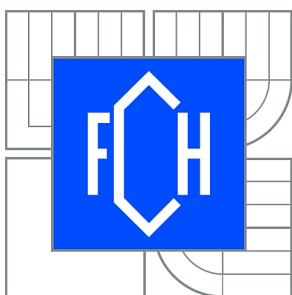




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

MOŽNOSTI VYUŽITÍ POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ PRO KOSMETICKÉ A MEDICÍNSKÉ APLIKACE

UTILIZATION OF THE POLYELECTROLYTE COMPLEXES IN MEDICINE AND COSMETICS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

IVA KARÁSKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR SEDLÁČEK, Ph.D.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0794/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Iva Karásková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Petr Sedláček, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Jiří Smilek	

Název bakalářské práce:

Možnosti využití polyelektrolytových komplexů pro kosmetické a medicínské aplikace

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat literární rešerši na dané téma se zvláštním zaměřením na huminové látky a chitosan coby kandidáty pro přípravu polyelektrolytových komplexů.
- 2) Na základě vypracované rešerše navrhnout a otestovat metodu přípravy polyelektrolytových perel z chitosanu a huminových kyselin. Otestovat vliv základních experimentálních podmínek (pH, iontová síla apod.).
- 3) Zhodnotit využitelnost připravených polyelektrolytů v oblasti medicínských a kosmetických aplikací.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Iva Karásková
Student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na možnosti využití polyelektrolytových komplexů huminových kyselin a chitosanu. V experimentální části byly na základě literární rešerše optimalizovány vhodné postupy přípravy těchto komplexů v hydrogelové formě. Hlavními aspekty přípravy, jejichž vliv byl studován, byly vliv směru přidavku, koncentrací, pH a iontové síly. Dále byla testována metoda enkapsulace za vzniku chitosanových perel. Práce byla směřována pro kosmetické a medicínské aplikace.

ABSTRACT

This thesis is focused on the possibilities of polyelectrolyte complexes of humic acid and chitosan. In the experimental part, based on a literature search, were optimized appropriate procedures for preparing such complexes in hydrogel form. The main aspects of the preparation, the effect was studied, the influence of the direction of the addition, the concentration, pH and ionic strength. Furthermore, the encapsulation method was tested to give chitosan pearls. Work was aimed for cosmetic and medical applications.

Klíčová slova

polyelektrolytové komplexy, huminové kyseliny, chitosan

Key words

polyelectrolyte complexes, humic acids, chitosan

KARÁSKOVÁ, I. *Možnosti využití polyelektrolytových komplexů pro kosmetické a medicínské aplikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 38 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Iva Karásková

Zde bych ráda poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce, Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D., za poskytnuté materiály, čas, energii a cenné rady, které mi během psaní práce věnoval. Dále děkuji Ing. Jiřímu Smilkovi a Ing. Petře Matouškové za pomoc s experimentální částí výzkumu.

Obsah

1 ÚVOD.....	6
2 CÍL PRÁCE.....	7
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Polyelektrolytové komplexy.....	8
3.1.1 Struktura a vlastnosti.....	8
3.1.2 Vznik.....	8
3.1.3 Metody charakterizace.....	9
3.2 Huminové látky.....	11
3.2.1 Struktura, vlastnosti a možnosti získávání.....	11
3.2.2 Dekontaminace půdních systémů.....	12
3.3 Chitosan.....	13
3.3.1 Struktura, vlastnosti a možnosti získávání.....	13
4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	15
4.1 Polyelektrolytové komplexy.....	15
4.1.1 Aplikace polyelektrolytových komplexů.....	16
4.2 Kosmetické a medicínské aplikace huminových látek.....	17
4.3 Kosmetické a medicínské aplikace chitosanu.....	18
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
5.1 Použité chemikálie.....	21
5.2 Použité přístroje.....	21
5.3 Příprava hydrogelů.....	21
5.4 Příprava makroskopických perel.....	22
5.5 Příprava mikroskopických perel.....	23
6 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	24
6.1 Optimalizace základního hydrogelu.....	24
6.2 Sušení a botnání.....	25
6.3 Viskoelastické vlastnosti připravených hydrogelů.....	27
6.4 Mikroskopie.....	30
7 ZÁVĚR.....	32
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	33
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	36
10 PŘÍLOHY.....	37

1 ÚVOD

Huminové kyseliny, látky zatím neúplně popsané, jsou složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny. Bylo vytvořeno mnoho studií zabývajících se jejich pozitivním efektem na životní prostředí, ale tato práce poukazuje spíše na jiné z jejich mnoha potenciálů. Těmi mohou být například antivirová aktivita nebo protizánětlivé vlastnosti. Huminové kyseliny se ve vodných roztocích chovají jako polyanionty a proto se často využívá jejich reakcí s polykationty za vzniku hydrogelu, který má zajímavé aplikační možnosti. Jejich partnerem byl v této práci zvolen polykationt chitosan, získávaný deacetylací chitinu, který je po celulóze druhým nejrozšířenějším přírodním polysacharidem. Kosmetické i medicínské aplikace tohoto biopolymeru nacházejí opravdu široké pole působnosti. Mezi antibakteriální, protinádorovou nebo antioxidační aktivitou můžeme najít i využití v tkáňovém inženýrství nebo jako nosiče léčiv. Při současném pokroku vědy se lidé snaží vyvíjet nové způsoby řešení různých kosmetických i medicínských problémů. Právě řízené uvolňování látek je v poslední době stále častěji diskutovaným tématem.

Z těchto důvodů jsem se svoji bakalářskou prací rozhodla věnovat studiu polyelektrolytových komplexů huminových kyselin a chitosanu a možnostem využití enkapsulace jako metody jejich tvorby.

2 CÍL PRÁCE

Hlavní náplní této bakalářské práce byla příprava a následná charakterizace polyelektrolytových komplexů huminových kyselin a chitosanu. V experimentální části byl testován vliv různých podmínek (pH, iontová síla, koncentrace apod.) na přípravu hydrogelů a optimalizována metoda enkapsulace za vzniku chitosanových perel. Motivací přípravy těchto polyelektrolytů ve formě hydrogelů byly možnosti využití pro kosmetické a medicínské aplikace.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Polyelektrolytové komplexy

3.1.1 Struktura a vlastnosti

PK jsou látky vznikající smísením vodných roztoků polykationtů a polyaniontů. Jsou obvykle nerozpustné ve vodě a tak se oddělí jako nově vzniklé koncentrované polymerní fáze zvané koacerváty [1], případně různě kompaktní hydrogely [2]. Ukazuje se, že stechiometrické komplexy lze považovat za slabě hydrofobní polymery, které jsou nerozpustné ve vodě. Jejich rozpustnost ale stoupá s přidáním soli. Tento účinek soli je ve skutečnosti velmi podobný jako účinek zvýšení teploty polymerů na rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. Vzhledem k tomu, že dvofázové systémy mohou být připraveny v koloidní formě, je diskutováno několik druhů koloidů, které se mohou tvořit v důsledku vzniku polyelektrolytových komplexů. Jsou to například tenké vrstvy, 'zipy', micely a micelární sítě [1]. Vlastnosti PK jsou určeny především stupněm interakce mezi polymery. Reakce probíhá ve vodném roztoku, což představuje hlavní výhodu proti kovalentně vázaným sítím. Další výhodou je biokompatibilita a vyhnutí se purifikaci před užitím. Hlavní nevýhodou PK je to, že jsou ovlivňovány více parametry než je tomu u jiných sítí [2].

Tradiční forma vzniku PK ve vodném roztoku je spojena se vznikem hydrogelové sítě. Gelace je základní fázový přechod, který nastává při reakcích polymerů, hydrokoloidů a koloidů. Shlukování monomerů může probíhat mezi rozvětvenými nebo nerozvětvenými řetězci, případně tvorbou sítí. Gelace může být také vratná [3]. Gel je obvykle utvářen ze shluků částic, které dosáhly takového rozměru, že vyplňují celý prostor původní disperze. Pro vytvoření 3D sítě se musí shluky částic propojit mezi sebou. Mechanismus tohoto spojení se značně liší od shlukování. Neprobíhá náhodně, ale shluky částic jsou brzděny jejich nejbližšími sousedy [4].

3.1.2 Vznik

PK vznikají smícháním vodných roztoků polykationtů a polyaniontů. Oba polymery tedy nesou opačný náboj. To znamená, že reakce může proběhnout pouze při hodnotách pH v okolí pK_a intervalu obou polymerů. Pro přípravu nejsou nutné žádné pomocné molekuly jako katalyzátory nebo iniciátory. Srážení je možné se vyhnout přidáním soli, například NaCl, která sníží elektrostatickou přitažlivost [2].

3.1.3 Metody charakterizace

PK je možné charakterizovat celou řadou metod. Jedná se o senzorní (subjektivní) metody vizuálního porovnávání, jednoduché materiálové charakteristiky (množství sušiny, výtěžku, hodnota pH) až po objektivní posuzování mechanických vlastností (reologie).

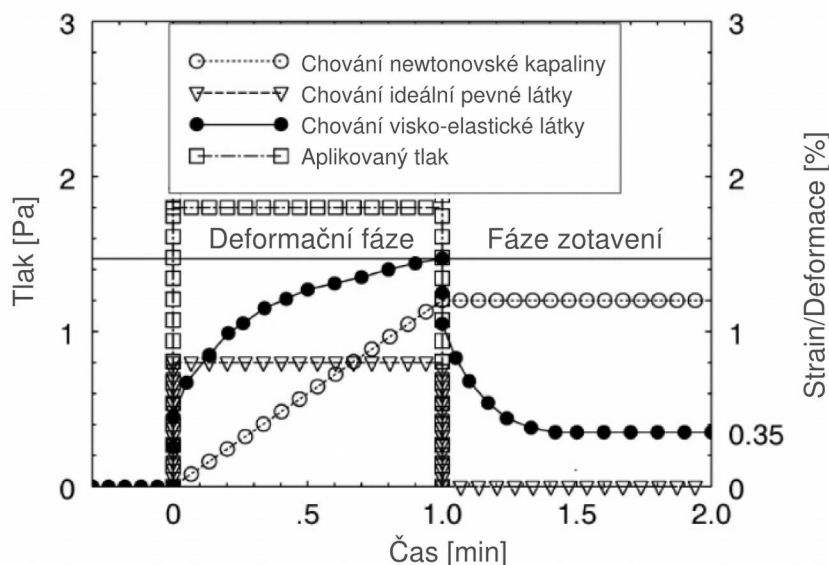
- **Vizuální porovnávání**

Při přípravě gelů v makroměřítku byla prováděna fotodokumentace a vzorky byly porovnávány. Byla zaznamenávána především barva a kompaktnost.

