



Bakalářská práce

Studium agregace částic v polymerním roztoku pomocí polarizační mikroskopie

Studijní program:

B0914P360007 Biomedicínská technika

Autor práce:

Dana Paličková

Vedoucí práce:

doc. Ing. Petr Mikeš, Ph.D.

Katedra fyziky

Liberec 2023



Zadání bakalářské práce

Studium agregace částic v polymerním roztoku pomocí polarizační mikroskopie

<i>Jméno a příjmení:</i>	Dana Paličková
<i>Osobní číslo:</i>	D20000143
<i>Studijní program:</i>	B0914P360007 Biomedicínská technika
<i>Zadávací katedra:</i>	Fakulta zdravotnických studií
<i>Akademický rok:</i>	2022/2023

Zásady pro vypracování:

Cíle práce:

Cílem práce je vytvořit metodiku pro vyhodnocování agregace na orálně disperzní filmech připravený metodou solvent casting.

Teoretická východiska (včetně výstupu z kvalifikační práce):

Agregace a následná sedimentace částic v polymerním roztoku je jedním z klíčových dějů, které negativně ovlivňují homogenitu roztoku/suspenze. Ta je důležitá pro přípravu kompozitních materiálů obsahující léčiva, proliferační faktory či částice hydroxyapatitu v případě kostních náhrad a podobně.

Výzkumné předpoklady / výzkumné otázky:

Je možné charakterizovat agregační proces na polymerních filmech vyrobených metodou solvent casting? Je možné tento proces nějak kvantifikovat obrazovou analýzou?

Metoda:

Kvantitativní

Technika práce, vyhodnocení dat:

Metodou solvent casting budou připraveny filmy z vybraných polymerních roztoků s mikročásticemi. Pomocí polarizační mikroskopie budeme studovat agregaci částic. Následně vyhodnotíme pomocí obrazové analýzy.

Místo a čas realizace výzkumu:

květen – prosinec 2022, v Liberci na půdě Technické univerzity; budova C

Vzorek:

Polymerní film na bázi vodorozpustných polymerů s obsahem nanočástic.

Rozsah práce:

Rozsah bakalářské práce činí 50-70 stran (tzn. 1/3 teoretická část, 2/3 výzkumná část).

Rozsah grafických prací: podle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická
Jazyk práce: Čeština

Seznam odborné literatury:

FERREIRA, A. O. et al. 2017. Orodispersible Films for Compounding Pharmacies. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 21(6), 454.461. ISSN 1092-4221.

GIJARE, Chaitrali a Ashwini DESHPANDE. 2018. Orodispersible Films: A Systematic Patent Review. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 12(2), 110.120. DOI 10.2174/1872211312666180509100216.

HOFFMANN, E. M., A. BREITENBACH a J. BREITKREUTZ. 2011. Advances in orodispersible films for drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 8(3), 299.316. DOI 10.1517/17425247.2011.553217

JOSE, Jobinet al. 2019. Oral Dispersible Films, Novel Technology for the Delivery of Drugs. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 12(1), 425.428. DOI:10.5958/0974-360X.2019.00077.5.

MCMURRY, John et al. 2015. *Organická chemie*. Brno: Vysoké u.eni technické v Brn., nakladatelství VUTIUM; Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-214-4769-1.

MIREAULT, Valerie, ed. 2020. *Solvent effects in chemistry: advances in applications and research*. New York: Nova Science Publishers. ISBN 978-1-5361-8226-2.

MUSAZZI, Umberto M. et al. 2020. Trends in the production methods of orodispersible films. *International Journal of Pharmaceutics*. 576, 118963. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118963.

REDFEARN, Andrew et al. 2019. In Vitro Oral Cavity Model for Screening the Disintegration Behavior of Orodispersible Films: A Bespoke Design. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 108(5), 1831.1836. DOI 10.1016/j.xphs.2018.12.025.

SEVI.NC OZAKAR, Rukiye a Emrah OZAKAR, 2021. Current Overview of Oral Thin Films. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 18(1), 111.121. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2020.76390

SHANBHAG, Anant et al. 2008. Method for screening of solid dispersion formulations of low-solubility compounds—miniaturization and automation of solvent casting and dissolution testing. *International Journal of Pharmaceutics*. 351(1.2), 209.218. DOI 10.1016/j.ijpharm.2007.09.042.

SHRAMA, Devender M. et al. 2018. UPDATE REVIEW ON ORAL DISINTEGRATING FILM. *International journal of creative research thoughts*. Zve.ejnil ResearchGate. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/322203893_UPDATE_REVIEW_ON_ORAL_DISINTEGRATING_FILM

Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Mikeš, Ph.D.
Katedra fyziky

Datum zadání práce: 25. října 2022
Předpokládaný termín odevzdání: 5. května 2023

L.S.

prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc.,
MBA
děkan

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat mému vedoucímu doc. Ing. Petru Mikešovi, Ph.D. za jeho trpělivost a vedení. Bez jeho rad a pomoci by tato práce nevznikla. Dále bych chtěla poděkovat mému kamarádovi a spolužákovi Ondřeji Hradeckému za spolupráci a Ing. Štěpánu Kuncovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich psychickou podporu.

ANOTACE

Studium agregace částic v polymerním roztoku pomocí polarizační mikroskopie

Pomocí orálně disperzních filmů (ODF) budeme sledovat agregaci a sedimentaci částic v polymerním roztoku. Ty jsou jedny z klíčových dějů, které negativně ovlivňují homogenitu roztoku, která je důležitá pro přípravu kompozitních materiálů obsahující léčiva. Cílem práce je vyvinutí metody pro pozorování agregace částic v reálném čase. K tomu bude použita metoda pro přípravu polymerních filmů „solvent-casting“.

Klíčová slova

polymery, agregace, orálně-disperzní filmy, solvent-casting

ANNOTATION

Study of aggregation particles in polymer solution by polarization microscopy

Study of particle aggregation in polymer solution by polarizing microscopy. We will use orally dispersible films (ODF) to observe the aggregation and sedimentation of particles in a polymer solution. These are some of the key processes that negatively affect the homogeneity of the solution, which is important for the preparation of drug-containing composite materials. The aim of this work is to develop a method for real-time observation of particle aggregation. To do this, a "solvent-casting" method for the preparation of polymer films will be used.

Keywords

polymers, aggregation, oral dispersible films, solvent-casting

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Agregace a sedimentace v polymerní suspenzi	10
2.1.1 Coffee ring effect	14
2.2 Přípravy orálně disperzních filmů	15
2.2.1 Metoda solvent – casting	19
2.3 Polarizační mikroskopie	20
2.3.1 Nanocelulóza	21
3 Praktická část	22
3.1 Cíle a výzkumné předpoklady/otázky	22
3.2 Příprava a nanášení polymerní suspenze	22
3.3 Pozorování částic pod mikroskopem	26
3.4 Vyhodnocení dat a poznatků z praktické části	30
4 Závěr	33
Seznam použité literatury	34

Seznam symbolů a zkratk

BP	Bakalářská práce
CNC	Krystalická nanocelulóza
CRE	Coffee ring effect
dH ₂ O	Destilovaná voda
PM	Polarizační mikroskopie
PVA	Polyvinylalkohol
PS	Polarizované světlo
SVP	Správná výrobní praxe

1 Úvod

Agregace částic/nanočástic v polymerním roztoku je jedním ze zásadních problémů farmakologie, tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Homogenita disperze je důležitá pro rovnoměrné uvolňování léčiv v celé ploše zasaženého místa. V opačném případě je zde riziko vyvolání nežádoucí imunologické odpovědi, která může mít fatální následky. Problematika agregace je její nepředvídatelnost. Při výrobě léčiv jsou zavedeny standardy při výrobě a uchování léčiv (v České republice je to např. správa výrobní praxe).

Ve farmacii jsou orálně disperzní filmy inovativní způsob podávání léčiv. Uplatňuje se u pacientů s gastroenterologickými potížemi či dětí, které nedokážou spolknout tabletovou formu léčiva. Jejich ekonomická a výrobní náročnost je stále nežádoucí a snadná destabilizace s prostředím může snadno vést k znehodnocení léčiva, která může být způsobená agregací částic.

Cílem práce je pokusit se vyvinout metodiku ke sledování agregace částic v reálném čase. Metodika zahrnuje přípravu vzorku, jeho aplikace do formy vhodné k pozorování, a nakonec zpracování získaných dat. Je snaha o přiblížení se o sledování agregace na vzorku, který by se nejvíce přiblížil realitě přípravy ODF.

Práce je rozdělena do dvou částí. V první budou ujasněny základní pojmy a teoretické znalosti, které se opírají o vědeckou literaturu. V druhé části se budeme zabývat praktickou realizací a vyvinutí metodiky.

2 Teoretická část

V medicíně se farmaka využívají na poli terapeutickém, diagnostickém i preventivním. Statisticky stoupá i spotřeba léků. Individuální projevy léku u spotřebitele závisí na jeho zdravotní kondici a špatné dávkování či poškozené farmakum může mít fatální následky. Proto se kladou vysoké nároky na výrobu léčiva, která je kontrolována a regulována správnou výrobní praxí (viz kapitola 2.2). Velká diverzita forem farmak se dokáže přizpůsobit jednotlivým preferencím spotřebitelů. (Hynie 2001; Perlík 2008) Od pevných forem jako jsou tablety a tobolky, ale i orálně disperzní filmy, které se nechají rozpustit pod jazykem a dojde k distribuci léčivé látky. Dále léčivé formy dělíme na polotuhé formy (masti) a tekuté lékové formy, kam můžeme zařadit roztoky, emulze, spreje, injekce a infuze. Všechny tyto formy mají své výhody a nevýhody, ať už se týkají distribuce léčivé látky či její absorpce. (Dostálek 2006; Ménová, 2022)

Stabilita orálně disperzních filmů je do dnešní doby stále otevřené téma. Hlavní oblast zkoumání se upíná na homogenní prostředí roztoku a jeho udržení a předvídatelnost agregace. „*Jakákoliv odchylka od stability může zapříčinit rozdílnou výtěžnost produktu, špatnou kvalitu, nepříznivé účinky produktu, nebo v případě výzkumu špatný výsledek.*“ (Kalina, 2015, str. 7)

2.1 Agregace a sedimentace v polymerní suspenzi

Stabilizace léčiva je ve farmacii klíčový atribut při výrobě, protože může přímo ohrozit zdraví pacienta a samotnou účinnost podaného léčiva. Jedním z mechanismů způsobující destabilizaci je právě agregace, která může být vyvolána přidáním flokulantů. Agregace ovlivňuje především fyzikální stabilitu, která zahrnuje velikost částic, rychlost rozpadu látky, rozpustnosti a viskozity. (Brunaugh, 2019; Kalina, 2015; Elimelech, ed., 2010)

Agregace částic je jev, kdy se částice (díky vlivu Van der Waalsových sil a Brownova pohybu) k sobě přibližují a shlukují do větších celků tzv. agregátů. Aby došlo k agregaci, musí se k sobě částice přiblížit na vzdálenost rovnou součtu jejich poloměrů. Čím menší velikost molekul léčivé látky, tím je lépe dispergována, a tedy vytvořeno ideální homogenní prostředí. Na druhou stranu se zvyšuje počet soudržných sil mezi molekulami a problémy s tokem léčiva (jeho viskozitou) při výrobě. (Brunaugh, 2019; Fischer, 2019; Kesharwani, ed., 2021)

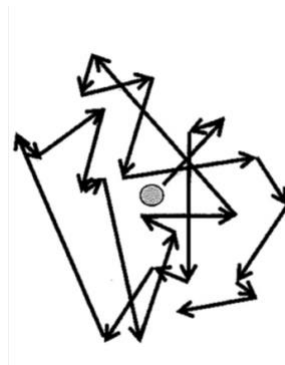
Faktory, které ovlivňují agregaci jsou jak biologické, chemické, tak i fyzikální. Ve farmacii mezi chemické můžeme řadit změnu pH, iontových sil (ovlivněné velikostí částic) či enzymů. U fyzikálních faktorů, které jsou důležitější pro skladování, výrobu a produkci farmak, řadíme sonikaci (použití ultrazvuku), změnu teploty (sušení, odpařování) a radiaci. (Persson a Gekas, 1994; Xiong, Liu a Xiong, 2021; Cao, Trefalt a Borkovec, 2018; Camassa et al., 2019)

