



Univerzita Palackého
v Olomouci

**FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ STUDIUM DEPOZICE A UVOLŇOVÁNÍ
MIKRO/NANO ROZMĚRNÝCH ČÁSTIC A HELA BUNĚK NA MODELOVÝCH
POVRŠÍCH**

Mgr. Jakub Vlček

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.

Katedra fyzikální chemie

Olomouc 2019



Přírodovědecká
fakulta

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci na téma *fyzikálně chemické studium depozice a uvolňování mikro/nano částic a HeLa buněk na modelových površích* vypracoval samostatně, pod vedením prof. Ing. Lubomíru Lapčíka, Ph.D, a veškerá použita literatura je řádně citována. Experimentální část práce vychází z výsledků, které byly publikovány v impaktovaných odborných časopisech. Tyto publikace, na kterých mám autorský podíl, jsou uvedené jako přílohy A-E. Dále prohlašuji, že nemám námitky k využití této práce v rámci autorského zákona č. 121/200 Sb.

V Olomouci dne

.....
Mgr. Jakub Vlček

Poděkování

Velmi rád bych poděkoval především prof. Ing. Lubomíru Lapčíkovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a vedení během celého doktorského studia. Také bych chtěl poděkovat za rady a připomínky při sepisování publikací a předkládané disertační práce. Dále bych chtěl poděkovat všem kolegům a kamarádům z Katedry fyzikální chemie a Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů, se kterými byla vždy radost spolupracovat, za ochotu a pomoc během celého studia i mimo něj. V neposlední řadě děkuji za veškerou finanční podporu při studiu a vlastní výzkumné činnosti.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Jakub Vlček
Název práce:	Fyzikálně-chemické studium depozice a uvolňování mikro/nano rozměrných částic a HeLa buněk na modelových površích
Typ práce:	Disertační
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Počet stran:	143 (včetně příloh)
Počet příloh:	5
Jazyk:	čeština
Abstrakt:	

Detailní pochopení procesů a jevů na fázovém rozhraní je důležité v mnoha biologických, chemických a technologických procesech. Cílem této práce bylo pochopení mezifázových procesů a jevů se zaměřením na vliv adhezních a kohezních sil. K tomuto účelu byl konstrukčně upraven a realizován systém pro měření kinetik depozice a uvolňování částic na bázi impinging jet. Tento systém byl dále použit ke studiu interakce nádorových HeLa buněk s 2D-uhlíkovými nanomateriály a k charakterizaci povrchu polymeru upraveného nano-embosováním. Dále byl zkoumán vliv adhezních a kohezních sil mezi částicovými minerálními plnivými a polymerní matricí na elasticko-plastické chování polymerních kompozitů. Část práce byla také zaměřena studium vlivu kohezních sil na tokové vlastnosti partikulárních látek pomocí smykového napětí.

Bibliographical identification

Author:	Mgr. Jakub Vlček
Title:	Physico-chemical study of the deposition and detachment of the micro/nano sized particles and HeLa cells on model substrates
Type:	Dissertation
Department:	Department of Physical Chemistry
Supervisor:	prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
Published:	2019
Pages:	143 (appendices including)
Appendices:	5
Language:	Czech
Abstract:	

The detailed understanding of processes and phenomena on the phase interfaces is important in many biological, chemical and technical applications. The aim of this work was an understanding of the phenomena on phase interfaces with a focus on the impact of the adhesion and cohesion forces. For this purpose, a system for measuring detachment and deposition kinetics was adjusted and implemented. This system was used for studying the interaction of the HeLa cancer cells with 2D-carbon nanomaterials and for the surface activity characterization of the nano-embossed modified polymer. Furthermore, the influence of elastic-plastic behaviour of the polymer composites by adhesion and cohesion forces between mineral fillers and polymer matrix was studied. Part of this thesis was also focused on the study of the impact of the cohesive forces on the flow properties of bulk solids using shear stress.

Obsah

1	Úvod	13
	Úvod do řešené problematiky	
2	Technika impinging jet.....	16
2.1	Teoretický popis toku v impinging jet systémech	17
3	Adheze buněk na povrch pevných látek	22
3.1	Fyzikálně-chemické jevy ovlivňující adhezi buněk.....	23
3.2	Využití 2D uhlíkových nanomateriálů jako substrát pro adhezi buněk.....	25
3.3	Buněčná linie HeLa	27
4	Základy reologie partikulárních látek	28
4.1	Tokové vlastnosti práškových materiálů	30
5	Polymerní kompozitní materiály	34
5.1	Struktura a vlastnosti polymerních kompozitních materiálů	34
5.2	Mechanické chování polymerních kompozitů v jednoosém tahu.....	37
6	Cíle disertační práce	40
	Řešená problematika	
7	Řešená problematika s využitím systému impinging jet	43
7.1	Studium depozice modelových částic (PS) na nanostrukturovaných polymerních površích.....	43

7.2	Studium adheze buněk (HeLa) na planárních površích (G, GO, sklo)	50
8	Další řešená problematika	60
8.1	Vliv tvaru minerálních plniv na mechanické chování kompozitů polyetylen/slída a polyetylen/wollastonit.	60
8.2	Charakterizace kohezních sil u partikulárních látek pomocí mechanického smykového napětí a aeračních testů.	66
9	Závěr	73
10	Summary	75
11	Seznam zkratk	77
12	Seznam publikací.....	79
13	Použitá literatura.....	81
14	Přílohy	91

1 Úvod

Detailní znalost a porozumění mezifázových procesů a jevů je klíčem k pochopení řady biologických, chemických a technologických procesů a jevů, které mají praktický význam v biomedicínské a technické praxi. Jedná se zejména o pochopení vzniku kohezních a adhezních sil mezi adsorbátem a adsorbentem, mezi plnivem a matricí v kompozitech, lepeným spojem dvou nebo více materiálů nebo interakce biologických entit jako např. buněk na povrchu pevné fáze apod. Z hlediska vzájemné interakce se jako významné jeví jednak vlastní chemické složení jednotlivých materiálů, jejich krystalická struktura, povrchová energie a polarita, drsnost, tvar mezifázového povrchu a jeho topologie. Pro přiblížení našich experimentů co nejbližše realitě se jako další parametr kromě teploty jeví typ aplikovaného deformačního napětí a jeho časový průběh a intenzita. Proto v této disertační práci byly provedeny experimenty zaměřené na charakterizaci mezifázových sil na fázovém rozhraní pevná fáze/pevná fáze v kompozitech pro jednoosé namáhání, dále byla použita smyková cela pro práškové materiály pro charakterizaci kohezních sil na fázovém rozhraní pevná fáze/plyn a v neposlední řadě byl zkoumán vliv hydrodynamických a smykových sil v laminárním toku na adsorpci/desorpci částic a buněk na fázovém rozhraní pevná fáze/kapalná fáze. Pro účely zkoumání interakcí na fázovém rozhraní pevná fáze/kapalná fáze byl konstrukčně upraven a realizován systém pro měření kinetiky depozice/uvolňování částic na bázi technologie impinging jet (vzhledem k absenci adekvátního českého překladu bude nadále v předložené práci používán anglický termín).

Předložená disertační práce je rozdělená do dvou hlavních celků. První část nazvaná úvod do řešené problematiky se zabývá teoretickým popisem principu metody impinging jet a principy adheze buněk na povrch pevné fáze a jevy, které buněčnou adhezi ovlivňují. Dále jsou popsány principy mechanických vlastností polymerních kompozitů a jejich chování při jednoosém namáhání. První část je pak uzavřena popisem vlivu kohezních a adhezních sil na tokové vlastnosti partikulárních látek spolu s teoretickým popisem testování těchto vlivů pomocí smykové cely. Druhá část nazvaná řešená problematika se zabývá samotným popisem experimentů, výsledky a jejich diskuzí. Nejprve se autor zabývá experimenty založené na metodě impinging jet: studium vlivu nano-embosování na kinetiku depozice

polystyrenových částic na povrch Zeonoru a studium adheze HeLa buněk na 2D-uhlíkaté nanomateriály. Dále je řešen vliv adheze minerálních plniv do polymerní matrice vysokohustotního polyetyleny (HDPE) na výsledné mechanické vlastnosti pomocí deformačního napětí v tahu. Experimentální část pak uzavírá popis experimentů zaměřených na vliv koheze na tokové vlastnosti minerálních plniv, mléčných produktů a kyseliny hyaluronové. Všechny výsledky z experimentální části byly použity jako součást publikací v impaktovaných časopisech a jsou uvedeny v plném znění v sekci přílohy.

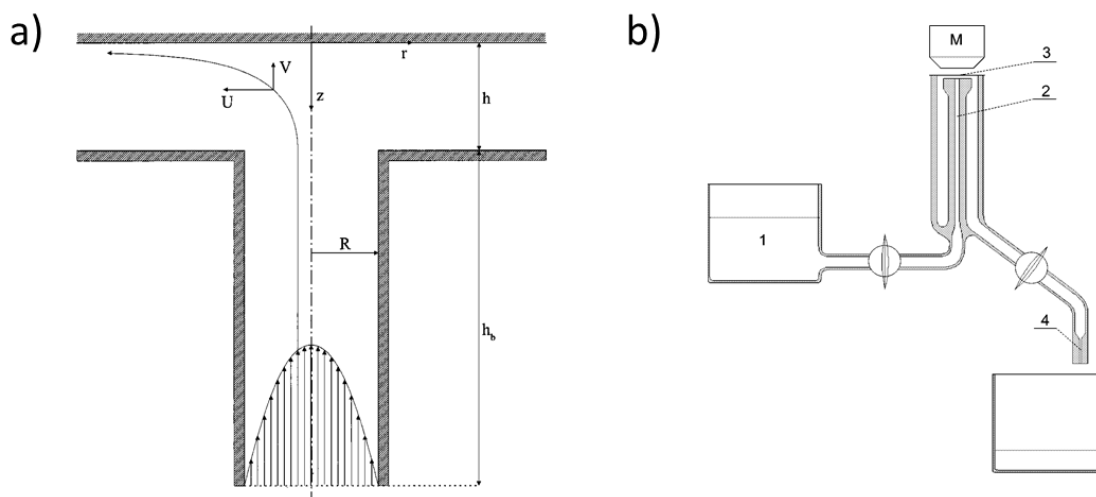
Úvod do řešení problematiky

2 Technika impinging jet

Studium interakcí nano- a mikro-rozměrných částic na rozhraní pevné fáze/kapalné fáze se zaměřením na adsorpční/desorpční jevy je důležité v mnoha oblastech a průmyslových procesech. Např. pro lepší pochopení filtračních procesů, čištění odpadních vod, navrhování mikrofluidních zařízení, při výrobě papíru, charakterizaci polymerů nebo pochopení procesu zanášení membrán.¹⁻⁴ Pro přesné a úplné pochopení výše zmíněného fenoménu je potřeba během experimentů dodržovat přesně definované hydrodynamické a fyzikálně-chemické podmínky. Jedny z prvních technik používaných pro studium depozice částic splňující tyto podmínky byly založené na rotačním disku, který zároveň slouží jako substrát k adhezi. Výhodou těchto technik je jednoduchý a dobře popsáný charakter proudění kapaliny v blízkosti disku. Díky tomu, že tloušťka hydrodynamického a difuzního rozhraní je konstantní nad celým povrchem disku, je relativně jednoduché analytické řešení jednodimenzionální konvektivně-difuzní rovnice v blízkosti povrchu disku.⁵ Tuto techniku lze využít nejenom při studiu depozice částic, ale i v elektrochemii, kde rotační disk slouží jako pracovní elektroda.⁶ Další techniky používané ke studiu adsorpce/desorpce částic, které splňují kritéria přesně definované hydrodynamické podmínky, jsou založené na stagnačním toku (z angl. stagnation point flow). Mezi tyto techniky patří i systém impinging jet. Kromě konstantní tloušťky difuzního a hydrodynamického rozhraní v blízkosti stagnačního bodu je u těchto technik výhodou při použití transparentního substrátu možnost přímého pozorování kinetik depozice pomocí optického mikroskopu. U technik založených na rotačním disku nelze tento způsob pozorování depozice využít z důvodu rotačního pohybu disku. Symetrický radiální stagnační tok nazývaný také impinging jet byl poprvé popsán prof. van de Venem a prof. Dabrosem.^{7,8} Pro praktické studování depozice částic splňující tyto podmínky se využívají impinging jet cely s radiálním,⁹⁻¹³ paralelním¹⁴⁻¹⁶ nebo šikmým¹⁷ geometrickým uspořádáním, se kterým lze provádět experimenty i na netransparentních substrátech. Tyto uspořádání využívají uniformního dvojdimenzionálního toku v okolí stagnačního bodu (centrum symetrie). V těsném okolí tohoto bodu nedochází k transportu hmoty konvenčním tokem kapaliny disperzního prostředí. Ve větších vzdálenostech od stagnačního bodu pak dochází k neuniformnímu proudění a transportu hmoty.⁸

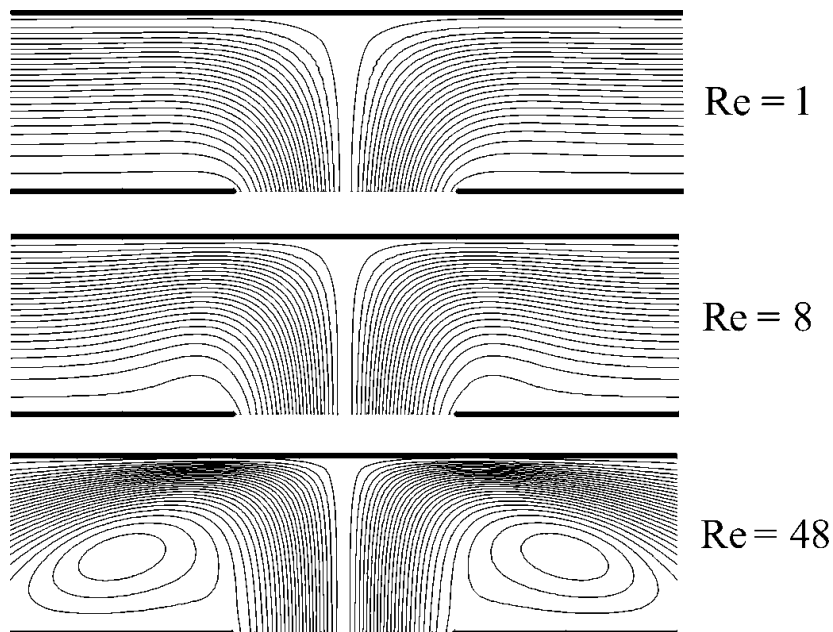
2.1 Teoretický popis toku v impinging jet systémech

Konfigurace impinging jet systému použité v rámci této disertační práce odpovídá původní geometrii navrhnuté prof. Dabrosem a prof. van de Venem.⁸ Na obr. 1 je znázorněna geometrie depoziční cely spolu s nákresem radiální impinging jet (RIJ) instrumentace.



Obr. 1. Schéma geometrie RIJ cely (a), kde R značí poloměr vnitřní kapiláry, h je vzdálenost mezi koncem vnitřní kapiláry a kolektorem (substrát), U a V značí vektory normálové a radiální komponenty rychlosti proudění, z je vzdálenost od adsorpčního rozhraní a r značí radiální vzdálenost od osy symetrie; schéma impinging jet instrumentace pro studium adsorpce/desorpce částic (b), kde M znázorňuje objektiv optického mikroskopu, 1 znázorňuje zásobní nádobu s disperzí, 2 představuje RIJ cely, 3 značí testovaný transparentní substrát a 4 je výstupní kapilára z RIJ cely.¹⁸ Copyright © Elsevier 2006.

Pokud je v geometrickém uspořádání cely poměr r/R menší než 0,25, dojde při nízkých hodnotách Reynoldova čísla (Re) k vytvoření stagnačního toku (viz obr. 2), jehož intenzita je řízená parametrem α . Tento parametr je numericky spočítán pro konkrétní geometrie RIJ cely jako funkce Re . Pokud známe rychlostní pole kapaliny, lze formulovat konvekčně-difuzní rovnici, která popisuje dvojdímenzionální transport částice.



Obr. 2. Znáznornění linií proudění v RIJ cele s parametrem $h/R = 1.6$ získané numerickými výpočty pro $Re = 1, 8$ a 48 .¹⁸ Copyright © Elsevier 2006.

Rychlost depozice částic lze pak určit pro různé parametry jako např. velikost částic, vzdálenost od stagnačního bodu, Re apod. Detailní popis distribuce proudění v radiální impinging jet cele byl získán numerickým řešením Navier–Stokesovy rovnice. Konvekčně – difuzní rovnice je vyjádřena vztahem:¹⁸

$$J = -D\nabla n + un \quad (1)$$

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \nabla J = Q \quad (2)$$

Kde J tok částic, Q je teplo, D je difuzní koeficient, u je rychlost, která se skládá z několika příspěvků (tlakový spád, zrychlení způsobené objemovými silami a zrychlení potřebné k překonání třecích sil). Hydrodynamickou rychlost pro nestlačitelné Newtonovské kapaliny lze vypočítat z řešení Navier- Stokesovy rovnice pokud se zanedbá přítomnost disperzní fáze. Pro zředěné disperze lze u_r vypočítat z rovnice:¹³

$$\rho \left(\frac{\partial u}{\partial t} + u \nabla u \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 u + \rho F_{ext} \quad (3)$$

Kde v je rychlost proudění, ρ je hustota kapaliny, p je tlak, η je dynamická viskozita, F_{ext} je objemová síla působící na kapalinu a t představuje čas. Pro nestlačitelné kapaliny platí pro rovnici (3):

$$\nabla u = 0 \quad (4)$$

Rovnice (3) a (4) lze analyticky řešit v případě jednoduchých geometrií.⁸ Radiální a normálová složka rychlosti toku kapaliny v blízkosti stagnačního bodu pro RIJ cely může být popsána následovně:⁸

$$u_r = \alpha_r (\text{Re}, h/r_c) \frac{u_m}{r_c^2} r z \quad (5)$$

$$u_z = -\alpha_r (\text{Re}, h/r_c) \frac{u_m}{r_c^2} z^2 \quad (6)$$

Kde r je radiální vzdálenost od osy symetrie, (z) značí vzdálenost od adsorpčního rozhraní, α je tokový parametr, u_m je střední lineární rychlost (vyjádřena v rovnici 8). Parametr α_r je závislý na geometrii cely a intenzitě toku, který je ve většině případu vyjádřen Reynoldsovým číslem (Re):¹⁸

$$\text{Re} = \frac{Q}{\pi r_c v} \quad (7)$$

Kde Q je průtok, r_c značí poloměr kapiláry impinging jet depoziční cely, v je kinematická viskozita roztoku.

$$u_m = \frac{Q}{\pi r_c^2} \quad (8)$$

Pro naše experimenty byl poměr vzdálenosti kolektoru od konce kapiláry a průměru kapiláry (h/r_c) 1,7. Pro toto uspořádání a Reynoldsovo číslo větší jak 40 lze hodnotu α_r vyjádřit:¹⁹

$$\alpha_r = 3.5 \nu^{1/3} u^{2/3} r_c^{-1/3} \quad (9)$$

Kde u značí rychlost tryskového proudění. Počet částic deponovaných na kolektor definovaný pomocí jednotky plochy a času lze vyjádřit jako tok částic j . Tento tok se v praxi označuje jako Sherwoodovo číslo Sh .²⁰

$$Sh = \frac{j a}{D_0 n_0} \quad (10)$$

D_0 je difuzní konstanta, n_0 značí koncentraci částic. Pokud není energetická bariéra mezi částicí a kolektorem (rychlá depozice) a se zanedbáním gravitačních sil, lze tok částic j vyjádřit s použitím Smoluchowski-Levich aproximace:²⁰

$$Sh_{fast} = \frac{\exp\left(-\frac{Pe}{6}\right)}{\int_1^{\infty} \exp\left[-\frac{Pe}{6}(z)^3\right] dz} \quad (11)$$

Kde z je bezrozměrná vzdálenost mezi středem sférické částice a stěnou kolektoru, Pe značí Pecletovo číslo. V případě že je v systému energetická bariéra, rychlost depozice se sníží a tok částic lze popsat:²⁰

$$Sh = \alpha_d Sh_{fast} \quad (12)$$

Kde α_d značí účinnost depozice. Pokud mezi částicí a povrchem působí elektrostatické repulse, pak je $\alpha_d < 1$, pro elektrostatické atrakce je $\alpha_d > 1$ a $\alpha_d \approx 1$ v případě, že působí pouze Van der Waalsovy interakce.²¹ Rovnice (13) popisuje počáteční rychlost depozice na čistý povrch.²⁰

$$n_t = n_\infty \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{blok}}} \right) \quad (13)$$

n_t je počet deponovaných částic v čase t , n_∞ představuje ustálený počet částic deponovaných na povrch v rovnovážném stavu. τ_{blok} je čas potřebný k dosažení ustáleného počtu deponovaných částic, v praxi označovaný jako blokovací čas:⁷

$$\frac{1}{\tau_{blok}} = \pi a^2 \gamma j_c \quad (14)$$

γ značí blokovací koeficient, který představuje celkovou plochu deponovaných částic blokujících další depozici. Rychlost depozice v blízkosti stagnačního bodu j_c lze vyjádřit:²¹

$$j_c = 0.776 \alpha_r^{1/3} n_c D_0^{2/3} \quad (15)$$

Impinging jet techniky lze kromě studia depozice částic využít i k charakterizaci polymerů nebo ke studiu povrchové topologie substrátů.^{11,13,21} Pro tyto účely se nejčastěji používají k depozici monodisperzní polystyrenové latexové částice. Studium povrchu Zeonoru, který byl upraven nano-embosováním je součástí této disertační práce a výsledky jsou diskutovány v sekci řešené problému. Další využití nachází tato technika při studování procesu uvolňování částice a velikosti adheze již deponované částice²²⁻²⁷ nebo při studiu adheze buněk, v rámci které byla např. sledována adheze a odtr červených krvinek na skleněném substrátu.^{9,28} Studium velikosti adheze lidských nádorových epiteliálních HeLa buněk na povrch grafenu a grafen oxidu (GO) je součástí této disertační práce a výsledky jsou podrobně rozebrány v sekci řešené problému. Pro tyto účely lze definovat sílu potřebnou k uvolnění částice z povrchu F_h pomocí vztahu:¹⁸

$$F_h = -6\pi\eta r V_\infty K(\lambda_0) \quad (16)$$

Kde η značí dynamickou viskozitu, $K(\lambda_0)$ je funkce popisující hydrodynamický odpor pro elipsoid (0,8614), r je poloměr částice, V_∞ představuje střední rychlost proudění kapaliny a vypočítá se ze vztahu:¹⁸

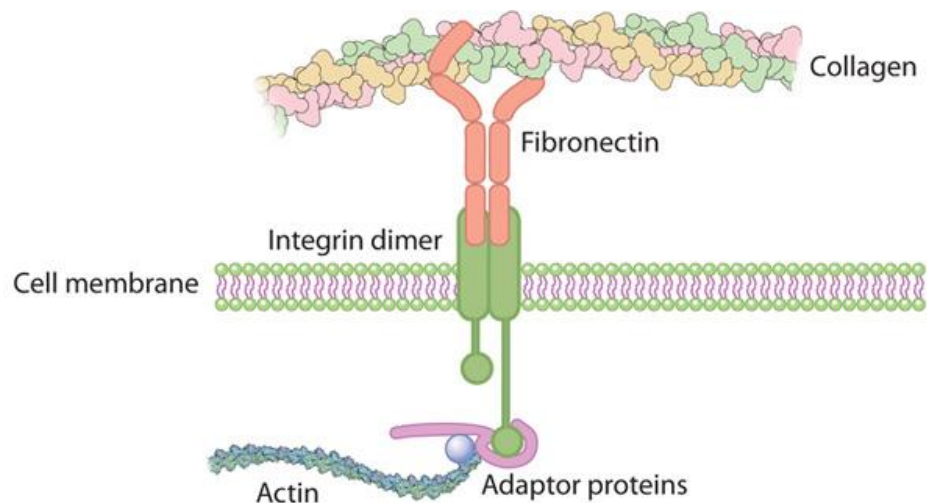
$$V_\infty = \frac{Q}{\pi R^2} \quad (17)$$

Kde Q značí průtok kapaliny a R průměr kapiláry v depoziční cele.

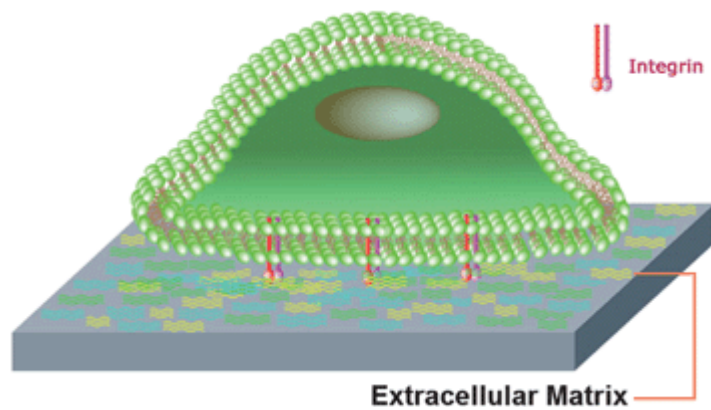
3 Adheze buněk na povrch pevných látek

Adheze buněk má klíčovou roli při mnoha buněčných procesech např. růst, diferenciaci, morfogeneze, apoptóza, formování a regenerace tkání. Pochopení základních principů buněčné adheze a sledování změny síly adheze je důležité v mnoha oblastech např. tkáňovém inženýrství, vývoji biosenzorů, při tvorbě umělých kloubů a implantátů apod.^{29–33}

Mechanismus buněčné adheze se dělí na dva základní typy. První typ bez účasti receptorů je založen na slabých nevalebných interakcích jako jsou vodíková vazba, elektrostatické interakce a Wan der Waalsovy interakce mezi molekulami na povrchu buněčné membrány a funkčními skupinami na povrchu substrátu bez přítomnosti proteinů z extracelulární matrix (ECM).³⁴ Tento typ interakce nezajišťuje zprostředkování signálu mezi buňkou a jejím okolím.³⁵ Druhý typ mechanismu adheze buněk je založen na ligand-receptor vazbě a spočívá v adhezi buněk skrze proteiny jako je fibronectin, vitronektin, kolagen a laminin z ECM.^{36,37} Tyto proteiny se pak vážou na transmembránové receptory (integriny) viz obr. 3 a 4.^{34,38} Tento typ ligand/receptor interakce umožňující mezibuněčnou komunikaci s aktinovým cytoskeletem je důležitý zejména pro buňky, které jsou závislé na ukotvení na substrát.³⁹ Pokud tento typ buněk nemá na buněčné membráně navázány proteiny z ECM nebo si nevytvoří vlastní, dojde k apoptóze do 48 hodin.^{40,41}



Obr. 3. Znázornění spojení transmembránových integrinů z ECM proteiny a aktinovým cytoskeletem. Copyright © Nature Education 2010.



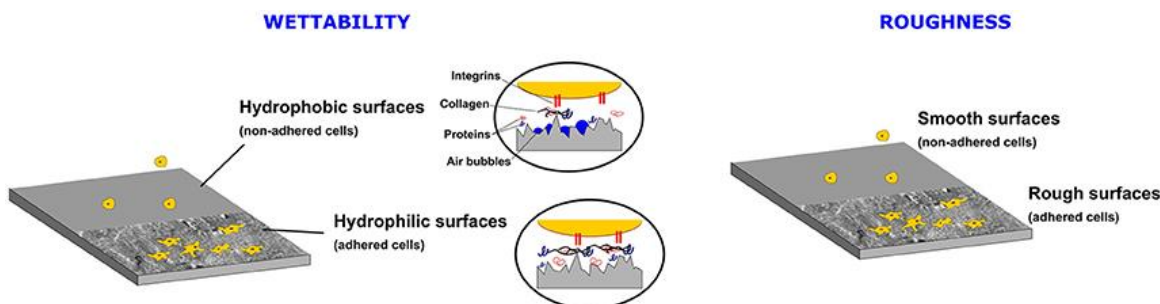
Obr. 4. Schématické znázornění role buněčné ECM při adhezi.⁴² Copyright © RSC 2013.

3.1 Fyzikálně-chemické jevy ovlivňující adhezi buněk

Rozsah a síla adheze buněk silně závisí na fyzikálně chemických vlastnostech povrchu materiálu zejména na smáčivosti, chemické povaze, polaritě a velikosti volné povrchové energie. Hydrofobní nebo hydrofilní povaha povrchu je jeden z nejdůležitějších parametrů při adhezi buněk na substrát. Adhezní proteiny z ECM se ve vyšších koncentracích vážou

na hydrofobní povrch, ale v rigidní a denaturované formě.^{34,43} Tento jev silně ovlivňuje sílu adheze a růst buněk a působí na adhezi negativně. Naopak hydrofilní povrchy podporují adhezi buněk, protože se ECM proteiny vážou ve své přirozené formě.⁴⁴ Důležitá je také míra hydrofilní povahy substrátu. V případě superhydrofilních povrchů s kontaktním úhlem smáčení pro vodu menším než 5° dochází ke snížení adsorpce ECM proteinů z důvodu vzniku silných odpuzivých sil mezi proteiny a navázanou tenkou vrstvou vody na povrchu substrátu.^{29,45} Ideální podmínky smáčení pro adhezi buněk jsou odlišné pro různé substráty a jsou silně ovlivněny povrchovou topologií, povrchovým nábojem a v neposlední řadě typem a koncentrací funkčních skupin na povrchu.⁴⁶ Na smáčivost mají největší vliv kyslíkové funkční skupiny (hydroxylové, karboxylové a etherové).⁴⁷ V případě adheze HeLa buněk na povrch s kyslíkovými funkčními skupinami se ideální smáčivost pohybuje kolem 50° pro vodu.⁴³ Dalším důležitým parametrem při adhezi buněk na substrát je povrchová drsnost, která se dělí na makrodrsnost (100 μm a více), mikrodrsnost (100 nm – 100 μm) a nanodrsnost (méně jak 100 nm). Povrchová makro-drsnost adhezi buněk na substrát neovlivní, protože povrchové nepravidelnosti jsou příliš velké. Buňky používané pro studium adheze mají ve většině případů kulatý tvar s průměrem kolem 50 μm a při přichycení a rozprostření na povrchu mohou zabírat plochu v řádech stovek až tisíců μm² a jsou tedy ovlivněny povrchovou mikrodrsností (zejména buňky, které jsou závislé na ukotvení na substrát). Mikrodrsnost ovlivňuje ve většině případu adhezi buněk pozitivně zvýšením povrchové energie a smáčivosti substrátu.^{48,49} V některých případech mohou povrchové mikronerovnosti působit na adhezi buněk negativně např. snížením proliferace a tím snížením populační hustoty.⁵⁰ Nanodrsnost ovlivňuje silně nejenom buněčnou adhezi ale celkové chování buňky. Změnou orientace, velikosti nebo tvaru nepravidelností v řádech nanometrů na povrchu substrátu lze kontrolovat buněčné chování jako např. proliferační aktivita, délka života, specifická adheze nebo diferenciací.⁵⁰ Tohoto jevu se často využívá např. při vývoji biomateriálů, umělých orgánů a implantátů.^{51–54} Schématické znázornění vlivu smáčivosti a drsnosti substrátu na buněčnou adhezi je znázorněno na obr.

5.



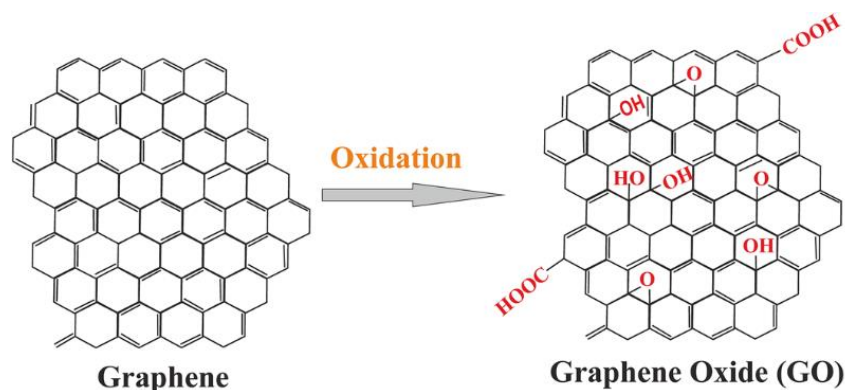
Obr. 5. Schématické znázornění vlivu smáčivosti (wettability) a drsnosti (roughness) povrchu na adhezi buněk.⁵⁴ Copyright © RSC 2016.

Sílu adheze mezi buňkami a substrátem lze vyhodnotit pomocí několika metod, mezi které patří metody hydrodynamické, centrifugační a mikromanipulační techniky.^{55,56} Mikroskopie atomárních sil (AFM) je velice účinná technika při studiu síly adheze buněk na substrát, ale je nevhodná pro větší buněčné populace a používá se spíše pro charakterizaci individuálních buněk. Naopak metody založené na principech hydrodynamiky, jako jsou impinging jet, radiální a paralelní průtokové cely, jsou vhodné pro studium velkých buněčných populací a kolektivního adhezivního chování. Tyto techniky, které jsou založeny na působení smykového napětí na adherované buňky, umožňují dynamická měření a studium kinetik uvolňování se substrátu.^{57–59} Další výhodou je možnost pořízení záznamu kinetik uvolňování pomocí mikroskopu a kamery. Ve srovnání s ostatními hydrodynamickými metodami, které pracují ve větších vzdálenostech od stagnačního toku, se systémy založené na principu impinging jet se zaměřují na malou oblast kolektoru v okolí stagnačního toku, kde jsou jednotlivé hydrodynamické vrstvy více uniformní.^{11,13,18} Toto uspořádání umožňuje přesnou kvantifikaci tangenciálních sil působících na substrát, čímž lze získat poměrně přesné a spolehlivé informace o síle adheze.

3.2 Využití 2D uhlíkových nanomateriálů jako substrát pro adhezi buněk

2D uhlíkové nanomateriály jako je grafen a GO nacházejí stále větší uplatnění v neustále se rozvíjejících biomedicínských aplikacích, v oblastech jako cílená doprava léčiv,^{60–63} příprava biomateriálů pro umělé orgány,^{64,65} biosenzory,^{66–69} neurální inženýrství,⁷⁰

fototermální terapie a teranostika.^{68–70} Ve výše uvedených aplikacích nacházejí tyto materiály uplatnění především díky svým specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem jako je vynikající tepelná vodivost, velká specifická plocha povrchu, vynikající mechanická pevnost, specifické optické vlastnosti a vynikající biokompatibilita.^{74–76} Grafen svojí strukturou připomínající včelí plástev se skládá z uhlíků s sp^2 hybridizací, které tvoří dvojrozměrnou síť (viz obr 6). Pokud se grafen oxiduje např. pomocí studené plazmy, vzniká derivát GO, který má na svých uhlících připojené kovalentně navázané kyslíkové funkční skupiny. Nejčastěji lze na povrchu GO najít funkční skupiny hydroxylové (-OH), epoxidové (=O) a karboxylové (-COOH). Díky těmto funkčním skupinám je GO rozpustný ve vodě, má větší povrchovou energii, polárnější povrch a je tedy vhodnější substrát pro adhezi buněk. Tyto funkční skupiny pak interagují s adhezními proteiny pomocí kovalentních vazeb, elektrostatických interakcí, vodíkových můstků a π - π interakcí. Míra proliferace pak závisí na obsahu kyslíkových funkčních skupin na povrchu.⁷⁷



Obr. 6. Schéma struktury grafenu a GO připraveným oxidací pomocí studené plazmy.⁷⁸ Copyright © Springer 2018.

Díky svým specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem nacházejí 2D uhlíkové nanomateriály v posledních letech stále větší uplatnění ve farmaceutickém a biomateriálovém výzkumu. Především v oblasti tkáňového inženýrství, vývoji biosenzorů nebo protetice je studium adheze buněk na tyto materiály tématem mnoha vědeckých

skupin.⁷⁹⁻⁸³ Díky schopnosti GO podporovat adhezi buněk a selektivně zachytávat nádorové buňky se začal povrch GO používat jako vhodná platforma pro konstrukci biosenzorů, detekování kolujících nádorových buněk nebo při cílené léčbě nádorových onemocnění založené na fototermální terapii. Např. nedávno připravený hybridní mikrovláknový polyester s vrstvou GO na povrchu využitý jako tkáňový nosič, který podporuje adhezi buněk, vykazoval schopnost usmrtit adherované buňky pomocí fototermální ablace.⁸⁴ Síla adheze je důležitá pro účinnost biosenzorů a může být vylepšena pomocí chemické modifikace nebo nanostrukturalizací povrchu.^{85,86} GO také působí pozitivně na proliferaci buněk, tohoto jevu se využívá např. v případě mesenchymálních kmenových buněk v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství.⁸⁷ Kromě výše uvedeného typu buněk GO podporuje proliferaci u fibroblastů,⁸⁸ lidských osteoblastů⁸⁹ nebo nádorových buněk adenokarcinomu.⁹⁰ Grafen má díky své excelentní vodivosti, díky které je možné ovlivnit elektroaktivní chování nervových buněk, obrovský potenciál v neurálním tkáňovém inženýrství.⁹¹

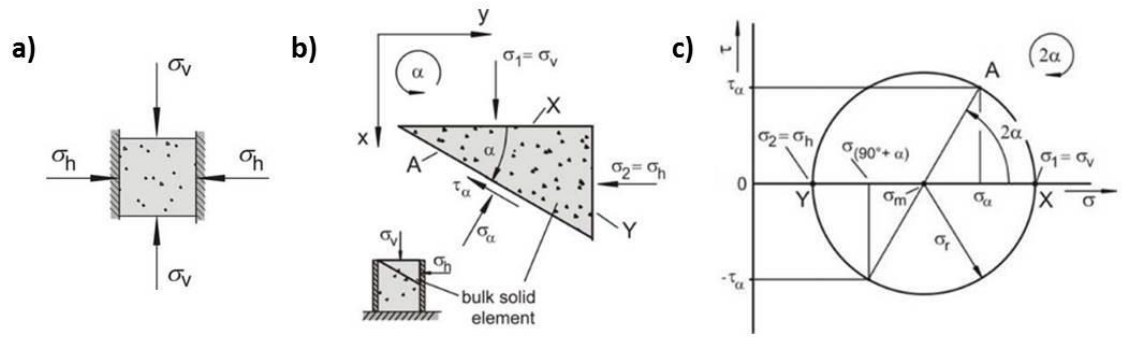
3.3 Buněčná linie HeLa

Buněčná HeLa linie byla založena v roce 1951 z biopsie rakoviny děložního čípku Henrietty Lacks a stala se prvními lidskými buňkami, které bylo možné pěstovat v laboratoři. Stále se jedná o nejpoužívanější buněčnou linii a od její založení se objevuje ve více než 75 000 odborných publikacích. Pomocí této linie bylo dosaženo mnoha vědeckých objevů jako např. objevení vakcíny proti vzteklině v roce 1955 profesorem Jonasem Salkem a kolegy.⁹² V roce 1983 Harald zur Hausen s kolegy publikoval stěžejní práci, která potvrdila roli lidského papillomaviru při onemocnění rakoviny děložního čípku.⁹³ Za tento objev, který vedl k přípravě vakcíny proti rakovině děložního čípku, získal Harald zur Hausen v roce 2008 Nobelovu cenu.⁹⁴ Rakovina děložního čípku týkající se žen celosvětově je nejběžnějším typem rakoviny a způsobuje přes 200 000 úmrtí ročně.⁹⁵ Těmto úmrtím je možné předejít včasnou diagnózou následovanou léčbou prekancerózy, protože včasná léčba značně ovlivňuje další prognózy. Studium adheze a kinetik uvolňování HeLa buněk adherovaných na grafen a GO může pomoci při dalším vývoji biosenzorů, které dále mohou být použity pro rutinní a efektivní diagnózu rakovinových onemocnění. Studie, které se autor této práce dále věnuje v sekci řešené problémy,

prokázala, že použitím techniky impinging jet je možné experimentálně kvantifikovat buněčnou adhezi na 2D uhlíkových nanomateriálech.⁹⁶

4 Základy reologie partikulárních látek

Práškové materiály patří mezi partikulární látky. Tyto látky se vyznačují tím, že jsou tvořeny pevnou fází, kterou obklopuje fáze tekutá (kapalina, plyn). Pro sypké práškové materiály je tekutá fáze plyn (nejčastěji vzduch). Kombinace těchto dvou složek pak udává celkové mechanické chování. Základním charakteristickým rysem práškových materiálů je schopnost přenášet smykové napětí v klidovém stavu, což se v praxi projeví tak, že k toku materiálů nestačí pouze gravitační síla jako u kapalin. Je tedy nutné dodat sílu k překonání vnitřního tření. Manipulaci s těmito látkami často komplikuje existence tzv. kohezních sil, jejíž vliv roste úměrně s rostoucí kontaktní plochou velikostí částic práškového materiálu. Se zmenšováním částic pak většinou dochází ke zvětšování těchto kohezních sil.^{97,98} Tokové vlastnosti práškových materiálů jsou ovlivněny spoustou faktorů jako velikost, pórovitost, plocha povrchu, tvrdost, štěpnost částic apod. Měření tokových vlastností partikulárních látek je pak velice náchylné na vnější vlivy zejména na vlhkost a vibrace.^{99–}
¹⁰³ Mezi partikulárními látkami působí vazebné mechanismy, které jsou příčinou stavu napjatosti mezi částicemi. Mechanický styk způsobený přímým kontaktem částic se projevuje vznikem třecí vazby. Toto silové působení se označuje v praxi jako vnitřní tření. Pro partikulární látky je typická vlastnost schopnost přenášení vnitřního tření i za klidového stavu. V partikulárních látkách je ve styku velké množství částic s různým tvarem, orientací a s rozdílnou velikostí kontaktních ploch, proto je nutné sledovat vnitřní tření v objemu, který se praktické účely označuje jako smyková zóna.⁹⁷



Obr. 7. Schéma elementární krychle práškového materiálu v zásobníku s vyznačeným směrem působení vertikálního σ_v a horizontálního σ_h napětí (a); schéma elementárního trojbokého hranolu s vyznačeným smykovým τ_α a normálovým napětím σ_α vzniklými proložením elementární krychle rovinou s úhlem α (b); graf závislosti smykového napětí na normálovém napětí s vyznačenou Mohrovou kružnicí (c).⁹⁷ Copyright © Springer 2008.

Rozložení napětí v práškových materiálech se určuje v rámci objemu partikulární látky a lze ji vyjádřit pomocí elementární krychle práškového materiálu v zásobníku (obr. 7a) při předpokladu, že plnicí výška zásobníku je nekonečná a mezi stěnami a materiálem nevniká žádné tření. Na obr. 7a σ_v značí normálové napětí působící na materiál ve vertikálním směru, σ_h pak horizontální napětí, které představuje tlak práškového materiálu vůči stěně a je důsledkem působení σ_v . Normálová napětí σ_v a σ_h působí tedy v plochách kolmých nebo rovnoběžných ke stěně zásobníku. Poměr σ_h/σ_v se značí K a nabývá pro partikulární látky obvykle hodnot od 0,3 a 0,6 (pro srovnání: ideální pevná látka $K = 1$, ideální kapalina $K = 0$). Na roviny vedené pod úhlem α působí kromě normálového napětí σ_α smykové napětí τ_α . Na obr. 7b je znázorněný elementární trojboký hranol o stranách dX , dY a dA , který vznikl proložením elementární krychle z obr. 7a obecnou rovinou o úhlu α . Pokud známe hodnoty σ_v a σ_h , můžeme pomocí vztahu (18) a (19) spočítat napětí σ_α a τ_α pro libovolný úhel α .^{97,98}

$$\sigma_{\alpha} = \frac{\sigma_v + \sigma_h}{2} + \frac{\sigma_v - \sigma_h}{2} \cos(2\alpha) \quad (18)$$

$$\tau_{\alpha} = \frac{\sigma_v - \sigma_h}{2} \sin(2\alpha) \quad (19)$$

Pro znázornění napětí v partikulárních látkách ve všech rovinách pod libovolným úhlem α se používá Mohrova kružnice, která vznikne po vynesení a spojení hodnot σ_{α} a τ_{α} pro jednotlivé úhly α v grafu závislosti smykového a normálového napětí (obr 7c). Střed této kružnice lze vypočítat pomocí vztahu (20) a leží na ose σ , poloměr kružnice lze zjistit pomocí vztahu (21). Z grafu je patrné, že kružnice má s osou σ dva průsečíky X a Y. Tyto body představují hodnoty hlavních normálových napětí, větší hodnota σ_1 odpovídá hodnotě vertikálního normálového napětí σ_v , menší hodnota σ_2 pak odpovídá hodnotě horizontálního napětí σ_h .⁹⁷

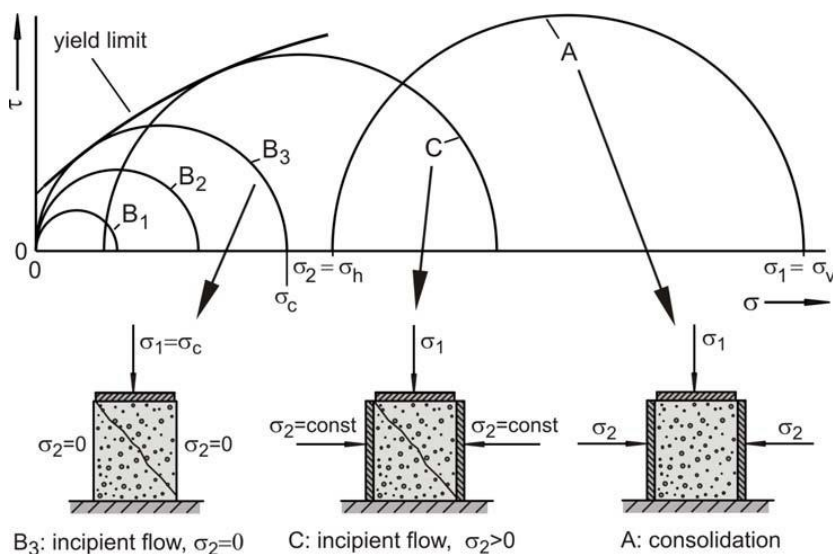
$$\sigma_m = \frac{\sigma_1 + \sigma_2}{2} \quad (20)$$

$$\sigma_r = \frac{\sigma_1 - \sigma_2}{2} \quad (21)$$

4.1 Tokové vlastnosti práškových materiálů

Tokové vlastnosti práškových materiálů silně závisí na adhezních silách mezi částicemi. Tyto adhezní síly vznikají několika mechanismy. Pro jemně zrnité materiály s minimální vlhkostí je adheze mezi částicemi způsobena převážně Wan der Walsovými a elektrostatickými interakcemi. Wan der Walsovy interakce jsou způsobeny rozdílnými dipóly atomů a molekul, zatímco elektrostatické interakce jsou zapříčiněny rozdílným elektrickým potenciálem na povrchu částic. U práškových materiálů, které obsahují hodně vlhkosti, jsou adhezní síly způsobeny převážně kapalnými můstky. Tyto můstky se vytvářejí převážně prostřednictvím kapaliny s nízkou viskozitou. Intenzita těchto interakcí závisí převážně na velikosti a chemickému složení povrchu interagujících částic. Se

snižující se velikostí interagujících částic dochází ke zvyšování adhezních sil, proto práškové materiály s velmi malou velikostí špatně tečou. Souhrnně se pak materiály se špatnými tokovými vlastnostmi označují jako kohezní.^{97,104} Při kompresi práškových materiálů externí silou dochází k plastickým deformacím na kontaktních plochách stýkajících se částic, což zapříčiní zvětšení ploch povrchu. Tento jev potom vede také ke zvýšení adhezních sil mezi částicemi a využívá se např. při výrobě tablet.¹⁰² Důležitou charakteristikou u práškových materiálů je mezní stav napjatosti. Tok u většiny práškových materiálů (netýká se volně tekoucích) nastane až po překročení mezního stavu napětí, kdy dojde k překonání mezičásticových interakcí. K určení mezního stavu napjatosti se používá jednoosá zkouška tlakem, která je založena na zatížení práškového materiálu ve válci. V první fázi se vzorek konsoliduje působením vertikálního napětí σ_v , které současně vyvolá horizontální napětí σ_h (podle poměru napětí K). Hodnota smykového napětí τ je 0. Tento stav při konsolidaci na grafu závislosti τ/σ (obr. 8) je znázorněn pomocí Mohrovy kružnice A.⁹⁷



Obr. 8. Znázornění grafu závislosti smykového napětí na normálovém napětí s vyznačenou mezní křivkou (yield limit) určenou Mohrovými kružnicemi B_3 a C ; v dolní části je schematicky znázorněn počátek toku B_3 , C (incipient flow) a konsolidace práškového materiálu A (consolidation) odkazující na jednotlivé Mohrovy kružnice.⁹⁷ Copyright © Springer 2008.