- **Reologie**

Reologie popisuje deformace pevných látek, kapalin nebo plynů vlivem vnějších sil. Ideální pevné látky nazýváme elastické. Jejich energie vyžadovaná pro deformaci je plně obnovena v okamžiku odstranění stresu. Ideální tekutiny, jako jsou kapaliny a plyny, podléhají deformaci nevratně – tečou. Energie vyžadovaná pro tuto deformaci je disipována jako teplo. Jestliže po zastavení toku nedojde k obrácení, jedná se o viskózní chování.

Mezi těmito kategoriemi jsou reálné systémy, které nazýváme viskoelastické. Tyto látky se deformují v závislosti na době působení vnějšími silami. Například ocel, typická pevná látka, může být tlakem formována a téct pro automobilové součástky. V užším pojetí je tedy reologie nauka o toku látek. Kořeny tohoto pojetí můžeme hledat už v Bibli, kde je psáno, že vše plyne (dokonce i hory), pokud sečkáme dostatečně dlouho [5].



Obr. 1 Napětí a deformace typických vzorků

Odtud tzv. Debořino číslo

$$De = \frac{T}{\Delta t}, \quad (1)$$

kde T vyjadřuje materiálový čas a Δt délku trvání deformačního procesu. Pro ideálně neelastické kapaliny je $T = 0$ a De tedy také nula. Pro ideálně elastické materiály je T i De rovno nekonečnu. Při nízkých hodnotách De se látky chovají jako vazké kapaliny, při vysokých hodnotách jako pružná tělesa [6].

Mezi nejčastější testy při studiu viskoelasticity patří creep a relaxace. Při testu relaxace je homogenní, izotropní materiál vystaven deformaci neustálým smykovým pohybem (konečným smykem), který je po celou dobu konstantní. Předpokládá se, že v materiálu není před začátkem testu jakékoli pnutí a je tedy dokonale odpočatý.

Tzv. relaxační modul

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\gamma_0}, \quad (2)$$

kde veličina $\sigma(t)$ vyjadřuje napětí v čase t a γ_0 je amplituda vzruchu. Je to materiální funkce popisující lineárně viskoelastické chování homogenního a izotropního materiálu za dané teploty a tlaku.

Tzv. Creepova poddajnost

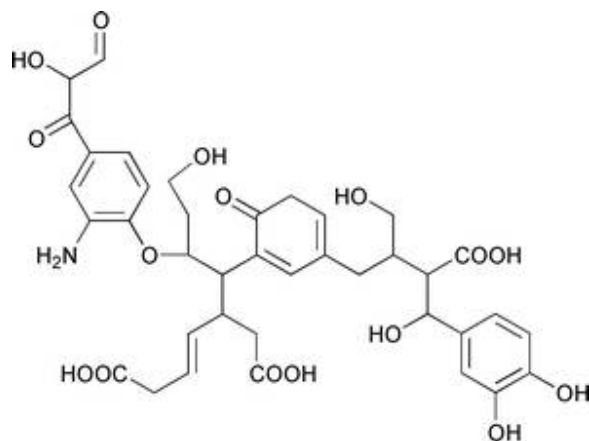
$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\sigma_0}, \quad (3)$$

kde $\gamma(t)$ vyjadřuje amplitudu smyku, která je přímo úměrná σ_0 amplitudě napětí. Je to materiální funkce vyjadřující viskoelastickou odezvu na konstantní napětí [7].

Gely jako disperze tuhých látek v kapalinách vykazují řadu mechanických vlastností pevných látek. Až do hodnoty kritického (tečného) napětí mají mechanické vlastnosti tuhého stavu a gely napětí odolávají. Hodnotu tečného napětí ovlivňuje především pevnost uzlů a jejich koncentrace v gelu. Menší počet vazeb značí obvykle spíše elastické vlastnosti. U čerstvě připravených gelů můžeme pozorovat samovolné jevy jako například stárnutí. Na povrchu dochází k vytlačení přebytečné vody, která nebyla zabudována do struktury gelu. Roste počet styčných bodů a celý vzorek se smršťuje. Tomuto jevu říkáme synereze a je způsoben neustálenou termodynamickou rovnováhou především u čerstvých gelů. Synerezi je možné podpořit zvýšením teploty, případně přidáním elektrolytu [6].

3.2 Huminové látky

3.2.1 Struktura, vlastnosti a možnosti získávání



Obr. 2 Steelinkův model HK

Huminové látky představují specifickou skupinu látek tmavé barvy, které vznikají v procesu rozkladu organických zbytků v půdě, to znamená v procesu jejich humifikace. Jsou schopné interagovat s dalšími polymery, s nízkomolekulárními organickými a anorganickými sloučeninami a zejména s kovy (za tvorby chelátových komplexů). Tradičně se využívají jako palivo a organická hnojiva [8].

HL lze podle fyzikálně-chemických vlastností rozdělit na humusové kyseliny, huminy a

humusové uhlí. Humusové kyseliny dále dělíme na huminové kyseliny, fulvokyseliny a hmatomelanové kyseliny. Jednotlivé skupiny se liší například molekulovou hmotností, obsahem funkčních skupin, kyselostí. Huminy a humusové uhlí jsou ve vodě prakticky nerozpustné, proto jsou významné především humusové kyseliny. Huminové kyseliny jsou rozpustné v zásadách, ale ne v kyselinách. Fulvokyseliny jsou rozpustné v zásadách i kyselinách a huminy nejsou rozpustné ani v zásadách ani v kyselinách. Pro svoji vyšší rozpustnost najdeme v přírodních vodách převážně fulvokyseliny. Mají navíc ve srovnání s HK více procent obsahu kyslíku a méně uhlíku [9].

Jsou to složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí stovek až desítek tisíců. Ve vodě se vyskytují jako jednotlivé molekuly nebo spojené do supramolekulárních struktur pomocí slabých vazebných interakcí. Mohou tvořit i micelární koloidy s hydrofobní částí molekuly uvnitř a hydrofilní částí vně [9]. Jsou to látky zatím neúplně popsány. Jedním z návrhů možné struktury je Steelinkův model (obr. 2), který je znázorněn na obrázku výše [10]. Z chemického pohledu se jedná o aromatické jádro s alifatickými řetězci a specifickým obsahem různých funkčních skupin. Nejvíce reaktivní se zdají být skupiny karboxylové, aromatické a fenolické. Díky tomu jsou tyto látky schopné vázat polární i nepolární sloučeniny. V průběhu tvorby huminových kyselin (proces humifikace) se zvyšuje obsah karboxylových a ketonových skupin. Naopak obsah OH a OCH₃ skupin se snižuje. Struktura je také ovlivněna materiálem, ze kterého byly huminové kyseliny izolované. Například po izolaci z ligninu získáváme strukturu bohatší na aromatické struktury a při izolaci z oxyhumolitu strukturu s více nerozvětvenými řetězci. Z pohledu

struktury jsou huminové kyseliny vhodné pro sorpční, iontově-výměnné a biodegradační procesy. Biologická aktivita huminových kyselin závisí na jejich původu a zpracování [11].

Huminové látky mohou být tvořeny jako konečné produkty syntetické činnosti mikroorganismů, degradací a přeměnou produktů v rostlinách, syntetickou oxidací fenolických sloučenin, případně pražením polymerů (například pražení kávy) [8]. Zdrojem huminových látek pro průmysl jsou především rašelina, lignit a oxyhumolit (zoxidované hnědé uhlí) z důvodu obsahu huminových látek až v desítkách procent. Ty se přirozeně vyskytují i v dalších materiálech (např. v sedimentech, zeminách, hnědém uhlí), ale jejich obsah v nich kolísá od jednotek po desítky procent [12].

3.2.2 Dekontaminace půdních systémů

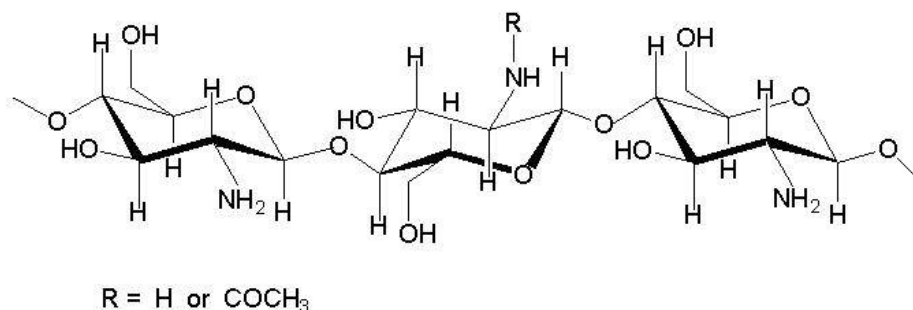
Huminové kyseliny jsou významně využívány pro dekontaminaci půd. Je při tom využíváno přirozené schopnosti půdy eliminovat kontaminanty interakcí s anorganickými a organickými (huminové kyseliny) složkami půdy. Tím je omezen pohyb kontaminantu v půdě a jeho působení. Přímý vliv huminových kyselin v půdě je velmi rozsáhlý z důvodu jejich vynikajících sorpčních schopností. Jedná se o fyzikální modifikaci struktury půdy (předcházení vysokým ztrátám vody a živin), chemické změny fixačních vlastností půdy (regulace pH), biologickou stimulaci rostliny a aktivitu půdních mikroorganismů, zvýšení výtěžků zemědělských plodin a v neposlední řadě ekologický přínos (zabránění úniku nitrátů a pesticidů do spodních vod).

