mikrografiju pojedinačnog nanokristala (a) sa markiranim segmentom koji odgovara HRTEM mikrografijama snimljenim na većim uvećanjima od 500 i 800 hiljada (b i c). Na ovaj način snimljen je veliki broj segmenata duž predstavljenog štapića. Rezultati dobijeni HRTEM-om pokazuju visok stepen uniformnosti, odnosno prilično pravilnu teksturu duž čitavog štapića. Najpre se primećuje veoma dobra organizacija kristalne rešetke i odsustvo defekata. U svim slučajevima d-rastojanja su merena sa ciljem da se identifikuju kristalografske orijentacije detektovanih domena i pravac kristalnog rasta. Interplanarna rastojanja merena na segmentima ovih HRTEM mikrografija bila su 0.47 i 0.34 nm što odgovara interplanarnim rastojanjima [200] i [002] ravni heksagonalnog hidroksiapatita. Imajući u vidu da su u svim segmentima analiziranog štapića detektovana ista intarplanarna rastojanja, može se pouzdano potvrditi da su ovi nanoštapići monokristali heksagonalne strukture hidroksiapatita.

Pravac rasta ovih nanoštapića je paralelan [001] i normalan na [100] kristalografski pravac strukture hidroksiapatita. Radi boljeg razumevanja primećene strukture i kristalnog rasta apatita na slici 4.9 data je ilustracija koja sadrži TEM mikrografiju nanoštapića hidroksiapatita (a) i simuliranu strukturu i pravac kristalnog rasta (b).



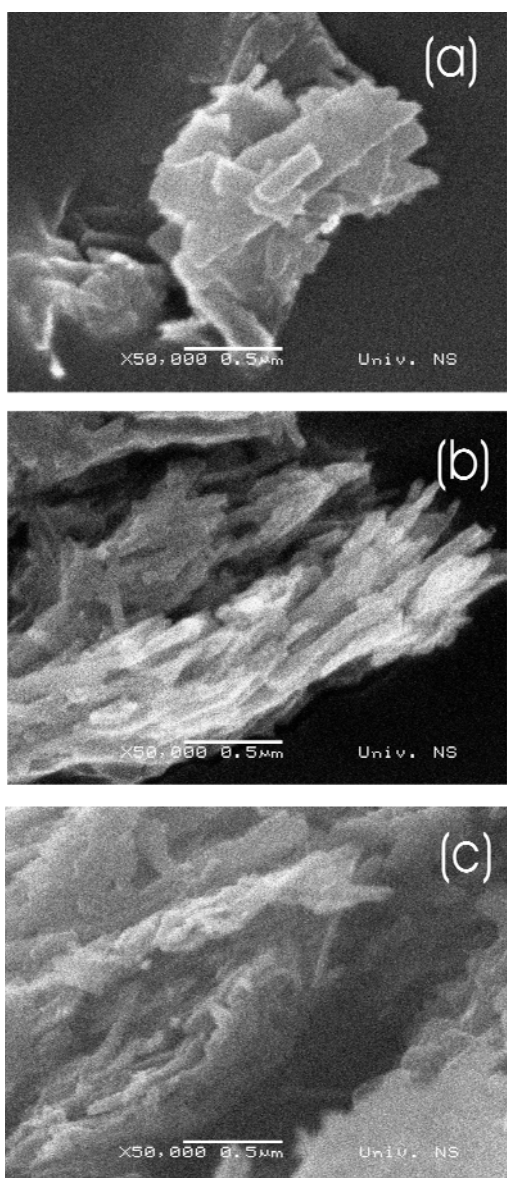
Slika 4.8: TEM mikrografija sonohemijski sintetisanog nanoštapićastog monokristala hidroksiapatita (a), HRTEM mikrografije segmenta monokristala sa 500 (b) i 800 (c) hiljada uvećanjem sa identifikovanim kristalografskim ravnima strukture hidroksiapatita



Slika 4.9: Shematska ilustracija strukture monokristala hidroksiapatita. Sive sfere označavaju Ca, bele H, crvene O i roze P atome. Slika predstavlja dvodimenzionu strukturu duž [100] pravca. Nanoštapići rastu preko [001] kristalne površine heksagonalnog hidroksiapatita.

4.2 Ultrazvučno usitnjavanje čestica hidroksiapatita

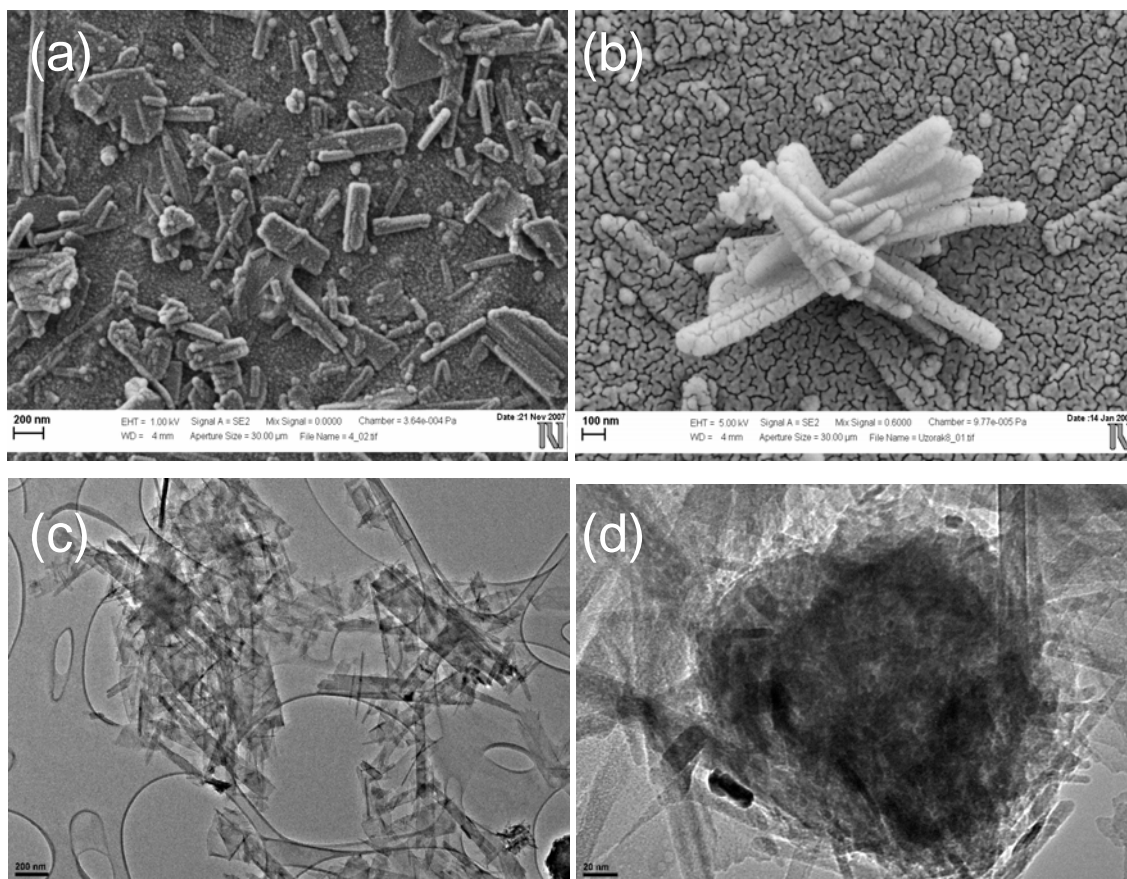
U prethodnom poglavlju je pokazano da se nakon sonohemijske sinteze hidroksiapatita, koji inače ima visoko adhezivnu prirodu, pored preferentnog rasta duž [001] kristalografskog pravca javlja i lateralno povezivanje štapića i formiranje pločastih struktura. Iz tog razloga u narednom delu eksperimenata pokušano je da se tretmanom u prisustvu visoko-intenzitetskog ultrazvučnog polja (600W, 80% amplitude, radni i relaksacioni režimi= 02:01 s) i male zapremine inertnog tečnog medijuma smanji stepen aglomeracije nanoštapića apatita.



Struktura ovako tretiranih čestica predstavljena je na slici 4.10. Na ovoj slici predstavljene su čestice hidroksiapatita tretiranog poljem ultrazvuka u trajanju od (a) 10, (b) 20 i (c) 30 minuta. Sa slika se jasno može primetiti postepena promena morfologije sa dužinom tretiranja ultrazvučnim poljem.

Naime, vidi se da se nakon pločastih struktura većih, mikronskih dimenzija predstavljenih na slici 4.3 (videti poglavlje 4.1.1), ultrazvučnim tretiranjem uzorka u trajanju od 10 minuta prelazi na pločaste strukture manjih dimenzija (širine u intervalu od ~200 do 400 nm i dužine od ~400 do 600 nm) i geometrijski pravilnijeg oblika (slika 4.10a). Ova struktura se zatim nakon tretiranja ultrazvučnim poljem u trajanju od dodatnih 10 minuta drastičnije menja i prelazi u štapičastu formu. Glavna promena ogleda se u smanjenju širine sintetisanih štapića (~do 100 nm) (slika 4.10b). Dodatno tretiranje poljem ultrazvuka do ukupnih 30 minuta dalje menja morfologiju do igličastih formacija kraće dužine (~do 300 nm) i manje širine (do ~50 nm) (slika 4.10c).

Slika 4.10: SEM mikrografije ultrazvučno sitnjenih čestica hidroksiapatita poljem snage 600 W. amplitudom od 80 %, on : off režimom u trajanju od 02 : 01 s i vremenom tretiranja (a) 10 min., (b) 20 min. i (c) 30 min u inertnom etanolnom medijumu zapremine 10 ml.



Slika 4.11: FE SEM mikrografije HAp-a: nakon (a) 10 min. i (b) 20 min. sitnjenja; TEM mikrografije HAp-a: nakon 10 min. sitnjenja (c) i (d) u visoko-intenzitetskom polju ultrazvuka.

Uočene promene dimenzija suprastruktura hidroksiapatita daleko je jasnije moguće primetiti na uzorcima koji su pripremani na polikarbonatnim membranama (videti odeljak 3.4.2 e) i predstavljeni FE SEM mikrografijama snimljenim na duplo većem uvećanju i sa mnogo boljom rezolucijom (slike 4.11a,b). Na ovim slikama predstavljena je morfologija čestica hidroksiapatita nakon sitnjenja poljem ultrazvuka visokog intenziteta u trajanju od 10 min. (slika 4.11a) i 20 min. (slika 4.11b). Ove slike pokazuju promenu morfologija od pločastih struktura, širine od 200 do 400 nm i dužine od 400 do 600 nm (slika 4.11a), do štapićastih struktura dužine 400 do 600 nm i širine do 100 nm (4.11b).

Struktura pločastih formacija koje se dobijaju nakon ultrazvučnog sitnjenja apatita u trajanju od 10 min. dalje je analizirana transmisionom mikroskopijom (slike 4.11 c i d). Sa ovih slika je moguće primetiti da su i štapići koji grade pločaste strukture znatno manjih dimenzija koje se kreću od 200 do 600 nm dužine i čak 10 do 60 nm širine, kao i činjenicu da su štapići većih dimenzija i dalje bočno spojeni.

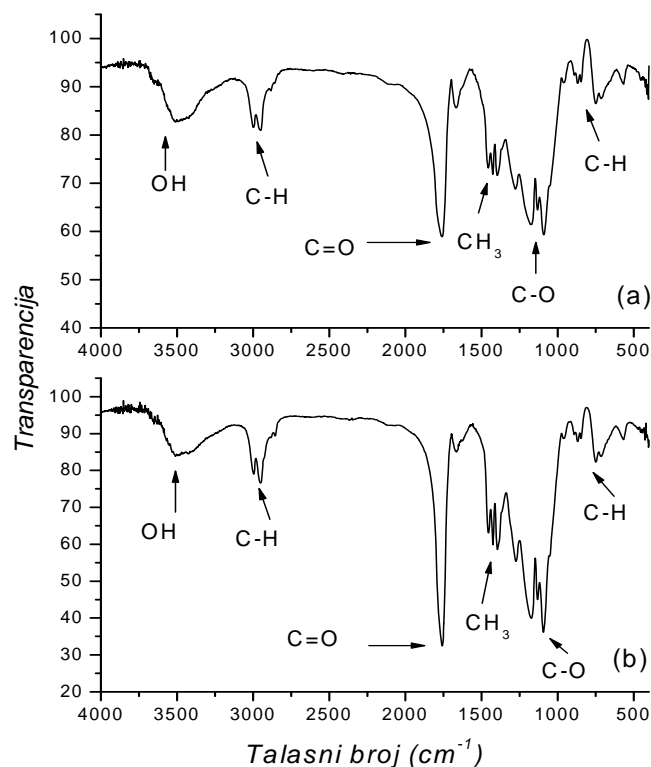
4.3 Ultrazvučno procesiranje poli(d,l-laktid-ko-glikolida)

Obzirom na činjenicu da je poli(d,l-laktid-ko-glikolid), koji je korišćen za dobijanje kompozita, veoma osetljiv i podložan degradaciji pod uticajem različitih faktora kao što je na primer povišena temperatura, bilo je vrlo važno ispitati njegovo ponašanje pri dejstvu korišćenih snaga ultrazvučnog polja. Glavni razlog za to je i taj što je, prema literaturnim podacima, do sada u svim eksperimentima u kojima je ovaj polimer ultrazvučno procesiran korišćena dosta niža snaga ultrazvučnog polja (32 W) uz nagoveštaje da će se eventualna mogućnost njegovog tretiranja jačim poljem naknadno ispitati.^[196]

Poli(d,l-laktid-ko-glikolid) je u par eksperimenata dalje procesiran poljem visokog intenziteta (50 i 142.5 W) kako bi se najpre proverila mogućnost ovakvog vida procesiranja ovog termički nestabilnog polimera i ustanovila postignuta morfologija čestica. Karakterizacija ultrazvučno procesiranog poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a rađena je infracrvenom spektroskopijom (IC) i skanirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM).

(a) Identifikacija

Identifikacija materijala dobijenih nakon procesiranja poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a u polju ultrazvuka visokog intenziteta rađena je primenom infracrvene spektroskopije. Na slici 4.12 predstavljeni su IC spektri poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a tretiranog snagom ultrazvučnog polja od (a) 50 W i (b) 142.5 W. U prvom slučaju korišćen je kontinualni režim rada polja, dok je u drugom korišćen pulsni režim sa periodom rada od 1 s i relaksacije od 4 s. Ovi spektri pokazuju prisustvo svih karakterističnih traka vibracija grupa poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a. Trake na 2998, 2950 i 2853 cm^{-1} odgovaraju ν_1 istežućim vibracijama C-H grupe, dok se trake na 751 i 710 cm^{-1} odnose na ν_2 savijajuće vibracije iste grupe. Intenzivna, oštra traka na 1762 cm^{-1} odgovara vibracijama C=O grupe. Trake na 1455, 1423 i 1397 cm^{-1} pripadaju vibracijama CH₃ grupe. Apsorpcione trake istežućih vibracija C-O grupe koje se nalaze na talasnim brojevima: 1273, 1174, 1130 i 1094 cm^{-1} .^{[34],[35]} Dodatne trake grupa koje pripadaju PVP-u koji je korišćen kao stabilizator, kao ni trake koje bi ukazivale na dodatne produkte koji su mogli nastati u toku ultrazvučnog procesiranja nisu registrovane, što je indikacija da je stabilizator ostao u supernatantu i na taj način bio isključen iz sistema nakon sinteze, kao i da je poli(d,l-laktid-ko-glikolid) ostao hemijski stabilan. Detektovane trake sumirane su u tabeli 4.6.



Slika 4.12: Infracrveni spektri čistog polimera tretiranog ultrazvučnim poljem snage (a) 50 W i (b) 142.5 W

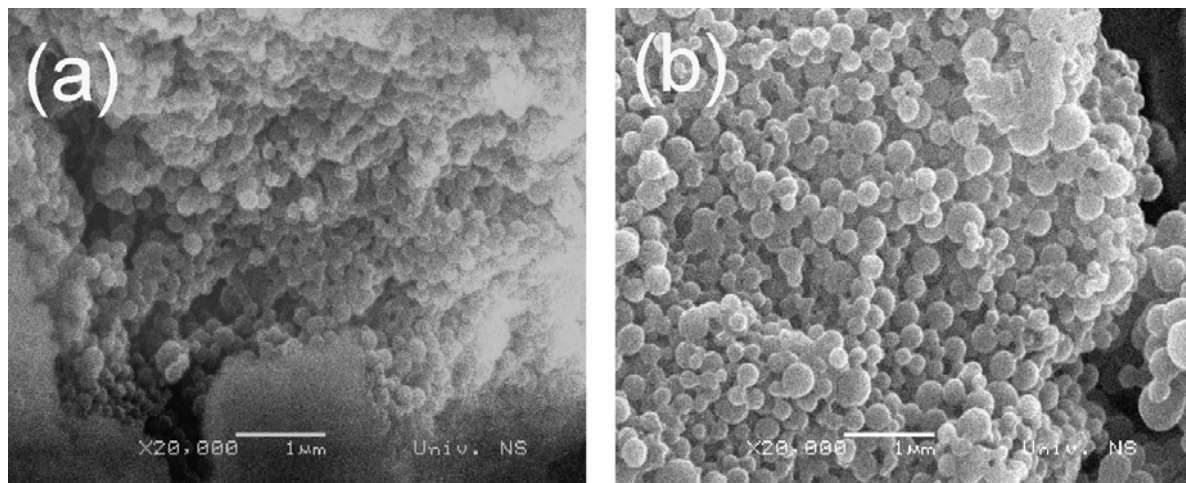
Tabela 4.6: Asignacija traka u IC spektru DLPLG kompozita

Grupa	Talasni broj vibracije (cm ⁻¹)		
CH	2998 (v ₁)	2950 (v ₁)	2853 (v ₁)
	751 (v ₂)		710 (v ₂)
CH ₃	1455	1423	1397
C=O	1762		
C-O	1273		1173
	1130		1099

(b) Morfološka analiza

Obzirom da je identifikacija poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a procesiranog poljem ultrazvuka potvrđena, sledeći korak je bilo ispitivanje morfologije sintetisanih čestica. SEM mikrografije ovih uzoraka predstavljene su na slici 4.13. Slika 4.13(a) predstavlja poli(d,l-laktid-ko-glikolid) tretiran poljem snage 50 W, dok je u slučaju (b) kopolimer tretiran poljem snage 142.5 W. Rezultati pokazuju da je u oba slučaja postignut sferan oblik sintetisanih čestica. Ove sfere su pravilnog oblika i bez znakova morfoloških oštećenja. Kada je u pitanju njihova

veličina, može se primetiti da su veoma malih dimenzija koje se kreću od 100 do 200 nm. Glavna razlika je u tome što je u slučaju veće primenjene snage polja postignuta uža raspodela veličine čestica, ali pomerena ka većim veličinama čestica.



Slika 4.13: SEM mikrografije poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a ultrazvučno procesiranog u polju snage (a) 50 W i (b) 142.5 W

4.4 Formiranje DLPLG/HAp kompozita u polju ultrazvuka

U poglavlju 4.3 pokazana je morfologija čestica hidroksiapatita nakon deaglomeracije u visoko-intenzitetskom polju ultrazvuka, dok je u poglavlju 4.4 pokazana mogućnost procesiranja DLPLG polimera visoko-intenzitetskim poljem ultrazvuka bez hemijske razgradnje, formiranja neželjenih produkata i bez morfoloških oštećenja. Cilj narednog bloka eksperimenata bio je ispitivanje mogućnost primene ultrazvučnog polja za oblaganje ovako usitnjenih čestica hidroksiapatita polimerom (DLPLG) radi očuvanja njihovih dimenzija kao i za formiranje sfernih čestica kompozitnog materijala (DLPLG/HAp) nanometarskih dimenzija. U okviru toga urađena je optimizacije različitih eksperimentalnih parametara kako bi se postigla željena morfologija. Analizirani su sledeći parametri:

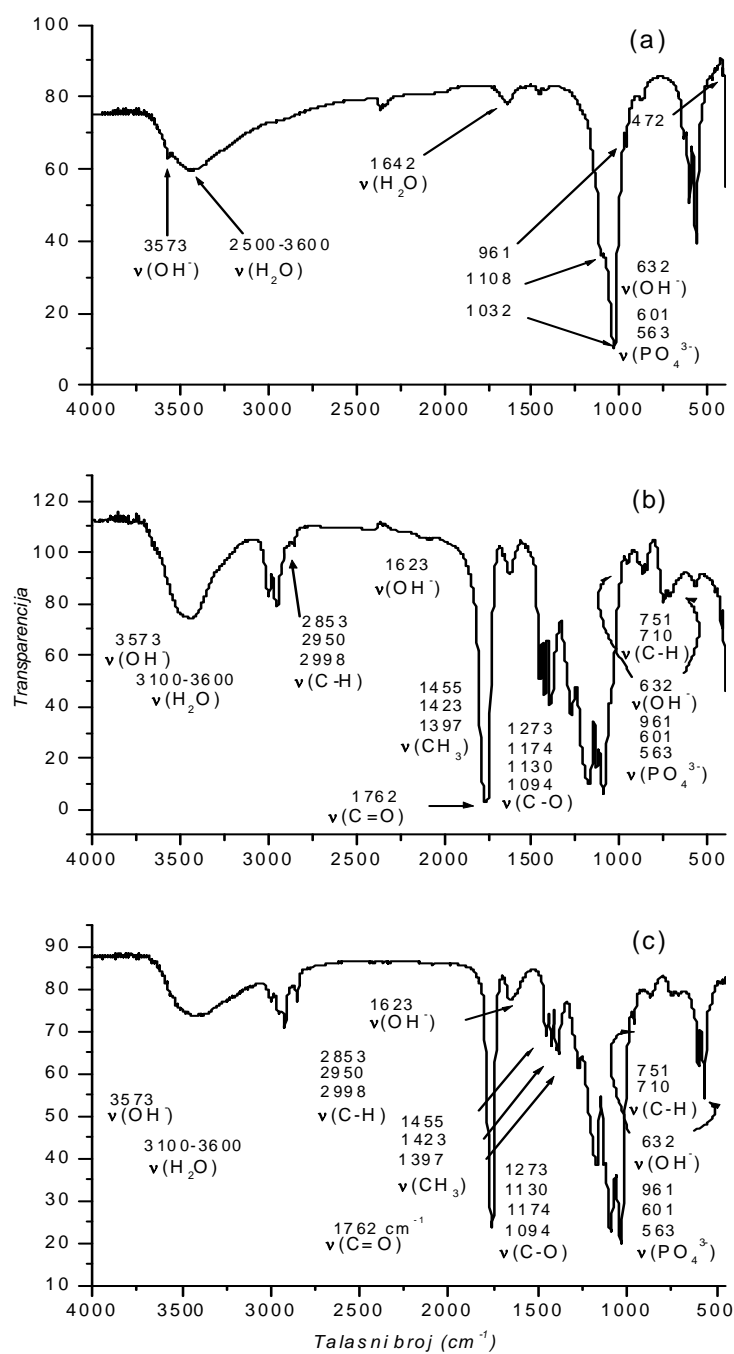
- Uticaj snage ultrazvučnog polja
- Uticaj udela polimerne i keramičke komponente u kompozitu
- Uticaj temperature medijuma
- Uticaj stabilizatora
- Uticaj redosleda koraka pri formiranju kompozita

4.4.1 DLPLG/HAp kompozitni materijal sa različitim sadržajem polimerne i keramičke faze

Kompozitni materijal poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit (DLPLG/HAp) je formiran u dva ključna koraka: (a) ultrazvučnim sitnjenjem hidroksiapatita sintetisanog metodom homogene sonohemijske precipitacije i (b) oblaganjem tako usitnjenog apatita polimerom u polju ultrazvuka. Na ovaj način sintetisan je kompozit sa dva različita sadržaja polimerne i kompozitne faze (uzorci 1 i 2 u tabeli 3.2) i njihova identifikacija je urađena primenom infracrvene spektroskopije i difrakcije x-zraka.