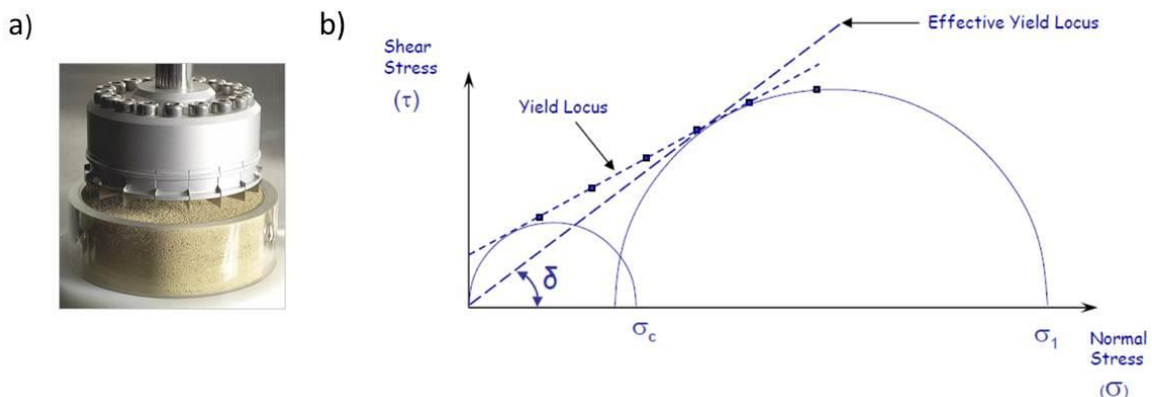
Pokud $\tau = 0$, pak větší hlavní normálové napětí $\sigma_1 = \sigma_v$ a zároveň menší hlavní napětí $\sigma_2 = \sigma_h$. V druhé fázi se odstraní stěny válce při současném zachování tvaru konsolidovaného materiálu. Vzorek je potom zatěžován postupně zvětšujícím se vertikálním napětím. Tento děj je znázorněn na obr. 8 pomocí Mohrových kružnic B_1 , B_2 a B_3 . Protože po odstranění stěn válce nepůsobí na materiál žádné horizontální normálové napětí σ_H ($\sigma_2=0$), všechny Mohrovy kružnice začínají na ose σ v bodě 0. Při určitém napětí σ_1 , dojde k selhání vzorku a materiál začne téct (Mohrova kružnice B_3). Toto napětí se značí jako prostá mez skluzu σ_c . Při menším napětí nedojde u konsolidovaného vzorku k selhání a dochází pouze k elastickým deformacím, jak je patrné v případě Mohrových kružnic B_1 a B_2 , které se nachází pod mezní křivkou. Pokud aplikujeme na konsolidovaný vzorek kromě σ_v také konstantní σ_h , posune se nám Mohrova kružnice na ose σ doprava. Pokud aplikujeme dostatečně velké napětí a dosáhneme mezní křivky, dojde k toku materiálu (Mohrova kružnice C). Protože je průběh mezní křivky závislý na napětí při konsolidaci, má materiál pro každé konsolidační napětí charakteristickou mezní křivku. K charakterizaci práškových materiálů v praxi se používá toková funkce ff_c , která představuje závislost mezních stavů napjatosti na konsolidačním napětí. Podle této funkce lze rozdělit partikulární látky do několika kategorií, které jsou znázorněné v tabulce 1.^{97,98}

Tab. 1: Tabulka klasifikace tokových vlastností práškových materiálu v závislosti na velikosti indexu toku ff_c .⁹⁷

toková funkce	partikulární látky
$ff_c < 1$	netekoucí
$1 < ff_c < 2$	velmi kohezní
$2 < ff_c < 4$	kohezní
$4 < ff_c < 10$	lehce tekoucí
$ff_c > 10$	volně tekoucí

Pro efektivnější měření a zároveň menší spotřebu vzorku lze využít rotační smykové stroje. Pro jedno konsolidační napětí (předsmyk) lze změřit více smykových bodů na mezní tokové křivce. Tento typ měření spočívá v působení rotační smykové cely na materiál ve

válci. Pomocí této smykové cely se na materiál působí zároveň vertikálním i smykovým napětím (obr. 9a). Pro každou hodnotu normálové napětí rotační cely pomalu otáčí, a tím zvyšuje smykové napětí, dokud nedojde k toku konsolidovaného vzorku. V rámci měření se v čase postupně snižuje normálové napětí. Tímto lze získat postupně dostatečný počet smykových bodů k sestrojení mezní tokové křivky. Současně je vzorek před každým dalším smykovým bodem konsolidován počátečním předsmykovým napětím. Na obr 9b je znázorněn typický příklad grafu závislosti smykového napětí na napětí normálovém získaný pomocí rotačního smykového stroje. První Mohrova kružnice se sestrojí tak aby procházela počátkem grafu a byla tečná k mezní tokové křivce.⁹⁷



Obr. 9. Ukázka rotační smykové cely v provedení FT4 od Freeman Technology (a); ukázka výstupu z měření pomocí rotačního smykového přístroje s vyznačenými příslušnými Mohrovými kružnicemi, mezní tokovou křivkou (Yield Locus), efektivní tokovou křivkou (Effective Yield Locus), mezním napětím σ_c a efektivním úhlem vnitřního tření δ . Copyright © Freeman Technology 2008.

Průsečík s osou σ představuje tlakovou pevnost σ_c . Druhá Mohrova kružnice prochází předsmykovým bodem P a je také tečná k mezní tokové křivce. Průsečíky s osou σ pak značí hlavní normálové napětí při konsolidaci σ_1 (vertikální) a σ_2 (horizontální). Z grafu lze vyčíst další parametry jako je efektivní úhel vnitřního tření δ , který svírá přímka procházející začátkem diagramu. Tato přímka je zároveň je tečná k druhé větší Mohrově kružnici a nazývá se efektivní toková křivka.^{97,98}

Tokové vlastnosti práškových materiálů jsou ovlivněny také vzduchem (případně jiným plynem) nacházejícím se v mezerách mezi jednotlivými částicemi. Přítomnost vzduchu nejvíce ovlivní tokové vlastnosti nízko hustotních a jemných práškových materiálů¹⁰⁵. U některých materiálů stačí minimum energie k přechodu do stavu vznosu, ve kterém se pak prášek chová jako kapalina a potřebuje minimum energie k toku. Energie potřebná k přechodu práškového materiálu do vznosu se nazývá aerační. Hodnoty této energie jsou velké zejména pro kohezní materiály a závisí na struktuře povrchu, tvaru, velikosti a hustotě částic. Pomocí moderních reometrů lze získat parametry jako je aerační poměr, aerační energie nebo aerační citlivost.¹⁰⁶

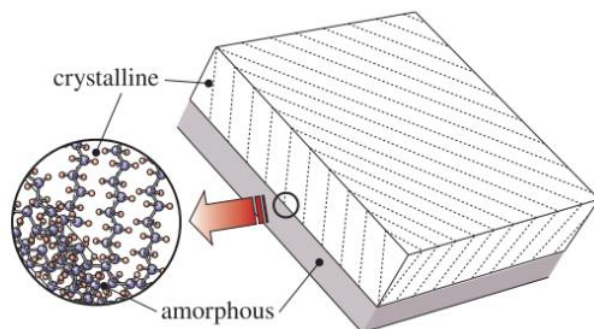
5 Polymerní kompozitní materiály

Pevnostní chování pevných látek souhrnně označuje odolnost materiálů proti porušení soudružnosti. Jeden z parametrů je pevnost v tahu, kterou se autor disertační práce zabývá dále v sekci řešené problémy. Každý materiál má určité mezní vlastnosti, které při překročení vedou k lomu materiálů. Lom je charakterizován tvorbou nového povrchu vyvolanou vnějším mechanickým napětím. Mezi hlavní faktory ovlivňující pevnost materiálu patří struktura, chemické složení a vnější podmínky jako je tlak, teplota a čas. Některé mechanické charakteristiky materiálů jako např. moduly pružnosti jsou závislé na celém objemu materiálu. Mechanické vlastnosti materiálů jak např. pevnost jsou závislé převážně na strukturálních nepravidelnostech jako trhliny a pukliny.¹⁰⁷

5.1 Struktura a vlastnosti polymerních kompozitních materiálů

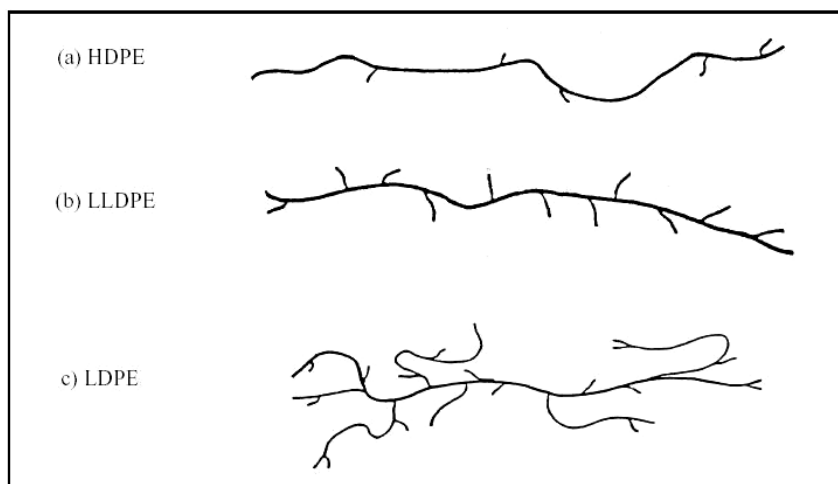
Jako kompozitní materiály (kompozity) označujeme takové materiály, které jsou složeny alespoň ze dvou rozdílných složek s rozdílnými materiálovými vlastnostmi. Konstrukční kompozity se skládají ze dvou fází: matrice a výztuže. Výsledný vnější tvar a povrch kompozitu záleží na matrici, která má zároveň spojovací funkci a přenáší zatížení na vlákna nosných částí. Výztuž představuje nespojitou část kompozitu a má funkci nosné části. Mezi matricí a výztuží je mezifáze, přes kterou se přenáší napětí z matrice na nosnou část. Přenos

napětí je ovlivněn tloušťkou mezifáze a mechanickými vlastnostmi matrice a výztuže. Síla adheze mezi matricí a výztuží je pak ovlivněna povrchovou energií jednotlivých fází a ovlivňuje finální mechanické chování kompozitu.¹⁰⁸ Jako matrice se běžně využívají polymery, které jsou odolné vůči korozi, mají nízkou hustotu a vysokou houževnatost. Nejčastěji se pak využívají termoplasty nebo reaktoplasty. Reaktoplasty jsou složené z krátkých molekul a mají charakter viskózní tekutiny, která se vytvrdí pomocí chemické reakce (např. epoxidové pryskyřice). Jejich výhodou je větší tepelná odolnost, protože zůstávají v pevné fázi i po zahřátí. Termoplasty, které jsou složené s dlouhým řetězců spojených pomocí slabých nevalebných a elektrostatických interakcí, naopak při zahřátí nad bod skelného přechodu začínají měknout a téct. Následně při snížení teploty opět tuhnou. Toto chování umožňuje pomocí forem znovu materiál vytvarovat. Mezi nejčastěji používané termoplasty pro matrici v kompozitech patří polypropylen (PP), polyethylentetraftalát (PET) a polyamidy (PA) nebo polyethylen (PE). U vláknových kompozitů se jako výztužné části používají uhlíková nebo skleněná vlákna. Tyto kompozity jsou kvůli vysokým hodnotám modulu pružnosti, pevnosti v tahu a chemické odolnosti používány v automobilovém a leteckém průmyslu. Jako výztužnou část lze použít i určité typy polymerů, musí mít však větší pevnost a tuhost než skleněná vlákna např. aromatické polyamidy (aramidy), které se používají např. v kompozitu s obchodním názvem Kevlar. Dalším typem kompozitních materiálů jsou částicové neboli plněné kompozity, kde se jako výztuže používají anorganické částice převážně za účelem snížení tepelné roztažnosti, zvýšení tepelné vodivosti a tvarové stálosti. Nejčastěji se používají minerální plniva na bázi hlinitokřemičitanů nebo uhličitanů s různým tvarem a různou velikostí částic. Dle rozměrů výztuže se kompozity dělí na makrokompozity ($>10^2$ μm), mikrokompozity ($10\text{-}10^2$ μm) a nanokompozity (výztuž má rozměry v nm).^{20,109,110} Jako jeden z často používaných polymerů pro matrici v částicových kompozitech se používá PE, který patří mezi lineární polyolefiny se semikrystalickou strukturou skládající se z amorfni a krystalické části. Krystalické lamely dodávají PE strukturální integritu, zatímco amorfni část je zodpovědná za elastické vlastnosti. Semikrystalický charakter PE je znázorněn na obr. 10.¹¹¹



**Obr. 10. Znáznění krystalické a amorfí fáze v polymerech se semikrystalickou strukturou.¹¹²
Copyright ©Elsevier 2008.**

PE lze připravit v několika modifikacích: nízkohustotní PE (LDPE), vysokohustotní PE (HDPE) a lineární nízkohustotní PE (LLDPE).¹¹³



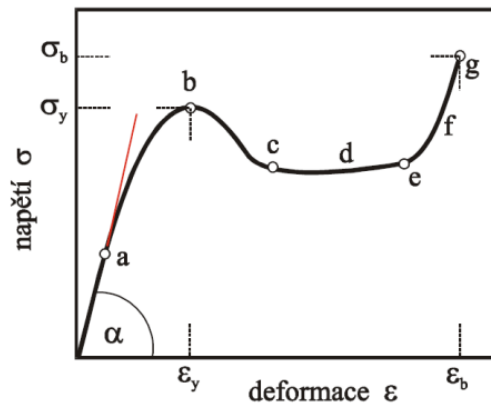
**Obr. 11. Znáznění mikrostruktury s bočními polymerními řetězci pro jednotlivé modifikace PE.¹¹¹
Copyright © Elsevier 2008.**

Jednotlivé modifikace mají stejnou základní opakující se strukturální jednotku ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) a liší se molární hmotností a její distribucí, hustotou, stupněm krystalinity, množstvím

krátkých a dlouhých bočních řetězců. HDPE obsahuje primárně lineární řetězce s velmi malým obsahem krátkých bočních řetězců. Míra rozvětvení řetězců silně ovlivňuje hustotu a reologické chování PE. HDPE obsahuje primárně lineární řetězce s nízkým obsahem bočních krátkých řetězců. LDPE obsahuje velké množství dlouhých i krátkých bočních řetězců, což se projeví nižší hustotou a pevností. Schématické znázornění mikrostruktury jednotlivých modifikací PE je zobrazeno na obr. 11.¹¹²⁻¹¹⁴

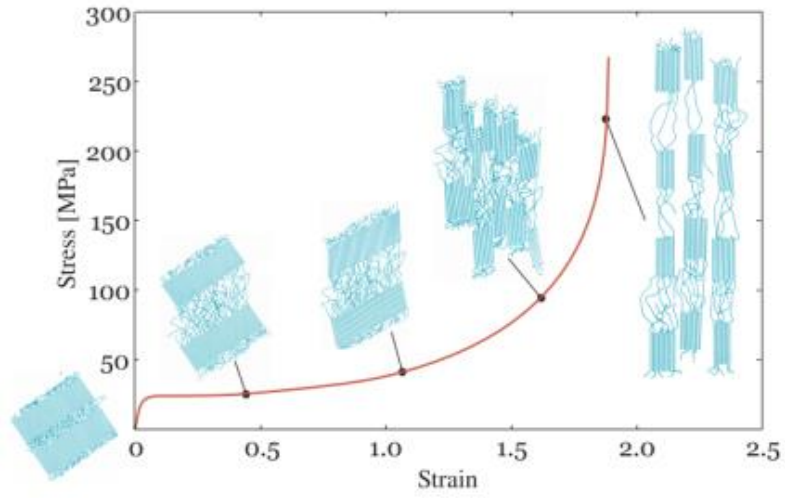
5.2 Mechanické chování polymerních kompozitů v jednoosém tahu

Mezi často používané experimentální metody hodnotící mechanické chování polymerů patří jednoosá tahová zkouška. Z průběhu této zkoušky také vychází většina teorií popisující pevnostní chování materiálů zejména z důvodu strukturní srozumitelnosti a experimentální jednoduchosti. V závislosti na rozsahu deformací lze sledovat lineární a nelineární chování nebo lom testovaného materiálu. Pro tento typ měření se používají trhací stroje, které nejčastěji pracují v režimu konstantní rychlosti deformace. Vzorek se uchytí mezi dvě upínací čelisti, z nichž jedna se pohybuje konstantní rychlostí vůči druhé. Snímá se průběh síly v závislosti na deformaci. Typický průběh křivky závislosti napětí na deformaci je znázorněn na tzv. pracovním diagramu (obr. 12). Z tohoto diagramu lze vyčíst důležité materiálové charakteristiky. Samotný tvar křivky je specifický pro každý materiál a lze z něj vyčíst jak je materiál pevný, tvárný, křehký apod. Směrnice křivky v počátku ($E = \sigma/\varepsilon$) definuje Youngův modul pružnosti, který je charakteristický pro daný materiál. Mez kluzu (Yield point) značí bod, kdy se elastické deformace změní na deformace plastické a nevratné. Tento bod je určen hodnotami ε_y a σ_y a na křivce je zpravidla v prvním maximu nebo podle některých norem v místě, kde se křivka začíná znatelně odchylovat od lineárního průběhu. Dále je v diagramu důležitý konečný bod křivky, který značí přetržení materiálu. Plocha pod křivkou odpovídá deformační práci a značí míru houževnatosti.^{20,107} Deformace PE v tahu vlivem vnějšího napětí je ovlivněno semikrystalickou povahou materiálu.¹⁰⁷



Obr. 12. Graf závislosti napětí σ na deformaci testovaného materiálu ε (pracovní diagram tahové zkoušky), kde bod (a) značí Youngův modul pružnosti, (b) horní mez kluzu, (d) přirozený dlužící poměr, (e) vyčerpání plasticity, (f) oblast zpevnění, (g) lom materiálu, ε_y a σ_y značí napětí a deformaci na mezi kluzu, σ_y je pevnost v tahu a ε_b značí tažnost materiálu.¹⁰⁷ Copyright © Univerzita Tomáše Bati 2004.

Na obr. 13 je znázorněn graf závislosti napětí v tahu na deformaci testovaného vzorku se znázorněnými změnami v mikro-struktuře polymeru během deformačních zkoušek. Na počátku nejsou pozorovány žádné deformace a zatížení je neseno převážně tuhými krystalickými lamelami. Po překročení meze kluzu jsou deformace způsobeny kombinací přesouvání amorfnní fáze a klouzáním krystalických lamel. Struktura jednotlivých krystalických lamel není v této fázi zatížením ovlivněna. S rostoucím napětím a deformací (1-1,5) lze vidět zvýšení orientace krystalické a amorfnní fáze polymeru ve směru vnějšího napětí. Při další deformaci po překročení hodnoty 1,5 dochází ke zpevnění materiálu, což se projeví na křivce prudkým nárůstem napětí. V této fázi nazývané oblast zpevnění je amorfnní fáze natažená na maximální hodnotu a dochází k rozvinutí a lámání krystalických lamel, tento jev je pak patrný na lomových plochách, které mají charakteristický hrubý a rozvlákněný povrch. Při dalším zvyšování napětí dojde k selhání materiálu, které se projeví přetržením. Změny v mikrostruktuře lamel a při deformaci včetně fáze zpevnění jsou zobrazeny na obr. 13.^{107,114}



Obr. 13. Graf závislosti napětí σ na deformaci testovaného PE materiálu s vyznačenými změnami v mikrostruktuře polymerní matrice.¹¹⁴

6 Cíle disertační práce

Hlavním cílem předložené disertační práce bylo pochopení a popsání mezifázových procesů a jevů, které mají význam v biomedicínské a technické praxi. Jedná se zejména o pochopení vztahů mezi fyzikálně chemickými jevy ovlivňující adsorpční/desorpční proces vybraných polymerních částic a biologických entit jako např. buněk na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka pomocí hydrodynamických a smykových sil. K tomuto účelu bylo potřeba realizovat a konstrukčně upravit systém na bázi technologie impinging jet, kde je depozice řízená difuzí a uvolnění adherovaných částic/buněk z povrchu iniciován laminárním tokem v okolí stagnačního bodu. Mezi další cíle patřilo studium a pochopení mezifázových jevů na rozhraní pevná látka/pevná látka se zaměřením na vliv kohezních a adhezních sil mezi plnivem a matricí na mechanické vlastnosti v kompozitních materiálech. K tomuto účelu byl zkoumán vliv intenzity a časového průběhu deformačního napětí ve formě jednoosého namáhání na deformaci kompozitů. Dalším cílem byla charakterizace kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u práškových materiálů pomocí mechanického smyku. Experimentální část je rozdělená do dvou logických částí. V první části hlavní řešené problémy se autor věnuje diskuzi výsledků z experimentů zaměřených na adsorpční/desorpční proces na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka pomocí techniky impinging jet. Druhá část nazvaná další řešené problémy je zaměřena na experimentálním studiu mezifázových jevů na rozhraní pevná látka/pevná látka a pevná látka/plyn pomocí deformačního a smykového mechanického napětí.

Přehled cílů v bodech

- 1- Studium a pochopení interakcí na fázovém rozhraní pevná látka/kapalina.
- 2- Konstrukce a realizace systému pro měření kinetiky depozice/ uvolňování částic na bázi technologie impinging jet.
- 3- Charakterizace a pochopení vlivů topologie, smáčení, volné povrchové energie a chemického složení testovaných povrchů na proces adsorpce/desorpce na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka.

- 4- Experimentální studium kinetiky uvolňování lidských nádorových buněk (HeLa) adherovaných na uhlíkové 2D-nanomateriály za přesně definovaných fyzikálních podmínek.
- 5- Zaměření výzkumné činnosti na experimentální studium vlivu topografie povrchu na kinetiku depozice latexových polystyrenových částic za přesně definovaných fyzikálních podmínek na polymerní substrát (ZEONOR) upravený technikou nano-embosování.
- 6- Experimentální studium vlivu adheze minerálních plniv do polymerní matrice na fázovém rozhraní pevná látka/pevná látka na výsledné mechanické vlastnosti kompozitu pomocí deformačního napětí.
- 7- Studium vlivu kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u partikulárních látek na tokové vlastnosti s využitím smykové cely.

Řešená problematika

7 Řešená problematika s využitím systému impinging jet

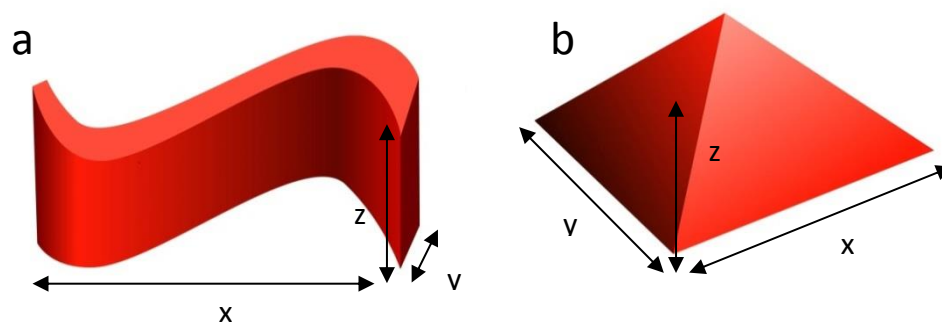
7.1 Studium depozice modelových částic (PS) na nanostrukturovaných polymerních površích

Tato studie byla zaměřena na výzkum vlivu topografie povrchu na depozici modelových polystyrenových latexových částic s velikostí 1,1 μm na modifikované polymerní substráty. Povrchová úprava polymeru na bázi cyklického olefinu (Zeonoru) byla prováděna metodou nano-embosování. Autor disertační práce se podílel na rešerši a sepisování publikace „impinging jet study of the deposition of colloidal particles on synthetic polymer (Zeonor)“ publikované v časopisu International journal of mass and heat transfer (2014). V rámci této řešené problematiky se autor disertační práce podílel provedením a vyhodnocením impinging jet experimentů, měření a vyhodnocením volných povrchových energií testovaných substrátů. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a AFM měření byly provedeny kolegy z regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM). Embosovaný Zeonor byl připraven Mgr. Jiřím Čechem, Ph.D. z DTU Nanotech (Dánsko).

7.1.1 Materiály a metody

Pro impinging jet experimenty bylo použito originální uspořádání depoziční cely navržené Dąbrošem, Van de Venem a Adamczykem. Toto uspořádání je často zmiňováno jako „radial impinging jet cell“ (RIJ).^{7,8,115} Objemový průtok Q byl regulován nastavením vertikální pozice koloidní disperze a změnou vnějšího průměru vstupní a výstupní kapiláry. Průběh depozičního procesu byl sledován pomocí optického mikroskopu SM 5 (Intraco Micro, Česká republika) se zvětšením $200\times$ při teplotě $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Průtok ($Re \approx 10$) byl konstantní pro všechny experimenty. Počet deponovaných částic byl stanoven počítáním ze snímků pořízených v následujících intervalech: 5; 10; 20; 30; 45; 60; 80; 100; 120; 150 minut. Snímky byly pořízeny digitální kamerou Nikon Coolpix 4500 (Japan). Jako substrát pro depozici částic byl použit syntetický polymer Zeonor (Zeon chemicals, Japonsko) ve formě fólií s různou tloušťkou (50 μm a 100 μm). Povrch Zeonoru byl modifikován

embosováním dvěma odlišnými vzory (viz obr. 14). Označení, popis a geometrické parametry jednotlivých vzorů jsou shrnuty v tab. 2.



Obr. 14. Schématický geometrický popis vlnitého E2 (a) a pyramidového E1 (b) vzoru.¹¹ Copyright © Elsevier 2014.

Tab. 2: Popis a označení jednotlivých vzorků.

vzorek	x (nm)	y (nm)	z (nm)	Popis vzorku
1_Z50_V	-	-	-	nemodifikovaný Zeonor, tloušťka 50 μm
2_Z50_E1	375	375	170	embosovaný Zeonor: tloušťka 50 μm , vzor E1
3_Z100_V	-	-	-	nemodifikovaný Zeonor, tloušťka 100 μm
4_Z100_E2	440	50	170	embosovaný Zeonor vzor: tloušťka 100 μm , E2

Polystyrenové latexové kulovité mikročástice byly vybrány jako dostupný a běžně používaný testovací disperzní systém s širokým rozsahem velikostí částic a různým stupněm polydisperzity.¹¹⁶ Pro impinging jet experimenty byly použity polystyrenové latexové částice s velikostí 1,1 μm , zeta-potenciálem -20 mV a koncentrací 5×10^6 částic/ cm^2 . Pro eliminaci elektrostatických interakcí během depozice byla disperze připravena ve vodném roztoku 1×10^{-3} M KCl s výsledným pH 7. Vypočítaná hodnota κ_a při našich experimentálních podmínkách byla 59. Pro měření velikosti kontaktních úhlů

smáčení testovaných substrátů byly použity následující sloučeniny: ethylenglykol (EG) (p.a., Lachema, Česká Republika), dimethylsulfoxid (DMSO) (99,9 % A.C.S reagent, Sigma-Aldrich, Německo) a glycerol (GL) (p.a., Lach-Ner, Česká Republika). Všechny depoziční experimenty byly prováděny v deionizované vodě (vodivost - 0,06 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Velikost a zeta-potenciál polystyrenových latexových částic byl měřen na přístroji Zeta Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Ke zpracování obrazu byl použit ImageJ software (Image Processing and analysis in Java, USA). Charakterizace topografie povrchu studovaných vzorků Zeonoru byla provedena pomocí SEM a AFM. Všechny snímky ze SEM byly pořízeny pomocí mikroskopu Hitachi SU6600 (FEG) v módu sekundárních elektronů při urychlovacím napětí 1 kV a vzdálenost 6mm mezi detektorem a vzorkem. Mikroskop se skenovací sondou (Ntegra, NT_MDT) v AFM semi-kontaktním módu s frekvencí 0,7 Hz a NSG10 hrotem byl použit na ke stanovení topografie povrchu použitých substrátů. Smáčivost povrchu byla stanovena pomocí techniky založené na měření statických kontaktních úhlů metodou sedící kapky na přístroji See System Apparatus (Masarykova univerzita, Brno). Všechna měření probíhala při 22 °C a byla opakována 7x se 3 μl smáčecí kapaliny. Volná povrchová energie testovaných materiálů byla vypočítána pomocí rozšířené Fowkesovy teorie (Owens, Wendt, Rabel and Kaelble aproximace).¹¹⁷

7.1.2 Charakterizace povrchu

Velikost kontaktních úhlů smáčení a s tím spojená velikost volné povrchové energie substrátu silně ovlivňuje depoziční částic. Úhly smáčení pro jednotlivé kapaliny nemodifikovaných a embosovaných povrchů jsou shrnuty v tab. 3. Naměřené kontaktní úhly smáčení pro vodu u povrchově nemodifikovaných vzorků Zeonoru, které byly v rozsahu od 96,8 ° pro vzorek 3_Z100_V do 99 ° pro vzorek 1_Z50_V, odráží jejich hydrofobní charakter. Po povrchové modifikaci embosováním vzory E1 a E2 došlo k zesílení hydrofobního charakteru, což se projevilo zvýšením kontaktních úhlů smáčení na 105 ° a 102,4 °.

Tab. 3: hodnoty statických kontaktních úhlů smáčení měřených metodou sedící kapky pro jednotlivé substráty.

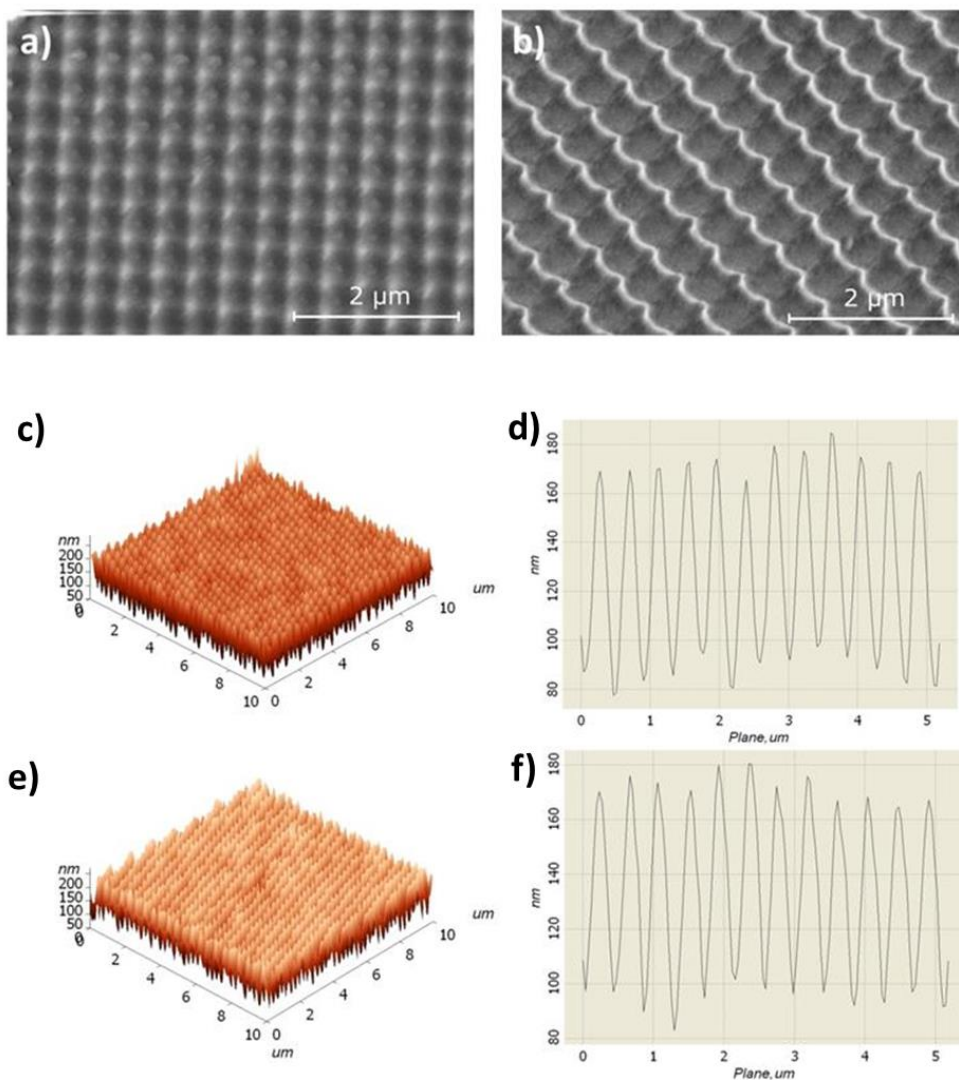
vzorek	kontaktní úhly smáčení θ (°)			
	voda	glycerol	ethylenglykol	DMSO
1_Z50_V	99.06 ± 2.29	81.17 ± 2.97	70.05 ± 0.56	64.99 ± 1.25
2_Z50_E1	104.99 ± 0.98	89.82 ± 2.41	67.85 ± 1.63	56.03 ± 1.97
3_Z100_V	96.79 ± 1.87	92.55 ± 0.54	67.64 ± 0.49	60.27 ± 0.89
4_Z100_E2	102.43 ± 1.53	82.44 ± 2.07	68.00 ± 2.28	60.61 ± 0.32

Pro výpočet volných povrchových energií byly změřeny kontaktní úhly smáčení pro glycerol, etylenglykol a DMSO. Souhrn spočítaných volných povrchových energií včetně polární a disperzní složky pro všechny vzorky je uveden v tab. 4.

Tab. 4: Souhrn spočítaných volných povrchových energií a jejich polárních a disperzních složek podle modelu Owens - Wendt - Rabel - Kaelble.

vzorek	volná povrchová energie (mJ/m ²)		
	celková	disperzní	polární
1_Z50_V	24.63 ± 3.77	21.49 ± 6.68	3.15 ± 4.05
2_Z50_E1	37.17 ± 8.83	36.52 ± 8.23	0.65 ± 0.88
3_Z100_V	30.00 ± 11.51	27.03 ± 12.66	2.97 ± 2.19
4_Z100_E2	31.92 ± 6.74	30.43 ± 8.50	1.49 ± 2.10

U všech sledovaných vzorků dominuje disperzní složka volné povrchové energie, polární složku lze považovat za minoritní. Nejnížší volná povrchová energie byla naměřena u nemodifikovaného substrátu 1_Z50_V (24,6 mJ/m²). Z výsledků je zřejmé, že embosování oběma vzory vede ke zvýšení volné povrchové energie. Nejvíce je tento jev patrný u pyramidového vzoru E1 kde došlo ke zvýšení o 50 % z původní hodnoty 24,6 mJ/m² na 37,2 mJ/m².

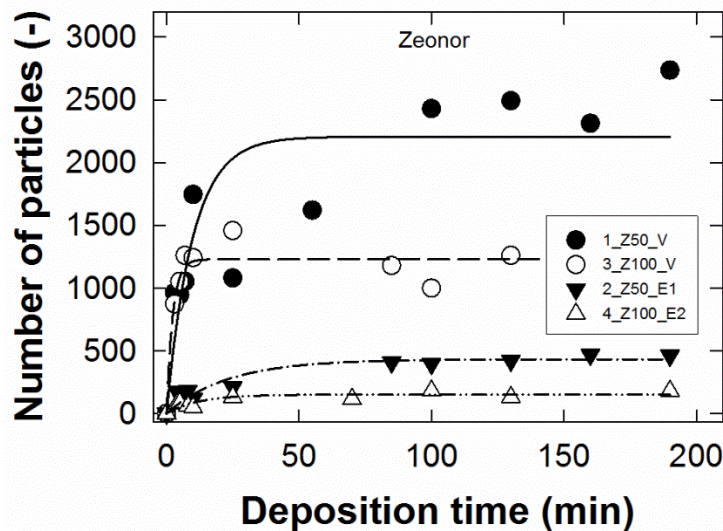


Obr.15. SEM snímky povrchu Zeonoru po embosování pyramidovým vzorem E1 (a) a vlnitým vzorem E2 (b); AFM snímky s profilovými řezy povrchu Zeonoru po embosování s pyramidovým vzorem E1 (c)(d) a vlnitým vzorem E2 (e)(f).¹¹ Copyright © Elsevier 2014.

Charakterizace povrchu byla provedena pomocí metod SEM a AFM (viz obr. 15). Ze snímků je patrné, že embosovaný povrch je vysoce homogenní u obou studovaných povrchů s embosovanými vzory E1 a E2. Snímky topografie povrchu ze SEM velice dobře korespondují s výsledky mapování povrchu pomocí AFM.

7.1.3 Depozice polystyrenových latexových částic pomocí techniky impinging jet

Naměřené kinetiky depozice záporně nabitých latexových částic o rozměru 1,1 μm na embosované a nemodifikované testované substráty pomocí techniky impinging jet jsou shrnuty na obr. 16.



Obr.16. Kinetiky depozice polystyrenových latexových částic získané technikou impinging jet pro jednotlivé substráty.¹¹ Copyright © Elsevier 2014.

Byl pozorován exponenciální nárůst počtu deponovaných částic během depozice pro všechny testované substráty. Z experimentů je patrné, že i přes zvýšení volné povrchové energie v důsledku úpravy povrchu nano-embosováním (viz tab. 4) bylo pozorováno snížení celkového počtu deponovaných polystyrenových latexových částic na povrch takto upravených substrátů ve srovnání s nemodifikovaným povrchem Zeonoru s nižší volnou povrchovou energií. Domníváme se, že toto snížení celkového počtu deponovaných částic je zapříčiněno lokalizovaným mikro vířením v kapalně vrstvě, která se nachází v těsné blízkosti nad strukturovaným povrchem. Tohoto jevu lze všeobecně využívat při depozici s hydrodynamickou fokusací. Je zřejmé, že povrchový design ovlivňuje celkovou aktivitu povrchu. Povrch Zeonoru s pyramidálním vzorem E1 je třikrát více aktivní ve srovnání s povrchem Zeonoru s vlnitým vzorem E2. Tento rozdíl je pravděpodobně zapříčiněn již

zmíněnou hydrodynamickou fokusací, která je více patrná u povrchu s pyramidovým vzorem. Tento předpoklad je podpořen rozsahem blokovacích časů pro jednotlivé vzorky, kde u povrchu s pyramidovým vzorem E1 se čas potřebný k ustálení počtu deponovaných částic (blokovací čas) zvýšil dvakrát v porovnání s nemodifikovaným Zeonorem. (tab. 5 pro 1_Z150_V a 2_Z50_E1). U vzorku s vlnitým vzorem 3_Z100_E2 bylo pozorováno zvýšení blokovacího času šestkrát ve srovnání s nemodifikovaným Zeonorem 3_Z100_V.

Tab. 5: Spočítané parametry depozice polystyrenových částic na testované substráty: τ_{bloc} – čas potřebný k ustálení počtu deponovaných částic (blokovací čas) (s), n – celkový počet deponovaných částic v ustáleném stavu (-), j_c – rychlost depozice v okolí stagnačního bodu.

vzorek	τ_{bloc} (min)	n_{∞} (-)	j_c (1/min)
1_Z50_V	9.82 ± 3.53	2206 ± 206	196.20
2_Z50_E1	23.1 ± 5.7	431.4 ± 2.7	18.72
3_Z100_V	2.32 ± 0.54	1230 ± 44	533.11
4_Z100_E2	12.2 ± 4.1	150.5 ± 1.7	12.83

Tyto závěry velice dobře korespondují s pozorováním rychlosti depozice v blízkosti stagnačního bodu j_c , kde je patrné razantní snížení u embosovaných vzorků. Povrchová drsnost pro jednotlivé vzorky byla spočítána s ohledem na typ smáčení (tab. 6). Všechny embosované vzorky vykazovaly homogenní typ smáčení (Wenzelův režim).

Tab. 6: Vypočítaná povrchová drsnost testovaných substrátů podle rovnice: $\cos(\theta_a) = \cos r(\theta)$.

vzorek	drsnost povrchu (-)		
	voda	EG	DMSO
2_Z50_E1	1.64	1.11	1.32
4_Z100_E2	1.82	0.98	0.99

7.1.4 Shrnutí

Tato studie byla zaměřena na depozici latexových částic na povrch syntetického polymeru Zeonoru pomocí techniky impinging jet. Topografie povrchu Zeonoru byla upravena pomocí nano-embosováním dvěma odlišnými vzory, tyto úpravy byly charakterizovány pomocí AFM a SEM. Depozice záporně nabitých (-20 mV) latexových částic o velikosti 1,1 μm probíhala při laboratorní teplotě (25 °C) a průtoku 2,3 g/min ($\text{Re} = 10$). Z grafu závislosti počtu deponovaných částic na čase je patrný exponenciální průběh až do ustálení rovnovážného stavu. Získané kinetiky depozice byly fitovány pomocí teoretického blokovacího modelu, díky kterému lze vypočítat čas potřebný k ustálení počtu deponovaných částic (blokovací čas) a rychlost depozice. I přes zvýšení volné povrchové energie v důsledku úpravy povrchu nano-embosováním bylo pozorováno snížení celkového počtu deponovaných polystyrenových latexových částic na povrch takto upravených substrátů ve srovnání s nemodifikovaným povrchem Zeonoru s nižší volnou povrchovou energií. Tento jev pravděpodobně způsobený hydrodynamickou fokusací v kapalně vrstvě v těsné blízkosti nad embosovaným povrchem. Toto tvrzení je podporováno vypočítanými depozičními parametry, kde u pyramidálního vzoru došlo k zdvojnásobení blokovacího času ve srovnání s čistým nemodifikovaným Zeonorem. V případě vlnitého vzoru došlo k šestinásobnému navýšení hodnoty blokovacího času. V obou případech došlo také k snížení počáteční rychlosti depozice částic.

7.2 Studium adheze buněk (HeLa) na planárních površích (G, GO, sklo)

Tato studie je zaměřena na využití techniky impinging jet při zkoumání a kvantifikaci adheze HeLa buněk na povrch grafenu (G) a GO. Naměřené kinetiky uvolňování adherovaných buněk ze substrátu, které bylo aktivováno laminárním prouděním o síle 9,4 nN, přispěly k hlubšímu pochopení interakce nádorových buněk a 2D-uhlíkových nanomateriálů. Chemické složení, topografie povrchu, volná povrchová energie testovaných substrátů byly charakterizovány pomocí rentgenové fotoelektronové mikroskopie (XPS), AFM, SEM a měření kontaktních úhlů smáčení. V rámci této řešené problematiky se autor disertační práce podílel na provedení a vyhodnocení impinging jet experimentů, přípravě GO oxidací grafenu pomocí studené plazmy, měření a vyhodnocení volných povrchových energií, vyhodnocení výsledků z metod: XPS, AFM a Ramanovy

spektroskopie. Dále se podílel na rešerši a sepisování publikace „Flow induced HeLa cell detachment kinetics show that oxygen-containing functional groups in graphene oxide are potent cell adhesion enhancers“ publikovaném v odborném časopisu *Nanoscale* (2019). XPS, SEM, AFM měření a kultivace HeLa buněk byly provedeny kolegy z regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM).

7.2.1 Materiály a metody

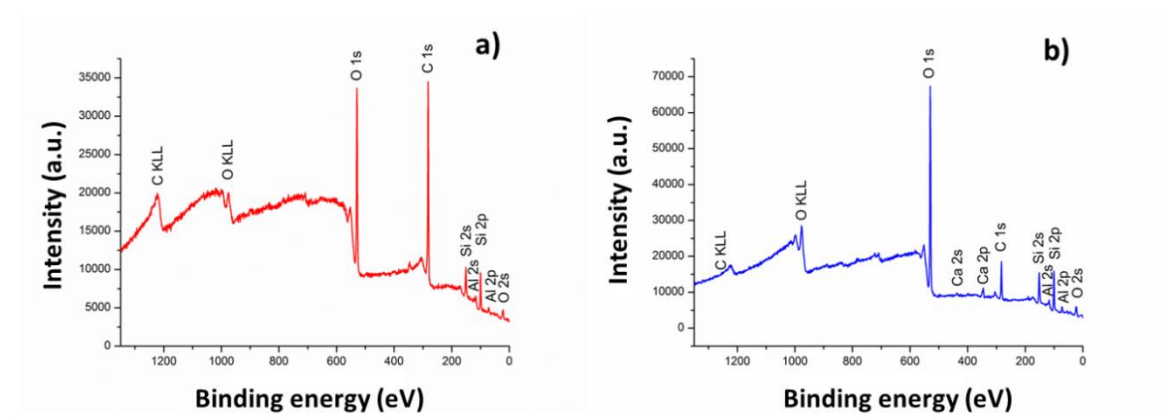
Pro impinging jet experimenty byly použity následující substráty: transparentní jednovrstvý grafen na skleněném substrátu (25x25) mm (Graphene Supermarket, USA); GO získaný modifikací z grafenu pomocí studené plazmy; skleněné krycí sklo (18x18x01) mm (Menzel – Gläser, Německo). Pro depozici na zmíněné substráty byla použita lidská buněčná nádorová linie cervix adenocarcinoma HeLa kultivovaná v modifikovaném Eaglovu médiu (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) doplněném 10 % fetálním hovězím sérem (FBS) a 1 % PEN/STR - penicilinem 10000 U/ml a streptomycinem 10000 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, USA). Voda (vodivost 0,06 µS/cm), diiodomethan 99 % (ACS reagent, Sigma-Aldrich, Německo) a EG (p.a., Lach-Ner, Česká Republika) byly použity jako smáčecí kapaliny pro měření kontaktních úhlů smáčení. Jako medium pro deponování HeLa buněk byl použit fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH 7,4 složený z následujících látek: dihydrogenfosforečnan draselný (p.a., Penta, Česká Republika), fosforečnan draselný (p.a., Sigma-Aldrich, Německo), chlorid draselný (p.a., Penta, Česká Republika) a chlorid sodný (p.a., Penta, Česká Republika). Grafen oxid byl připraven oxidací grafenu na skleněném substrátu pomocí studené atmosférické plazmy generované difuzním koplánárním bariérovým výbojem (Ceplant, Česká Republika) při atmosférickém tlaku. Doba plazmování byla 20 s při výkonu generátoru 350 W.