Při interakcích s xenobiotiky (látky nevznikající v lidském organismu) předpokládáme několik druhů vazbových interakcí. Působením elektrostatických sil mezi pevnými náboji přítomných funkčních skupin a ionty v roztoku vzniká iontová vazba. Nejdůležitějším typem vazby pro odstranění toxických kovů z půdy je koordinační vazba. Ta vzniká mezi makromolekulárními maticemi huminových látek a ionty kovů. V huminových látkách se na vzniku této vazby nejvíce podílejí karboxylové a fenolové skupiny. Zastoupení těchto skupin je ovlivněno především mírou disociace (hodnotou pH). Při slabě kyselém pH se na vzniku vazby podílí především karboxylové skupiny a v slabě zásaditém prostředí se k nim přidávají i fenolické skupiny. Všeobecně tedy stabilita komplexů vzrůstá se stoupajícím pH.

Při vzniku kovalentní vazby může být využita aktivita enzymů nebo biokatalýza. Vznik kovalentní vazby je pro imobilizaci kontaminantu velmi důležitý, proto je důležité zjistit, zda je vznik vazby proces reverzibilní nebo ireverzibilní. Dále se na interakcích s kontaminanty mohou podílet vodíkové můstky a při kontaktu nepolárních skupin molekul ve vodných roztocích také hydrofobní interakce [11].

3.3 Chitosan

3.3.1 Struktura, vlastnosti a možnosti získávání



Obr. 3 Struktura chitosanu

Chitosan, (poly - D - glukosamin), (1 → 4) - 2 - amino - 2 - deoxy - β - D - glukán, má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Patří mezi přírodní polysacharidové polymery. Je odvozený od přírodního chitinu, což je po celulóse druhý nejrozšířenější polysacharid [13] a jedním z nejdůležitějších polymerů na světě. Je syntetizován do podoby krystalických mikrovláken značným počtem živých organismů, které ho využívají jako výtuž pro své exoskelety. Přirozeně se vyskytuje částečně deacetylovaný a malým množstvím glukosaminových jednotek a nerozpustný v obvyklých rozpouštědlech. Právě tato nerozpustnost způsobuje hlavní překážku v širším využití chitinu [16].

Chitosan je tvořený náhodně nebo blokově uspořádanými jednotkami N - acetyl - glukosaminu a N - glukosaminu [14]. Pokud je počet N - acetyl - glukosaminových jednotek vyšší než 50 %, jedná se o chitin. V opačném případě jsou látky souhrnně nazývány chitosan [15]. V pevném stavu je semikrystalický polymer (přechod mezi krystalickou a amorfni fází) [16]. Reaktivní aminoskupiny a primární i sekundární hydroxyskupiny mohou chemicky upravit jeho vlastnosti při mírných reakčních podmínkách [17]. Rozpuštění nastává protonací aminoskupin na pozici C2 opakujících se jednotek D - glukosaminu. Polysacharid je přeměněn na polyelektrolyt v kyselém médiu. Pro charakterizaci vzorku chitosanu je nutné určení jeho průměrné molekulové hmotnosti. Chitosan je jako polyelektrolyt schopný tvořit v kyselém prostředí elektrostatické komplexy. Zvláštní pozornosti se dostává komplexům s opačně nabitými povrchově aktivními látkami a PK [16].

Tento polymer se v přírodě vyskytuje jen v malém množství u několika typů hub [18]. Komerčně se dosud chitin a chitosan získávají z koryšů, například z krabů a krevet [14]. Chitosan se získává alkalickou deacetylací chitinu pomocí varu s 50% NaOH nebo

enzymaticky pomocí N - deacetylasy [13]. Často je zařazen i krok odbarvení, kdy je odstraněn přebytečný pigment. Výsledný produkt musí být označen patřičnou čistotou a barvou, protože zbytkový protein a pigment by mohl způsobit problémy při dalším využití (zejména pro biomedicínské potřeby). Tento proces musí být přizpůsoben každému jednotlivému zdroji [16].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Polyelektrolytové komplexy

Elektrostatická přitažlivost mezi kationtovou skupinou a aniontovou skupinou druhého polyelektrolytu je hlavní interakcí vedoucí ke vzniku PK. Nejdůležitější faktory, které je třeba sledovat jsou pH, teplota, iontová síla a vliv přídavku [2].

Z konkrétních popsanych způsobů přípravy PK bych uvedla využití interakcí alginátu a chitosanu. Autoři Saether a kol. použili vodné roztoky alginátu sodného o pH 6,5 a chloridu chitosanu o pH 4,0. Tyto hodnoty pH zajišťovaly úplnou deprotonaci alginátu a plnou protonaci chitosanu. Roztoky polyelektrolytů byly smíchány pomocí homogenizátoru při pokojové teplotě. Roztok alginátu byl přidáván po kapkách za průtoku 1 ml/s do roztoku chitosanu za vzniku PK. Výsledné PK byly použity jako modely kapsulí typu core-shell v závislosti na změnách ve velikosti, zeta potenciálu a pH [19].

Systém huminových kyselin a chitosanu, kterým se zabývám v této práci byl již také popsán, i když za jiným účelem. Huminové látky mají značné nežádoucí účinky na kvalitu pitné vody. Z důvodu neustálého hledání levné a efektivní metody, která by byla šetrná k životnímu prostředí, začalo se využívat přírodních kationtových polymerů (tedy například chitosanu). Lze je využít k neutralizaci negativního náboje huminových koloidů tak, že se sráží a vytvářejí PK [20].

Chitosan je používán samostatně, případně v kombinaci s hlinitými nebo železitými solemi. Koagulace probíhá nábojovou neutralizací, kdy dochází k částečné disociaci iminoskupin při nízkých hodnotách pH (4,0-6,0) [9]. Například dle Costa byl chitosan vhodný pro předčištění vody [21].

Autoři Bratskaya a kol. dospěli k závěru, že huminové kyseliny mohou být téměř kompletně vysráženy (95-100%) z roztoku o pH 7 za pomoci chitosanu. Množství chitosanu, které je nutné pro efektivnost této operace závisí na hustotě náboje humátu. Čím více negativně nabitých částic, tím větší množství je třeba pozitivně nabitého chitosanu. Účinnost srážení navíc podstatně ovlivňují i molekulové hmotnosti obou složek [22].

- **Enkapsulace**

Enkapsulace je imobilizace aktivních složek v polymerní síti. Aktivními složkami můžou být například enzymy, léčiva, vitamíny, oleje, buňky nebo mikroby. Druhů polymerních sítí, které mohou být použity je mnoho. Slouží jako bariéra, která podléhá difúzi pouze ve specifických podmínkách. Velikost vzniklých částic je přednastavena pomocí volby velikosti trysky. Můžeme rozlišovat formu kapky a formu kapsule.

Byly provedeny studie mikrokapsulí alginátu sodného a chitosanu se zaměřením na uvolňování léčiv. Roztok alginátu obsahující NaCl a léčivo guaifenesin byl stříkačkou kapán do roztoku chitosanu s NaCl a CaCl₂. Mikrokapsule vzniklé vytvořením PK pomocí elektrostatických interakcí měly asi 0,5 mm v průměru. Uvolňování guaifenesinu bylo měřeno přímo pomocí absorbance UV/VIS spektrometrem. Obecně bylo uvolňování vyšší při zvyšujícím se pH. Uvolňování mohlo také záviset na dalších faktorech. Jedním byla tloušťka a druhým kompaktnost membrány, která tvořila povrch mikrokapsule [17].

4.1.1 Aplikace polyelektrolytových komplexů

- **Membránové separace**

PK mohou mít mnoho způsobů využití a jedním z nich je právě membránová separace. Je to membránový proces, kdy membrána slouží jako bariéra a síto pro tekuté směsi, směsi plynů a směsi koloidních částic. Ve srovnání s ostatními metodami je tato metoda efektivní, univerzální, energeticky úsporná a ekologická [22].

- *Pervaporace*

Pervaporace je proces oddělování kapalných směsí. Obecně platí, že přesun molekul přes membránu je řízen mechanismem difúze. Hlavními aplikacemi jsou dehydratace organických látek, separace směsí organických kyselin, separace organických směsí z vody a odstraňování síry z benzínu. Mimo to může být pervaporace použita pro produkci extra čistých rozpouštědel [22]. Jedním z příkladů pervaporace jsou PK chitosanu a polyakrylové kyseliny vyplněné mordenitem, které byly připravovány pro oddělování vodných roztoků ethylenglykolu [23].

- *Nanofiltrace*

Nanofiltrace je tlakově řízená membránová separační technologie. Operační tlak se pohybuje obvykle v rozmezí 0,1 – 1,5 MPa. Membrány jsou zpravidla asymetrických nebo kompozitních struktur, kde je mikroporézní nosná vrstva potažena ultratenkou selektivní vrstvou. Tyto kompozitní materiály bývají určeny pro separaci molekul v rozsahu 200 - 2 000 Da v závislosti na přesné velikosti pórů [22].

Jedním z nedávno zkoumaných PK je komplex etheru kvarterní amonium celulosy a sodium karboxymethyl celulosy, který byl využit k přípravě záporně nabitých membrán. Ty byly vhodné pro nanofiltraci organických molekul a anorganických solí [24].

- **Palivové články**

Palivové články jsou elektrochemické přístroje, které jsou schopné přeměnit chemickou energii paliva na elektrickou energii, aniž by bylo palivo spalováno. Jejich největší výhody spočívají v nízkých emisích a vysoké účinnosti. V palivových člancích figuruje chemická

energie, jejíž základem je vodík, methanol a ethanol ve vodě. Společně s ní dochází k přenosu elektrické energie a tepla [22]. Příkladem mohou být iontově vázané PK chitosanu (kation) a polyakrylové kyseliny (anion). Jako ideální směs pro přímé použití do methanolových palivových článků byla vyhodnocena směs s hmotnostními procenty chitosanu a polyakrylové kyseliny v poměru 1:1 [25].

Polyelektrolytové komplexy mají rozhodně do budoucna širší aplikační potenciál například v oblasti řízeného uvolňování léčiv. Těmto kosmetickým a medicínským možnostem využití se věnuje v dalších kapitolách práce.

4.2 Kosmetické a medicínské aplikace huminových látek

Po úspěšné aplikaci bahenních terapií na bázi rašeliny v minulosti se vědci začali více zabývat možnými farmaceutickými aplikacemi těchto látek. Jako hlavní účinná složka byly označeny huminové látky a nyní je známo několik možností jejich medicínského využití.