(a) Infracrvena spektroskopija

Identifikacija ovih materijala, čiji je cilj bio potvrđivanje prisustva organske i neorganske faze, tj. poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a i hidroksiapatita urađena je najpre pomoću infracrvene spektroskopije. Odgovarajući IC spektri dati su na slici 4.14: slika 4.14a predstavlja IC spektar čistog apatita (dodat radi lakšeg poređenja spektara i jasnije identifikacije), 4.14b IC spektar kompozita sa odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 i 4.14c IC spektar kompozita sa odnosom DLPLG : HAp = 75 : 25. Ovi spektri jasno pokazuju karakteristične trake poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a na 2998, 2950, 2853, 1762, 1455, 1423, 1397, 1273, 1174, 1130, 1094, 751 i 710 cm^{-1} , sa jedne strane, i karakteristične trake HAp-a na 1036, 961, 632, 601, 563 i 472 cm^{-1} , sa druge strane. Trake na 2998, 2950 i 2853 cm^{-1} odgovaraju ν_1 istežućim vibracijama C-H grupe, dok se trake na 751 i 710 cm^{-1} odnose na ν_2 savijajuće vibracije iste grupe. Intenzivna, oštra traka na 1762 cm^{-1} odgovara vibracijama C=O grupe. Trake na 1455, 1423 i 1397 cm^{-1} pripadaju vibracijama CH_3 grupe. Apsorpcioni pikovi istežućih vibracija C-O grupe lokalizovani su na 1273, 1174, 1130 i 1094 cm^{-1} .^{[34],[35]} Karakteristične trake PO_4^{3-} grupe (što je moguće jasnije videti na spektru čistog apatita na slici 4.14a) javljaju se na 472, 563, 601, 961 i 1032 cm^{-1} .^[241] Traka na 472 cm^{-1} odgovara ν_2 , dok trake na 563 i 601 cm^{-1} odgovaraju ν_4 savijajućim vibracijama ove grupe. Traka na 961 naznačena je kao ν_1 simetrična istežuća vibracija, dok traka na 1032 cm^{-1} odgovara ν_3 vibraciji P-O grupe. Široka, jaka traka koja se proteže od 3100 do 3700 cm^{-1} i traka na 1623 cm^{-1} odgovaraju vibracijama OH grupe vode.^[243] Sa druge strane, oštra traka na 3573 cm^{-1} odgovara istežućoj vibraciji OH^- jona rešetke dok slaba traka na 632 cm^{-1} odgovara ometenoj rotaciji O-H grupe.^[243]

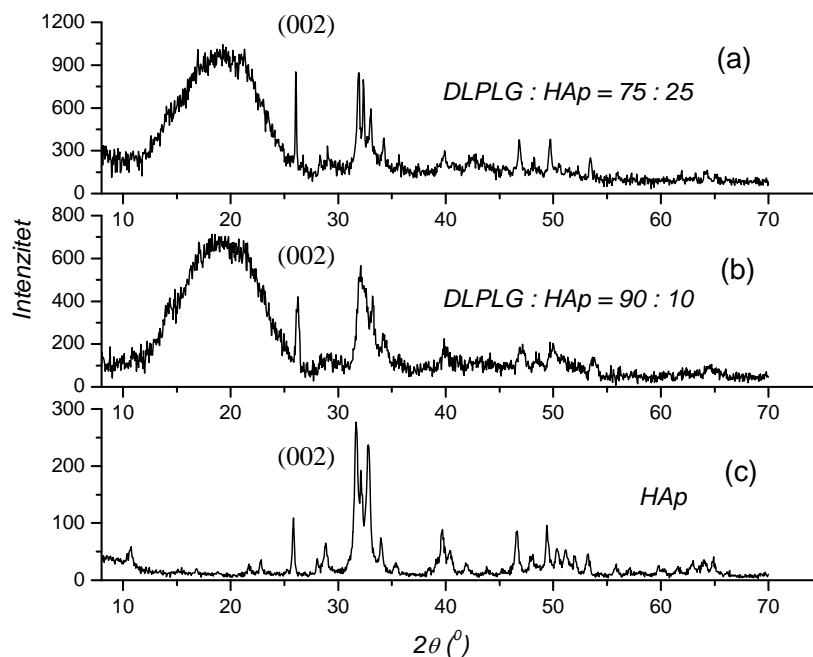


Slika 4.14: IC spektar čistog hidroksiapatita (a), DLPLG/HAp kompozita sa odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 (b) i kompozita sa odnosom DLPLG : HAp = 75 : 25 (c)

(b) Metoda difrakcije x-zraka

Dalja identifikaciona analiza DLPLG/HAp kompozita formiranog u polju ultrazvuka rađena je na osnovu XRD rezultata. Difraktogrami kompozita i čistog apatita prikazani su na

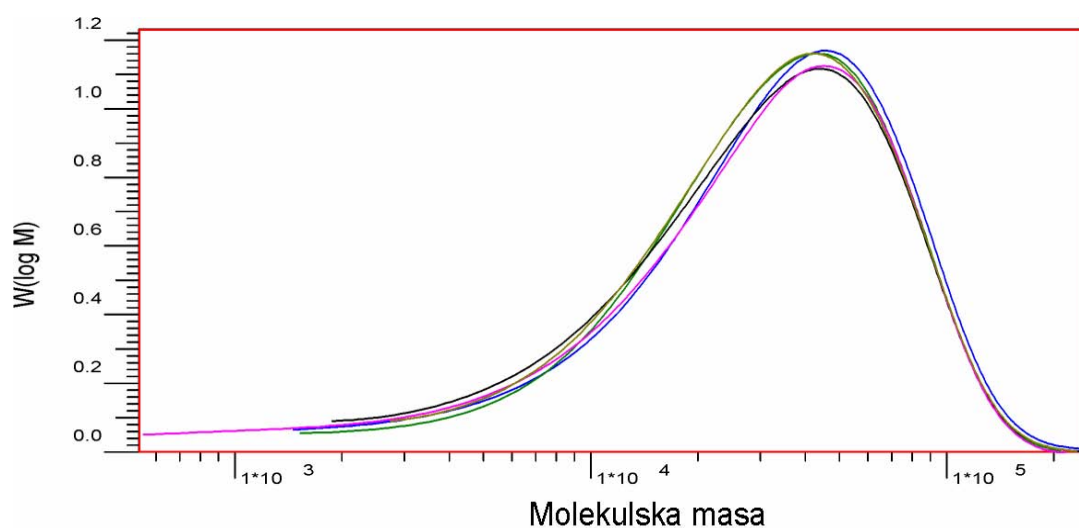
slici 4.15: kompozit sa masenim odnosom DLPLG : HAp jednakim 75 : 25 (a) i sa masenim odnosom 90 : 10 (b) kao i čistog hidroksiapatita (c). Rezultujući difraktogrami kompozitnih materijala pokazuju prisustvo dve različite faze. Polimerni deo ovog nanostrukturnog kompozita je većinom amorfna faza i ima vrlo nisku kristaliničnošću sa karakterističnim, širokim difrakcionim maksimumom na 2θ oko 20° [249],[250],[251]. Sa druge strane, svi ostali oštri pikovi, koji ukazuju na fazu sa mnogo boljom kristalnošću, identifikovani su kao difrakcioni maksimumi hidroksiapatita. Identifikacija hidroksiapatita rađena je na osnovu poređenja sa ICPDS bazom podataka (kartica broj 240033) i postignuto je veoma dobro slaganje. Poređenje veličina kristalita, dobijenih pomoću širine na polovisini pika (002) (slika 4.15), uz primenu Scherrer-ove formule za sva tri difraktograma, pokazalo je različite vrednosti. Na žalost, na ovaj način nije moguće precizno odrediti veličinu kristalita HAp-a u kompozitu (zbog preciznosti određivanja bazne linije), ali se procenjene vrednosti mogu međusobno porediti. Ove vrednosti ukazuju na najveću veličinu kristalita u čistom apatitu, nešto manju vrednost u kompozitu sa nižim i najmanju vrednost u kompozitu sa višim sadržajem polimera.



Slika 4.15: Difraktogrami kompozita sa odnosom DLPLG : HAp = 75:25 (a) i 90:10 (b) i čistog hidroksiapatita (c)

(c) Gel-propusna hromatografija (GPH)

Primena prethodnih metoda omogućila je identifikaciju kompozitnog materijala. U daljem radu bilo je neophodno ispitati da li i u kojoj meri primenjeno visoko-intenzitetsko polje ultrazvuka uzrokuje promenu srednjih molekularnih masa kopolimera kako u čistom DLPLG polimeru tretiranom poljem ultrazvuka na različitim temperaturama (8 i 25 °C), tako i u DLPLG/HAp kompozitnom materijalu sa udelom polimera i keramike (90:10) dobijenim na različitim temperaturama (8 i 25 °C). Krive raspodela molekularnih masa ovih uzoraka predstavljene su na slici 4.16. Rezultati srednjih vrednosti molekularnih masa i polidisperznosti sumirani su u tabeli 4.7.



Slika 4.16: Rezultati vrednosti raspodela molekularnih masa i njihovih srednjih vrednosti GPH metodom: DLPLG (komercijalni) (—), DLPLG (ultrazvuk, 8 °C) (—), DLPLG (ultrazvuk, 25 °C) (—), DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 25 °C) (—), DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 8 °C) (—).

Tabela 4.7: Vrednosti srednjih molekularnih masa i polidisperznost dobijene GPH metodom

Uzorak	$\overline{M}_w \cdot 10^4$	$\overline{M}_n \cdot 10^4$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
DLPLG (komercijalni)	4.2032	1.7929	2.18
DLPLG (ultrazvuk, 8 °C)	4.0325	1.8821	2.14
DLPLG (ultrazvuk, 25 °C)	3.9549	1.7570	2.25
DLPLG:HAp 90:10 (ultrazvuk, 25 °C)	3.9024	1.1390	3.43
DLPLG:HAp 90:10 (ultrazvuk, 8 °C)	4.0494	2.0728	1.95

(d) Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (NMR C^{13})

Druga metoda koja je korišćena za ispitivanje osobina polimera nakon procesiranja visoko-intenzitetskim poljem ultrazvuka bila je nuklearna magnetna rezonanca (C^{13} -NMR). Obzirom

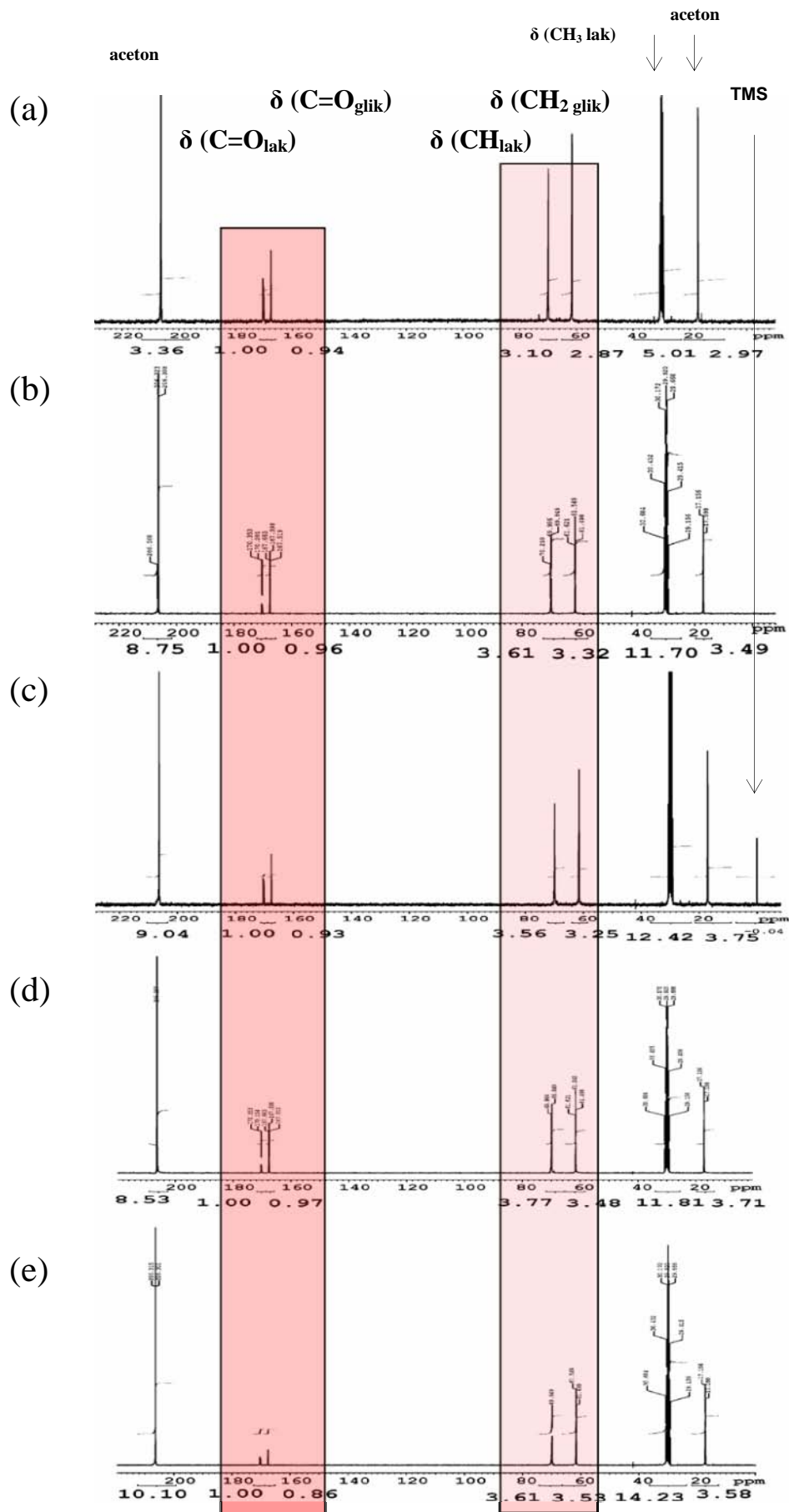
na to da je prethodna metoda korišćena za određivanja degradacije polimera/polimernog dela kompozita i njenog kvantifikovanja, naredna metoda je trebala da odredi odnos laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica u DLPLG polimernim lancima nakon ove degradacije.

C^{13} -NMR spektri ispitivanih uzoraka predstavljeni su na slici 4.17: (a) C^{13} -NMR spektar komercijalnog DLPLG, (b) i (c) C^{13} -NMR spektri DLPLG-a procesiranog ultrazvučnim poljem na temperaturi medijuma od $8^{\circ}C$ i $25^{\circ}C$, (d) i (e) C^{13} -NMR spektri DLPLG:HAp=90:10 kompozitnog materijala procesiranog poljem ultrazvuka na temperaturi medijuma od $25^{\circ}C$ i $8^{\circ}C$.

Detektovani signali identifikovani su na sledeći način: signali koji odgovaraju hemijskim pomerajima od 170 ppm i 167 ppm potiču od rezonance u C=O grupama laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica, respektivno. Signali na položajima 69 ppm i 30 ppm odgovaraju CH i CH_3 grupama laktidnih, dok signali na 61 ppm odgovaraju CH_2 grupama glikolidnih monomernih jedinica. Integrali pikova koji odgovaraju CH grupama laktidnih ($I(CH)_{lak}$) i CH_2 grupama glikolidnih ($I(CH_2)_{glik}$) monomernih jedinica i integrali pikova C=O grupa laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica ($I(C=O)_{lak}$ i $I(C=O)_{glik}$) kao i, na osnovu njih, izračunati udeli laktidnih (R_{lak}) i glikolidnih (R_{glik}) monomernih jedinica (primenom jednačina (3) i (4)) u polimerima/polimernim delovima kompozita i njihovi odnosi ($R_{lak}:R_{glik}$) predstavljeni su u tabeli 4.8.

Tabela 4.8: Rezultati integracije NMR pikova i izračunatih procentualnih udela laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica (C^{13} - NMR)

	Hemijski pomeraj (δ) (ppm)	DLPLG (komercijalni)	DLPLG ultrazvuk ($8^{\circ}C$)	DLPLG ultrazvuk ($25^{\circ}C$)	DLPLG:HAp 90:10 ultrazvuk ($25^{\circ}C$)	DLPLG:HAp 90:10 ultrazvuk ($8^{\circ}C$)
$I(C=O)_{lak}$	170	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$I(C=O)_{glik}$	167	0.94	0.96	0.93	0.97	0.86
R_{lak}		0.52	0.51	0.52	0.51	0.53
R_{glik}		0.48	0.49	0.48	0.49	0.47
$R_{lak}:R_{glik}$		52:48	51:49	52:48	51:49	53:47
$I(CH)_{lak}$	69	3.1	3.61	3.56	3.77	3.61
$I(CH_2)_{glik}$	61	2.87	3.32	3.25	3.48	3.53
R_{lak}		0.52	0.52	0.52	0.52	0.51
R_{glik}		0.48	0.48	0.58	0.48	0.49
$R_{lak}:R_{glik}$		52:48	52:48	52:48	52:48	51:49

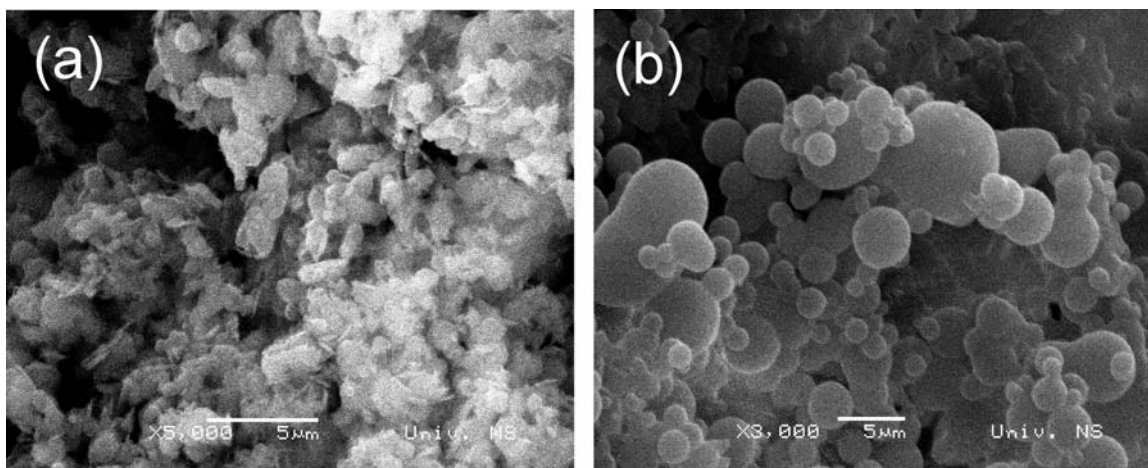


Slika 4.17: C^{13} -NMR spektar: (a) komercijalnog DLPLG, (b) DLPLG (ultrazvuk, 8°C), (c) DLPLG (ultrazvuk 25°C), (d) DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 25°C) i (e) DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 8°C).

4.4.1 Uticaj snage ultrazvučnog polja

Nakon ispitivanja morfologije čistog polimera, sledeći korak bio je ispitivanje morfoloških promena koje će nastati nakon formiranja kompozitnog materijala u polju ultrazvuka iste snage. Na slici 4.18 predstavljene su SEM mikrografije poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozita sa maseni odnosom DLPLG : HAp = 75 : 25 sintetisanog na sobnoj temperaturi ($T \sim 25^{\circ}\text{C}$) u polju snage 50 W na slici (a) i snage 142.5 W na slici (b). Na ovim slikama kompozita procesiranog različitim snagama ultrazvučnog polja najjasnije se primećuje razlika u morfologiji formiranih čestica kao posledica jačine ultrazvučnog polja. U oba slučaja stabilizator je bio polivinilpirolidon (PVP).

U slučaju kompozita formiranog u polju niže snage (slika 4.18a) može se primetiti da su sintetisane savijene ljušpičaste čestice kao i formacije koje podsećaju na sfere izuzetno nepravilnog oblika. Veličina ovako formiranih čestica bila je par mikrona. Sa druge strane, na slici 4.18b predstavljene su čestice istog kompozita sintetisane u ultrazvučnom polju veće snage i primetno je da je njihova morfologija potpuno različita, jer su u ovom slučaju formirane sfere daleko pravilnijeg oblika. Ove sfere poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozita su dosta široke raspodele veličina od oko 1.5-8.2 μm .



Slika 4.18: SEM mikrografije kompozita sa DLPLG:HAp=75:25 masenim odnosom formiranog na $T \sim 25^{\circ}\text{C}$ u polju ultrazvuka snage (a) 50 W i (b) 142.5 W.