K testování velikosti adheze buněk deponovaných na testované substráty byla použita technika impinging jet. V této studii byla použita stejná depoziční cela jako při experimentech s modifikovaným Zeonorem. Průtok Q byl kontrolován nastavením vertikální pozice dělicí baňky obsahující fosfátový pufr a změnou průměru vstupní a výstupní kapiláry připojených na depoziční celu. Proces uvolňování buněk z povrchu studovaných substrátů byl sledován pomocí optického mikroskopu SM5 (Intraco Micro,

Česká Republika) se zvětšením 10x při teplotě 37 °C. Průtok byl nastaven na $Re \approx 40,5$ během všech experimentů, které byly zopakovány 3x. Smáčivost povrchu a velikost volné povrchové energie byla určena pomocí měření statických kontaktních úhlů smáčení na přístroji Krüss DSA 30 (Krüss GmbH, Německo). Měření bylo opakováno 7x pro všechny smáčení kapaliny při teplotě 22 °C. Volná povrchová energie testovaných substrátů byla spočítána z průměrné hodnoty naměřených kontaktních úhlů smáčení s využitím Fowkesovy rovnice rozšířené o Owens, Wendt, Rabel and Kaelbe teorii (OWRK).³ Topografie povrchu studovaných substrátů byla provedena technikou AFM. Snímky byly pořízeny na přístroji NTegra Spectra AFM instrument (NT-MDT, Rusko) se sondou VIT_P (NT-MDT, Rusko) při běžných laboratorních podmínkách (vlhkost 49 %, teplota 23 °C). Rezonanční frekvence sondy byla 300 kHz v semi-kontaktním módu. Pořízené snímky byly následně analyzovány v softwaru NT-MDT a Gwydion (Český meteorologický ústav, Česká Republika). Chemické složení povrchu studovaných vzorků bylo určeno pomocí XPS a Ramanovy spektroskopie. Spektra byla pořízena na přístroji DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, USA) s CCD kamerou a objektivem se zvětšením 10x. Všechna spektra byla měřena při laboratorní teplotě. Spektra byla měřena při červené excitační linii 633 nm (He-Ne laser) s výkonem 5,0 mW a délkou štěrbin 50 mm. K XPS měření byl použit přístroj PHI VersaProbe II XPS system (Physical Electronics, USA) s monochromatickým zdrojem Al-K α 15 kV o výkonu 50 W a energii fotonu 1486,7 eV. U každého vzorku byla analyzována oblast s průměrem 100 μ m. Všechna spektra byla měřena ve vakuu $1,3 \times 10^{-8}$ Pa a laboratorní teplotě 20 °C. Získaná spektra byla analyzována pomocí softwaru MultiPak (version 9.4.0.7.; Ulvac – PHI, Inc., USA). Všechny hodnoty vazebných energií byly vztaženy k referentnímu uhlíkovému píku C 1s (284,8 eV). Studované Hela buňky byly inkubovány při 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Pro mikroskopické měření byly buňky o koncentraci 5×10^3 buněk v 1ml suspenze smíchány s trypsinem a následně vysazeny na testované substráty. Po 48 hod. kultivace byly buňky vytaženy z růstového media a promyty fosfátovým pufrem. Snímky adheovaných buněk byly pořízeny na inverzním mikroskopu Olympus IX 70 (Olympus, Japonsko) se zvětšením 10x.

7.2.2 Charakterizace povrchu

Chemické složení, smáčivost, topografie a volná povrchová energie povrchu hrají při adhezi buněk na povrch materiálu důležitou roli, proto bylo nutné podrobně charakterizovat testované substráty.¹¹⁸ Na XPS přehledových spektrech lze vidět, že grafen se skládá převážně z atomů uhlíku a obsahuje pouze malé množství kyslíku (obr. 17). Po úpravě povrchu grafenu pomocí studené plazmy se množství kyslíku razantně zvýšilo, což je zapříčiněno navázáním kyslíkových funkčních skupin na povrch grafenu.



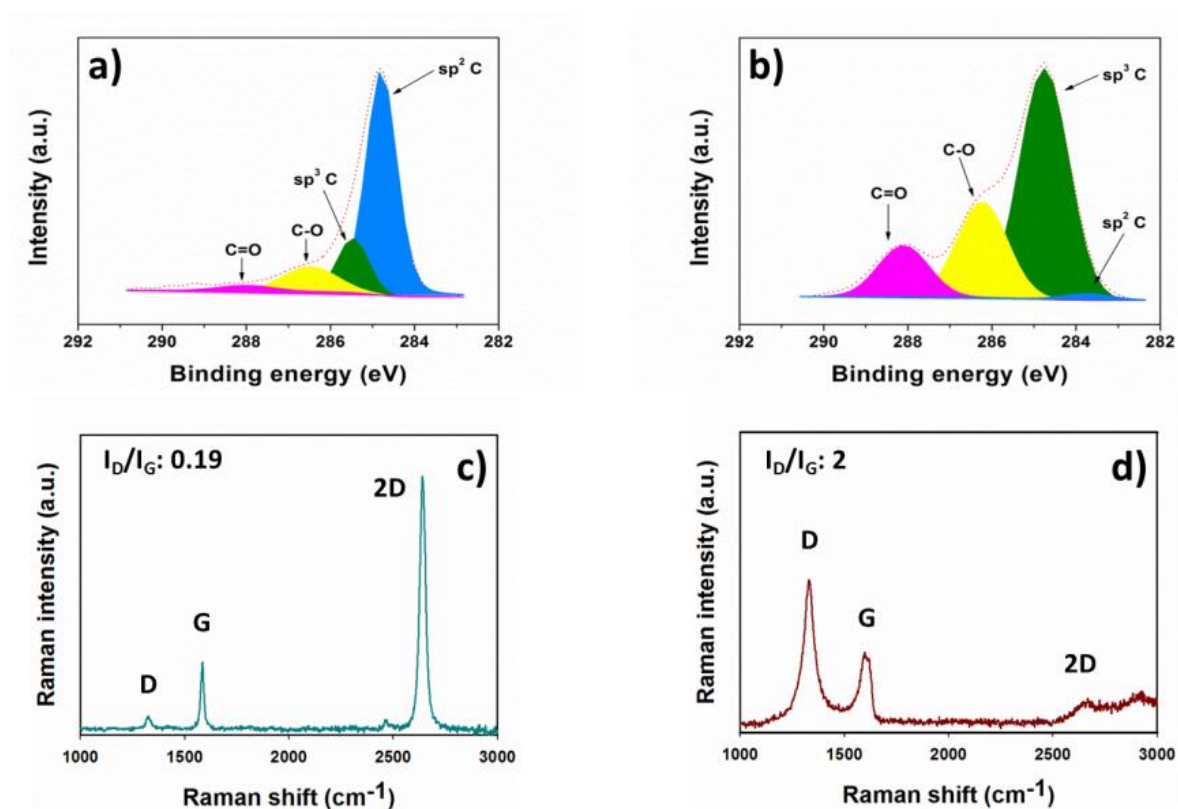
Obr.17. Naměřené XPS přehledové spektra grafenu (a) a GO (b) připraveného pomocí studené plazmy.⁹⁶ Copyright © RSC 2019.

Tab. 7: Chemické složení povrchu (vyjádřené v procentech) a pozorované poměry sp^2/sp^3 uhlíku pro grafen a GO.

vzorek	chemické složení povrchu (%) a poměry sp^2/sp^3 uhlíku				
	sp^2 C	sp^3 C	C-O	C=O	sp^2/sp^3
grafen	66.7	15.6	12.3	2.7	4.3
GO	3.0	53.4	29.1	12.4	0.06

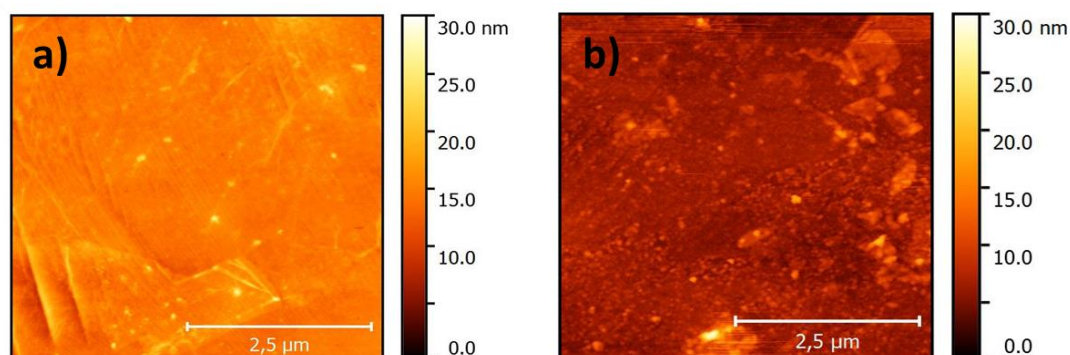
Píky pozorované při vazebných energiích 286,2 a 288,1 eV u C 1s XPS spekter s vysokým rozlišením (obr. 18a,b) odpovídají kyslíkovým funkčním skupinám C-O a C=O, které byly

detekovány na povrchu grafenu a GO. Vystavení povrchu grafenu působení studené plazmy má také za následek snížení intenzity píku sp^2C a jeho červený posun z 284,8 eV na 283,7 eV. Relativní zastoupení kyslíkových funkčních skupin se zvýšilo z původních 17,8 % na 43,5 % (viz tab. 7). Rozdílné chemické složení substrátů bylo také charakterizováno pomocí Ramanovy spektroskopie. Ve spektrech grafenu i GO lze vidět typické G, D a 2D pásy (obr. 18c,d). Ostrý a symetrický 2D pás s I_{2D}/I_G poměrem 3,7 vypovídá, že se grafen nachází v jedné vrstvě.^{119,120} Nicméně přítomnost D pásu a I_D/I_G poměru 0,19 značí přítomnost strukturálních defektů, které mohou být zapříčiněny částečnou oxidací grafenu (obr. 18a). Naměřené spektrum pro GO odráží jeho strukturu, která je bohatá na sp^3 defekty. Tyto defekty jsou zodpovědné za vysokou hodnotu I_D/I_G (2) a červený posun G pásu o 21 cm^{-1} ve srovnání s grafenem.^{121,122} Tyto data se shodují s výsledky XPS analýzy.



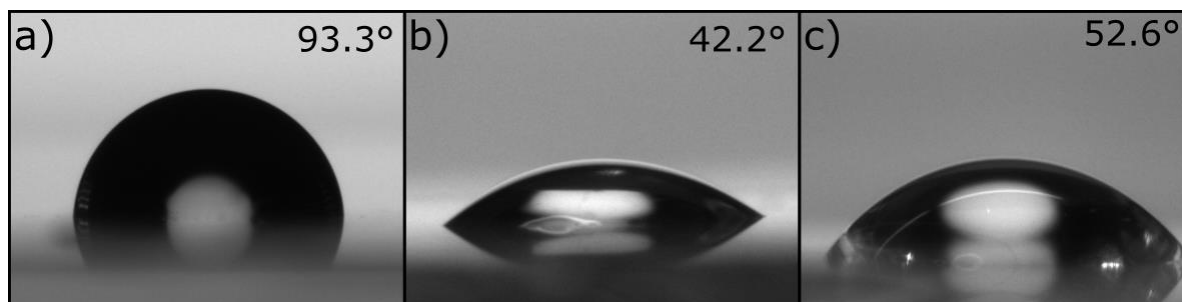
Obr. 18. Naměřené a fitované C 1s XPS spektra s vysokým rozlišením povrchu grafenu (a) a GO připraveným pomocí studené plazmy (b); Ramanova spektra ($\lambda_{ex} = 632.8\text{ nm}$) povrchu grafenu (c) a GO (d) připraveným pomocí studené plazmy.⁹⁶ Copyright © RSC 2019.

Topografie a drsnost povrchu testovaných materiálů byla analyzována metodou AFM (obr. 19). Drsnost povrchu grafenu byla 1,28 nm, drsnost povrchu GO pak 1,25 nm. Tyto naměřené hodnoty poukazují na to, že úprava pomocí studené plazmy neovlivnila morfologii povrchu. Impinging jet experimenty tedy byly prováděny na površích se stejnou morfologií ale s odlišným chemickým složením.



Obr 19. Snímky z mapování povrchové topografie grafenu (a) a GO (b) získané pomocí metody AFM⁹⁶. Copyright © RSC 2019.

Adheze buněk na substrát silně závisí na polaritě, volné povrchové energii, smáčivosti povrchu a schopnosti adsorbovat ECM proteiny jako je kolagen, vitronektin, fibronektin a laminin.¹²³ Tyto proteiny se vážou relativně ve velkých koncentracích na hydrofobní povrchy, nicméně v rigidní a denaturované formě díky intramolekulárním protein–protein interakcím a intermolekulárním interakcím protein–substrát. Toto chování negativně ovlivňuje adhezi a růst buněk. Naopak na hydrofilní povrch se proteiny z ECM mají tendenci vázat v jejich přirozené formě, což podporuje adhezi buněk. Naměřený kontaktní úhel smáčení vody na povrchu grafenu $93,3^\circ \pm 1,1^\circ$ odráží jeho hydrofobní charakter (tab. 8 a obr. 20a). Kontaktní úhel smáčení vody na povrchu GO připraveným pomocí studené plazmy byl razantně nižší ($42,9 \pm 5,9^\circ$). Toto snížení je způsobeno oxidací povrchu, díky které je povrch více hydrofilním (tab. 8 a obr. 20b).



Obr. 20. Snímky použité k určení rovnovážných kontaktních úhlů smáčení sedící kapky vody na povrchu grafenu (a), GO (b) a skla (c).⁹⁶ Copyright © RSC 2019.

Rozsah této změny lze určit určen pomocí spočítané volné povrchové energie zahrnující polární a disperzní části (viz tab. 9). Volná povrchová energie pro grafen byla $36,3 \pm 1,5$ mJ/m², zatímco pro GO $46,9 \pm 9,4$ mJ/m². Během oxidace dochází na povrchu k vytvoření kyslíkových funkčních skupin, které mají za následek zvýšení polární složky volné povrchové energie z $0,72 \pm 0,27$ mJ/m² pro grafen na $8,3 \pm 3,2$ mJ/m² pro GO. Díky úpravě pomocí studené plazmy se povrch grafenu stává hydrofilním a tudíž podporuje adhezi a růst buněk.¹¹⁸

Tab. 8: Kontaktní úhly smáčení jednotlivých kapalin pro grafen, GO a sklo měřeny metodou sedící kapky při 24°C.

vzorek	kontaktní úhly smáčení θ (°)		
	voda	diodometan	ethylenglykol
grafen	93.3 ± 1.1	47.3 ± 1.5	68.0 ± 3.3
GO	42.9 ± 5.9	40.6 ± 2.2	27.6 ± 1.4
sklo	52.6 ± 4.2	56.6 ± 1.8	44.4 ± 4.5

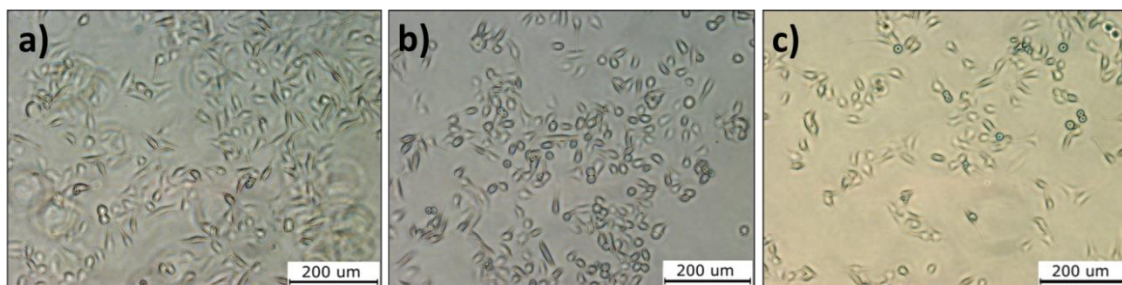
Funkční skupiny na povrchu GO umožňují vytvoření slabých vazebných interakcí (elektrostatické interakce, vodíkové můstky) s proteiny, které se nachází v ECM. Z tab. 9 je patrné, že povrch grafenu je více hydrofobní než povrch skla, nicméně grafen je lepší substrát pro adhezi buněk díky interakcím π -elektronového oblaku s hydrofobními jádry proteiny z ECM. To se projeví např. větší konfluenci po 2 denní inkubaci v porovnání se skleněným substrátem (viz. obr. 21).

Tab. 9: Celková volná povrchová energie substrátů s polárním a disperzním příspěvkem vypočítaná pomocí aproximace podle OWRK.

vzorek	volná povrchová energie (mJ/m ²)		
	celková	polární	disperzní
grafen	36.3 ± 1.5	0.7 ± 0.3	35.6 ± 1.2
GO	46.9 ± 9.4	8.3 ± 3.2	38.7 ± 5.9
sklo	43.2 ± 11.7	30.1 ± 4.5	13.2 ± 7.2

7.2.3 Impinging jet experimenty

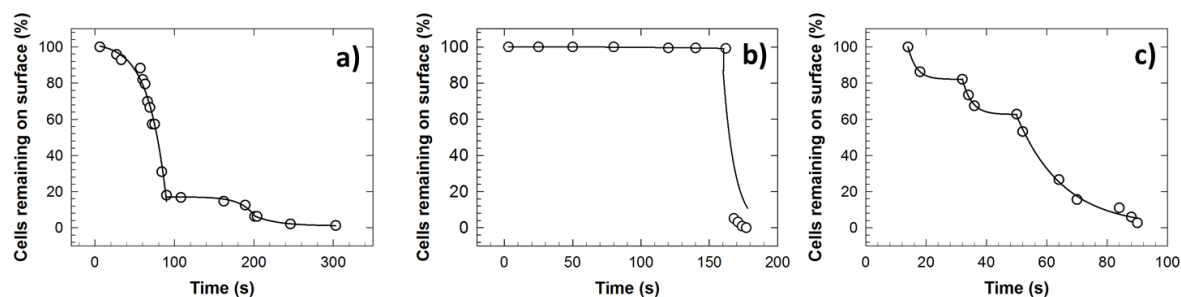
Ze snímků z optického mikroskopu zachycující růst buněk na testovaných substrátech po 48 hodinové kultivaci jsou patrné rozdíly v dosažené konfluenci pro jednotlivé substráty. Buňky dosáhly 80 % konfluence na povrchu GO, 60 % na povrchu grafenu a 40 % na povrchu skla (obr. 21). U všech sledovaných buněk lze vidět proces mitózy, který značí normální chování buněk během kultivace.



Obr. 21. HeLa buňky po 48 hodinové kultivaci na povrchu GO (a) grafenu (b) a skla (c); snímky byly pořízeny na inverzním mikroskopu Olympus IX 70 se světšením 10 x, vložené měřítko: 200 μm.⁹⁶ Copyright © RSC 2019.

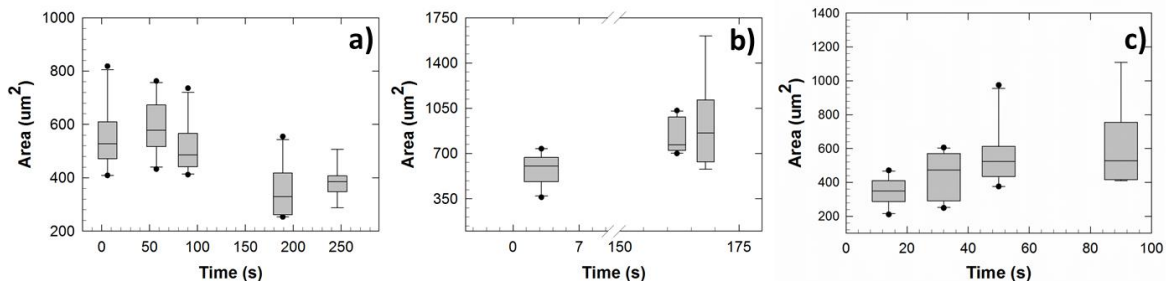
Charakterizace kinetik uvolňování adherovaných buněk na jednotlivých substrátech byla provedena pomocí metody impinging jet. Uvolňování buněk ze substrátu bylo iniciováno laminárním prouděním o $Re \approx 40.5$ odpovídajícím tangenciální síle 9,5 nN (výpočet podle rovnice 16). Čas potřebný k odtržení 80 % buněk adherovaných na povrch grafenu byl $90 \pm 8,7$ s, zatímco pro buňky adherované na skleněný substrát $68,6 \pm 6,6$ s. V případě substrátu

GO byl pozorován téměř dvojnásobný čas potřebný k uvolnění 80 % adherovaných buněk ($168 \pm 16,3$) ve srovnání s povrchem grafenu. Tyto výsledky se shodují se závěry dřívější studie, která se zabývala efektivitou GO jako substrátu pro adhezi savčích buněk.¹²⁴ Pozorované kinetiky uvolňování buněk z povrchu grafenu a skla se skládají se ze dvou kroků (obr. 22). V případě grafenu je patrný prudký pokles počtu adherovaných buněk v prvním kroku s následným poklesem rychlosti odrtu v druhém kroku. V případě povrchu skla se rychlost uvolňování razantně nemění. Naopak kinetika uvolňování buněk adherovaných na povrch GO probíhá v jednom prudkém kroku s výraznou periodou, kde odtrh buněk nebyl pozorován.



Obr. 22. Kinetiky uvolňování HeLa buněk z povrchu grafenu (a) GO (b) a skla (c). Experimenty byly prováděny s populací čítající stovky buněk⁹⁶. Copyright © RSC 2019.

Také bylo zjištěno, že na povrchu GO a skla se buňky s menší adhezní plochou uvolňují přednostně oproti buňkám s větší adhezní plochou (viz obr. 23). Lze předpokládat, že u buněk s menší adhezní plochou vzniká méně vazeb mezi buněčnými receptory a proteiny z ECM. Síla adheze tedy úměrně klesá se zmenšující se adhezní plochou buňky.¹²⁵ Odlišné chování bylo pozorováno v případě povrchu grafenu, kde se přednostně uvolňovaly buňky s větší adhezní plochou oproti buňkám s menší adhezní plochou, u kterých docházelo k uvolnění v pozdější fázi.



Obr. 23. Vztah mezi velikostí adhezní plochy buněk a jejich časem uvolnění z povrchu grafenu (a), GO (b) a skla (c).⁹⁶ Copyright © RSC 2019.

7.2.4 shrnutí

Tato studie se zabývala adhezí HeLa buněk na povrch grafenu a GO. Pro srovnání byl jako referentní materiál použit skleněný substrát. Chemické složení, morfologie a volná energie testovaných povrchů byly charakterizovány pomocí metod XPS, AFM, Ramanovy spektroskopie a měření kontaktních úhlů smáčení. Ke stanovení kinetik uvolňování HeLa buněk adherovaných na studovaných substrátech byla použita metoda impinging jet. Z výsledků experimentů je patrné, že smáčivost povrchu je jeden z klíčových faktorů určující velikost adheze. Čas potřebný pro uvolnění 80 % adherovaných buněk na povrch GO naznačuje, že je možné tento materiál použít jako substrát zesilující adhezi buněk a mohl by být potenciálně použit při konstrukci biosenzorů. Uvolnění buněk z povrchu bylo u všech testovaných substrátů iniciováno silou 9,4 nN a probíhalo ve dvou krocích v případě povrchu grafenu a skla. Jednokroková kinetika u GO s dlouhou periodou, kde nebyl odtrh buněk pozorován vůbec, pravděpodobně souvisí se silnější adhezí buněk způsobenou přítomností kyslíkových funkčních skupin na povrchu GO. Tento fenomén je patrný i u druhého kroku kinetiky uvolňování z povrchu grafenu, kde je patrné razantní snížení rychlosti uvolňování buněk, které je pravděpodobně zapříčiněno právě kyslíkovými nečistotami na povrchu grafenu. Dále bylo zjištěno, že se buňky s větší adhezní plochou na povrchu grafenu uvolňují přednostně oproti buňkám s menší adhezní plochou. Opačný trend byl pozorován v případě skla a GO.

8 Další řešená problematika

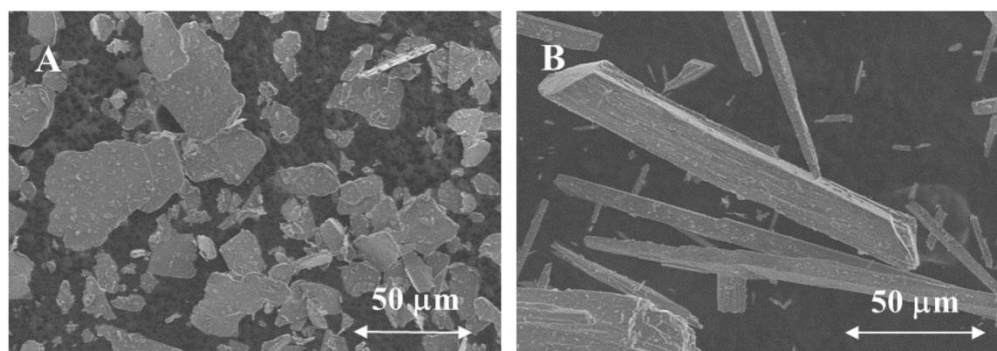
V této sekci se autor disertační práce věnuje řešeným problémům založených na pochopení mezifázových jevů na rozhraní pevná látka/pevná látka se zaměřením na vliv kohezních a adhezních sil mezi částicovým plnivem a polymerní maticí na výsledné mechanické vlastnosti polymerních kompozitů. Pro studium mezifázových jevů bylo použito mechanické deformační napětí. Experimenty byly zaměřeny na studium vlivu tvaru minerálních částicových plniv a jejich adhezi do polymerní matrice na elasticko-plastické chování kompozitních polymerů. Další část obsahuje výsledky z charakterizace kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u partikulárních látek s využitím smykové cely. Experimenty v této části byly zaměřeny na studiu tokových vlastností minerálních částicových plniv pro polymerní kompozity, mléčných produktů a kyseliny hyaluronové.

Zkoušky jednoosého namáhání pomocí deformačního napětí v tahu byly realizovány pomocí trhacího zkušebního zařízení Shimadzu AGS-X (shimadzu, Japonsko). Prášková reologie byla provedena na přístroji FT4 Powder rheometer (Freeman Technology, UK). Teplota byla pro všechny měření konstantní 23 °C s relativní vlhkostí 43 %.

8.1 Vliv tvaru minerálních plniv na mechanické chování kompozitů polyetylen/slída a polyetylen/wollastonit.

Tato studie se zabývala vlivem tvaru částic minerálních plniv na mechanické vlastnosti kompozitu připravených ze slídy a wollastonitu v matici vysokohustotního polyetylen (HDPE). Autor této disertační práce se podílel na tomto výzkumu testováním mechanických vlastností polymerních kompozitů včetně vyhodnocení výsledků. Kompozitní polymery byly připraveny kolegy z technologické fakulty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Výsledky z níže uvedených experimentů byly použity v publikaci „Effect of filler particle shape on plastic-elastic mechanical behavior of high density poly(ethylene)/mica and poly(ethylene)/wollastonite composites“ publikované v odborném impaktovaném časopise Composites part B (2018).

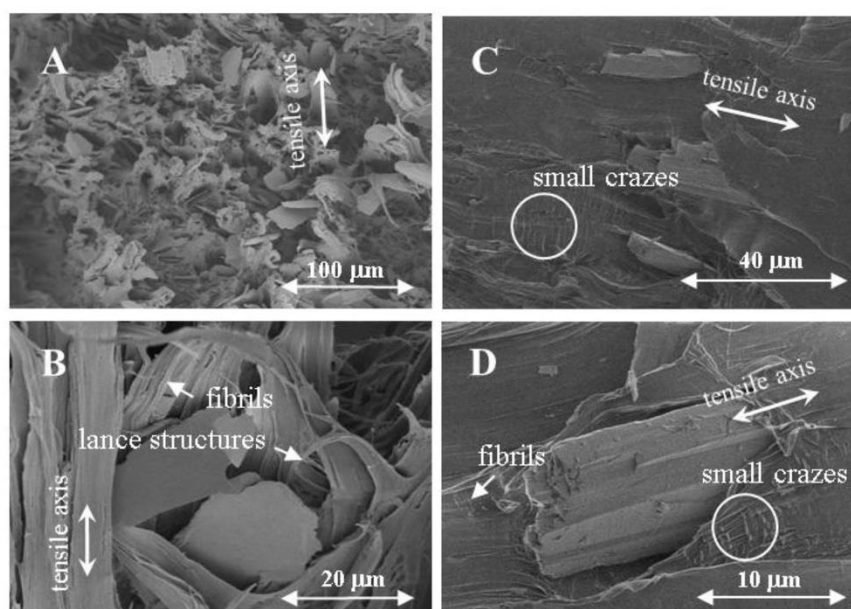
Slída se používá jako plnivo v polovodičích, izolátorech, plastech a nátěrových hmotách a patří mezi hlinitokřemičitany se složitější strukturou, která se označuje T-O-T (tetraedr-oktaedr-tetraedr). Základem planárního uspořádání jsou dvě tetraedrické sítě ve vzájemné hexagonální symetrii, mezi kterými je oktaedrická síť. Díky tomuto uspořádání vykazuje slída dokonalou štěpnost v bazální rovině. Na SEM snímku (obr. 22a) lze vidět planární nepravidelné uspořádání částic s průměrnou velikostí 30 μm a tloušťkou 1,7 μm . Wollastonit je chemickým složením křemičitan vápenatý, který se nejčastěji vyskytuje v trojklonné krystalové soustavě, má jehlicovitý tvar s průměrnou velikostí částic (150 \times 20 \times 10) μm (obr. 22b).^{126,127} V průmyslu se často používá jako pigment v nátěrových hmotách. Ve stavebním průmyslu jako náhražka azbestů nebo v metalurgickém průmyslu je přidáván do směsí ke svařování oceli. Hlavním cílem této studie bylo zjistit vliv tvaru částic wollastonitu a slídy na výsledné mechanické vlastnosti HDPE polymerního kompozitu.



Obr. 24. SEM snímky studovaných minerálních plniv: slída (A) a wollastonit (B).¹²⁸ Copyright© Elsevier 2018.

Na SEM snímcích z analýzy lomových ploch testovaných kompozitů se slídou i wollastonitem, které vznikly během pevnostních zkoušek v jednoosém tahu, lze vidět plastické deformace HDPE vláken, které jsou pro tento polymer typické a projevují se vznikem ostruh.¹²⁹ Výskyt malých dutinek kolem částic minerálních plniv během tahových zkoušek značí relativně slabou adhezi mezi částicemi a HDPE maticí při zatížení (platí pro slídu i wollastonit), (obr. 25b,d). Nicméně přítomnost puklin v okolí jednotlivých částic wollastonitu v kolmém směru vůči mechanické deformaci (vyznačeny kroužkem na obr.

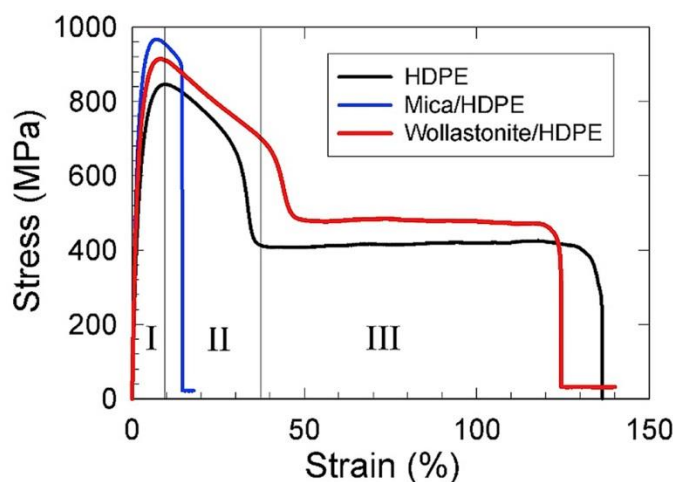
25c,d) poukazuje na silnější adhezi částic na matrici v případě kompozitu wollastonit/HDPE ve srovnání s kompozitem slída/HDPE, u kterého tyto pukliny nebyly pozorovány. Orientace šíření trhlin je nejlépe viditelná při tahových zkouškách na zkušebních tělesech typu „dog bone“ připravených technologií vstřikování plastů, u kterých trhliny vznikají ve vnitřních částech vzorku, kde jsou makromolekuly polymeru málo orientované. Tyto trhliny se pak šíří směrem ven k povrchu kompozitu, kde jsou makromolekuly polymeru orientované podélně ve směru deformace, kde se zastaví.¹³⁰



Obr. 25. SEM snímky na lomových plochách studovaných kompozitů. A, B - kompozit slída/HDPE po tahové zkoušce (koncentrace 15 % slídy). C, D – kompozit wollastonit/HDPE po tahové zkoušce (koncentrace 15 % wollastonitu); tahové zkoušky byly provedeny při rychlosti deformace 50mm/min.; na obrázku je šipkami znázorněn směr deformace v tahu (tensile axis), deformované HDPE vlákna (fibrils), vznik ostruh (lance structures) a kroužkem vyznačené trhliny (small crazes).¹²⁸ Copyright © Elsevier 2018.

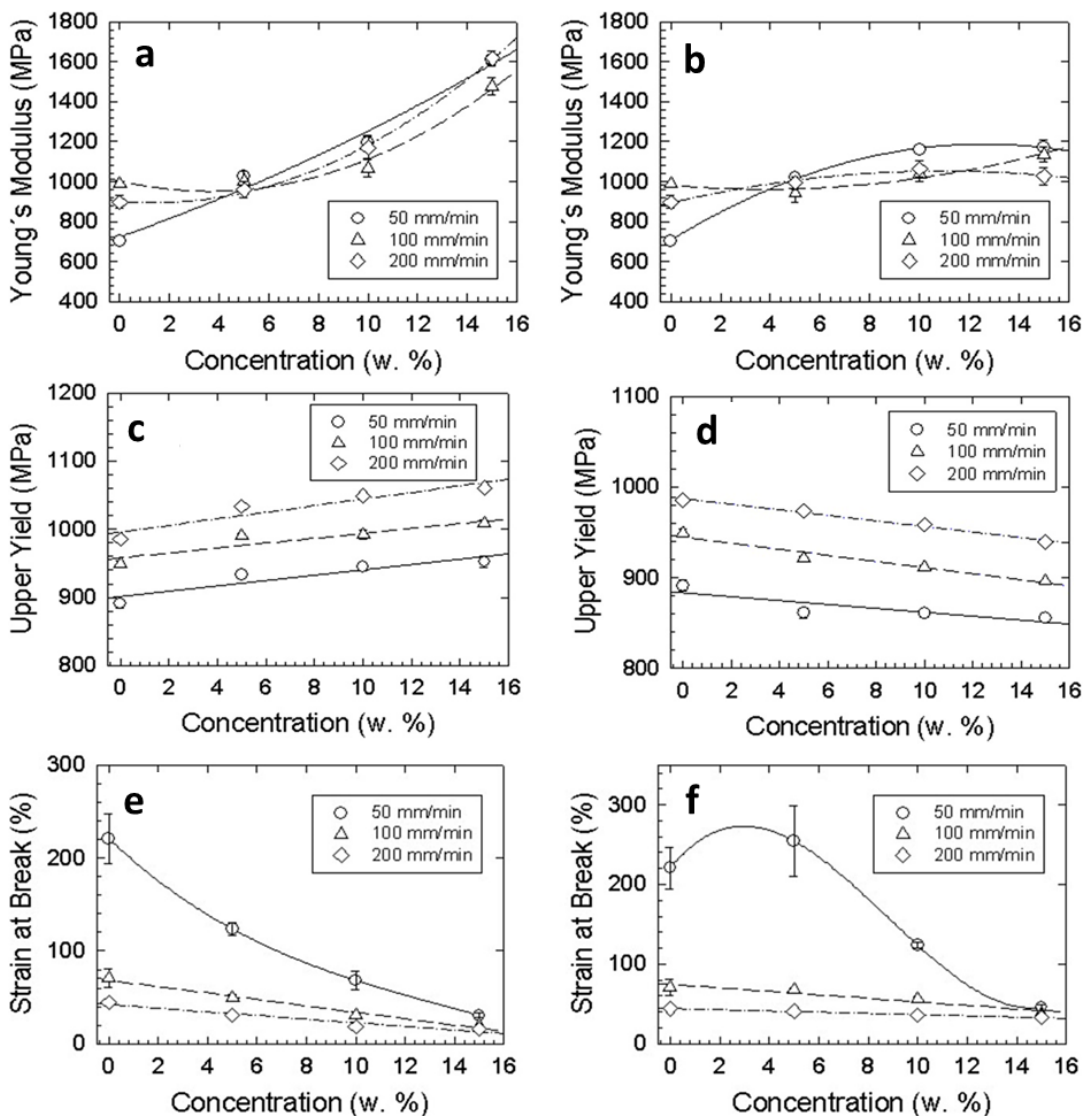
Mechanické chování testovaných kompozitů při zkouškách pevnosti v tahu je znázorněno na grafu závislosti napětí na deformaci (obr 26). Graf lze rozdělit na 3 základní oblasti, oblast I – elastické chování, oblast II – elasticko-plastické a oblast III – plastické chování.

Podobné chování lze vidět i u kompozitu HDPE s dutými kuličkami uhličitanu vápenatého.¹³¹ V případě kompozitu slída/HDPE bylo pozorováno zvýšení tuhosti a křehkosti ve srovnání s čistým HDPE a kompozitem wollastonit/HDPE s typickým elasticko–plastickým chováním.



Obr. 26. Graf závislosti napětí na deformaci zkušebního materiálu při rychlosti deformace v tahu 50 mm/min pro jednotlivé HDPE kompozity s koncentrací plniva 15 w. % Experimenty byly opakovány 10x při teplotě 22 °C.¹²⁸ Copyright © Elsevier 2018.

V případě obou typů kompozitů došlo po přidání minerálních plniv ke zvýšení Youngova modulu pružnosti v tahu při rychlosti deformace 50 mm/min (obr. 27a, 27b) z původní hodnoty 703 ± 73 MPa pro čistý HDPE na 1609 ± 93 MPa pro kompozit slída/HDPE a 1173 ± 107 MPa pro kompozit wollastonit/HDPE. Navýšení elastického chování o 129 % v případě kompozitu slída/HDPE je dáno vyšším stupněm krystalinity ve srovnání s kompozitem wollastonit/HDPE, který je více amorfni a vykazuje spíše plastické chování. Pozorované výsledky potvrdily dřívější studie v oblasti polymerních kompozitů, kde tuhá plniva zvyšují Youngův model pružnosti kompozitů úměrně s rostoucí koncentrací.^{132,133} Na obr. 27c a 27d lze vidět rozdílný vliv jednotlivých plniv na horní mez kluzu. V případě kompozitu wollastonit/HDPE dochází k navýšení horní meze kluzu se zvyšující se koncentrací wollastonitu, tento trend se shoduje s předešlou prací Liang a spol.¹³⁴



Obr. 27. Grafy znázorňující vliv koncentrace slída (a,c,e) a wollastonitu (b,d,f) na pevnostní charakteristiky kompozitů: Youngův modul pružnosti (a,b), horní mez kluzu (c,d) a prodloužení materiálu při přetržení (e,f).¹²⁸ Copyright © Elsevier 2018.

U kompozitu slída/HDPE bylo pozorováno opačné chování. Tyto výsledky potvrzují, že kompozit slída/HDPE vykazuje větší tuhost než kompozit wollastonit/HDPE. Na obr. 27e a 27f jsou znázorněny grafy závislosti koncentrace jednotlivých plniv na prodloužení materiálu při přetržení pro různé rychlosti deformace. Z výsledů pro rychlost deformace 100 a 200 mm/min je patrné lineární chování, kde zvyšování koncentrace minerálních plniv vede ke snížení výsledného protažení materiálu, což značí větší křehkost ve srovnání

s čistým HDPE. Nelineární průběh lze vidět pro rychlost deformace 50 mm/min, kde u kompozitu wollastonit/HDPE s koncentrací plniva 5 % dochází ke zvýšení výsledného protažení materiálu o 15 %. Je známo, že rychlost deformace má silný vliv na deformační proces. Energie se během plastických deformací uvolňuje především ve formě tepla. Nicméně bylo zjištěno, že při vysokých rychlostech deformace materiál podléhá spíše adiabatickému dloužení. Naopak při nižších rychlostech se při plastických deformacích uplatní izotermické dloužení materiálu.¹³⁵

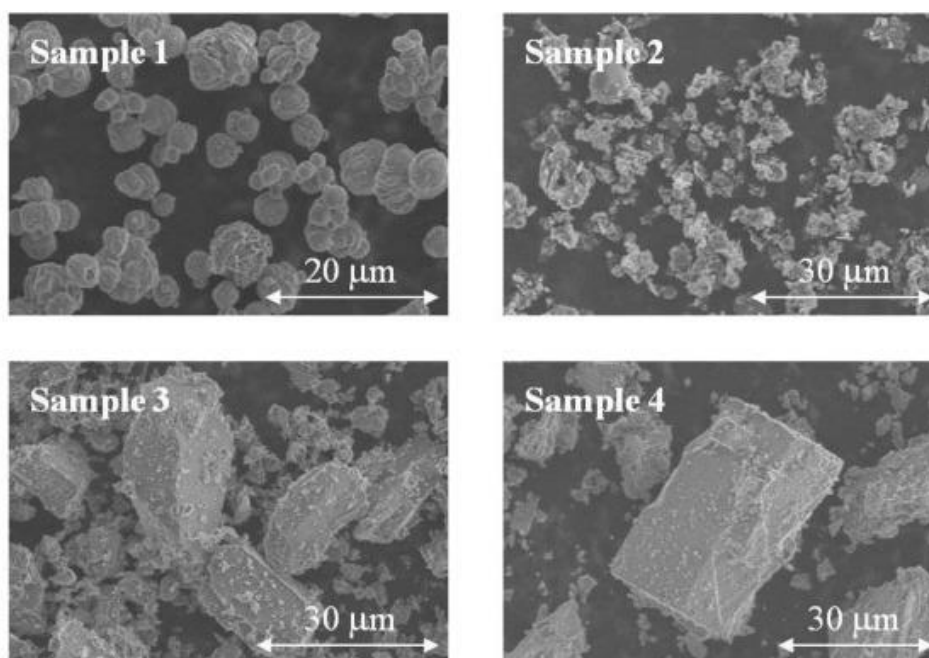
8.2 Charakterizace kohezních sil u partikulárních látek pomocí mechanického smykového napětí a aeračních testů.

V této poslední části se autor disertační práce zabývá studiem kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u práškových materiálů. K tomuto účelu byly provedeny experimenty se smykovou celou (konfigurace FT4 Freeman Technology). Autor se podílel na realizaci reologických experimentů a vyhodnocení výsledků. Výsledky z těchto experimentů pak byly použity v následujících publikacích: „Hollow spheres as nanocomposite fillers for aerospace and automotive composite materials applications“ (Composites Part B – Engineering, 2016), „Surface energy analysis (SEA) and rheology of powder milk dairy products“ (Food chemistry, 2015). V této sekci se autor zabývá pouze výsledky z práškové reologie, na kterých se podílel. Pro hlubší pochopení dané problematiky a kompletní výsledky jsou jednotlivé publikace přiloženy v sekci přílohy. Všechny experimenty byly realizovány na přístroji FT4 Freeman (Freeman Technology, UK)

8.2.1 Charakterizace reologických vlastností dutých částic uhličitanu vápenatého s možným využitím jako plnivo v kompozitních materiálech pro letecký a automobilový průmysl.

V současnosti se zvyšuje poptávka po syntetických polymerech v automobilovém a leteckém průmyslu, která je zaměřená na použití polyetyleny, polypropylenu a polyamidu jako materiály pro komponenty exteriéru, interiéru a ostatních funkčních částí dopravních prostředků.¹³⁶ Z počátku byly minerály do polymerních matric používány pro snížení výrobní ceny.¹³⁷ V důsledku vývoje technologií zpracování minerálů a nerostných surovin a nových technologií v polymerní chemii se začaly minerální plniva používat jako funkční aditiva, díky kterým kompozity získávají specifické mechanické vlastnosti.^{138–140} Přítomnost nano- a mikro-rozměrných dutých částic v kompozitech má za následek zvýšení modulu pružnosti a zvýšení absorpce energie při tlakovém zatížení.¹⁴⁰ Tato studie byla zaměřena na studiu reologického chování práškových minerálních plniv ve formě dutých

kuliček a lamelárních částic (obr. 28) pro použití v kompozitních polymerech na bázi polyolefinů.



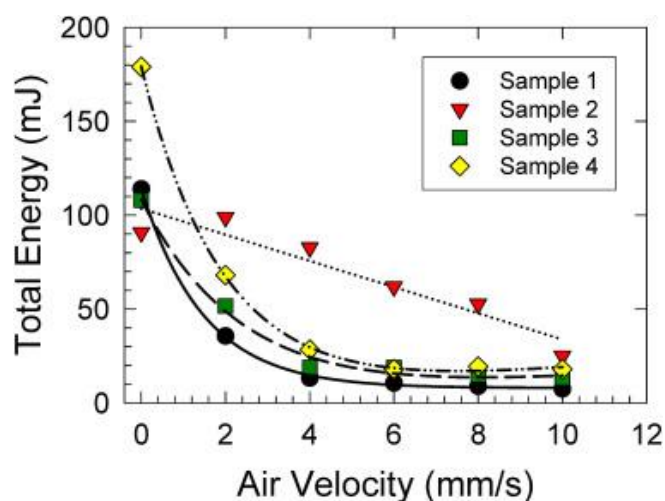
Obr. 28. SEM snímky studovaných kompozitních plniv, kde sample 1 = duté kuličky Ca_2CO_3 , sample 2 = kalcinovaný jíł, sample 3 = dolomit a sample 4 = kalcinovaný kaolin.⁹⁶ Copyright © Elsevier 2016.

Z měření aerace jednotlivých minerálů je patrné, že sférické duté kuličky díky svému aerodynamickému tvaru vykazují nejmenší hodnotu aerační energie při průtoku vzduchu 10 mm/s (7,5 mJ) a mají nejvyšší aerační poměr 15,1 ve srovnání s ostatními minerály lamelárního charakteru (aerační energie pro kalcinovaný jíł byla naměřena 25,1mJ). Vysoký aerační poměr odráží dobré fluidizační vlastnosti materiálu. Ty jsou naopak špatné u částic s nepravidelným planárním tvarem z důvodu vzniku turbulentního proudění kolem jednotlivých částic. Toto chování se pak nejvíce projevilo u kalcinovaného jílu nejnižší hodnotou aerační citlivosti (0,152). Nízká aerační citlivost je typická pro kohezni práškové materiály. Parametry jako aerační energie (AE), aerační poměr (AR), energie toku (BFE) a normalizovaná aerační citlivost (NAS) jsou shrnuty v tab. 10.

Tab. 10: Přehled výsledků z aeračních měření kde BFE značí energii toku, AE_10 aerační energii, AR je aerační poměr a NAS představuje normalizovanou aerační citlivost.

Vzorek	BFE [mJ]	AE_10 [mJ]	AR_10 [-]	NAS [s/mm]
duté kuličky	114.1	7.5	15.1	0.344
kalcinovaný jííl	90.8	25.1	3.6	0.152
dolomit	107.9	13.4	8.1	0.261
kalcin. kaolin	179.3	18.0	9.9	0.310

Poměrně silně kohézní chování kalcinovaného jííl, které je způsobeno kohezí mezi jednotlivými částicemi, se projevilo odlišným průběhem křivky v grafu závislosti celkové energie na rychlosti proudění (viz obr. 29). Výsledky z měření aerace byly následně potvrzeny experimenty se smykovou celou, kde byly zjištěny nízké hodnoty indexu toku pro kalcinovaný jííl (3,67), dolomit (3,01) a kalcinovaný kaolin (3,81). Tyto nízké hodnoty odrážející spíše kohézní charakter částic. Ve srovnání s vyšším indexem toku pro duté kuličky uhličitanu vápenatého (4,71), který je typický pro dobře tekoucí materiály.



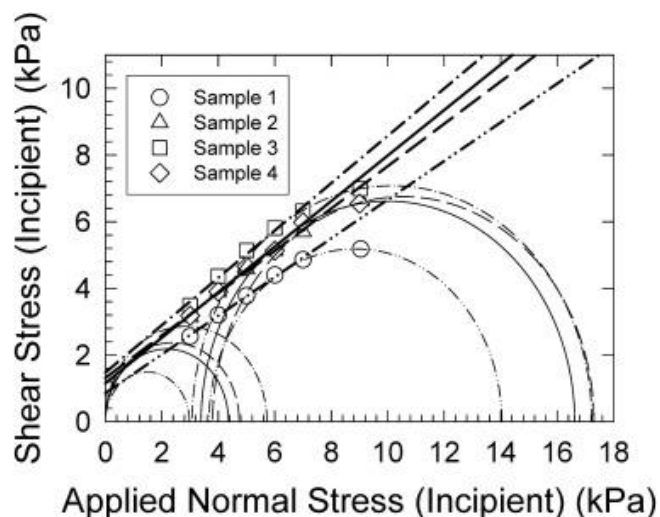
Obr. 29. Graf závislosti celkové energie (mJ) na rychlosti proudění (mm/s) pro studované vzorky kde sample 1 = duté kuličky Ca_2CO_3 , sample 2 = kalcinovaný jííl, sample 3 = dolomit a sample 4 = kalcinovaný kaolin. ⁹⁶ Copyright © Elsevier 2016.