- **Antivirová aktivita**

Předběžné studie poukazují na antivirovou aktivitu proti různým druhům virů (například A virus, herpes virus typu 1, HIV-1, HIV-2). Jednou z nejznámějších antivirově aktivních látek je syntetický polymer vznikající oxidací kávové kyseliny. Polymery inhibují řadu respiračních onemocnění (virus chřipky typu 1, chřipku typu A i B). U mnoha virů jsou specifické efekty huminových kyselin a jejich polymerů především proti časné fázi virové replikace. Proto se nabízí využití těchto látek spíše pro prevenci než léčbu.

- **Protizánětlivé vlastnosti**

Protizánětlivý efekt byl potvrzen v roce 1963 na krysích packách, kdy sodium humát prokazatelně potlačil otok. V roce 1990 byly potvrzeny protizánětlivé účinky v obou fázích protizánětlivého procesu (exudaci i proliferaci). Protizánětlivá aktivita je spojována se syntetickými nízkomolekulárními sloučeninami (molekulová hmotnost 1500 Da). Huminové látky využívají takzvaný buffering effect. To znamená, že jsou schopné produkovat i vázat aktivované kyslíkové spécie. Tento regulační systém je důležitý při vlivu na hojení ran a usmrcování rakovinných buněk.

- **Vliv na srážení krve a fibrinolýzu**

Možné vysvětlení adhezně - inhibičního efektu HK může být aktivování degradace fibrinu. To probíhá prostřednictvím indukované huminové kyseliny, která uvolní aktivátor plasminogenu (t-PA). Ten přemění plasminogen na plasmin a ten změní nerozpustný fibrin na rozpustný fibrinogen.

- **Životní prostředí**

U huminových látek byla prokázána des-mutagení aktivita. Dále bylo u ryb prokázáno

snížení akutní toxicity způsobené ionizujícím zářením. Preparáty obsahující huminové kyseliny jsou tedy zamýšleny pro lepší regeneraci po akutním ozáření, případně ke zmírnění nežádoucích účinků chemoterapie [8].

4.3 Kosmetické a medicínské aplikace chitosanu

Podrobný souhrn této problematiky nabízí autoři Dash a kolektiv [18].

- **Antibakteriální aktivita**

Chitosan vykazuje antibakteriální účinnost vůči mnoha gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím a houbám při pH menším než 6. Aktivita závisí na molekulové hmotnosti, stupni deacetylace chitinu, derivatizaci, typu substituce, velikosti a poloze substituentů, rozpustnosti, pH. Antimikrobiální účinnost chitosanu vzrůstá s klesajícím pH. Nemodifikovaný chitosan je při pH 7 nerozpustný a antibakteriálně neúčinný. Z tohoto důvodu je velká pozornost věnována přípravě jeho rozpustných solí. Obecně lze říci, že optimální velikost aktivního chitosanu je v rozmezí 2 až 200 kDa. Pozoruhodným jevem je inhibice aktivity bakterie E.Coli, kterou způsobuje chitosan s vyšší molekulovou hmotností. Antibakteriální účinky chitosanu mohou výrazně zvýšit stříbrné ionty, které jsou také známy antibakteriální aktivitou.

- **Protinádorová aktivita**

U této vlastnosti chitosanu je taktéž důležitá molekulová hmotnost, rozpustnost a obsah acetylových skupin. Je nutné použít nízkomolekulární chitosan, který se připravuje štěpením polymerů chitosanu přirozenými enzymy chitosanasou a chitinasou. Protinádorová účinnost byla zkoumána u měďnatého komplexu (pentahydrát síranu měďnatého), který interaguje a štěpí DNA. Účinnost závisí na koncentraci iontů v komplexu. Chitosan se zatím používá především jako nosič protinádorové látky.

- **Antioxidační aktivita**

Antioxidanty jsou látky, které zpomalují nebo brání oxidaci oxidovatelných buněčných substrátů. Zachytávají radikály a reaktivní kyslíkové spécie. Tyto radikály jsou velmi nestabilní a rychle reagují s jinými látkami v těle, což vede k poškození buněk a tkání. Nízkomolekulární, částečně N-acetylovaný chitosan rozpustný ve vodě je možné považovat za přírodní antioxidant.

- **Tkáňové inženýrství**

Bylo vytvořeno několik kompozitů na bázi polymerních maticí vápenatých sloučenin pro případné využití jako tvrdé materiály náhradních tkání pro kostní tkáňové inženýrství (ortopedii). Předběžné mechanické zkoušky ukázaly zachování plasticity polymerů, což může být výhodné pro vývoj nových kostních náhrad. Současný výzkum v této oblasti je založen na výsevu buněk na porézní biologicky rozložitelné polymerní matrice. Na tyto materiály jsou

kladené značné nároky. Musí být možné je připravit v porézní formě pro přechod z hostitelských buněk do matrice, musí být biodegradabilní a samozřejmě netoxické. Jednou z nejčastěji zkoušených metod přípravy chitinu nebo chitosanu pro výsev buněk (rozprostření na živné medium) je nejprve tvorba prekursoru (typicky gel) a následné vymražení. Chitosanové scaffoldy jsou také skvělou možností pro tkáňové inženýrství chrupavky. Při akutních i chronických jaterních onemocněních lze rovněž použít chitosanové materiály za účelem využití v oblasti tkáňového inženýrství jater. Existuje i speciální odvětví zabývající se nervovým systémem [18].

- **Hojení ran**

Monomerní jednotka chitinu, N-acetylglukosamin, se objevuje také ve struktuře kyseliny hyaluronové, která je důležitá při hojení ran. Proto se předpokládá, že i chitin by měl mít charakteristické vlastnosti příznivé pro urychlení kožní regenerace [18]. Také je možné využít vlastností jeho derivátů s kvarterními amonnými solemi, které prokazují vysoký účinek proti bakteriím a houbám [26]. Vhodné aplikace sahají od jednoduchých krytí ran až po sofistikované umělé kožní matrice. Je možné využít chitosan samostatně nebo v kombinaci s jinými materiály v závislosti na požadovaném účinku [14]. Použití chitosanu při léčbě ran podporuje růst fibroblastů a působí na aktivitu makrofágů, což urychluje léčebný proces [13]. Chitosanové membrány je možné použít i při léčbě keloidních jizev [15].

Jednou z nejlepších ukázek hojivých účinků je výzkum chitinových membrán s názvem Vinachitin, které byly připraveny dekrystalizací krabích skořápek. Během tříletého sledování byly zaznamenány dobré výsledky u více než 300 pacientů s hlubokými popáleninami, ortopedickými potížemi a vředy [14].

PK chitosanu s sulfonovaným chitosanem nebo N - karboxylbutyl chitosanem byly prokázány jako nadějně materiály pro efektivní regeneraci poraněné kůže. PK chitosanu s alginátem byly prokazatelně stabilnější se změnou pH než chitosan a alginát samostatně. Tyto polyelektrolytové membrány byly vyzkoušeny na krysách a podporovaly urychlení hojení jizev [15].

- **Genová terapie**

Jsou rozlišovány dva hlavní typy vektorů používaných pro genovou terapii: virové a neviróvé systémy. Systémy obsahující chitosan jsou slibnými kandidáty pro neviróvou genovou terapii. Komplexy chitosanu s DNA je velmi jednoduché syntetizovat, ale jejich využití je limitované nízkou účinností transfekce (infekce hostitelské buňky nukleovou kyselinou bez proteinového obalu) [15]. Již byly provedeny studie v oblasti užití chitosanu pro přenos genu a v genové terapii savčích buněk [14].

- **Nosiče léčiv**

Některé formy chitosanu, jako gely a membrány, je možno použít jako nosiče pro různé aktivní látky, včetně léčiv (například antibiotik) a biologických materiálů. Chitosan také poskytuje slibné možnosti aplikace pro kontrolu infekce při operacích kostí. Jedná se o takzvaný chitosan - apatit cement sloužící jako nosič léčiva [14].

Například Jiang a kolektiv zkoumali uvolňování elektrostaticky vázaného ibuprofenu v polyethylen glykol chitosanových membránách [27].

- **Kožní aplikace**

Byly vytvořeny filmy založené na PK chitosanu k dodání léčiv do kůže. Tyto filmy s maximalizovanými elektrostatickými interakcemi byly úspěšně připraveny z chitosanu a polyakrylátů s různými síťovacími činidly a různou hustotou zesíťování. Připravené filmy byly tenké, s hladkým, homogenním povrchem a velmi hustou průřezovou morfologií [28]. Například Feng a kolektiv se zabývali efektem chitosanových nanovláken s galaktosovým povrchem jako možnými skafoldy pro tvorbu shluků hepatocytů a zkoumali jejich vliv na funkci jater u krys [29].

- **Hypocholesterický efekt**

Přibývá důkazů o schopnosti chitosanu snížit jak krevní i jaterní triacylglyceroly, tak celkovou hodnotu cholesterolu. Vykazuje tedy hypocholesterické a hypolipidemické účinky. Bylo také zjištěno, že chitosan může významně snížit riziko kardiovaskulárních onemocnění, jelikož má schopnost na sebe in vitro vázat tukové buňky. U lidí bylo dokonce potvrzeno snížení plazmatických lipidů bez vedlejších účinků. Přesný mechanismus těchto účinků chitosanu zatím zůstává neobjasněný [30].

- **Další aplikace**

Z dalších možných aplikací je vhodné zmínit krevní kompatibilitu chitinu a chitosanu, anti-trombogenní aktivitu a snížení krevního tlaku [18]. Chitosanová nanovlákná jsou také využívána pro filtrace a jako biosenzory [26].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

chitosan medium molecular weight (Sigma-Aldrich)
lignohumát (Amagro)
kyselina chlorovodíková normalan 1M (Sigma-Aldrich)
hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
azid sodný (Sigma-Aldrich)
chlorid sodný (Lach-Ner, s.r.o.)
kyselina octová (Lach-Ner, s.r.o.)
TPP - sodium triphosphate pentabasic (Sigma-Aldrich)

5.2 Použité přístroje

encapsulator B-395 Pro BUCHI
reometr AR-G2 Ta Instruments
sušárna Venticell
magnetické míchačky Variomag Poly a Heidolph MR HEI-Standard
přenosný teploměr GMM 175 Greisinger
pH metr WTW pH 330
stereomikroskop SteREO Discovery. v12 ZEISS

5.3 Příprava hydrogelů



Obr. 4 Ilustrace gelu i s patrnou synerезí

Zásobní roztoky byly připravovány v 2 % koncentraci. Lignohumát byl rozpouštěn ve vodě. Chitosan byl rozpouštěn (24 hodin míchán) v 0,1 M HCl. Do 500 ml zásobního roztoku bylo přidáváno 5 ml 5 % roztoku azidu sodného, abychom předešli plesnivění připravených hydrogelů.