Všechny vyjmenované faktory z velké části potvrzuje Stokesova–Einsteinova rovnice [1], která tvrdí, že mezi rychlostí pohybem částic a jejich velikostí je vztah, který je definován (Lu a Murphy, 2018):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad [1]$$

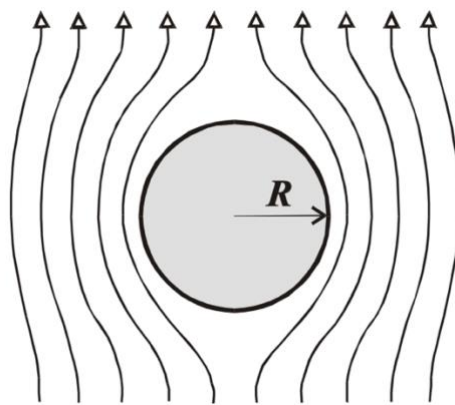
Kde η je viskozita, T je teplota, r je poloměr částic a k je Boltzmannova konstanta. Díky této rovnici Einstein vyjádřil Brownův pohyb. Ten byl objeven botanikem Brownem, když pozoroval hladinu, na které byly vidět chaoticky se pohybující zrnka pylu. V dnešní době se Brownovy zákony dotýkají nejen fyziky, ale i chemie, biologie a ekonomie. (Stefánsson, 2006)

Brownův pohyb je definován jako neuspořádaný a náhodný pohyb částic v prostředí. (Bian, 2016) I když se chaotickým pohybem částic zabývalo spousta fyziků, teprve Einstein dokázal vyjádřit Brownův pohyb na základě termodynamiky a Stokesova zákona. Přesněji rozrušení mikroskopické částice tepelným pohybem molekul kapaliny, a definitivně prokázat, že atomy a molekuly existují. „*Platí-li atomová hypotéza musí částice ponořené do okolního prostředí podstupovat věčný nepravidelný pohyb v důsledku chaotických srážek s jeho molekulami.*“ (Frey, 2005, str. 23) Pokud částice mají velikost v rozměru mikrometrů, mají ideální velikost, protože jsou dostatečně velké na pozorování v mikroskopu a dostatečně malé, aby na ně neustále působil Brownův pohyb. Čím vyšší je viskozita disperzního prostředí, tím nižší je pohyblivost částic. (Bian, 2016; Frey, 2005; Dill, 2003; Mo, 2019; Dalal, 2019)



Obrázek 2.1 Trajektorie Brownova pohybu jedné částice (Lu, 2018)

Hlavní vliv na Brownův pohyb má viskozita. Odpor prostředí, který viskozita vytváří, ovlivňuje pohyblivost částic v prostředí a jejich možnou agregaci. „*Viskozita je fyzikální veličina, která charakterizuje odpor toku kapalin.*“ (George, 2013, str. 1) Je známo, že čím vyšší je viskozita kapaliny, tím se snižuje hybnost molekul. Třecí síla způsobená tečnými silami mezi jednotlivými „vrstvami“ kapaliny pohybující se různou rychlostí, je hlavní příčinou viskozity. Tečné síly vznikají díky chaotickému pohybu částic a slabým mezimolekulárním interakcím. Faktory, které ovlivňují viskozitu kapaliny, jsou koncentrace roztoku, teplota, chemická povaha látky a tlak. U hrubých a koloidních disperzních soustav (např. suspenze) jsou rozměry disperzních částic větší, než částice disperzního prostředí. V prostředí se částice o poloměru R účastní tvorby viskózního prostředí, protože už se rychlost toku nemění jenom kolmo na směr proudnic, ale i podél nich. Element kapaliny se těsně přiblíží k částici a rychlost toku zpomalí. Poté, co se dostane za částici, se rychlost toku opět zrychlí (viz. obrázek 2.2). V případě orálně disperzních filmů ovlivňuje výrobu i jejich funkci. Například při vysoké viskozitě dochází k problémům s odvodušněním a nerovnoměrnému rozložení disperze (dochází tzv. k nehomogenitě prostředí). Proto se musí optimalizovat viskozita i z důvodu zpomalení sedimentace a udržení stabilního prostředí. (Hrazdira, 2004; Lázničková, 2014; He, 2021; Turković, 2022; Pouchlý, 2008; Sarisuta, 1982; Fischer, 2019)



Obrázek 2.2 Obtékání kulovitého tělesa kapalinou (Pouchlý, 2008)

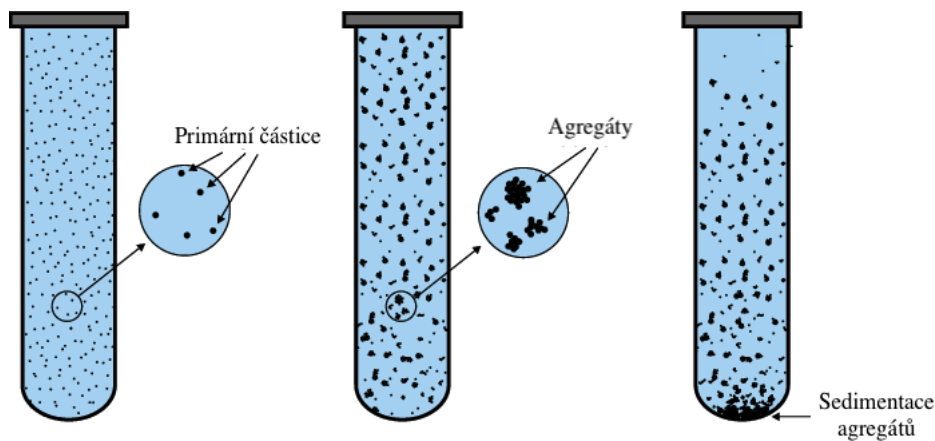
Pokud se částice k sobě přiblíží natolik, aby spolu mohly interagovat, vznikají mezi nimi slabé vazebné interakce (nebo také mezimolekulární interakce). Mezi ně řadíme Van der Waalsovy síly a vodíkové vazby. Slabé nevazebné interakce nacházíme např. v DNA, kdy celá dvoušroubovice má svou strukturu právě díky těmto silám. Síly jsou o dost slabší než např. kovalentní vazby nebo iontové a záleží čistě na vzdálenosti mezi molekulami. Van der Waalsovy síly působí na molekuly s elektricky neutrálním nábojem. Princip vzniku těchto sil je na základě nerovnoměrného rozložení elektronů, které můžeme vyjádřit pomocí dipólového momentu. Místa s převahou kladně či záporně nabitých elektronů se nazývají dipóly. Dipólový moment je vektorová veličina, která charakterizuje nesymetrické rozdělení. Základní jednotka je C/m (Coulomb na metr). Van der Waalsovy síly zpravidla vznikají mezi polárními nebo polární–nepolární molekulou. U polárních molekul se síly orientují opačně nabitými částmi k sobě. U interakce polární – nepolární vazby nejprve polární molekula indukuje u nepolární dipól, který způsobí, že nepolární molekula se chová částečně jako polární. Mezi typické polární molekuly řadíme např. vodu. Mezi nepolární řadíme organické sloučeniny nebo čisté prvky (např. H₂). (Franková, 2014; Hirschfelder, 1963; Halgren, 1992; Banerjee, 2022)

Při tvorbě agregátů se plynule přechází k procesu sedimentace (viz. obrázek 2.3). Sedimentace je proces, kdy dochází k usazování agregátů, a tedy i k oddělení 2 složek (pevné a kapalné) suspenze za působení gravitační síly, která působí na částice. Hlavním prekurzorem je rozdíl mezi gravitační a vzlakovou silou. Rychlost sedimentaci ovlivňují tři úrovně interakcí v suspenzi. První je interakce částice–částice, kdy je myšlena agregace částic. Tato interakce je významná u vysoce koncentrovaných suspenzí. Další interakce je částice a médium. Některé částice mohou nepřímo interagovat s médiem, a tím ovlivnit proces sedimentace. Poslední parametr je hydrodynamická interakce částic. Tato

hydrodynamická síla způsobuje, že každá částice kvůli svému chaotickému pohybu vytváří kolem sebe sekundární proudové pole a při vysoké koncentraci roztoku se pole jednotlivých částic mohou překrývat, a zároveň rušit. Rychlost sedimentace se dá vyjádřit pomocí rovnice [2], podle které je sedimentace přímo úměrná rozdílu hustot mezi pevnou a kapalnou fází a nepřímo úměrná viskozitě prostředí. (Babu, ed., 2022; Kourki, 2012; Fischer, 2019; Cheng, 1955) Stokesova rovnice pro sedimentaci zní (Kourki, 2012):

$$v = \frac{d^2 g}{18\mu} (\rho_c - \rho_p) \quad [2]$$

Kdy d je průměr částice, g je gravitační zrychlení, μ je viskozita prostředí, ρ_c je hustota částic a ρ_p je hustota prostředí.



Obrázek 2.3 Schéma agregace a sedimentace (Lin, 2015)

2.1.1 Coffee ring effect

Důkaz pohybu částic v kapalině a její agregaci byl znovu dokázán na konci 20. století. Coffee ring effect (CRE) je fenomén, který popisuje obrazec vytvořený po odpaření kapaliny obsahující částice. Byl charakterizován dle kroužkovitého útvaru, který je vytvořen po obvodu rozlité kávy. Celý mechanismus pracuje na principu kapilárního proudění. Kapka s částicemi se odpařuje od kraje, a zároveň jsou okraje doplňované kapalinou ze středu. To způsobuje pohyb částic k okraji. Aby ale tento efekt nastal, musí kapalina mít nízké Marangoniho číslo. To popisuje přenos hmoty mezi dvěma fázemi v důsledku gradientu povrchového napětí. Marangoniho proudění se nachází i u rozpuštěných látek v roztoku při odpařování, kdy se využívá při tvorbě rovnoměrného filmu. (Gençer, 2017; Ooi, 2017; Deegan, 1997)

2.2 Přípravy orálně disperzních filmů

Farmaceutický průmysl se více přizpůsobuje potřebám zákazníka (pacienta). I přes velice variabilní léčivé formy, orálně disperzní filmy (ODF) se ve světě uchytily zejména díky jejich jednoduchosti aplikace a jejich možnosti individuální výroby, která podporuje trend směřující k personalizované léčbě. (Morath, 2022) Jsou vhodné zejména pro pacienty s dysfagií, dětské pacienty, anebo pacienty upoutané na lůžko. Můžou se podat buď perorálně, bukálně či sublingválně. Hlavním důvodem k výrobě této formy byly obavy z udušení tabletovou formou. (SEVİNÇ ÖZAKAR, 2021; Ferreira, 2017; Gijare, 2018; Speer, 2018)

ODF jsou charakterizované jako tenká a pružná polymerní vrstva, která je netoxická, biologicky odbouratelná a biokompatibilní. Splňují mnoho nároků systému pro podávání léčiv. Byla prokázána zvýšená počáteční účinnost léčiva a jeho trvání a snížené dávkování. (Karki, 2016) Jako první s touto lékovou formou přišel Pfizer v roce 2001. (Walicová, 2016)

Díky anatomii dutiny ústní se léčivo uvolňuje do krevního řečiště hned po podání, kvůli epitelu dutiny ústní, přesněji nerohovatějící sublingvální sliznici, který je vysoce permeabilní (až 4000x více propustná než kůže). Méně propustná je sliznice bukální a měkkého patra. Právě tyto místa se používají v klinické praxi. Hlen obsažený ve slinách funguje jako lubrikant, protože zajišťuje přilnutí lékových forem ke sliznici. Při fyziologickém pH nese negativní náboj, díky kterému má léčivá látka horší přístup k transportu a absorpci, ale taky možnost prodloužení kontaktu s epitelem, a tím dochází i k delší době působení léčivé látky na epitel. Hlen má funkci ochrannou, zvlhčující a bariérovou. Sliny jsou produkovány slinnými žlázami, které se skládají ze 3 hlavních velkých žláz (příušní, podčelistní a sublingvální). V menším množství se sliny produkují i v malých slinných žlázách, které jsou hned pod sliznicí (celková plocha sliznice v dutině je 100-200 cm²). Celkově se vyprodukuje za minutu 1-2 ml. Sliny, kromě hlenu, obsahují vodu, amylázy, imunoglobuliny, minerální soli atd., které zapříčiňují rozpustnost ODF v dutině ústní. (Čihák, 2013; SEVİNÇ ÖZAKAR, 2021; Gajdzik, 2016; Walicová, 2016; Redfearn, 2019)