Parametry z měření pomocí smykové cely jsou shrnuty v tabulce 11. Závislost smykového napětí na normálovém napětí se sestrojenými Mohrovými kružnicemi pro jednotlivé materiály je znázorněna na obr. 30. Kompletní výsledky z akustických měření a měření náboje zkoumaných práškových materiálů jsou dostupné v publikaci, která je přiložena v plném znění jako příloha D. Duté kuličky uhličitanu vápenatého byly následně využity pro výrobu kompozitu s HDPE.¹³¹

Tab. 11: Tabulka shrnující výsledné parametry z měření se smykovou celou, kde ff_c značí index toku, AIF je vnitřní úhel tření, BD je hustota a AIF (E) představuje efektivní úhel vnitřního tření.

Vzorek	koheze [kPa]	ff_c [-]	AIF [°]	BD [g/ml]	AIF [E] [°]
duté kuličky	0.86	4.71	30.13	1.95	35.86
kalcinovaný jíł	1.30	3.67	32.55	1.17	39.89
dolomit	1.48	3.01	35.34	1.92	44.20
kalcin. kaolin	1.15	3.81	34.53	2.36	41.39

Z výsledku je patrné, že tvar částic má velký vliv na tokové vlastnosti zkoumaných práškových minerálních plniv. Duté kuličky uhličitanu vápenatého mají charakter volně tekoucího práškového materiálu ve srovnání s lamelárními částicemi kalcinovaného kaolinu, který vykazoval kohezní charakter. Toto chování je způsobeno kohezními silami mezi jednotlivými částicemi. To bylo následně potvrzeno měřením aerace, kde v případě kalcinovaného kaolinu byla naměřena dvojnásobná hodnota aerační energie ve srovnání s částicemi uhličitanu vápenatého.

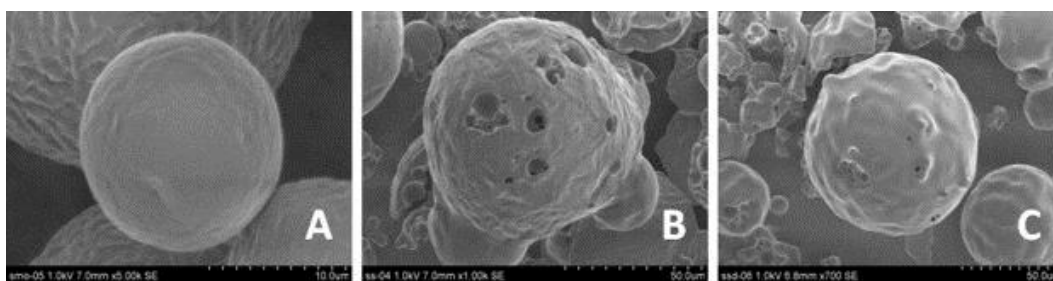


Obr. 30. Závislosti smykového napětí (τ) na normálovém napětí (σ) se sestrojenými Mohrovými kružnicemi pro studované práškové materiály: duté kuličky Ca_2CO_3 (symbol kruh), kalcinovaný jíł (symbol trojúhelník), dolomit (symbol čtverec) a kalcinovaný kaolin (symbol kosočtverec).⁹⁶ Copyright © Elsevier 2016.

8.2.2 Charakterizace reologických vlastností mléčných produktů v práškové formě

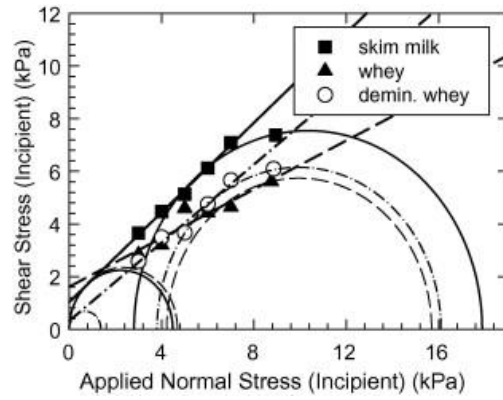
Sušené mléko je jednou z hlavních složek mnoha potravin. Koloidní povaha kravského mléka a proces zpracování jsou zásadní parametry, které mají vliv na konečnou kvalitu mléčných produktů. Tento koloidní systém může být rozdělen na dvě základní části: mléčné tuky např. Laktoglobulin a micely kaseinu. Tyto dvě složky tvoří až 80 % všech pevných látek v roztoku mléka, a proto studium struktury a interakcí mezi těmito částicemi hraje významnou roli v mlékárenském výzkumu a průmyslu. Mezi hlavní výhody sušeného mléka patří snadná doprava, možnost skladování v běžných podmínkách a mnohonásobně delší životnost ve srovnání s běžným mlékem.¹⁴¹ Dalším důležitým výrobkem z mléka vznikajícím při výrobě sýrů jako sekundární produkt je syrovátka, která obsahuje 50 % všech pevných látek obsažených v mléce.¹⁴² Surovátka a produkty se syrovátky obsahují esenciální prvky jako je vápník, hořčík, sodík, draslík, železo, zinek a měď a používají se v nízkokalorických potravinách, produktech pro kojence, krmivech pro zvířata nebo cukrovinách. Surová syrovátka a produkty z ní (demineralizovaná syrovátka, laktóza, koncentrovaná syrovátka apod.) se pak nejčastěji uchovávají v práškové formě.¹⁴³

Výsledky z práškové reologie měřené pomocí smykové cely spolu s doplněnými výsledky z aeračních měření byly použity jako součást výsledků v publikaci (příloha E) zaměřené na charakterizaci reologického chování, stanovení volné povrchové energie a jejich komponent (disperzní a polární část) a termické vlastnosti odstředěného mléka, syrovátky a demineralizované syrovátky v práškové formě. Na snímcích se SEM lze vidět kulovitý charakter částic s poloměrem 15 μm pro laktózu, 80 μm pro syrovátku a 88 μm pro demineralizovanou syrovátku (obr. 31).



Obr. 31. SEM snímky studovaných práškových materiálů: odstředěné mléko (A), syrovátka (B) a demineralizovaná syrovátka (C).¹⁴⁴ Copyright © Elsevier 2015.

Výsledky reologických měření pomocí smykové cely studovaných mléčných produktů jsou znázorněny na obr. 32, který znázorňuje graf závislosti smykového napětí (τ) na normálovém napětí (σ) se sestavenými Mohrovými kružnicemi. Z výsledků je patrné, že demineralizovaná syrovátka je volně tekoucí materiál charakterizovaný nízkým indexem toku $ff_c = 11,7$. Naopak naměřené nižší hodnoty indexu toku ff_c v případě odstředěného mléka (3,3) a syrovátky (4,5) ukazují na spíše kohezní chování resp. dobře tekoucí charakter v případě syrovátky. Hodnoty indexů toků jsou v souladu s naměřenými hodnoty prostých mezí kluzu (σ_c): 1,37 kPa pro demineralizovanou syrovátku; 4,48 kPa pro syrovátku a 4,63 kPa pro odstředěné mléko. Výsledky z aeračních měření ukázaly, že nejlepší fluidizační vlastnosti byly zjištěny v případě syrovátky, u které byla naměřena aerační energie AE (energie potřebná k fluidizaci vzorku) 4,8 mJ a aerační poměr $AR = 32,4$. Naopak nejhorší fluidizační vlastnosti byly zjištěny v případě odstředěného mléka, pro které byla AE naměřena 14,4 mJ ($AR = 8,98$).



Obr. 32. Závislosti smykového napětí (τ) na normálovém napětí (σ) se sestrojenými Mohrovými kružnicemi pro studované práškové materiály: odstředěné mléko (skim milk), syrovátka (whey) a demineralizovaná syrovátka (demin. whey).¹⁴⁴ Copyright © Elsevier 2015.

9 Závěr

Cílem této práce bylo pochopení a popsáním fyzikálně-chemických jevů ovlivňující adsorpci a desorpci částic a biologických entit jako např. buněk na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka. Pro tento účel byl upraven a realizován systém na bázi techniky impinging jet pro měření kinetik depozice a uvolňování částic pomocí laminárního toku v okolí stagnačního bodu. V rámci této problematiky byl testován vliv topografie povrchu polymeru (Zeonoru) upraveného nano-embosováním dvěma rozdílnými vzory. Získané kinetiky depozice modelových polystyrenových latexových částic na takto upravené povrchy ukázaly, že nano-embosování silně ovlivňuje aktivitu povrchu. I přes zvýšení volné povrchové energie v důsledku nano-embosování bylo pozorováno výrazné snížení rychlosti depozice a celkového počtu deponovaných částic ve srovnání s nemodifikovaným povrchem polymeru. Tento jev je pravděpodobně způsobený hydrodynamickou fokusací v kapalně vrstvě v těsné blízkosti nad povrchem polymeru. V rámci studia odtrhávání HeLa buněk adherovaných na 2D-uhlíkaté nanomateriály pomocí techniky impinging jet byl sledován vliv chemického složení, morfologie a smáčení testovaných povrchů na adhezi buněk. Z Výsledků je patrné, že kyslíkové funkční skupiny na povrchu GO zesilují adhezi HeLa buněk. Získané kinetiky uvolňování buněk naznačují, že se GO jeví jako potenciálně vhodný substrát zesilující adhezi buněk pro konstrukci biosenzorů.

V další části předložené práce byl zkoumán vliv tvaru a adheze částicových minerálních plniv do polymerní matrice na mechanické vlastnosti polymerních kompozitů pomocí jednoosého namáhání v tahu. Z výsledků je patrné, že adheze částicových plniv do polymerní matrice HDPE silně ovlivňuje plasticko-elastické chování kompozitu. V případě kompozitů slída/HDPE a wollastonite/HDPE došlo v obou případech k navýšení Youngova modulu pružnosti přímo úměrně se zvětšující se koncentrací jednotlivých plniv. V případě kompozitu slída/HDPE došlo také k navýšení horní meze kluzu spolu s rapidním snížením prodloužení materiálu při přetržení, což značí vyšší tuhost a křehkost materiálů ve srovnání s čistým HDPE a kompozitem wollastonite/HDPE.

Součástí předložené práce bylo také studium vlivu kohezních sil mezi částicemi partikulárních látek na fázovém rozhraní pevná látka/plyn na tokové vlastnosti testovaných

práškových materiálů. V rámci této problematiky byl pomocí mechanického smyku a aeračních testů zkoumán vliv kohezních sil na tokové vlastnosti partikulárních látek. Experimenty byly zaměřeny na studium minerálních částicových plniv s možným využitím v polymerních kompozitech, charakterizaci tokových vlastností mléčných produktů jako je syrovátka a sušené mléko.

Výsledky z této disertační práce jsou podrobně popsány v sekci řešené problémy. Poznatky získané během experimentální práce pomocí techniky impinging jet přinášejí nové poznatky v oblasti interakcí 2D-uhlíkových nanomateriálů s buňkami a v oblasti vlivu topografie povrchu a nanodrsnosti polymerů na depozici částic. Dále byly prohloubeny dosavadní poznatky z oblasti polymerních částicových kompozitů se zaměřením na vliv adheze minerálních částicových plniv do polymerní matrice HDPE. Lze tedy konstatovat, že autor práce splnil vytyčené cíle. Všechny výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech, které jsou uvedeny v plném znění v sekci přílohy.

10 Summary

The aim of this thesis was to understand and describe the influence of the physicochemical phenomena on particle deposition and cell detachment processes on the solid/liquid phase interface. For this purpose, a system based on an impinging jet technique for the measuring deposition and detachment kinetics induced by laminar flow near stagnation point was adjusted and implemented. The influence of the topography of the Zeonor surface, modified by nano-embossing by two different templates, was tested. Obtained kinetics of the polystyrene latex particles deposition on modified Zeonor surface have shown, that nano-embossing significantly influenced the activity of the surface. Despite the fact, that embossing of the Zeonor surface caused increasing of the SFE, a decrease of the total number of deposited particles and lower deposition rates were observed in comparison to the virgin Zeonor surfaces. This phenomenon is probably caused by hydrodynamic focusing in a thin liquid layer above the Zeonor surface. Another study was focused on HeLa cells adhesion on 2D carbon-based nanomaterials with focus on the influence of the surface chemical composition, surface topology and surface wetting on the cell adhesion. According to results, it is evident, that oxygen-containing functional groups on GO surface enhanced cell adhesion. Obtained detachment kinetics indicate, that GO is a potent cell adhesion enhancer and could be used as a substrate for the construction of biosensors.

In the next part of the thesis, the effect of the mineral filler shape, size and adhesion into the polymer matrix was studied. This research was focused on the impact of the mineral fillers on the mechanical properties of HDPE composites by means of uniaxial stress testing. Results show that the adhesion of mineral fillers to the HDPE polymer matrix strongly influenced the plastic-elastic behaviour of the composite. The increase of mica/HDPE and wollastonite/HDPE of Young's modulus of elasticity was observed. In both cases, increasing was in proportion to the increasing concentration of the individual filler. In the case of the mica/HDPE composites an increase of the upper yield strength and rapid reduction of the elongation at break was observed. This behaviour indicates higher stiffness and brittleness of the material compared to the virgin HDPE and wollastonite/HDPE composite. In the case of the mica / HDPE composite, the upper yield strength also

increased, together with a rapid reduction in elongation of the breakage material, indicating higher stiffness and brittleness of the materials compared to pure HDPE and wollastonite/HDPE composites. Part of this thesis was also focused on the research of the influence of cohesive forces study in bulk solids on the flow properties of the tested powder materials. For this purpose, mechanical shear stress and aeration tests were used. Experiments were focused on the study of mineral fillers with possible use in polymer composites, characterization of flow properties of dairy products such as whey and dried milk.

Complete results are well described and discussed in the section solved problems on page 42. Experiments using impinging jet technique bring a new finding in the field of interactions of 2D-carbon based nanomaterials with HeLa cells and in the field of the surface nanoroughness impact on particle deposition process. Furthermore, understanding of the mineral filler adhesion to the polymer matrix impact on the mechanical properties of polymer composites was enhanced. In conclusion the author achieved the main aims of this thesis. All results, which are listed in the appendix section, were published in impact journals.

11 Seznam zkratek

RIJ	radialní impinging jet (z angl. radial impinging jet)
Re	Reynoldovo číslo
Sh	Sherwoodovo číslo
GO	grafen oxid
G	grafen
ECM	extracelulární matrix
AFM	mikroskopie atomárních sil (z angl. atomic force microscopy)
PP	polypropylen
PET	polyethylentereftalát
LDPE	nízkohustotní polyethylen (z angl. low density polyethylene)
HDPE	vysokohustotní polyethylen (z angl. high density polyethylene)
LLDPE	lineární nízkohustotní polyethylen (z angl. linear low density polyethylene)
RCPTM	regionální centrum pokročilých technologií a materiálů
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
EG	ethylenglykol
DMSO	dimethylsulfoxid
GL	glycerol
SPM	mikroskopie skenující sondou (z angl. scanning probe microscopy)
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie (z angl. X-ray photoelectron spectroscopy)
OWRK	Owens, Wendt, Rabel a Kaelble
CCD	snímací zařízení s vázanými náboji (z angl. charged-coupled device)
AE	aerační energie
AR	aerační poměr (z angl. aeration ratio)

BFE	základní energie toku (z angl. basic flowability energy)
NAS	normalizovaná aerační citlivost (z angl. normalized aeration sensitivity)
HA	hyaluronic acid
SFE	volná povrchová energie (z angl. surface free energy)

12 Seznam publikací

1. **J. Vlček**, L. Lapčík, J. Čech, B. Lapčíková: Impinging jet study of the deposition of colloidal particles on synthetic polymer (Zeonor), *International Journal of Heat and Mass Transfer* 78 (2014), 416-422. (IF = 3,891) **Příloha A**
2. L. Lapčík, B. Lapčíková, E. Otyepková, M. Otyepka, **J. Vlček**, F. Buňka, R. Salek: Surface energy analysis (SEA) and rheology of powder milk dairy products, *Food Chemistry* 147 (2015), 25-30. (IF = 4,946) **Příloha E**
3. L. Lapčík, M. Ruzsala, M. Vašina, B. Lapčíková, **J. Vlček**, N. Rowson, R. Greenwood: Hollow spheres as nanocomposite fillers for aerospace and automotive composite materials applications, *Composites Part B: Engineering* 106 (2016), 74–80. (IF = 4,92) **Příloha D**
4. L. Lapčík, D. Mañas, B. Lapčíková, M. Vašina, M. Staněk, K. Čépe, **J. Vlček**, K. E. Waters, N. Rowson, R. Greenwood: Effect of filler particle shape on plastic-elastic mechanical behavior of high density poly(ethylene)/mica and poly(ethylene)/wollastonite composites, *Composites Part B: Engineering* 141 (2018), 92-99. (IF = 4,92) **Příloha C**
5. **J. Vlček**, L. Lapčík, M. Havrdová, V. Poláková, B. Lapčíková, T. Opletal, J. Froning, M. Otyepka: Flow induced HeLa cell detachment kinetics show that oxygen-containing functional groups in graphene oxide are potent cell adhesion enhancers, *Nanoscale* 11(2019), 3222-3228. (IF = 7,23) **Příloha B**
6. Kapitola v knize: *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications* – Smithers Rapra publishing; L. Lapčík, E. Otyepková, B. Lapčíková, M. Otyepka, **J. Vlček**, I. Kupská: Hyaluronic acid powder physico-chemical analysis for cosmetic and pharmaceutical processing, Smithers Rapra, 2014, Shrewsbury, UK.

13 Použitá literatura

- 1 M. Kamiti, *Colloids and Surfaces*, 1995, **100**, 117–129.
- 2 K. J. Kubiak, M. C. T. Wilson, T. G. Mathia and P. Carval, *Wear*, 2011, **271**, 523–528.
- 3 D. Y. Kwok, D. Li and A. W. Neumann, *Langmuir*, 1994, **10**, 1323–1328.
- 4 X. Jiang, M. Tong, H. Li and K. Yang, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **350**, 427–434.
- 5 R. A. W. M. Elimelech, J. Gregory, X. Jia, *Particle deposition and aggregation: measurement, modelling and simulation*. Butterworth-Heinemann, 1995.
- 6 N. M. Markovic, K. J. J. Mayrhofer, V. Stamenkovic, B. B. Blizanac, M. Arenz and D. Strmcnik, *Electrochim. Acta*, 2007, **53**, 3181–3188.
- 7 T. Dąbroś and T. G. . Van De Ven, *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, **89**, 232–244.
- 8 T. Dabroś and T. G. M. van de Ven, *Colloid Polym. Sci.*, 1983, **261**, 694–707.
- 9 Z. Xia, H. L. Goldsmith and T. G. van de Ven, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 1073–1083.
- 10 Z. Adamczyk, B. Siwek and P. Warszyński, *J. Colloid Interface Sci.*, 2002, **248**, 244–254.
- 11 J. Vlček, L. Lapčík, J. Čech and B. Lapčíková, *Int. J. Heat Mass Transf.*, 2014, **78**, 416–422.
- 12 Z. Adamczyk, B. Siwek, M. Zembala and P. Warszyński, *J. Colloid Interface Sci.*, 1989, **130**, 578–587.
- 13 L. Lapčík, M. Fraščík and B. Lapčíková, *Int. J. Heat Mass Transf.*, 2012, **55**, 1513–1518.
- 14 Z. Adamczyk, L. Szyk and P. Warszyński, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **209**, 350–361.

- 15 M. Polverari and T. G. M. van de Ven, *Langmuir*, 1995, **11**, 1870–1876.
- 16 Z. Adamczyk, L. Szyk and P. Warszyński, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 1993, **75**, 185–193.
- 17 Z. Adamczyk, E. Musiał and B. Siwek, *J. Colloid Interface Sci.*, 2004, **269**, 53–61.
- 18 Z. Zbigniew Adamczyk, *Particles at interfaces : interactions, deposition, structure*, Elsevier/ Academic Press, 2006.
- 19 M. Kamiti and T. G. M. van de Ven, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 1995, **100**, 117–129.
- 20 K. Friedrich, S. Fakirov and Z. Zhang, *Polymer composites : from nano-to-macro-scale*, Springer, 2005.
- 21 T. G. M. van de Ven and S. J. Kelemen, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, **181**, 118–123.
- 22 M. A. Hubbe, *Colloids and Surfaces*, 1987, **25**, 325–339.
- 23 M. A. Hubbe, *Colloids and Surfaces*, 1985, **16**, 249–270.
- 24 M. A. Hubbe, *Colloids and Surfaces*, 1985, **16**, 227–248.
- 25 S. Varennes and T. G. M. Van De Ven, *Colloids and Surfaces*, 1988, **33**, 63–74.
- 26 J. Visser, *J. Colloid Interface Sci.*, 1970, **34**, 26–31.
- 27 W. Smith and J. A. Kitchener, *Chem Eng Sci*, 1978, **33**, 1631–1636.
- 28 Z. Xia, H. L. Goldsmith and T. G. van de Ven, *Biophys. J.*, 1994, **66**, 1222–1230.
- 29 J. Zheng, L. Li, H. K. Tsao, Y. J. Sheng, S. Chen and S. Jiang, *Biophys. J.*, 2005, **89**, 158–166.
- 30 B. M. Gumbiner, *Cell*, 1996, **84**, 345–357.
- 31 K. I. Nishijima, T. Fujiki, H. Kojima and S. Iijima, *Cytotechnology*, 2000, **33**, 147–155.

- 32 M. Suzanne and H. Steller, *J. Biol.*, 2009, **8**, 49.
- 33 H.-Y. Chang, C.-C. Huang, K.-Y. Lin, W.-L. Kao, H.-Y. Liao, Y.-W. You, J.-H. Lin, Y.-T. Kuo, D.-Y. Kuo and J.-J. Shyue, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 14464–14470.
- 34 N. Nath, J. Hyun, H. Ma and A. Chilkoti, in *Surface Science*, 2004, vol. 570, pp. 98–110.
- 35 L. Bačáková, V. Mareš, M. Grazia Bottone, C. Pellicciari, V. Lisá and V. Švorčík, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **49**, 369–379.
- 36 J. G. Steele, G. Johnson and P. A. Underwood, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1992, **26**, 861–884.
- 37 F. Grinnell and M. K. Feld, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 4888–4893.
- 38 M. M. Kozlov, *Nature*, 2010, **463**, 439–440.
- 39 D. (David) Colman, *Advances in molecular and cell biology. Volume 16, Cell adhesion*, JAI Press, 1996.
- 40 A. J. Garcia, M. D. Vega and D. Boettiger, *Mol. Biol. Cell*, 1999, **10**, 785–798.
- 41 S. Huang, C. S. Chen and D. E. Ingber, *Mol. Biol. Cell*, 1998, **9**, 3179–3193.
- 42 W. Song and J. F. Mano, *Soft Matter*, 2013, **9**, 2985–2999.
- 43 A. K. Pannier, B. C. Anderson and L. D. Shea, *Acta Biomater.*, 2005, **1**, 511–522.
- 44 L. Bačáková, E. Filová, M. Pařízek, T. Ruml and V. Švorčík, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 739–767.
- 45 T. Ishizaki, N. Saito and O. Takai, *Langmuir*, 2010, **26**, 8147–8154.
- 46 Y. Arima and H. Iwata, *Biomaterials*, 2007, **28**, 3074–3082.
- 47 T. G. Ruardy, J. M. Schakenraad, H. C. van der Mei and H. J. Busscher, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995, **29**, 1415–1423.
- 48 L. Jin, Z. Zeng, S. Kuddannaya, D. Yue, J. Bao, Z. Wang and Y. Zhang, *J. Mater.*

Chem. B, 2015, **3**, 4338–4344.

- 49 G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran and B. D. Boyan, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2005, **74**, 49–58.
- 50 H. J. Kim, S. H. Kim, M. S. Kim, E. J. Lee, H. G. Oh, W. M. Oh, S. W. Park, W. J. Kim, G. J. Lee, N. G. Choi, J. T. Koh, D. B. Dinh, R. R. Hardin, K. Johnson, V. L. Sylvia, J. P. Schmitz and D. D. Dean, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2005, **74A**, 366–373.
- 51 S. H. Lim, X. Y. Liu, H. Song, K. J. Yarema and H. Q. Mao, *Biomaterials*, 2010, **31**, 9031–9039.
- 52 A. M. Loye, E. R. Kinser, S. Bensouda, M. Shayan, R. Davis, R. Wang, Z. Chen, U. D. Schwarz, J. Schroers and T. R. Kyriakides, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 8758.
- 53 G. K. Thakral, R. Thakral, N. Sharma, J. Seth and P. Vashisht, *J. Clin. Diagnostic Res.*, 2014, **8**, 7–10.
- 54 D. Karazisis, A. M. Ballo, S. Petronis, H. Agheli, L. Emanuelsson, P. Thomsen and O. Omar, *Int. J. Nanomedicine*, 2016, **11**, 1367–1382.
- 55 P. L. Johansen, F. Fenaroli, L. Evensen, G. Griffiths and G. Koster, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 1–8.
- 56 C. D. Reyes and A. J. García, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2003, **67A**, 328–333.
- 57 G. A. Truskey and J. S. Pirone, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, **24**, 1333–1353.
- 58 S. C. Kuo and D. A. Lauffenburger, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 2191–2200.
- 59 R. S. Cargill, K. C. Dee and S. Malcolm, *Biomaterials*, 1999, **20**, 2417–2425.
- 60 L. Liu, L. H. Klausen and M. Dong, *Nano Today*, 2018, **23**, 40–58.
- 61 S. Some, A. R. Gwon, E. Hwang, G. H. Bahn, Y. Yoon, Y. Kim, S. H. Kim, S. Bak, J. Yang, D. G. Jo and H. Lee, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 1–9.

- 62 V. Georgakilas, J. N. Tiwari, K. C. Kemp, J. A. Perman, A. B. Bourlinos, K. S. Kim and R. Zbořil, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 5464–5519.
- 63 J. Liu, L. Cui and D. Losic, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 9243–9257.
- 64 Z. Zhang, L. H. Klausen, M. Chen and M. Dong, *Small*, 2018, **14**, 1801983.
- 65 E. Nishida, H. Miyaji, A. Kato, H. Takita, T. Iwanaga, T. Momose, K. Ogawa, S. Murakami, T. Sugaya and M. Kawanami, *Int. J. Nanomedicine*, 2016, **11**, 2265–2277.
- 66 E. Morales-Narváez, A. R. Hassan and A. Merkoçi, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2013, **52**, 13779–13783.
- 67 A. M. H. Ng, Kenry, C. Teck Lim, H. Y. Low and K. P. Loh, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **65**, 265–273.
- 68 L. Gao, C. Lian, Y. Zhou, L. Yan, Q. Li, C. Zhang, L. Chen and K. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **60**, 22–29.
- 69 X. Yu, H. Cheng, M. Zhang, Y. Zhao, L. Qu and G. Shi, *Nat. Rev. Mater.*, 2017, **2**, 1–14.
- 70 Z. Zhang, R. Xu, Z. Wang, M. Dong, B. Cui and M. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 34736–34743.
- 71 Y. A. Cheon, J. H. Bae and B. G. Chung, *Langmuir*, 2016, **32**, 2731–2736.
- 72 Y. Zeng, Z. Yang, H. Li, Y. Hao, C. Liu, L. Zhu, J. Liu, B. Lu and R. Li, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1–10.
- 73 K. Yang, L. Feng, X. Shi and Z. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 530–47.
- 74 X. Huang, Z. Yin, S. Wu, X. Qi, Q. He, Q. Zhang, Q. Yan, F. Boey and H. Zhang, *Small*, 2011, **7**, 1876–1902.
- 75 A. K. Geim and K. S. Novoselov, *Nat. Mater.*, 2007, **6**, 183–191.

- 76 M. Allen, *Am. Chem. Soc.*, 2009, 184.
- 77 S. H. Ku, M. Lee and C. B. Park, *Adv. Healthc. Mater.*, 2013, 2, 244–260.
- 78 S. Priyadarsini, S. Mohanty, S. Mukherjee, S. Basu and M. Mishra, *J. Nanostructure Chem.*, 2018, 8, 123–137.
- 79 R. Guazzo, C. Gardin, G. Bellin, L. Sbricoli, L. Ferroni, F. Ludovichetti, A. Piattelli, I. Antoniac, E. Bressan and B. Zavan, *Nanomaterials*, 2018, 8, 349.
- 80 Kenry, P. K. Chaudhuri, K. P. Loh and C. T. Lim, *ACS Nano*, 2016, 10, 3424–3434.
- 81 K. C. Lin, M. W. Lin, M. N. Hsu, G. Yu-Chen, Y. C. Chao, H. Y. Tuan, C. S. Chiang and Y. C. Hu, *Theranostics*, 2018, 8, 2477–2487.
- 82 J.-T. Jeong, M.-K. Choi, Y. Sim, J.-T. Lim, G.-S. Kim, M.-J. Seong, J.-H. Hyung, K. S. Kim, A. Umar and S.-K. Lee, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 33835.
- 83 J. Lee, J. Kim, S. Kim and D. H. Min, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, 105, 275–287.
- 84 N. Mauro, C. Scialabba, G. Pitarresi and G. Giammona, *Int. J. Pharm.*, 2017, 526, 167–177.
- 85 S. Wang, H. Wang, J. Jiao, K. J. Chen, G. E. Owens, K. I. Kamei, J. Sun, D. J. Sherman, C. P. Behrenbruch, H. Wu and H. R. Tseng, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2009, 48, 8970–8973.
- 86 T. Naganuma, *Nanoscale*, 2017, 9, 13171–13186.
- 87 W. C. Lee, C. H. Y. X. Lim, H. Shi, L. A. L. Tang, Y. Wang, C. T. Lim and K. P. Loh, *ACS Nano*, , DOI:10.1021/nn202190c.
- 88 S.-R. Ryoo, Y.-K. Kim, M.-H. Kim and D.-H. Min, *ACS Nano*, 2010, 4, 6587–6598.
- 89 M. Kalbáčová, A. Brož, J. Kong and M. Kalbac, *Carbon N. Y.*, 2010, 48, 4323–4329.
- 90 O. N. Ruiz, K. A. S. Fernando, B. Wang, N. A. Brown, P. G. Luo, N. D. McNamara, M. Vangsness, Y.-P. Sun and C. E. Bunker, *ACS Nano*, 2011, 5, 8100–8107.

- 91 S. Agarwal, X. Zhou, F. Ye, Q. He, G. C. K. Chen, J. Soo, F. Boey, H. Zhang and P. Chen, *Langmuir*, 2010, **26**, 2244–2247.
- 92 G. Tweedale, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**, 311–314.
- 93 M. Durst, L. Gissmann, H. Ikenberg and H. zur Hausen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1983, **80**, 3812–3815.
- 94 R. A. Weiss, *Cell*, 2008, **135**, 983–986.
- 95 S. A. M. Shazly, M. H. Murad, S. C. Dowdy, B. S. Gostout and A. O. Famuyide, *Gynecol. Oncol.*, 2015, **138**, 457–471.
- 96 J. Vlček, L. Lapčík, M. Havrdová, K. Poláková, B. Lapčíková, T. Opletal, J. P. Froning and M. Otyepka, *Nanoscale*, 2019, **11**, 3222–3228.
- 97 D. Schulze, J. Schwedes and J. W. Carson, *Powders and bulk solids: Behavior, characterization, storage and flow*, Springer, 2008.
- 98 D. McGlinchey, *Characterisation of bulk solids*, Blackwell, 2005.
- 99 X. Y. Lu, L. Chen, C. Y. Wu, H. K. Chan and T. Freeman, *Materials (Basel)*, 2017, **10**, 592.
- 100 T. Freeman, K. Brockbank and B. Armstrong, in *Procedia Engineering*, 2015, vol. 102, pp. 35–44.
- 101 W. Nan, M. Ghadiri and Y. Wang, *Chem. Eng. Sci.*, 2017, **173**, 374–383.
- 102 C. Xu and J. Zhu, *Powder Technol.*, 2006, **161**, 135–144.
- 103 X. Fu, D. Huck, L. Makein, B. Armstrong, U. Willen and T. Freeman, *Particuology*, 2012, **10**, 203–208.
- 104 Q. Li, V. Rudolph, B. Weigl and A. Earl, *Int. J. Pharm.*, 2004, **280**, 77–93.
- 105 W. Nan, M. Ghadiri and Y. Wang, *Chem. Eng. Sci.*, 2017, **162**, 141–151.
- 106 R. Freeman, *Powder Technol.*, 2007, **174**, 25–33.

- 107 L. Lapčík and M. Raab, *Nauka o materiálech II*, Univerzita Tomáše Bati, 2004.
- 108 G. Wypych, *Pigment Resin Technol.*, DOI:10.1108/prt.1999.12928bae.002.
- 109 V. K. Thakur, M. K. Thakur and R. K. Gupta, *Hybrid polymer composite materials: Structure and chemistry*, 2017.
- 110 R. N. Rotheron, *Particulate-Filled Polymer Composites*, Rapra Technology, 2003.
- 111 J. J. Cheng, *Methods*, 2008, 302.
- 112 J. J. Cheng, *Methods*, 2008, 302.
- 113 A. J. Peacock, *Handbook of Polyethylene Structures, Properties, and Applications*, Marcel Dekker, 2000.
- 114 J. A. Alvarado-Contreras, *Micromechanical Modeling of Polyethylene*, University of Waterloo, 2007.
- 115 Z. Adamczyk, B. Siwek, P. Warszyński and E. Musiał, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **242**, 14–24.
- 116 M. R. Ferrick, J. Murtagh and J. K. Thomas, *Macromolecules*, 1989, **22**, 1515–1517.
- 117 D. K. Owens and R. C. Wendt, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1969, **13**, 1741–1747.
- 118 L. Bačáková, E. Filová, M. Pařízek, T. Ruml and V. Švorčík, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 739–767.
- 119 K. Krishnamoorthy, M. Veerapandian, K. Yun and S.-J. Kim, *Carbon N. Y.*, 2013, **53**, 38–49.
- 120 Z. Ni, Y. Wang, T. Yu and Z. Shen, *Nano Res.*, 2008, **1**, 273–291.
- 121 K. Vijayarangamuthu, S. Ahn, H. Seo, S.-H. Yoon, C.-M. Park and K.-J. Jeon, *Adv. Mater.*, 2016, **28**, 661–667.
- 122 M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, L. G. Cançado, A. Jorio and R. Saito, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 1276–1290.

- 123 L. Bachkova, V. Rybka, I. Miecz, V. Hnatowicz and F. Kocourek, 1996, **17**, 1121–1126.
- 124 O. N. Ruiz, K. A. S. Fernando, B. Wang, N. A. Brown, P. G. Luo, N. D. McNamara, M. Vangsness, Y. P. Sun and C. E. Bunker, *ACS Nano*, , DOI:10.1021/nm202699t.
- 125 G. Truskey and T. Proulx, *Biomaterials*, 1993, **14**, 243–254.
- 126 N. I. Demidenko and G. B. Tel'nova, *Glas. Ceram.*, 2004, **61**, 183–186.
- 127 L. Lapčík, M. Vašina, B. Lapčíková, E. Otyepková and K. E. Waters, *Compos. Part B Eng.*, 2015, **77**, 304–310.
- 128 L. Lapčík, D. Mañas, B. Lapčíková, M. Vašina, M. Staněk, K. Čépe, J. Vlček, K. E. Waters, R. W. Greenwood and N. A. Rowson, *Compos. Part B Eng.*, 2018, **141**, 92–99.
- 129 B. Pukánszky, M. Van Es, F. H. J. Maurer and G. Vörös, *J. Mater. Sci.*, 1994, **29**, 2350–2358.
- 130 C. B. Bucknall, *Toughened plastics*, Applied Science Publishers, 1977.
- 131 L. Lapčík, D. Mañas, M. Vašina, B. Lapčíková, M. Řezníček and P. Zádrapa, *Compos. Part B Eng.*, 2017, **113**, 218–224.
- 132 J.-Z. Liang, J.-Q. Feng, C.-P. Tsui and C.-Y. Tang, *J. Thermoplast. Compos. Mater.*, 2015, **28**, 275–286.
- 133 L. Lapčík, P. Jindrová, B. Lapčíková, R. Tamblyn, R. Greenwood and N. Rowson, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, **110**, 2742–2747.
- 134 J. Z. Liang and Q. Q. Yang, *J. Thermoplast. Compos. Mater.*, 2007, **20**, 225–236.
- 135 A. Dasari, S. Sarang and R. D. K. Misra, *Mater. Sci. Eng. A*, 2004, **368**, 191–204.
- 136 B. Lapčíková, L. Lapčík, P. Smolka, R. Dlabaja and D. Hui, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, **102**, 1827–1833.

- 137 S. Ottani, A. Valenza and F. P. La Mantia, *Rheol. Acta*, 1988, **27**, 172–178.
- 138 B. L. Zhu, J. Wang, H. Zheng, J. Ma, J. Wu and R. Wu, *Compos. Part B Eng.*, 2015, **69**, 496–506.
- 139 R. Huang and P. Li, *Compos. Part B Eng.*, 2015, **78**, 401–408.
- 140 M. Porfiri and N. Gupta, *Compos. Part B Eng.*, 2009, **40**, 166–173.
- 141 M. D. Ranken, R. C. Kill and C. (Christopher) Baker, *Food industries manual*, Blackie Academic & Professional, 1997.
- 142 J. R. Hoffman and M. J. Falvo, *J. Sports Sci. Med.*, 2004, **3**, 118–30.
- 143 H. B. Jacobucci, V. C. Sgarbieri, N. F. G. P. Dias, P. Borges and C. Tanikawa, *Nutr. Res.*, 2001, **21**, 905–915.
- 144 L. Lapčík, B. Lapčíková, E. Otyepková, M. Otyepka, J. Vlček, F. Buňka and R. N. Salek, *FOOD Chem.*, 2015, **174**, 25–30.

Příloha A

Impinging jet study of the deposition of colloidal particles on synthetic polymer (Zeonor)



Impinging jet study of the deposition of colloidal particles on synthetic polymer (Zeonor)



Jakub Vlček^a, Lubomír Lapčák^{a,b,*}, Jiří Čech^c, Barbora Lapčíková^{a,b}

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17 Listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Tomas Bata University in Zlin, Institute of Foodstuff Engineering, Nad Stranemi 4511, 760 05 Zlin, Czech Republic

^c DTU Nanotech, Department of Micro- and Nanotechnology, Technical University of Denmark, Building 345 East, DK-2800 Kongens Lyngby, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2014

Received in revised form 5 July 2014

Accepted 6 July 2014

Keywords:

Embossing

Contact angle

Kinetics of deposition

Polymer

Zeonor

Polystyrene particles

ABSTRACT

In this study, an impinging jet deposition experiments were performed on synthetic polymer (Zeonor) original and by micro-embossing modified substrates with exactly defined topology as confirmed by AFM and SEM. Deposition experiments were performed at ambient temperature and at selected flow regime of $Re = 10$. As a particles deposited a polystyrene (PS) 1,1 μm diameter particles (Sigma-Aldrich) were used having negative charge of -20 mV as observed by zeta potential experiments. There was found gradual increase of total number of deposited particles with time reaching steady state number. Obtained kinetic curves were fitted to the theoretical blocking model where characteristic time required to reach the steady state (blocking time) as well as steady state number of deposited particles were calculated.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Studying interactions of colloidal particles at the solid/liquid interface with respect to the adsorption/desorption phenomena is important for many scientific and industrial processes [1–7]. This knowledge is significant for better understanding of filtration processes, water treatment, microfluidic devices construction, paper making, polymer characterization, biofouling of membranes and artificial organs [8–11] etc. For detailed and exact understanding of the latter mentioned phenomena well defined hydrodynamic and physicochemical conditions during experiments are required. These conditions are met in impinging jet technique, where deposition of colloidal particles is well controlled by hydrodynamic conditions during deposition process [2].

The most important sphere–wall interactions are those leading to the deposition of a spherical particle onto the surface. The flow near the collector can be decomposed into a local stagnation–point flow and a local simple–shear flow. Theoretical background is well described in our previous paper [12].

The connective–diffusion equation can be written as follows:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \nabla J = Q \quad (1)$$

$$J = -D\nabla n + un \quad (2)$$

where J is the particle flux vector, Q is a source term, D the diffusion tensor and u the velocity which can consist of several contributions e.g. u_{hydr} , u_{coll} and u_{ext} . Hydrodynamic velocity is usually obtained by solving the Navier–Stokes equation neglecting the presence of the dispersed phase. Because of the latter assumption results apply only to dilute dispersions:

$$\rho \left(\frac{\partial u}{\partial t} + u\nabla u \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 u + \rho F_{ext} \quad (3)$$

where v is the fluid flow velocity, ρ is the fluid density, p is the pressure, η is the dynamic viscosity, F_{ext} is the body volume force exerted on the fluid and t is the time. For the incompressible fluids Eq. (3) is complemented by the continuity Eq. (4):

$$\nabla u = 0 \quad (4)$$

Analytical solution of Eqs. (3) and (4) is available for a given initial velocity field and specified boundary conditions for simple geometries. In our case a stagnation–point flow collector was used which in experimental configuration is called “impinging jet” [13]. The

* Corresponding author at: Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17 Listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic.

E-mail address: lapcik@seznam.cz (L. Lapčák).

fluid velocity components (radial and normal) in the vicinity of the stagnation point can be described [13]:

$$u_r = \alpha_r(\text{Re}, h/r_c) \frac{u_m}{r_c^2} r z \quad (5)$$

$$u_z = -\alpha_r(\text{Re}, h/r_c) \frac{u_m}{r_c^2} z^2 \quad (6)$$

where r is the radial distance from the symmetry axis, z is the distance from the adsorbing interface, α_r is a flow intensity parameter and u_m is the mean linear velocity given in (8). The latter parameter α_r is dependent on the cell geometry and the flow intensity, which is usually expressed by the Reynolds number (Re):

$$\text{Re} = \frac{Q}{\pi r_c \nu} \quad (7)$$

where Q is the volume flow, r_c is the capillary radius of the impinging jet, ν is the kinematic viscosity of the fluid.

$$u_m = \frac{Q}{\pi r_c^2} \quad (8)$$

For our experimental set-up the ratio of the distance between the confining plate and the collector to the radius of the jet (h/r_c) was 1.7. For this geometry, values of α_r for a Reynolds number of more than 50 can be expressed as follows [14]:

$$\alpha_r = 3.5 \nu^{1/3} u^{2/3} r_c^{-1/3} \quad (9)$$

where u is the mean velocity of the jet.

Number of particles depositing per unit area per unit time on the wall is expressed as a particle flux j . This flux is expressed in praxis in the form of dimensionless Sherwood number Sh (10):

$$Sh = \frac{j a}{D_0 n_0} \quad (10)$$

where D_0 is the diffusion constant, and n_0 is the number concentration of particles. By use of Smoluchowski-Levich approximation for the case when there is no energy barrier between the particle and the collector (so called fast deposition) and by neglecting gravity forces particle flux is given as:

$$Sh_{fast} = \frac{\exp\left(-\frac{Pe}{6}\right)}{\int_1^\infty \exp\left[-\frac{Pe}{6}(z)^3\right] dz} \quad (11)$$

where z is the dimensionless distance between the sphere center and the wall, and Pe is the Peclet number. In the case when the energy barrier is present, the deposition rate is reduced and for the particle flux we obtain:

$$Sh = \alpha_d Sh_{fast} \quad (12)$$

where α_d is called the *deposition efficiency*. When electrostatic repulsion is acting between particles and the surface $\alpha_d < 1$ while for electrostatic attraction $\alpha_d > 1$ [10]. When only the Van der Waals forces are acting $\alpha_d \approx 1$. Eq. (12) describe the initial deposition rate on a base surface. As deposition proceeds, deposited particles slow down the deposition. In the absence of particle detachment [10]:

$$n_t = n_\infty \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{bloc}}}\right) \quad (13)$$

where n_t is the number of deposited particles at time t , n_∞ they steady state number, and τ_{bloc} is the characteristic time required to reach the steady state, referred to as the blocking time. The blocking time can be expressed as [15]:

$$\frac{1}{\tau_{bloc}} = \pi a^2 \gamma j_c \quad (14)$$

where γ is the blocking coefficient which represents a normalized area per deposited particle that effectively blocks further

deposition, j_c is the rate of particle deposition on a bare surface near to stagnation point given as [10]:

$$j_c = 0.776 \alpha_r^{1/3} n_c D_0^{2/3} \quad (15)$$

The most stable equilibrium contact angle of liquid droplet on solid smooth and heterogenous surface (θ) can be described by Young equation, which corresponds to minimal energy state among the three phases [16]:

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \gamma_{LG} \cos\theta \quad (16)$$

Where γ_{SG} , γ_{SL} and γ_{LG} are the surface tensions of solid- gas, solid-liquid and liquid- gas interfaces. In the case of the heterogenous rough surface observed contact angles differs from smooth surface and are described by Wenzel and Cassie-Baxter [17,18]. If the liquid is in contact everywhere with the solid surface, system is in Wenzel regime and following equation can be used:

$$\cos(\theta_A) = r \cos(\theta) \quad (17)$$

Otherwise when the liquid drop is in contact only with the top protrusions on the surface (no liquid penetration into a solid surface is observed) Cassie-Baxter approach for determination of apparent equilibrium contact angle (i.e. θ^*) can be applied [19]:

$$\cos\theta^* = -1 + \Phi_s(\cos\theta + 1) \quad (18)$$

where Φ_s is the portion of solid region, that is in touch with the liquid droplet area and θ is the equilibrium contact angle on a smooth surface. If we suppose, that there system is in ideal Cassie regime, the surface textures is much smaller than the droplet size and the three-phase contact line (CL) constrain is small or inconsiderable, we can calculate total surface free energy change for very small displacements of contact line (dR) after and before the movement [19]:

$$dE = dE_{surface} + dE_{line} \quad (19)$$

where $dE_{surface}$ and dE_{line} represent surface and line energies. $dE_{surface}$ can be defined as

$$dE_{surface} = \Phi_s(\gamma_{SL} - \gamma_{SV})dA + (1 - \Phi_s)\gamma_{LV}dA \cos\theta^* \quad (20)$$

The total line energy change (E_{line}) can be calculated as follows:

$$dE_{line} = \frac{2\tau\Phi_s dA}{r} \quad (21)$$

Therefore the dependence of the texture size (r) on the most stable apparent equilibrium contact angle (θ^*) using the Young equation can be determined by extended Cassie – Bexter equation in the case, that the changes of total surface free energy are minimalized [19]:

$$\cos\theta^* = -1 + \Phi_s(\cos\theta + 1) - \frac{2\Phi_s\tau}{r\gamma_{LV}} \quad (22)$$

where the τ means the contact line tension at three-phase interface.

2. Experimental

2.1. Methods

For impinging jet experiments was used setup original designed by Dąbroś, van de Ven and Adamczyk [3,13,15]. This setup is sometimes mentioned as radial impinging-jet cell (RIJ) [3]. The volumetric flow rate Q was controlled by adjustment of the vertical position of the colloidal dispersion level and by changing the inner diameter of inlet and outlet capillary. Deposition process was followed by microscope SM 5 (Intraco Micro, Czech Republic) with magnification $200\times$ for all experiments at the temperature of 22 C. Flow regime ($\text{Re} \approx 10$) was kept constant for all experiments

(see Scheme 1). Deposited particles number was determined by counting of individual particles as observed on snapshots recorded at following time intervals: 5; 10; 20; 30; 45; 60; 80; 100; 120; 150 min). Snapshots were taken by Nikon Coolpix 4500 digital camera (Japan).

Flow rate was determined by weighing method. For Reynolds number (Re) calculation following formula was used:

$$\text{Re} = \frac{Q}{\pi r_c v} \quad (20)$$

where Q is volumetric flow rate, r_c is the capillary radius (in our case $r_c = 1$ mm), v kinematic viscosity ($v = 1,004 \times 10^{-6}$ m²/s).

PS particles diameter and zeta-potential were measured on Zeta Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Image processing was performed by ImageJ software (Image Processing and Analysis in Java, USA) available from <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html> web pages.

Surface topology characteristics of studied Zeonor samples were followed by scanning electron microscope (SEM) and by atomic force microscopy (AFM).