4.4.2 Uticaj udela polimerne i keramičke faze na morfologiju DLPLG/HAp kompozita

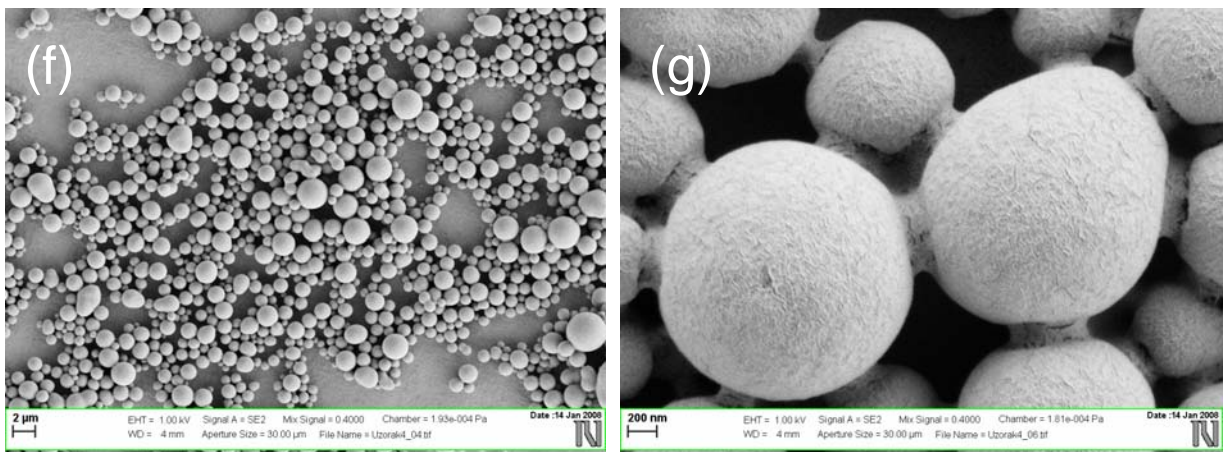
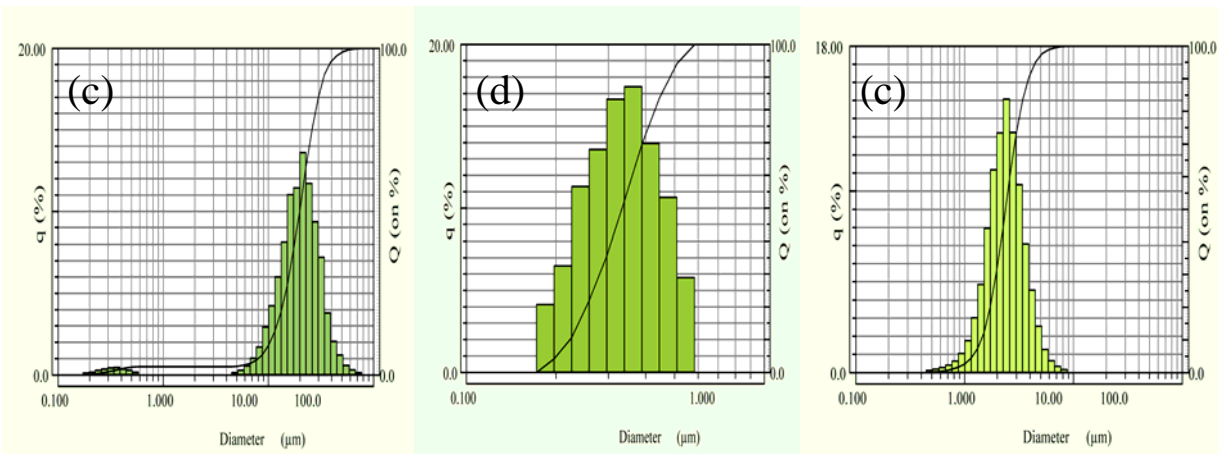
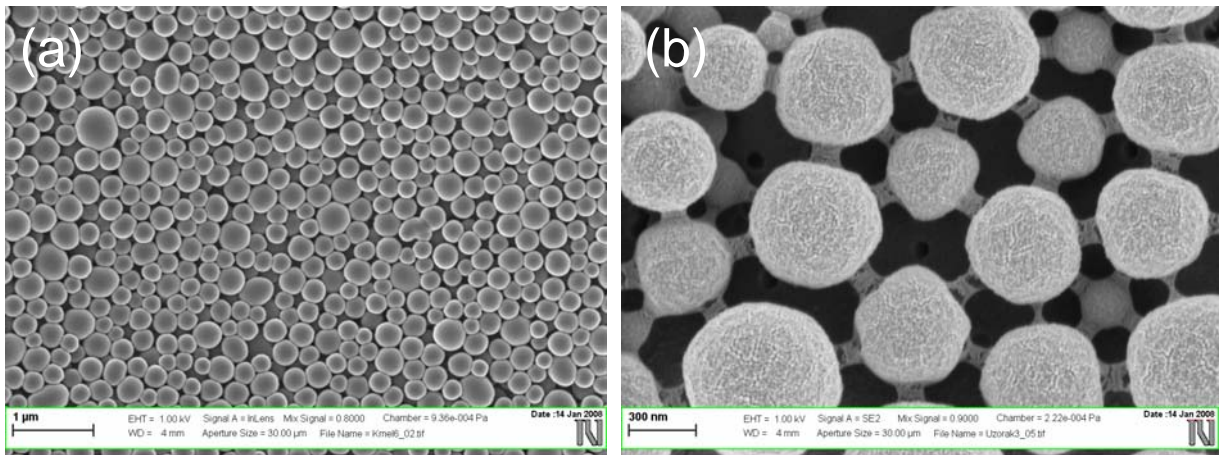
Sledeći parametar koji je variran u cilju analiza morfologije DLPLG/HAp kompozita bio je udeo keramičke i polimerne komponente u kompozitu. Kao što je već pomenuto u polju ultrazvuka formirani su poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit (DLPLG/HAp) kompozitni materijali sa dva različita masena odnosa DLPLG:HAp= 90:10 i 75:25. Morfologija dobijenih čestica analizirana je pomoću skanirajuće elektronske mikroskopije, dok je analiza raspodele veličina čestica rađena pomoću metode rasejanja laserskog snopa.

SEM mikrografije i odgovarajuće raspodele veličina čestica ovih uzoraka date su na slici 4.19: na slikama 4.19 a i b predstavljene su kompozitne čestice sa odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10, kao i njihove raspodele veličina (4.19 c i d), dok je na slici 4.19 e data raspodela veličina kompozitnih čestica sa odnosom DLPLG : HAp = 75 : 25 čija je morfologija prikazana na slikama 4.19 f i g.

U slučaju kompozitnih čestica sa većim sadržajem polimera (90 mas. %), postignute su skoro savršene sfere, veoma pravilnog oblika (slika 4.19a) i sa karakterističnom planarnom prostornom organizacijom sfera. Ove sfere karakteriše i prosečna vrednost dijametra od oko 330 nm (slika 4.19 d) i (tabela 4.9) kao i visok stepen uniformnosti veličina čestica (slika 4.19a). Sa druge strane, kompozitne čestice sa manjim sadržajem polimera (75 mas. %), (slika 4.19 f) su takođe sfernog ne tako pravilnog oblika i bez pomenute pravilnosti u prostornoj organizaciji. Veličinu ovih čestica odlikuju mikronski dijametri koji u proseku iznosi 2.39 μm (tabela 4.9) i prilično mala uniformnost raspodele veličina (slika 4.19 e).

I u jednom i u drugom slučaju moguće je primetiti prisustvo "vratova" koji međusobno spajaju dve ili više sfera (slike 4.19 b i g). Ovaj fenomen je i ranije detektovan pri ultrazvučnom tretiranju materijala i posledica je sinterujućeg efekta koji nastaje usled međusobnih sudara čestica koje su ubrzane udarnim talasom koji nastaje nakon eksplozije kavitacionih mehurića i povećane plastičnosti materijala na mestu sudara.^[51]

Treba primetiti i dvostruku raspodelu čestica dobijenu u slučaju čestica sa većim sadržajem polimerne komponente (slika 4.19 c) usled činjenice da su pojedinačne sfere ovog kompozita nanometarskih dimenzija tako da je njihova raspodela odvojena od raspodele čestica koje su ostale povezane vratovima i detektovane kao veće. U slučaju kompozitnih čestica sa manjim sadržajem polimernog dela ovakva pojava nije registrovana i dobijena je jedna raspodela veličina čestica koja odgovara veličinama detektovanim na SEM mikrografijama.



Slika 4.19: FE SEM mikrografije kompozita procesiranog u polju ultrazvuka na $T=8^{\circ}\text{C}$ sa odnosom DLPLG:HAp=90:10 (a, b) sa raspedelama veličina čestica (c, d) i raspedela veličina čestica kompozita sa odnosom DLPLG:HAp=75:25 (e) čija je morfologija prikazana na slikama (f, g). Raspedela veličina čestica prikazana na slici d predstavlja uvećanu raspedelu koja se na slici c nalazi na manjim dijametrima.

Tabela 4.9: Srednje vrednosti veličina čestica DLPLG/HAp kompozita i vrednosti njihovih dijametara u određenom procentu merene zapremine.

Srednji dijametri	DLPLG:HAp (90:10) (sl. 33 e)	DLPLG:HAp (90:10) (sl. 33 f)	DLPLG:HAp (75:25) (sl. 33g)
10%	10.3857	0.2227	1.4141
20%	13.3742	0.2526	1.7209
30%	15.6323	0.2802	1.9456
40%	17.6715	0.3071	2.1620
50%	21.9834	0.3605	2.6049
50%	24.5414	0.3901	2.8861
70%	27.9361	0.4299	3.2618
90%	33.0428	0.4832	3.8701
ukupan	19.8957	0.3332	2.5467

4.4.3 Uticaj temperature na proces oblaganja hidroksiapatita polimerom

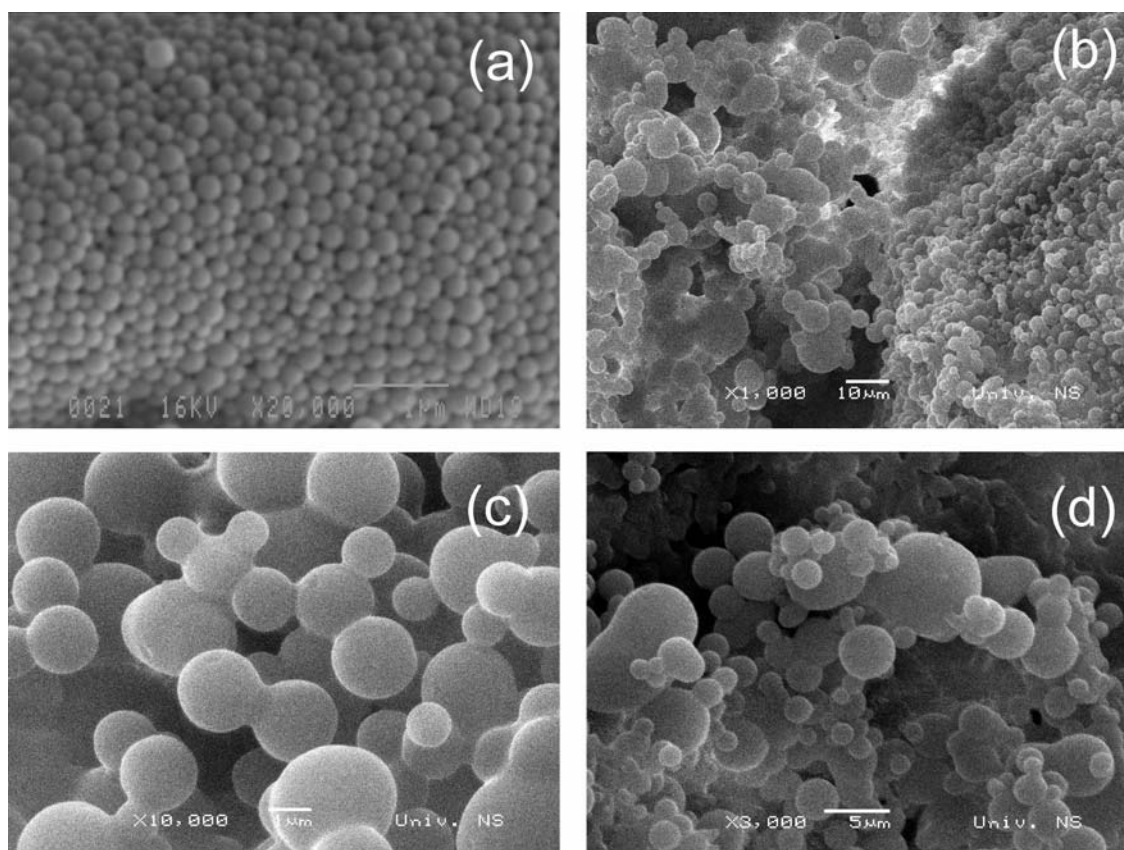
Obzirom na činjenicu da je temperatura medijuma u kojoj se vrši sinteza materijala jedan od vrlo važnih parametara sistema koji intenzivno utiče na produkte, njen uticaj na morfologiju poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozita, posebno zbog polimerne faze, je bilo neophodno ispitati. U tom cilju, formiranje kompozita je rađeno na dve različite temperature i morfološka analiza je urađena SEM-om.

Na slici 4.20 predstavljene su SEM mikrografije DLPLG/HAp kompozita: na slikama (a) i (c) predstavljena je morfologija čestica sintetisanih na niskoj temperaturi ($T = 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$), dok su na slikama (b) i (d) čestice sintetisane na sobnoj temperaturi ($T \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Maseni udeo polimera i keramike je za (a) i (b) 90 : 10, dok je za (c) i (d) 75 : 25.

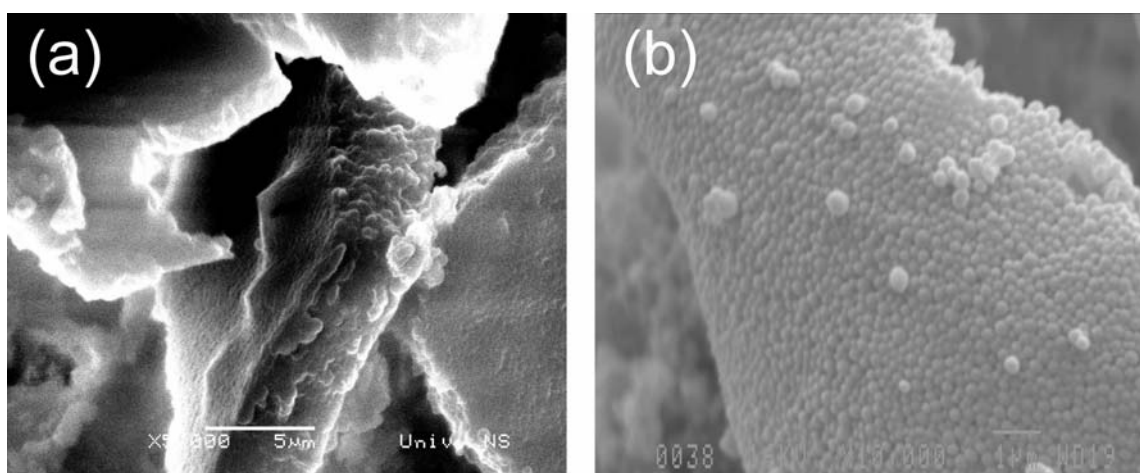
Na osnovu prikazanih rezultata vidi se uticaj temperature na morfologiju sintetisanih čestica. Najpre se može primetiti promena u veličini. U slučaju sistema koji su sintetisani na nižoj temperaturi čestice su manjih dimenzija.

U slučaju uzorka sa odnosom DLPLG/HAp jednakim 90 : 10 sintetisanim na nižoj temperaturi (sl. 40 a) čestice su veoma malih dimenzija (od 150-320 nm) i imaju veoma visok stepen uniformnosti. Za razliku od njih, isti sistem sintetisan na sobnoj temperaturi (slika 4.20 b) sastoji se iz dve vrste sfernih čestica. Sa jedne strane prisutne su sferne čestice veoma malih dimenzija i velikog stepena uniformnosti veličina, dok su sa druge strane prisutne sfere prilično većih dimenzija i široke raspodele veličina. Na ovim sistemima je moguće primetiti i

odsustvo aglomeracije za uzorak sintetisan pri nižoj temperaturi, dok se u slučaju uzorka sintetisanog na višoj temperaturi izražena aglomeracija vidi kod sfera većih dimenzija.



Slika 4.20: SEM mikrofografije DLPLG/HAp kompozita sintetisanog na (a) $T = 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i (b) $T \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa masenim odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 i na (c) $T = 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i (d) $T \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa masenim odnosom DLPLG:HAp = 75 : 25

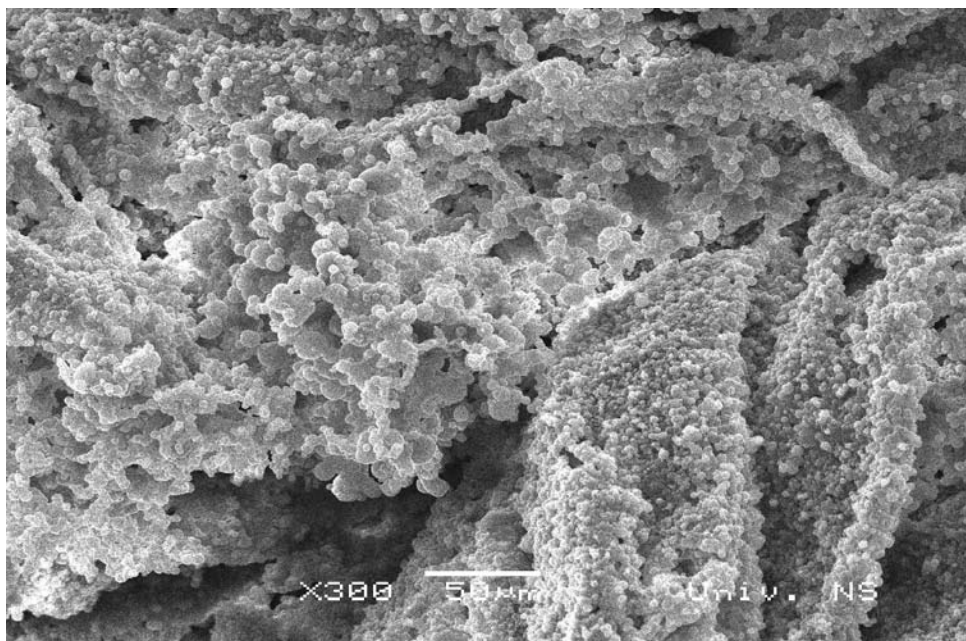


Slika 4.21: Planarna samoorganizacija sfernih čestica DLPLG/HAp kompozita sa maseni odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 sintetisanog na $T = 8\text{ }^{\circ}\text{C}$: (a) izgled preseka ravni i (b) površina ravni izgrađena iz pravilno raspoređenih sfernih čestica.

Zanimljivo je i to da sistem sintetisan na nižoj temperaturi ima određenu vrstu planarne prostorne samoorganizacije sfera. Ovu tvrdnju naročito potvrđuju slike 4.21 a i b. Na njima je u krupnijem planu predstavljena ravan koju ove sfere formiraju pri čemu je na slici 4.21a predstavljena struktura preseka ove ravni, dok se na slici 4.21 b može zapaziti njena površina izgrađena iz veoma pravilno raspoređenih sfera nanometarskih dimenzija.

Određeni vid prostorne organizacije, mada ne tako pravilan kao u prethodnom slučaju ali ipak zanimljiv, može se primetiti i u uzorku sintetisanom na sobnoj temperaturi. Već je rečeno da su detektovane dve vrste sfera koje se značajno razlikuju u veličini, ali i po tome da su manje sfere aglomerisane i grade "grozdastu strukturu" tipičnu za ove aglomerate, dok su sa druge strane sitnije sfere potpuno drugačije organizovane i na njima se može zapaziti određeni vid planarne organizacije. Ipak, ova organizacija nije u istoj meri geometrijski pravilno uređena kao u sistemu predstavljenom na slici 4.21 a i b. Na slici 4.22 moguće je jasno zapaziti ove dve vrste sfera i njihovu različitu prostornu organizaciju.

U slučaju uzorka sa većim sadržajem keramike (DLPLG : HAp = 75 : 25) prethodno pomenuta pravilnost strukture se potpuno gubi. Pored razlike u veličini sintetisanih čestica, može se primetiti da je raspodela veličina čestica široka u oba slučaja, ali da je nešto uža u slučaju uzorka sintetisanog na nižoj temperaturi. Ono što iznenađuje je da je oblik sfera pravilniji u uzorku sintetisanom na sobnoj temperaturi.



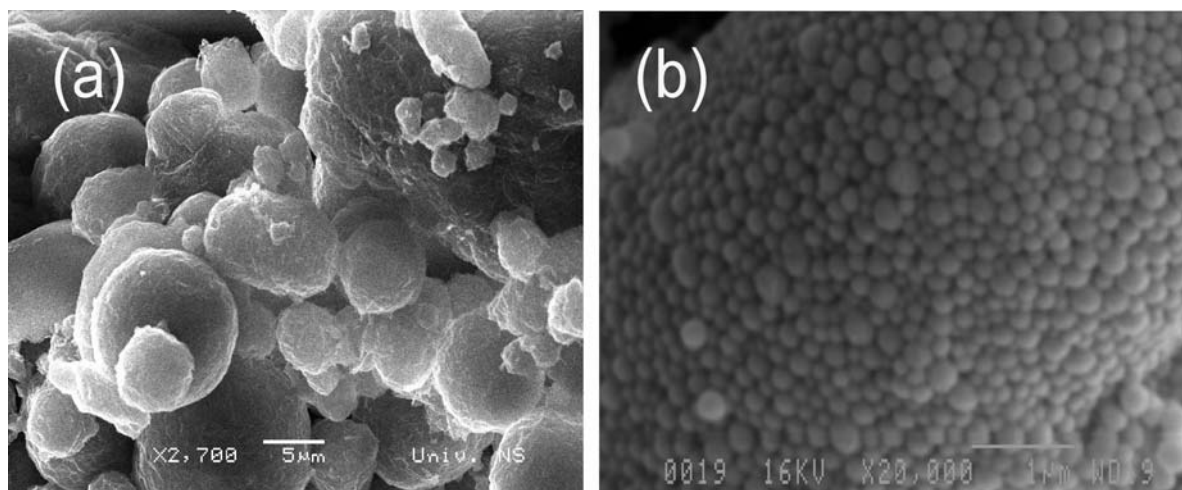
Slika 4.22: "Grozdasta" prostorna organizacija sfernih čestica većih dimenzija i planarna organizacija manjih sfera u uzorku sa masenim odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 sintetisanom na sobnoj temperaturi.

4.4.4 Uticaj različitih stabilizatora

Na putu ka nalaženju optimalnih uslova za sintezu DLPLG/HAp kompozitnog materijala željenih morfoloških karakteristika sledeći parametar koji je ispitan bio je stabilizator-površinski aktivna supstanca čiji je cilj kompenzovanje površinskog naelektrisanja sintetisanih čestica kako bi se sprečila samostalna međusobna kompenzacija naelektrisanja čiji je rezultat aglomeracija. U narednoj seriji eksperimenata korišćene su dve vrste stabilizatora: poli(vinil-alkohol) (PVA) i poli(vinil-pirolidon) (PVP).