Pro gelaci bylo vždy použito 50 ml roztoku chitosanu a 50 ml roztoku lignohumátu. Veškeré experimenty byly třikrát opakovány. Po smíchání byly roztoky míchány na magnetické míchačce po dobu přibližně

15 minut. Před i po smíchání bylo měřeno pH a vzorky byly 20 minut centrifugovány při 4000 otáčkách. Vzniklý odstředěný gel byl zvážen a pomocí vpichové elektrody bylo změřeno jeho vnitřní pH.

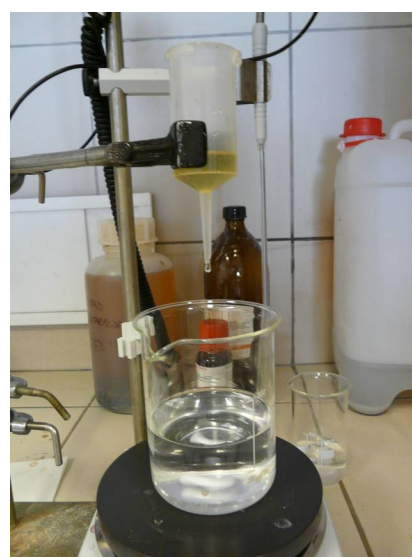
V rámci optimalizace byly upravovány jednotlivé parametry zásobních roztoků (koncentrace, pH apod.) a porovnávány vzniklé gely.

5.4 Příprava makroskopických perel

Pro přípravu perel byly použity roztoky:

- 0,5 M NaOH
- 3 % chitosan v 5 % CH₃COOH
- 1 % chitosan v 5 % CH₃COOH
- 4 g HK v 500 ml vody
- 4 g HK v 500 ml 0,5 M NaOH

Roztok chitosanu byl míchán 24 hodin a před použitím ochlazen pod 20°C. V kádince byl na magnetické míchače míchán roztok NaOH / HK a roztok chitosanu byl za stálého míchání přikapáván. (viz. Obr. 5). Při použití 3 % chitosanu vznikaly perly. Při 1 % chitosanu vznikla pouze sraženina. Byla tedy provedena optimalizace a perly z 1 % chitosanu byly tvořeny pomocí injekčních stříkaček. Dále byly připraveny perly s přídatkem 1 % TPP a 5 % TPP v roztoku HK / NaOH.



Obr. 5 Příprava perel



Obr. 6 Makroperely tvořené z 1% CH uložené ve vodě.

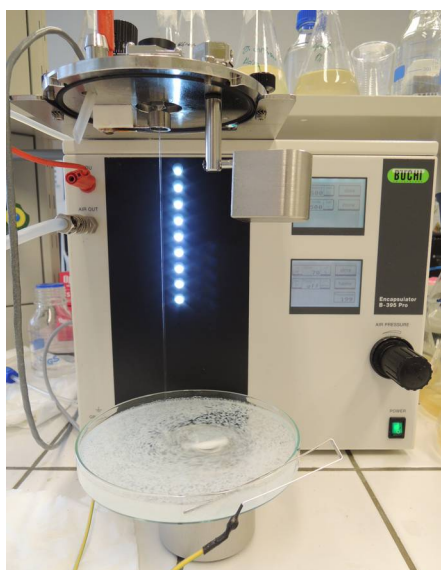
Na obr. 6 je na první pohled patrné rozdílné uvolňování HK do vody, což je velmi důležité z hlediska inkorporace HK jako aktivní složky. Je vidět, že volbou podmínek můžeme řídit rychlost uvolňování HK.

5.5 Příprava mikroskopických perel

Perly byly připravovány pomocí enkapsulace na přístroji Encapsulator B-395 Pro. Pro přípravu částic byly používány tyto roztoky:

- 1 % chitosan (24 hodin míchán a přefiltrován)
- 2 % chitosan (24 hodin míchán a přefiltrován)
- 1 % trifosfát sodný
- 5 % trifosfát sodný
- 1 % HK
- 2 % HK
- 1 % HK + 5 % trifosfát sodný
- 0,5 % HK + 5 % trifosfát sodný.

V případě mikroskopických perel nedocházelo ke gelaci v takovém měřítku jako u makroskopických vzorků. Proto byl použit trifosfát sodný jako vhodné síťovací činidlo chitosanu a zkoumali jsme jeho možné nahrazení huminovými kyselinami.



Obr. 7 Enkapsulace

Roztok chitosanu v kyselině octové byl protlačený tryskou (většinou o průměru 450) do druhého míchaného roztoku (jak je znázorněno na obr. 7).

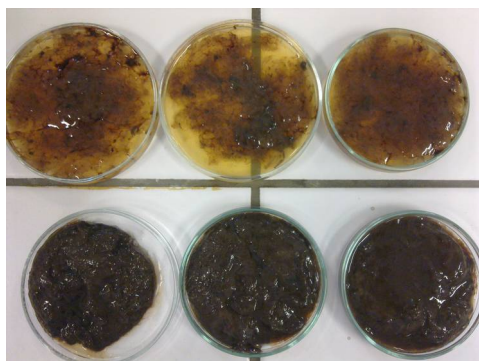
Byly provedeny následující enkapsulace:

- 1 % TPP + 1 % CH
- 5 % TPP + 1 % CH
- 5 % TPP + 2 % CH
- 2 % CH + 1 % HK
- 2 % CH + 2 % HK
- 5 % TPP + 1 % CH + 0,5 % HK
- 5 % TPP + 1 % CH + 1 % HK
- 5 % TPP + 2 % CH + 0,5 % HK
- 5 % TPP + 2 % CH + 1 % HK.

Pro ochranu enkapsulovaných vzorků před nežádoucími jevy byl přidán biocid, konkrétně azid sodný. Do nádobek se vzorky a přibližně 100 ml vody bylo přidáváno 0,8 ml 5 % roztoku. Mikroskopické perly připravené enkapsulací byly sušeny dvěma způsoby: na vzduchu a nebo byly vymrazeny v lyofilizátoru.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Optimalizace základního hydrogelu



Obr. 8 Hydrogely s vlivem směru
přídavku

V prvním kroku byl prokázán překvapivě výrazný efekt směru přídavku roztoků výchozích látek. Vzniklé gely, připravené dávkováním roztoku CH do roztoku LH a naopak, byly značně odlišné vizuálně, konzistencí i množstvím výtěžku (tabulka 1). Z těchto důvodů byly všechny další gely připravovány ve směru přípravku chitosan do lignohumátu (spodní vzorky na obr. 8).

Dalším krokem byly změny koncentrací výchozích roztoků. Bylo nutné nalézt vhodnou koncentraci, při které ještě bude vznikat dostatečně kompaktní gel. Pro

enkapsulaci totiž není možné použít chitosan ve vysokých koncentracích z důvodu jeho viskozity a hrozícího ucpání trysky. Na základě výsledků byla pro další hydrogely zvolena koncentrace původních roztoků 1 %.

Z důvodu různých hodnot pKa byly prováděny i změny pH výchozích složek. Při různém pH byly ionty různě nabitě a tím se měnila jejich elektrostatická interakce. Bez úpravy měl 1% roztok chitosanu pH 4,1 a lignohumátu 9,6. V tomto kroku optimalizace byla před smícháním provedena úprava pomocí 0,1 M HCl a 0,1 M NaOH. Gel s pH 7 a 7 byl vizuálně vyhodnocen jako nejlepší.

V dalším kroku byl testován vliv iontové síly. Rostoucí iontová síla snižovala viskozitu chitosanu, docházelo ke stínění elektrostatických vazeb a tím se měnila intenzita síťování těmito vazbami ve struktuře PK. Před smícháním byly k oběma roztokům přidáván chlorid sodný v hmotnostních koncentracích: 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %. Při koncentraci 10 % po smíchání roztoků ke gelaci nedošlo. Při 1 % koncentraci byl vzniklý gel hodnocen jako kompaktnější než předchozí gelace bez vlivu iontové síly.

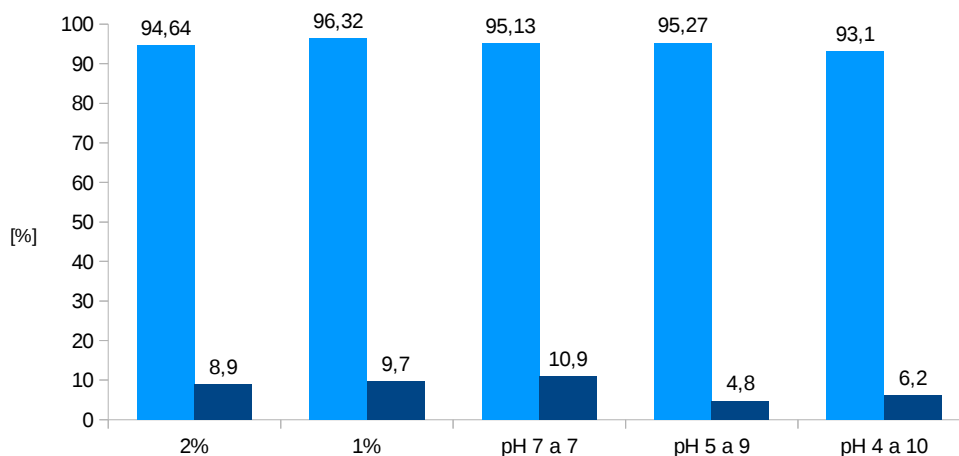
Polymerní kostra PK byla schopná po sušení běžně absorbovat vodu v míře až 200násobku vlastní hmotnosti.