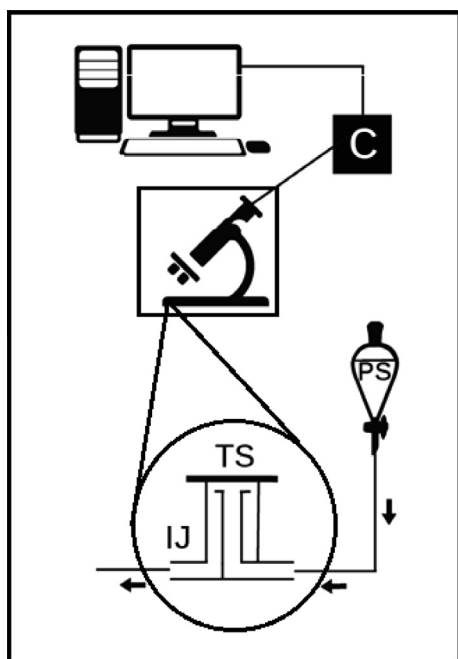
All SEM images were taken on SEM Hitachi SU6600 (FEG). Secondary electrons mode, accelerating voltage 1 kV and distance between detector and the sample 6 mm were used.

Scanning probe microscope (SPM) (Ntegra, NT_MDT) in AFM mode was used for surface topology. Semi-contact mode with NSG10 tip and frequency of 0,7 Hz was set for this measurements.

Static contact angle of wetting measurements based on axisymmetric shape drop analysis were performed by See System apparatus (Masaryk University, Czech Republic). Each contact angle measurement was repeated 7 × at 22 °C with 3 μl volume of the wetting liquid. Surface free energy of the tested material was calculated according to the Owens, Wendt, Rabel and Kaelble [20,21] extended Fowkes theory as a mean value of all testing liquids combinations.

2.2. Materials

For particles deposition experiments synthetic polymers Zeonor (Zeon Chemicals, Japan) in the form of foil with three different



Scheme 1. Schematic description of the experimental setup: PS – polystyrene latex dispersion, C – camera, TS – tested substrate and IJ – impinging jet cell.

thicknesses (50 μm, 100 and 188 μm) were used. Zeonor surface was modified by embossing with two different patterns (for geometrical parameters of the patterns see Scheme 2).

Polystyrene micro-spheres were selected as a testing colloidal system as they are inexpensive and readily available at wide range of particle sizes and surface modifications, degree of polydispersity. For impinging jet experiments polystyrene latex beans (Sigma–Aldrich, USA) with 1,1 μm mean particle and zeta-potential of -20 mV were used. The average number concentration was set to 5×10^6 per cubic centimetre. For elimination of electrostatic interactions during deposition experiments latex dispersion were prepared in 1×10^{-3} M KCl aqueous solution and pH 7. Calculated value of α was 59 at our experimental conditions. All contact angle measurements and impinging jet experiments were performed in de-ionized water (Millipor, conductivity of 0,06 μS/cm)

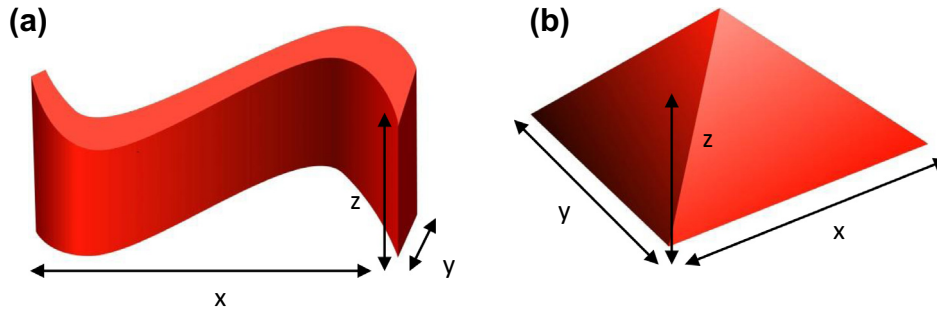
Ethylene glycol (EG) (p.a., Lachema, Czech Republic), dimethylsulfoxide (DMSO) (99,9% A.C.S reagent, Sigma–Aldrich, Germany) and glycerol (G) (p.a., Lach-Ner, Czech Republic) were used as testing liquids for contact angle measurements (ACS grade, Sigma–Aldrich, USA).

3. Results and discussion

3.1. Surface energy and topology characterization

As mentioned in the introduction, magnitude of a surface free energy and of equilibrium contact angles of wetting liquids on collector substrate surfaces play important role during particle deposition process. In our study we have used polystyrene latex particles for deposition. Polymer substrate under study (Zeonor) wetting characteristics of both virgin and embossed samples are summarized in Table 2. It is evident, that for water contact angles of wetting of virgin Zeonor surfaces was ranging from 99° for sample 1_Z50_V and 96,8° for sample 3_Z_100_V to approximately 96° for sample 6_Z188_E3, reflecting their hydrophobic character. After embossing with latter described geometrical patterns (see Table 1) in the first two cases of patterns E1 and E2 further increase of the measured contact angles was observed to 105° as well as to 102.4°. This increase reflects more water repellent character of the patterned surfaces. However in the case of pattern E3 this trend was not observed, where after embossing the contact angle of wetting of water was decreased from 103.6° to 96 °C. To allow us calculation of the surface free energy the wetting of following testing liquids was measured (glycerol, ethylene glycol, DMSO). Calculated values of the surface free energies of all studied samples are summarized in Table 3. Here a dominating was dispersive part of the surface free energy with minor polar component in all studied cases. The lowest total surface free energy was found for sample 1_Z50_V (24.6 mJ/m²), for samples 3_Z_100_V and 5_Z188_V were observed approximately equal values of 30 mJ/m². However, embossing triggered increase of the surface free energy was in the case of surface patterns E1 and E2 due to the increase of dispersive part of the surface free energy, while in the case of E3 geometric pattern due to the increase of the polar component. The most visible increase of the surface free energy was found for geometric pattern E1, from original 24.6 mJ/m² to 37.2 mJ/m².

Surface topology was characterized by means of SEM and AFM measurements. For original AFM and SEM snapshots see Figs. 1–4. As one can see studied embossed surfaces exhibited excellent reproducible patterns in contrary to the original flat surfaces. SEM images of Zeonor embossed foil with thickness 100μ shows (sample 4_Z100_E2), that topological pattern is uniform, as shown in Fig. 3. Pattern consists of 300 nm long and 180 nm high nanostructures, which are shown in AFM image in Fig. 1. Topological pattern of the embossed Zeonor foil thickness 50 μm and 188 μm



Scheme 2. Schematic description of the patterned E1 (a) and pattern E2 and E3 (b) surface geometry.

Table 1
Sample labeling and description.

Sample	x (nm)	y (nm)	z (nm)	Description
1_Z50_V	–	–	–	Virgin Zeonor, thickness 50 μm
2_Z50_E1	375	375	170	Embossed Zeonor, thickness 50 μm, spacing x 450 nm, y 450 nm, pyramidal pattern geometry
3_Z100_V	–	–	–	Virgin Zeonor, thickness 100 μm
4_Z100_E2	440	50	170	Embossed Zeonor, thickness 100 μm, spacing x 440 nm, y 560 nm, wave like pattern geometry
5_Z188_V	–	–	–	Virgin Zeonor, thickness 188 μm
6_Z188_E3	375	375	180	Embossed Zeonor, thickness 188 μm, spacing x 425 nm, y 425 nm, pyramidal pattern geometry

Table 2
Measured static contact angles of wetting (θ) of studied polymer samples (Zeonor Embossed 50 μm, Zeonor Virgin 50 μm, Zeonor embossed 100 μm and Zeonor Virgin 100 μm) by axisymmetric shape drop analysis (measured at 24 °C).

Wetting liquid	Contact angle of wetting θ (°)					
	1_Z50_V	2_Z50_E1	3_Z_100_V	4_Z_100_E2	5_Z188_V	6_Z188_E3
Water	99.06 ± 2.29	104.99 ± 0.98	96.79 ± 1.87	102.43 ± 1.53	103.64 ± 0.83	96.15 ± 1.43
Glycerol	81.17 ± 2.97	89.82 ± 2.41	92.55 ± 0.54	82.44 ± 2.07	91.05 ± 0.37	78.74 ± 2.78
Ethelene glycol	70.05 ± 0.56	67.85 ± 1.63	67.64 ± 0.49	68.00 ± 2.28	69.22 ± 1.03	62.16 ± 3.26
DMSO	64.99 ± 1.25	56.03 ± 1.97	60.27 ± 0.89	60.61 ± 0.32	67.75 ± 1.14	57.90 ± 3.22

Table 3
Total surface free energy and its parts (dispersive, polar) calculated via Owens–Wendt approach.

Surface free energy [mJ/m ²]	1_Z50_V	2_Z50_E1	3_Z_100_V	4_Z_100_E2	5_Z188_V	6_Z188_E3
γ_s	24.63 ± 3.77	37.17 ± 8.83	30.00 ± 11.51	31.92 ± 6.74	29.65 ± 7.40	30.86 ± 4.84
γ_s^D	21.49 ± 6.68	36.52 ± 8.23	27.03 ± 12.66	30.43 ± 8.50	28.43 ± 7.67	26.72 ± 9.03
γ_s^P	3.15 ± 4.05	0.65 ± 0.88	2.97 ± 2.19	1.49 ± 2.10	1.22 ± 1.76	4.14 ± 5.30

(2_Z50_E1 and 6_Z188_E3) show different geometry with approximately the same size of individual nano-object structures similar to the previous sample are shown in Figs. 1,2 and 4. SEM images characteristic features correspond very well with AFM images of all three samples under study (of all three thicknesses of 50, 100 and 188 m).

3.2. Impinging jet deposition experiments

At the present time a microfluidics, the manipulation of liquids using small structures in the tens of micrometers, is an emerging field of research and development in life sciences and medicine. Broad range of applications, where microfluidics have been applied, spans from nanoliter-volume chemical synthesis to micro-scale capillary-driven diagnostics, single cell analysis, high-throughput drug screening, protein crystallization etc. Results from negative latex particles deposition by means of the impinging jet experiments on structurally tuned micropatterned surfaces are summarized in Fig. 5. As shows a typical exponential growth of the total number of deposited particles as a function of time was

observed. From our measurements we have observed decreasing of total number of deposited particles after embossing of Zeonor surface, despite the fact, that embossing caused increasing of SFE for all tested patterns as given in Table 2 and Table 3. We might expect that the flux pattern above structural surface is affected by creation of the localized micro vortices in the adjacent liquid layer above tested surface which in general can be used for hydrodynamic focusing of deposition. Obtained data shows that surface of Zeonor foil with thickness 50 μm and pyramidal structural pattern design is more active compare to the surface of Zeonor foil with thickness 100 μm having wave like geometrical pattern. We might expect some kind of hydrodynamic focusing like effect in the case of both pyramids as well as wave like round pattern designs. This conclusion is supported by observed blocking time magnitudes, where after pyramidal embossing the latter blocking time was increase two times in comparison to the virgin surfaces (samples 1_Z50_V compare with 2_Z50_E1). However in the case of wave like pattern geometry the latter blocking time was increased approximately six times in comparison to the virgin surface (see Table 4 data for samples 3_Z100_V and 3_Z100_E2). Similarly the

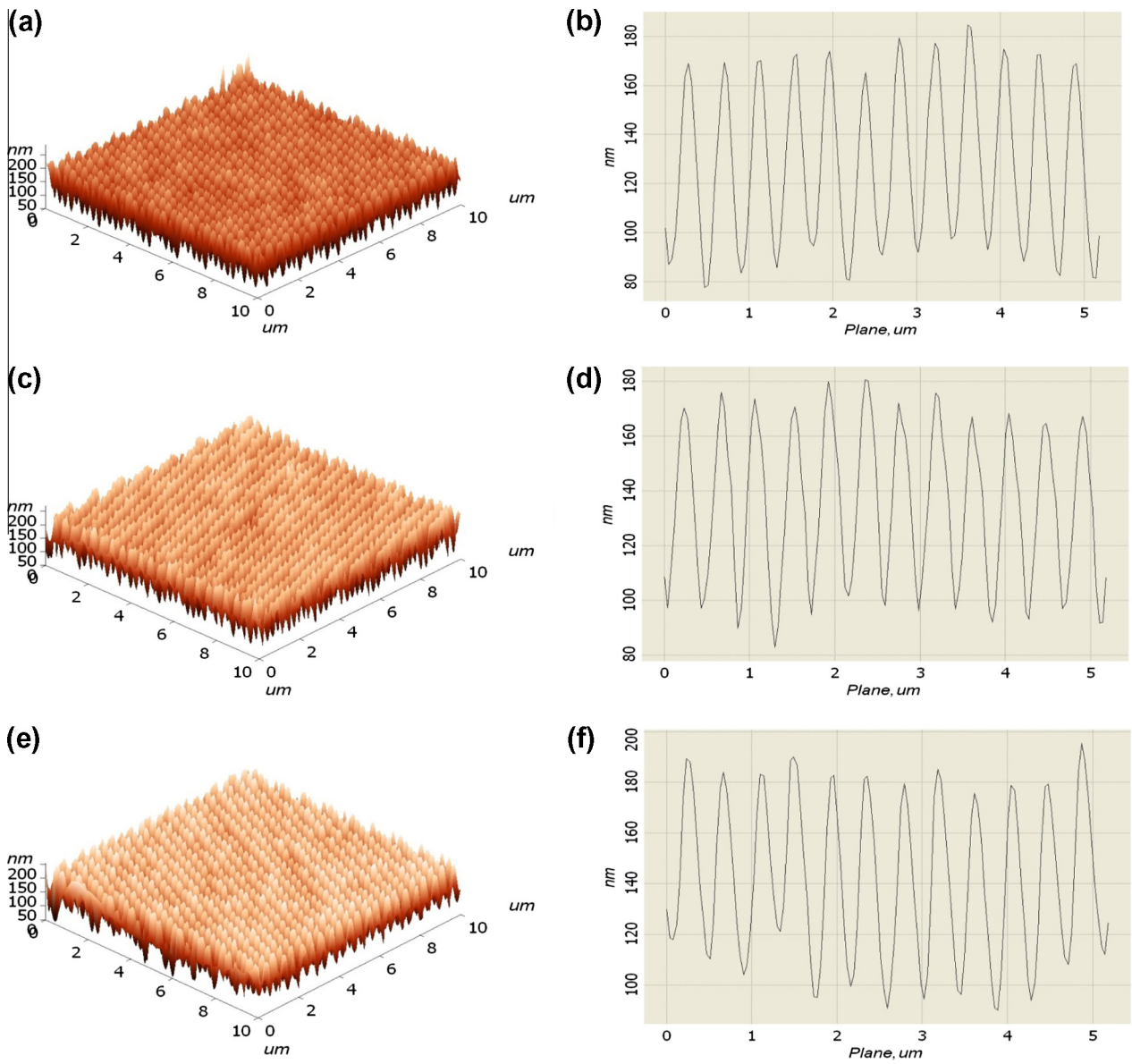


Fig. 1. AFM image of Zeonor modified via embossing with pattern E1 (a) E2 (c) E3 (e) and profile cut of the samples 2_Z50_E1 (b), 4_Z100_E2 (d) and 6_Z188_E3 (f).

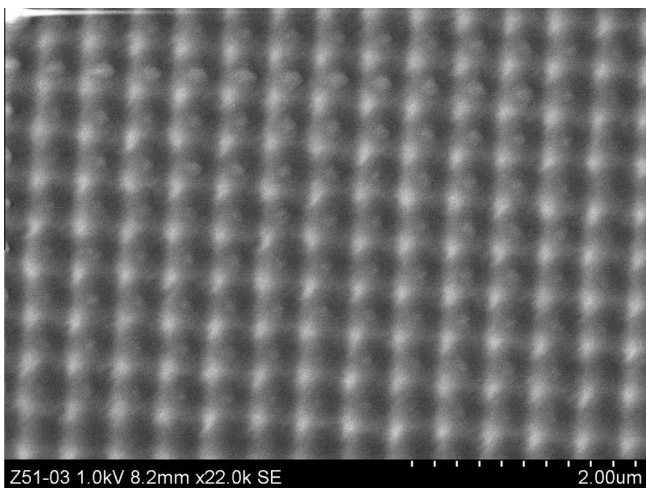


Fig. 2. SEM image of Zeonor foil with thickness 50 μm modified via embossing with pattern E1.

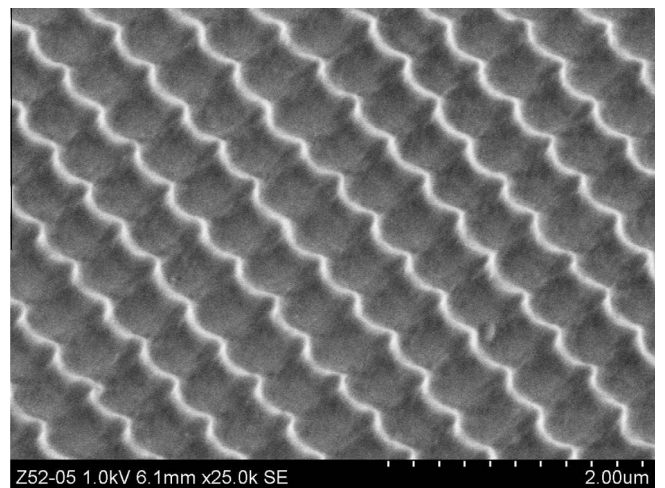


Fig. 3. SEM image of Zeonor with thickness 100 μm modified via embossing with pattern E2.

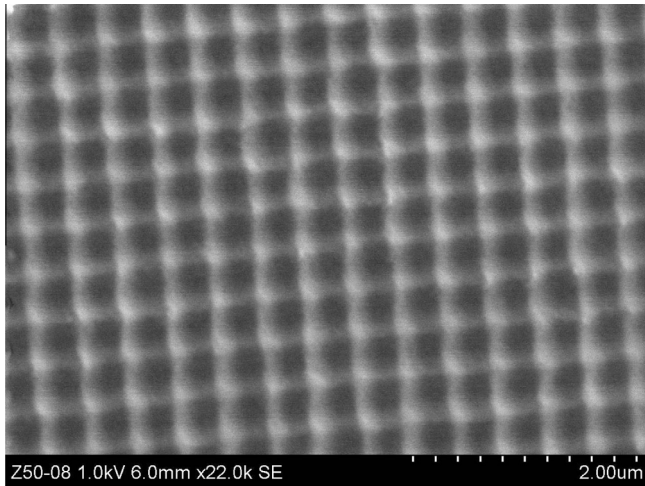


Fig. 4. SEM image of Zeonor with thickness 188 μm modified via embossing with pattern E3.

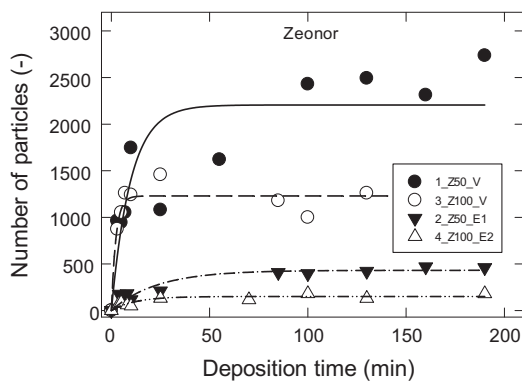


Fig. 5. Total number of particles deposited as a function of time of PS particles on Zeonor virgin (circle) and embossed (triangle) with thickness 50 μm (full symbols) and 100 μm (empty symbols). (measured at 24 °C). Lines are best fits of experimental data with deposition model (17).

Table 4

Results of the impinging jet experiments of particle PS deposition on Zeonor surfaces: τ_{bloc} blocking time (s), n_{∞} – steady state number of deposited particles (-), j_c – rate of particle deposition on a bare surface near stagnation point.

Sample	τ_{bloc} (min)	n_{∞} (-)	j_c (1/min)
1_Z50_V	9.82 ± 3.53	2206 ± 206	196.20
2_Z50_E1	23.1 ± 5.7	431.4 ± 2.7	18.72
3_Z100_V	2.32 ± 0.54	1230 ± 44	533.11
3_Z100_E2	12.2 ± 4.1	150.5 ± 1.7	12.83

steady state number of deposited particles was decreased proportionally to the above mentioned blocking time data in the case of embossed surfaces. Above mentioned conclusions very well correspond to the observations of particle deposition rates near stagnation point j_c where their vigorous decrease was found for embossed surfaces in comparison to the virgin ones. With respect to the mode of wetting the tested surfaces results of the surface roughness calculations are summarized in Table 5. Here is evident observed Wenzel mode of wetting behavior for water, where for the 2_Z50_E1 and 4_Z100_E2 samples we obtained surface roughness ranging from 1.64 to 1.82, however with more hydrophobic character in comparison to the 6_Z188_E3 sample, where in contrary more hydrophilic behavior was found.

Table 5

Calculated surface roughness of tested embossed samples according to Eq. (17).

Sample	Surface roughness (-)		
	Water	EG	DMSO
2_Z50_E1	1.64	1.11	1.32
4_Z100_E2	1.82	0.98	0.99
6_Z188_E3	0.45	1.32	1.40

4. Conclusions

There were performed an impinging jet deposition experiments on synthetic polymer (Zeonor) original and by micro-embossing modified substrates with exactly defined topology as confirmed by AFM and SEM. Deposition experiments were performed at ambient temperature and at selected flow regime of $Re = 10$. As a particles deposited the PS 1,1 μm diameter particles (Sigma-Aldrich) were used having negative charge of -20 mV as observed by zeta potential experiments. There was found gradual increase of total number of deposited particles with time reaching steady state number. Obtained kinetic curves were fitted to the theoretical blocking model where characteristic time required to reach the steady state (blocking time) as well as steady state number of deposited particles were calculated. We have observed decreasing of total number of deposited particles after embossing of Zeonor surface, despite the fact, that embossing caused increasing of SFE for all tested patterns. There was confirmed some kind of hydrodynamic focusing like effect in the case of both pyramids as well as wave like round pattern designs. This conclusion is supported by observed blocking time magnitudes, where after pyramidal embossing the latter blocking time was increased two times in comparison to the virgin surfaces. However in the case of wave like pattern geometry the latter blocking time was increased approximately six times in comparison to the virgin surface. Latter conclusions were consistent with data observed for the steady state number of deposited particles as well as of particle deposition rates near stagnation point j_c where their vigorous decrease was found for embossed surfaces in comparison to the virgin ones.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

Financial support from the Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (grants CZ.1.05/3.1.00/14.0302 and CZ.1.05/2.1.00/03.0058) is gratefully acknowledged. Special thanks to Mgr. K. Šafářová, Ph.D. and Ing. O. Tomanec for SEM and AFM measurements.

References

- [1] Z. Adamczyk, M. Nattich-Rak, M. Sadowska, A. Michna, K. Szczepaniak, Mechanisms of nanoparticle and bioparticle deposition - Kinetic aspects, *Colloid Surface A* 439 (2013) 3–22.
- [2] Z. Adamczyk, Particles at Interfaces: Interactions, Deposition, Structure, in: *Particles at Interfaces: Interactions, Deposition, Structure*, 2006, pp. 1–744.
- [3] Z. Adamczyk, B. Siwek, P. Warszynski, E. Musial, Kinetics of particle deposition in the radial impinging-jet cell, *J Colloid Interf Sci* 242 (1) (2001) 14–24.
- [4] X.J. Jiang, M.P. Tong, H.Y. Li, K. Yang, Deposition kinetics of zinc oxide nanoparticles on natural organic matter coated silica surfaces, *J Colloid Interf Sci* 350 (2) (2010) 427–434.
- [5] S.T. Yang, B.B.M. Razavizadeh, R. Pelton, G. Bruin, Nanoparticle Flotation Collectors-The Influence of Particle Softness, *ACS Appl Mater Inter* 5 (11) (2013) 4836–4842.
- [6] S.T. Yang, R. Pelton, Nanoparticle Flotation Collectors II: The Role of Nanoparticle Hydrophobicity, *Langmuir* 27 (18) (2011) 11409–11415.

- [7] S.T. Yang, R. Pelton, M. Montgomery, Y.G. Cui, Nanoparticle Flotation Collectors III: The Role of Nanoparticle Diameter, *ACS Appl Mater Inter* 4 (9) (2012) 4882–4890.
- [8] L. Lapcik, B. Alince, T.G.M. Vandeven, Effect of poly(ethylene oxide) on the stability and flocculation of clay dispersions, *J Pulp Pap Sci* 21 (1) (1995) J19–J24.
- [9] N. Savage, M.S. Diallo, Nanomaterials and water purification: Opportunities and challenges, *J Nanopart Res* 7 (4–5) (2005) 331–342.
- [10] T.G.M. vandeVen, S.J. Kelemen, Characterizing polymers with an impinging jet, *J Colloid Interf Sci* 181 (1) (1996) 118–123.
- [11] L. Lapcik, S. De Smedt, J. Demeester, P. Chabreck, Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications, *Chemical Reviews* 98 (8) (1998) 2663–2684.
- [12] L. Lapcik, M. Frastik, B. Lapcikova, Impinging jet study of the deposition of colloidal particles on modified polycarbonate and poly(ethylene terephthalate) surfaces, *International Journal of Heat and Mass Transfer* 55 (5–6) (2012) 1513–1518.
- [13] T. Dabros, T.G.M. Vandeven, A direct method for studying particle deposition onto solid-surfaces, *Colloid and Polymer Science* 261 (8) (1983) 694–707.
- [14] M. Kamiti, T.G.M. Vandeven, Impinging jet studies of the kinetics of deposition and dissolution of calcium-carbonate particles, *Colloid Surface A* 100 (1995) 117–129.
- [15] T. Dabros, T.G.M. Vandeven, Kinetics of coating by colloidal particles, *Journal of Colloid and Interface Science* 89 (1) (1982) 232–244.
- [16] K.J. Kubiak, M.C.T. Wilson, T.G. Mathia, P. Carval, Wettability versus roughness of engineering surfaces, *Wear* 271 (3–4) (2011) 523–528.
- [17] J. Bico, U. Thiele, D. Quere, Wetting of textured surfaces, *Colloid Surface A* 206 (1–3) (2002) 41–46.
- [18] T.S. Meiron, A. Marmur, I.S. Saguy, Contact angle measurement on rough surfaces, *J Colloid Interf Sci* 274 (2) (2004) 637–644.
- [19] T.S. Wong, C.M. Ho, Dependence of Macroscopic Wetting on Nanoscopic Surface Textures, *Langmuir* 25 (22) (2009) 12851–12854.
- [20] D.Y. Kwok, D. Li, A.W. Neumann, Evaluation of the Lifshitz van-der-Waals acid-base approach to determine interfacial-tensions, *Langmuir* 10 (4) (1994) 1323–1328.
- [21] R. Gajdošíková, B. Lapčíková, L. Lapčík Jr, Surface phenomena and wetting of porous solids, *Physical Chemistry: An Indian Journal* 6 (3) (2011) 146–162.

Příloha B

Flow induced HeLa cell detachment kinetics show that oxygen-containing functional groups in graphene oxide are potent cell adhesion enhancers



Cite this: *Nanoscale*, 2019, **11**, 3222

Flow induced HeLa cell detachment kinetics show that oxygen-containing functional groups in graphene oxide are potent cell adhesion enhancers†

Jakub Vlček,^a Lubomír Lapčík,^b Markéta Havrdová,^a Kateřina Poláková,^a Barbora Lapčíková,^{a,b} Tomáš Opletal,^c Jens P. Frøning^a and Michal Otyepka^{*,a}

A broader and quantitative understanding of cell adhesion to two-dimensional carbon-based materials is needed to expand the applications of graphene and graphene oxide (GO) in tissue engineering, prosthetics, biosensing, detection of circulating cancer cells, and (photo)thermal therapy. We therefore studied the detachment kinetics of human cancer cells HeLa adhered on graphene, GO, and glass substrates using stagnation point flow on an impinging jet apparatus. HeLa cells detached easily from graphene at a force of 9.4 nN but adhered very strongly to GO. The presence of hydrophilic functional groups thus apparently enhanced the HeLa cells' adherence to the GO surface. On graphene, smaller HeLa cells adhered more strongly and detached later than cells with larger projected areas, but the opposite behavior was observed on GO. These findings reveal GO to be a suitable platform for detecting cells or establishing contacts, e.g. between graphene-based circuits/electrodes and tissues. Our experiments also show that the impinging jet method is a powerful tool for studying cellular detachment mechanisms and adhesion strength, and could therefore be very useful for investigating interactions between cells and graphene-based materials.

Received 7th November 2018,
Accepted 27th January 2019

DOI: 10.1039/c8nr08994a

rscl.li/nanoscale

Introduction

The two-dimensional (2D) carbon-based nanomaterials graphene and graphene oxide (GO) and recently two-dimensional peptide-based functional nanomaterials¹ have a wide and growing range of biomedical applications in areas and systems such as targeted drug delivery,^{2–4} scaffold biomaterials,^{5,6} biosensors,^{7–10} neural engineering,¹¹ photothermal therapy,^{12,13} and theranostics.^{14–16} Their usefulness in these applications is

due to their unique physical and chemical properties, which include excellent electrical and thermal conductivity, a large specific surface area, superior mechanical strength, attractive optical properties, and good biocompatibility.^{17–19}

Cell adhesion to 2D carbon-based materials has drawn particular attraction in recent years in pharmaceutical and biomaterials research, partly because of the potential applications of these materials in tissue engineering and prosthetics.^{20–23} The ability of GO to enhance cell adhesion and even selectively capture cancer cells makes GO surfaces suitable platforms for biosensing, and (photo)thermal therapy. A recently prepared hybrid polyester microfiber scaffold with a GO coating that promotes cell adhesion was shown to enable efficient killing of captured cancer cells *via* photothermal ablation.²⁴ Adhesion strength is important for the efficiency of biosensors, and can be improved by surface nanostructuring or chemical modification.^{25,26} A better understanding of cellular adhesion to these nanomaterials and new experimental techniques suitable for developing such an understanding are thus needed to support the advancement of research into the biomedical applications of graphene and GO.

The adhesion forces between cells and substrates can be evaluated using several methods including hydrodynamic, centrifugation, and micromanipulation techniques.^{27,28} Atomic force microscopy (AFM) is a powerful technique for measuring

^aRegional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic. E-mail: lapcikli@seznam.cz, michal.otyepka@upol.cz

^bTomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic

^cRegional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

† Electronic supplementary information (ESI) available: XPS survey spectra of graphene, graphene oxide after air plasma treatment, optical microscopy image of HeLa cells attached on glass substrate, AFM topography mapping of glass substrate, water sessile drop contact angle image on glass, HeLa cells jet impingement-induced detachment kinetics on glass substrate. See DOI: 10.1039/c8nr08994a

the strength of adhesion of single cells but is unsuitable for large population analysis.²⁹ Conversely, hydrodynamic devices such as parallel plate apparatus, radial flow chambers, and impinging jet systems are suitable for studying the adhesion of large cell populations. These techniques, which are based on the application of shear stress to cells adhered on the surface, enable dynamic measurements and studies on detachment kinetics.^{30–32} Impinging jet systems focus a jet on a small area, producing a thinner and more uniform hydrodynamic boundary layer than other hydrodynamic methods, which act at long distances from the stagnation point.^{33–35} This enables exact quantification of the tangential forces acting at the target surface in the vicinity of the contact point of the impinging dispersion medium, generating reliable data on the strength of the adhesion between the surface and adhering particles (in this case, HeLa cells).

Cervical cancer is the third most common type of cancer; it affects many women worldwide and causes over 200 000 deaths annually.³⁶ Deaths due to cervical cancer could be greatly reduced by routine screening and early diagnosis followed by treatment of pre-cancerous lesions because early-stage treatment significantly improves prognosis. The development of graphene/GO based biosensors, which could potentially be used for routine and effective cancer diagnosis, will be facilitated by information on HeLa cells' adhesion to these nanomaterials. We therefore investigated the adhesion of HeLa cervical cancer cells to graphene and GO, and compared our results to measurements of their adhesion to glass. These studies revealed that the impinging jet technique enables experimental quantification of cellular adhesion on diverse surfaces.

Experimental

Materials

Transparent single-layer graphene on square 25 × 25 mm glass substrate coupons was purchased from Graphene Supermarket (USA). Glass coverslips measuring 18 × 18 × 0.1 mm (width × length × thickness) were purchased from Menzel-Gläser (Germany) for use as reference substrates. Samples of the human cervix adenocarcinoma HeLa cell line were purchased from the American-type Culture Collection (ATCC, USA) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% PEN/STR – penicillin 10 000 U mL⁻¹/streptomycin 10 000 µg mL⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, USA). Millipore water (USA) with a conductivity of 0.06 µS cm⁻¹, diiodomethane (99% pure, ACS reagent grade, Sigma-Aldrich, Germany), and ethylene glycol (p.a., Lach-Ner, Czech Republic) were used as wetting liquids for contact angle measurements. PBS buffer (0.1 M, pH 7.4) for impinging jet experiments was prepared using potassium dihydrogen phosphate (p.a., Penta, Czech Republic), dipotassium phosphate (p.a., Sigma-Aldrich, Germany), potassium chloride (p.a., Penta, Czech Republic), and sodium chloride (p.a., Penta, Czech Republic).

Methods

The surface wettability of graphene, GO, and glass was determined by static contact angle of wetting measurements based on axisymmetric drop shape analysis, which was performed using a Krüss DSA 30 (Krüss GmbH, Germany) instrument. All measurements were performed with 3 µL of wetting liquid, and all tests were repeated 7× at 22 °C. The surface free energy of the tested substrates was calculated from the average static contact angles for water, diiodomethane, and ethylene glycol according to the Owens, Wendt, Rabel, and Kaelble extended Fowkes theory.³⁷

The topology of the studied surfaces was characterized by AFM. Images were acquired using an NTegra Spectra AFM instrument (NT-MDT, Russian Federation) with VIT_P probes (NT-MDT, Russia). The probes' free resonance frequency was around 300 kHz for operation in semi-contact mode. The set point for amplitude modulation mode was approximately 50% of the free oscillation amplitude under ambient conditions of 49% humidity at 23 °C. The image lines were scanned at 0.3 Hz. The glass substrates bearing graphene and GO monolayers were imaged by AFM under the same experimental conditions. The images of the tested surfaces were analyzed using software provided by NT-MDT and the Gwyddion software package (Czech Metrology Institute, Czech Republic). Image enhancement was performed to reduce obvious thermal drift between fast scanning lines and to compensate for potential creep and hysteresis in the AFM scanner.

The chemical composition of the tested surfaces was determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Raman spectroscopy. Raman spectra were recorded using a DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, USA) equipped with a thermoelectrically cooled charge-coupled device camera (maintained at -50 °C) and a 10× objective. All spectra were measured at room temperature on a glass slide. Raman spectra were measured with an excitation line at 633 nm (He-Ne gas laser) and were acquired over a wavenumber range of 400 to 1800 cm⁻¹. The laser light power incident on the samples was adjusted to 5.0 mW and the slit length was set to 50 mm. The number of exposures per sample was 32, with an accumulation time of 1 s per repetition. XPS experiments were performed using a PHI VersaProbe II XPS system (Physical Electronics) with a 15 kV 50 W monochromatic Al-Kα source producing a photon energy of 1486.7 eV. The analyzed area of each sample was a spot 200 µm in diameter. All spectra were acquired in vacuum (1.3 × 10⁻⁸ Pa) at room temperature (20 °C). The survey scan spectra were acquired with a pass energy of 187.85 eV over a binding energy range of 0 to 1300 eV with an electron volt step of 0.8 eV. High resolution spectra were acquired using a pass energy of 23.5 eV and an electron volt step of 0.2 eV. Dual beam compensation was used in all experiments. The resulting spectra were evaluated using MultiPak (version 9.4.0.7.; Ulvac – PHI, Inc., USA). All binding energies were referenced to the C 1s carbon peak at 284.8 eV. Samples were mounted on the sample holder using double-sided non-fluorinated tape.

GO was prepared by oxidizing a CVD graphene layer on a glass substrate using a cold atmospheric plasma generated by diffuse coplanar surface barrier discharge (DCSBD) (Ceplant, Czech Republic) at atmospheric pressure in ambient air. The treatment time was 20 s with a generator power of 350 W.

Studied cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. For microscopic examination HeLa cells (5×10^3) cells per mL were trypsinized and seeded on the glass, graphene and GO substrates inserted in 6-well polystyrene plate. After 48 h incubation, the slides were removed from the growth medium, washed with phosphate buffer solution (PBS), and fixed on a microscopic holder. Images of the resulting cell cultures on the different substrates were obtained using an Olympus IX 70 inverted microscope (Olympus, Japan) with a magnification of 10 \times .

Cell detachment experiments were performed using the impinging jet method. Our instrument setup was based on the setup designed by Dabros, van de Ven and Adamczyk.^{38–40} The volumetric flow rate of the Q was controlled by adjusting the vertical position of the flask containing the PBS solution and changing the diameter of the inlet capillary. The detachment process was observed using an SM5 microscope (Intraco Micro, Czech Republic) with 10 \times magnification at 37 °C. The flow regime was adjusted to maintain an approximately constant Re of ≈ 40.5 in all experiments. All experiments were repeated three times.

Results and discussion

Surface characterization

We begin by describing the chemical composition, topology, wettability and surface energy of the studied substrates because these features have important effects on the extent and strength of cell adhesion to material surfaces.⁴¹ XPS survey spectra showed that the graphene samples consisted primarily of carbon and contained only a small amount of oxygen (ESI Fig. S1†). Graphene-coated glass sheets exhibited significantly increased oxygen contents after cold plasma treatment, consistent with graphene oxidation.⁴² The peaks at binding energies of 286.2 and 288.1 eV observed in the high resolution XPS spectra (Fig. 1a and b) correspond to the oxygen-containing functional groups C–O and C=O, respectively, which were grafted onto the graphene surface. Plasma treatment also greatly reduced the intensity of the sp² C peak and caused it to be down-shifted from 284.8 eV to 283.7 eV. The relative abundance of oxygen-containing groups increased from 17.8% in graphene to 43.5% in GO (Table 1). The different chemical compositions of the two materials were also reflected in their Raman spectra. The Raman spectra of graphene and GO both featured typical G, D, and 2D bands (Fig. 1c and d). The 2D band of graphene is sharp and symmetric, and its I_{2D}/I_G ratio of 3.7 was greater than 2, indicating that the samples consisted of single-layer graphene.^{43–45} However, the presence of the D band and an I_D/I_G ratio of 0.19 indicates the presence of some structural defects, which can

be attributed to partial graphene oxidation (Fig. 1a). The spectrum of GO reflects its structure, which is rich in sp³ defects. These defects are responsible for its high I_D/I_G ratio of 2 and the red-shift of its G band by ~ 21 cm⁻¹ relative to graphene. These observations are fully consistent with the XPS data.

The surface topography and roughness of each material was analyzed using AFM (Fig. 1e and f). The roughness of graphene was 1.28 nm, and that of GO was 1.25 nm. The similarity of these values shows that the cold plasma treatment did not affect the samples' surface morphology. This is important because it means that the cell adhesion experiments were performed on surfaces with similar nanoscale morphologies but different surface chemistry.

As mentioned in the introduction, cell/substrate adhesion depends strongly on the polarity, surface free energy (SFE), and wetting properties of the substrate, as well as its ability to adsorb mediating extracellular matrix (ECM) proteins such as collagen, vitronectin, fibronectin, and laminin.⁴⁶ These proteins bind to hydrophobic surfaces at relatively high concentrations. However, they adsorb to these surfaces in rigid and denatured forms because of intramolecular protein–protein and intermolecular protein–substrate interactions. This reduces cell adhesion and growth. Conversely, hydrophilic surfaces have a greater tendency to adsorb these proteins in their native form, increasing cell adhesion.^{47,48} The equilibrium water contact angle on graphene is $93.3^\circ \pm 1.1^\circ$, in keeping with the hydrophobic character of its surface (Table 2 and Fig. 1g). The measured water contact angle of GO samples formed by cold plasma treatment was significantly lower ($42.9^\circ \pm 5.9^\circ$), indicating that the originally hydrophobic graphene surface had become more hydrophilic due to surface oxidation (Table 2 and Fig. 1h). The magnitude of this change was quantified by calculating SFE values including polar and dispersive components for both surfaces (Table 3). The SFE of graphene was 36.3 ± 1.5 mJ m⁻², while that of GO was 46.9 ± 9.4 mJ m⁻². Because the oxidation process introduced polar oxygen-containing groups onto the graphene surface (Fig. 1b), the polar component of the SFE increased from 0.72 ± 0.27 mJ m⁻² for graphene to 8.3 ± 3.2 mJ m⁻² for GO. The cold plasma treatment thus made the graphene surface hydrophilic. These changes favor cell adhesion and support cellular growth and spread⁴¹ because the oxygen-containing functional groups on the GO surface enable the formation of stabilizing electrostatic and hydrogen bonding interactions with bound ECM proteins. With changing of GO oxidation grade (*i.e.* concentration of oxygen containing groups on the surface) it is possible to control apparent water contact angles, hence moderate cell adhesion.²³ Contact angle measurements (Table 2) indicated that the graphene surface was more hydrophobic than glass. However, graphene is a better substrate for cellular adhesion and growth because its π -electron cloud interacts favorably with the hydrophobic cores of ECM binding proteins.^{49,50}

Impinging jet experiments on HeLa cell detachment

Optical microscope images of cells growing on the tested substrates after 48 hours of cultivation are shown in Fig. 2a and b.

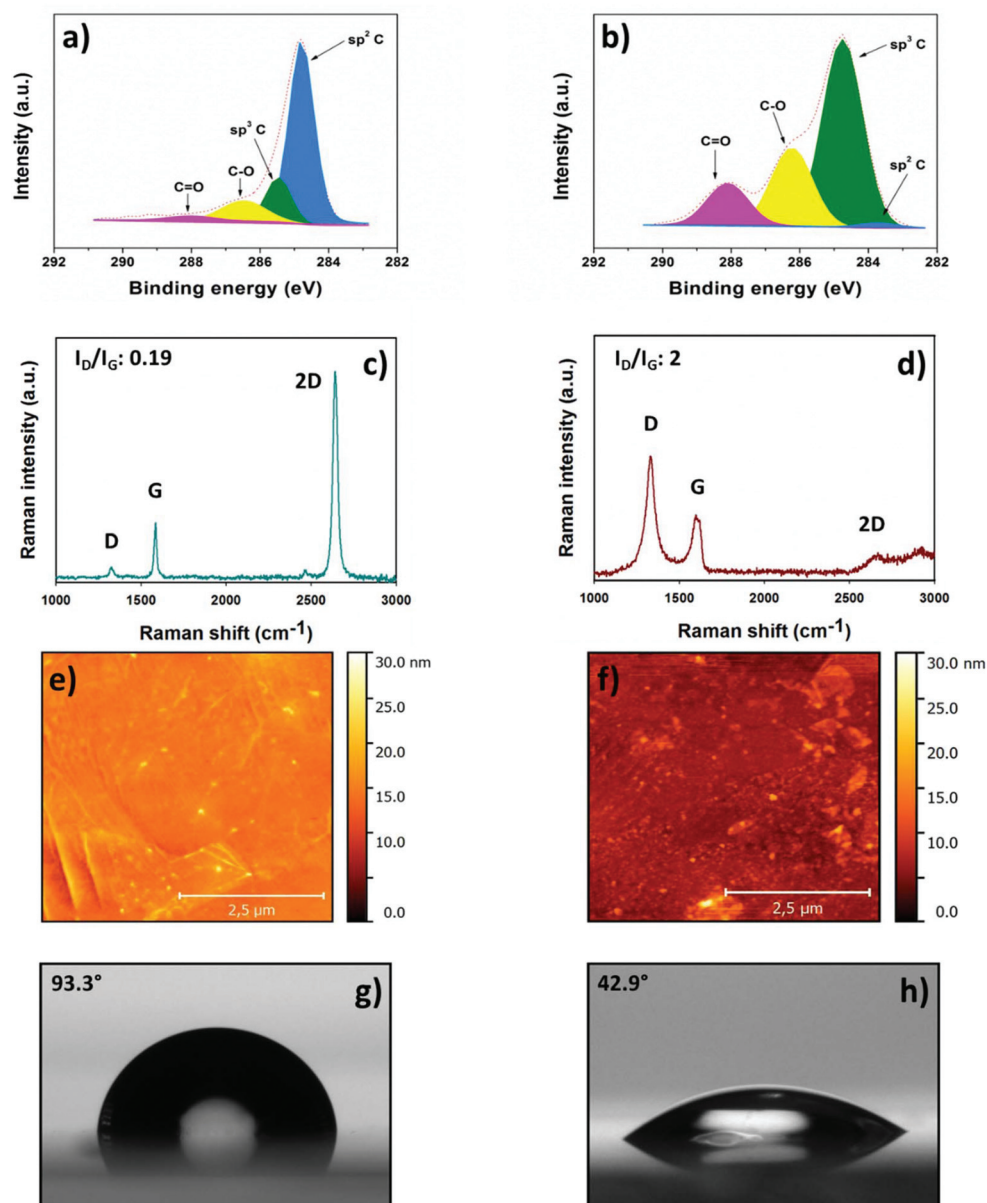


Fig. 1 Measured and fitted high resolution C 1s XPS spectra of graphene (a) and GO formed by 20 s plasma treatment (b); measured Raman spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 632.8$ nm) of graphene (c) and GO formed by 20 s plasma treatment (d); topographic mapping images of the graphene (e) and GO (f) substrates obtained by AFM; images used to determine the static sessile drop contact angles of wetting for water on graphene (g) and GO (h).

Table 1 Chemical composition of the surface (expressed as the percentage of carbon centers having the indicated character) and observed ratios of sp^2 to sp^3 carbon centers for graphene and GO

Sample	Relative chemical composition (%) and sp^2/sp^3 ratio					
	sp^2 C	sp^3 C	C-O	C=O	O-C=O	sp^2/sp^3
Graphene	66.7	15.6	12.3	2.7	2.8	4.3
Graphene oxide	3.0	53.4	29.1	12.4	2.0	0.06

Table 2 Static contact angles of wetting (θ) for the graphene, GO, and glass substrates, as determined by axisymmetric drop shape measurements at 24 °C

Sample	Contact angle of wetting θ (°)		
	Water	Diiodomethane	Ethylene glycol
Graphene	93.3 ± 1.1	47.3 ± 1.5	68.0 ± 3.3
Graphene oxide	42.9 ± 5.9	40.6 ± 2.2	27.6 ± 1.4
Glass	52.6 ± 4.2	56.6 ± 1.8	44.4 ± 4.5

Table 3 Total surface free energies of the substrates together with the polar and dispersive components calculated by the Owens–Wendt approach

Sample	Surface free energy (mJ m^{-2})		
	Total	Polar	Dispersive
Graphene	36.3 ± 1.5	0.7 ± 0.3	35.6 ± 1.2
Graphene oxide	46.9 ± 9.4	8.3 ± 3.2	38.7 ± 5.9
Glass	43.2 ± 11.7	30.1 ± 4.5	13.2 ± 7.2

There are clear differences between the substrates with respect to the number of adhered cells: the cells achieved 80% confluence on GO ($520 \text{ cells per mm}^2$), 60% on graphene ($390 \text{ cells per mm}^2$), and 40% on glass ($255 \text{ cells per mm}^2$), (see ESI†). Mitosis was visible in all samples, indicating that the cells behaved normally during cultivation.

Impinging jet experiments were performed to characterize the detachment kinetics of cells adhering to each substrate (Fig. 2c and d). Detachment was induced by a laminar hydrodynamic flow with $\text{Re} \approx 40.5$, corresponding to a tangential force of 9.5 nN .³⁵ The time required for detachment of 80% of the adhering cells from graphene was $90 \pm 8.7 \text{ s}$, while that for glass was $68.6 \pm 6.6 \text{ s}$ (see ESI†). However, the time required to achieve 80% detachment from the GO substrate was $168 \pm 16.3 \text{ s}$, *i.e.* almost twice that for the graphene surface. These results confirm earlier reports that GO is an effective substrate for mammalian cell adhesion.⁵¹ The detachment kinetics observed for graphene (Fig. 2c) exhibit two-step process and three-step process for glass (see ESI†). In the case of graphene, the number of cells remaining on the substrate initially fell rapidly but then declined at a slower steady rate. Conversely, detachment from GO (Fig. 2d) appeared to proceed in a single step, with the cells exhibiting no detectable detachment for an extended period.