Analiza morfologije sintetisanih čestica rađena je na osnovu SEM mikrografija ovih uzoraka predstavljenih na slici 4.23: na slici 4.23 a predstavljena je morfologija kompozitnih čestica stabilisanih pomoću PVA, dok su na slikama 4.23 b .predstavljene čestice stabilisane uz upotrebu PVP-a. Sistemi su sintetisani na istoj temperaturi ($T \sim 25^{\circ}\text{C}$) i sa maseni odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10, kako bi se uticaj ovih faktora eliminisao.

Na osnovu ovih slika jasno se može uočiti razlika u morfologiji. Čestice sintetisane u prisustvu PVP-a (4.23b) su daleko manjih dimenzija, veće su uniformnosti veličina, pravilnijeg su oblika i daleko manje aglomerisane. Međusobna slepljenost čestica je posledica već pomenutog efekta "vrata". Za razliku od njih, morfologija čestica sintetisanih u prisustvu PVA je potpuno drugačija. Sintetisane sfere imaju izbrazdanu površinu i izrazito su nepravilnog oblika. Osim toga, čestice su u proseku mnogo većih dimenzija i prilično aglomerisane.



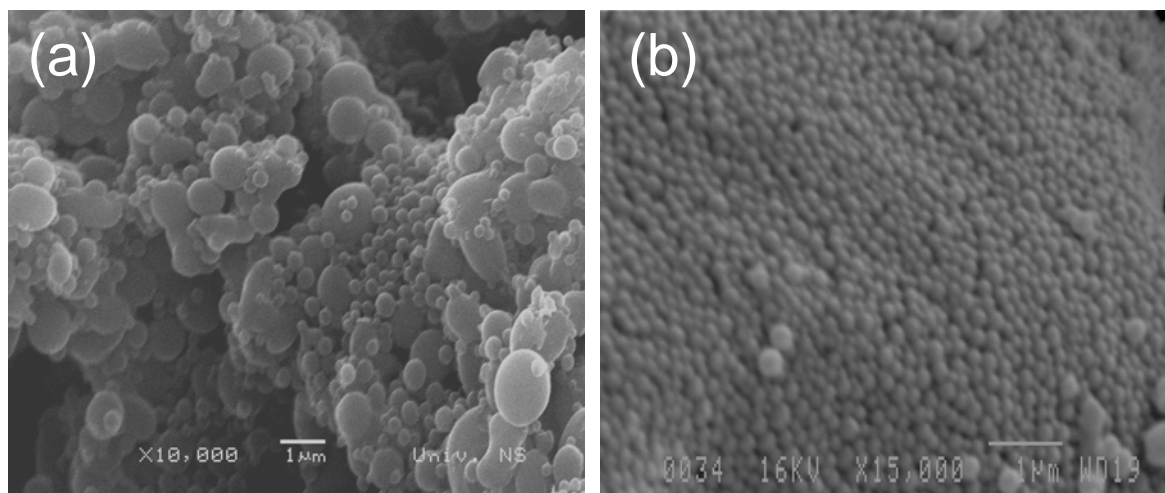
Slika 4.23: SEM mikrografije uzoraka DLPLG/HAp kompozitnog materijala formiranog u prisustvu PVA (a) i PVP (b) kao stabilizatora

4.4.5 Uticaj redosleda koraka u procesu formiranja DLPLG/HAp kompozita

U toku sinteze prikazane serije uzoraka urađen je i jedan kontrolni eksperiment u kome je promenjen redosled koraka kako bi se utvrdio eventualni uticaj na morfologiju sintetisanih čestica. Na ovaj način bilo je potrebno ispitati par stvari koje se tiču uticaja rastvarača, taložnog reagensa kao i homogenosti u procesu precipitacije i formiranja čestica kompozita.

SEM mikrografije ovih uzoraka predstavljene su na slici 4.24: na slici 4.24a predstavljena je slika uzorka sintetisanog dispergovanjem hidroksiapatita u etanolu pri čemu je disperzija dodata rastvoru polimera u cilju njegovog taloženja i formiranja kompozita, dok je na slici 4.24b predstavljena morfologija uzorka u čijoj sintezi je korišćena disperzija apatita u polimeru kojoj je dodat etanol u cilju taloženja. Uzorci su kompozitni materijali sa masenim udelom DLPLG : HAp = 90 : 10 sintetisani na sniženoj temperaturi i pri snazi polja od 142.5 W.

Sa ovih slika je moguće primetiti da su čestice uzorka sintetisanog dispergovanjem apatita u etanolu najpre daleko većih dimenzija, izrazito široke raspodele veličina, veoma aglomerisane i sa grozdastom prostornom organizacijom sfera (slika 4.24a). U poređenju sa njima predstavljen je uzorak o kome je već bilo reči (slika 4.24b) čija morfologija je izuzetno pravilna, čestice su veoma male, raspodela veličina čestica je izuzetno uska i postoji zanimljiva planarna prostorna organizacija.

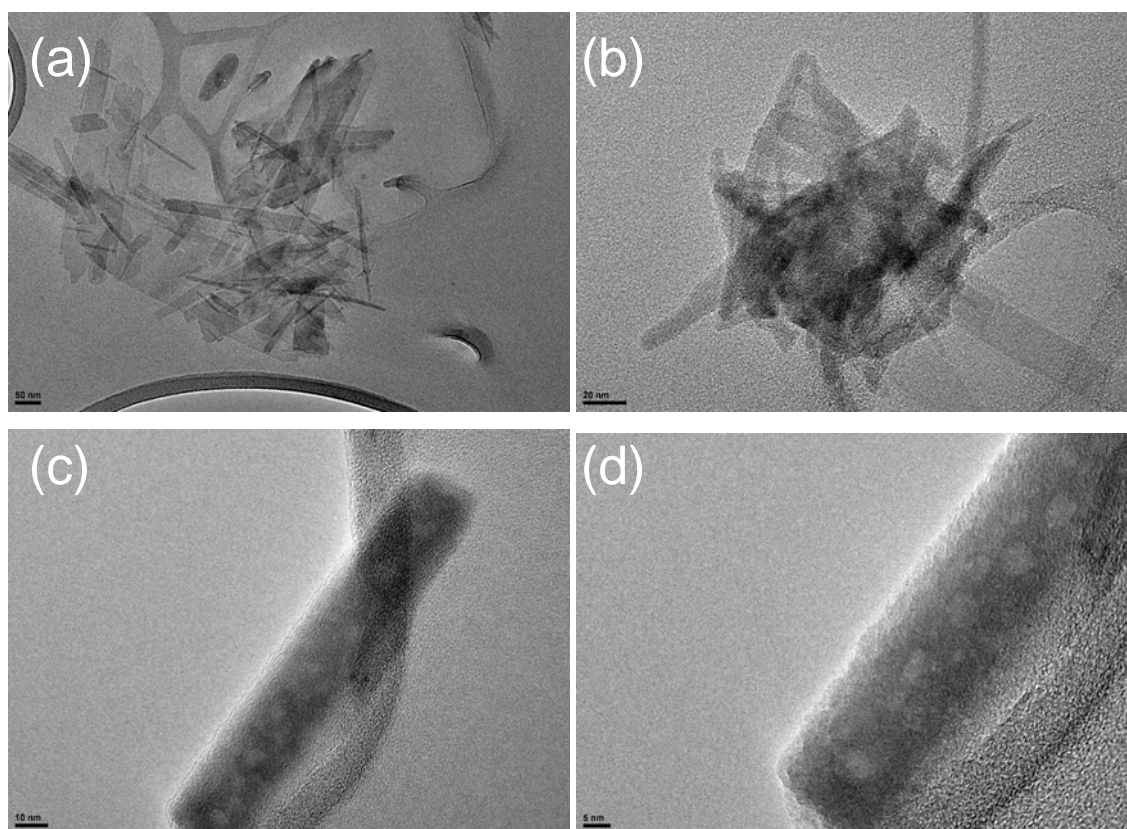


Slika 4.24: SEM mikrografije uzoraka kompozita sa masenim odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 sintetisanim na sniženoj temperaturi uz korišćenje (a) disperzija hidroksiapatita u etanolu i (b) apatita u polimeru.

Ovim eksperimentom je pokazana neophodnost uspostavljanja homogenosti između čvrstih čestica apatita i rastvora polimera u momentu pre njegovog taloženja kako bi se nakon postignutog taloženja obezbedila pravilna morfologija čestica kompozitnog materijala.

4.4.6 Morfologija hidroksiapatita u kompozitu

U dosadašnjem radu optimizacijom parametara modelovana je morfologija polimernog dela kompozitnog materijala koja je analizirana skanirajućom elektronskom mikroskopijom. Obzirom na to da su rezultati pokazivali sferne oblike bez prisustva štapićastih formacija hidroksiapatita, primenom transmisionne elektronske mikroskopije, analizirana je morfologija keramičkog dela ovog kompozita.



Slika 4.25: TEM mikrografije štapića hidroksiapatita koji je nakon ultrazvučnog sitnjenja bio obložen polimerom

Morfologija čestica hidroksiapatita koji je odmah nakon procesiranja poljem ultrazvuka visokog intenziteta u cilju sitnjenja obložen polimerom predstavljena je na slikama 4.25 a,b,c,d. Sa ovih slika se može primetiti široka raspodela veličina dobijenih štapića. Sa jedne

strane jasno je moguće videti veće štapice dimenzija od 100 do 400 nm dužine i od 10 do 30 nm širine (slika 4.25 a), dok su sa druge strane prisutni izuzetni mali štapici čije su dimenzije bile do 100 nm dužine i od 5 do 10 nm širine (slika 4.25 b). Može se primetiti da su ovi štapici i nakon tretmana visoko-intenzivnim poljem ultrazvuka u cilju sitnjenja i deaglomeracije i kasnijeg procesiranja u cilju formiranja kompozita zadržali izuzetno pravilan štapčasti oblik. Ovo se najbolje može primetiti na slici 4.25 c na kojoj je predstavljen jedan štapčić hidroksiapatita dužine 125 i širine 25 nm. Može se primetiti da je za razliku od visoko uređene strukture pojedinačnih štapčića velikih dimenzija koji su dobijeni nakon sinteze apatita (videti poglavlje 4.1.2), u ovom slučaju ova dobro uređena kristalna struktura narušena usled prisustva defekata (slika 4.25 d) koji su neminovno nastali u toku procesa ultrazvučnog rušenja suprastruktura i smanjenja dimenzija štapčića hidroksiapatita.

Dati primer ilustruje značajnu promenu morfologije i smanjenje dimenzija sintetisanih čestica hidroksiapatita pod dejstvom intenzivnog ultrazvučnog polja i male zapremine etanola, inertnog medijuma u kome je rađeno sitnjenje, koja je na najbolji način bila očuvana u slučaju kada su štapčići odmah nakon ultrazvučnog procesiranja obloženi polimerom.

V

DISKUSIJA

5.1 Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita

Korišćenjem metode homogene precipitacije u polju ultrazvuka, u prvom delu ovog rada, sintetisan je hidroksiapatit. Obzirom na primenjenu metodu u kojoj je urea agens homogene precipitacije, njena koncentracija u sistemu je jedan od ključnih parametara tako da je najpre ispitan njen uticaj na krajnje produkte sinteze. Postepenim povećavanjem koncentracije uree, dobijeni dvofazni sistem koji su gradili hidroksiapatit i oktakalcijum-fosfat, pomerao se ka povećanju sadržaja hidroksiapatita i smanjenju oktakalcijum-fosfata. U trenutku postizanja granične koncentracije uree, hidroksiapatit postaje najstabilnija faza u sistemu i dobija se jednofazni sistem.^[171] Dobijeni rezultati ukazivali su na ranije predložen mehanizam sinteze hidroksiapatita preko ACP-OCP-HAp^{[127],[128][129]} transformacija u kome je OCP intermedijerna faza čije je prisustvo u sistemu tesno povezano sa koncentracijom OH⁻ jona.

Dejstvo ultrazvuka pospešuje hidroliza uree.^[169] Na taj način ubrzan je proces njene razgradnje i postizanja neophodne koncentracije OH⁻ jona. Takvi uslovi omogućili su da se tokom homogene sonohemijske precipitacije finalni monofazni HAp dobije posle svega 12 h starenja na sobnoj temperaturi.^[171] To je značajno skraćenje sintetskog vremena u poređenju sa klasičnom homogenom precipitacijom kod koje je minimalno vreme starenja koje je neophodno za dobijanje monofaznog hidroksiapatita 48-120 h zavisno od temperature (82-90 °C), dok kraća vremena starenja daju višefazne sisteme u kojima sintetska reakcija još uvek nije završena.^[164]

Utvrđeno je da daljim povećanjem koncentracije uree, u meri u kojoj se i dalje ostaje u užem opsegu pH oko fiziološke vrednosti, ona više ne utiče na sastav već na veličinu i strukturu sintetisanih čestica. Čestice apatita sintetisane u polju ultrazvuka imale su pločastu formu pri čemu su ove pločaste formacije bile većih dimenzija u slučaju uzoraka sintetisanih u prisustvu veće koncentracije uree. To je bilo u skladu sa izračunatim veličinama kristalita na osnovu fitovanja pika u pravcu (002).^[171]

Mikrostrukturna analiza koja je rađena pomoću Rietveld-ove metode, dala je izotropne veličine kristalnih domena na osnovu kojih je utvrđen štapićasti oblik nano- čestica apatita sa preferentnim pravcem rasta duž c-ose. Analiza TEM mikrografija istog uzorka dala je rezultate koji su pokazali prisustvo ovih štapićastih formacija i potvrdili rezultate utičajavanja strukture.^[255]

Strukturalna analiza ovih pločastih formacija, posmatrana od veće ka manjoj skali veličina, pokazala je da su one zapravo suprastrukture izgrađene iz nanoštapića. Prostornu organizaciju ovih suprastrukture grade međusobno paralelni i lateralno povezani nanoštapići. Na osnovu analize grafika elektronske difrakcije i veoma pravilne teksture dobijene na HRTEM mikrografijama, utvrđeno je da su ovi nano- štapići monokristalni sa veoma dobrim uređenjem rešetke i odsustvom defekata.^[255]

Kristalna struktura sonohemijski sintetisanih produkata može pružiti određene podatke o sintetskom procesu čime bi bilo moguće proširiti mehanizam sinteze sa hemijskog na strukturalni aspekt. Prema Suslick-u i saradnicima^[256], postoje dva mesta sonohemijske aktivnosti: prvo je unutar mehurića koji će u određenom momentu eksplodirati dok je drugo u prostoru između ovih mehurića i okružujućeg medijuma. Ukoliko se reakcija dešava unutar mehurića, produkti su obično amorfni, a ako je reč o prostoru između mehurića i okolnog medijuma produkti su nanokristalni. U ovom slučaju, obzirom na to da je dobijen apatit visoke kristalnosti i sa veoma dobro uređenom rešetkom, može se očekivati da se reakcija u kojoj se on formira dešava upravo u regionu između mehurića i okolnog medijuma. I u polju ultrazvuka hidroksiapatit ima svoj prirodni preferentni pravac rasta duž c-ose, međutim, lateralna povezanost ovih štapića ukazuje na moguće posledice sinterujućeg efekta mikro mlazeva koji nastaje prilikom eksplozija mehurića u toku sonohemijskog procesa^[257]. Pločaste formacije izgrađene iz nanoštapića verovatno nastaju kao rezultat njihovih sudara. Sličan efekat je detektovan i kod drugih sonohemijski sintetisanih materijala kao što je, na primer, antimonsulfid.^[258] U prilog tome ide i činjenica da su za razliku od ovako dobijenih nanostrukturnih pločica, strukturu apatita dobijenog klasičnom homogenom precipitacijom gradile vlaknaste strukture veoma velikih dimenzija (50-150 μm)^[164] ili pak trakaste strukture monokristala dužina 20-60 μm , dužine 0.8-3.6 μm i debljine 100-300 nm^[165]. Drugačija struktura kristala dobijenih u prisustvu i odsustvu ultrazvuka ukazuje na različit mehanizam kristalnog rasta i doprinos ultrazvuka ovom procesu.^[255]

U IC spektrima uočene su trake slabog intenziteta koje odgovaraju CO_3^{2-} grupama čije pozicije ukazuju na supstituciju PO_4^{3-} grupe apatita, odnosno na formiranje hidroksiapatita sa karbonatima (tip B). Obzirom na to da je apatit u ovom slučaju bio sintetisan iz prekursora koji su sadržali veću koncentraciju Ca^{2+} jona od stehiometrijske ($\text{Ca/P}=2$) u prisustvu organskog precipitacionog agensa, pojava apsorpcione trake karbonata je potpuno očekivana.^[252] Međutim, karbonati su veoma česte nečistoće u apatitima i lako se adsorbuju na njihovoj površini tako da je teško govoriti o udelu ovih jona unutar rešetke apatita.^[255]

5.2 Procesiranje DLPLG/HAp u polju ultrazvuka

U toku optimizacije parametara u cilju formiranja poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit (DLPLG/HAp) kompozita i postizanja što bolje morfologije nakon ultrazvučnog procesiranja, utvrđena je veoma velika povezanost između eksperimentalnih uslova i morfologije kompozitnih čestica.

Uticaj snage ultrazvučnog polja

Kada je reč o uticaju snage ultrazvučnog polja, obzirom na činjenicu da je do sada ova vrsta polimera tretirana samo poljem niže snage ($P = 32 \text{ W}$), najpre je ispitan uticaj ovog parametra na čist polimer kako bi se proverilo koliko je on u ultrazvučnom polju stabilan i da li postoji mogućnost njegovog procesiranja. Nakon ultrazvučnog tretmana polimera snagom od 50 i 142.5 W identifikacija dobijenih prahova potvrdila je prisustvo čistog polimera bez pojave dodatnih produkata. Na ovaj način je potvrđeno da ultrazvučno polje veće snage nije hemijski razgradilo analizirani sistem. Ispitivanjem oblika i veličine polimernih čestica ultrazvučno tretiranih uzoraka pokazalo je prisustvo sfernih čestica, veoma pravilnog oblika, prilično dobre uniformnosti veličina koje su se kretale u opsegu od 100 do 200 nm i nije bilo tragova destruktivnog dejstva polja na morfologiju polimernih čestica. Postignuta veličina sfernih čestica poli(d,l-laktid-ko-glikolid)-a je manja od veličine sfera koje su dobijene ultrazvučnim procesiranjem u polju manje snage (32 W) čija je prosečna vrednost dijametara bila 490 nm^[196].

Značajan uticaj snage ultrazvučnog polja moguće je primetiti tek pri formiranju kompozitnog materijala gde se jasno može videti razlika u morfologiji čestica obloženih polimerom pri višoj i pri nižoj snazi polja. SEM mikrografije pokazuju oblike zakrivljenih ljustica za kompozitne čestice sintetisane u polju niže snage, dok su u polju veće snage postignute sferne čestice. Fizički efekti ultrazvučnog polja koji su u ovom slučaju izraženi omogućili su iskorišćenje prostiranja ultrazvučnog talasa kroz medijum za intenzivnu emulzifikaciju i homogenizaciju sistema čiji rezultat je dobijena pravilnost u morfologiji. U oba slučaja radikali formirani kao produkti sonolize pri hemijskim efektima ultrazvučnog polja^[54] svakako su uticali na modifikaciju površina polimera kako bi povećali kontaktni ugao između faza što bi povećalo njegovu adhezivnost i omogućilo vezivanje za površinu čestica apatita u trenutku prelaska iz rastvora u čvrsto stanje. Obzirom da se u polju veće snage može očekivati veća koncentracija ovih radikala, modifikacija površine polimera pri tretiranju jačim

poljem pored povećanja adhezivnosti utiče i na oblik polimernog sloja čestica koji se više ne prilagođava obliku čestica apatita već dobija pravilan sferni oblik.

DLPLG/HAp kompozitni materijali sa različitim sadržajem polimerne i keramičke faze

U polju ultrazvuka formiran je poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozit sa dva različita masena udela polimera i keramike DLPLG:HAp 90:10 i 75:25. Njihova identifikacija je najpre izvršena infracrvenom spektroskopijom čime je potvrđena aplikativnost sonohemije, kao nove metode, u procesu formiranja DLPLG/HAp kompozita.

Rezultate kvalitativne IC analize potvrdila je i difrakcija x-zraka. Na difraktogramima su identifikovani oštri pikovi kristalnog hidroksiapatita i širok pik amorfnog polimera. Pored identifikacije celokupnog kompozita, difraktogrami su omogućili i pojedinačnu analizu komponenti što je za keramički deo kompozita bio veoma važan podatak. Naime, primećena je promena širine pika koji odgovara preferentnom pravcu rasta nano- štapićastih kristala duž c-ose. Širina ovog pika se povećava počev od čistog apatita, preko kompozita sastava DLPLG:HAp 75:25 do sastava 90:10. Ovo širenje ukazuje na smanjenje dimenzija štapića u kompozitu. Dakle, ova procenjena veličina nano-štapića ukazuje da se sa povećanjem udela polimerne komponente kompozita, dobijaju sitnije čestice apatita. Preciznije rečeno, veći sadržaj polimera doprinosi boljem održanju veličina čestica i efikasnije sprečava njihovu aglomeraciju. Ovi rezultati su očekivani obzirom na činjenicu da se sa povećanjem koncentracije polimernih lanaca koji imaju ulogu matrice značajno smanjuje dalji rast i aglomeracija sonohemijski tretiranih čestica apatita uprkos visoko adhezivnoj prirodi ove keramike.

SEM mikrografije su pokazale da je i u jednom i u drugom kompozitnom materijalu postignut sferan oblik čestica. U kompozitu sa većim sadržajem apatita čestice su većih, mikronskih, dimenzija, široke raspodele veličina i imaju proizvoljnu prostornu orijentaciju tipičnu za aglomerate polimernih sfernih čestica. Međutim, kompozit sa nižim sadržajem hidroksiapatita pokazuje izraženu pravilnost skoro savršenih sfernih čestica, visokog stepena uniformnosti veličina čija je srednja vrednost značajno smanjena i iznosi oko 330 nm.

Za razliku od jedne krive raspodele veličina čestica kompozita 75:25, za kompozit 90:10 su dobijene dve raspodele. Poređenjem veličina čestica sa SEM mikrografija sa krivama raspodele za kompozit 90:10, može se zaključiti da raspodela koja se nalazi na manjim dijametrima pokazuje veličinu pojedinačnih čestica, dok druga pokazuje međusobno vezane

čestice. Kriva raspodele kompozita sa većim sadržajem keramike odgovara veličinama čestica sa SEM mikrografija.