Tabulka 1 Souhrn hodnot při optimalizaci hydrogelu

směr přidavku			
	výtěžek z 50 ml [g]	vnitřní pH gelu	množství vody v gelu [%]
LH do CH	23,5	6,18	94,6
CH do LH	34,7	6,27	-
koncentrace			
1%	9,4	5,6	96,3
0,5%	2,3	5,58	-
0,1%	bez gelace	-	-
pH			
4 a 10	16,7	6,08	95,1
5 a 9	16,3	6,28	95,3
7 a 7	19,4	7,23	93,1
iontová síla			
0,1%	5,9	5,44	-
0,5%	5,8	5,38	-
1%	8	5,41	-
5%	7,2	5,42	-

6.2 Sušení a botnání

Vzorky gelů, při jejichž přípravě byl studován vliv koncentrace a pH, byly vysušeny v sušárně při 50°C a následně vloženy do vody. Byla sledována jejich hmotnost (tabulka 1) a procentuální množství vody v čerstvě připraveném hydrogelu v porovnání se vzorky po sušení a botnání (obr. 9).



Obr. 9 Grafické znázornění procentuálního obsahu vody v čerstvých hydrogelech s vlivem koncentrace a pH původních roztoků a ve vzorcích po vysušení a botnání

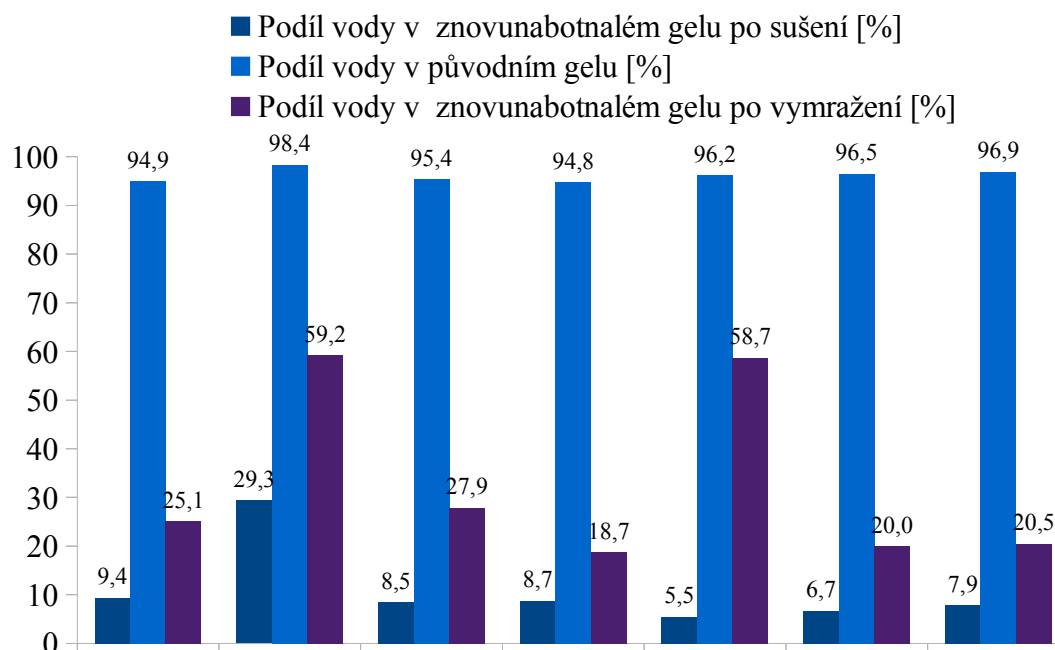
Z grafu je patrné, že nejlépe se voda po vysušení zpět vážala na gel vzniklý smísením 1% roztoku CH o pH 7 a 1% roztoku LH o pH 7.

Tabulka 2 Sušení a botnání mikroperel

Procentuální podíl vody v gelu			
	Původní gel	Sušení na vzduchu+botnání	Lyofilizace+botnání
2%CH+5%TPP	94,9	9,4	25,1
2%CH+2%HK	98,4	29,3	59,2
2%CH+5%TPP+1%HK	95,4	8,5	27,9
2%CH+5%TPP+0,5%HK	94,8	8,7	18,7
1%CH+5%TPP	96,2	5,5	58,7
1%CH+5%TPP+1%HK	96,5	6,7	20,0
1%CH+5%TPP+0,5%HK	96,9	7,9	20,5

Hmotnost při sušení a botnání byla sledována také u mikroskopických perel připravených enkapsulací viz. tabulka 2.

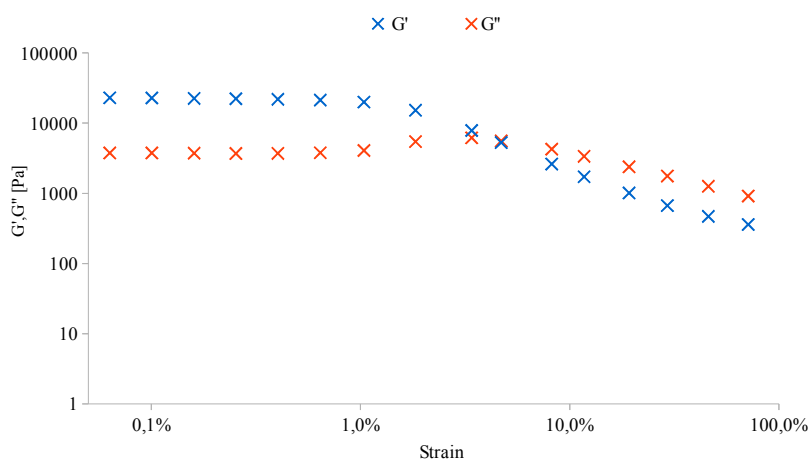
Po vysušení i vymražení si mikroperly zachovaly svůj původní tvar až na vzorky bez TPP. Na ty se ale na druhou stranu nejvíce vážala voda, konkrétně na mikroperly č. 2, tedy tvořené 2% CH a 2% HK (viz obr. 10). Tento vzorek se stal po vysušení v sušárně kompaktní a zůstal tak i po namočení ve vodě. Po vymražení vážaly mikroperly více vody než po vysušení v sušárně, ale o reverzibilní gely se nejedná. Částice plavaly na hladině, jak je možné vidět v příloze 11.



Obr. 10 Grafické znázornění procentuálního obsahu vody v připravených mikroperlách a po vysušení a botnání

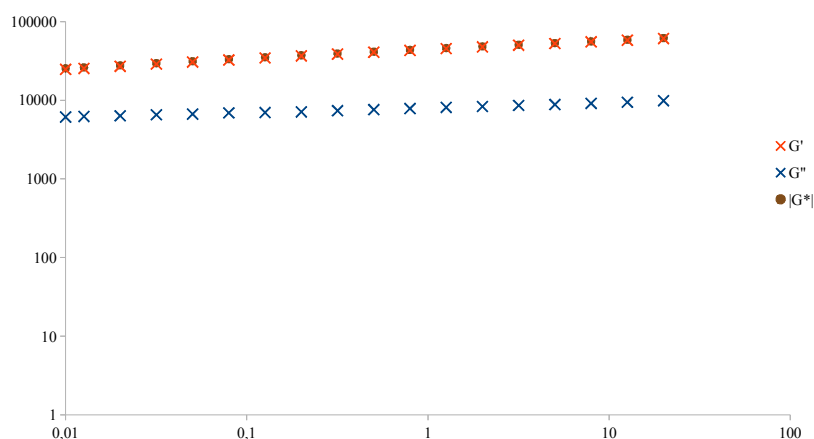
6.3 Viskoelastické vlastnosti připravených hydrogelů

Měření dat pro stanovení viskoelastických vlastností bylo prováděno při 25°C na přístroji ARG2 Rheometer za použití senzoru deska - deska. Vždy byla nejdříve stanovena oblast lineární viskoelastivity prostřednictvím deformačního testu. Vhodná amplituda, která nezpůsobí trvalé změny struktury gelu a umožňuje tak nerušený popis deformačního chování vzorku, byla většinou v oblasti hodnoty 0,1 % jak je patrné z grafu pro vzorek 2 % LH do 2 % CH (obr. 11).

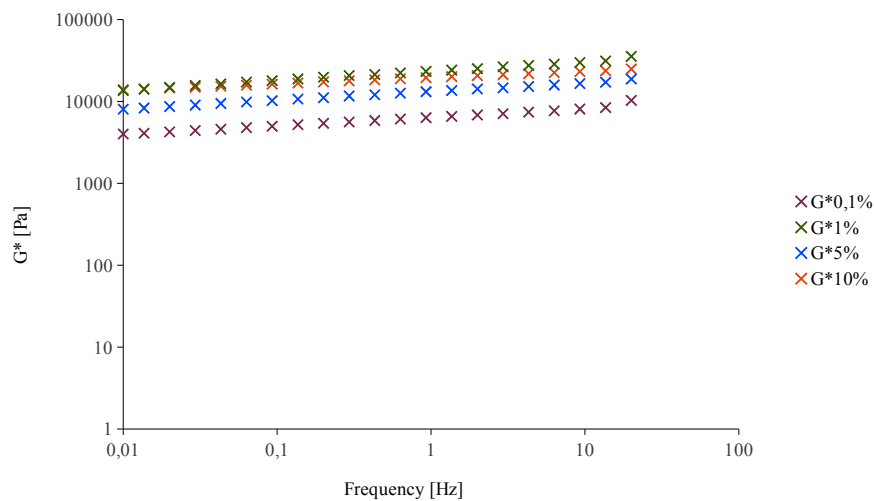


Obr. 11 Deformační test pro stanovení oblasti lineární viskoelastivity

Deformační i oscilační testy byly provedeny pro hydrogely s různou koncentrací, s různou iontovou silou a o různém pH. Grafy oscilačních testů (obr. 12) a hodnoty G^* jsem použila k odlišení absolutní hodnoty rigidity. Hodnoty G' a G^* téměř splývají. Na příkladu (obr. 13) je patrné, že zkoumané gely vykazují strukturu spíše pevných látek.