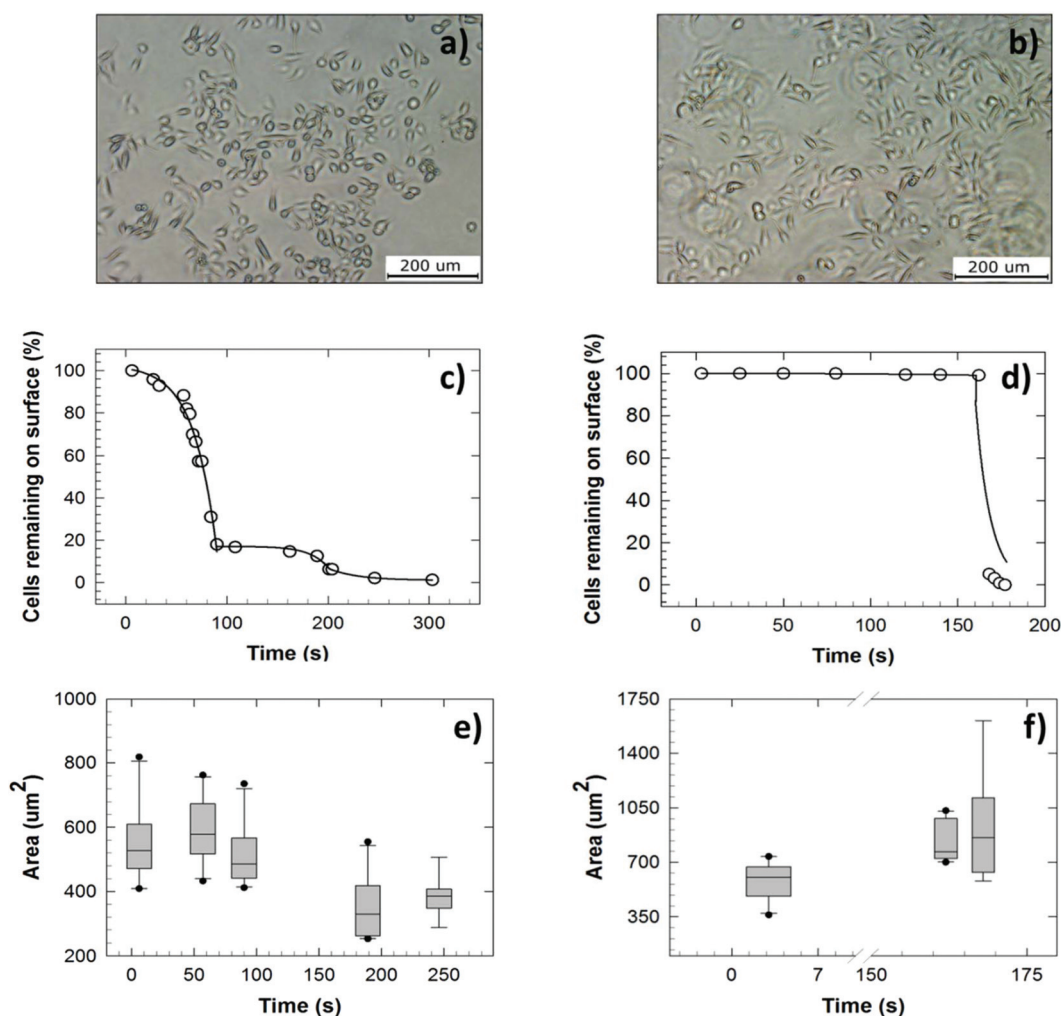


Fig. 2 Top row: HeLa cells after 48 hours' cultivation on graphene (a) and GO (b) substrates. Images were acquired using an Olympus IX 70 microscope at 10x magnification. Inset scale bar: 200 μm. Middle row: impinging jet detachment kinetics of HeLa cells on graphene (c) and GO (d) surfaces. Experiments were performed with populations of hundreds of cells. Bottom row: the relationship between the projected areas of HeLa cells and their detachment time on graphene (e) and GO (f) substrates.

Interestingly, cells with smaller projected areas after spreading detached more readily from GO (see Fig. 2e and f) and glass (see ESI†) than more widely spread cells. We assume that cells with smaller projected areas have fewer bonds between cellular receptors and ECM binding proteins, so the adhesion force declines proportionally to the projected area.⁵² However, in experiments with the graphene substrate, cells with smaller projected areas detached less readily than those with larger projected areas, and thus presumably formed stronger adhesive bonds.

Conclusions

We performed cellular detachment experiments using HeLa cancer cells adhering to graphene and GO substrates. The chemical composition, morphology, and surface energy of both substrates were characterized by XPS, Raman, AFM, and contact angle techniques, while the hydrodynamic impinging jet method was used to analyze the detachment of HeLa cells. The strong adhesion of HeLa cells to GO showed that surface wettability is a key determinant of cell adhesion. Moreover, the high detachment time of HeLa cells on GO surfaces suggests that this material could be used as a cell adhesion enhancer and may be well suited for constructing biosensors for cancer diagnosis, cell detachment from GO was induced by force of 9.4 nN. Our results also indicate that cell detachment from graphene proceeds *via* a two-stage process, with the first stage corresponding to detachment from the unfunctionalized graphene surface and the second corresponding to detachment from regions containing oxygen impurities. Finally, adhered cells with larger contact areas were found to detach preferentially from the graphene substrate but showed the opposite behavior on GO and glass surfaces.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000754), an internal grant from Palacký University Olomouc (IGA_PrF_2018_032), and the OP PIK program of the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (grant no. CZ.01.1.02/0.0/0.0/16_084/0010256) are all gratefully acknowledged, as is funding *via* the European Union's Horizon 2020 research and innovation program to M. O. under grant agreement no. 683024 (ERC-CoG). The authors offer special thanks to A. Opletalová for the acquisition of Raman spectra.

References

- L. Liu, L. H. Klausen and M. Dong, *Nano Today*, 2018, **23**, 40–58.
- J. Liu, L. Cui and D. Losic, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 9243–9257.
- S. Some, A. R. Gwon, E. Hwang, G. H. Bahn, Y. Yoon, Y. Kim, S. H. Kim, S. Bak, J. Yang, D. G. Jo and H. Lee, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 1–9.
- V. Georgakilas, J. N. Tiwari, K. C. Kemp, J. A. Perman, A. B. Bourlinos, K. S. Kim and R. Zboril, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 5464–5519.
- E. Nishida, H. Miyaji, A. Kato, H. Takita, T. Iwanaga, T. Momose, K. Ogawa, S. Murakami, T. Sugaya and M. Kawanami, *Int. J. Nanomed.*, 2016, **11**, 2265–2277.
- Z. Zhang, L. H. Klausen, M. Chen and M. Dong, *Small*, 2018, **14**, 1801983.
- L. Gao, C. Lian, Y. Zhou, L. Yan, Q. Li, C. Zhang, L. Chen and K. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **60**, 22–29.
- A. M. H. Ng, Kenry, C. Teck Lim, H. Y. Low and K. P. Loh, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **65**, 265–273.
- X. Yu, H. Cheng, M. Zhang, Y. Zhao, L. Qu and G. Shi, *Nat. Rev. Mater.*, 2017, **2**, 1–14.
- E. Morales-Narváez, A. R. Hassan and A. Merkoçi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 13779–13783.
- Z. Zhang, R. Xu, Z. Wang, M. Dong, B. Cui and M. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 34736–34743.
- Y. A. Cheon, J. H. Bae and B. G. Chung, *Langmuir*, 2016, **32**, 2731–2736.
- Y. Zeng, Z. Yang, H. Li, Y. Hao, C. Liu, L. Zhu, J. Liu, B. Lu and R. Li, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1–10.
- K. Yang, L. Feng, X. Shi and Z. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 530–547.
- K. P. Loh, D. Ho, G. N. C. Chiu, D. T. Leong, G. Pastorin and E. K.-H. Chow, *Adv. Mater.*, 2018, 1802368, DOI: 10.1002/adma.201802368.
- D.-K. Ji, C. Ménard-Moyon and A. Bianco, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2018, DOI: 10.1016/j.addr.2018.08.010.
- A. K. Geim and K. S. Novoselov, *Nat. Mater.*, 2007, **6**, 183–191.
- M. Allen, *Am. Chem. Soc.*, 2009, 184.
- X. Huang, Z. Yin, S. Wu, X. Qi, Q. He, Q. Zhang, Q. Yan, F. Boey and H. Zhang, *Small*, 2011, **7**, 1876–1902.
- R. Guazzo, C. Gardin, G. Bellin, L. Sbricoli, L. Ferroni, F. Ludovichetti, A. Piattelli, I. Antoniac, E. Bressan and B. Zavan, *Nanomaterials*, 2018, **8**, 349.
- K.-C. Lin, M.-W. Lin, M.-N. Hsu, G. Yu-Chen, Y.-C. Chao, H.-Y. Tuan, C.-S. Chiang and Y.-C. Hu, *Theranostics*, 2018, **8**, 2477–2487.
- Kenry, P. K. Chaudhuri, K. P. Loh and C. T. Lim, *ACS Nano*, 2016, **10**, 3424–3434.
- J.-T. Jeong, M.-K. Choi, Y. Sim, J.-T. Lim, G.-S. Kim, M.-J. Seong, J.-H. Hyung, K. S. Kim, A. Umar and S.-K. Lee, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 33835.
- N. Mauro, C. Scialabba, G. Pitarresi and G. Giammona, *Int. J. Pharm.*, 2017, **526**, 167–177.
- T. Naganuma, *Nanoscale*, 2017, **9**, 13171–13186.
- S. Wang, H. Wang, J. Jiao, K. J. Chen, G. E. Owens, K. I. Kamei, J. Sun, D. J. Sherman, C. P. Behrenbruch,

- H. Wu and H. R. Tseng, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 8970–8973.
- 27 P. L. Johansen, F. Fenaroli, L. Evensen, G. Griffiths and G. Koster, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 1–8.
- 28 C. D. Reyes and A. J. García, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2003, **67**, 328–333.
- 29 T. D. Nguyen and Y. Gu, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 1–13.
- 30 G. A. Truskey and J. S. Pirone, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, **24**, 1333–1353.
- 31 S. C. Kuo and D. A. Lauffenburger, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 2191–2200.
- 32 R. S. Cargill, K. C. Dee and S. Malcolm, *Biomaterials*, 1999, **20**, 2417–2425.
- 33 L. Lapčík, M. Fraštkík and B. Lapčíková, *Int. J. Heat Mass Transfer*, 2012, **55**, 1513–1518.
- 34 J. Vlček, L. Lapčík, J. Čech and B. Lapčíková, *Int. J. Heat Mass Transfer*, 2014, **78**, 416–422.
- 35 Z. Adamczyk, *Particles at Interfaces: Interactions, Deposition, Structure*, Academic Press, 2006.
- 36 S. A. M. Shazly, M. H. Murad, S. C. Dowdy, B. S. Gostout and A. O. Famuyide, *Gynecol. Oncol.*, 2015, **138**, 457–471.
- 37 D. Kwok, D. Li and A. Neumann, *Langmuir*, 1994, **10**, 1323–1328.
- 38 Z. Adamczyk, B. Siwek and P. Warszy, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **24**, 14–24.
- 39 T. G. M. Vandeven and T. Dabros, *Colloid Polym. Sci.*, 1983, **261**, 697–707.
- 40 T. Dąbroś and T. G. M. Van De Ven, *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, **89**, 232–244.
- 41 L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml and V. Svorcik, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 739–767.
- 42 J. P. Froning, P. Lazar, M. Pykal, Q. Li, M. Dong, R. Zbořil and M. Otyepka, *Nanoscale*, 2017, **9**, 119–127.
- 43 K. Krishnamoorthy, M. Veerapandian, K. Yun and S.-J. Kim, *Carbon*, 2013, **53**, 38–49.
- 44 Z. Ni, Y. Wang, T. Yu and Z. Shen, *Nano Res.*, 2008, **1**, 273–291.
- 45 A. C. Ferrari and D. M. Basko, *Nat. Nanotechnol.*, 2013, **8**, 235–246.
- 46 L. Bačáková, V. Švorčík, V. Rybka, I. Miček, V. Hnatowicz, V. Lisá and F. Kocourek, *Biomaterials*, 1996, **17**, 1121–1126.
- 47 B. G. Keselowsky, D. M. Collard and A. J. García, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2003, **66**, 247–259.
- 48 G. Anand, S. Sharma, A. K. Dutta, S. K. Kumar and G. Belfort, *Langmuir*, 2010, **26**, 10803–10811.
- 49 W. C. Lee, C. H. Y. X. Lim, H. Shi, L. A. L. Tang, Y. Wang, C. T. Lim and K. P. Loh, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7334–7341.
- 50 M. Kalbacova, A. Broz, J. Kong and M. Kalbac, *Carbon*, 2010, **48**, 4323–4329.
- 51 O. N. Ruiz, K. A. S. Fernando, B. Wang, N. A. Brown, P. G. Luo, N. D. McNamara, M. Vangsness, Y.-P. Sun and C. E. Bunker, *ACS Nano*, 2011, **5**, 8100–8107.
- 52 G. A. Truskey and T. L. Proulx, *Biomaterials*, 1993, **14**, 243–254.

Electronic Supplementary Information

Flow induced HeLa cell detachment kinetics show that oxygen-containing functional groups in graphene oxide are potent cell adhesion enhancers

*Jakub Vlček,^a Lubomír Lapčík,^{*a,b} Markéta Havrdová,^a Kateřina Poláková,^a Barbora Lapčíková,^{a,b} Tomáš Opletal,^c Jens P. Froning^a and Michal Otyepka^{a*}*

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Department of Food Technology, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Czech Republic

^c Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

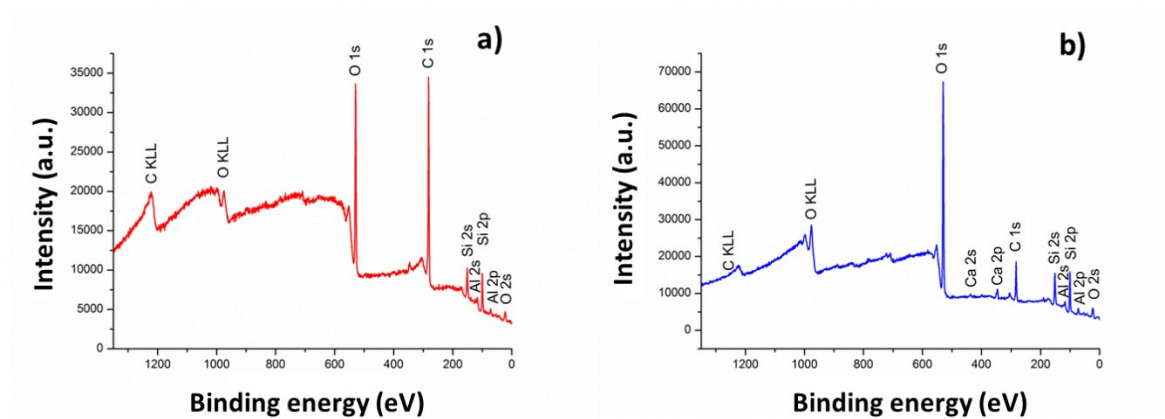


Fig. S1 Measured XPS survey spectra of graphene (a) and GO formed by 20 s plasma treatment (b).

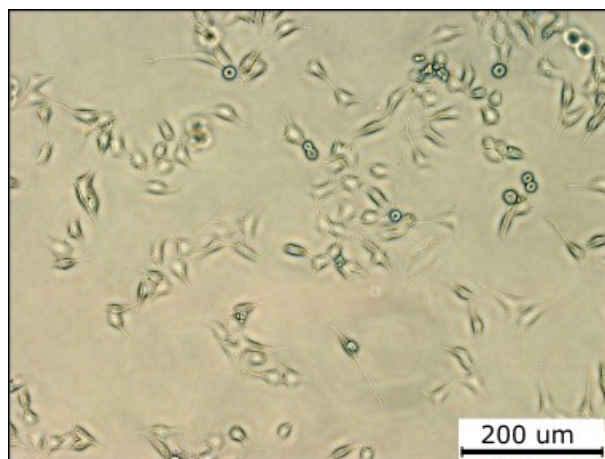


Fig. S2 HeLa cells after 48 hours' cultivation on glass substrate. Image was acquired using an Olympus IX 70 microscope at 10 \times magnification. Inset scale bar: 200 μm .

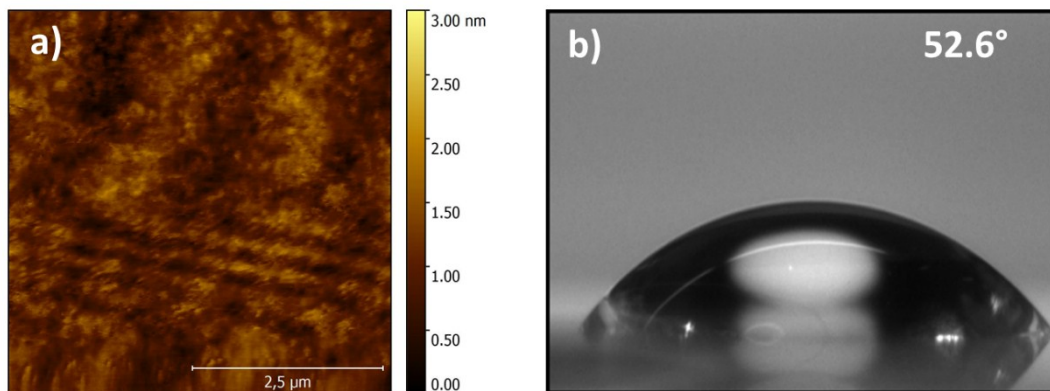


Fig. S3 Topographic mapping image of the glass substrate obtained by AFM (a); image used to determine the static sessile drop contact angle of wetting for water on glass (b).

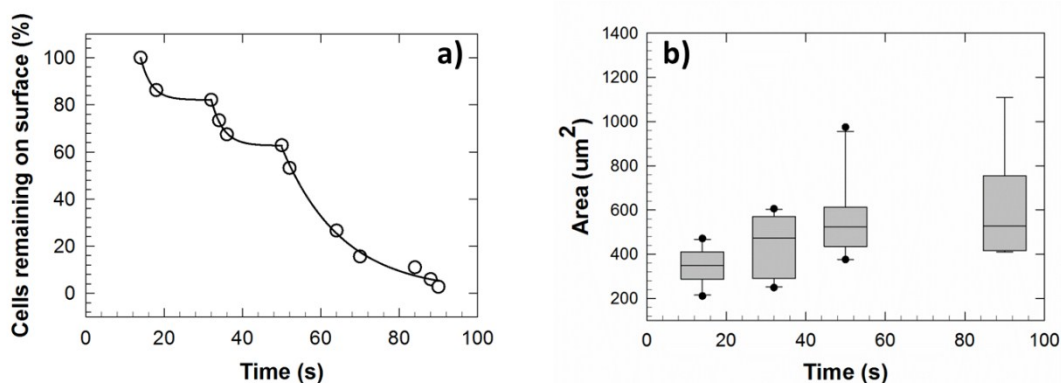
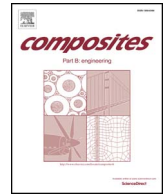


Fig. S4 Impinging jet detachment kinetics of HeLa cells on glass surface (a). Experiments were performed with populations of hundreds of cells; the relationship between the projected areas of HeLa cells and their detachment time on glass substrate (b).

Příloha C

Effect of filler particle shape on plastic-elastic mechanical behavior of high density poly(ethylene)/mica and poly(ethylene)/wollastonite composites



Effect of filler particle shape on plastic-elastic mechanical behavior of high density poly(ethylene)/mica and poly(ethylene)/wollastonite composites

Lubomír Lapčík^{a,b,*}, David Maňas^{a,1}, Barbora Lapčíková^{a,b}, Martin Vašina^{a,c}, Michal Staněk^a, Klára Čépe^b, Jakub Vlček^b, Kristian E. Waters^d, Richard W. Greenwood^e, Neil A. Rowson^e

^a Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Nam. T.G. Masaryka 275, 760 01 Zlín, Czech Republic

^b Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^c VŠB-Technical University of Ostrava, Department of Hydromechanics and Hydraulic Equipment, Faculty of Mechanical Engineering, 17. Listopadu 15/2172, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic

^d Department of Mining and Materials Engineering, McGill University, M.H. Wong Building, 3610 University Street, Montreal H3A 0C5, Québec, Canada

^e School of Chemical Engineering, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

HDPE
Mica
Wollastonite
Impact testing
Tensile testing
Vibration damping
SEM
Thermal analysis

ABSTRACT

It was found in this study that both fillers (mica and wollastonite) trigger an increase in Young's modulus of elasticity with increasing filler concentration in a HDPE composites matrix. In the case of HDPE/mica the same improvement was also found for the upper yield point vs. filler concentration dependencies indicating higher stiffness. However, for the HDPE/wollastonite composites the opposite trend was observed, i.e. a decrease of the upper yield point and strain at break. These findings were also confirmed by mechanical vibration damping testing where there was found a more intense shift of the first resonance frequency peak position to higher frequencies with increasing filler concentrations for HDPE/mica in comparison to HDPE/wollastonite composites. Both composites exhibited decreasing strain at break with increasing filler concentration indicating a more brittle mechanical behavior in comparison to the virgin HDPE polymer matrix. However, for HDPE/wollastonite composites at 5 w. % filler concentration a 15% increase in the magnitude of the strain at break was found indicating an increase in ductility at 50 mm/min deformation rate. Fracture toughness measurements show, that both studied fillers function as the stress concentrators in the HDPE polymer matrix, which was reflected in the exponentially decreasing dependencies of the fracture toughness vs. filler concentrations. SEM analysis of the fracture surfaces show typical elongation bands of high plasticity deformation regions characteristic of typical shearing bands, interpenetrated with cavities created around filler particles. Thermal analysis data showed for HDPE/mica a strong increase of the crystallinity with increasing filler concentration, however in the case of HDPE/wollastonite the opposite effect of a higher amorphous polymer phase content was found.

1. Introduction

At the present time, the engineering and materials science interests in automotive and aerospace industries are focused on the development and application of composite structures in construction of complex products exhibiting specific physico-chemical and material properties [1]. One of the aims is to obtain the elasto-mechanical behavior of complex structures to be capable to withstand the applied external mechanical loads without damage of the individual structural components. Traditional reinforcing fillers such as glass, carbon [2–4], boron fibers, calcium carbonate [5], carbon black, titanium dioxide, kaolin

[6], silicon dioxide, wollastonite [7] and mica particles were added to polyolefin matrices to improve their rigidity, high temperature resistance, toughness etc. [8–12]. Furthermore, there were numerous applications of novel fillers in the production of polyethylene based composites, such as carbon nanotubes [13], cellulose fibers of different nature [14–16], metal powders [17,18], peat ash [19] etc. Thermoplastics, such as poly (ethylene) (PE) can offer useful mechanical, chemical, electrical properties, with low density, high formability and the ability to be recycled. Due to its low price per unit volume and its unique physico-chemical properties it is therefore, the world's number one per volume most used thermoplastic [6]. This semi-crystalline

* Corresponding author. Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic.

E-mail address: lapcicl@seznam.cz (L. Lapčík).

¹ Deceased 16.9.2017.

polymer can be classified according its density and divided into four groups: high density polyethylene (HDPE), low density polyethylene (LDPE), linear low density polyethylene (LLDPE), and very low density polyethylene (VLDPE). In general, semi-crystalline polymers such as HDPE are regarded as a three-phase continuum composed of an amorphous phase, a crystalline phase, and an inter-phase. The crystalline skeleton is formed by mutually connected spherulites, each of them consist of a number of crystalline lamellae with an amorphous phase located in between the crystallites and lamellae [5,20–22]. Different crystalline morphologies, such as spherulites, cylindrites, shish-kebab and fibrous crystal can be obtained with variety processing conditions [23,24]. It was found, that the type and size of the filler particles has a strong effect on the HDPE crystallization kinetics and melting behavior [25,26] as well. However, no changes in the thermal oxidation mechanism of HDPE based composites filled with different inorganic fillers (e.g. mica, wollastonite, kaolin, talc or diatomite) were found [27]. In general, stress transfer in composite matrices is affected by structural, morphological and surface properties of the filler/matrix interface [11]. It is well known, that the polymer/filler interface quality performance is essential for excellent overall composite system material/mechanical properties. The exact adjustment of the polymer matrix modulus and adhesive bond strength is vital for the final synergistic increase in mechanical strength of the resulting composite system [28]. In most cases, silane coupling agents were used to create covalent bonds between filler particles and the polymer matrix [6,28–30]. In a paper [31] a prediction of the complex modulus of elasticity was studied at various strain rates by means of dynamic mechanical analysis. There was found a linear viscoelastic response to a given strain history. The paper of Xiang et al. [12] was studying DMA (Dynamic Mechanical Analysis) of HDPE/mica composites in a single cantilever mode at a frequency of 1 Hz. Tested composites were prepared by a dynamic packing injection molding (DPIM) technique allowing proper control of the central and skin layers of the prepared testing articles. They proposed the effect of the additional mica delamination induced by the injection flow and its orientation within the flow direction, allowing thus HDPE macromolecules melted matrix its intercalation in between galleries of mica layers under applied shear conditions. As a result, an increased storage modulus was found reflecting higher stiffness of the DPIM prepared HDPE/mica composite materials.

In this study, the mechanical properties of composites prepared from commercially available filler materials of mica (muscovite type) and wollastonite in HDPE matrix were investigated. Mica belongs to a group of silicate minerals, with the most common being muscovite ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$). Micas are used as a filler in insulators, condensers, plastics, cosmetics and paints. Micas are sheet silicate minerals whose TOT-type (tetrahedral-octahedral-tetrahedral) sheets are made of two tetrahedral layers sandwiching an octahedral layer. The tetrahedral layers consist of a hexagonal pavement of tetrahedra (SiO_4)⁴⁻ in which each tetrahedron shares three apexes with the neighboring tetrahedra: the chemical composition of such layers is (Si_4O_{10})⁴⁻. In each sheet, the tetrahedra of the upper tetrahedral layer point downwards, and the ones of the lower tetrahedral sheet point upwards [32]. The most prominent characteristic of mica is nearly a perfect basal cleavage. Wollastonite is a calcium silicate (CaSiO_3) industrial mineral, which is commonly used as a filler in paints and plastics [33,34]. It is also used in the construction industry as a substitute for asbestos; ceramic applications including ceramic glazes and bodies; in metallurgical applications wollastonite is commonly added to formulated powders for steel casting and welding. It is the only naturally occurring needle-shaped crystal, and the shape is an important economic aspect of wollastonite, with highly acicular samples being most expensive. There are three polymorphs: triclinic pseudowollastonite of very high temperature (above 1120 °C), monoclinic wollastonite-2M and triclinic wollastonite-Tc at lower temperatures. The usual form of wollastonite is the triclinic form.

As mentioned above, the reinforcing platelet shaped silicates in

polymeric materials have been widely used due to their high aspect ratio, the effect of two-dimensional reinforcing as well as the overall materials cost reducing effect. However, the majority of the studies were performed in the static mechanical tensile testing configurations. Hence the better knowledge of the dynamic-mechanical performance at a wide frequency range is missing. This paper aims to study the effect of planar shape mica and prism shape wollastonite filler particles in HDPE polymer composites, specially investigating the mechanical properties (both static and dynamic in a frequency range of 2–3200 Hz), and the thermal and fracture mechanical behaviors. This will be combined with SEM analysis.

2. Materials and processing

High density poly (ethylene) (HDPE) type 25055E (The Dow Chemical Company, USA) was purchased in the form of white pellets (lot. No. 1119091333). As filler particles the inorganic minerals muscovite mica (Imerys, Kings Mountains, USA) (specific surface area of 9.7 m²/g, d_{50} of 17 μm, aspect ratio of 1.7) and wollastonite type VANSIL W-10 (Vanderbilt Minerals, Norwalk, USA) (specific surface area of 0.5 m²/g, d_{50} of 49 μm, aspect ratio of 13.5) were used. There were prepared 250 composites samples of each filler type (dog bone shape for tensile testing, Charpy's pendulum and vibrator testing) of virgin HDPE and 5, 10 and 15 w.% of inorganic filler concentrations of HDPE/mica and HDPE/wollastonite composites.

Composite samples were made using the injection molding technique on the injection molding machine Arburg Allrounder 420C (Germany). Parameters for the injection molding machine: 1 × 40 mm diameter rotating screw, length 800 mm ($L/D = 20$). The processing temperature ranging from 190 to 220 °C, the mold temperature was kept at 30 °C, the injection pressure was 60 MPa, and the injection rate was 20 mm/s, injection cycle time was 45 s, holding pressure time was 15 s. Studied melted matrices were filled at the central part of the mold during injection molding process, thus enhancing flux of the material in the direction of the longer side of the dog bone testing articles. There were found parallel orientations of the filler particles in the final composite testing articles by SEM analysis. (For the visualization of the flux of the polymer matrix/filler melt in the mold see Appendix A. Supplementary data). As a feed material for injection molding granules prepared by melt blending of the polymer resin and the mineral filler were used. The latter granules were prepared by means of extrusion technique on extrusion machine LABTECH engineering model LTE20-40 Scientific (Thailand). Parameters of the extrusion machine were: 2 × 20 mm diameter co-rotating screws, length 800 mm ($L/D = 40$), extrusion rate 200 rpm, feeding rate 30 rpm. For the virgin HDPE processing temperature profile ranged from 136 to 172 °C. The mica and wollastonite filled HDPE samples temperature profiles ranged from 140 to 174 °C.

Supplementary video related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.12.035>.

3. Methods

3.1. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to determine the shape and size of the studied mineral composite filler particles. SEM images were captured using a Scanning Electron Microscope Hitachi SU 6600 (Japan). The source of the electrons is Schottky cathode. This microscope has the resolution in secondary electron mode (SE) 1.3 nm and in back scattered electrons (BSE) 3 nm. For these images, the secondary electron mode (SE) and an accelerating voltage of 5 kV (Fig. 1) or 1 kV (Fig. 2) were used. The distance between sample and detector was 6 mm. Studied materials were placed on double sided carbon tape on aluminum holder. All samples were metallized by gold with the thickness of 15 nm on sputter coater Quantum Q150T, LOT-Quantum

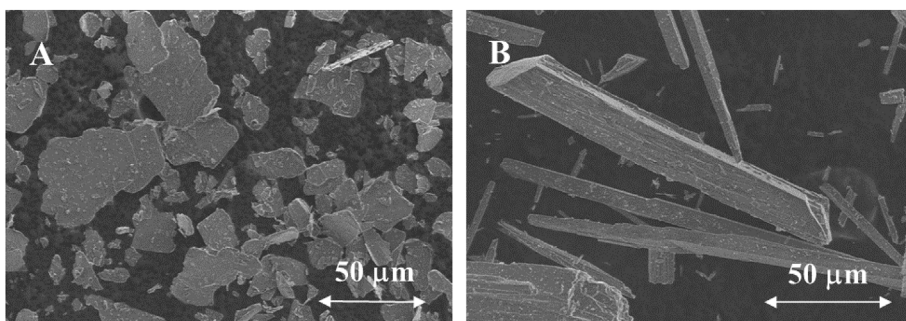


Fig. 1. SEM images of the studied composites inorganic filler materials: A – mica (aspect ratio ~1.7), B – wollastonite (aspect ratio ~13.5).

Design (Germany) prior to the SEM measurements. All captured SEM images were taken from the surface fractured sections located at the central parts of the testing articles as obtained during uniaxial tensile testing or Charpy's pendulum impact testing.

3.2. Thermal analysis

Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) experiments were performed on a simultaneous TG-DTA apparatus (Shimadzu DTG 60, Japan). Throughout the experiment, the sample temperature and weight loss were continuously monitored. The measurements were performed at a heat flow rate of 10 °C/min in a dynamic nitrogen atmosphere (50 ml/min) over the temperature range from 30 °C to 550 °C. The crystallinity X_C of the composites was calculated according to formula (1) [35,36]:

$$X_C = \frac{\Delta H_m}{(1 - c) \times \Delta H^*} \times 100 \tag{1}$$

where c is the filler concentration (as mass fraction), ΔH_m is melting enthalpy of the tested sample, ΔH^* is the melting enthalpy of 100% crystallinity HDPE (293 J/g) [35]. Each experiment was repeated five times. Tested material was taken from the injection molded samples from the central part of the dog bone shape testing articles used for uniaxial tensile testing experiments.

3.3. Uniaxial tensile testing

For tensile testing of injection-molded specimens a Zwick 1456 multipurpose tester (Germany) and Universal Testing Machine Autograph AGS-X Shimadzu (Japan) equipped with the Compact Thermostatic Chamber TCE Series were used. The measurements were performed according to the CSN EN ISO 527-1 and CSN EN ISO 527-2

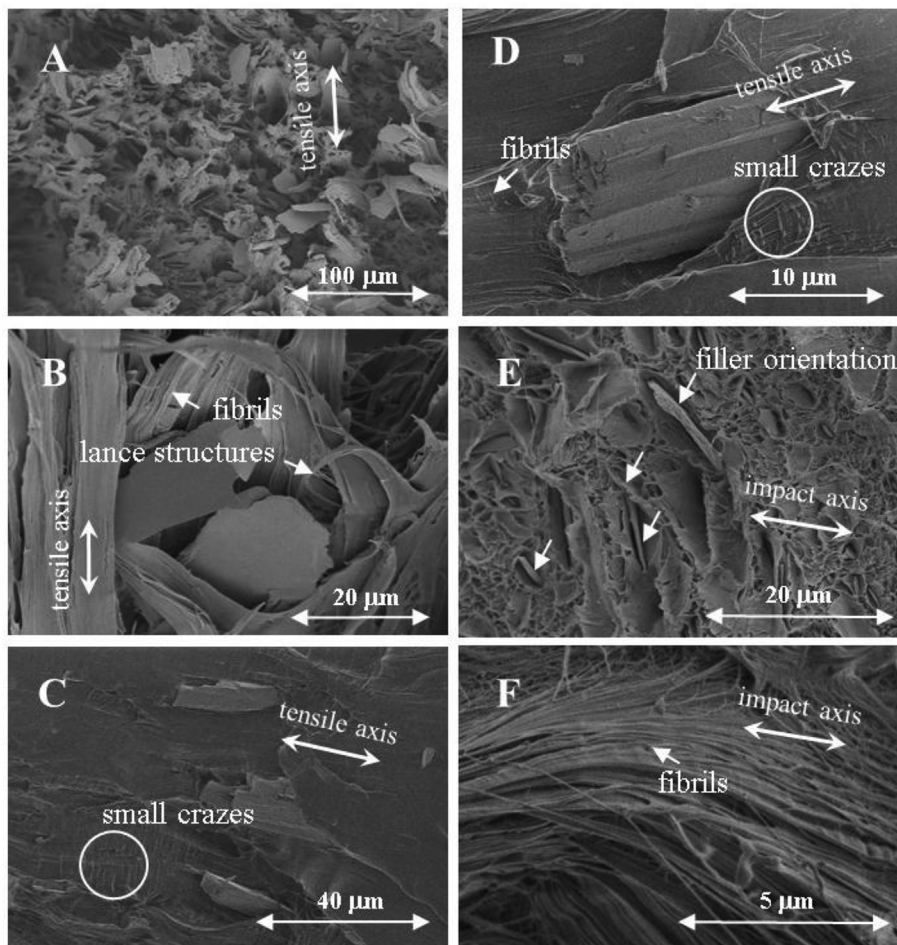


Fig. 2. SEM images of the fracture surfaces of the studied virgin HDPE, HDPE/mica and HDPE/wollastonite composite materials: A, B – HDPE/mica composites fracture surfaces after tensile testing (15 w.% mica concentration) at 50 mm/min deformation rate, C, D – HDPE/wollastonite composites fracture surfaces after tensile testing (15 w.% wollastonite concentration) at 50 mm/min deformation rate, E – HDPE/mica composite fracture surface after Charpy's pendulum impact measurement, F – virgin HDPE fracture surface after Charpy's pendulum impact measurement.

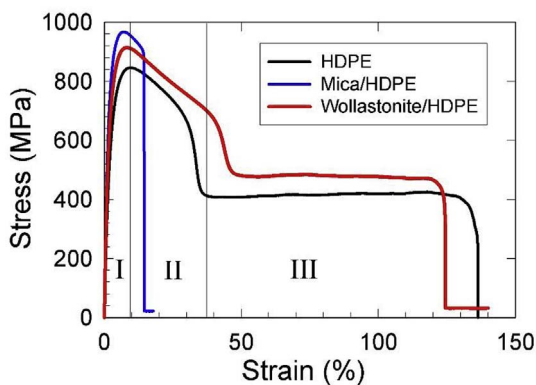


Fig. 3. Stress vs. strain dependencies of tested composites samples as obtained for 50 mm/min deformation rates at ambient temperature. Filler concentration of 10 w. %.

standards with the tested specimen gauge length of 80 mm. The specimens were strained at room temperature up to break at a test speeds of 50, 100 and 150 mm/min. From the stress–strain dependences, strength at break, Young’s modulus and strain at break were calculated. Each experiment was repeated 10 × at the ambient temperature of 22 °C and average values and standard errors were calculated.

3.4. Charpy impact testing

Impact tests were performed on Zwick 513 Pendulum Impact Tester (Germany) according to the CSN EN ISO 179-2 standard with the drop energy of 25 J. Each experiment was repeated 10 times.

3.5. Mechanical vibration damping testing

In the case of harmonic vibration, the transfer damping function *D* (dB) is given by the equation [5,37]:

$$D = 20 \cdot \log \frac{a_1}{a_2} \quad (2)$$

where *a*₁ is the acceleration amplitude on the input side of the tested material, and *a*₂ is the acceleration amplitude on the output side of the tested material. The damping properties of the investigated HDPE composites were obtained by the forced oscillation method [37–39]. The transfer damping function was experimentally measured using a BK 4810 vibrator device in combination with a BK 3560-B-030 three-channel signal pulse multi-analyzer and a BK 2706 power amplifier operating over a frequency range of 2–3200 Hz. Sine waves were generated by the vibrator device in this case. The acceleration amplitudes on the input and output sides of the investigated specimens were recorded by BK 4393 accelerometers (Brüel & Kjær, Denmark). Measurements of the transfer damping function were performed for three different mass loads (i.e., 0 g, 85 g and 500 g) located on the upper side of the periodically loaded tested materials. The tested block article dimensions were (60 × 60 × 4) mm (length × width × thickness). Each

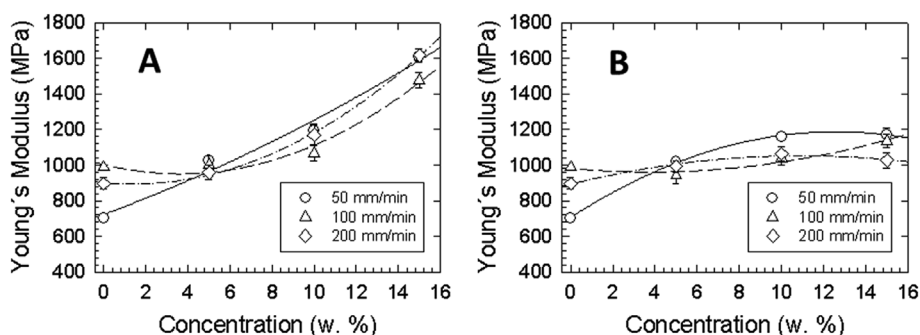


Fig. 4. Deformation rate dependencies of Young’s modulus vs. filler concentrations of HDPE composites. Filler materials: A – mica, B – wollastonite.

experiment was repeated 10 times at the ambient temperature of 22 °C.

4. Results and discussion

In Fig. 1 representative SEM analysis results are shown, indicating the planar random shape of mica filler particles of about 30 μm rectangular size and of 1.7 μm thickness and the prism shape of wollastonite filler particles of about (150 × 20 × 10) μm size (length × width × thickness). Plastically deformed fibrils [5,6,40–42] typical for HDPE tensile behavior (Fig. 2F), known as the deformation to shear yielding, were observed also for both the HDPE/mica (Fig. 2B), as well as in part for HDPE/wollastonite composites (Fig. 2D). There was a relatively weak adhesion between the filler and the matrix after stress load in both studied composites, characteristic with the occurrence of the small cavities around individual particles as observed after uniaxial tensile testing (Fig. 2B and D). Furthermore, in contrary to HDPE/mica composites, there were found small crazes oriented perpendicularly to the applied mechanical deformation in the case of HDPE/wollastonite composites, indicating better polymer/filler adhesion in comparison to mica as highlighted in Fig. 2C and D by circles. It is known from the literature, that the orientation of the craze propagation is most clearly demonstrated in tensile tests on injection-molded bars, where crazes form readily in the interior of the bar. There, the polymer macromolecule orientation is low, and the crazes propagate outwards towards the surface, where the high orientation along the length of the bar brings them to a halt [41]. The alternative mechanism of deformation to shear yielding is craze formation, which is both a localized yielding process and the first stage of fracture. When a tensile stress is applied to a glassy polymer, small holes form in a plane perpendicular to the stress, to produce an incipient crack. However, the holes become stabilized by fibrils of oriented polymeric material which span the gap and prevent it from becoming wider. The resulting yielded region consisting of an interpenetrating network of voids and polymer fibrils, is known as a craze.

There was found a presence of the delamination of the mica filler from the surrounding matrix in the form of cavities in the case of the impact damage (Fig. 2E) indicating high mechanical energy dissipative capacity of the mica particles accompanied by the lance structure of the individually localized shearing bands.

A schematic representation of the general mechanical behavior observed under uniaxial tensile deformation testing is shown in Fig. 3. Here, there were found typical stress-strain patterns characteristic for the elastic region (I), elastic plastic transition region (II) and the stress plateau draw ratio region (III) in a similar fashion as in the case of calcium carbonate hollow spheres/HDPE composites [5]. However, in the case of HDPE/mica composites these exhibit typical stiff and brittle tensile deformation behavior, in contrary to the HDPE/wollastonite and neat HDPE samples which exhibited elasto-plastic mechanical behavior. It was found, that both fillers (wollastonite as well as mica) contribute to the increase of the Young’s modulus of elasticity *E* as shown in Fig. 4. The modulus *E* was increased by about 129% for HDPE/mica composites and increased by 67% for the HDPE/wollastonite composites. In

Table 1
Thermal analysis results of the studied HDPE/mica and HDPE/wollastonite composites.

c (w. %)	HDPE/mica			HDPE/wollastonite		
	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_C (%)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_C (%)
0	137.67	172.42	58.85	137.39	182.20	62.18
5	135.72	183.15	65.80	135.41	146.13	52.50
10	135.02	172.95	65.59	134.46	162.02	61.44
15	134.90	190.89	76.65	133.81	139.24	55.91

c = filler concentration, T_m = melting temperature, ΔH_m = heat of fusion, X_C = crystallinity.

absolute values the original HDPE E was (703 ± 73) MPa. With 15 w. % HDPE/mica the modulus of the composite was (1609 ± 93) MPa and for the HDPE/wollastonite composites the modulus was (1173 ± 107) MPa, as observed at the room temperature of 22 °C and 50 mm/min deformation rate. The observed results confirmed well the known fact, that the stiff filler particles enhance the E of polymer based composites with increasing filler content in comparison to the virgin polymer matrix [43,44]. This behavior was ascribed to the higher crystallinity of the HDPE/mica polymer composites in comparison to HDPE/wollastonite composites (Table 1). Higher crystallinity polymers exhibit higher elastic properties rather than plastic, which is characteristic for amorphous polymeric systems [41]. As shown in Fig. 5, the observed upper yield fillers concentration dependencies exhibit mutually opposite linear behavior for each of the studied fillers: in the case of HDPE/mica composites the observed trend is that the upper yield was increasing with increasing filler concentration for all tested deformation rates. For the deformation rate of 50 mm/min the upper yield was increased from (891 ± 20) MPa for virgin HDPE to (952 ± 27) MPa for HDPE/mica composites. This behavior was in agreement with data observed by Liang and Yang [45]. However, for HDPE/wollastonite composites the observed upper yield dependency decreased with increasing filler concentration to (855 ± 6) MPa. A similar behavior was obtained for all tested deformation rates. These results indicate the fact, that HDPE/mica composites have higher stiffness in comparison to HDPE/wollastonite composites. Fig. 6 shows results of the filler concentration strain at break dependencies measured at three different deformation rates. It is evident, that both the composites exhibited a linear decrease of strain at break with increasing filler concentrations for 100 mm/min and 200 mm/min deformation rates, indicating a more brittle mechanical behavior in comparison to the virgin HDPE polymer. However, the HDPE/wollastonite composites at 5 w.% filler concentration exhibited a 15% increase in the magnitude of the strain at break (Fig. 6B) indicating an increase in ductility at 50 mm/min deformation rate. Observed dependency was modeled as a third order polynomial of the form of $y = 220.69 + 37.85x - 7.67x^2 + 0.29x^3$, where y is the strain at break (in %) and x is filler concentration (in w.%). For the 50 mm/min deformation rate of the HDPE/mica composites, the latter strain at break vs. concentration dependence (Fig. 6A) was modeled as $y = 220.69 - 25.23x + 1.32x^2 - 0.03$

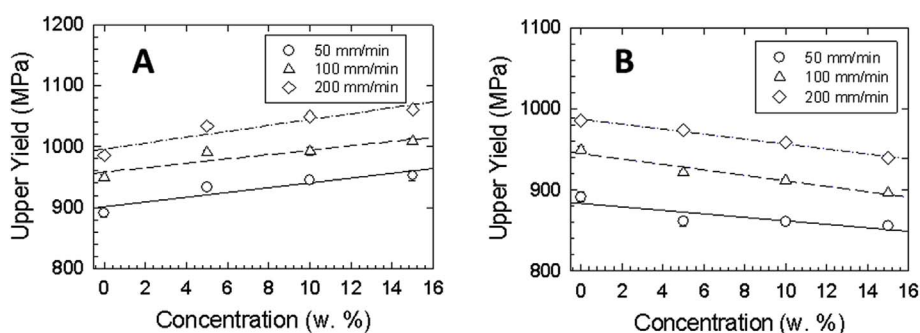


Fig. 5. Deformation rate dependencies of upper yield vs. filler concentrations of HDPE composites. Filler materials: A – mica, B – wollastonite.

x^3 . Strain rate has a complicated effect on materials deformation processes. The energy expended during plastic deformation is in majority dissipated as heat. However, this process was found to be more prominent at higher deformation rates associated with adiabatic drawing. At lower deformation rates the isothermal drawing was confirmed [10].

Fracture toughness measurements have shown, that the mineral fillers function as the stress concentrators in the polymer matrix which was reflected in the observed exponentially decreasing dependencies of fracture toughness vs. filler concentration as shown in Fig. 7. It was found, that the HDPE/wollastonite composites exhibited higher toughness of about 12% in comparison to the HDPE/mica composites. These findings were in excellent correlation with the uniaxial tensile testing results, confirming for both materials that increasing stiffness resulted in increasing Young's modulus of elasticity (Fig. 4). The same conclusions were obtained for both composites from the mechanical vibration damping testing data, where it was confirmed the increasing material stiffness with increasing filler content as reflected by the shift of the first resonance frequency peak to higher excitation frequencies (Fig. 8). We assume our composite materials act as a spring-mass-damper mechanical system which is subjected to the base support harmonic motion excitation. As is known, due to the materials structural internal damping, the first resonance frequency of the base excited spring-mass-damper is always less than the undamped natural frequency which increases with the increasing stiffness of system [38,45]. That is why, when in our case, the energy dissipative processes occur in the tested material system, e.g. due to the internal friction, the vibration energy damping increases as well. This is reflected in the lower material stiffness, hence observing a lower first resonance frequency of the transfer damping function. Furthermore, the natural frequency of the undamped system is proportional to the square root of the ratio of the material stiffness to the applied inertial mass. This leads to the decreasing dependence of the first resonance frequency with the increasing inertial mass for each of the studied filler concentrations (Fig. 8).