Kompozit sa sastavom 90:10 pokazuje veoma zanimljivu planarnu samoorganizovanost i gusto pakovanje sfera koje su međusobno povezane vratovima u ravni. Za razliku od njih, sfere kompozita 75:25 nemaju tako pravilnu, već slučajnu prostornu raspoređenost i povezanost vratovima.

Krive raspodela veličina čestica i veoma pravilna prostorna organizovanost sfernih čestica kompozita sa sastavom 90:10, ukazuju na to da su ove nano- čestice bile dosta jače vezane tako da pri istom ultrazvučnom dispergovanju nisu mogle biti potpuno razdvojene.

Sva poboljšanja u morfologiji kompozitnih čestica sa nižim sadržajem apatita moguće je objasniti upravo činjenicom da je "plastičnost" polimernih materijala u polju ultrazvuka veoma velika što i omogućava formiranje prilično pravilnih struktura. U skladu sa tim, svako građenje kompozitnih materijala u kome je udeo keramičke faze znatniji doprinosi većoj rigidnosti i težem formiranju pravilnih oblika. Postizanjem optimalnih ultrazvučnih parametara svakako je moguće formirati uniformne, sferne DLPLG/HAp čestice čija je moguća gustina pakovanja najbolja. Na taj način se omogućuju veoma dobre mehaničke osobine ovog materijala što i jeste jedan od zahteva za neke od njegovih primena. Ova činjenica ističe značaj primene ove metode za dobijanje ovog materijala.

Uticaj temperature medijuma

U cilju analize uticaja temperature medijuma na morfologiju kompozitnih čestica urađena je mikroskopska analiza ovih materijala formiranih na sobnoj (25°C) i sniženoj (8°C) temperaturi.

Poređenjem morfologije čestica dobijenih na različitim temperaturama medijuma može se primetiti da su na nižoj temperaturi dobijene sferne čestice veće uniformnosti veličina i manjih dimenzija. U sistemu koji je sintetisan na nižoj temperaturi medijuma primećena je planarna prostorna organizacija sfernih čestica i odsustvo aglomeracije. Sa druge strane, sistem koji je sintetisan na višoj temperaturi pokazuje dva tipa prostorne organizacije sfernih čestica: sferne čestice većih dimenzija grade grozdaste aglomerate, dok čestice manjih dimenzija grade manje pravilnu planarnu prostornu organizaciju sfera.

Kontrola temperature medijuma predstavlja izuzetno važan parametar sistema koji omogućava hemijsku i morfološku stabilnost kompozita. Ova stabilnost polimernog dela kompozita u ultrazvučnom polju može biti objašnjena činjenicom da se materijal nalazio u

sredini u kojoj je mogao biti izložen samo sekundarnim uticajima ultrazvučnog polja. Da temperatura medijuma nije bila kontrolisana polimer bi se razgradio na svoje isparljive produkte koji bi se našli unutar kavitacionih mehurića u kojima bi bili izloženi primarnim ultrazvučnim efektima (izuzetno visokoj temperaturi i visokom pritisku) usled kojih bi formirali potpuno nove produkte. Kontrolisana temperatura medijuma onemogućila je ovu termičku razgradnju i polimer je, obzirom na to da kao makromolekul nema gasovitu fazu, ostao u oblasti izvan kavitacionih mehurića u kojoj je mogao biti izložen samo sekundarnim efektima. Ovi sekundarni efekti odnose se na fizičke efekte polja kao dominantne i na sekundarni uticaj primarno stvorenih radikala kao hemijskih efekata ultrazvučnog polja.

Uticaj vrste stabilizatora

U cilju ispitivanja uticaja stabilizatora na morfologiju sintetisanih čestica poli(d,l-laktid-koglikolid)/hidroksiapatit kompozita, analizirani su sistemi koji su stabilizovani pomoću dve vrste polimernih stabilizatora- poli(vinil-pirolidon)-a (PVP) i poli(vinil-alkohol)-a (PVA). Analiza sintetisanih čestica je rađena na osnovu SEM mikrografije i pokazala je da sistemi koji su sintetisani pri jednakim uslovima i stabilizovani različitim stabilizatorima pokazuju različitu morfologiju i prostornu organizovanost čestica. Kompozit koji je stabilisan PVP-om ima izuzetno pravilnu prostornu organizaciju sfera koja je u slučaju stabilizacije sa PVA potpuno narušena i prelazi u aglomerate. Pored promene u prostornoj organizaciji čestica moguće je primetiti da su čestice stabilisane sa PVA veoma široke raspodele veličina i daleko nepravilnijeg oblika.

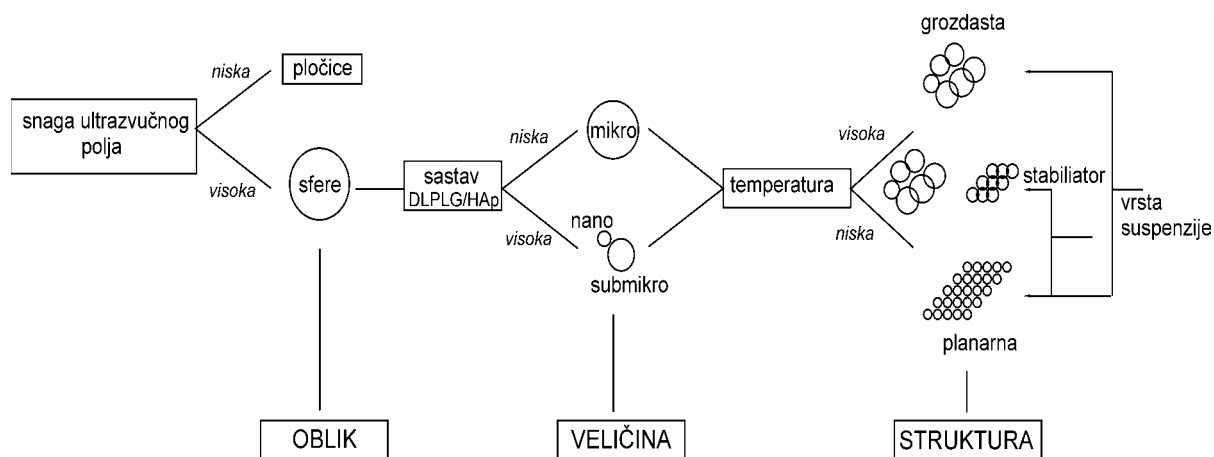
Rezultati ukazuju na činjenicu da modifikacija površina polimernog dela kompozita izazvana spregom hemijskih sekundarnih efekata ultrazvučnog polja preko formiranih radikala i pravilan izbor dodatih polimernih stabilizatora koji svoje polarne grupe koriste za "vandervalsovski" tip stabilizacije intenzivno utiču na morfologiju i prostornu organizaciju DLPLG/HAp kompozitnih čestica.

Uticaj redosleda koraka u procesu formiranja DLPLG/HAp kompozita

Kako bi se utvrdila važnost postavljenih koraka u procesu formiranja kompozita sa predstavljenom pravilnošću morfologije, analiziran je sistem u kom je redosled koraka promenjen. Promena redosleda koraka u procesu formiranja DLPLG/HAp kompozita dala je vidne promene u morfologiji sintetisanih čestica. SEM mikrografije pokazuju da su čestice

sintetisane dispergovanjem apatita u rastvoru polimera mnogo pravilnijeg oblika, manjih dimenzija i uređenije strukture u poređenju sa istim sistemom sintetisanim u suprotnom procesu dispergovanja apatita u etanolu.

Korišćenjem fizičkih efekta emulzifikacije i homogenizacije ultrazvučnim talasima, dobija se homogena disperzija čvrstih čestica apatita u rastvoru polimera. Formiranjem ove disperzije svaka čestica apatita okružena je polimernim lancima koji se još uvek nalaze u rastvoru. U toku postepenog dodavanja etanola, koji je precipitacioni agens DLPLG-a, dolazi do kontinualnog istiskivanja molekula polimernog rastvarača molekulima nerastvarača koji je iz tog razloga dodat u višku. U toku tog procesa polimer menja svoju strukturnu prostornu organizaciju od izduženog lanca u razblaženom rastvoru rastvarača sa čijim molekulima uspostavlja privlačne sile do klupčaste strukture u prisustvu molekula nerastvarača sa kojima interaguje odbojnim silama. U prisustvu dovoljno velike koncentracije nerastvarača dolazi do taloženja polimera koji koristi čvrste čestice apatita kao klice na kojima će otpočeti proces taloženja. U slučaju u kom je apatit dispergovan u etanolu pri dodatku rastvora polimera on takođe koristi čestice apatita kao klice za taloženje, ali u ovom slučaju nema pomenute homogenosti raspodele polimerne i keramičke komponente u momentu pre taloženja kao ni postepenog taloženja polimera, rezultat čega su navedene razlike u morfologiji.



Slika 5.1: Šematski prikaz ustanovljenih zavisnosti između eksperimentalnih parametara i strukture, oblika i veličine čestica DLPLG/HAp kompozita u toku ultrazvučnog procesiranja

Na slici 5.1 šematski su predstavljeni sumirani efekti koji su primećeni u toku ispitivanja uticaja sintetskih parametara u toku formiranja poli(d,l-laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozitnog materijala u polju ultrazvuka. Na osnovu njih je moguće primetiti da morfologija kompozitnih čestica najpre zavisi od snage ultrazvučnog polja koja utiče na oblik čestica.

Zavisno od ovog parametra oblik čestica može biti nepravilno pločast ili sferan. Veličina sfernih čestica dalje je dizajnirana promenom sastava kompozita. Utvrđeno je da promenom sastava kompozita, odnosno povećanjem udela polimerne i smanjenjem udela keramičke komponente, dolazi do smanjenja veličine čestica od mikronskih do nanometarskih dimenzija. Uticaj temperature je pokazao promenu u strukturi, odnosno prostornoj organizaciji, sfernih čestica. Primećeno je da se sa smanjenjem temperature medijuma struktura menja od grozdaste preko mešovite grozdasto-planarne do planarne. Prelazi između ovako dobijenih morfolologija mogući su promenom kako stabilizatora, tako i vrste suspenzije.

DLPLG polimerni lanci u visoko-intenzitetskom polju ultrazvuka

Ispitivanjem polimera/polimernog dela kompozita procesiranog poljem ultrazvuka visokog intenziteta rađeno je pomoću C^{13} nuklearne magnetne rezonantne spektroskopije (NMR) i gel propusne hromatografije (GPC).

GPC metoda je omogućila dobijanje raspodela molekulskih masa polimera/polimernog dela kompozita kao i njihovih srednjih vrednosti (\overline{M}_w i \overline{M}_n). Rezultati, prikazani u tabeli 4.7, su pokazali da razlika u \overline{M}_w i \overline{M}_n između komercijalnog i ultrazvučno procesiranih uzoraka postoji. Sa povećanjem temperature medijuma \overline{M}_w i \overline{M}_n su se smanjivale i kod polimera i kod kompozita. Ove razlike ($\Delta \overline{M}_w$ i $\Delta \overline{M}_n$) su kod polimera iznosile 776 Da i 1251 Da, dok su kod kompozita bile 147 Da i 9338 Da. Sa druge strane, pri konstantnoj temperaturi, razlike \overline{M}_w i \overline{M}_n , između polimera i kompozita na 8°C bile su -169 Da i -1907 Da, dok je su na 25°C bile 525 Da i 618 Da. Obzirom na činjenicu da je utvrđeno da se promena molekulskih masa polimera u polju ultrazvuka dešava do granične vrednosti od $\overline{M}_w \sim 30000$ Da nakon čega prestaje^[84] ove promene DLPLG-a u visoko-intenzitetskom polju ultrazvuka nisu velike. Sa druge strane, uprkos činjenici da je kod nekih polimera degradacija polimera intenzivnija sa smanjenjem temperature i u prisustvu manje isparljivih rastvarača (jer se pri tim uslovima postiže intenzivnija kavitacija i agresivnija sredina),^[83] predstavljeni rezultati ukazuju na bržu degradaciju na višoj temperaturi u lako isparljivom medijumu (alkoholu) što se može pripisati visokom intenzitetu polja (koji obezbeđuje potrebnu agresivnost sredine). Primetna je činjenica da su srednje brojčane molekulske mase polimera/polimernih delova kompozita procesiranih na nižoj temperaturi (8°C) veće u odnosu na komercijalni polimer. Ovo jeste neobična pojava, međutim, poznato je da ultrazvučno polje može da uzrokuje i degradaciju ali i polimerizaciju prvobitnih polimernih lanaca.^[53] U skladu sa tim moguće je pretpostaviti da nastale promene u

srednjim vrednostima brojčanih molekulskih masa zapravo predstavljaju proizvod ravnoteže između istovremene degradacije polimernih lanaca (pri čemu nastaju reaktivni radikali) i njihovog reorganizovanja u duže lance. Treba pomenuti i činjenicu da je najveći indeks polidisperznosti ($\overline{M}_w / \overline{M}_n = 3.43$) imao kompozit procesiran na višoj temperaturi, dok je najmanju ($\overline{M}_w / \overline{M}_n = 1.95$) imao kompozit procesiran na nižoj temperaturi medijuma (tabela 4.7) kao i činjenicu da kompozit sa najmanjim polidisperznošću ima i najpravilniju morfologiju čestica (slika 4.19a). Ovo je u skladu sa mogućnošću optimizovanja osobina, kao što je morfologija, promenom molekulskih masa i smanjenjem polidisperznosti polimera u polju ultrazvuka.^[53]

Sa druge strane, u skladu sa C^{13} -NMR spektrima i odgovarajućim izračunatim udelom laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica (tabela 4.8), moguće je primetiti da ovaj odnos ostaje konstantan u toku procesa promene raspodela molekulskih masa ultrazvučno tretiranih polimernih, odnosno kompozitnih materijala. Na taj način, u toku procesiranja polimera u polju ultrazvuka dešavala se ravnomerna promena brojčanih molekulskih masa bez dominantne promene mikrostrukture segmenata lanaca ni laktidnih ni glikolidnih monomernih jedinica.

5.4 Morfologija hidroksiapatita nakon ultrazvučnog procesiranja i formiranja kompozita

Obzirom da je u okviru strukturne analize ustanovljeno da su nakon sonohemijske sinteze dobijene mikronske pločaste strukture hidroksiapatita izgrađene iz nanometarskih štapića, urađena je njihova deaglomeracija intenzivnim poljem ultrazvuka u inertnom medijumu male zapremine (15 ml). Na osnovu SEM mikrografija može se primetiti da se nakon ultrazvučnog tretmana morfologija ovih sistema postepeno menja sa vremenom od pločaste preko štapićaste do igličaste. U trenutku kada se degradacija strukture svede na nivo štapića jasno se zapaža njihova, prethodno pomenuta, paralelna orijentacija uočena na osnovu TEM mikrografija. Pored promene morfologije i dimenzija aglomerata, primećena je i promena dimenzija štapića koje ove aglomerate grade. Ova faza analize hidroksiapatita u jednom obrnutom procesu razgradnje ultrazvučno formiranih suprastruktura pored toga što potvrđuje prethodno navedene tvrdnje o njihovoj strukturi, ukazuje i na mogućnost redukcije dimenzija ultrazvučno sintetisanih čestica. Njihovim daljim templiranjem u odgovarajućoj matrici, u ovom slučaju polimernoj, bilo bi moguće dobiti veoma sitne čestice kompozitnog materijala. Unutar kompozita bi se održale nano- dimenzije apatita bez aglomeracije ovog izuzetno adhezivnog materijala što je daljom analizom morfologije keramičkog dela kompozita i potvrđeno.

Zapravo, morfološka analiza keramičkog dela DLPLG/HAp kompozitnog materijala kod koga su čestice apatita odmah nakon ultrazvučnog sitnjenja obložene polimerom, pokazuje najbolje očuvanje njegovih nano-dimenzija.

Poznato je da pravilan izbor ultrazvučnih parametara, kao što su snaga, amplituda, preneti energija polja, geometrija aparature i zapremina tečnog medijuma, omogućava dizajniranje oblika i veličine čestica materijala u toku procesa sonokristalizacije.^{[6],[7],[8]} Dobijeni rezultati pokazuju reverzibilnost između formiranja i rušenja pločastih i štapićastih struktura hidroksiapatita i potvrđuju mogućnost dizajniranja njegovih strukturnih osobina u polju ultrazvuka.

VI

ZAKLJUČAK

U ovom magistarskom radu opisana je primena ultrazvuka najpre za sintezu hidroksiapatita metodom homogene sonohemijske precipitacije, zatim i za formiranje DLPLG/HAp kompozita metodom visoko-intenzitetskog ultrazvučnog procesiranja. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti sledeće:

- ❖ Optimizacijom koncentracije uree utvrđena je vrednost od $2 \cdot 10^{-2}$ M koja je neophodna da se pri sonohemijskim parametrima: $T=88^{\circ}\text{C}$, periodu radnog i relaksacionog režima 02:01 s, Amp.=80% i $P=600$ W metodom sonohemijske homogene precipitacije dobije monofazni hidroksiapatit. Utvrđeno je da koncentracija uree utiče na konačno dobijene produkte (od nje zavisi stepen transformacije smeše OCP-a u HAp), kao i na morfologiju i veličinu sintetisanih kristala (sa povećanjem koncentracije uree pločaste čestice HAp-a su većih dimenzija).
- ❖ Morfologiju čestica sonohemijski dobijenog hidroksiapatita gradile su pločaste suprastruktura mikronskih dimenzija izgrađene iz paralelno orijentisanih i bočno spojenih nano -štapića. Ovi nano-štapići su monokristali sa preferentnim pravcem rasta duž c-ose. U skladu sa tim, može se predložiti kristalni rast ovih pločastih struktura koji bi mogao da se odvija kroz rast nano-štapića u preferentnom pravcu i njihovo bočno vezivanje do mikronskih struktura.
- ❖ Prednosti sonohemijske u odnosu na klasičnu homogenu precipitaciju su: 1. vreme starenja, u toku koga se dešava reakcija u čvrstom stanju, je trajalo 12 h i znatno je kraće u odnosu na klasičnu homogenu precipitaciju u toku koje ovo vreme traje 48-100 h zavisno od temperature i 2. za razliku od štapića dužine 600 i širine 400 nm, klasičnom metodom su dobijene čestice veličine nekoliko mikrona.
- ❖ Deaglomeracijom HAp-a u polju ultrazvuka visokog intenziteta, koja u dosadašnjoj literaturi nije opisana, postignuta je promena morfologije (od pločaste do štapićaste) kao i smanjenje dimenzija prvobitnih pločastih struktura mikronskih dimenzija do manjih pločica širine 200-400 nm i dužine 400-600 nm nakon ultrazvučnog tretmana u trajanju od 10 minuta, preko štapića iste dužine i 100 nm širine nakon 20 minuta do iglica dužine 300 nm i širine 50 nm nakon 30 minuta.

- ❖ Po dosadašnjoj literaturi DLPLG je tretiran ultrazvučnim poljem niže snage. Nakon tretmana ultrazvukom veće snage (142.5 W) on je ostao hemijski stabilan i postignuto je poboljšanje morfologije sfernih čestica uz smanjenje njihovih dimenzija (100 do 200 nm) u poređenju sa dosadašnjim rezultatima.
- ❖ DLPLG/HAp kompozitni materijal je sintetisan primenom metode visoko-intenzitetskog ultrazvučnog procesiranja, koja do sad nije korišćena za dobijanje ovog materijala. Morfologiju kompozita su gradile nanometarske sferne čestice, veoma pravilnog oblika, glatkih površina, uske raspodele veličina i srednjeg dijametra sfera od 330 nm. Sferne čestice kompozita su imale karakterističnu planarnu prostornu organizaciju. Unutar ovih polimernih sfera nalazili su se nanometarski štapići HAp-a.
- ❖ Utvrđeni su optimalni parametri za dobijanje visoko-uređenih struktura izgrađenih iz nano-sfera DLPLG/HAp kompozita: DLPLG:HAp= 90:10 (mas.%), $P_{(\text{polja})} = 142.5 \text{ W}$, $T_{(\text{medijuma})} = 8^{\circ}\text{C}$, PVP kao stabilizator i neophodna homogenost pre i u momentu precipitacije polimera koja se postiže formiranjem fine suspenzije čestica apatita u rastvoru polimera.
- ❖ Postignuta pravilnost morfologije i nanometarska veličina čestica DLPLG/HAp kompozita unapređuje ovaj materijal sa stanovišta potencijalne primene u biomedicinskom inženjerstvu. Obzirom na veliku slobodnu površinu i posledično veliku adhezivnost DLPLG/HAp sfernih nano-čestica, ovaj materijal bi mogao da se iskoristi za izgradnju višeslojnog biomaterijala sa znatno unapređenim funkcionalnim osobinama. U skladu sa tim on bi, uz pretpostavljeno poboljšanje i drugih osobina koje zavise od morfologije, bio ozbiljan kandidat kao materijal za primenu u rekonstruktivnoj medicini. Sa druge strane, veliki udeo polimerne komponente (DLPLG:HAp=90:10) povlači sa sobom i veliki kapacitet za inkapsulaciju leka što otvara mogućnost primene ovog materijala za izradu biodegradabilnih implantata-nosača medikamenata koji se ugrađuju unutar namenski formiranih malih koštanih defekata i na taj način otpuštaju lek bez protoka kroz krvotok i opasnosti od smanjenja prohodnosti krvnih sudova.