Proces dávkování léčiva se skládá z výroby velmi tenkého perorálního proužku, který se přiloží na sliznici dutiny ústní (většinou na nebo pod jazyk nebo vnitřní stěnu tváře), kde se díky slinám přilne na místo aplikace a následně rozpadne kvůli obsahujícím

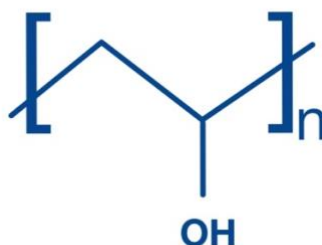
polymerům rozpustných ve vodě. Po rozpadu se buď léčivá forma smíchá se slinami a následně polkne, anebo při delší setrvačnosti rozpadu ODF se léčivá forma absorbuje přes sliznici. V druhém případě může dojít k lokálnímu účinku léčivé látky. (Vishwakarma, 2017; SEVİNÇ ÖZAKAR, 2021; Walicová, 2016)

Základní složení ODF se skládá z: léčivé látky (API – active pharmaceutical ingredient, neboli aktivní farmaceutická složka), filmotvorného polymeru, změkčovadla, látek stimulující slinění, látek maskující chuť, plniv, barviva. Dodatečně může obsahovat i inhibitory enzymů, aktivní povrchové látky, stabilizátory a zahušťovadla. (Pacheco, 2021)

Polymer, který slouží v ODF jako nosič API, musí být vodorozpustný, aby se ODF dokázalo rozpustit v dutině ústní. Polymer rozpustný ve vodě, musí mít dostatečný počet elektronegativních atomů a funkčních skupin v řetězci, aby dokázal vytvořit vodíkové můstky. Po kontaktu tohoto polymeru s vodou, má polymer schopnost zvyšovat viskozitu při nižších koncentracích, bobtnat a měnit strukturu a tvar roztoku. (Kalia, ed., 2021) Při použití vhodného polymeru pro léčiva sledujeme dva parametry. Molekulová hmotnost udává rychlost rozpuštění polymeru. Čím vyšší je molekulová hmotnost, tím je molekula větší a její vazby silnější, tedy rychlost rozpuštění polymeru bude pomalejší. Dalším faktorem je stupeň krystalinity. Ke krystalizaci dochází právě při extrémní teplotní změně nebo náhlé změně struktury polymeru např. při ochlazování po roztavení, odpařování, nebo mechanickému protažení. Krystalizace může ovlivnit vlastnosti polymeru (chemické, mechanické, optické ...). Stupně krystalinity jsou udávány v procentech a udává podíl obsahu (v procentuálním zastoupení) krystalického obsahu ve struktuře polymeru. Čím vyšší stupeň, tím hůře se polymer rozpouští. Místo krystalizace se označuje jako zárodek a podle původu ho rozdělujeme na homogenní nebo heterogenní. Homogenní částice vznikají právě prudkým ochlazením polymeru nebo dalším mechanickým nebo teplotním působením. Heterogenní zárodky bývají nepatrné částice prachu nebo jiného materiálu. (Keller, 1952) Nejčastěji používané polymery jsou: polyvinylalkohol (PVA), polyvinyl pyrrolidon (PVP), hydroxypropylmethylcelulosa (HPMC), polyethylen oxid (PEO), a přírodní např. pullulan (PUL) nebo maltodextrin. Nejsou to ale jediné používané polymery. Více se klade důraz na přírodní polymery (biopolymery), které jsou už od přírody biokompatibilní, biodegradabilní, jsou často hydrofilní a netoxické. (Rebelo, 2017) Biopolymery jsou polymery, které jsou produkovány živými organismy, a tudíž je můžeme najít volně v přírodě. Nachází se od

rostlin přes bakterie až po člověka. Hlavním představitelem této skupiny je DNA a RNA, tedy polynukleotidy. Řadí se sem ale také polysacharidy a polypeptidy. (Yadav, 2015) Díky jejich složité struktuře a nahodilosti v porovnání se syntetickými polymery, jsou ideální pro využití v medicíně. Ve farmacii jsou využívány hlavně jako nosiči léčivé látky. Velká výhoda biopolymerů se využívá také v tkáňovém inženýrství. (Onar, 2004; Baranwal, 2022)

Námi používaný PVA (strukturní vzorec viz. obrázek 2.4) je vodorozpustný polymer, který díky jemu snadné dostupnosti je jedním z nejvíce používaných polymerů ve zdravotnictví vůbec. Mezi jeho hlavní výhody spadá snadná chemická modifikace, biokompatibilita, nízká tendence k adhezi proteinů a nízká toxicita. (Baker, 2012; Morath, 2022; Parisi, 2022) Další složkou jsou změkčovadla, která pomáhají s mechanickou pružností a obecné zlepšení mechanických vlastností. Barviva a látky maskující chuť (sladidla, aromata) slouží hlavně pro účely zamaskování chuti (protože většina API mají nahořklou chuť) a atraktivnější přijetí léčiva spotřebitelem. (Turković, 2022; Singh, 2021; Dixit, 2009; Pacheco, 2021; Kadajji, 2011)



Obrázek 2.4 Vzorec polyvinylalkoholu (PVA) (Zdroj: autor)

Stěžejními výhodami ODF jsou prokrvení sliznice a snadná dostupnost k lymfatickému systému. Velká plocha sliznice umožňuje snadnou aplikaci a rychlejší absorpci a přeskočení „first-pass“ efektu (např. žaludeční šťávy nebo žluč), který způsobuje sníženou koncentraci účinné látky v těle, a to taky umožňuje použití menší dávky léčivé látky a omezení nežádoucích vedlejších efektů. Tenká vrstva léku je stabilnější a rychleji se rozpouští, a to způsobuje rychlejší uvolnění léčivé látky do těla. Oproti tekutým formám je zaručena lepší přesnost dávkování. Díky rozpuštění i bez „zapíjení“ léčivé formy vodou, je ideální formou např. pro pacienty podstupující

chemoterapii. (Gajdzik, 2016; Siddiqui, 2010; Vishwakarma, 2017; SEVİNÇ ÖZAKAR, 2021; Herman, 2022; Cupone, 2022; Ferlak, 2023; Hoffmann, 2011)

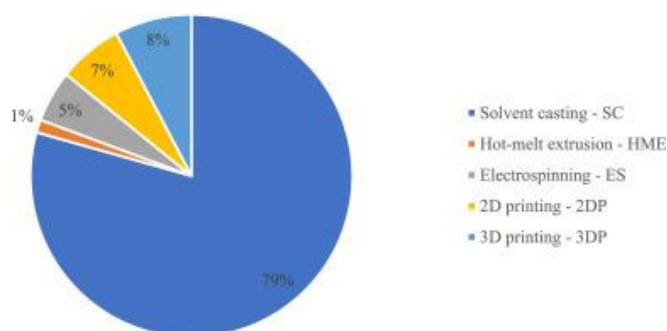
Hlavní nevýhodou ODF je ekonomická náročnost na přípravu i uchování. Sledovaným parametrem při skladování je vlhkost, protože tato vlastnost přináší výhodu při aplikaci léčiva pacientovi, je náchylnější ke skladování. Možná další nevýhoda je malé množství dávky. Bylo prokázáno, že lze navýšit množství léčivé látky až na 50% celkové hmotnosti ODF. (Siddiqui, 2010; Vishwakarma, 2017; Cupone, 2022)

ODF je v literatuře často zaměnitelný pojem. Evropskou lékovou agenturou (EMA – European Medicines Agency) je definován jako orodispergovatelny film (angl. Orodispersible film). Americká FDA (Food and Drug Administration) používá termín rozpustný film (angl. soluble film). Dále se označuje pojmem orální plátek (angl. oral strip). V česku je oficiálně uveden pod pojmem jako „*Film dispergovaný v ústech*“ v Českém lékopisu 2009 Doplněk 2013, kde je definován jako jednovrstevné nebo vícevrstevné pláty z vhodného materiálu určené k umístění do ústní dutiny, kde se rychle dispergují. (ANON, 2013; Walicová, 2016)

Pro zajištění kvality ODF a jejich zaručenou stabilitu při podání léčiva zajišťuje správná výrobní praxe (SVP). Z anglického překladu Good Manufacturing Practice (GMP), SVP je soubor pravidel, který zajišťuje ochranu spotřebitele (pacienta) pomocí opatření minimalizující riziko schválení léku nevyhovující kvality nebo nevhodný pro zamýšlené použití, který by mohl spotřebitele ohrozit na životě. Jinými slovy tyto pravidla určují přesný postup výroby a kontroly léčiv. Mezi základní kontrolní oblasti patří řízení jakosti (kvality), rozdělení pracovníků, prostor a zařízení, dokumentace, výroba, kontrola jakosti, smluvní výroba a laboratorní kontrola, reklamace i stahování výrobků. (Hampl, 2015)

V české legislativě je SVP uzákoněna v zákoně o léčivech č. 379/2007 Sb.. Přesná pravidla postupu dle zákona o léčivech stanovuje vyhláška MZd ČR č. 229/2008 Sb. Zákonné normy jsou v souladu s předpisy Evropské unie dle Směrnice Komise 2003/94/EC, 2004/27/EC a 2004/28/EC. Dále můžeme pokyny pro SVP nalézt v pokynech SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv) VYR-32 vydaný ve Věstníku SÚKL č. 2/2006, který je českým překladem materiálů Evropské unie pod názvem „*The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4, Good Manufacturing Practices*“. (Hampl, 2015)

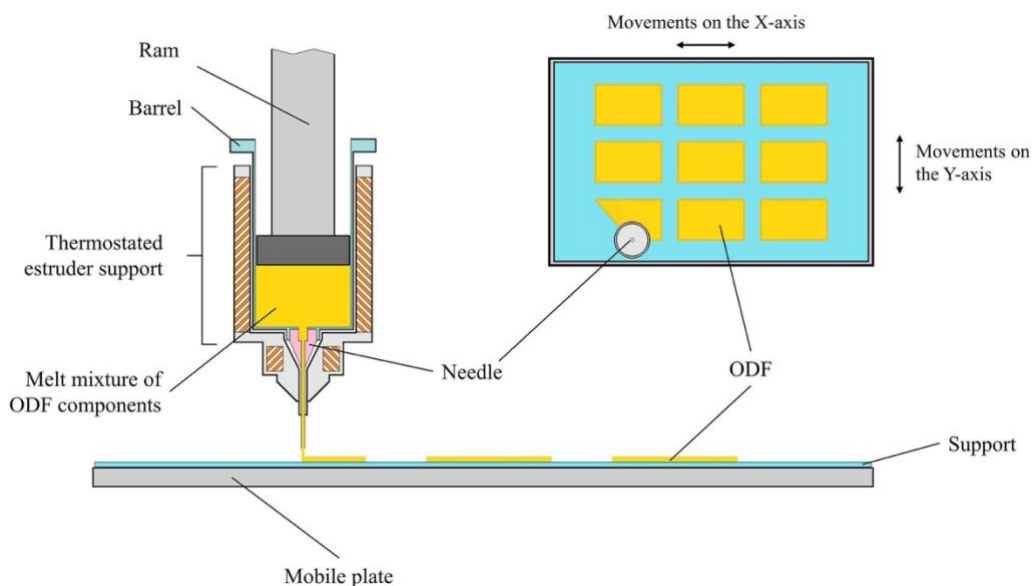
Výroba ODF začala v 60. letech minulého století přípravou celulózových folií. Ty však nebyly stabilní kvůli smršťování filmů při sušení, nepřesným dávkováním a nejednotnosti lékové formulace. Od té doby příprava ODF značně pokročila. Je několik druhů přípravy, ale metoda solvent-casting patří bezkonkurenčně k nejrozšířenějším (hlavně co se týče průmyslové metody) (viz. obrázek č. 2.5). Další využívané metody jsou elektrosponing (electrospinning), vytlačování za tepla (hot-melt extrusion) nebo 2D a 3D tisk (2D, 3D printing). (Turković, 2022; Cupone, 2022; Morath, 2022; Ferlak, 2023; Jose, 2019; Musazzi, 2020; Shanbhag, 2008)



Obrázek 1.5 Frekvence používání jednotlivých způsobů výroby ODF (Turković, 2022)