As mentioned above, due to the melt flow induced fillers spatial orientation in the injection molded testing articles, the fillers were oriented in the direction of their lowest hydrodynamic resistance. That is why, the steep increase of the first resonance frequency position for the 15 w. % HDPE/mica composites was ascribed to the effect of the proper pouring of the polymer macromolecular chains on the surface of the planar mica particles initiating stronger inter particle as well as particle polymer interactions, enhancing the so-called confinement effects [11]. This phenomenon was not found for the HDPE/wollastonite composites. We assume that the prism shape high aspect ratio filler particles act as the stiffness increasing component, however, due to its elongated shape large volumes of the HDPE polymer matrix remained intact. As clearly demonstrated in results presented in Fig. 8 this mechanical behavior was evident only at the zero inertial mass transfer damping function measurements, with increasing inertial mass these results were not so pronounced, due to the restricted macromolecular chains motion resulting in higher matrix stiffness. This fact was confirmed also by the uniaxial tensile testing E modulus dependencies shown in Fig. 4. Here

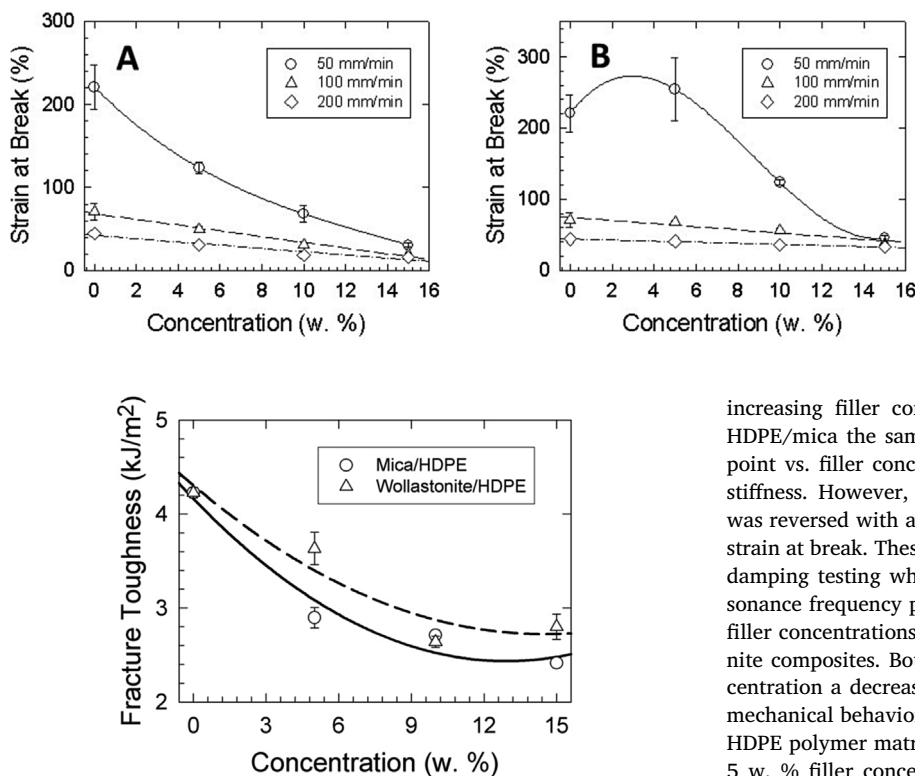


Fig. 7. Fracture toughness and absorbed impact work vs. concentration dependences for HDPE mineral filler composites as observed by Charpy's impact measurements: empty symbols – fracture toughness, full symbols – absorbed impact work.

for the HDPE/mica composite the observed Young's modulus filler concentration dependence increase was more intensive in comparison to HDPE/wollastonite composites. Results of the thermal analysis of the studied composites are shown in Table 1 and Fig. 9. It was found that with increasing filler concentration the crystallinity of the HDPE in HDPE/mica composites increased from 59% for virgin HDPE to 77% for 15 w. % HDPE/mica composite, indicating a positive effect of the mica nano-sheets planar crystalline facets on HDPE crystallization in a similar fashion as in the case of other planar filler materials such as clay [6,21]. The observed maximum thermal degradation rate of the HDPE/mica composites found was about 467 °C, which was in agreement with the earlier published data [46]. On the other hand, the crystallinity decreased from 62% obtained for virgin HDPE to 56% for the 15 w. % HDPE/wollastonite composites.

5. Conclusions

It was found in this study, that both fillers under study (mica and wollastonite) trigger an increase of Young's modulus of elasticity with

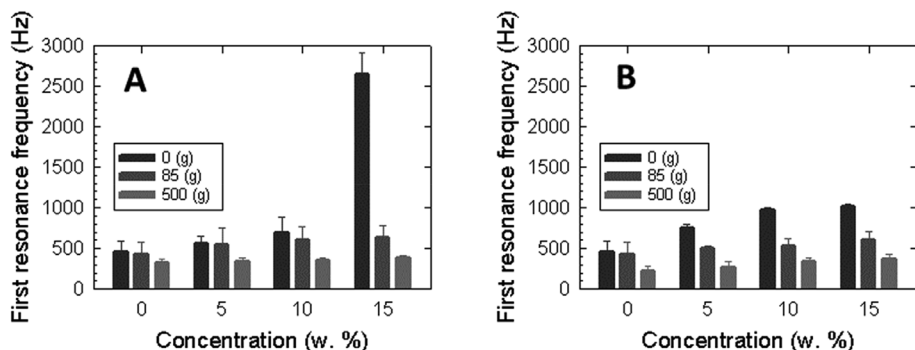


Fig. 6. Deformation rates dependencies of strain at break vs. filler concentrations of HDPE composites. Filler materials: A – mica, B – wollastonite.

increasing filler concentration in HDPE composites. In the case of HDPE/mica the same increasing trend was found for the upper yield point vs. filler concentration dependencies indicating higher material stiffness. However, for the HDPE/wollastonite composites this trend was reversed with a decrease of the upper yield point as well as of the strain at break. These findings were confirmed by mechanical vibration damping testing where there was a more intense shift of the first resonance frequency peak position to higher frequencies with increasing filler concentrations for HDPE/mica in comparison to HDPE/wollastonite composites. Both composites exhibited with increasing filler concentration a decreasing strain at break data, indicating a more brittle mechanical behavior of studied composites in comparison to the virgin HDPE polymer matrix. However, for HDPE/wollastonite composites at 5 w. % filler concentration a 15% increase in the magnitude of the strain at break was found indicating an increase in ductility at 50 mm/min deformation rate. This phenomenon was not found for measurements at 100 and 200 mm/min deformation rates. Fracture toughness measurements show, that both studied fillers function as the stress concentrators in the HDPE polymer matrix, which was reflected in the observed exponentially decreasing dependencies of the fracture toughness vs. filler concentrations. It was found, that the HDPE/mica composites exhibited lower fracture toughness of about 12% in comparison to the HDPE/wollastonite composites in the whole fillers concentration range tested. SEM analysis of the fracture surfaces show typical elongation bands of high plasticity deformation regions characterized with the typical shearing bands interpenetrated with cavities created around filler particles. Thermal analysis data showed for HDPE/mica composites a strong increase of the crystallinity with increasing filler concentration, however, in the case of HDPE/wollastonite composites an opposite effect of the higher amorphous polymer phase content was found.

Acknowledgements

Authors would like to express their gratitude to Ing. P. Zádrapa, Ph.D. for assistance with sample preparation. Partial financing of this research from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech

Fig. 8. Inertial mass dependencies of the first resonance frequencies vs. filler concentrations of HDPE composites. Filler materials: A – mica, B – wollastonite.

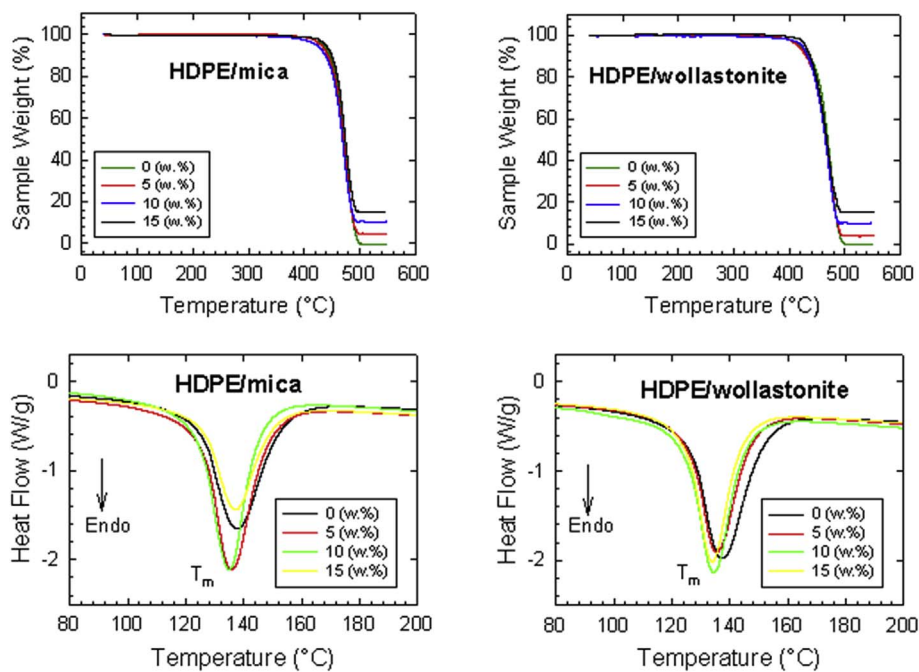


Fig. 9. Thermal analysis results of the studied HDPE/mica and HDPE/wollastonite composites. Inset legend: filler concentrations.

Republic (grant no. LO1305) and the Palacky University in Olomouc Internal Grant Agency (grant no. IGA_PrF_2017_028) is gratefully acknowledged.

Appendix B. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.12.035>.

References

- 1] Vaia R. Adaptive and responsive polymer nanocomposites: opportunities for smart materials. Proceedings of eurofillers - a conference on functional fillers for shape memory advanced applications, zalakaros (Hungary). 2007.
- 2] Liang J, Yang Q. Effects of carbon fiber content and size on electric conductive properties of reinforced high density polyethylene composites. *Compos B Eng* 2017;114:457–66.
- 3] Savas LA, Tayfun U, Dogan M. The use of polyethylene copolymers as compatibilizers in carbon fiber reinforced high density polyethylene composites. *Compos B Eng* 2016;99:188–95.
- 4] Erkendirici OF. Investigation of the quasi static penetration resistance behavior of carbon fiber reinforced laminate HDPE composites. *Compos B Eng* 2016;93:344–51.
- 5] Lapčák L, Manas D, Vasina M, Lapcikova B, Reznicek M, Zadrava P. High density poly(ethylene)/CaCO₃ hollow spheres composites for technical applications. *Compos B Eng* 2017;113:218–24.
- 6] Krasny I, Lapčák L, Lapcikova B, Greenwood RW, Safarova K, Rowson NA. The effect of low temperature air plasma treatment on physico-chemical properties of kaolinite/polyethylene composites. *Compos B Eng* 2014;59:293–9.
- 7] Dasari A, Rohrmann J, Misra R. On the scratch deformation of micrometric wollastonite reinforced polypropylene composites. *Mater Sci Eng A-Struct Mater Prop Microstruct Process* 2004;364(1–2):357–69.
- 8] Malik TM, Farooqi MI, Vachet C. Mechanical and rheological properties of reinforced polyethylene. *Polym Compos* 1992;13(3):174–8.
- 9] Liang J, Yang Q. Mechanical, thermal, and flow properties of HDPE-mica composites. *J Thermoplast Compos Mater* 2007;20(2):225–36.
- 10] Dasari A, Sarang S, Misra R. Strain rate sensitivity of homopolymer polypropylenes and micrometric wollastonite-filled polypropylene composites. *Mater Sci Eng A-Struct Mater Prop Microstruct Process* 2004;368(1–2):191–204.
- 11] Kuelpmann A, Osman MA, Kocher L, Suter UW. Influence of platelet aspect ratio and orientation on the storage and loss moduli of HDPE-mica composites. *Polymer* 2005;46(2):523–30.
- 12] Xiang Y, Hou Z, Su R, Wang K, Fu Q. The effect of shear on mechanical properties and orientation of HDPE/mica composites obtained via dynamic packing injection molding (DPIM). *Polym Adv Technol* 2010;21(1):48–54.
- 13] Yim Y, Rhee KY, Park S. Electromagnetic interference shielding effectiveness of nickel-plated MWCNTs/high-density polyethylene composites. *Compos B Eng* 2016;98:120–5.
- 14] Valente M, Tirillo J, Quitadamo A, Santulli C. Paper fiber filled polymer. Mechanical evaluation and interfaces modification. *Compos B Eng* 2017;110:520–9.
- 15] Fernandes EM, Aroso IM, Mano JF, Covas JA, Reis RL. Functionalized cork-polymer composites (CPC) by reactive extrusion using suberin and lignin from cork as coupling agents. *Compos B Eng* 2014;67:371–80.
- 16] Babaei I, Madanipour M, Farsi M, Farajpoor A. Physical and mechanical properties of foamed HDPE/wheat straw flour/nanoclay hybrid composite. *Compos B Eng* 2014;56:163–70.
- 17] Singh R, Singh N, Fabbrocino F, Fraternali F, Ahuja IPS. Waste management by recycling of polymers with reinforcement of metal powder. *Compos B Eng* 2016;105:23–9.
- 18] Grigoriadou I, Paraskevopoulos KM, Karavasili M, Karagiannis G, Vasileiou A, Bikiaris D. HDPE/Cu-nanofiber nanocomposites with enhanced mechanical and UV stability properties. *Compos B Eng* 2013;55:407–20.
- 19] Cao Z, Daly M, Geever LM, Major I, Higginbotham CL, Devine DM. Synthesis and characterization of high density polyethylene/peat ash composites. *Compos B Eng* 2016;94:312–21.
- 20] Zhu C, Zhang R, Huang Y, Yang W, Liu Z, Feng J, et al. Hierarchical crystalline structures induced by temperature profile in HDPE bars during melt penetration process. *Chin J Polym Sci* 2017;35(1):108–22.
- 21] Singh VP, Vimal KK, Sharma S, Kapur GS, Choudhary V. Polyethylene/sepiolite clay nanocomposites: effect of clay content, compatibilizer polarity, and molar mass on viscoelastic and dynamic mechanical properties. *J Appl Polym Sci* 2017;134(33):45197.
- 22] Stuerzel M, Hees T, Enders M, Thomann Y, Blattmann H, Muelhaupt R. Nanostructured polyethylene reactor blends with tailored trimodal molar mass distributions as melt-processable all-polymer composites. *Macromolecules* 2016;49(21):8048–60.
- 23] Giboz J, Spoelstra AB, Portale G, Copponex T, Meijer HEH, Peters GWM, et al. On the origin of the “core-free” morphology in microinjection-molded HDPE. *J Polym Sci B Polym Phys* 2011;49(20):1470–8.
- 24] Jiang ZY, Tang YJ, Men YF. Morphological and structural evolution of tensile deformed high density polyethylene during melting: in situ synchrotron small-angle X-ray scattering study. *Plast Rubber Compos* 2010;39(9):392–9.
- 25] Tarani E, Wurm A, Schick C, Bikiaris DN, Chrissafis K, Vourlias G. Effect of graphene nanoplatelets diameter on non-isothermal crystallization kinetics and melting behavior of high density polyethylene nanocomposites. *Thermochim Acta* 2016;643:94–103.
- 26] Abareshi M, Zebarjad SM, Goharshadi EK. Effect of milling time and clay content on the thermal stability of polyethylene-clay nanocomposite. *J Vinyl Addit Technol* 2016;22(3):285–92.
- 27] Yang R, Liu Y, Yu J, Wang KH. Thermal oxidation products and kinetics of polyethylene composites. *Polym Degrad Stabil* 2006;91(8):1651–7.
- 28] Plueddemann EP. Silane adhesion promoters. *Coatings technology handbook*. second ed. 2001. p. 563–5.
- 29] Arkles B. Tailoring surfaces with silanes. *Chemtech* 1977;7(12):766–78.
- 30] Plueddemann E, Stark G. Role of coupling agents in surface modification of fillers. *Modern Plast* 1977;54(8). 76–8.
- 31] Zeltmann SE, Prakash KA, Daddamani M, Gupta N. Prediction of modulus at various strain rates from dynamic mechanical analysis data for polymer matrix composites. *Compos B Eng* 2017;120:27–34.
- 32] Demange M. Mineralogy for petrologists optics, chemistry and occurrence of rock-forming minerals. Leiden: CRC Press/Balkema; 2012. p. 182.
- 33] Lapčák L, Vasina M, Lapcikova B, Otyepkova E, Waters KE. Investigation of

- advanced mica powder nanocomposite filler materials: surface energy analysis, powder rheology and sound absorption performance. *Compos B Eng* 2015;77:304–10.
- [34] Demidenko NI, Tel'nova GB. Microstructure and properties of a material based on natural wollastonite. *Glass Ceram* 2004;61(5–6):183–6.
- [35] Dole M, Wunderlich B. The melting range of semicrystalline copolymers.2. *J Polym Sci* 1957;24(105):139–43.
- [36] Ahn Y, Jeon JH, Park J, Thenepalli T, Ahn JW, Han C. Effects of modified LDPE on physico-mechanical properties of HDPE/CaCO₃ composites. *Kor J Chem Eng* 2016;33(11):3258–66.
- [37] Lapcik L, Vasina M, Lapcikova B, Valenta T. Study of bread staling by means of vibro-acoustic, tensile and thermal analysis techniques. *J Food Eng* 2016;178:31–8.
- [38] Lapcik L, Vasina M, Lapcikova B, Plskova M, Gal R, Brychtova M. Application of a vibration damping technique in characterizing mechanical properties of chicken meat batters modified with amaranth. *J Food Meas Char* 2017;11(4):1987–94.
- [39] Bonfiglio P, Pompoli F, Horoshenkov KV, Rahim MIBSA. A simplified transfer matrix approach for the determination of the complex modulus of viscoelastic materials. *Polym Test* 2016;53:180–7.
- [40] Pukanszky B, Vanes M, Maurer FHJ, Voros G. Micromechanical deformations in particulate filled thermoplastics - volume strain-measurements. *J Mater Sci* 1994;29(9):2350–8.
- [41] Bucknall CB. Toughening of plastics. *Plast Rubber Int* 1978;3(5). 211–211.
- [42] Su J, Zhang J. Improvement of mechanical and dielectrical properties of ethylene propylene diene monomer (EPDM)/barium titanate (BaTiO₃) by layered mica and graphite flakes. *Compos B Eng* 2017;112:148–57.
- [43] Lapcik L, Jindrova P, Lapcikova B, Tamblyn R, Greenwood R, Rowson N. Effect of the talc filler content on the mechanical properties of polypropylene composites. *J Appl Polym Sci* 2008;110(5):2742–7.
- [44] Liang J, Yang Q. Mechanical, thermal, and flow properties of HDPE-mica composites. *J Thermoplast Compos Mater* 2007;20(2):225–36.
- [45] Stephen NG. On energy harvesting from ambient vibration. *J Sound Vib* 2006;293(1–2):409–25.
- [46] Oliveira PL, Araujo RS, Oliveira VR, Morais JS, Marques MDFV. Nanocomposites of polyethylene blends using organomica. *Macromol Symp* 2016;367(1):143–50.

Příloha D

Hollow spheres as nanocomposite fillers for aerospace and automotive composite materials applications



Hollow spheres as nanocomposite fillers for aerospace and automotive composite materials applications



Lubomír Lapčík^{a, b, *}, Matthew J.A. Ruzsala^c, Martin Vašina^{d, e}, Barbora Lapčíková^{a, b}, Jakub Vlček^a, Neil A. Rowson^c, Liam M. Grover^c, Richard W. Greenwood^c

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Technology, Inst. Foodstuff Technology, Nam. T.G. Masaryka 275, 760 01 Zlin, Czech Republic

^c School of Chemical Engineering, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, UK

^d Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Technology, Inst. Physics Materials Engineering, Nam. T.G. Masaryka 275, 760 01 Zlin, Czech Republic

^e VSB-Technical University of Ostrava, Department of Hydromechanics and Hydraulic Equipment, Faculty of Mechanical Engineering, 17. Listopadu 15/2172, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2016

Accepted 12 September 2016

Available online 13 September 2016

Keywords:

Hollow sphere particles

Powder rheology

Sound damping

Powder processing

Elastic coefficient

Electrostatic charge

ABSTRACT

There were studied four types of powder filler materials for polyolefin composite parts production for automotive and aerospace industry. There was confirmed, that the particle shape has a strong effect on the acoustic and mechanical properties of the powder bed as influenced by the varying packing density. The calcium carbonate spherical hollow particles exhibited the best aerodynamic performance when aerated and were completely fluidised. Simultaneously they were exhibiting the easy flowing behaviour as reflected in the observed flowability of 4.71. In contrary to this, the flat lamellar geometry of the precipitated calcium carbonate resulted in the worst fluidisation behaviour, as the aeration energy was 2.5× higher in comparison to the spherical particles. Remaining samples under study, i.e. flash calcined kaolin and dolomite powder, exhibited cohesive rheological behaviour as reflected in the observed flowability. There was found a clear correlation between powder rheological and electrostatic charge data with the observed acoustic performance as reflected in the frequency dependence of the normal incident sound damping coefficient. This was demonstrated by a relatively high increase in the damping efficiency with increasing porosity of the powder bed as reflected in the decreasing packing density. However the best fit was found between the absolute value of the electrostatic charge values and the sound damping properties.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

At present there is an increased demand for the application of synthetic polymers in the automotive and aeronautic industries. It is mainly targeted for utilisation of poly(ethylene), poly(propylene), polycarbonate and polyamide components of the interior, exterior or other functional parts of vehicles [1,2]. Minerals first served as additives in polymer systems as a cost reducing technology [3] and due to the technological improvements in minerals processing and polymer chemistry, these materials are now used as functional additives [4] bringing specific mechanical and functional properties

to the final composite products [5,6]. For example, hollow particle filled composites, called syntactic foams, are used in applications requiring high damage tolerance and low density, e.g. in aerospace and marine engineering structural applications. It was found that the presence of stiff hollow inclusions can enhance the composite elastic modulus in comparison to neat resin. Moreover, with the latter elastic modulus enhancement, an increase in energy absorption under compressive load was found due to the hollow fillers progressively crushing [6].

The recent review article by Wang et al. [7] described the present state of the art chemical synthesis routes and strategies for the synthesis of hollow micro/nano structured materials. The synthetic strategies were grouped into three major categories; hard templating, soft templating, and self-templating synthesis. Hollow spheres have a wide range of applications due to their regular uniform shape, meaning that they have the same properties,

* Corresponding author. Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic.

E-mail address: lapciki@seznam.cz (L. Lapčík).

regardless of their orientation. Nano/micro scale hollow spheres have been produced through a variety of different methods [8–15] and have the benefit of being a colloidal particle that can flow, and remain untangled with other particles when put into a complex formulation [16]. Hollow latex spheres have been made commercially since the 1980's [17,18], with the primary production method being osmotic swelling [19]. Hollow latex spheres however have the disadvantage of being easily squashed or ruptured, so sturdier mineral structures are often preferred. This can be achieved by armour plating hollow latex spheres [20,21], or by creating hollow spheres directly from mineral structures, which has the benefit of fewer production steps.

Creating hollow spheres made of calcium carbonate has proved to be a success, with [22], and [23] making them using a carbon dioxide bubbles as a template, whilst [24,25] used an emulsification process. Consequently, hollow CaCO₃ spheres have proved to be a success, and the understanding of their properties, and their possible applications continue to increase.

Another route for the production of the perfectly formed dense agglomerates and the formation of deformed or hollow agglomerates is affected by particle consolidation during spray drying evaporation, particle rearrangement during the consolidation period and by the inter-particle potential. In general, the consolidation can proceed in the thermodynamic state, where the inter-particle potential is either repulsive or attractive. In the dispersed slurry, the long-range inter-particle potential allows the particles to repel one another. When the particles are repulsive, the meniscus that separates the two fluids exerts a capillary pressure on the particles at the surface, forcing them together as a dense agglomerates. In the case of the mechanism, where particles were not allowed to rearrange after a short period of evaporation, the agglomerate becomes hollow and deformed. Whereas in the case of the attractive particle network, if the capillary pressure exceeds the yield stress, the spherical agglomerates with uniform density are formed [26].

As a composite system matrix, polyolefin polymers are widely used, such as poly(ethylene) or poly(propylene), with different grades, types and qualities [3]. There was found to be an increase in tested polyolefin melts viscosity, a decrease of the elasticity with increasing filler loading and the presence of yield values in the flow curves depending on the filler particles volume loading and particles size [27]. When comparing the acoustic properties of the composite materials, the process of the interaction of the mechanical acoustic wave and the material structure is based on the assumption that an incoming wave is reflected at the boundary between two acoustically different materials due to the differences in the acoustic impedance of the involved materials [28–31].

This paper is focused on the application of powder rheology, acoustic performance testing and electrostatic charge measurements on the evaluation of hollow spheres and lamellar mineral powder materials as prospective fillers for polyolefin composite materials applications.

2. Theoretical background

Sound is an acoustic wave with frequencies ranging from 10 Hz to 16 kHz, with sonic waves spreading in all directions from the source. On the basis of different points of view on the problem of noise attenuation it is possible to distinguish the following methods of sound and vibration damping [32]:

- Reduction method – attenuation at the noise source, e.g. during the machinery construction stage.
- Sound isolation method – covering the sound source by material with high airborne sound insulation characteristics.

- Sound absorption method – endeavour to minimise sound reflections e.g. to absorb the maximum of the incident acoustic energy.

In the matrix of the sound/vibration attenuating material, dissipation of the sonic wave to mechanical energy and heat takes place. This proceeds by the combination of the following processes:

- By friction of the vibrating air particles on the walls during their penetration into the pores of the sound absorbing material. This lowers the kinetic energy of the incident sound field. Effectiveness of this process increases with growing porosity of the absorption material.
- By decreasing the potential energy of the sonic wave penetrating into the material. This lowers the acoustic pressure due to the heat exchange between air and the skeleton of the absorbing material during periodic pressure changes.
- By non-elastic deformation of the absorbing material body. At the specifically aimed construction of the vibration or noise-isolation material it is therefore possible to utilise all of the above mentioned processes for their synergistic effect in obtaining maximum effectiveness of attenuation. This is possible by modelling the geometry of the damping material body as well as by proper selection of the main material matrix and adhesive system.

2.1. Sound absorption measurements

Sound absorption properties express a material's ability to absorb incident acoustic energy and is described by the sound absorption coefficient (α) which is defined by the ratio of dissipated power in a tested material and incident power. Sound absorption of a given material depends on many factors, including; excitation frequency, thickness, structure, temperature, density and humidity [28,32]. The effect of the excitation frequency on the sound absorption coefficient is expressed by the noise reduction coefficient (NRC), which is defined as the arithmetic mean of the sound absorption coefficients of a given material at the excitation frequencies of 250, 500, 1000 and 2000 Hz [33]. On the basis of the primary absorption peak frequency (f_{p1}), it is possible to determine the speed of sound (c) of an elastic wave through a powder bed and the longitudinal elastic coefficient (K) of the powder bed as follows, where h is the height of a given powder bed and ρ_b is the bulk density of the powder bed [34].:

$$c = 4f_{p1}h \quad (1)$$

$$K = c^2\rho_b = 16f_{p1}^2h^2\rho_b \quad (2)$$

3. Materials

The materials studied were commercially available mineral filler powders and are described in Table 1. Four samples were analysed; formulated calcium carbonate spheres (process route developed at The University of Birmingham, UK), flash calcined kaolin, dolomite and calcined kaolin. Samples 1 was the hollow calcium carbonate spheres, sample 2 was flash calcined kaolin based filler (Imerys, UK), sample 3 was dolomite powder (CaO (30.3 wt%), MgO (21.6 wt %), Fe₂O₃ (0.08 wt%)) (Omya, Switzerland) and sample 4 was a calcined kaolin based filler (Imerys, UK). Sample moisture content ranged from 0.1 to 0.9 wt%.

Table 1
Studied samples labelling and description.

Sample	Geometry	Description	Moisture [w.%]
1	Hollow sphere	Calcium carbonate, narrow particle size distribution, 4 μm diameter, density 2.4 g/cm ³ .	0.9
2	Agglomerate	Opacilite (Imerys), flash calcined kaolin, $d_{50} = 1.6 \mu\text{m}$, density 2.1 g/cm ³ .	0.9
3	Lamellar	Microdol H600 (Omya, Switzerland), dolomite powder, $d_{50} = 5.5 \mu\text{m}$, density 2.9 g/cm ³ .	0.3
4	Lamellar	Polestar 200P (Imerys), calcined kaolin, $d_{50} = 2 \mu\text{m}$ diameter, density 2.7 g/cm ³ .	0.1

4. Methods

4.1. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to determine the shape and size of the studied mineral composite filler particles. SEM images were captured using a Hitachi 6600 FEG microscope (Japan) operating in the secondary electron mode using an accelerating voltage of 1 kV.

4.2. Thermal analysis

Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) experiments were performed on simultaneous DTA-TG apparatus (Shimadzu DTG 60, Japan) to determine the moisture content of the samples, and to determine whether there was any organic material present. Throughout the experiment, the sample temperature and weight-heat flow changes were continuously monitored. The measurements were performed at a heat flow rate of 10 °C/min in a static air atmosphere at the temperature range of 30 °C–300 °C.

4.3. Powder rheology

Powder rheology measurements were conducted on a FT4 Powder rheometer (Freeman Technology, UK). All experiments were performed under the ambient laboratory conditions of 23 °C and relative humidity of 43%.

4.4. Acoustic performance testing

The frequency dependencies of the sound absorption coefficients of the investigated powders were experimentally determined by the transfer function method ISO 10534-2 [31,35,36]. The frequency dependencies were experimentally measured using a two-microphone impedance tube BK 4206 in combination with a three-channel signal Pulse Multianalyzer BK 3560-B-030 and power amplifier BK 2706 (all from Brüel & Kjær, Denmark) in the frequency range of 150–6400 Hz. This equipment was subsequently used in order to determine the noise reduction coefficient, the speed of sound through the loose powder materials and the longitudinal elastic coefficient of the investigated unconsolidated materials. The normal incidence sound wave absorption of the investigated loose powder samples of defined layer thickness (ranging from 5 to 100 mm) was also determined. The measurements were performed under ambient laboratory conditions of 62% relative humidity and at constant temperature of 25 °C.

4.5. Electrostatic charge measurements

Electrostatic charge measurements were conducted on a NK-1001A Coulomb meter (Kasuga Denki, Japan). Samples were placed in a Faraday cage and the charge (nC) was measured for 1 g samples [37]. Each measurement was repeated 8 \times , and all measurements were performed at 25 °C ambient laboratory temperature and 45% relative humidity.

5. Results and discussion

Sound absorption properties of the tested powders are affected by their porosity, shape of pores, angle of inclination of incident acoustic waves on the material surface, friction of acoustic waves during transmission through the porous matrix [32], material mechanical stiffness and conditions of applied acoustic field, including; sound excitation frequency, ambient air relative humidity and ambient temperature. The shape and size of the tested powder materials observed using SEM are shown in Fig. 1. Sample 1 was found to have a regular spherical shape with a narrow 4 μm diameter, whilst sample 2 had a plate agglomerate structure of 3–6 μm particle dimensions, contrary to the agglomerate structure of sample 2, samples 3 and 4 exhibited lamellar plate like structures of 20–30 μm dimensions with a relatively large fraction of the residual 3–4 μm size particles.

Results of the normal incidence sound absorption measurements are shown in Figs. 2 and 3 and are summarised in Table 2. From this data it is evident that sound absorption properties increase with increasing material thickness, in this case with height of the loose powder bed. Fig. 2 demonstrates the measured data for hollow spheres (sample 1). The obtained frequency dependencies of the normal incidence sound absorption coefficient are characterised by the primary absorption peak at a characteristic frequency f_{p1} . It is visible that the primary absorption peak frequency was shifted toward decreasing frequency with increasing loose powder bed height (Fig. 2), i.e. from 1584 Hz for the bed height of 5 mm–304 Hz for 100 mm powder bed height. Similar dependencies of the f_{p1} on the powder bed height were also observed for the other materials tested (Table 2). As was described in the theoretical section, the primary absorption peak frequency is directly proportional to the longitudinal elastic coefficient of the powder bed and to the velocity of the sound propagation through the powder bed. There was observed the highest magnitude of elastic coefficient of 11 MPa (for the powder bed $h = 100$ mm) for sample 4. In contrary to this, the lowest magnitude of elastic coefficient of 0.95 MPa was observed for sample 2 for the same powder bed height. It was found in this study that the material stiffness characterised by the longitudinal elastic coefficient proportionally increased with increasing powder bulk density. The highest speed of sound (see Eq. (1)) of the acoustic wave propagated through the powder bed (of 100 mm) was found for sample 1 ($c = 121.6$ m/s). This was attributed to the low sound absorption properties of sample 1 (hollow spheres) compared to the other materials tested. Most probably this phenomenon is caused by the observed closed cell porous structure of the individual hollow spheres. The mutual comparison of sound damping properties of the tested loose powder materials for the powder bed height $h = 15$ mm is shown in Fig. 3. It is evident that the best sound damping properties over the whole measured frequency range were obtained for sample 2. Contrary to this, the worst sound damping properties were found for the hollow sample 1, indicating its excellent sound reflecting properties. This result is in excellent agreement with the calculated values of the noise reduction coefficient NRC (Table 2), which represents the arithmetic mean sound absorption at the four given excitation frequencies. It was found

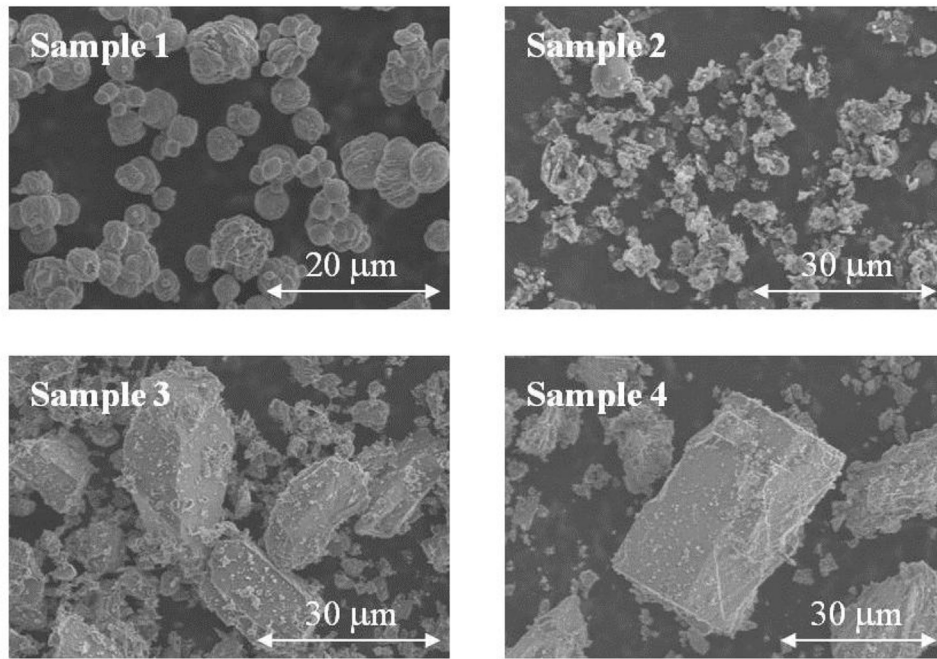


Fig. 1. SEM images of the studied composites filler materials, where sample 1 = hollow calcium carbonate spheres, sample 2 = flash calcined clay, sample 3 = dolomite and sample 4 = calcined kaolin.

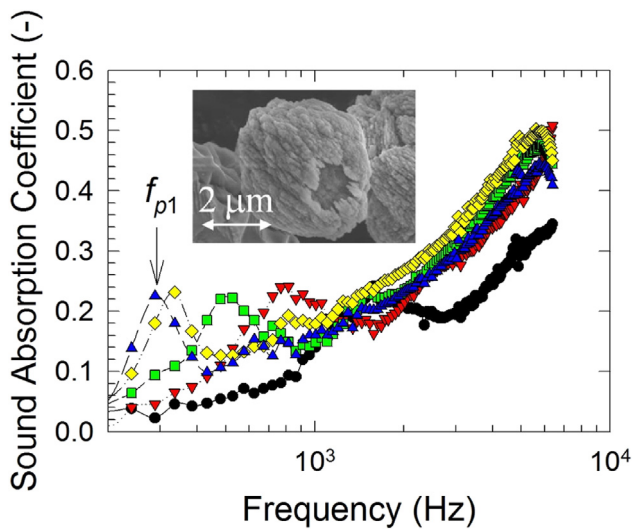


Fig. 2. Sound absorption coefficient frequency dependence for sample 1 (hollow particles) for different powder bed heights: black circle – 5 mm, red triangle down – 10 mm, green square – 20 mm, yellow diamond – 50 mm and blue triangle up – 100 mm. Arrow indicates primary absorption peak frequency (f_{p1}). Inset: SEM image of sample 1 hollow sphere structure. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that better sound absorption is obtained for materials with lower bulk density, hence exhibiting higher porosity. It was also evident (Figs. 2 and 3) that sound absorption is generally increasing with increasing excitation frequency [38].

The results of the powder bed aeration experiments are shown in Fig. 4 and Table 3. Basic flowability energy (BFE), aeration energy at 10 mm/s air velocity (AE₁₀), aeration ratio at 10 mm/s air velocity (AR₁₀) and normalised aeration sensitivity (NAS) parameters were determined. It was found that the spherical particle shape of sample 1 exhibited the lowest aeration energy of 7.5 mJ and the

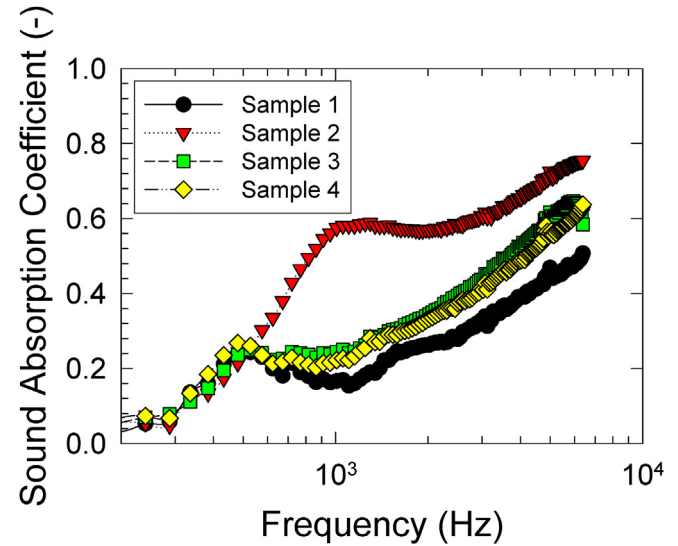


Fig. 3. Sound absorption coefficient frequency dependence of studied powder materials. Measured at the powder bed height of 15 mm.

best fluidisation properties as reflected in the highest measured aeration ratio of 15.1 from all materials studied. These results are in excellent agreement with the most aerodynamic shape of the spherical particles in comparison to the plate like irregular particles which exhibit turbulent air flow patterns around the particles. Contrary to this, sample 2 was found to have low sensitivity to aeration across the whole range of air velocities tested. Such behaviour is typical for highly cohesive powder materials. The observed aeration energy for sample 2 was the highest in comparison to all materials studied at 25.1 mJ and the aeration ratio was the smallest of 3.6. Results of the aeration testing for samples 3 and 4 indicate that these powder materials are less cohesive and have

Table 2
Results of the acoustic and mechanical testing for the studied powder composites filler materials.

Sample	Quantity	Material height h [mm]					
		5	10	15	20	50	100
1	α_{\max} [–]	0.345	0.512	0.508	0.478	0.506	0.446
	$f_{z\max}$ [Hz]	6368	6392	6384	5624	5688	5768
	NRC [–]	0.112	0.149	0.180	0.167	0.167	0.163
	f_{p1} [Hz]	1584	808	544	520	312	304
	K [MPa]	0.421	0.438	0.446	0.725	1.631	6.196
	c [m s ⁻¹]	31.7	32.3	32.6	41.6	62.4	121.6
	α_{\max} [–]	0.860	0.727	0.757	0.805	0.779	0.774
2	$f_{z\max}$ [Hz]	4840	5920	6344	5600	6312	5936
	NRC [–]	0.188	0.316	0.359	0.434	0.500	0.338
	f_{p1} [Hz]	3992	2351	1264	768	244	152
	K [MPa]	1.6445	2.282	1.484	0.974	0.614	0.954
	c [m s ⁻¹]	79.8	94.0	75.8	61.4	48.8	60.8
	α_{\max} [–]	0.579	0.729	0.647	0.627	0.690	0.685
	$f_{z\max}$ [Hz]	5920	6384	5928	4864	6384	6392
3	NRC [–]	0.132	0.258	0.228	0.279	0.254	0.220
	f_{p1} [Hz]	1472	1296	520	512	272	240
	K [MPa]	0.732	2.268	0.822	1.416	2.498	7.778
	c [m s ⁻¹]	29.4	51.8	31.2	41.0	54.4	96.0
	α_{\max} [–]	0.571	0.563	0.639	0.635	0.580	0.644
	$f_{z\max}$ [Hz]	5760	6392	6376	6384	4864	5592
	NRC [–]	0.128	0.181	0.221	0.201	0.221	0.236
4	f_{p1} [Hz]	1536	696	472	416	288	272
	K [MPa]	0.878	0.721	0.746	1.030	3.086	11.008
	c [m s ⁻¹]	30.7	27.8	28.3	33.3	57.6	108.8

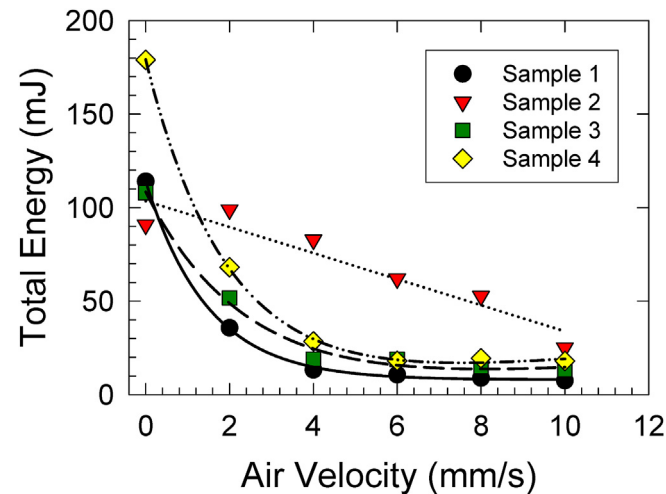


Fig. 4. Total energy against fluidised velocity for the four mineral samples.

moderate sensitivity to aeration. This fact indicates that samples 1, 3 and 4 create more compact powder bed structures compared with sample 2. This fact was confirmed in the sound absorption experiments, where sample 2 exhibited the best sound damping properties due to the more microporous structure of the powder bed (Table 2, Fig. 3). This conclusion is also supported by the trend obtained for the basic flowability energy parameter, where the lowest magnitude was found for sample 2 at 90.8 mJ, whilst the BFEs for samples 1, 3 and 4 exceeded 107.9 mJ. The highest BFE was found for sample 4 at 179.3 mJ. The observed trends are in excellent agreement with the shear cell flow experiments. The hollow calcium carbonate spheres (sample 1) exhibited the highest flowability of 4.71, indicating easy flowing character [39], whereas samples 2, 3 and 4 showed cohesive properties (FF ranged between 3.01 (sample 3) to 3.81 (sample 4)) (see Fig. 5) (see Table 4).

It is well known from the literature, that the mechanical friction

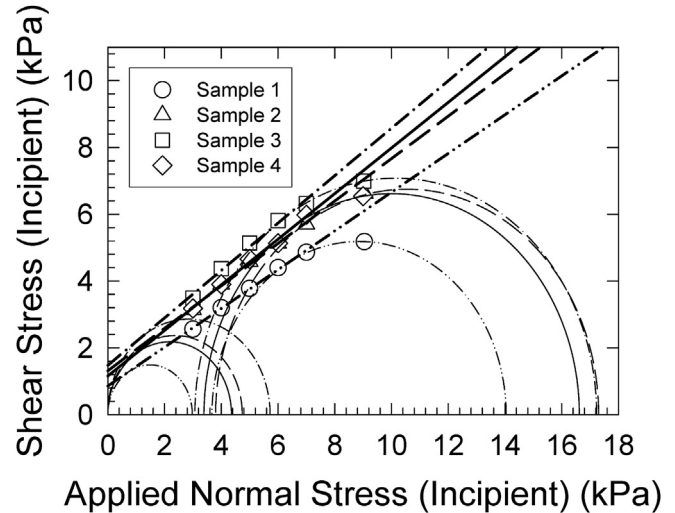


Fig. 5. Yield locus and the Mohr's circles of the tested materials as obtained by shear cell experiments at applied 9 kPa consolidation stress.

Table 3
Results of the aeration test of the studied powder composite filler materials.

Sample	BFE [mJ]	AE_10 [mJ]	AR_10 [–]	NAS [s/mm]
1	114.1	7.5	15.1	0.344
2	90.8	25.1	3.6	0.152
3	107.9	13.4	8.1	0.261
4	179.3	18.0	9.9	0.310

Table 4
Results from the shear cell flow experiments, measured at the consolidation stress of 9 kPa and the temperature of 24 °C.

Sample	Cohesion [kPa]	UYS [kPa]	MPS [kPa]	FF [–]	AIF [°]	BD [g/ml]	MCS [kPa]	AIF [E] [°]
1	0.86	2.98	14.04	4.71	30.13	1.95	3.67	35.86
2	1.30	4.74	17.38	3.67	32.55	1.17	3.80	39.89
3	1.48	5.72	17.23	3.01	35.34	1.92	3.07	44.20
4	1.15	4.36	16.62	3.81	34.53	2.36	3.39	41.39

UYS – unconfined yield strength, MPS – major principal stress, FF – flow function, AIF – angle of internal friction, DB – bulk density, MCS – minor consolidation stress, AIF [E] – angle of internal friction (effective).

of individual nano/micro particles induces the creation of electrostatic charge on their surfaces [37]. This electrostatic charge has a strong influence on the packing density of the powder bed, thus influencing its mechanical, as well as acoustic properties. It was found in this study that the calcium carbonate hollow sphere particles (sample 1) were of positive electrostatic charge at 1.25 ± 0.22 nC, however lamellar precipitated calcium carbonate exhibited a negative electrostatic charge of -1.50 ± 0.24 nC. The highest charge was found for flash calcined kaolin (sample 2) at -10.15 ± 0.95 nC. Electrostatic charge of sample 3 (dolomite powder) was -4.17 ± 0.55 nC. The mutual comparison of the absolute values of the observed electrostatic charges of the samples studied was in the following order: sample 1 < sample 4 < sample 3 < sample 2. This order was found to be of the same pattern as for the sound damping performance, where the best damping properties were found for sample 2 and the worst for sample 1. These results can be attributed to the spatial ordering of the individual micro particles, thus creating a specific porous structure as reflected in the observed packing densities in the case of each sample

studied. However, the poor sound absorption performance of sample 1 indicates its superior sound reflection properties.

6. Conclusions

In this paper the material properties of four powder filler materials for polyolefin composite parts production for the automotive and aerospace industry were studied. It was found that the particle shape has a strong effect on the acoustic and mechanical properties of the powder bed as influenced by the varying packing density. Moreover the hollow calcium carbonate spheres exhibited the best aerodynamic performance when aerated and were completely fluidised. Simultaneously they exhibited the easy flowing behaviour as reflected in the observed flowability of 4.71. Contrary to this, the flat lamellar geometry of the calcined kaolin resulted in the worse fluidisation behaviour, as the aeration energy was 2.5× higher at 18 mJ compared to the spherical particles ($AE_{10} = 7.5$ mJ). The flash calcined kaolin and dolomite powders exhibited cohesive powder behaviour as reflected in the observed flowability of 3.67 and 3.01, respectively.

There was found to be a clear correlation between powder rheological and electrostatic charge data, with the observed acoustic performance as reflected in the frequency dependency of the normal incident sound damping coefficient. Here a clear increase of the damping efficiency with increasing porosity of the powder bed was demonstrating as reflected in the decreasing packing density. However the best correlation with sound damping performance was found with the observed absolute values of the electrostatic charge of the tested powders. Here the largest electrostatic charge was found for sample 2 and the lowest for sample 1 (hollow spheres). The same pattern was also found for the sound damping performances, i.e. the best sound damping properties were found for sample 2 and the worst one for sample 1 (hollow spheres). However, the poor sound absorption performance of the sample 1 indicates its superior sound reflection properties make it potentially commercially attractive for sound insulation applications. The same dependency was also found for the aeration measurements results, where the most cohesive character was found for sample 2 and the best fluidisation properties found for the low density hollow spheres (sample 1). Based on the above results it can be concluded that the combination of the powder rheological and electrostatic charge measurements can be used to predict the sound damping properties of the powder filler materials.