Sadržaj slika

Slika 1: Sonohemijaska metoda i mikroskopski analizirana morfologija hidroksiapatita i poli(laktid-ko-glikolid)/hidroksiapatit kompozita

I TEORIJSKI DEO

Slika 1.1: Model prostiranja ultrazvučnog talasa i opseg frekvencija ultrazvuka ^{[37],[38]}

Slika 1.2: Shematski prikaz mehanizma interakcije ultrazvuka sa neelastičnim medijumom ^[38]

Slika 1.3: Sonohemijski parametri u poređenju sa parametrima drugih hemijskih metoda ^[45]

Slika 1.4: Sonoluminiscencija eksperimentalno registrovana u ultrazvučnoj sondi visokog intenziteta ^[45]

Slika 1.5: Kavitacioni regioni i njihovi parametri ^[53]

Slika 1.6: Shematski prikaz klasifikacije hemijskih i fizičkih efekata ultrazvuka i nekih njihovih primena

Slika 1.7: Ilustracija hemijskih efekata ultrazvuka u toku procesa polimerizacije ^[82]

Slika 1.8: Makroskopska promena izgleda materijala nakon ultrazvučnog formiranja kompozita ^[101]

Slika 1.9: Ilustracija interakcije biomaterijala sa živom ćelijom ^[117]

Slika 1.10: Struktura i ilustracija primene hidroksiapatita; (a) slučajna raspodela lanaca proteina, (b) uređena struktura prilikom vezivanja za neorganske komponente i (c) održanje uređenosti na makro- nivou ^{[120],[121]}

Slika 1.11: Ilustracija primene hidroksiapatita kao fillera (a), mogućnost modelovanja u cilju prilagođavanja oblika potrebama primene (b) i primer primene u rekonstrukciji koštanog tkiva šake (c). ^[134]

Slika 1.12: Ilustracija inkapsulacije proteina u PLGA za kontrolisanu dostavu ^[174]

Slika 1.13: Laktidna kiselina: (a) acimetrični C-atom, (b) L (+) laktidna i (c) D(-) laktidna kiselina ^{[179],[180]}

Slika 1.14: Hemijaska struktura poliglikolida (PGA), polilaktida (PLA) i poli(laktid-ko-glikolida) (PLGA) ^[181]

Slika 1.15: Poluvreme života PLGA kopolimera sa različitim sastavom laktidnih i glikolidnih monomera implantiranih u tkivo pacova. ^[183]

Slika 1.16: Krive otpuštanja TRH hormona iz PLGA mikrosfera sa različitim monomernim sastavom (a). Uticaj raspodele molekulskih masa na krive otpuštanja TRH hormona iz mikrosfera PLGA 75:25 (b) ^[183]

Slika 1.17: Raspodela veličina sfernih čestica PLGA formiranih u polju ultrazvuka. Bar na SEM mikrografijama je 1 μm . ^[196]

Slika 1.18: Ilustracija svojstava i primene biokompozita za rekonstrukciju koštanog tkiva ^[202]

III EKSPERIMENTALNI DEO

Slika 3.1: Shematski prikaz aparature koja je korišćena u procesu sonohemijske sinteze hidroksiapatita i njegovog oblaganja polimerom u cilju formiranja DLPLG/HAp kompozita

Slika 3.2: Shematski prikaz piezoelementa ^[236]

Slika 3.3: Shematski prikaz toka eksperimenta sa naznačenim koracima u ultrazvučnom procesiranju u kojima se dobijaju međuprodukti na putu do kompozitnog materijala.

Slika 3.4: Kalibraciona kriva korišćena u GPH metodi.

IV REZULTATI

Slika 4.1: Difraktogrami uzoraka 1-6 (Tabela 3.1s) sintetisanih u prisustvu različitih koncentracija uree: 1.0 10^{-2} M, (b) 1.2 10^{-2} M, (c) 1.6 10^{-2} M, (d) 2.0 10^{-2} M, (e) 3.0 10^{-2} M

Slika 4.2: Grafički prikaz eksperimentalnih i fitovanjem izračunatih vrednosti difrakcionog pika sa Milerovim indeksima (010) za uzorke 4 i 5 sa različitim sadržajem uree.

Slika 4.3: SEM mikrografije monofaznih apatitnih čestica sintetisanih u prisustvu različite koncentracije uree koja je iznosila : (a) $3 \cdot 10^{-2}$ M i (b) $2 \cdot 10^{-2}$ M.

Slika 4.4: IC spektar uzorka 5 sintetisanog u prisustvu granične koncentracije uree od $2 \cdot 10^{-2}$ M na kome su naznačene identifikovane trake hidroksiapatita

Slika 4.5: Grafički prikaz rezultata Ritveldove metode: eksperimentalni (— % Y_{posm}), izračunat (--- % Y_{izrac}) i rezultati (— % $Y_{\text{posm}} - Y_{\text{izrac}}$) razlike difrakcionih podataka (| % Bragove pozicije).

Slika 4.6: TEM mikrografija sonohemijski sintetisanih štapićastih kristala hidroksiapatita. Umetnuti insert predstavlja uvećani segment ivice strukture koji je na slici zaokružen.

Slika 4.7: TEM mikrografija (a) i grafik elektronske difrakcije (b) pojedinačnog nanoštapića hidroksiapatita sintetisanog homogenom sonohemijskom precipitacijom.

Slika 4.8: TEM mikrografija sonohemijski sintetisanog nanoštapićastog monokristala hidroksiapatita (a), HRTEM mikrografije segmenta monokristala sa 500 (b) i 800 (c) hiljada uvećanjem (desno) sa identifikovanim kristalografskim ravnima strukture hidroksiapatita

Slika 4.9: Shematska ilustracija strukture monokristala hidroksiapatita. Sive sfere označavaju Ca, bele H, crvene O i roze P atome. Slika predstavlja dvodimenzionu strukturu duž [100] pravca. Nanoštapići rastu preko [001] kristalne površine heksagonalnog hidroksiapatita.

Slika 4.10: SEM mikrografije ultrazvučno sitnjenih čestica hidroksiapatita poljem snage 600 W, amplitudom od 80 %, on : off režimom u trajanju od 02 : 01 s i vremenom tretiranja (a) 10 min., (b) 20 min. i (c) 30 min u inertnom etanolnom medijumu zapremine 10 ml.

Slika 4.11: FE SEM mikrografije HAp-a: nakon (a) 10 min. i (b) 20 min. sitnjenja; TEM mikrografije HAp-a: nakon 10 min. sitnjenja (c) i (d) u visoko-intenzitetskom polju ultrazvuka.

Slika 4.12: Infracrveni spektri čistog polimera tretiranog ultrazvučnim poljem snage (a) 50 W i (b) 142.5 W

Slika 4.13: SEM mikrografije DLPLG polimera ultrazvučno procesiranog u polju snage (a) 50W i (b) 142.5W

Slika 4.14: IC spektar čistog hidroksiapatita (a), DLPLG/HAp kompozita sa odnosom DLPLG : HAp = 90:10 (b) i kompozita sa odnosom DLPLG : HAp = 75 : 25 (c)

Slika 4.15: Difraktogrami kompozita sa odnosom DLPLG : HAp =75 : 25 (a) i 75 : 25 (b) i čistog hidroksiapatita (c).

Slika 4.16: Rezultati vrednosti raspodela molekulskih masa i njihovih srednjih vrednosti GPH metodom: DLPLG (komercijalni) (—), DLPLG (ultrazvuk, 8 °C) (—), DLPLG (ultrazvuk, 25 °C) (—), DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 25 °C) (—), DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 8 °C) (—).

Slika 4.17: C¹³-NMR spektar: (a) komercijalnog DLPLG, (b) DLPLG (ultrazvuk, 8°C), (c) DLPLG (ultrazvuk 25°C), (d) DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 25°C) i (e) DLPLG/HAp=90:10 (ultrazvuk, 8°C).

Slika 4.18: SEM mikrografije kompozita sa DLPLG:HAp=75:25 masenim odnosom formiranog na T~25°C u polju ultrazvuka snage (a) 50 W i (b) 142.5 W.

Slika 4.19: FE SEM mikrografije kompozita procesiranog u polju ultrazvuka na T=8°C sa odnosom DLPLG:HAp=90:10 (a, b) sa raspedelama veličina čestica (c, d) i raspodela veličina čestica kompozita sa odnosom DLPLG:HAp=75:25 (e) čija je morfologija prikazana na slikama f i g. Raspodela veličina čestica prikazana na slici d predstavlja uvećanu raspodelu koja se na slici c nalazi na manjim dijametrima.

Slika 4.20: SEM mikrografije DLPLG/HAp kompozita sintetisanog na (a) T = 8 °C i (b) T ~25 °C sa masenim odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 i na (c) T = 8 °C i (d) T ~25 °C sa masenim odnosom DLPLG:HAp = 75 : 25.

Slika 4.21: Planarna samoorganizacija sfernih čestica DLPLG/HAp kompozita sa maseni odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 sintetisanog na T = 8 °C: (a) izgled preseka ravni i (b) površina ravni izgrađena iz pravilno raspoređenih sfernih čestica.

Slika 4.22: «Grozdata» prostorna organizacija sfernih čestica većih dimenzija i planarna organizacija manjih sfera u uzorku sa masenim odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 sintetisanom na sobnoj temperaturi.

Slika 4.23: SEM mikrografije uzoraka DLPLG/HAp kompozitnog materijala formiranog u prisustvu PVA (a) i PVP) (b) kao stabilizatora

Slika 4.24: SEM mikrografije uzoraka kompozita sa masenim odnosom DLPLG : HAp = 90 : 10 sintetisanim na sniženoj temperaturi uz korišćenje (a) disperzija hidroksiapatita u etanolu i (b) apatita u polimeru.

Slika 4.25: TEM mikrografije štapića hidroksiapatita koji je nakon ultrazvučnog sitnjenja bio obložen polimerom

V DISKUSIJA

Slika 5.1: Shematski prikaz ustanovljenih zavisnosti između eksperimentalnih parametara i strukture, oblika i veličine čestica DLPLG/HAp kompozita u toku ultrazvučnog procesiranja

Sadržaj tabela

I TEORIJSKI DEO

Tabela 1.1: Kvantitativna analiza sonohemije pojedinačnog kavitacionog mehurića na 52 kHz.^[58]

Tabela 1.2: Osobine i primena PLA, PLG i PLGA polimera

Tabela 1.3: Klasifikacija biomaterijala za reparaciju koštanog tkiva

III EKSPERIMENTALNI DEO

Tabela 3.1: Parametri ultrazvučnog polja i koncentracije rastvora uree u toku procesa sinteze

Tabela 3.2: Eksperimentalni uslovi u procesu formiranja DLPLG/HAp komozita

Tabela 3.3: Kalibraciona tabela korišćena u GPH metodi

IV REZULTATI

Tabela 4.1: Promena veličine kristalita sa porastom koncentracije uree

Tabela 4.2: Asignacija traka detektovanih u IC spektru hidroksiapatita

Tabela 4.3: Pozicije jona i utučnjeni parametri sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita (uzorak 5).

Tabela 4.4: Strukturni parametri jedinične ćelije rešetke odgovarajućih standarda i sonohemijski sintetisanog hidroksiapatita.

Tabela 4.5: Mikrostrukturni parametri utučnjeni primenom Ritveldove metode

Tabela 4.6: Asignacija traka u IC spektru DLPLG kompozita

Tabela 4.7: Vrednosti srednjih molekulskih masa i polidisperznost dobijenih iz GPH merenja

Tabela 4.8: Rezultati integracije NMR pikova i izračunatih procentualnih udela laktidnih i glikolidnih monomernih jedinica (C^{13} - NMR)

Tabela 4.9: Srednje vrednosti veličina čestica DLPLG/HAp kompozita i vrednosti njihovih dijametara u određenom procentu merene zapramine.

LITERATURA

- [1] W. T. Richards, A. L. Loomis, "The chemical effects of high frequency sound waves I. A preliminary survey", *Journal of the American Chemical Society*, **49** (1927) p.p. 3086-3091.
- [2] K. S. Suslick, "Sonochemistry", *Science*, **247** (1990) p.p. 1439-1445.
- [3] D. F. Gaitan, L. A. Crum, C. C. Church, R. A. Roy, "Sonoluminescence and bubble dynamics for a single, stable, cavitation bubble", *Journal of the Acoustical Society of America*, **91** (1992) p.p. 3166-3183.
- [4] D. F. Gaitan, W. J. Lentz, A. A. Atchley, "Further investigation of a single, stable, sonoluminescing bubble using Mie scattering", *Journal of the Acoustical Society of America*, **91** (1992) p.p. 2331-2348.
- [5] P. Cintas, J. L. Luche, "The sonochemical approach", *Green Chemistry*, **1** (1999) p.p. 115-125.
- [6] M. D. Lique de Castro, F. Priego-Capote, "Ultrasound- assisted crystallization (sonocrystallization)" , *Ultrasonic Sonochemistry*, **14** (2007) p.p. 717-724.
- [7] H. Li, H. Li, Z. Guo, Y. Liu, "The application of power ultrasound to reaction crystallization", *Ultrasonics Sonochemistry*, **13** (2006) p.p. 359-363.
- [8] H. Li, J. Wang, Y. Bao, Z. Guo, M. Zhang, "Rapid sonocrystallization in the salting-out process", *Journal of Crystal Growth*, **247** (2003) p.p. 192-198.
- [9] O. Milošević, D. Uskoković, "Synthesis of BaTiO₃ and ZnO varistor precursor powders by means of the reaction spray pyrolysis", *Materials Science and Engineering A*, **168** (1993) p.p. 249-252.
- [10] O. Milošević, B. Jordović, D. Uskoković, "Preparation of fine spherical ZnO powders by an ultrasonic spray pyrolysis method", *Materials Letters*, **19** (1994) p.p. 165-170.
- [11] Z. V. Marinković, L. Mančić, R. Marić, O. Milošević, "Preparation of nanostructured Zn-Cr-O spinel powder by ultrasonic spray pyrolysis", *Journal of the European Ceramic Society*, **21** (2001) p.p. 2051-2055.
- [12] S. Grgurić-Sipka, T. Sabo, L. Mančić, O. Milošević, "Aerosol synthesis of ruthenium doped ZnO fine particles", *Journal of Aerosol Science*, **35** (2004) p.p. S183-184.
- [13] S. Stopić, I. Ilić, D. Uskoković, "Preparation and formation mechanism of submicrometer spherical NiO particles from water solution of NiCl₂ by ultrasonic spray pyrolysis", *Journal Science of Sintering*, **26** (1994) p.p. 145-156.
- [14] V. Jokanović, Đ. Janačković, A. Spasić, D. Uskoković, "Synthesis and formation mechanism of ultrafine spherical Al₂O₃ powders by ultrasonic spray pyrolysis", *Materials Transactions*, **37** (1996) p.p. 627-635.
- [15] Đ. Janačković, V. Jokanović, Lj. Kostić-Gvozdenović, "Synthesis of mulite nanostructured spherical powder by ultrasonic spray pyrolysis", *Nanostructured Materials*, **19** (1998) p.p. 333-339.

- [16] V. Jokanović, Đ. Janačković, R. Ćurčić, P. Živanović, "Synthesis of cordierite powder performed under the conditions of periodic ultrasonic field activity", *Materials Science Forum*, **282-283** (1998) p.p. 65-70.
- [17] Lj. Cerović, S. Milonjić, Lj. Živković, D. Uskoković, "Synthesis of spherical β -silicon carbide particles by ultrasonic spray pyrolysis", *Journal of the American Ceramic Society*, **79** (1996) p.p. 2215-2217.
- [18] J. M. Nedeljković, Z. V. Saponjić, Z. Rakočević, D. P. Uskoković, "Ultrasonic spray pyrolysis of TiO₂ nanoparticles", *Nanostructured Materials*, **9** (1997) p.p. 125-128.
- [19] S. R. Stopić, I. B. Ilić, J. M. Nedeljković, Z. Lj. Rakočević, D. P. Uskoković, "Influence of hydrogen spillover effect on the properties of Ni particles prepared by ultrasonic spray pyrolysis", *Spillover and Migration of Surface species on Catalysts*, **112** (1997) p.p. 103-110.
- [20] D. Jugović, N. Cvjetičanin, M. Mitrić, S. Mentus, D. Uskoković, "Comparison between different LiFePO₄ synthesis routes", *Materials Science Forum*, **555** (2007) p.p. 225-230.
- [21] D. Jugović, N. Cvjetičanin, V. Kusigerski, M. Mitrić, M. Miljković, D. Makovec, D. Uskoković, "Structural and magnetic characterization of LiMn_{1.825}Cr_{0.175}O₄ spinel obtained by ultrasonic spray pyrolysis", *Materials Research Bulletin*, **42** (2007) p.p. 515-522.
- [22] J. P. Marković, D. Jugović, M. Mitrić, D. Makovec, S. K. Milonjić, D. P. Uskoković, "Nanostructured ZrO₂ powder synthesis by ultrasonic spray pyrolysis", *Surface Review and Letters*, **14** (2007) p.p. 915-919.
- [23] I. Lj. Validžić, V. Jokanović, D. P. Uskoković, J. M. Nedeljković, "Influence of solvent on the structural and morphological properties of AgI particles prepared using ultrasonic spray pyrolysis", *Materials Chemistry and Physics*, **107** (2008) p.p. 28-32.
- [24] M. E. Rabanal, C. Morales, J. M. Torralba, L. Mančić, O. Milošević, "Gd₂O₃:Eu³⁺ phosphor particles processed through aerosol route", *Journal of the European Ceramic Society*, **25** (2005) p.p. 2023-2027.
- [25] O. Milošević, L. Mančić, M. E. Rabanal, B. Yang, P. D. Townsend, "Structural and luminescence properties of Gd₂O₃:Eu³⁺ and Y₃Al₅O₁₂:Ce³⁺ phosphor particles synthesized via aerosol", *Journal of Electrochemical Society*, **152** (2005) p.p. G707-713.
- [26] L. Mančić, G. del Rosario, Z. Marinković, O. Milošević, "Detailed structural characterization of phosphor YAG:Ce particles obtained via spray pyrolysis", *Materials Science Forum*, **518** (2006) p.p. 107-112.
- [27] V. Jokanović, A. Spasić, D. Uskoković, "Designing of nanostructured hollow TiO₂ spheres obtained by ultrasonic spray pyrolysis", *Journal of Colloid and Interface Science*, **278** (2004) p.p. 342-352.
- [28] V. Jokanović, D. Uskoković, "Calcium hydroxyapatite thin films on titanium substrates prepared by ultrasonic spray pyrolysis", *Materials Transactions*, **46** (2005) p.p. 228-235.
- [29] V. Jokanović, I. Nikčević, B. Dačić, D. Uskoković, "Synthesis of nanostructured carbonated calcium hydroxyapatite by spray pyrolysis", *Journal of Ceramic Processing Research*, **2** (2004) p.p. 157-162.

- [30] M. Radić, N. Ignjatović, D. Jugović, Z. Nedić, M. Mitrić, M. Miljković, "Synthesis of BCP and BCP/PLGA biomaterials by ultrasonic spray pyrolysis", *Proceedings of the 7th international conference of fundamental and applied aspects of physical chemistry*, **2** (2004) p.p. 487-489.
- [31] S. Marković, M. Mitrić, G. Starčević, D. Uskoković, "Ultrasonics de-agglomeration of barium titanate powder", *Ultrasonics Sonochemistry*, **15** (2008) p.p. 16-20.
- [32] D. Jugović, M. Mitrić, N. Cvjetičanin, B. Jančar, S. Mentus, D. Uskoković, "Synthesis and characterization of LiFePO₄/C composite obtained by sonochemical method", *Solid State Ionics*, **179** (2008) p.p. 415-419.
- [33] M. Stevanović, N. Ignjatović, B. Jordović, D. Uskoković, "Stereological analysis of the poly (DL-lactide-co-glycolide) submicron sphere prepared by solvent/non-solvent chemical methods and centrifugal processing", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18** (2007) p.p. 1339-1344.
- [34] M. Stevanović, J. Savić, B. Jordović, D. Uskoković, "Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **59** (2007) p.p. 215-223.
- [35] M. M. Stevanović, B. Jordović, D. P. Uskoković, "Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing ascorbic acid", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2007** (2007) p.p. 1-8.
- [36] D. P. Uskoković, N. L. Ignjatović (eds.), "Calcium phosphate ceramics- bioresorbable polymer composite biomaterials", *Institute of Technical Sciences of the Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade*, (2007).
- [37] <http://www.sonochemistry.info>
- [38] http://www.variclean_nl-images-d6_gif.mht
- [39] <http://en.wikipedia.org/wiki/ultrasound>
- [40] W. G. Pitt, G. A. Hussein, B. J. Staples, "Ultrasonic drug delivery- a general review", *Expert Opinion on Drug Delivery*, **1** (2004) p.p. 37-56.
- [41] M. Postema, G. Schmitz, "Ultrasonic bubbles in medicine: influence of the shell", *Ultrasonics Sonochemistry*, **14** (2007) p.p. 438-444.
- [42] W. G. Pitt, "Defining the role of ultrasound in drug delivery", *Journal of Drug Delivery*, **1** (2003) p.p. 27-42.
- [43] L. A. Crum, "Measurement of the growth of air bubbles by rectified diffusion", *Journal of the Acoustical Society of America*, **68** (1980) p.p. 203-211.
- [44] R. Pool, "Can sound drive fusion in a bubble?" , *Science*, **266** (1994) p.p. 1804-1814.
- [45] <http://www.scs.uiuc.edu>
- [46] W. B. McNamara III, Y. T. Didenko, K. S. Suslick, "Pressure during sonoluminescence", *Journal of Physical Chemistry B*, **107** (2003) p.p. 7303-7306.

- [47] K. S. Suslick, D. A. Hammerton, R. E. Cline, "The sonochemical hot spot", *Journal of the American Chemical Society*, **108** (1986) p.p. 5641-5642.
- [48] K. S. Suslick, R. E. Cline, D. A. Hammerton, "Determination of local temperatures caused by acoustic cavitation", *IEEE 1985 Ultrasonics Symposium*, **4** (1985) p.p. 1116-1121.
- [49] K. S. Suslick, R. E. Cline, D. A. Hammerton, "The site and nature of sonochemical reactions", *Ultrasonic International*, **5** (1985) p.p. 231-236.
- [50] W. Lauteborn, A. Vogel, "Modern optical techniques in fluid mechanics", *Annual Review of the Fluid Mechanics*, **16** (1984) p.p. 223-244.
- [51] S. J. Doktycz, K. S. Suslick, "Interparticle collisions driven by ultrasound", *Science*, **247** (1990) p.p. 1067-1069.
- [52] K. S. Suslick, "The yearbook of science and the future 1994", *Encyclopedia Britanica, Chicago*, (1994) p.p. 138-155.
- [53] <http://www.ceegs.ohio-state.edu>
- [54] J. Z. Sostaric, P. Riesz, "Sonochemistry of surfactants in aqueous solutions: an EPR spin-trapping study", *Journal of the American Chemical Society*, **123** (2001) p.p. 11010-11019.
- [55] M. A. Margulis, "Sonoluminescence and sonochemical reactions in cavitation fields. A review", *Ultrasonics*, **23** (1985) p.p. 157-169.
- [56] A. Weisler, I. Pecht, M. Anbar, "Ultrasound chemical effects on pure organic liquids", *Science*, **150** (1965) p.p. 1288-1289.
- [57] K. S. Suslick, J. W. Gawienowski, P. F. Schubert, H. H. Wang, "Sonochemistry in non-aqueous liquids", *Ultrasonics*, **22** (1984) p.p. 33-36.
- [58] Y. T. Didenko, K. S. Suslick, "The energy efficiency of formation of photons, radicals and ions during single-bubble cavitation", *Nature*, **418** (2002) p.p. 394-397.
- [59] K. S. Suslick, G. J., "Applications of ultrasound to materials chemistry", *Annual Review of the Materials Science*, **29** (1999) p.p. 295-326.
- [60] K. S. Suslick, D. J. Casadonte, M. L. H. Green, M. E. Thompson, "Effects of high intensity ultrasound on inorganic solids", *Ultrasonics*, **25** (1987) p.p. 56-59.
- [61] V. Raman, A. Abbas, "Experimental investigations on ultrasound mediated particle breakage", *Ultrasonic Sonochemistry*, **15** (2008) p.p. 55-64.
- [62] S. G. Thoma, M. Ciftcioglu, D. M. Smith, "Determination of agglomerate strength distributions Part 1. Calibration via ultrasonic forces", *Powder Technology*, **68** (1991) p.p. 53-61.