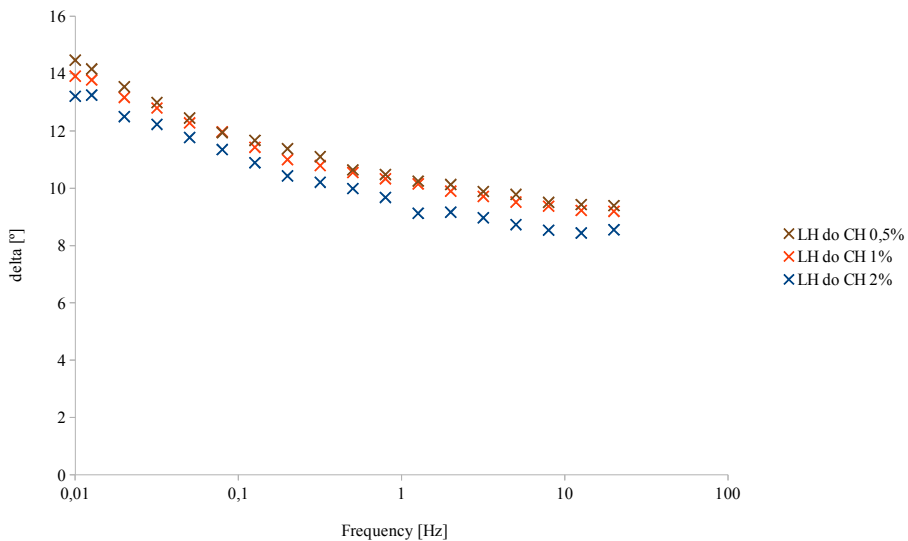


Obr. 12 Příklad oscilačního testu gelu 1% LH do 1% CH



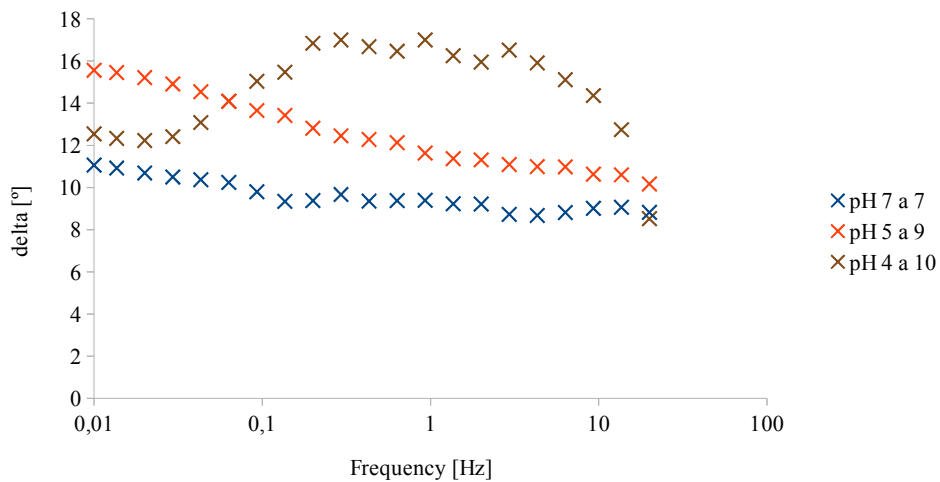
Obr. 13 Oscilační test pro hydrogely o různé iontové síle

Dalším zkoumaným parametrem je úhel posunu, který nám pomáhá dobře odlišit, zda se látka chová spíše elasticky nebo spíše viskózně. Čím větší je amplituda, tím větší je snaha gelu vrátit se zpět do původní pozice a tím vyšší je napětí v gelu.



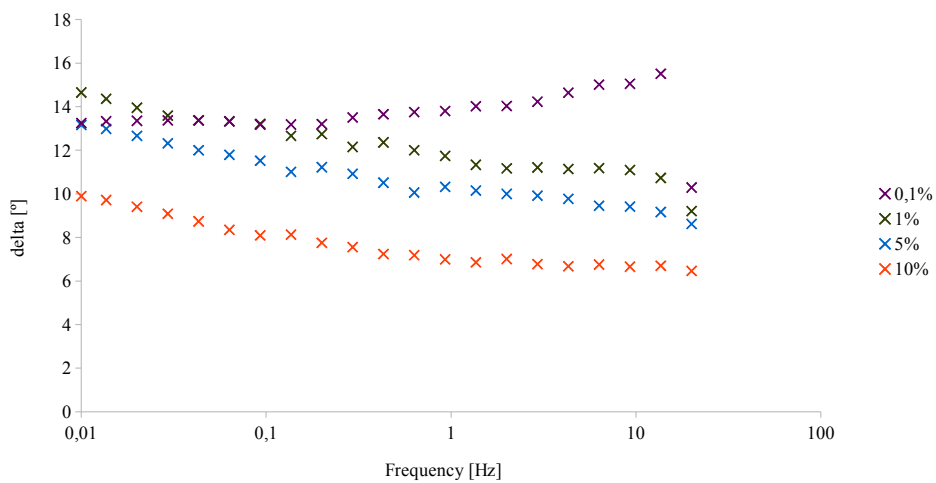
Obr. 14 Závislost ztrátového úhlu na frekvenci pro různé koncentrace

Na obr. 14 jsou vidět podobné hodnoty ztrátových úhlů pro gely o různé koncentraci, což svědčí o obsahu stejných typů vnitřních a síťujících vazeb. Oproti tomu na obr. 15 je patrná jiná struktura gelu pH 4 a 10.



Obr. 15 Závislost ztrátového úhlu na frekvenci pro různé pH

Na obr. 16 můžeme vidět, jak s rostoucí iontovou silou klesá stabilita komplexu. Struktura vazeb se mění a gel se začíná chovat více jako kapalina.



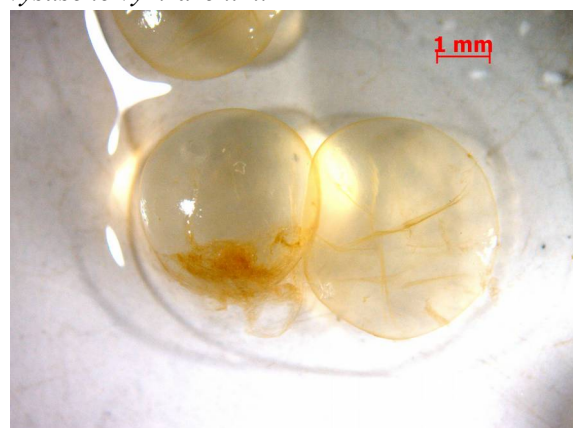
Obr. 16 Závislost ztrátového úhlu na frekvenci pro různé iontové síly

6.4 Mikroskopie

Vzorky byly foceny pomocí stereomikroskopu SteREO Discovery v12 ZEISS. Snímky byly pořizovány v mokřém stavu, po vysušení na vzduchu a po vymražení.



Obr. 17-20 Částice mikroperel 2%CH+5%TPP+1%HK. Shora: mokré, vysušené na vzduchu a vysušené vymražením.



Obr. 21 Mokré mikroperly 2% CH+2% HK

Obr. 22 Mikroperly 2% CH+5% TPP+1% HK

U vzorků s TPP byly pozorovány vykrystalizované artefakty, jak je patrné i na obr. 20. Ovšem vzorky bez TPP nebyly tak pevné a stabilní. Při porovnání například vzorku 2% CH+2% HK (obr. 21) a vzorku 2% CH+5% TPP+1% HK (obr. 22) v mokrému stavu jsou patrné účinky tohoto síťovacího činidla. I přesto, že druhé jmenované částice obsahují méně HK, jsou tmavší. U částic bez TPP docházelo k rozdílům v síťování a z toho pramenící nižší pevnosti. Mikroperly bez přídavku HK působí na první pohled velmi podobně jako ty s HK, ale jsou čistě bílé. Proměřené částice CH s TPP jsou větší než ty s přídavkem HK.

Sušením na vzduchu vznikaly menší suché mikroperly než částice vysušené lyofilizací. Docházelo i k jinému zbarvení suchých mikroperel jak je patrné na fotografiích výše. U částic vysušených na vzduchu byla zachována tmavá až černá barva typická pro HK, ale u vzorků vysušených vymrazením došlo k výraznému zesvětlení. Při vysušení bez přídavku TPP došlo k porušení původního tvaru perel jak je možné vidět v příloze 1 a 2.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo navrhnout, otestovat a optimalizovat metody přípravy polyelektrolytových perel z chitosanu a huminových kyselin. Nejprve byly testovány změny ve struktuře hydrogelů vzniklých pouhým smícháním látek při úpravě parametrů výchozích roztoků (pH, IS, koncentrace a vliv směru přídatku). U jednotlivých vzorků byl stanovován výtěžek, vnitřní pH, obsah sušiny a hydratační schopnosti.

Jako nejkompaktnější se prokázal gel připravený z výchozích roztoků chitosanu a lignohumátu o pH 7 a 7. Nejlepší hydratační schopnosti a nejvyšší podíl sušiny vykazoval gel z výchozích roztoků 1% CH a 1% HK bez úpravy pH. Při testování vlivu iontové síly byl dosahován nejvyšší výtěžek u vzorků s 1% obsahem NaCl. Z hlediska reologických vlastností se většina takto upravovaných gelů chovala spíše jako pevné látky.

Na základě dílčích výsledků byly připravovány makroskopické perly a následně mikroskopické perly na komerčním mikroenkapsulátoru. Po prvních vzorcích bylo do roztoku lignohumátu přidáváno typické síťovací činidlo pro chitosan TPP a bylo studováno jeho možné nahrazení huminovými látkami. Při výzkumu opětovné hydratace sušiny mikroperel se voda nejvíce vážala na vzduchem vysušené i vymrazené mikroperly 2% CH + 2% HK. Téměř totožné množství vody bylo navázáno i na vzorek 1% CH + 5% TPP, ale pouze u částic vysušených lyofilizací.

Stěžejní částí výzkumu bylo vizuální porovnávání snímků mikroperel pořízených na stereomikroskopu. U částic bez TPP docházelo k rozdílu v síťování. Z toho pramenila nižší pevnost a porušení původního tvaru perel při vysušení. Proměřené částice pouze CH s TPP byly větší než ty s přídatkem HK. Sušením na vzduchu vznikaly menší mikroperly než ty vysušené lyofilizací. U částic vysušených na vzduchu byla zachována tmavá až černá barva typická pro HK, ale u částic vysušených vymrazením došlo k výraznému zesvětlení.