2.2.1 Metoda solvent – casting

Solvent – casting metoda je nerozšířenější metoda, co se týče metody přípravy orálně disperzních filmů. Je to zatím i nejpraktičtější metoda pro technickou přípravu v klinické praxi. Můžeme použít širokou škálu polymerů, kdy má každá své unikátní vlastnosti způsobující individuální proces a jiné mechanismy uvolňování. Připravují se jak ODF s API, anebo bez ní, které se pak používají jako substráty na 2D tisk. Postup je následující. Nejdříve rozpustíme léčivou látku ve vhodném rozpouštědle. Odděleně smícháme ostatní pomocné látky (polymer, změkčovadlo, barviva atd.) do formy roztoku nebo suspenze. Pro lepší manipulaci by se měl disperzní systém odplynit, kvůli odstranění vzniklých bublin. Následně se rozleje roztok/ suspenze do formy (vrstvicí stroj nebo Petriho miska), kde se suší. Sušení probíhá zhruba za teploty 50°C. Je to z důvodu přizpůsobení se výrobě. Nejideálnější je pokojová teplota, kvůli lepším mechanickým vlastnostem, ovšem díky časové náročnosti a průmyslové (myšleno farmaceutické) výrobě je potřeba proces sušení urychlit. Nakonec se rozřeže na požadovanou velikost. (Salawi, 2022; Turković, 2022; Morath, 2022; Mireault, 2020)



Obrázek 2.6 Postup výroby ODF metodou solvent – casting (Musazzi, 2020)

2.3 Polarizační mikroskopie

I když se dá agregace částic pozorovat více způsoby (např. pomocí rozptylu světla), pro tuto práci jsme zvolili polarizační mikroskopii. Její schopnost vyznačit pouze opticky aktivní částice může pomoci se sledováním agregace. V dnešní době máme už několik druhů mikroskopů od „klasického“ optického mikroskopu, přes elektronový mikroskop, až po fluorescenční mikroskop. Každý má své speciální užití. (Frandsen, 2016)

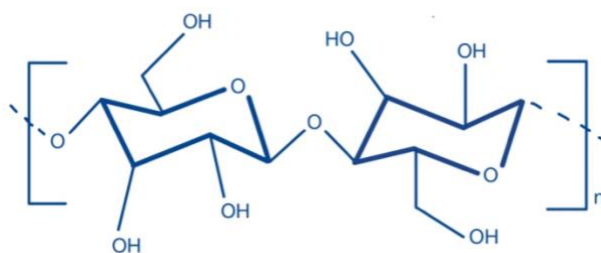
Polarizační mikroskopie (PM) v posledních letech zaznamenala největší pokrok u studování dvojlomého charakteru anizotropních subcelulárních soustav. Obecně se využívá na sledování anizotropních látek a krystalů. PM je kombinací klasického světelného mikroskopu a polarimetru. Polarimetr se v medicíně používá při měření glukózy v moči. (Olympus, 2023; Nikon, 2023)

Polarizace světla je založena na principu šíření elektromagnetických vln. U světla jsou elektromagnetické vlny, resp. vektor intenzity elektrického pole E a vektor magnetického pole H , na sebe kolmé a jsou kolmé i na směr šíření vlnění jako takového. Za běžných podmínek ale směr šíření vektoru E je zcela nahodilý a je nutné proto přirozené světlo zpolarizovat a získat tzv. lineárně polarizované světlo, které bude mít vektor E kmitající v jedné rovině a bude tedy i polarizovatelné. (Kocsis et al., 1998; Olympus, 2023; Frandsen, 2016; Nikon, 2023)

K polarizaci používáme u PM dva polarizátory (v české literatuře polarizátor a analyzátor). Polarizátor se nachází v osvětlovací soustavě a analyzátor za objektivem zpravidla v tubusu. U PM se využívá metoda dvojlomu. Paprsek, který projde opticky aktivní látkou (např. nanocelulózou) se rozdělí na dva, kdy jeden projde analyzátolem kolmo (tedy dál neprojde) a druhý rovnoběžně. Ten se pak zobrazí světle nebo barevně (záleží na povaze látky, kterou paprsek prošel). (Nikon, 2023; Olympus, 2023; Frandsen, 2016)

2.3.1 Nanocelulóza

Mezi lehce pozorovatelné, ve vodě nerozpustné, a opticky aktivní látky patří nanocelulóza. To je celulóza, kdy jeden její parametr má pod 100nm. Její obrovská výhoda je nízká toxicita, díky které si získala oblibu jako biomedicinský materiál (např. v tkáňovém inženýrství jako tkáňový nosič). Na druhou stranu je její obrovská nevýhoda její výroba a pracné zpracování. Často se kvůli homogenitě používá sonikace (ultrazvuk), kvůli porušení vazeb. Dělí se na nanokrystaly (CNC nebo NCC), nanovlákná (CNF) a bakteriální nanocelulózu. Chemická struktura jednotlivých typů je podobná, ale každý typ se odlišuje svoji morfologií, velikostí částic či krystalitou. Nejtypičtější charakteristika nanocelulózy je její schopnost vytvářet gel. (Puglia, ed., 2016; Gençer, 2017; Mondal, ed., 2016; Klockars, 2018; Heise, 2021)



Obrázek 2.7 Vzorec nanocelulózy (Zdroj: Autor)

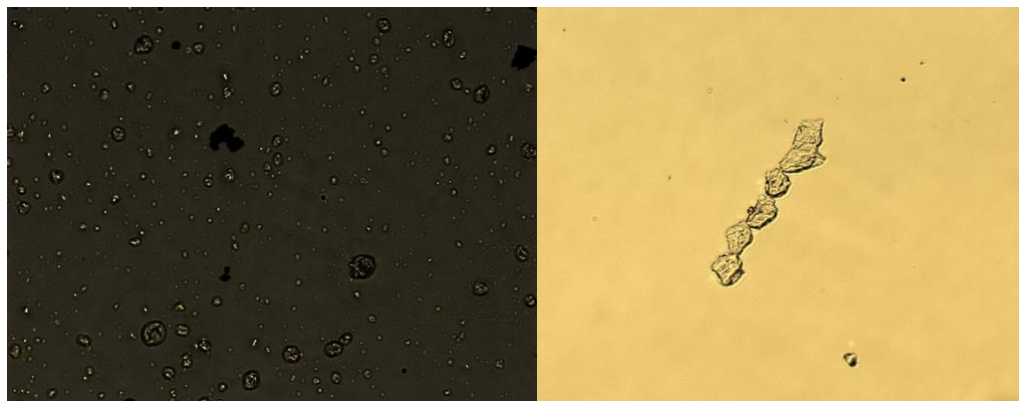
3 Praktická část

3.1 Cíle a výzkumné předpoklady/otázky

Cílem bakalářské práce je vyvinout metodiku pro pozorování a vyhodnocení agregace částic v ODF vyrobené pomocí metody „solvent–casting“. Hlavní otázkou je, zda je možné sledovat agregaci částic v reálném čase (online). Suspenze by měla být viskózní tak, aby byla zajištěna dostatečná pohyblivost částic. Otázky, které budou řešeny v této práci jsou následující: Je možné charakterizovat agregační proces na polymerních filmech vyrobených metodou „solvent-casting“? Je možné tento proces nějak kvantifikovat obrazovou analýzou?

3.2 Příprava a nanášení polymerní suspenze

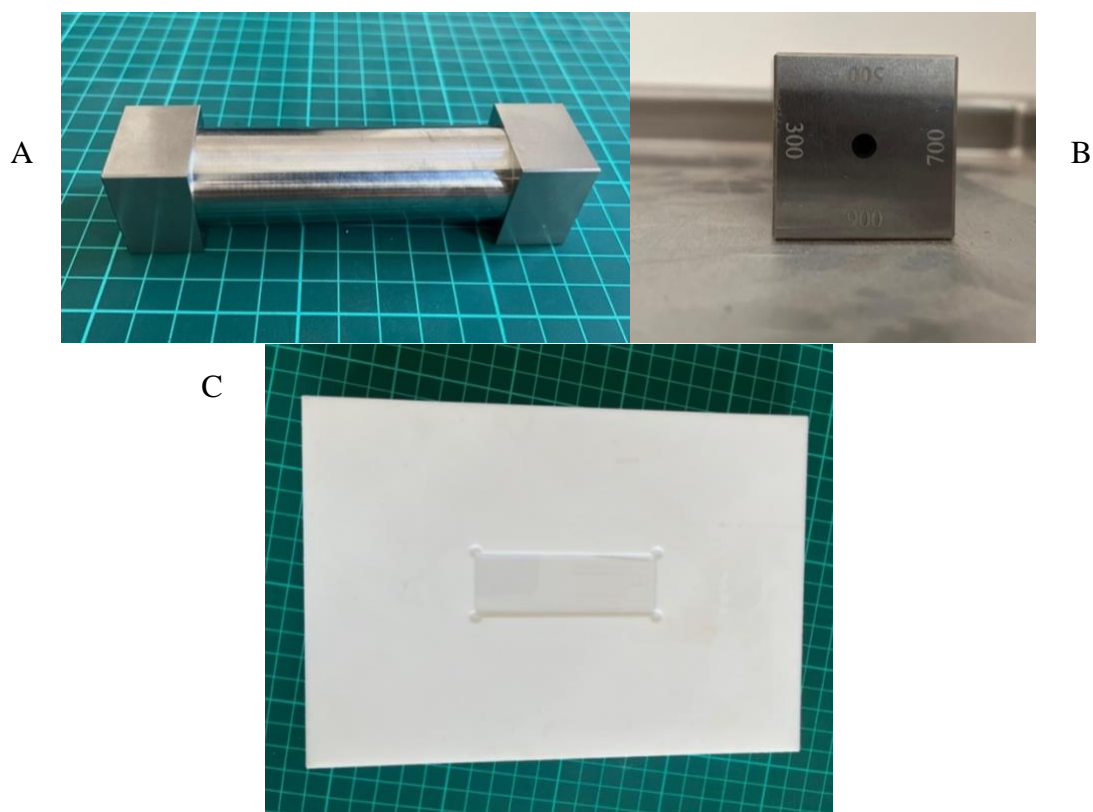
Jako částice jejíž pohyb bude sledován byla zvolena nanocelulóza (CNC, z angl. cellulose nano crystals), která byla dispergována v polyvinylalkoholu (PVA) rozpuštěném v destilované vodě (dH₂O) a ethanolu. CNC je ve vodě nerozpustná a v polarizovaném světle vykazuje aktivitu (viz. obrázek 3.1). V našem případě používáme CNC značky CelluForce (výrobní číslo #2015-133) a PVA 5-88 značky Emprove® Essential, SKU 1413541000, CAS-No 9002-89-5.



Obrázek 3.1 CNC v PVA (vlevo), řetězec CNC (vpravo) (Zdroj: Autor)

Nejdříve bylo nutné najít nejvhodnější viskózní prostředí. Byl připraven roztok PVA s vodou v různém procentuálním zastoupení. Důležité bylo, aby roztok byl snadno roztíratelný, a zároveň se neroztékal po sklíčku. Byly připraveny roztoky o hmotnostní koncentraci 25%, 20%, 15%, 10% PVA ve vodě/ethanol (8:2). Poté byl každý vzorek rozetřen po sklíčku, vloženém v teflonové desce (viz. obrázek 3.5C), pomocí natahovacího pravítka značky Proinex Instruments s.r.o., třídy Baker VF1515-373

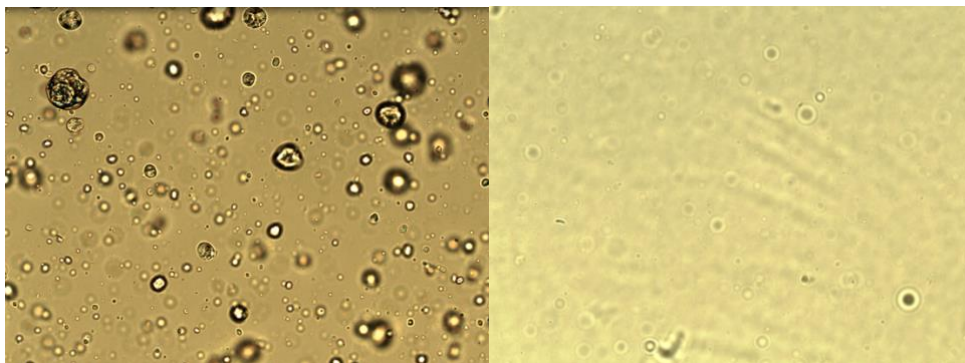
(viz. obrázek 3.2A). Válcový aplikátor má 4 aplikační hrany různé tloušťky (300, 500, 700 a 900 μm) (viz. obrázek 3.2B) a je vyroben z vysoce kvalitní nerezové oceli, která se nepoškodí ani kyselými ani zásaditými prostředky.