- [63] K. S. Suslick, D. J. Casadonte, S. J. Doktycz, "The effects of ultrasound on nickel and copper powders", *Solid State Ionics*, **32-33** (1989) p.p. 444-452.
- [64] K. Chatakondur, M. L. H. Green, M. E. Thompson, K. S. Suslick, "The enhancement of intercalation reactions by ultrasound", *Journal of the Chemical Society, Short communication*, **62** (1987) p.p. 900-901.
- [65] A. Gedanken, "Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials", *Ultrasonics Sonochemistry*, **11** (2004), p.p. 47-55.
- [66] K. S. Suslick, S. B. Choe, A. A. Cichowlas, M. W. Grinstaff, "Sonochemical synthesis of amorphous iron", *Nature*, **353** (1991) p.p. 414-416.
- [67] M. W. Grinstaff, A. A. Cichowlas, S. B. Choe, K. S. Suslick, "Effect of cavitation conditions on amorphous metal synthesis", *Ultrasonics*, **30** (1992) p.p. 168-172.
- [68] M. W. Grinstaff, M. B. Salamon, K. S. Suslick, "Magnetic properties of amorphous iron", *American Physical Society: Physical Review B*, **48** (1993) p.p. 269-273.
- [69] X. F. Qiu, J. J. Zhu, H. Y. Chen, "Controllable synthesis of nanocrystalline gold assembled whiskery structures via sonochemical route", *Journal of Crystal Growth*, **257** (2003), p.p. 378-383.
- [70] K. S. Suslick, P. F. Schubert, J. W. Goodale, "Sonochemistry and sonocatalysis of iron carbonyls", *Journal of American Chemical Society*, **103** (1981) p.p. 7342-7344.
- [71] R. Bellissent, G. Galli, T. Hyeon, S. Magazu, D. Majolino, P. Migliardo, K. S. Suslick, "Structural properties of amorphous bulk Fe, Co and Fe-Co binary alloys", *Physica Scripta*, **T57** (1995) p.p. 79-83.
- [72] K. V. P. M. Shafi, A. Gedanken, R. Prozorov, "Sonochemical preparation and characterization of nanosized amorphous Co-Ni alloy powders", *Journal of Materials Chemistry*, **B8** (1998) p.p. 769-773.
- [73] K. V. M. P. Shafi, A. Gedanken, R. B. Goldfarb, I. Felner, "Sonochemical preparation of nanosized amorphous Fe-Ni alloys", *Journal of Applied Physics*, **81** (1997) p.p. 6901-6905.
- [74] E. H. Kim, H. S. Lee, B. K. Kwak, B. K. Kim, "Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **289** (2005) p.p. 328-330.
- [75] H. L. Li, Y. C. Zhu, S. G. Chen, O. Palchik, J. P. Xiong, Y. Kolytyn, Y. Gofer, A. Gedanken, "A novel ultrasound-assisted approach to the synthesis of CdSe and CdS nanoparticles", *Journal of Solid State Chemistry*, **172** (2003) p.p. 102-110.
- [76] P. W. Cains, P. D. Martin, C. J. Price, "The use of ultrasound in industrial chemical synthesis and crystallization. 1. Applications to synthetic chemistry", *Organic Process Research and Development*, **2** (1998) p.p. 34-48.

- [77] R. B. Valitov, A. K. Kurochkin, M. A. Margulis, Y. V. Badikov, R. N. Galiakhmetov, "Chemical and physicochemical process in the fields created by hydroacoustic transmitters. I: Intensifying of the hydroacoustic field on several chemical reactions", *Russian Journal of Physical Chemistry*, **60** (1986) p.p. 889-892.
- [78] A. Polidori, B. Pucci, J. C. Maurizis, A. A. Pavia, "Synthesis of nonionic glycosidic surfactants derived from tris(hydroxymethyl)aminomethane, Preliminary assessment", *New Journal of Chemistry*, **18** (1994) p.p. 839-849.
- [79] T. J. Lu, S. M. Cheng, L. J. Sheu, "Ultrasound accelerated coupling reaction of Grignard reagents with 1,3-dioxolanes of α,β -ultrasaturated aldehydes", *Journal of Organic Chemistry*, **63** (1998) p.p. 2738-2741.
- [80] S. R. Toress, A. L. S. Vasquez, E. A. S. Gonzalez, "Novel syntheses of spiropyran photochromatic compounds using ultrasound", *Synthetic Communications*, **25** (1995) p.p. 105-110.
- [81] C. Hucho, M. Kraus, D. Maurer, V. Muller, "Ultrasonic investigations of $C_{60}C_{70}$ -compounds", *Physica B*, **194-196** (1994) p.p. 415-416.
- [82] <http://www.nanonanonano.net>
- [83] S. Koda, H. Mori, K. Matsumoto, H. Nomura, "Ultrasonic degradation of water-soluble polymers", *Polymer*, **35** (1994) p.p. 30-33.
- [84] M. V. Encina, E. Lissi, M. Sarasua, L. Gargallo, D. Radic, "Ultrasonic degradation of polyvinylpyrrolidone: effect of peroxide linkages", *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, **18** (1980) p.p. 757-760.
- [85] B. M. E. Van der Hoff, P. A. R. Glynn, "The rate of degradation by ultrasonation of polystyrene in solution", *Journal of Macromolecular Science*, **A8** (1974) p.p. 429-449.
- [86] T. W. Weidman, P. A. Bianconi, E. W. Kwock, "Sonochemical Na/K alloy emulsion synthesis of polysilynes", *Ultrasonics*, **28** (1990) p.p. 310-315.
- [87] G. J. Price, D. J. Norris, P. J. West, "Polymerization of methyl methacrylate initiated by ultrasound", *Macromolecules*, **25** (1992) p.p. 6447-6454.
- [88] P. Kruus, T. J. Patraboy, "Initiation of polymerization with ultrasound in methyl methacrylate", *Journal of Physical Chemistry*, **89** (1985) p.p. 3379-3384.
- [89] G. Cooper, F. Greiser, S. Biggs, "The effects of high-intensity ultrasound on the ring-opening polymerization of cyclic lactones", *Journal of Colloides and Interfaces*, **184** (1997) p.p. 52-63.
- [90] G. J. Price, E. J. Lenz, C. W. G. Ansell, "The effects of high-intensity ultrasound on the ring-opening polymerization of cyclic lactones", *European Polymer Journal*, **38** (2002) p.p. 1753-1760.
- [91] M. W. Urban, E. M. Salazar-Rojas, "Ultrasonic PTC modification of poly(vinylidene-fluoride) surfaces and their characterization", *Macromolecules*, **21** (1988) p. 372.

- [92] G. J. Price, F. Keen, A. A. Clifton, "Sonochemically-assisted modification of polyethylene surfaces", *Macromolecules*, **29** (1996) p.p. 5664-5670.
- [93] S. Avivi, Y. Nitzan, R. Dror, A. Gedanken, "An easy sonochemical route for the encapsulation of tetracycline in bovine serum albumin microspheres", *Journal of the American Chemical Society*, **125** (2003) p.p. 15712-15713.
- [94] K. J. Liu, M. W. Grinstaff, J. Jiang, K. S. Suslick, H. M. Swartz, W. Wang, "In vivo measurement of oxygen concentration using sonochemically synthesized microspheres", *Biophysical Journal*, **67** (1994) p.p. 896-901.
- [95] T. Kondo, V. Mišik, P. Riesz, "Sonochemistry of cytochrome c. Evidence for superoxide formation by ultrasound in argon-saturated aqueous solution", *Ultrasonics Sonochemistry*, **3** (1996) p.p. S193-S199.
- [96] S. Avivi, A. Gedanken, "The preparation of avidin microspheres using the sonochemical method and the interaction of the microspheres with biotin", *Ultrasonics Sonochemistry*, **12** (2005) p.p. 405-409.
- [97] K. S. Suslick, M. W. Grinstaff, K. J. Kolbeck, M. Wong, "Characterization of sonochemically prepared proteinaceous microspheres", *Ultrasonics Sonochemistry*, **1** (1994) p.p. S65-S68.
- [98] M. W. Grinstaff, K. S. Suslick, "Air-filled proteinaceous microbubbles: synthesis of an echo-contrast agent", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **88** (1991) p.p. 7708-7710.
- [99] K. S. Suslick, M. W. Grinstaff, "Protein microencapsulation of nonaqueous liquids", *Journal of the American Chemical Society*, **112** (1990) p.p. 7807-7809.
- [100] A. Gedanken, "Doping nanoparticles into polymers and ceramics using ultrasound radiation", *Ultrasonic Sonochemistry*, **14** (2007) p.p. 418-430.
- [101] <http://www.science24.com/paper/8443>
- [102] S. Wizel, R. Prozorov, Y. Cohen, D. Aurbach, S. Margel, A. Gedanken, "The preparation of metal-polymer composite materials using ultrasound radiation", *Journal of Materials Research*, **13** (1998) p.p. 211-216.
- [103] S. Wizel, S. Margel, A. Gedanken, "The preparation of metal-polymer composite materials using ultrasound radiation: Part II. Differences in physical properties of cobalt-polymer and iron-polymer composites", *Journal of Materials Research*, **14** (1999) p.p. 3913-3920.
- [104] S. Wizel, S. Margel, A. Gedanken, "The preparation of a polystyrene-iron composite by using ultrasound radiation", *Polymer International*, **49** (2000) p.p. 445-448.
- [105] R. V. Kumar, Y. Koltypin, Y. S. Cohen, Y. Cohen, D. Aurbach, O. Palchik, I. Felner, A. Gedanken, "Preparation of amorphous magnetite nanoparticles embedded in polyvinyl alcohol using ultrasound radiation", *Journal of Materials Chemistry*, **10** (2000) p.p. 1125-1129.

- [106] R. V. Kumar, R. Elgamiel, Y. Diamant, A. Gedanken, J. Norwing, "Sonochemical preparation and characterization of nanocrystalline copper oxide embedded in poly(vinyl alcohol) and its effects on crystal growth of copper oxide", *Langmuir*, **17** (2001), p.p. 1406-1410.
- [107] R. V. Kumar, Y. Mastai, A. Gedanken, "Sonochemical synthesis and characterization of nanocrystalline paramelaconite in polyaniline matrix", *Chemistry of Materials*, **12** (2000) p.p. 3892-3895.
- [108] M. Sivakumar, A. Gedanken, "A sonochemical method for the synthesis of polyaniline and Au-polyaniline composites using H₂O₂ for enhancing rate and yield", *Synthetic Metals*, **148** (2005) p.p. 301-306.
- [109] Y. Q. Liao, Q. Wang, H. S. Xia, "Preparation of poly(butyl methacrylate)/ γ -Al₂O₃ nanocomposites via ultrasonic irradiation", *Polymer International*, **50** (2001) p.p. 207-212.
- [110] H. S. Xia, Q. Wang, "Ultrasonic irradiation: a novel approach to prepare conductive polyaniline/nanocrystalline titanium oxide composites", *Chemistry of Materials*, **14** (2002) p.p. 2158-2165.
- [111] H. S. Xia, Q. Wang, "Preparation of conductive polyaniline/nanosilica particles composites through ultrasonic irradiation", *Journal of Applied Polymer Science*, **87** (2003) p.p. 1811-1817.
- [112] H. S. Xia, Q. Wang, G. H. Qui, "Polymer-encapsulated carbon nanotubes prepared through ultrasonically initiated in situ polymerization", *Chemistry of Materials*, **15** (2003) p.p. 3879-3886.
- [113] R. V. Kumar, O. Palchik, Y. Koltypin, Y. Diamant, A. Gedanken, "Sonochemical synthesis and characterization of Ag₂S/PVA and CuS/PVA nanocomposite", *Ultrasonic Sonochemistry*, **9** (2002) p.p. 65-70.
- [114] A. Petra, E. Sominska, S. Ramesh, Y. Koltypin, Z. Zhong, A. Gedanken, H. Minti, R. Reisfeld, "Sonochemical preparation and characterization of Eu₂O₃ and Tb₂O₃ doped in and coated on silica and alumina nanoparticles", *Journal of Physical Chemistry*, **B103** (1999) p.p. 3361-3365.
- [115] A. Gedanken, R. Reisfeld, E. Sominski, Y. Koltypin, O. Palchik, G. Panzer, M. Gaft, H. Minti, "Sonochemical preparation and characterization of europium oxide doped in and coated on ZrO₂ and yttrium-stabilized zirconia (YSZ)", *Journal of Physical Chemistry*, **B104** (2000) p.p. 7057-7065.
- [116] S. Seino, T. Kusunose, T. Sekino, T. Kinoshita, t. Nakagawa, Y. Kakimi, Y. Kawabe, J. Lida, T. A. Yamamoto, Y. Mizukoshi, "Synthesis of gold/magnetic iron oxide composite nanoparticles for biomedical applications with good dispersibility", *Journal of Applied Physics*, **99** (2006) p.p. 101-104.
- [117] <http://www.shef.ac.uk>
- [118] T. D. Price, M. J. Schoeninger, G. J. Armelagos, "Bone chemistry and past behavior: an overview", *Journal of Human Evolution*, **14** (1985), p.p. 419-447.
- [119] D. Tadić, M. Epple, "A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone", *Biomaterials*, **25** (2004), 987-994.

- [120] <http://www.abdn.ac.uk>
- [121] W. L. Murphy, D. J. Mooney, "Molecular-scale biomimicry", *Nature Biotechnology*, **20** (2002), p.p. 30-31.
- [122] X. Su, K. Sun, F. Z. Cui, W. J. Landis, "Organization of apatite crystals in human woven bone", *Bone*, **32** (2003) p.p. 150-162.
- [123] P. G. Koutsoukos, Z. Amjad, G. H. Nancollas, "The influence of phytate and phosphonate on the crystal growth of fluorapatite and hydroxyapatite", *Journal of Colloid and Interface Science*, **83** (1981), p.p. 599-605.
- [124] G. H. Nancollas, P. G. Koutsoukos, "Calcium phosphate nucleation and growth in solution", *Progress in Crystal Growth and Characterisation*, **3** (1980), p.p. 77-102.
- [125] E. C. Moreno, K. J. Varughese, "Crystal growth of calcium apatites from dilute solutions", *Journal of Crystal Growth*, **53** (1981), p.p. 20-30.
- [126] K. Onoma, "Recent research on pseudobiological hydroxyapatite crystal growth and phase transformation mechanisms", *Progress in Crystal Growth and Characterisation of Materials*, **52** (2006), 223-245.
- [127] W. E. Brown, J. P. Smith, J. R. Lehr, W. A. Frazier, "Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite", *Nature*, **196** (1962), p.p. 1050-1055.
- [128] M. S. Tung, W. E. Brown, "An intermediate state in hydrolysis of amorphous calcium phosphate", *Calcified Tissue International*, **35** (1983), p.p. 783-790.
- [129] R. Xin, Y. Leng, N. Wang, "In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation", *Journal of Crystal Growth*, **289** (2006), p.p. 339-344.
- [130] T. Koshino, W. Kubota, T. Moris, "Bone formation resulting from hydroxyapatite thermal decomposition product as bone cement", *Biomaterials*, **16** (1995) p.p. 125-128.
- [131] M. Itokazu, S. Kumazawa, E. Wada, Y. Wenyi, "Sustained release of andriamycin from implanted hydroxyapatite blocks for the treatment of experimental osteogenic sarcomain mice", *Cancer Letters*, **107** (1996) p.p. 11-18.
- [132] K. J. L. Burg, S. Porter, J. F. Kellam, "Biomaterials developments for tissue engineering", *Biomaterials*, **21** (2000) p.p. 2347-2359.
- [133] A. K. Dash, G. C. Cudworth, "Therapeutic applications of implantable drug delivery systems", *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **40** (1998) p.p. 1-12.
- [134] <http://www.innovants-report.com>
- [135] H. R. Ramay, M. Zhang, "Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of gel-casting and polymer sponge methods", *Biomaterials*, **24** (2003) p.p. 3293-3302.

- [136] L. M. Rodriguez-Lorenzo, J. M. F. Ferreira, "Development of porous ceramic bodies for application in tissue engineering and drug delivery systems", *Materials Research Bulletin*, **39** (2004) p.p. 83-91.
- [137] D. W. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage", *Biomaterials*, **21** (2000) p.p. 2529-2543.
- [138] V. L. Tsana, S. N. Bhatia, "Three-dimensional tissue fabrication", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56** (2004) p.p. 1635-1647.
- [139] H. W. Kim, J. C. Knowles, H. E. Kim, "Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(ϵ -caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings", *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, **B70** (2004) p.p. 240-249.
- [140] M. Böhner, J. Lemaitre, P. V. Landuyt, P. Y. Zambelli, H. P. Merkle, B. Gander, "Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **86** (1997) p.p. 565-572.
- [141] G. E. Holt, J. L. Halpern, T. T. Dovan, D. Hamming, H. S. Schwartz, "Evolution of an in vivo bioreactor", *Journal of Orthopedic Research*, **23** (2005) p.p. 916-923.
- [142] Y. Watanabe, T. Ikoma, Y. Suetsugu, H. Yamada, K. Tamura, Y. Komatsu, J. Tanaka, Y. Moriyoshi, "Type-A zeolites with hydroxyapatite surface layers formed by an ion exchange reaction", *Journal of the European Ceramic Society*, **26** (2006) p.p. 469-474.
- [143] S. Sugiyama, T. Ichii, H. Matsumoto, H. Hayashi, "Effect of calcination and aieving of calcium hydroxyapatite on ion-exchangeability with lead cation in the presence and absence of HCl", *Advances in Environmental Research*, **6** (2002) p.p. 285-289.
- [144] S. Sugiyamai, H. Matsumoto, H. Hayashi, J. B. Moffat, "Sorption and ion-exchange properties of barium hydroxyapatite with divalent cations", *Colloids ans Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **169** (2000) p.p. 17-26.
- [145] S. Sugiyama, T. Moriga, M. Goda, H. Hayashi, J. B. Moffat, "Effects of fine structure changes of strontium hydroxyapatites on ion-exchange properties with divalent cations", *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **92** (1996) p.p. 4305-4310.
- [146] H. Tanaka, Y. Nuno, S. Irie, S. Shimomura, "Absorption mechanism of polylysine on hydroxyapatite and its effect on dissolution properties of hydroxyapatite", *Talanta*, **39** (1992) p.p. 893-898.
- [147] R. Suen, S. Lin, W. Hsu, "Hydroxyapatite-based immobilized metal affinity adsorbents for protein purification", *Journal of Chromatography A*, **1048** (2004) p.p. 31-39.
- [148] M. P. Reddy, a. Venugopal, M. Subrahmanyam, "Hydroxyapatite photocatalytic degradation of calmagite (an azo dye) in aqueous suspension", *Applied Catalysis B: Environmental*, **69** (2007), p. p. 164-170.

- [149] R. Tahir, K. Banert, S. Sebti, "Natural and synthetic phosphates: new and clean heterogeneous catalysis for the synthesis of 5-arylhydantoin", *Applied Catalysis A: General*, **298** (2006) p.p. 261-264.
- [150] X. Y. Pang, X. Bao, "Influence of the temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles", *Journal of the European Ceramic Society*, **23** (2003) p.p. 1697-1704.
- [151] M. C. Cuo, S. K. Yen, "The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature", *Materials Science and Engineering C*, **20** (2002), p.p. 153-160.
- [152] G. Bezzi, G. Celloti, E. Landi, T. M. G. la Torretta, I. Soryan, A. Tampieri, "A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation", *Materials Chemistry and Physics*, **78** (2003) p.p. 816-824.
- [153] X. Zhang, K. S. Vecchio, "Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods", *Journal of Crystal Growth*, **308** (2007), p.p. 133-140.
- [154] G. K. Lim, J. Wang, S. C. Ng, L. M. Gan, "Formation of nanocrystalline hydroxyapatite in nonionic surfactant emulsions", *Langmuir*, **15** (1999), p.p. 7472-7477.
- [155] S. Bose, S. K. Saha, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique", *Chemistry of Materials*, **15** (2003) p.p. 4464-4469.
- [156] P. Parhi, A. Ramanan, A. R. Ray, "Synthesis of nano-sized alkaline-earth hydroxyapatites through microwave assisted metathesis route", *Materials Letters*, **60** (2006) p.p. 218-221.
- [157] A. Wang, D. Liu, H. Yin, H. Wu, Y. Wada, M. Ren, T. Jiang, X. Cheng, Y. Xu, "Size-controlled synthesis of hydroxyapatite nanorods by chemical precipitation in the presence of organic modifiers", *Materials Science and Engineering C*, **27** (2007) p.p. 865-869.
- [158] A. Mochales, H. E. B. BenAbdeslam, M. P. Ginebra, A. Terol, J. A. Planell, P. Boudeville, "Dry mechanochemical synthesis of hydroxyapatite from DCPD and CaO: influence of instrumental parameters on the reaction kinetics", *Biomaterials*, **25** (2004) p.p. 1151-1158.
- [159] R. Kumar, P. Cheang, K. A. Khor, "RF plasma processing of ultra-fine hydroxyapatite powders", *Journal of Materials Processing Technology*, **113** (2001) p.p. 456-462.
- [160] P. Luo, T. G. Nieh, "Synthesis of ultrafine hydroxyapatite particles by a spray dry method", *Materials Science and Engineering C*, **3** (1995) p.p. 75-78.
- [161] Y. C. Han, S. P. Li, X. Y. Wang, X. M. Chen, "Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by citric acid sol-gel combustion method", *Materials Research Bulletin*, **39** (2004) p.p. 25-32.
- [162] V. Shukla, G. S. Elliott, B. H. Kear, "Hyperkinetic deposition of nanopowders by supersonic rectangular jet impingement", *Scripta Materialia*, **44** (2001) p.p. 2179-2182.