Z provedené literární rešerše lze říci, že rozsah aplikačního potenciálu takovýchto polyelektrolytových komplexů je opravdu široký. V průběhu této práce ještě zdaleka nebyly prozkoumány všechny možnosti. Výsledky ovšem potvrdily správný směr studia a to je pro mě velkou motivací do další práce.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VAN DER GUCHT, Jasper, Evan SPRUIJT, Marc LEMMERS a Martien A. Cohen STUART. Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011, č. 361, s. 407-422.
- [2] BERGER, J., M. REIST, J.M. MAYER, O. FELT a R. GURNY. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004, č. 57, s. 35-52.
- [3] MADRAS, Giridhar a Benjamin J. MCCOY. Kinetics and dynamics of gelation reactions. *Chemical Engineering Science*. 2007, č. 62, s. 5257-5263.
- [4] SEFCIK, J., R. GRASS, P. SANDKUHLER a M. MORBIDELLI. Kinetics of aggregation and gelation in colloidal dispersions. *Chemical Engineering Research and Design*. 2005, č. 83, s. 926-932.
- [5] SCHRAMM, Gebhard. A partical Approach to Rheology and Rheometry. Karlsruhe: Gebrueder HAAKE GmbH, 1998. 2.
- [6] SEDLÁČEK, P. Reologie gelů - stručný přehled. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007, 34 s.
- [7] BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. An introduction to rheology. Amsterdam, The Netherlands : Elsevier, 1993. 199 s.
- [8] KLOCKING, Renate a Bjorn HELBIG. *Medical Aspects and Applications of Humic Substances*. Weinheim: WILEY-VCH, 2005, s. 3-16. ISBN 3-527-31154-8.
- [9] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. 2010, č. 104, s. 1015-1022.
- [10] DAVIES, Geoffrey, Elham A. GHABBOUR a Cornelius STEELINK. Products of Soil Chemistry. *Journal of Chemical Education*. 2001, roč. 78, č. 12.
- [11] SKOKANOVÁ, Marianna a Katarína DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakce huminových kyselin s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 338-345.
- [12] SKOKANOVÁ, Marianna a DERCOVÁ. Humínové kyseliny, povod a struktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262-268.
- [13] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 56-65.
- [14] KHOR, Eugene a Lee Yong LIM. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003, č. 24, s. 2339-2349.

- [15] SHI, Chunmeng, Ying ZHU, Xinze RAN, Meng WANG, Yongping SU a Tianmin CHENG. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research*. 2006, č. 133, s. 185-192.
- [16] RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, č. 31, s. 603-632.
- [17] LEE, Kuen Yong, Won Ho PARK a Wan Shik HA. *Polyelectrolyte Complexes of Sodium Alginate with Chitosan or Its Derivatives for Microcapsules*. 1996, 8 s.
- [18] DASH, M., F. CHIellini, R.M. OTTENBRITE a E. CHIellini. Chitosan – A versatile semi - synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011, č. 36, s. 981-1014.
- [19] SAETHER, Heidi Vogt, Hilde K. HOLME, Gjertrud MAURSTAD, Olav SMIDSTROD a Bjorn T. STOKKE. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2008, č. 74, s. 813-821.
- [20] BRATSKAYA, Svetlana, Simona SCHWARZ a Denis CHERVONETSKY. Comparative study of humic acids flocculation with chitosan hydrochloride and chitosan glutamate. *Water research*. 2004, č. 38, s. 2955-2961.
- [21] COSTA, A.R. a M.N. DE PINHO. Coagulation/flocculation/ultrafiltration for natural organic matter removal in drinking water production. *Water Supply*. 2005, roč. 4, 5-6, s. 215-222.
- [22] ZHAO, Qiang, Quanfu F. AN, Yanli JI, Jinwen QIAN a Congjie GAO. Polyelectrolyte complex membranes for pervaporation, nanofiltration and fuel cell applications. *Journal of Membrane Science*. 2011, č. 379, s. 19-45.
- [23] HU, Changlai, Ruili GUO, Ben LI, Xiaocong MA, Hong WU a Zhongyi JIANG. Development of novel mordenite-filled chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex membranes for pervaporation dehydration of ethylene glycol aqueous solution. *Journal of Membrane Science*. 2007, č. 293, s. 142-150.
- [24] JI, Yanli, Quanfu AN, Qiang ZHAO, Huanlin CHEN, Jinwen QIAN a Congjie GAO. Fabrication and performance of a new type of charged nanofiltration membrane based on polyelectrolyte complex. *Journal of Membrane Science*. 2010, č. 357, s. 80-89.
- [25] SMITHA, B., S. SRIDHAR a A. A. KHAN. Polyelectrolyte Complexes of Chitosan and Poly(acrylic acid) As Proton Exchange Membranes for Fuel Cells. *Macromolecules*. 2004, č. 37, s. 2233-2239.
- [26] JAYAKUMAR, R., M. PRABAHARAN, S.V. NAIR a H. TAMURA. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*. 2010, č. 28, s. 142-150.

- [27] JIANG, H., D. FANG, B. HSIAO, B CHU a W. CHEN. .Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2004, roč. 15, č. 3, s. 279-296.
- [28] SILVA, Cândia L., Jorge C. PEREIRA, Amílcar RAMALHO, Alberto A.C.C. PAIS a Joao J.S. SOUSA. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *Journal of Membrane Science.* 2008, č. 320, s. 268-279.
- [29] FENG, ZQ, X CHU, NP HUANG, T WANG, Y WANG, X SHI, Y DING a ZZ GU. The effect of nanofibrous galactosylated chitosan scaffolds on the formation of rat primary hepatocyte aggregates and the maintenance of liver function. *Biomaterials.* 2009, roč. 30, č. 14, s. 2753-2763.
- [30] XIA, Wenshui, Ping LIU, Jiali ZHANG a Jie CHEN. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids.* 2011, č. 25, s. 170-179.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>zkratka</i>	<i>význam</i>
HL	humínové látky
HK	humínové kyseliny
PK	polyelektrolytové komplexy
CH	chitosan
IS	iontová síla

<i>symbol</i>	<i>význam</i>
De	Debořino číslo
T	materiálový čas
Δt	délka trvání deformačního procesu
$G(t)$	relaxační modul
$\sigma(t)$	napětí
γ_0	amplituda vzruchu
$J(t)$	creepova poddajnost
$\gamma(t)$	amplituda smyku
σ_0	amplituda napětí

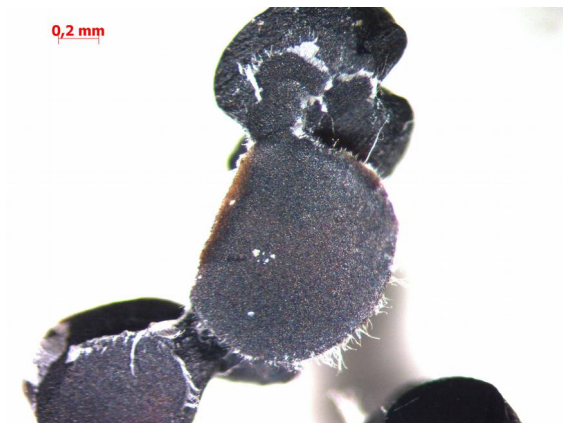
10 PŘÍLOHY



Příloha 1: Vysušené částice mikroperel 2% CH+1% HK.



Příloha 2: Povrch částic mikroperel 2% CH+2% HK.



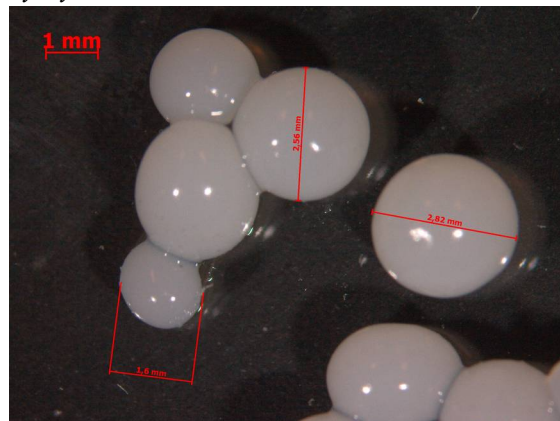
Příloha 3: Vysušené částice mikroperel 2% CH+5% TPP+0,5% HK s patrným vykrytalizováním TPP.



Příloha 4: Vymražené částice mikroperel 2% CH+5% TPP+0,5% HK s patrným vykrytalizováním TPP.



Příloha 5: Vymražené částice mikroperel 2% CH+5% TPP.



Příloha 6: Mokrě částice mikroperel 2% CH+5% TPP.



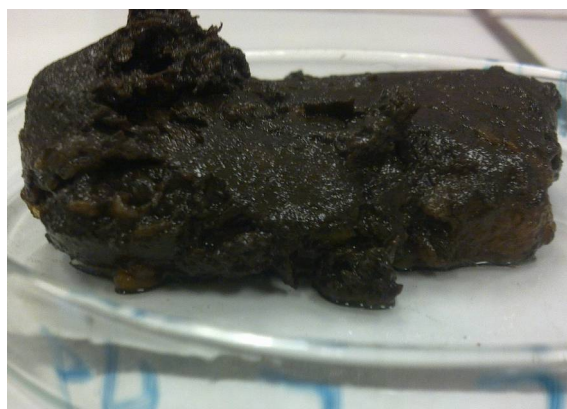
Příloha 7: Vymražené částice mikroperel 1% CH+1% TPP



Příloha 8: Vymražené částice mikroperel 1% CH+1% HK+5% TPP



Příloha 9: Částice makroperel 3% CH v 0,5 M NaOH.



Příloha 10: Hydrogel s pH výchozích roztoků 7 a 7.



Příloha 11: Vzorek vymražených mikroperel 24 hodin namočený ve vodě.



Příloha 12: Vzorek mikroperel 2% CH+2% HK vysušených na vzduchu po 24 hodinách ve vodě.