Obrázek 3.2 A Natahovací pravítko, B Velikosti natahovacího pravítka, C Teflonová deska s vloženým sklíčkem
(Zdroj: Autor)

Na základě subjektivního pozorování byla stanovena pro přípravu filmu nejlepší koncentrace 20% PVA ve vodě/ethanol (8:2). Při přípravě suspenze je důležité homogenně dispergovat nejprve částice CNC v destilované vodě. Homogenita částic působí velké problémy při výrobě nanomateriálů i léčiv (např. ODF). Byly proto použity dvě metody přípravy. V první metodě (CNC \Rightarrow PVA) bylo přidáno CNC do už vzniklého roztoku PVA. Následně za využití ultrazvukové lázně po dobu 90 minut by mělo být dosaženo homogenity v suspenzi. Druhá metoda (PVA \Rightarrow CNC) zahrnovala opačný postup. Nejprve bylo CNC dispergováno ve vodě pomocí ultrazvukové lázně po dobu 45 minut. Subjektivním vyhodnocením homogenity částic byla suspenze ponechána v lázni dle potřeby. S postupným přidáváním PVA rostla viskozita suspenze, a tím se snižovala hybnost částic. (viz. str. 12) PVA bylo přidáváno po dávkách kvůli zachování homogenity.

Problémem při přípravě vzorků byla schopnost CNC vytvářet při vyšších koncentracích gel. Při přípravě dvou vzorků o stejném složení, ale jiné metodě vyšla rozdílná viskozita prostředí a viditelný počet částic pod mikroskopem (viz. obrázek 3.3). Při přípravě vzorku první metodou byl problém vysoké viskozity vzorku. Byla snížena koncentrace suspenze na 15% PVA.

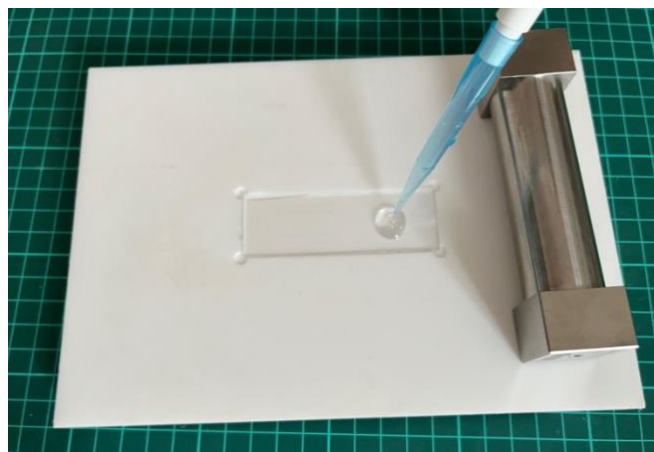


Obrázek 3.3 Snímek vzorku č. 1 (vlevo), snímek vzorku č. 2 (vpravo) (Zdroj: Autor)

Ke sledování byly vybrány 4 vzorky o různé koncentraci CNC a metodě přípravy. (viz. tabulka 3.1)

Tabulka 3.1 Seznam vzorků

Číslo vzorku	Hmotnostní koncentrace CNC (%)	Metoda přípravy
1.	0,06	CNC \Rightarrow PVA
2.	0,06	PVA \Rightarrow CNC
3.	0,3	PVA \Rightarrow CNC
4.	0,6	PVA \Rightarrow CNC



Obrázek 3.4 Proces nanášení vzorku na sklíčko (Zdroj: Autor)

Připravené suspenze byly nanášeny na sklíčko a do Petriho misky. Nanášení suspenze na sklíčko a rozetření válcovým aplikátorem mělo přiblížit výrobní proces (viz obrázek 3.4). Petriho miska, která měla v průměru 30 mm, přibližovala laboratorní přípravu. Každý vzorek byl protažen válcovým aplikátorem ve všech nabízených tloušťkách s různým dávkováním za pomoci pipety Biohit Proline 100–1000 μl . (viz. tabulka 3.2), kdy bylo potřebné dodržovat konstantní rychlost tažení pravítkem. Nejvhodnější tloušťka byla hodnocena dle následujících kritérií: délka evaporace, schopnost pozorovat pohyb částic a schopnost následného sejmutí vzorku ze sklíčka. Bylo zjištěno, že pro nejideálnější sledování agregace v suspenzi, je tloušťka 900 μm .

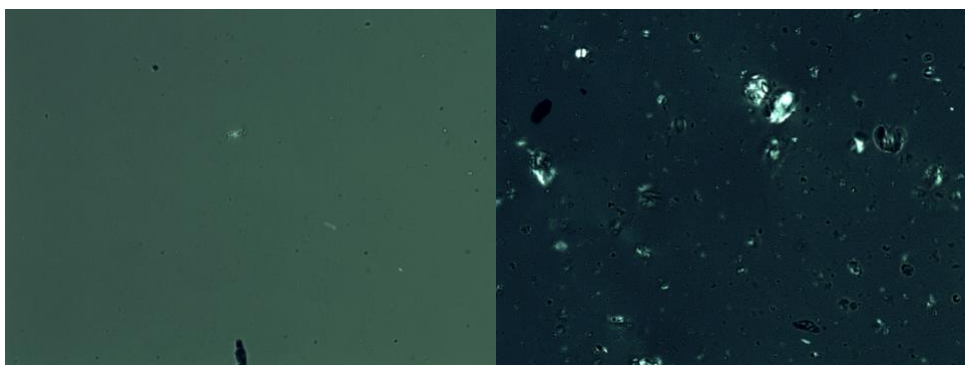
Tabulka 3.2 Přehled dávkování pro jednotlivé tloušťky

Tloušťka vzorku (μm)	Dávka (μl)
300	100
500	300
700	400
900	500
Petriho miska	1000

Po vypařování rozpouštědla ze suspenze bylo nutné vzorek sejmut ze sklíčka pomocí skalpelu. U tlouštěk 300 a 500 μm byl pokus neúspěšný u všech typů vzorků. U tloušťky vzorku 700 μm bylo možné sejmut vzorek č. 1 a 4 za občasného poškození struktury filmu. U tloušťky 900 μm bylo možné sejmut všechny vzorky. Obecně je možné tvrdit, že čím vyšší zastoupení CNC a větší tloušťky vzorku, tím je snadnější sejmutí vzorku ze sklíčka. Největší problém byly okraje vzorku. Jak bylo prokázáno u CRE zasychání vzorku probíhá od okrajů (Ooi, 2017). Kraje sledovaných vzorků jsou tenčí a projevovala se konkávní geometrie vzorku. Tento efekt byl sledován pouze u vzorků natažených pravítkem. U Petriho misky bylo pozorováno rovnoměrné rozprostření suspenze po celém povrchu misky díky kapilárním silám mezi stěnou misky a vodou obsaženou v suspenzi. Další problematika byla zjištěna v čase skladování vzorků, kdy docházelo po celou dobu k jejich vysychání. Vysychání vzorku dokazuje komplikovanost skladování ODF filmů v praxi.

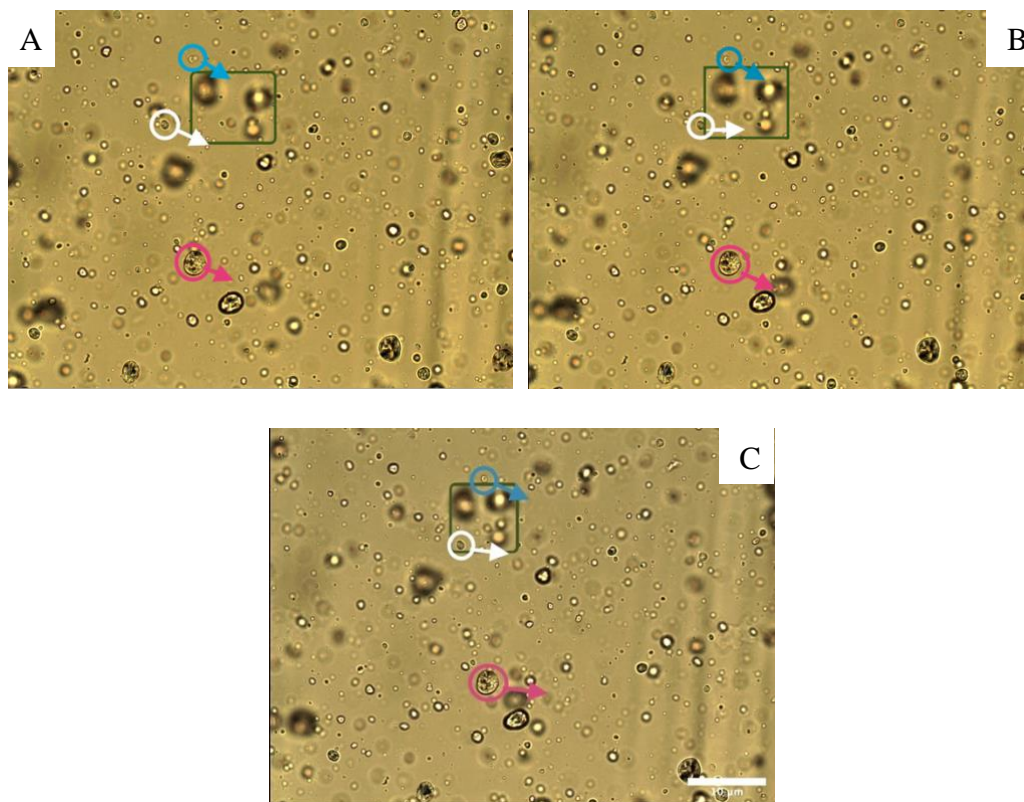
3.3 Pozorování částic pod mikroskopem

Po nanesení vzorku na sklíčka byly vzorky sledované pod mikroskopem značky Olympus BX60 s různými časovými rozestupy. Všechny následující snímky byly pozorovány objektivem se zvětšením 20x. Vzorky byly pozorovány pod normálním světlem (viz. obrázek 3.1), tak v polarizovaném světle (PS) (viz. obrázek 3.5).



Obrázek 3.5 Vzorek č.3 pod PS (vlevo), vzorek č. 4 pod PS (vpravo) (Zdroj: Autor)

Ukázka pohybu částic okem vidíme na obrázcích 3.6 Jsou zvýrazněné 3 částice třemi barvami (modrá, bílá, růžová). Všechny se pohybují jedním směrem zleva doprava. Sleduje se jejich pohyb v čase (t_0 , t_1 , t_2). Na obrázcích 3.6 jsou snímky pořízeny v rozmezí 10 s. V tmavě zeleném poli vyobrazeném na obrázcích 3.6 lze pozorovat rozostřené tři částice, jak se přibližují k sobě. Každá částice má jiné zaostření kvůli hloubce ostroty. Ve vzorku je spousta hladin, ve kterých se částice může pohybovat.



Obrázek 3.6 Vzorek 1, 500 μm , A v čase t_0 B v čase t_1 C v čase t_2 (Zdroj: Autor)

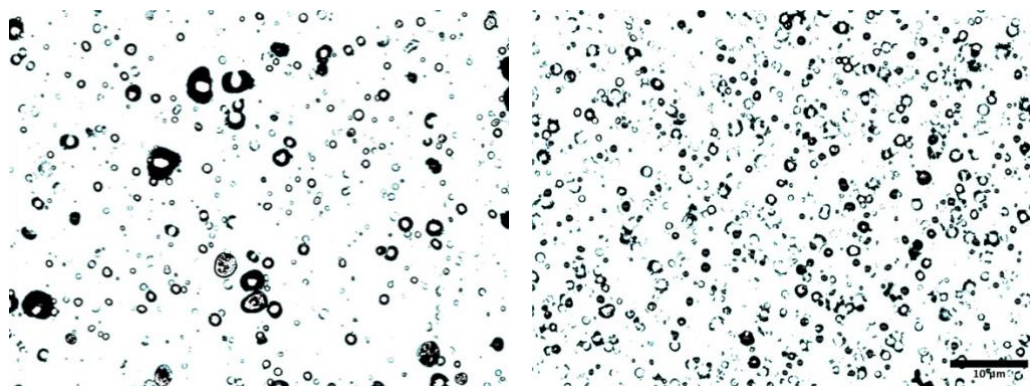
Pro důkaz pohybu částic byla změřena vzdálenost (μm) jednotlivých částic od okraje snímku (viz. tabulka 3.3). Zvýrazněné částice se pohybovaly podobnou rychlostí ve stejném směru.