- [163] K. Itatani, K. Iwafune, F. S. Howell, M. Aizawa, "Preparation of various calcium-phosphate powders by ultrasonic spray freeze-drying technique", *Materials Research Bulletin*, **35** (2000) p.p. 575-585.
- [164] H. Zhang, Y. Wang, Y. Yan, S. Li, "Precipitation of biocompatible hydroxyapatite whiskers of moderately acid solution", *Ceramics International*, **29** (2003) p.p. 413-418.
- [165] M. Aizawa, A. E. Porter, S. M. Best, W. Bonfield, "Ultrastructural observation of single-crystal apatite fibers", *Biomaterials*, **26** (2005) p.p. 3427-3433.
- [166] J. Pena, M. V. Regi, "Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique", *Journal of European Ceramics Society*, **23** (2003) p.p. 1687-1696.
- [167] W. Kim, F. Saito, "Sonochemical synthesis of hydroxyapatite from H₃PO₄ solution with Ca(OH)₂", *Ultrasonic Sonochemistry*, **8** (2001) p.p. 85-88.
- [168] M. de Campos, F. A. Müller, A. H. A. Bressiani, J. C. Bressiani, P. Greil, "Sonochemical synthesis of calcium phosphate powders", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18** (2007) p.p. 669-675.
- [169] L. Cao, C. Zhang, J. Huang, "Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation", *Ceramics International*, **31** (2005) p.p. 1041-1044.
- [170] L. Cao, C. Zhang, J. Huang, "Influence of temperature, [Ca²⁺], Ca/P ratio, and ultrasonic power on the crystallinity and morphology of hydroxyapatite nanoparticles prepared with a novel ultrasonic precipitation method", *Materials Letters*, **59** (2005) p.p. 1902-1906.
- [171] M. Jevtić, D. Uskoković, "Influence of urea as a homogeneous precipitation agent on sonochemical hydroxyapatite synthesis", *Materials Science Forum*, **555** (2007) p.p. 285-290.
- [172] Y. Han, S. Li, X. Wang, I. Bauer, M. Yin, "Sonochemical preparation of hydroxyapatite nanoparticles stabilized by glycosaminoglycans", *Ultrasonic Sonochemistry*, **14** (2007) p.p. 286-290.
- [173] Y. Han, S. Li, X. Wang, L. Jia, J. He, "Preparation of hydroxyapatite rod-like crystals by protein precursor method", *Materials Research Bulletin*, **42** (2007) p.p. 1169-1177.
- [174] <http://www.src.org>
- [175] A. E. Holy, C. Cheng, J. E. Davis, M. S. Shoichet, "Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering", *Biomaterials*, **22** (2001) p.p. 25-31.
- [176] A. Sun, B. Ranganathan, S. Feng, "Multifunctional poly(l,d,l-actide-co-glycolide) montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for target chemotherapy of breast cancer", *Biomaterials*, **29** (2008) p.p. 475-486.
- [177] A. Taluja, Y. S. Youn, Y. H. Bae, "Novel approaches in microparticulate PLGA delivery systems encapsulating proteins", *Journal of Materials Chemistry*, **17** (2007), p.p. 4002-4014.

- [178] M. N. V. Ravi Kumar, U. Bakowsky, C. M. Lehr, "Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers", *Biomaterials*, **25** (2004) p.p. 1771-1777.
- [179] <http://www.chemguide.co.uk>.
- [180] <http://www.ch.ic.ac.uk>.
- [181] <http://www.drugdeliverytech.com>
- [182] M. S. Shive, J. M. Anderson, "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres", *Advanced Drug Delivery Review*, **28** (1997) p.p. 5-24.
- [183] <http://www.wako-chem.co.jp>.
- [184] T. Heya, H. Okada, Y. Ogawa, H. Toguchi, "Factors influencing the profiles of TRH release from copoly(d,l-lactic/glycolic acid) microspheres", *International Journal of Pharmaceutics*, **72** (1991) p.p. 199-205.
- [185] M. L. T. Zweers, G. H. M. Engbers, D. W. Grijpma, J. Feijen, "In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)", *Journal of Controlled Release*, **100** (2004) p.p. 347-356.
- [186] T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, Y. Kawashima, "Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with d,l-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior", *Journal of Controlled Release*, **25** (1993) p.p. 89-98.
- [187] S. W. Choi, H. Y. Kwon, W. S. Kim, J. H. Kim, "Thermodynamic parameters on poly(d,l-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **201** (2002) p.p. 283-289.
- [188] A. Quintanar-Guerrero, A. Ganem-Quintanar, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, "Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(d,l-lactide acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique", *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers*, **15** (1998) p.p. 107-119.
- [189] H. Fessi, F. Piusieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement", *International Journal of Pharmaceutics*, **55** (1989) p.p. R1-4.
- [190] A. Allemann, R. Gurny, E. Doelker, "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size", *International Journal of Pharmaceutics*, **87** (1992) p.p. 247-253.
- [191] C. E. Astete, C. M. Sabliov, "Synthesis of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles with entrapped magnetite in the polymeric matrix by emulsion evaporation", *Particulate Science and Technology*, **24** (2006) p.p. 321-328.

- [192] S. Mao, Y. Shi, L. Li, J. Xu, A. Schaper, T. Kissel, "Effects of process and formation parameters on characteristics and internal morphology of poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68** (2008), p.p. 214-223.
- [193] R. T. Liggins, H. M. Burt, "Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations", *Advanced Drug Delivery Review*, **54** (2002) p.p. 191-202.
- [194] V. Hoffart, N. Ubrich, C. Simonin, V. Babak, C. Vigneron, M. Hoffman, T. Lecompte, P. Maincent, "Low molecular weight heparin-loaded polymeric nanoparticles: formation, characterization and release characteristics", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **28** (2002) p.p. 1091-1099.
- [195] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, "Sonication parameters for the preparation of biodegradable nanocapsules of controlled size by the double emulsion method", *Pharmaceutical Development and Technology*, **8** (2003) p.p.1-9.
- [196] S. Freitas, G. Hielscher, H. P. Merkle, B. Gander, "Continuous contact- and contamination- free ultrasonic emulsification- a useful tool for pharmaceutical development and production", *Ultrasonics Sonochemistry*, **13** (2006) p.p. 76-85.
- [197] S. Freitas, B. Rudolf, H. P. Merkle, B. Gander, "Flow-through ultrasonic emulsification combined with static micromixing for aseptic production of microspheres by solvent extraction", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **61** (2005) p.p. 181-187.
- [198] H. Jin-Tian, S. Hua-Bo, L. Guo-Ping, T. Xian-Mei, M. Wei, S. Hou-Yan, "Stabilisation and encapsulation of a staphylokinase variant (K35R) into poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres", *International Journal of Pharmaceutics*, **309** (2006) p.p. 101-108.
- [199] Ch. B. Felder, M. J. Blanco-Prieto, J. Heizmann, H. P. Merkle, B. Gander, "Ultrasonic atomization and subsequent polymer desolvation for peptide and protein microencapsulation into biodegradable polyesters", *Journal of Microencapsulation*, **20** (2003) p.p. 553-567.
- [200] S. Freitas, H. P. Merkle, B. Gander, "Ultrasonic atomisation into reduced pressure atmosphere- envisaging aseptic spray- drying for microencapsulation", *Journal of Controlled Release*, **95** (2004) p.p. 185-195.
- [201] J. H. Park, M. Ye, Y. Yeo, W. K. Lee, c. Paul, K. Park, "Reservoir- type microcapsules prepared by the solvent exchange method: effect of formulation parameters on microencapsulation of lysozyme", *Molecular Pharmaceutics*, **3** (2006) p.p. 135-143.
- [202] <http://www2.warwich.ac.uk>
- [203] I. Shishkovsky, Y. Morozov, I. Smurov, "Nanofractal surface structure under laser sintering of titanium and nitinol for bone tissue engineering", *Applied Surface Science*, **254** (2007) p.p. 1145-1149.

- [204] N. Namura, T. Kohama, I. H. Oh, S. Hanada, A. Chiba, M. Kanehira, K. Sasaki, "Mechanical properties of porous Ti-15Mo-5Zr-3Al compacts prepared by powder sintering", *Materials Science and Engineering C*, **25** (2005) p.p. 330-335.
- [205] A. Vadiraj, M. Kamaraj, "Characterization of fretting fatigue damage on PVD TiN coated biomedical titanium alloys", *Surface and Coatings Technology*, **200** (2006) p.p. 4538-4542.
- [206] K. E. Salyer, H. T. Newsom, R. Holmes, G. Hahn, "Mandibular reconstruction", *The American Journal of Surgery*, **134** (1977) p.p. 461-464.
- [207] J. A. Hunt, J. T. Callaghan, C. J. Sutcliffe, R. H. Morgan, B. Halford, R. A. Black, "The design and production of Co-Cr alloy implants with controlled surface topography by CAD-CAM method and their effects on osseointegration", *Biomaterials*, **26** (2005) p.p. 5890-5897.
- [208] K. Jahnke, D. Plester, G. Heimke, "Experiences with Al₂O₃-ceramic middle ear implants", *Biomaterials*, **4** (1983), p.p. 137-138.
- [209] P. F. Manicone, P. R. Lommetti, L. Raffaelli, "An overview of zirconia ceramics: basic properties and clinical applications", *Journal of Dentistry*, **35** (2007) p.p. 819-826.
- [210] W. Liang, M. N. Rahaman, D. E. Day, N. W. Marion, G. C. Riley, J. J. Mao, "Bioactive borate glass scaffolds for bone tissue engineering", *Journal of Non Crystalline Solids*, **354** (2008) p.p. 1690-1696.
- [211] W. R. Walsh, F. Vizesi, D. Michael, J. Auld, A. Langdown, R. Oliver, Y. Yu, H. Irie, W. Bruce, "β-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model", *Biomaterials*, **29** (2008) p.p. 266-271.
- [212] K. S. Vecchio, X. Zhang, J. B. Massie, M. Wang, C. W. Kim, "Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants", *Acta Biomaterialia*, **3** (2007) p.p. 910-918.
- [213] B. Stadlinger, E. Pilling, M. Huhle, R. Mai, S. Bierbaum, D. Scharnweber, E. Kuhlisch, R. Loukota, U. Eckelt, "Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study", *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **37** (2008) p.p. 54-59.
- [214] H. Igai, Y. Yamamoto, S. S. Chang, M. Yamamoto, Y. Tabata, H. Yokonise, "Tracheal cartilage regeneration by slow release of basic fibroblast growth factor from a gelatin sponge", *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **134** (2007) p.p. 170-175.
- [215] D. Howard, K. Partridge, X. Yang, M. M. P. Clarke, Y. Okubo, K. Bessho, S. M. Howdle, K. M. Shakesheff, R. O. Oreffo, "Imunoselection and adenoviral genetic modulation of human osteoprogenitors: in vivo bone formation on PLA scaffolds", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **299** (2002) p.p. 208-215.
- [216] V. Vanionpaa, J. Kilpikari, J. Laiho, P. Helevirta, P. Rokkanen, P. Tormala, "Strength and strength retention vitro, of absorbable, self-reinforced polyglycolide (PGA) rods for fracture fixation", *Biomaterials*, **8** (1987) p.p. 46-48.

- [217] R. D. Toro, W. Betti, S. Spampinato, "Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(d,l-lactide-co-glycolide) copolymers", *European Journal of Pharmaceuticals Sciences*, **21** (2004) p.p. 161-169.
- [218] L. Savarino, N. Baldini, M. Greco, O. Capitani, S. Pinna, S. Valentini, B. Lombardo, M. T. Esposito, L. Pastore, L. Ambrosio, S. Battista, F. Causa, S. Zeppetelli, V. Guarino, P. A. Netti, "The performance of poly- ϵ -caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4", *Biomaterials*, **28** (2007) p.p. 3101-3109.
- [219] A. Race, K. A. Mann, A. A. Edidin, "Mechanics of bone PMMA/composite structures: an in vitro study of human vertebrae", *Journal of Biomechanics*, **40** (2007) p.p. 1002-1010.
- [220] S. Yunoki, T. Ikoma, A. Monkawa, K. Ohta, M. Kikuchi, S. Sotome, K. Shinomiya, J. Tanaka, "Control of pore structure and mechanical property of hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth", *Materials Letters*, **60** (2006) p.p. 999-1002.
- [221] S. Teng, L. Chen, Y. Guo, J. Shi, "Formation of nano-hydroxyapatite in gelatin droplets and the resulting porous composite microspheres", *Journal of Inorganic Biochemistry*, **101** (2007) p.p. 686-691.
- [222] P. S. Uskoković, C. Y. Tang, C. P. Tsui, N. Ignjatović, D. P. Uskoković, "Micromechanical properties of a hydroxyapatite/poly-l-lactide biocomposite using nanoindentation and modulus mapping", *Journal of the European Ceramic Society*, **27** (2007) p.p. 1559-1564.
- [223] Y. C. Fu, M. L. Ho, S. C. Wu, H. S. Hsieh, C. K. Wang, "Porous bioceramic bead prepared by calcium phosphate with sodium alginate gel and PE powder", *Materials Science and Engineering C*, (2007) doi: 10.1016/j.msec.2007.09.001., *In Press, Corrected Proof*.
- [224] Y. Zhang, L. Zhou, D. Li, N. Xue, X. Hu, J. Li, "Oriented nano-structured hydroxyapatite from the template", *Chemical Physics Letters*, **376** (2003) p.p. 493-497.
- [225] Z. Hong, P. Zhang, C. He, X. Qiu, A. Liu, L. Chen, X. Chen, X. Jing, "Nano-composite of poly(l-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility", *Biomaterials*, **26** (2005) p.p. 6296-6304.
- [226] K. A. Gross, L. M. Luis, M. Rodriguez-Lorenzo, "Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering", *Biomaterials*, **25** (2004) p.p. 4955-4962.
- [227] R. Zhang, P. X. Ma, "Poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. I Preparation and morphology", *Journal of Biomedical Materials Research*, **44** (1999) p.p. 446-455.
- [228] H. Nie, C. H. Wang, "Fabrication and characterisation of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA", *Journal of Controlled Release*, **120** (2007) p.p. 111-121.

- [229] Y. C. Fu, H. Nie, M. L. Ho, C. K. Wang, C. H. Wang, "Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2", *Biotechnology and Bioengineering*, **99** (2008), p.p. 996-1006.
- [230] Ignjatović, Z. Ajduković, D. Uskoković, "New biocomposite (biphasic calcium phosphate/poly-DL-lactide-co-glycolide/biostimulative agent) filler for reconstruction of bone tissue changed by osteoporosis", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **16** (2005) p.p. 621-626.
- [231] Z. Ajduković, N. Ignjatović, D. Petrović, D. Uskoković, "Substitution of osteoporotic alveolar bone by biphasic calcium phosphate/poly-d,l-lactide-co-glycolide biomaterials", *Journal of Biomaterials Application*, **21** (2007) p.p. 317-328.
- [232] N. L. Ignjatović, C. Z. Liu, J. T. Czernuszka, D. P. Uskoković, "Micro- and nano-injectable composite biomaterials containing calcium phosphate coated with poly(dl-lactide-co-glycolide)", *Acta Biomaterialia*, **3** (2007) p.p. 927-935.
- [233] N. Ignjatović, P. Ninkov, Z. Ajduković, D. Vasiljević-Radović, D. Uskoković, "Biphasic calcium phosphate coated with poly-d,l-lactide-co-glycolide biomaterial as a bone substitute", *Journal of European Ceramic Society*, **27** (2007) p.p. 1589-1594.
- [234] V. Hasirci, K. U. Lewandrowski, S. P. Bondre, J. D. Gresser, D. J. Trantolo, D. L. Wise, "High strength bioresorbable bone plates: preparation, mechanical properties and in vitro analysis", *Bio-Medical Materials and Engineering*, **10** (2000) p.p. 19-29.
- [235] C. Durucan, P. W. Brown, "Calcium-deficient hydroxyapatite- PLGA composites: Mechanical and microstructural analysis", *Journal of Biomedical Materials Research*, **51** (2000) p.p. 726-734.
- [236] <http://www.askoki.co.uk>
- [237] R. J. Carvajal, "FULLPROOF- A program for Rietveld Refinement", *Laboratoire Leon Brillouin: CEA-Saclay, France*, 2000.
- [238] H. M. Rietveld, "A profile refinement method for nuclear and magnetic structures", *Journal of Applied Crystallography*, **2** (1969) p.p. 65-71.
- [239] P. Thompson, D. E. Cox, J. B. Hastings, "Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron X-ray data for Al₂O₃", *Journal of Applied Crystallography*, **20** (1987) p.p. 79-83.
- [240] A. G. Hausberger, P. P. DeLuca, "Characterization of biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **13** (1995) p.p. 747-760.
- [241] K. C. Blakeslee, R. A. Condrate, "Vibrational Spectra of Hydrothermally Prepared Hydroxyapatites", *Journal of The American Ceramic Society*, **54** (1971) p.p. 559-563.
- [242] H. Monma, T. Takashshi, "Vibrational spectra of hydroxyapatite", *Gypsum Lime*, **210** (1987) p.p. 287-291.

- [243] B. Chen, C. Liang, "Preparation of hydroxyapatite coating by the use of a sacrificial Mg anode method", *Ceramics International*, **33** (2007) p.p. 701-703.
- [244] M. Aizawa, H. Ueno, K. Itatani, I. Okada, "Synthesis of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations", *Journal of European Ceramic Society*, **26** (2006) p.p. 501-507.
- [245] M. Marković, B. O. Flower, M. S. Tung, "Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material", *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, **109** (2004) p.p. 553-568.
- [246] J. H. Morgan, R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, P. Anderson, "Preparation and characterization of monoclinic hydroxyapatite and its precipitated carbonate apatite intermediate", *Biomaterials*, **21** (2000) p.p. 617-627.
- [247] R. A. Young, D. W. Holcomb, "Variability of hydroxyapatite preparations", *Calcified Tissue International*, **34** (1982) p.p. 17-32.
- [248] R. Murugan, S. Ramacrishna, "Crystallographic study of hydroxyapatite bioceramics derived from various sources", *Crystal Growth and Design*, **5** (2005) p.p. 111-112.
- [249] K. Dillen, J. Vandervoort, G. Van der Mooter, L. Verheyden, A. Ludwig, "Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, **275** (2004), p.p. 171-187.
- [250] S. A. Seo, H. S. Choi, G. Khang, J. M. Rhee, H. B. Lee, "A local delivery system for fentanyl based on biodegradable poly(l-lactide-co-glycolide) oligomer", *International Journal of Pharmaceutics*, **239** (2002) p.p. 93-101.
- [251] H. Zhang, S. Gao, "Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against Glioma C6 cancers cells in vitro", *International Journal of Pharmaceutics*, **329** (2007), 122-128.
- [252] P. Moens, F. Callens, P. Matthys, F. Maes, R. Verbeeck, D. Naessens, "Adsorption of carbonate-derived molecules on the surface of carbonate-containing apatites", *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions*, **87** (1991), p.p. 3137-3141.
- [253] Jillavenkatesa, R. A. Condrate, "Sol-gel processing of hydroxyapatite", *Journal of Materials Science*, **33** (1998) p.p. 4111-4119.
- [254] J. Huang, L. Gao, "Anisotropic growth of In(OH)₃ nanocubes to nanorods and nanosheets via a solution-based seed method", *Crystal Growth and Design*, **6** (2006) p.p. 1528-1532.
- [255] M. Jevtić, M. Mitrić, S. Škapin, B. Jančar, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Crystal structure of hydroxyapatite nano-rods synthesized by sonochemical homogeneous precipitation", *Crystal Growth and Design*, (2008), accepted.

- [256] W. B. McNamara, Y. T. Didenko, K. S. Suslick, "Sonoluminescence temperatures during multi-bubble cavitation", *Nature*, **401** (1999) p.p. 772-775.
- [257] K. S. Suslick, S. J. Doktycz, "On the origin of sonoluminescence and sonochemistry", *Ultrasonics*, **28** (1990) 280-290.
- [258] H. Wang, Y. Lu, J. Zhu, H. Chen, "Sonochemical fabrication and characterization of stibnite nanorods", *Inorganic Chemistry*, **42** (2003) 6404-6411.

Objavljeni rezultati koji čine deo teze

Delovi teze publikovani su u naučnim časopisima i materijalima naučnih skupova, a spisak tih publikacija je sledeći:

Rad u časopisu međunarodnog značaja R_{51a}

- M. Jevtić, M. Mitrić, S. Škapin, B. Jančar, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Crystal structure of hydroxyapatite nano-rods synthesized by sonochemical homogeneous precipitation", *Crystal Growth and Design*, (2008), accepted.

Rad u časopisu međunarodnog značaja R₅₂

- M. Jevtić, D. Uskoković, "Influence of urea as a homogeneous precipitation agent on sonochemical hydroxyapatite synthesis", *Materials Science Forum*, 555 (2007) 285-290.

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja, štampan u izvodu R₇₃

- M. Jevtić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Homogena sonohemijska precipitacija hidroksiapatita i uticaj stabilizatora na njegovu morfologiju", *Peti seminar mladih istraživača*, 25.-26. decembar 2006. SANU, zbornik abstrakata.
- M. Jevtić, A. Radulović, M. Mitrić, N. Ignjatović, S. Skapin, D. Uskoković, "Uticaj sintetskih parametara na morfologiju ultrazvučno sintetisanog DLPLG/HAp biokompozita", *Šesta konferencija mladih istraživača*, 24.-26. decembar 2007. SANU, zbornik abstrakata.

Rad saopšten na međunarodnom naučnom skupu štampan kao izvod

- M. Jevtić, N. Ignjatović, M. Mitrić, D. Uskoković, "Ultrasound synthesis of poly-DL-lactide-co-glycolide/hydroxyapatite core-shell nano-spheres", *8th World Biomaterials Conference, Book of Abstracts*, 2008.
- M. Jevtić, S. Škapin, E. Žagar, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Composition, morphology and structure of DLPLG/HAp nanocomposite fabricated in the field of ultrasound", *WomenInNano Winter School, Book of Abstracts*, 2008.

- M. Jevtić, M. Mitrić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Sonochemical Preparation of Hydroxyapatite / Poly (lactide-co-glycolyde) Composite", 9th Conference of the Yugoslav Materials Science- YUCOMAT 2007, Book of Abstracts, 0/1 p. 1.
- M. Jevtić, M. Mitrić, N. Ignjatović, D. Uskoković, "Sonochemical Synthesis of Hydroxyapatite Using Homogeneous Precipitation Agent- Urea", 8th Conference of Yugoslav Materials Research Society –YUCOMAT 2006, Book of Abstracts, 2006, V/3 p. 17.