Tabulka 3.3 Vzdálenost částic od hrany snímku

Částice/vzdálenost od hrany	t_1	t_2 (10 s)	t_3 (20 s)
modrá	23,3	25,1	27,3
bílá	19,7	21,7	24,2
růžová	22,4	24,4	27,1

Práce s aplikací ImageJ byla zaměřena na analýzu částic a jejich trasování. První krok byl kalibrace obrazu. Každý snímek musel být před zpracováním převeden do 8-bit obrazu, a poté segmentován pomocí funkce „Threshold“, která vytvořila černobílý obraz (viz. obrázek 3.9)

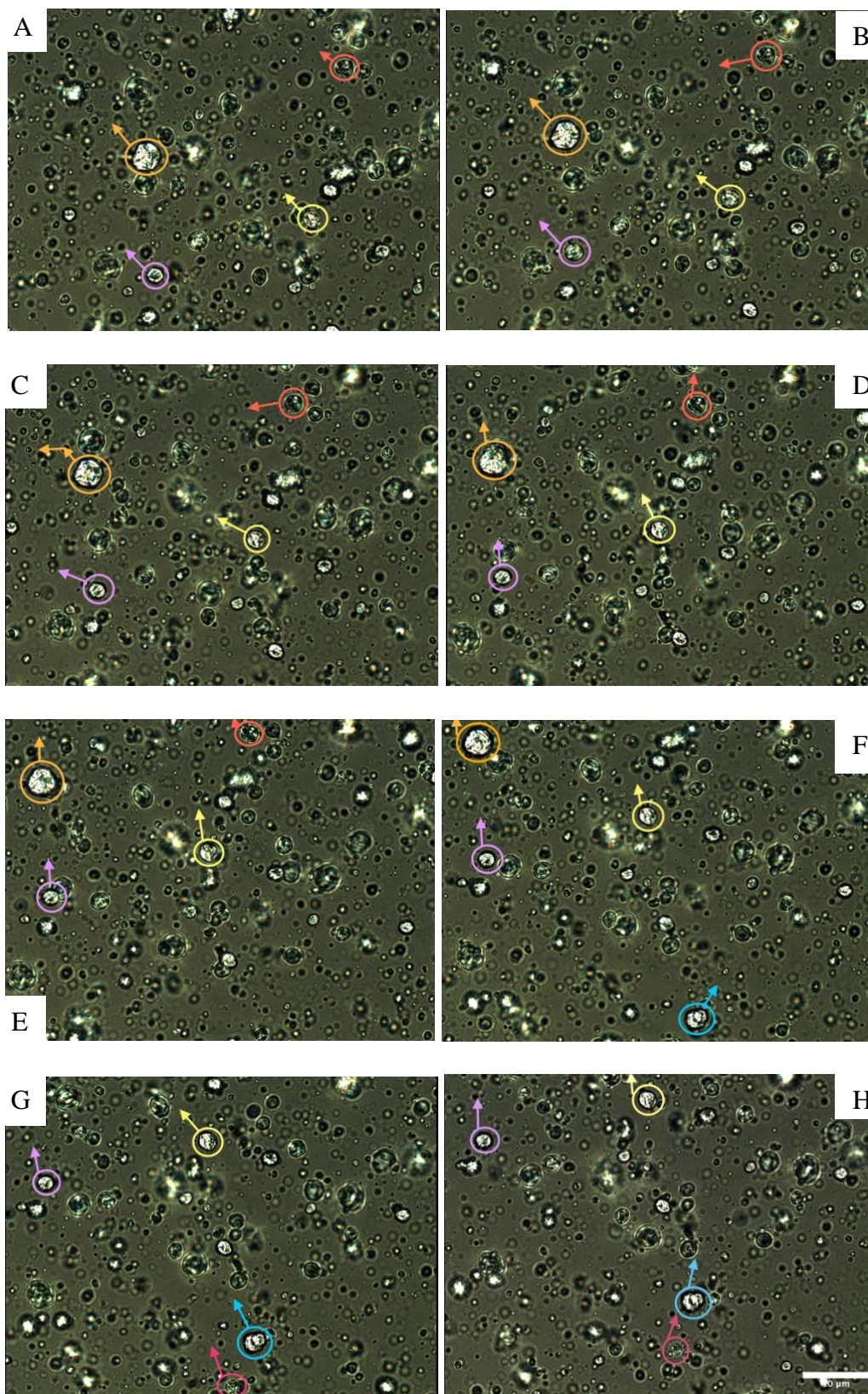
K změření velikosti a počtu částic byla využita funkce „Analyze particles“. Bylo stanovena sledovaná velikost částic v rozmezí $0,01 - \infty \mu\text{m}^2$. Tato funkce je využívána při měření velikosti nanočástic nebo fluorescenčních částic.



Obrázek 3.7 Vzorek č. 1, $500 \mu\text{m}$ upravený funkcí „Threshold“ (vlevo); vzorek č. 1 v Petriho misce 14 dní po přípravě upravený funkcí „Threshold“ (vpravo)

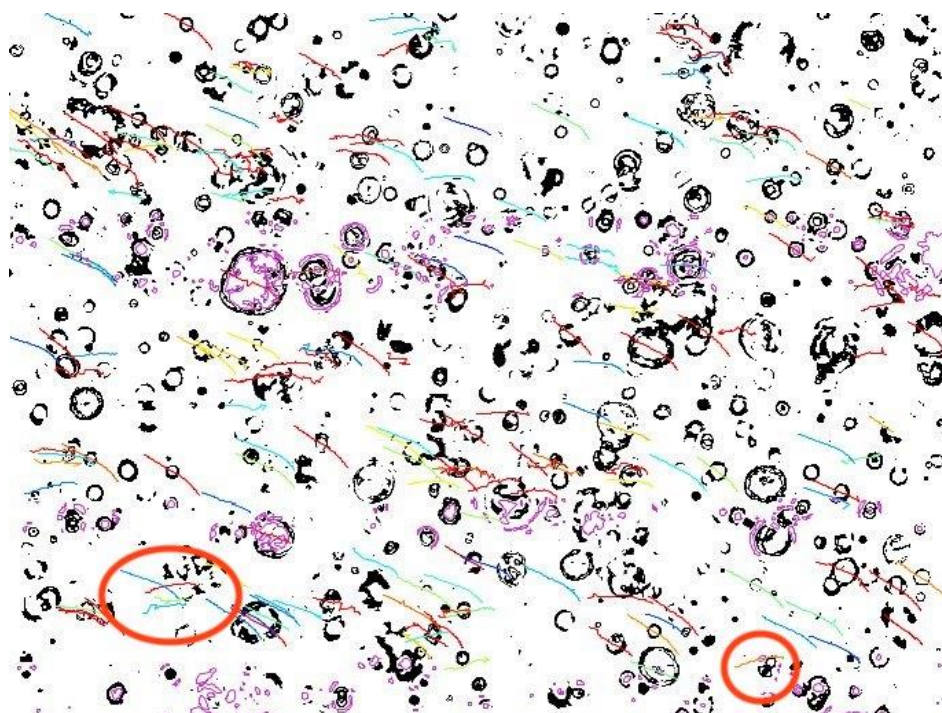
Pro trasování částic byla použita funkce „TrackMate“. Mezi schopnosti funkce spadá: integrace několika segmentačních algoritmů, detekce a ukládání obrysů 2D. Tato funkce se využívá k trasování buněčných struktur, T buněk a dalších biologických struktur. (Ershov, 2022; Tinevez, 2017)

U vzorku 1, tloušťky $900 \mu\text{m}$, byl pod mikroskopem pozorován nahodilý pohyb částic (viz obrázek 3.10). Následující obrázek (3.10) ukazuje manuální značení pohybu částic. Snímky byly pořízeny s 10 s odstupem. Lze vidět, že pohyb částic není stejný po celou dobu, ale mění se v čase. Také lze vidět problematiku trasování konkrétní částice, kdy nám vlivem proudění po čase částice zmizí.



Obrázek 3.8 Vzorek 1, 900 μm; A – H snímky ze záznamu agregace částic v časovém úseku 0 – 70 s po 10 s (Zdroj: Autor)

K porovnání manuálního trasování částic byla použita funkce „TrackMate“. Nevýhodou použití funkce na vzorku 1 o tloušťce 900 μm bylo velké množství částic, které „TrackMate“ nedokázal trasovat. Jak můžeme vidět na obrázku 3.8, časem částice mohou zmizet z pozorované oblasti. Proto je nutné trasovat pouze část videa. U vzorku č. 1 se sledoval záznam videa v rozmezí 50 snímků. Výsledkem jsou zakreslené barevné „čáry“ ukazující pohyb jednotlivých částic. Čáry označené v červeném kruhu (viz. obrázek 3.9) zobrazuje částice vychylující se od směru toku.



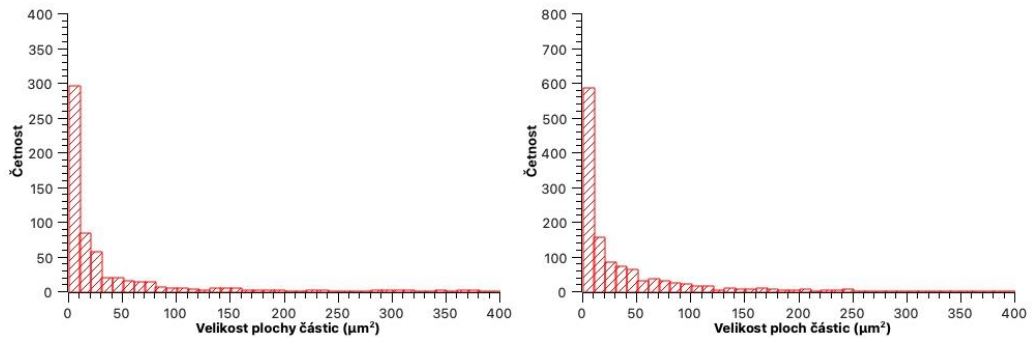
Obrázek 3.9 Vyznačený směr pohybu částic pomocí funkce „TrackMate“ v úseku 50 – 100 snímků
(Zdroj: Autor)

3.4 Vyhodnocení dat a poznatků z praktické části

Z rovnice agregace [1] byla prokázána závislost pohybu částic na viskozitě, poloměru částic. Důkazem jsou vysoké hmotnostní koncentrace roztoku PVA a nemožnost natažení příliš viskózního vzorku. Všechny připravené a pozorované vzorky byly hodnocené jako nevyhovující. Vzorky č. 2 a 3 měly nedostatečný počet částic na jejich možné trasování. Vzorky č. 1 a 4 vyhovovaly většině parametrů, ale bylo nemožné pomocí aplikace ImageJ zpracovat získaná data. K ideálnímu prostředí ke sledování částic a k lepší následovné manipulaci s filmem byla vyhovující tloušťka filmu 900 μm .

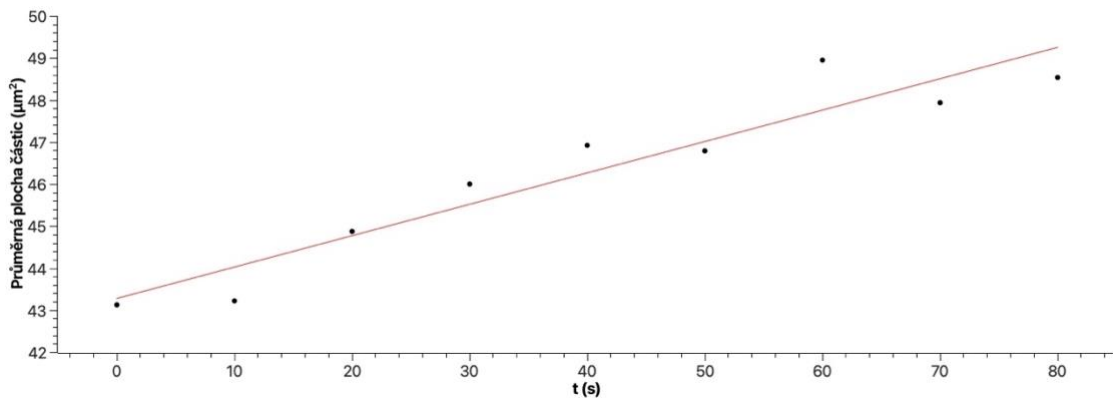
V průběhu práce s daty v programu ImageJ docházelo k velkým chybám a zpracování obrazu je nepřesné, z důvodu velkého počtu částic na snímku nebylo možné

segmentovat jednotlivé částice. Na obrázku 3.7 můžeme vidět dva snímky stejného vzorku, které jsou pořízeny v rozmezí 14 dní, který vidíme graficky vyhodnocený na grafu 3.1. Průměrná velikost plochy částic u vzorku č. 1 je $50,27 \mu\text{m}^2$ a u Petriho misky je $30,14 \mu\text{m}^2$. Velikost částic může souviset s uskladňováním suspenze v laboratoři. Výsledky jasně ukazují zvýšený počet částic u Petriho misky, a to dokazuje, že i námi opticky neviditelné částice se agregují do větších celků.

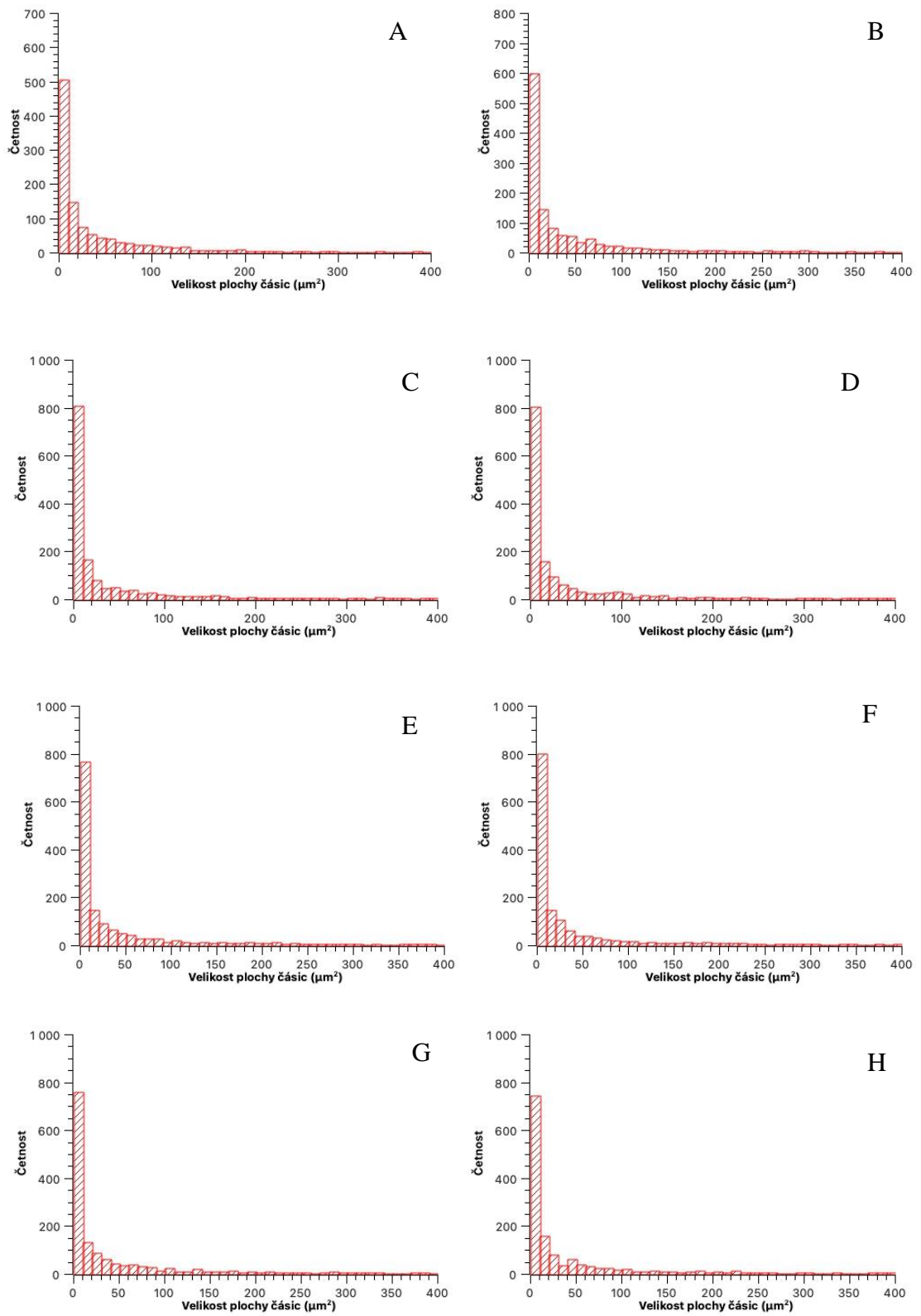


Graf 3.1 Počet částic ve vzorku jedna (vlevo), Počet částic v Petriho misce (vpravo)

Byla také provedena analýza částic z manuálního trasování (viz. obrázek 3. 8), jejímž výstupem byly histogramy zaznamenávající velikosti ploch částic ve snímku. (viz. graf 3.3) Nakonec jsme udělali celkový graf průměrných velikostí ploch částic v čase (viz. graf 3.2), kdy je možné pozorovat trend zvětšujícího se průměru ploch částic, která může být způsobená agregací částic.



Graf 3.2 Graf průměrných ploch částic v čase (Zdroj: Autor)



Graf 3.3 Histogram velikosti ploch částic A v čase t_0 B v čase t_1 C v čase t_2 D v čase t_3 E v čase t_4 F v čase t_5 G v čase t_6 H v čase t_7

4 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo vyvinout metodiku pro sledování agregace částic v čase. Agregace částic má přesah nejen do výroby materiálů, ale i výroby léčiv a materiálů pro kloubní náhrady.

Nejprve jsme stanovili nanocelulózu jako ideální částice pro sledování procesu agregace. Nanocelulóza vykazuje optickou aktivitu pod polarizačním mikroskopem. Byla připravena v suspenzi s polyvinylalkoholem, který slouží ve farmaceutickém průmyslu jako nosič léčiv. Následně byl připraven film, na kterém byl sledován pohyb částic. Hlavní limity pozorování nanočástic bylo optické rozlišení mikroskopu, jehož minimální rozlišení je omezeno vlnovou délkou viditelného světla. To umožňuje pozorování pouze částice o velikosti minimálně 500nm. Další omezení byla příprava samotného roztoku. Částice agregovaly již v průběhu přípravy suspenze, což ovlivňovalo pozorování.

Výsledky pozorování na mikroskopu byly podrobeny obrazové analýze za použití manuálního trasování částic a funkce „TrackMate“ v aplikaci ImageJ. Limity této metody byl vysoký počet částic ve snímku, což znemožňovalo dlouhodobé trasování částic. Vyhodnocování částic bylo dále nepřesné kvůli neschopnosti funkce „TrackMate“ zaznamenat nově příchozí částice.

I tak se podařilo dokázat agregaci částic dvěma způsoby. Prvním bylo segmentace částic manuálního trasování obrazu a následné zpracování do histogramu. Bylo ukázáno, že v čase se zvětšuje plocha sledovaných částic, které na okraji vzorku mají důvod díky coffee ring effectu. Druhou metodou bylo porovnání dvou snímků stejného vzorku v časovém rozmezí 14 dní.

Naše zvolená metoda solvent-casting je hodnocena jako možná cesta ke sledování agregace částic. Je potřeba se více zaměřit na přípravu vzorku a její skladování, jelikož to působí hlavní problémy, a to nejen farmaceutickému průmyslu.

Seznam použité literatury

ANON. 2013. Český lékopis 2009 - Doplněk 2013 (ČL 2009 - Dopl. 2013) =: Pharmacopoea Bohemica MMIX - Addendum MMXIII (Ph. B. MMIX - Add. MMXIII). 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4242-7.

BABU, Suryadevara, ed. 2022. Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP). Second Edition. Duxford: WoodHead Publishing. ISBN 978-0-12-821791-7.

BAKER, Maribel I. et al. 2012. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **100B**(5), 1451–1457. DOI 10.1002/jbm.b.32694.

BANERJEE, Sritoma, Amit Kumar NAYAK a Kalyan Kumar SEN. 2022. Aquasomes: a nanoparticulate approach for therapeutic applications. In: *Systems of Nanovesicular Drug Delivery*. B.m. ; Elsevier, s. 207–219. DOI 10.1016/B978-0-323-91864-0.00025-5. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323918640000255>

BARANWAL, Jaya et al. 2022. Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. *Polymers*. **14**(5), 983. DOI 10.3390/polym14050983.

BIAN, Xin, Changho KIM a George Em KARNIADAKIS. 2016. 111 years of Brownian motion. *Soft matter*. **12**(30), 6331–6346. DOI 10.1039/c6sm01153e.

BRUNAUGH, Ashlee D., Hugh D. C. SMYTH a Robert O. WILLIAMS III. 2019. *Essential Pharmaceutics*. Cham: Springer International Publishing. DOI 10.1007/978-3-030-31745-4. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-31745-4>

CAMASSA, Roberto et al. 2019. A first-principle mechanism for particulate aggregation and self-assembly in stratified fluids. *Nature Communications*. **10**(1), 5804. DOI 10.1038/s41467-019-13643-y.

CAO, Tianchi, Gregor TREFALT a Michal BORKOVEC. 2018. Aggregation of Colloidal Particles in the Presence of Hydrophobic Anions: Importance of Attractive Non-DLVO Forces. *Langmuir*. **34**(47), 14368–14377. DOI 10.1021/acs.langmuir.8b03191.

CUPONE, Irma E. et al. 2022. Orodispersible Film (ODF) Platform Based on Maltodextrin for Therapeutical Applications. *Pharmaceutics*. **14**(10), 2011. DOI 10.3390/pharmaceutics14102011.

ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM a Karlova UNIVERZITA. 2013. *Anatomie. 2. Třetí, upravené a doplněné vydání*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4788-0.

DALAL, Mandeep. 2019. *A Textbook of Organic Chemistry – Volume 1*. B.m. ; Dalal Institute. ISBN 978-81-952427-3-3.

DEEGAN, Robert D. et al. 1997. Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*. **389**(6653), 827–829. DOI 10.1038/39827.

DILL, Ken A. a Sarina BROMBERG. 2003. *Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology*. B.m. ; Garland Science. ISBN 978-0-8153-2051-7.

- DIXIT, R. P. a S. P. PUTHLI. 2009. Oral strip technology: Overview and future potential. *Journal of Controlled Release*. **139**(2), 94–107. DOI 10.1016/j.jconrel.2009.06.014.
- DOSTÁLEK, Miroslav. 2006. *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1464-6.
- ELIMELECH, Menachem, ed. 2010. *Particle deposition and aggregation: measurement, modelling and simulation*. Nachdr. Woburn, Mass: Butterworth-Heinemann. ISBN 978-0-7506-7024-1.
- ERSHOV, Dmitry et al. 2022. TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. *Nature Methods*. **19**(7), 829–832. DOI 10.1038/s41592-022-01507-1.
- FERLAK, Jan, Weronika GUZENDA a Tomasz OSMAŁEK. 2023. Orodispersible Films—Current State of the Art, Limitations, Advances and Future Perspectives. *Pharmaceutics*. **15**(2), 361. DOI 10.3390/pharmaceutics15020361.
- FERREIRA, Anderson O. et al. 2017. Orodispersible Films for Compounding Pharmacies. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. **21**(6), 454–461. ISSN 1092-4221.
- FISCHER, Andreas, Arkya CHATTERJEE a Thomas SPECK. 2019. Aggregation and sedimentation of active Brownian particles at constant affinity. *The Journal of Chemical Physics*. **150**(6), 064910. DOI 10.1063/1.5081115.
- FRANSEN, Athela F. 2016. *Polarised light microscopy*. Melbourne Campus: Florida Institute of Technology. Dostupné také z: <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20170000349/downloads/20170000349.pdf>
- FRANKOVÁ, Jana, Martin MODRIANSKÝ a Jiří VRBA. 2014. *Základy lékařské chemie pro studenty všeobecného lékařství*. ISBN 978-80-244-4085-9.
- FREY, E. a K. KROY. 2005. Brownian motion: a paradigm of soft matter and biological physics. *Annalen der Physik*. **517**(1–3), 20–50. DOI 10.1002/andp.200551701-303.
- GAJDIZOK, Jan a David VETCHÝ. 2016. Dutina ústní jako aplikační místo pro přívod léčiva do organismu. *Praktické Lékarenství*. **2016**(12(2)), 63–65.
- GENÇER, Alican, Christina SCHÜTZ a Wim THIELEMANS. 2017. Influence of the Particle Concentration and Marangoni Flow on the Formation of Cellulose Nanocrystal Films. *Langmuir*. **33**(1), 228–234. DOI 10.1021/acs.langmuir.6b03724.
- GEORGE, Herman F. a Farrukh QURESHI. 2013. Newton's Law of Viscosity, Newtonian and Non-Newtonian Fluids. In: WANG, Q. Jane a Yip-Wah CHUNG, ed. *Encyclopedia of Tribology*. Boston, MA: Springer US, s. 2416–2420. DOI 10.1007/978-0-387-92897-5_143. Dostupné také z: https://doi.org/10.1007/978-0-387-92897-5_143
- GIJARE, Chaitrali a Ashwini DESHPANDE. 2018. Orodispersible Films: A Systematic Patent Review. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. **12**(2), 110–120. DOI 10.2174/1872211312666180509100216.
- HALGREN, Thomas A. 1992. The representation of van der Waals (vdW) interactions in molecular mechanics force fields: potential form, combination rules, and vdW parameters. *Journal of the American Chemical Society*. **114**(20), 7827–7843. DOI 10.1021/ja00046a032.

HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. 2015. Farmakochemie. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-875-7.

HE, Mengning et al. 2021. Recent advances of oral film as platform for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. **604**, 120759. DOI 10.1016/j.ijpharm.2021.120759.

HEISE, Katja et al. 2021. Nanocellulose: Recent Fundamental Advances and Emerging Biological and Biomimicking Applications. *Advanced Materials*. **33**(3), 2004349. DOI 10.1002/adma.202004349.

HERMAN, Timothy F. a Cynthia SANTOS. 2022. First Pass Effect. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551679/>

HIRSCHFELDER, Joseph O., Charles Francis CURTISS a Robert Byron BIRD. 1963. *Molecular theory of gases and liquids*. Corr. print. with notes added. New York [etc.]: J. Wiley & sons. ISBN 978-0-471-40065-3.

HOFFMANN, Eva Maria, Armin BREITENBACH a Jörg BREITKREUTZ. 2011. Advances in orodispersible films for drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. **8**(3), 299–316. DOI 10.1517/17425247.2011.553217.

HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. 2004. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. Dotisk 1. vyd. Brno: NEPTUN. ISBN 978-80-902896-1-1.

HYNIE, Sixtus. 2001. *Farmakologie v kostce*. Vyd. 2. V Praze: Triton. ISBN 978-80-7254-181-2.

CHENG, P. Y. a H. K. SCHACHMAN. 1955. Studies on the validity of the Einstein viscosity law and Stokes' law of sedimentation. *Journal of Polymer Science*. **16**(81), 19–30. DOI 10.1002/pol.1955.120168102.

JOSE, Jobin et al. 2019. Oral Dispersible Films, Novel Technology for the Delivery of Drugs. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. **12**(1), 425. DOI 10.5958/0974-360X.2019.00077.5.

KADAJJI, Veeran Gowda a Guru V. BETAGERI. 2011. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymers*. **3**(4), 1972–2009. DOI 10.3390/polym3041972.

KALIA, Susheel, ed. 2021. *Natural polymers-based green adsorbents for water treatment*. 1. vyd. Cambridge: Elsevier. ISBN 978-0-12-820541-9.

KALINA, Michal, Aneta CHYTILOVÁ a Martina KLUCAKOVA. 2015. Aggregation and Degradation Processes of Biopolymers and Biocolloids Studied by Light Scattering Techniques. In: .

KARKI, Sandeep et al. 2016. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **11**(5), 559–574. DOI 10.1016/j.ajps.2016.05.004.

KESHARWANI, Prashant et al., ed. 2021. *Nanoparticle therapeutics: production technologies, types of nanoparticles, and regulatory aspects*. 1. vyd. Waltham: Elsevier. ISBN 978-0-12-820757-4.

- KLOCKARS, Konrad W. et al. 2018. Effect of Anisotropy of Cellulose Nanocrystal Suspensions on Stratification, Domain Structure Formation, and Structural Colors. *Biomacromolecules*. **19**(7), 2931–2943. DOI 10.1021/acs.biomac.8b00497.
- KOCSIS, Katalin et al. 1998. Combination of digital image analysis and polarization microscopy: Theoretical considerations and experimental data. *Microscopy Research and Technique*. **43**(6), 511–517. DOI 10.1002/(SICI)1097-0029(19981215)43:6<511::AID-JEMT4>3.0.CO;2-A.
- KOURKI, Hajir a Mohammad Hossein Navid FAMILI. 2012. Particle sedimentation: effect of polymer concentration on particle–particle interaction. *Powder Technology*. **221**, 137–143. DOI 10.1016/j.powtec.2011.12.050.
- LÁZNIČKOVÁ, CSC., doc. Ing. Alice a Ing. Vladimír KUBÍČEK, CSC. 2014. *Základy fyzikální chemie*. třetí. Karolinum. ISBN 978-80-246-2791-5.
- LIN, Lingnan, Hao PENG a Guoliang DING. 2015. PREDICTION MODEL OF THE AVERAGE SIZE OF AGGREGATE IN NANOREFRIGERANT. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/314080968_PREDICTION_MODEL_OF_THE_AVERAGE_SIZE_OF_AGGREGATE_IN_NANOREFRIGERANT
- LU, Xiaomeng a Regina M. MURPHY. 2018. Nanoparticle Tracking for Protein Aggregation Research. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). **1777**, 145–158. DOI 10.1007/978-1-4939-7811-3_7.
- MĚNOVÁ, Petra, František HAMPL a škola chemicko-technologická v Praze VYSOKÁ. 2022. *Základy farmakochemie*. Vydání: první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-119-2.
- MIREAULT, Valérie, ed. 2020. *Solvent effects in chemistry: advances in applications and research*. New York: Nova Science Publishers. ISBN 978-1-5361-8226-2.
- MO, Jianyong a Mark G. RAIZEN. 2019. Highly Resolved Brownian Motion in Space and in Time. *Annual Review of Fluid Mechanics*. **51**(1), 403–428. DOI 10.1146/annurev-fluid-010518-040527.
- MONDAL, Md Ibrahim H., ed. 2016. *Nanocellulose, cellulose nanofibers, and cellulose nanocomposites: synthesis and applications*. New York: Nova Publishers. ISBN 978-1-63483-860-3.
- MORATH, B. et al. 2022. Orodispersible films – Recent developments and new applications in drug delivery and therapy. *Biochemical Pharmacology*. **200**, 115036. DOI 10.1016/j.bcp.2022.115036.
- MUSAZZI, Umberto M. et al. 2020. Trends in the production methods of orodispersible films. *International Journal of Pharmaceutics*. **576**, 118963. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118963.
- NIKON. 2023. Polarized Light Microscopy | Nikon's MicroscopyU. Nikon's MicroscopyU [online]. [Cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/polarized-light/polarized-light-microscopy>
- OLYMPUS. 2023. Polarized Light Microscopy - Microscope Configuration | Olympus LS. Olympus [online]. [Cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/polarized/configuration/>

- ONAR ÇAMLIBEL, Nurhan. 2004. Usage Of Biopolymers In Medical Applications. In: .
- OOI, Yuto et al. 2017. Suppressing the coffee-ring effect of colloidal droplets by dispersed cellulose nanofibers. *Science and Technology of Advanced Materials*. **18**(1), 316–324. DOI 10.1080/14686996.2017.1314776.
- PACHECO, Murilo Santos et al. 2021. A review on orally disintegrating films (ODFs) made from natural polymers such as pullulan, maltodextrin, starch, and others. *International Journal of Biological Macromolecules*. **178**, 504–513. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.180.
- PARISI, Daniele et al. 2022. Rheological investigation on the associative properties of poly(vinyl alcohol) solutions. *Journal of Rheology*. **66**(6), 1141–1150. DOI 10.1122/8.0000435.
- PERLÍK, František a Karlova UNIVERZITA. 2008. *Základy klinické farmakologie*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-528-4.
- PERSSON, Kenneth M. a Vassilis GEKAS. 1994. Factors influencing aggregation of macromolecules in solution. *Process Biochemistry*. **29**(2), 89–98. DOI 10.1016/0032-9592(94)80001-4.
- POUCHLÝ, Julius a škola chemicko-technologická v Praze VYSOKÁ. 2008. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-674-6.
- PUGLIA, Debora, ed. 2016. *Multifunctional polymeric nanocomposites based on cellulosic reinforcements*. Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-0-323-44248-0.
- REBELO, Rita, Margarida FERNANDES a Raul FANGUEIRO. 2017. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Engineering*. **200**, 236–243. DOI 10.1016/j.proeng.2017.07.034.
- REDFEARN, Andrew et al. 2019. In Vitro Oral Cavity Model for Screening the Disintegration Behavior of Orodispersible Films: A Bespoke Design. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **108**(5), 1831–1836. DOI 10.1016/j.xphs.2018.12.025.
- SALAWI, Ahmad. 2022. An Insight into Preparatory Methods and Characterization of Orodispersible Film—A Review. *Pharmaceuticals*. **15**(7), 844. DOI 10.3390/ph15070844.
- SARISUTA, Narong a Eugene L. PARROTT. 1982. Relationship of Dissolution Rate to Viscosity of Polymeric Solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **71**(12), 1375–1380. DOI 10.1002/jps.2600711216.
- SEVİNÇ ÖZAKAR, Rukiye a Emrah ÖZAKAR. 2021. Current Overview of Oral Thin Films. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. **18**(1), 111–121. DOI 10.4274/tjps.galenos.2020.76390.
- SHANBHAG, A et al. 2008. Method for screening of solid dispersion formulations of low-solubility compounds—Miniaturization and automation of solvent casting and dissolution testing. *International Journal of Pharmaceutics*. **351**(1–2), 209–218. DOI 10.1016/j.ijpharm.2007.09.042.
- SIDDIQUI, Nehal, Garima GARG a Pramod SHARMA. 2010. A Short Review on „A Novel Approach in Oral Fast Dissolving Drug Delivery System and Their Patents”.

- ResearchGate [online]. [Cit. 2023-03-08]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/266569598_A_Short_Review_on_A_Novel_Approach_in_Oral_Fast_Dissolving_Drug_Delivery_System_and_Their_Patents
- SINGH, Ram Sarup et al. 2021. Pullulan in biomedical research and development - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. **166**, 694–706. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.227.
- SPEER, Isabell, Maren PREIS a Jörg BREITKREUTZ. 2018. Prolonged drug release properties for orodispersible films by combining hot-melt extrusion and solvent casting methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **129**, 66–73. DOI 10.1016/j.ejpb.2018.05.023.
- STEFÁNSSON, Einar a Thorsteinn LOFTSSON. 2006. The Stokes–Einstein equation and the physiological effects of vitreous surgery. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. **84**(6), 718–719. DOI 10.1111/j.1600-0420.2006.00778.x.
- TINEVEZ, Jean-Yves et al. 2017. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*. **115**, 80–90. DOI 10.1016/j.ymeth.2016.09.016.
- TURKOVIĆ, Erna et al. 2022. Orodispersible films — Pharmaceutical development for improved performance: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **75**, 103708. DOI 10.1016/j.jddst.2022.103708.
- VISHWAKARMA, Amit. 2017. A Review on Oral Films : From Theory to Practice. ResearchGate [online]. [Cit. 2023-03-08]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/322011237_A_Review_on_Oral_Films_From_Theory_to_Practice
- WALICOVÁ, V., J. GAJDZIOK a D. VETCHÝ. 2016. Orodispersovatelné filmy, technologie jejich výroby a specifické pomocné látky pro přípravu. *Chemické listy*. **110**(6), 424–429. ISSN 1213-7103.
- WALICOVÁ, Veronika a Jan GAJDZIOK. 2016. Orální filmy jako perspektivní léková forma. (65), 15–21.
- XIONG, Yu, Xinmin LIU a Hailing XIONG. 2021. Aggregation modeling of the influence of pH on the aggregation of variably charged nanoparticles. *Scientific Reports*. **11**(1), 17386. DOI 10.1038/s41598-021-96798-3.
- YADAV, Preeti et al. 2015. Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. **9**(9), ZE21–ZE25. DOI 10.7860/JCDR/2015/13907.6565.