Acknowledgements

Financial support from the grant no. LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic is gratefully acknowledged. Author M.R. would like to express his gratitude for the financing of his research by AkzoNobel N.V. and the EPSRC (UK). Authors would like to express their gratitude for surface charge measurements to Mgr. B. Prudilová (Palacky University in Olomouc).

References

- [1] Lapčík Jr L, Jindrová P, Lapčíková B, Tamblyn R, Greenwood R, Rowson N. Effect of the talc filler content on the mechanical properties of polypropylene composites. *J Appl Polym Sci* 2008;110(5):2742–7.
- [2] Lapčíková B, Lapčík Jr L, Smolka P, Dlabaja R, Hui D. Application of radio frequency glow discharge plasma for enhancing adhesion bonds in polymer/polymer joints. *J Appl Polym Sci* 2006;102(2):1827–33.
- [3] Ottani S, Valenza A, Lamantia F. Shear characterization of CaCO₃-filled linear low-density polyethylene. *Rheol Acta* 1988;27(2):172–8.
- [4] Zhu BL, Wang J, Zheng H, Ma J, Wu J, Wu R. Investigation of thermal conductivity and dielectric properties of LDPE-matrix composites filled with hybrid filler of hollow glass microspheres and nitride particles. *Compos Part B Eng* 2015;69:496–506.
- [5] Huang R, Li P. Elastic behaviour and failure mechanism in epoxy syntactic foams: the effect of glass microballoon volume fractions. *Compos Part B Eng* 2015;78:401–8.
- [6] Porfiri M, Gupta N. Effect of volume fraction and wall thickness on the elastic properties of hollow particle filled composites. *Compos Part B Eng* 2009;40(2):166–73.
- [7] Wang X, Feng J, Bai Y, Zhang Q, Yin Y. Synthesis, properties, and applications of hollow micro-/nanostructures. *Chem Rev* 2016. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00731>.
- [8] Donath E, Sukhorukov G, Caruso F, Davis S, Mohwald H. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angew Chem Int Ed* 1998;37(16):2202–5.
- [9] Nakashima T, Kimizuka N. Interfacial synthesis of hollow TiO₂ microspheres in ionic liquids. *J Am Chem Soc* 2003;125(21):6386–7.
- [10] Peng Q, Dong Y, Li Y. ZnSe semiconductor hollow microspheres. *Angew Chem Int Ed* 2003;42(26):3027–30.
- [11] Ras RHA, Kemell M, de Wit J, Ritala M, ten Brinke G, Leskela M, et al. Hollow inorganic nanospheres and nanotubes with tunable wall thicknesses by atomic layer deposition on self-assembled polymeric templates. *Adv Mater* 2007;19(1):102–+.
- [12] Tang Z, Akiyama Y, Itoga K, Kobayashi J, Yamato M, Okano T. Shear stress-dependent cell detachment from temperature-responsive cell culture surfaces in a microfluidic device. *Biomaterials* 2012;33(30):7405–11.
- [13] Velev O, Furusawa K, Nagayama K. Assembly of latex particles by using emulsion droplets as templates .1. Microstructured hollow spheres. *Langmuir* 1996;12(10):2374–84.
- [14] White RJ, Tauer K, Antonietti M, Titirici M. Functional hollow carbon nanospheres by latex templating. *J Am Chem Soc* 2010;132(49):17360–3.
- [15] Yang H, Zeng H. Preparation of hollow anatase TiO₂ nanospheres via Ostwald ripening. *J Phys Chem B* 2004;108(11):3492–5.
- [16] Ruzsala M, Rowson N, Grover L, Choudhery R. Low carbon footprint TiO₂ substitutes in paint: a review. *Int J Chem Eng Appl* 2015;6(5):331.
- [17] Kowalski A, Vogel M. Blankenship RM. Polymeric pigment particles. U. S. Patent 1984(4427836).
- [18] Kowalski A, Vogel M. Core sheath polymer particles production useful as opacifying agent. U. S. Patent 1984(4469825).
- [19] McDonald C, Devon M. Hollow latex particles: synthesis and applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2002;99(3):181–213.
- [20] Cayre OJ, Biggs S. Hollow microspheres with binary porous membranes from solid-stabilised emulsion templates. *J Mater Chem* 2009;19(18):2724–8.
- [21] zu Putlitz B, Landfester K, Fischer H, Antonietti M. The generation of "armored latexes" and hollow inorganic shells made of clay sheets by templating cationic miniemulsions and latexes. *Adv Mater* 2001;13(7):500–+.
- [22] Hadiko G, Han Y, Fuji M, Takahashi M. Synthesis of hollow calcium carbonate particles by the bubble templating method. *Mater Lett* 2005;59(19–20):2519–22.
- [23] Kim S, Ko JW, Park CB. Bio-inspired mineralization of CO₂ gas to hollow CaCO₃ microspheres and bone hydroxyapatite/polymer composites. *J Mater Chem* 2011;21(30):11070–3.
- [24] Enomae T, Sasaki K, Kim B, Onabe F. Anisotropy of internal stress related to paper surface roughening. In: *Tappi advanced coating fundamentals symposium*; 1999. p. 133–45.
- [25] Enomae T, Tsujino K. Application of spherical hollow calcium carbonate particles as filler and coating pigment. *Appita J* 2004;57(6):493–493.
- [26] Fair G, Lange F. Effect of interparticle potential on forming solid, spherical agglomerates during drying. *J Am Ceram Soc* 2004;87(1):4–9.
- [27] Kleinecke K. Influence of fillers on rheological behavior of high-molecular-weight polyethylene melts .1. Flow behavior in shear-flow and extensional flow. *Rheol Acta* 1988;27(2):150–61.
- [28] Pannert W, Winkler R, Merkel M. On the acoustical properties of metallic hollow sphere structures (MHSS). *Mater Lett* 2009;63(13–14):1121–4.
- [29] Vašina M, Hughes DC, Horoshenkov KV, Lapčík L. The acoustical properties of consolidated expanded clay granulates. *Appl Acoust* 2006;67(8):787–96.
- [30] Hong Z, Bo L, Guangsu Huang. Sound absorption behavior of multiporous hollow polymer micro-spheres. *Mater Lett* 2006;60(29–30):3451–6.
- [31] Janousch C, Winkler R, Wiegmann A, Pannert W, Merkel M, Oechsner A. Simulation and experimental validation of acoustic properties of hollow sphere structures. *Materialwiss Werkst* 2014;45(5):413–22.
- [32] Lapčík L, Cetkovský V, Lapčíková B, Vašut S. Materials for noise and vibration attenuation. *Chem Listy* 2000;94(2):117–22.
- [33] Lapčík L, Vašina M, Lapčíková B, Valenta T. Study of bread staling by means of vibro-acoustic, tensile and thermal analysis techniques. *J Food Eng* 2016;178:31–8.
- [34] Okudaira Y, Kurihara Y, Ando H, Satoh M, Miyayama K. Sound-absorption measurements for evaluating dynamic physical-properties of a powder bed. *Powder Technol* 1993;77(1):39–48.
- [35] International Organization for Standardization, ISO 10534-2. Acoustics-Determination of sound absorption coefficient and impedance in impedance tubes-Part 2: transfer-function method. ISO 10534-2. 1998. p. 10534–42.
- [36] Lapčík L, Vašina M, Lapčíková B, Otyepková E, Waters KE. Investigation of advanced mica powder nanocomposite filler materials: surface energy analysis, powder rheology and sound absorption performance. *Compos Part B Eng* 2015;77:304–10.

- [37] Lapčík L, Otyepka M, Otyepková E, Lapčíková B, Gabriel R, Gavenda A, et al. Surface heterogeneity: information from inverse gas chromatography and application to model pharmaceutical substances. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2016;24:64–71. August.
- [38] Le AT, Gacoin A, Li A, Mai TH, El Waki N. Influence of various starch/hemp mixtures on mechanical and acoustical behavior of starch-hemp composite materials. *Compos Part B Eng* 2015;75:201–11.
- [39] Lapčík L, Lapčíková B, Krásný I, Kupská I, Greenwood RW, Waters KE. Effect of low temperature air plasma treatment on wetting and flow properties of kaolinite powders. *Plasma Chem Plasma Process* 2012;32(4):845–58.

Příloha E

Surface energy analysis (SEA) and rheology of powder milk dairy products



Surface energy analysis (SEA) and rheology of powder milk dairy products



Lubomír Lapčík^{a,b,*}, Barbora Lapčíková^{a,b}, Eva Otyepková^a, Michal Otyepka^a, Jakub Vlček^a, František Buňka^b, Richardos Nikolaos Salek^b

^a Department of Physical Chemistry, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 77146 Olomouc, Czech Republic

^b Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Technology, Institute of Foodstuff Technology, nám. T.G. Masaryka 5555, 760 05 Zlín, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2014

Received in revised form 10 October 2014

Accepted 3 November 2014

Available online 8 November 2014

Keywords:

Skimmed milk powder

Whey powder

Demineralised whey powder

Wetting

Surface energy distribution

Surface energy analysis

Inverse gas chromatography

Thermal analysis

Scanning electron microscopy

Powder rheology

Flow index

ABSTRACT

Results of inverse gas chromatography adsorption/desorption experiments using selected probes on skimmed milk, whey and demineralised whey powder materials are presented. The dispersive component of surface energy was found to be dominant, indicating a low polarity character. Surface energy profiles of demineralised whey and skimmed milk showed a characteristic steep exponential decrease from approximately 170 mJ/m² to 60 mJ/m² and 140 mJ/m² to 45 mJ/m², respectively, whereas whey powder exhibited a constant (non-exponential) surface energy at approximately 45 mJ/m². The dispersive surface energy of demineralised whey and skimmed milk powder showed a broad distribution ranging from 40 mJ/m² to 120 mJ/m² and 175 mJ/m², respectively. In contrast, the dispersive surface energy distribution for whey was very narrow, ranging from only 42.8 mJ/m² to 45 mJ/m². The determined yield locus and Mohr's circles indicated that demineralised whey exhibited free flowing powder characteristics, whereas skimmed milk and whey exhibited cohesive powder flow behaviour.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Powdered milk is a major precursor for many food products. Its value has been enhanced in recent years by the relatively large amount of research conducted to support the development and commercialisation of dairy-based products with an increasing variety of flavours, textures and shelf-lives (Osorio et al., 2014; Bolenz, Romisch, & Wenker, 2014; Crowley, Gazi, Kelly, Huppertz, & ÓMahony, 2014; Martinez-Padilla, Garcia-Mena, Casas-Alencaster, & Sosa-Herrera, 2014; Romeih, Abdel-Hamid, & Awad, 2014; Saffari & Langrish, 2014; Zhou, Liu, Chen, Chen, & Labuza, 2014; Nilufer-Erdil, Serventi, Boyacioglu, & Vodovotz, 2012). The colloidal nature of cow's milk is a crucial structural feature that affects its final product quality as well as processing behaviour (Fox & McSweeney, 1998; Gauchon et al., 1997). It can be divided into two compositional domains: the casein micelle and the milk

fat globule. These colloidal domains comprise nearly 80% of the approximate 12.7 g total solids per 100 g⁻¹ in milk. Therefore, investigation of the structure and interactions of these colloidal particles continues to be an important area of milk research. Dried milk powders (e.g. whole, skimmed or retentate), dried buttermilk, and other dairy powders (e.g. cheese whey powder (WP), whey protein concentrates (WPC), whey protein isolates (WPI), caseinates and lactose) are products made from milk or whey where practically all the water is removed, i.e. to <4 g per 100 g⁻¹ of water (Tamime, Robinson, & Michel, 2007). These dried products have a very long shelf-life, they can be stored at ambient temperature and can be readily exported to countries that have a shortfall in milk production. After rehydrating milk powders, the reconstituted products may be similar to fresh milk (whole or skimmed), whereas the remaining dairy powders have different applications in the dairy, food and pharmaceutical industries.

In this study, the term skimmed milk powder defines a dairy product obtained by removing the water from skimmed milk, with a maximum fat content of 11%, a maximum moisture content of 5% and protein content not less than 31.4% of non-fatty dry extract. Skimmed milk powder is by far the most important of all milk

* Corresponding author at: Department of Physical Chemistry, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 77146 Olomouc, Czech Republic. Tel.: +420 732506770.

E-mail address: lapciki@seznam.cz (L. Lapčík).

powders and the most widely used form of milk protein in the food industry. Skimmed milk production firstly involves its evaporation to a concentration of about 50% of total solids. Thereafter, the evaporated skimmed milk can be dried in any of the various types of spray drier available. Two types of powder can therefore be distinguished: roller-dried powder and spray-dried powder. Moreover, skimmed milk powder represents a significant source of protein (35%) and carbohydrate (lactose, 50%) and can be used as a food ingredient, for reconstitution and as an animal feed. As a food ingredient, it performs three main functions: (i) contributes to a desirable dairy flavour, (ii) affects food texture, and (iii) enhances the development of desirable colour and flavour compounds (Ranken, Kill, & Baker, 1997; Tamime et al., 2007).

Whey is a general term describing the translucent liquid part of milk that remains following the process (isoelectric or rennet coagulation) of cheese manufacturing (Hoffman & Falvo, 2004; Manso & Lopez-Fadino, 2004). Whey prepared by isoelectric precipitation or rennet coagulation is called acid whey (dry whey with 0.35% or higher titratable acidity on a reconstituted basis) or sweet (rennet) whey (dry whey not over 0.16% titratable acidity on a reconstituted basis), respectively. Whey contains nearly 50% of the total solids found in whole milk, including essentially all the lactose and whey proteins (Fundamentals of cheese, 15). The content of total essential amino acids and branched-chain amino acids is high in whey protein than in most other dietary proteins (Helaine, Valdemiro, Dias, Borges, & Tanikawa, 2001). Whey and whey products are commonly used in animal feed, dietetic foods (infant food), bread, confectionery, candies and beverages. The composition of whey products varies depending on several factors, including the source of the milk, production method, type of cheese and manufacturer's specifications. Whey and whey components contain a number of valuable minerals such as calcium, magnesium, manganese, phosphorus, copper, iron, zinc, sodium and potassium.

The main component of whey is lactose (70–75%), while the major component of whey solids are whey proteins (10–13%), mainly lactalbumin and globulins. Practically all the mineral elements found in whey are essential for nutrition. Condensed whey, dried whey, dried modified whey, whey protein concentrate and isolates, as well as lactose (crystallised and dried) are the most often reported whey products. Whey can also be processed into a number of valuable products, as well as some that are considered waste products. Examples of whey types include reduced lactose whey, demineralised whey, acid whey, sweet whey and whey protein concentrate. Whey protein is a complete, high quality protein with a rich amino acid profile. Whey proteins refer to a group of individual proteins or fractions that separate out from casein during cheese-making. These fractions are usually purified to different concentrations depending on the end composition desired and vary in their content of protein, lactose, carbohydrates, immunoglobulins, minerals and fat (Tamime et al., 2007). Demineralised whey powder is produced from whey by selective removal of most of the minerals.

The properties of surfaces and interfaces characterised by surface or interfacial tension and surface energy have attracted increasing attention in recent years. Such properties affect many phenomena associated with adhesion, wetting, spreading and wicking, which play an important role in everyday life, natural processes and numerous industrial applications. These processes are important in various materials, for instance biopolymers (Collins, 2014; Lapčik, Lapčik, De Smedt, Demeester, & Chabreček, 1998), synthetic polymers, wood (Lapčik et al., 2014), paper, stone, soils (Lapčik et al., 2012), cereals and textiles, encompassing all possible types of surface from polar to non-polar (Gamble et al., 2012). However, the surfaces of such materials are usually rough rather than smooth and may even be porous, making their surface characterisation challenging. Despite the difficulties, several methods are

applicable for characterising powder and fibrous materials (Gajdošíková, Lapčiková, & Lapčik, 2011), such as the capillary rise method, thin-layer wicking and Wilhelmy plate method. In particular, a surface energy analysis technique based on inverse gas chromatography has been found to be very effective for characterising wetting phenomena on powders and fibres (Lapčik, Otyepková, Lapčiková, & Otyepka, 2013; Mohammadi-Jam & Waters, 2014; Lazar et al., 2014).

2. Methods

2.1. Theoretical background

The surface free energy of a solid can be described by the sum of dispersive and specific contributions. Dispersive (apolar) interactions, also known as Lifshitz-van der Waals interactions, consist of London interactions originating from electron density changes but may also include both Keesom and Debye interactions (Gajdošíková et al., 2011). Other forces influencing the magnitude of surface energy are Lewis acid–base interactions, which are generated between an electron acceptor (acid) and electron donor (base). They occur in compounds containing hydrogen bonds – strong secondary bonds between atoms of hydrogen and a highly electronegative element such as F, O, N and Cl or other compounds that can interact with Lewis acids and bases. Details of the most widely accepted theoretical treatment for estimation of solid surface free energies from selective wetting measurements are given in our recent review article (Gajdošíková et al., 2011).

The dispersive component of the surface energy γ_S^D can be calculated from the retention times obtained from inverse gas chromatography measurements of a series of n-alkane probes injected at infinite dilution (concentration within the Henry region of the adsorption isotherm) (Belgacem, Gandini, & Pefferkorn, 1999). For evaluation of these dependencies, two approaches have been used, as described by Eq. (1) (Schultz, Lavielle, & Martin, 1987) and (2) (Dorris & Gray, 1980):

$$RT \ln V_N = a(\gamma_L^D)^{1/2} 2N_A(\gamma_S^D)^{1/2} + C \quad (1)$$

where R is the universal gas constant, N_A is Avogadro's number, γ_L^D is the dispersive component of surface free energy of the liquid probe, γ_S^D is the dispersive component of the surface free energy of the solid, V_N is the retention volume and C is a constant, and

$$\gamma_S^D = \frac{[RT \ln(V_{N(C_{n+1}H_{2n+4})})/V_{N(C_nH_{2n+2})}]}{4N_A^2 a_{CH_2}^2 \gamma_{CH_2}} \quad (2)$$

where a_{CH_2} is the surface area of a CH_2 unit ($\sim 0.6 \text{ nm}^2$) and γ_{CH_2} is its free energy (approximately 35.6 mJ/m^2).

3. Experimental

Inverse gas chromatography was conducted using a surface energy analyser (SEA) (Surface Measurement Systems, UK). Samples were placed in 4 mm (internal diameter) columns to give a total surface area of approximately 0.5 m^2 . The following eluent vapours were passed through the column: nonane, octane, hexane and heptane. All reagents were obtained from Sigma Aldrich (USA) and were of analytical grade. The injection of vapours was controlled in order to pass a set volume of eluent through the column to give pre-determined fractional coverage of the sample in the column. Using this method, the retention time of the vapours through the particles gives an indication of the surface properties of the material, including the surface energy. By gradually increasing the amount of vapour injected, it is possible to build up a surface heterogeneity plot.

Specific surface area measurements were made using a Micromeritics TriStar 3000 surface area and porosity analyser (USA) combined with the nitrogen BET technique.

Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) experiments were performed on a Netzsch STA 449 C Jupiter simultaneous thermal analyser (Netzsch, Germany). Samples were weighted to aluminium pans and measured. Each measurement was repeated 3×. Conditions of measurement: Heat flow 10 °C/min and dynamic atmosphere of nitrogen (N₂ – 50 ml/min), range of temperature measurement was from 35 °C to 300 °C. Throughout the experiment, the sample temperature and weight-heat flow changes were continuously monitored.

Scanning electron microscopy (SEM) images were captured on a Hitachi 6600 FEG microscope (Japan) operating in the secondary electron mode and using an accelerating voltage of 1 kV.

Powder rheology measurements were acquired on a FT4 Powder rheometer (Freeman Technology, UK). All experiments were performed under the laboratory ambient temperature of 23 °C and air relative humidity of 43%.

The moisture content of the powdered samples was as follows: skimmed milk 3.7 wt.%, whey 2.0 wt.% and demineralised whey 2.4 wt.% (Moravia Lacto, Czech Republic). The powdered milk samples were stored under dry conditions in desiccators (at an ambient temperature of 23 °C) for 2 weeks prior to the experiments.

4. Results and discussion

A typical SEM image for the powdered milk materials under study is presented in Fig. 1, showing that the particles had a spherical shape. The individual particle diameter of the powdered skimmed milk sample was found to be 15.1 µm, compared to 80.0 µm and 88.0 µm for the powdered whey and demineralised whey samples, respectively. All samples were characterised by thermogravimetric and DSC measurements over a temperature range of +35 to +300 °C to evaluate moisture content and thermal stability. The observed TG and DSC temperature dependencies are shown in Figs. 2 and 3. It can be seen from these scans (Fig. 2) that the powdered skimmed milk and whey samples exhibited three step weight loss patterns. The first TG weight loss step occurred from 35 to 150 °C and corresponded to a weight loss of 4.6 wt.% for the skimmed milk and 3.1 wt.% for the whey sample, representing moisture release of physically retained water molecules by casein or whey proteins. As all samples were conditioned at the same humidity prior to the experiments, the linear zero moisture behaviour in the case of demineralised whey is likely due to its low mineral content in comparison to the other two materials (skimmed milk and whey). The second TG degradation step occurring over the temperature range 150–248 °C was attributed to the thermo-destruction of casein and whey proteins (Mocanu et al., 2012). The thermal stability of the studied milk dairy products can be described by the initial temperature of thermal degradation (2. region), which was 150 °C. At this temperature, the weight loss

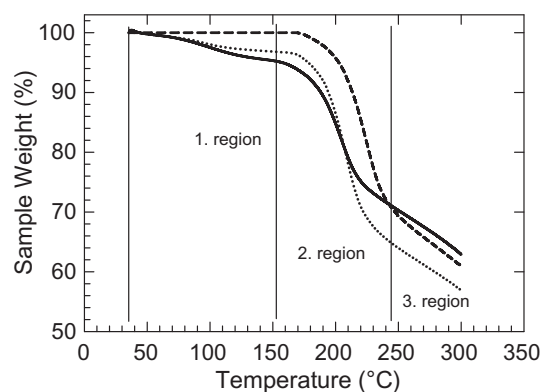


Fig. 2. Thermogravimetric analysis of studied powder milk products: full line – powdered skimmed milk, dotted line – powdered whey, short dashed line – demineralised powdered whey.

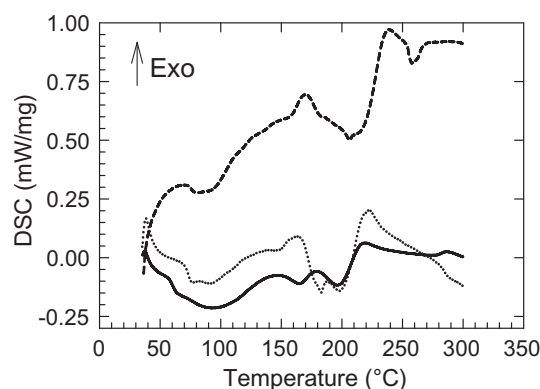


Fig. 3. DSC pattern of studied powder milk products: full line – powdered skimmed milk, dot line – powdered whey, short dashed line – demineralised powdered whey.

for all samples was approximately 25–32 wt.%. The third degradation step was initiated at 248 °C for skimmed milk and whey and at 236 °C for demineralised whey. The residual masses were 62.9 wt.% for powdered skimmed milk, 56.9 wt.% for powdered whey and 60.9 wt.% for demineralised powdered whey. As evident from Fig. 2, the weight lost pattern of skimmed milk during the third degradation step was inverted (became the lowest) in comparison to the first and second degradation regions. We ascribed this behaviour to the higher residual mass of lactose in comparison to the milk fats. The thermal characteristics of milk powder are significantly affected by fat and lactose content (Rahman, Al-Hakmani, Al-Alawi, & Al-Marhubi, 2012). However, the tangent of the sample weight at 200 °C was higher for the whey products in comparison to the skimmed milk, indicating that milk fats have a lower degradation resistivity in comparison to lactose in skimmed

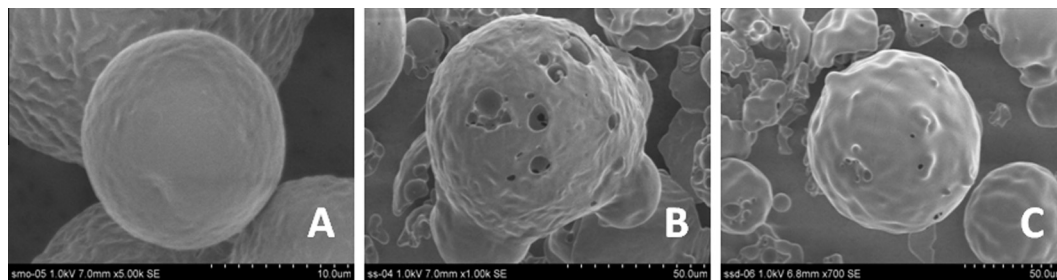


Fig. 1. SEM images of studied powders: (A) skimmed milk, (B) whey, and (C) demineralised whey.

milk. As milk is a multi-component mixture, it would be difficult to attribute its thermal behaviour to particular components as complex individual as well as synergistic effects need to be taken into account.

Based on the DSC data (Fig. 3), the first exothermic peak at approximately 170 °C can be assigned to lactose crystallisation and the second huge peak to the non-enzymatic browning advanced Maillard reaction between proteins and lactose, which is initiated at a temperature of 220 °C (Rahman et al., 2012; Vuataz, Meunier, & Andrieux, 2010). The last third degradation region is likely to correspond to oxidation of milk fats and lactose degradation (Raemy, Hurrell, & Löfger, 1983).

The specific surface areas of the studied samples were identical for all materials under study. Although the obtained value of 0.6 m²/g was relatively low, it was in excellent agreement with data available in previous literature (Berlin, Howard, & Pallansch, 1964).

Surface energy profiles and their components of the studied milk products powders based on the inverse gas chromatography measurements are shown in Fig. 4. The surface energy profiles of skimmed milk and demineralised whey clearly differed from that of whey. The first two materials (skimmed milk and demineralised whey) showed a characteristic steep exponential decrease in surface energy from approximately 170 mJ/m² to 60 mJ/m² and 140 mJ/m² to 45 mJ/m², respectively, between a coverage of 0% to approximately 2% (skimmed milk) and 5% (demineralised whey), reflecting the relatively low number of high energy sites on the surface of these materials. In contrast, for a surface coverage of 5% up to 20%, the surface energy profiles plateaued at 45 mJ/m² (skimmed milk) and 60 mJ/m² (demineralised whey). As clearly visible from Fig. 4, the dispersive component dominated the surface energy, thus reflecting the non-polar nature of the surface active sites in both skimmed milk and demineralised whey powders. The same hydrophobic character was also found for the third material under study, i.e. whey. However, in contrary to the above mentioned skim milk and demineralised whey materials, a surface energy coverage dependence exhibited stable non-exponential (linear) pattern with the magnitude of the observed surface energy approximately 45 mJ/m², thus reflecting high homogeneity of acting energetic surface sites. For all three tested materials, the polar component of the surface energy was negligible in comparison to the dispersive component. For both the whey and demineralised whey powders, its value was independent of coverage at approximately 5 mJ/m², thus suggesting a high uniformity of surface struc-

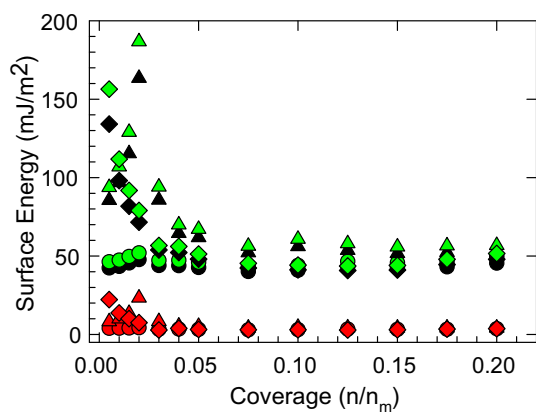


Fig. 4. Surface energy and its component profiles of powdered milk products: circle – powdered whey, triangle – demineralised powdered whey, diamond – powdered skimmed milk, black – dispersive component of the surface energy (SFE), red – polar component of SFE, green colour – total SFE. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

tural components responsible for this kind of behaviour. However, the polar component of skimmed milk showed an exponential decay, ranging from 30 mJ/m² for a coverage of 0% coverage up to 5 mJ/m² for coverages of 3% up to 20%, which indicates a broader distribution of energetic sites responsible for such behaviour due to the increased complexity of the main milk constituents. It was also evident that the polar surface active sites were of relatively low energy in all the studied powders, providing further evidence of their low polarity character. Such behaviour can be attributed to the presence of milk fat components at the surface interface (Jensen, Ferris, & Lammi-Keefe, 1991).

The measured dispersive surface energy (Fig. 5), showed a characteristically broad distribution for both skimmed milk (40–175 mJ/m²) and demineralised whey (40–120 mJ/m²), thus reflecting the large number of structural elements responsible for this behaviour. However, the dispersive surface energy distribution of whey was very narrow (see Fig. 5 – inset), ranging from only 42.8 mJ/m² to 45 mJ/m², with relatively the same area increment occupancy of 2% as for demineralised whey. In contrast, the area increment occupancy for skimmed milk was 3 times higher, reaching 6%. This SEA pattern behaviour may be due to the greater concentration of inorganic salts in whey in comparison to milk and demineralised whey, which might successfully screen the most energetic surface sites (at the lowest surface coverage) by binding surrounding water molecules remaining as residual moisture content.

The macroscopic powder flow behaviour was also investigated by determining the yield locus and flow function dependencies at different stress levels for the studied samples. Results of the powder rheological measurements are shown in Fig. 6, which presents the yield locus and Mohr's circles of the tested powder milk dairy products. The results show that demineralised whey exhibited free flowing powder characteristics, as indicated by the observed friction coefficient of 11.7. In contrast, the friction coefficients of the skimmed milk and whey powders ranged from 3.3 to 4.5, which are values characteristic for cohesive powders behaviour. The unconfined yield strengths ranged from 1.37 kPa (demineralised whey) to 4.48 kPa (skimmed milk) and 4.69 kPa (whey). The unconfined yield strength, σ_c , can be obtained from the stress circle tangential to the yield locus and passing through the origin (minor principal stress $\sigma_2 = 0$). Because the largest Mohr stress circle indicated a state of steady-state flow, the internal friction angle can be regarded as a measure of the internal friction at steady-state flow (Lapčik et al., 2012). For the studied samples, the angle of internal friction ranged from 26.5° for whey up to 36.4° and 40.4° for demineralised whey and skimmed milk, respectively. The relatively low

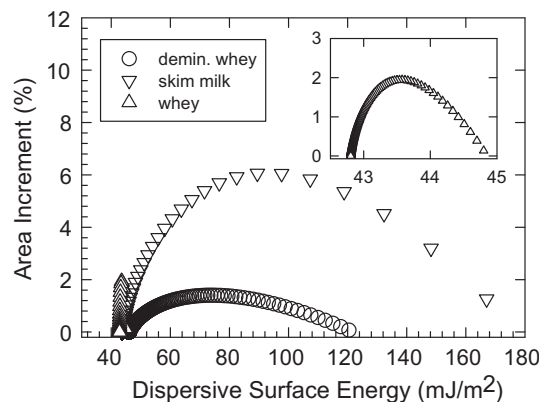


Fig. 5. Dispersive surface energy distribution of demineralised powdered whey (circle), powdered skimmed milk (triangle down) and powdered whey (triangle up). Inset: expanded dispersive surface energy distribution of whey sample.

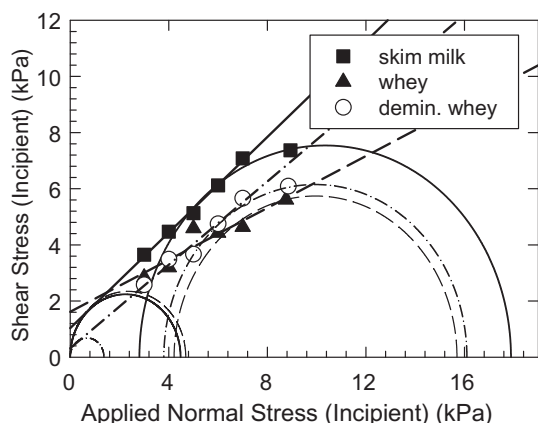


Fig. 6. Yield locus and Mohr's circles of studied powdered milk products: full square – skimmed milk, full triangle up – whey, empty circle – demineralised whey (measured at 24 °C).

value of the angle of internal friction observed for whey is consistent with the observed friction factor of 3.3 characteristic for cohesive powders. The relevant consolidation stress, σ_1 , can be obtained from the major principal stress of the Mohr stress circle tangential to the yield locus and intersecting the point of steady flow. The major principle stress for all the tested powders was about 16–18 kPa. The latter stress circle represents the stresses in the sample at the end of the consolidation procedure (stress at steady state flow). It corresponds to the stress circle at the end of consolidation in the uniaxial compression test.

In addition to the above shear testing, powder aeration tests were performed, allowing consideration of the fluidisation capability of the studied powders. The aeration ratio was found to range from 32.4 for whey to 12.7 (demineralised whey) and 8.98 for skimmed milk, whereas the aerated energy varied from 4.8 mJ (whey) to 10.1 mJ (demineralised whey) and 14.4 mJ (skimmed milk). The aeration data indicated that whey showed the lowest cohesion of all the samples tested, i.e. highest aeration ratio in combination with the lowest aerated energy. All the tested powders exhibited complete fluidisation at 4 mm/s air velocity, with basic flowability energy ranging from 127 mJ (skimmed milk and demineralised whey) to 157 mJ for whey.

5. Conclusions

The results showed that the surface energy of the studied milk product powders was dominated by the dispersive component, indicating their low polarity character. Surface energy profiles of skimmed milk and demineralised whey showed a characteristic steep exponential decrease of the surface energy from approximately 170 mJ/m² to 60 mJ/m² (demineralised whey) and of 140 mJ/m² to 45 mJ/m² (skimmed milk), reflecting the relatively small number of high energy sites located at the surface of the studied materials. From 5% up to 20% surface coverage, the surface energy profiles reached a plateau at 45 mJ/m² for skimmed milk and 60 mJ/m² for demineralised whey. Whey powder surface energy coverage dependence exhibited stable non-exponential (linear) pattern with the magnitude of the observed surface energy approximately 45 mJ/m², thus reflecting high homogeneity of acting energetic surface sites. For all three tested materials, the polar component of the surface energy was negligible in comparison to the dispersive component. It was found that the polar surface active sites were of relatively low energy in all the studied powders, confirming their low polarity character. The observed dispersive surface energy showed characteristically broad distributions

for skimmed milk and demineralised whey ranging from 40 mJ/m² to 175 mJ/m² and 120 mJ/m², respectively, thus reflecting the large number of structural elements responsible for this behaviour. In contrast, the dispersive surface energy distribution of whey was very narrow, ranging from only 42.8 mJ/m² to 45 mJ/m². The macroscopic powder flow behaviour of the studied materials was analysed by examining the yield locus and flow function dependencies at different stress levels. The determined yield locus and Mohr's circles indicated that demineralised whey exhibited free flowing powder characteristics (observed friction coefficient 11.7). However, the friction coefficients of the skimmed milk and whey powders were in the range 3.3–4.5, which are values characteristic for cohesive powders. All tested powders allowed complete fluidisation at 4 mm/s air velocity, with basic flowability energies ranging from 127 mJ (skimmed milk and demineralised whey) to 157 mJ for whey.

Acknowledgements

Financial support from the Operational Program Research and Development for Innovations – European Regional Development Fund (grants CZ.1.05/3.1.00/14.0302 and CZ.1.05/2.1.00/03.0058) and the Tomas Bata University in Zlin and Palacky University in Olomouc Internal Grant Agencies (projects IGA/FT/2014/001 and PrF_2014_032) is gratefully acknowledged. Special thanks to Mgr. K. Šafářová, Ph.D. for performing the SEM measurements.

References

- Belgacem, M. N., Gandini, A., & Pefferkorn, M. N. (1999). *Interfacial phenomena in chro-matography*. New York: Marcel Dekker.
- Berlin, E., Howard, N. M., & Pallansch, M. J. (1964). Specific surface area of milk powders produced by different drying methods. *Journal of Dairy Science*, 47, 132–138.
- Bolenz, S., Romisch, J., & Wenker, T. (2014). Impact of amorphous and crystalline lactose on milk chocolate properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1644–1653.
- Collins, M. N. (2014). *Hyaluronic acid biomedical and pharmaceutical applications*. Shawbury: Smithers Rapra.
- Crowley, S. V., Gazi, I., Kelly, A. L., Huppertz, T., & ÓMahony, J. A. (2014). Influence of protein concentration on the physical characteristics and flow properties of milk protein concentrate powders. *Journal of Food Engineering*, 135, 31–38.
- Dorris, G. M., & Gray, D. G. (1980). Adsorption of normal-alkanes at zero surface coverage on cellulose paper and wood fibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 77, 353–362.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Gajdošíková, R., Lapčíková, B., & Lapčík, L. (2011). Surface phenomena and wetting of porous solids. *Physical Chemistry: An Indian Journal*, 6, 146–162.
- Gamble, J. F., Leane, M., Olusanmi, D., Tobby, M., Supuk, E., Khoo, J., et al. (2012). Surface energy analysis as a tool to probe the surface energy characteristics of micronized materials – a comparison with inverse gas chromatography. *International Journal of Pharmaceutics*, 422, 238–244.
- Gauchon, F., Famelart, M. H., Mariette, F., Raulot, K., Michel, F., & LeGraet, Y. (1997). Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry*, 59, 439–447.
- Helaine, B. J., Valdemiro, C. S., Dias, N. F. G. P., Borges, P., & Tanikawa, C. (2001). Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein and liver cholesterol. *Nutrition Research*, 21, 905–915.
- Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. (2004). Protein – Which is best? *Journal of Sports Science and Medicine*, 3, 118–130.
- Jensen, R. G., Ferris, A. M., & Lammi-Keefe, C. J. (1991). The composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 74, 3228–3243.
- Lapčík, L., Lapčík, L., De Smedt, S., Demeester, J., & Chabreček, P. (1998). Hyaluronan: Preparation, structure, properties and applications. *Chemical Reviews*, 98, 2663–2684.
- Lapčík, L., Lapčík, L., Kubiček, P., Lapčíková, B., Zbořil, R., & Nevěčná, T. (2014). Study of penetration kinetics of sodium hydroxide aqueous solution into wood samples. *BioResources*, 9, 881–893.
- Lapčík, L., Lapčíková, B., Krásný, I., Kupská, I., Greenwood, R. W., & Waters, K. E. (2012). Effect of low temperature air plasma treatment on wetting and flow properties of kaolinite powders. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32, 845–858.
- Lapčík, L., Otyepková, E., Lapčíková, B., & Otyepka, M. (2013). Surface energy analysis (SEA) study of hyaluronan powders. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 1170–1174.

- Lazar, P., Otyepková, E., Banáš, P., Fargašová, A., Šafářová, K., Lapčík, L., et al. (2014). The nature of high surface energy sites in graphene and graphite. *Carbon*, *73*, 448–453.
- Manso, M. A., & Lopez-Fadino, R. (2004). β -Casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, *20*, 329–355.
- Martinez-Padilla, L. P., Garcia-Mena, V., Casas-Alencaster, N. B., & Sosa-Herrera, M. G. (2014). Foaming properties of skim milk powder fortified with milk proteins. *International Dairy Journal*, *36*, 21–28.
- Mocanu, A. M., Moldoveanu, C., Odochian, L., Paius, C. M., Apostolescu, N., & Neculau, R. (2012). Study on the thermal behaviour of casein under nitrogen and air atmosphere by means of the TG-FTIR technique. *Thermochimica Acta*, *546*, 120–126.
- Mohammadi-Jam, S., & Waters, K. E. (2014). Inverse chromatography applications: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.07.002>.
- Nilufer-Erdil, D., Serventi, L., Boyacioglu, D., & Vodovotz, Y. (2012). Effect of soy milk powder addition on staling of soy bread. *Food Chemistry*, *131*, 1132–1139.
- Osorio, J., Monjes, J., Pinto, M., Ramirez, C., Simpson, R., & Vega, O. (2014). Effects of spray drying conditions and the addition of surfactants on the foaming properties of a whey protein concentrate. *LWT-Food Science and Technology*, *58*, 109–115.
- Raemy, A., Hurrell, R. F., & Löfliger, J. (1983). Thermal behavior of milk powders studied by differential thermal analysis and heat flow calorimetry. *Thermochimica Acta*, *65*, 81–92.
- Rahman, M. S., Al-Hakmani, H., Al-Alawi, A., & Al-Marhubi, I. (2012). *Thermochimica Acta*, *549*, 116–123.
- Ranken, M. D., Kill, K. C., & Baker, C. (1997). *Food industrial manual*. London: Blackie Academic & Professional.
- Romeih, E. A., Abdel-Hamid, M., & Awad, A. A. (2014). The addition of buttermilk powder and transglutaminase improves textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt. *Dairy Science & Technology*, *94*, 297–309.
- Saffari, M., & Langrish, T. (2014). Effect of lactic acid in-process crystallization of lactose/protein powders during spray drying. *Journal of Food Engineering*, *137*, 88–94.
- Schultz, L., Lavielle, C., & Martin, J. (1987). The role of the interface in carbon fibre-epoxy composites. *Journal of Adhesion*, *23*, 45–60.
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K., & Michel, M. (2007). Microstructure of concentrated and dried milk products. In A. Y. Tamime (Ed.), *Structure of dairy products* (pp. 104–133). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Vuataz, G., Meunier, V., & Andrieux, J. C. (2010). Tg-DTA approach for designing reference methods for moisture content determined in food powders. *Food Chemistry*, *122*, 436–442.
- Zhou, P., Liu, D. S., Chen, X. X., Chen, Y. J., & Labuza, T. P. (2014). Stability of whey protein hydrolysate powders: Effects of relative humidity and temperature. *Food Chemistry*, *150*, 457–462.



Univerzita Palackého
v Olomouci

**FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ STUDIUM DEPOZICE A UVOLŇOVÁNÍ MIKRO/NANO
ROZMĚRNÝCH ČÁSTIC A HELA BUNĚK NA MODELOVÝCH POVRŠÍCH**

Mgr. Jakub Vlček

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.

Katedra fyzikální chemie

Olomouc 2019



Přírodovědecká
fakulta

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studia fyzikální chemie na Katedře fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Ph.D. student:

Mgr. Jakub Vlček

Katedra fyzikální chemie, PřF, UPOL

Vedoucí práce:

prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.

Katedra fyzikální chemie, PřF, UPOL

Oponenti:

Místo a termín obhajoby:

Místo, kde se bude možné s disertační prací a posudky alespoň 14 dní před vykonáním obhajoby seznámit

Obsah

1	Úvod.....	5
2	Technika impinging jet	6
3	Adheze buněk na povrch pevných látek.....	8
3.1	Fyzikálně-chemické jevy ovlivňující adhezi buněk	8
3.2	Využití 2D uhlíkových nanomateriálů jako substrát pro adhezi buněk	9
4	Základy reologie partikulárních látek.....	10
4.1	Tokové vlastnosti práškových materiálů	11
5	Polymerní kompozitní materiály	13
5.1	Mechanické chování polymerních kompozitů v jednoosém tahu	13
6	Cíle disertační práce.....	15
7	Řešená problematika s využitím systému impinging jet.....	18
7.1	Studium depozice modelových částic (PS) na nanostrukturovaných polymerních površích.....	18
7.2	Studium adheze buněk (HeLa) na planárních površích (G, GO, sklo).....	24
8	Další řešená problematika	31
8.1	Vliv tvaru minerálních plniv na mechanické chování kompozitů polyetylen/slída a polyetylen/wollastonit.	32

8.2	Charakterizace kohezních sil u partikulárních látek pomocí mechanického smykového napětí a aeračních testů.	37
9	Seznam publikací.....	45
10	Použitá literatura.....	46

1 Úvod

Detailní znalost a porozumění mezifázových procesů a jevů je klíčem k pochopení řady biologických, chemických a technologických procesů a jevů, které mají praktický význam v biomedicínské a technické praxi. Jedná se zejména o pochopení vzniku kohezních a adhezních sil mezi adsorbátem a adsorbentem, mezi plnivem a matricí v kompozitech, lepeným spojem dvou nebo více materiálů nebo interakce biologických entit jako např. buněk na povrchu pevné fáze apod. Z hlediska vzájemné interakce se jako významné jeví jednak vlastní chemické složení jednotlivých materiálů, jejich krystalická struktura, povrchová energie a polarita, drsnost, tvar mezifázového povrchu a jeho topologie. Pro přiblížení našich experimentů co nejbližší realitě se jako další parametr kromě teploty jeví typ aplikovaného deformačního napětí a jeho časový průběh a intenzita. Proto v této disertační práci byly provedeny experimenty zaměřené na charakterizaci mezifázových sil na fázovém rozhraní pevná fáze/pevná fáze v kompozitech pro jednoosé namáhání, dále byla použita smyková cela pro práškové materiály pro charakterizaci kohezních sil na fázovém rozhraní pevná fáze/plyn a v neposlední řadě byl zkoumán vliv hydrodynamických a smykových sil v laminárním toku na adsorpci/desorpci částic a buněk na fázovém rozhraní pevná fáze/kapalná fáze. Pro účely zkoumání interakcí na fázovém rozhraní pevná fáze/kapalná fáze byl konstrukčně upraven a realizován systém pro měření kinetiky depozice/uvolňování částic na bázi technologie impinging jet (vzhledem k absenci adekvátního českého překladu bude nadále v předkládané práci používán anglický termín).

Předložená disertační práce je rozdělená do dvou hlavních celků. První část se zabývá teoretickým popisem principu metody impinging jet a principy adheze buněk na povrch pevné fáze a jevy, které buněčnou adhezi ovlivňují. Dále jsou popsány principy mechanických vlastností polymerních kompozitů a jejich chování při jednoosém namáhání. První část je pak uzavřena popisem vlivu kohezních a adhezních sil na tokové vlastnosti partikulárních látek spolu s teoretickým popisem testování těchto vlivů pomocí smykové cely. Druhá část se zabývá samotným popisem experimentů, výsledky a jejich diskuzí. Nejprve se autor zabývá experimenty založené na metodě impinging jet: studium vlivu nano-embosování na kinetiku depozice polystyrenových částic na povrch Zeonoru a studium adheze HeLa buněk na 2D-uhlíkaté

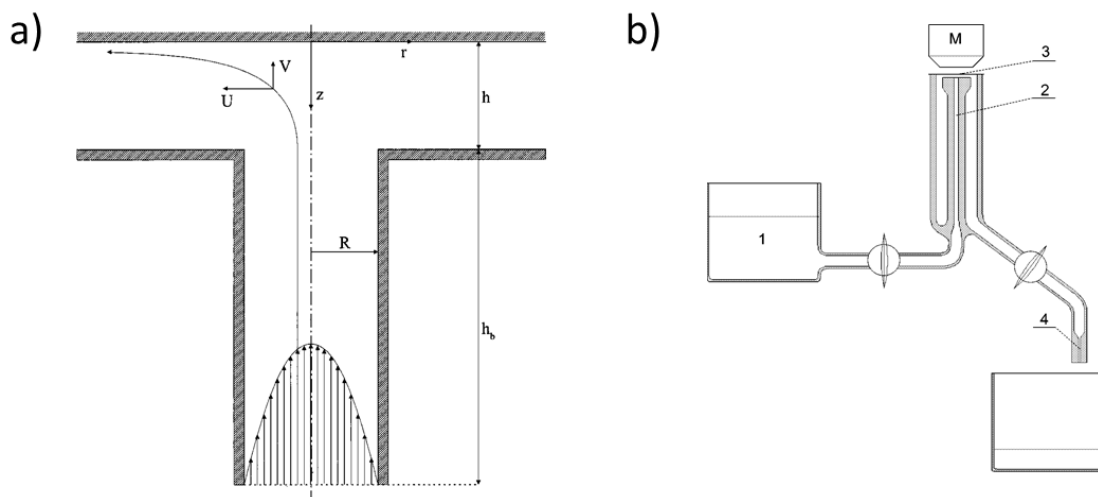
nanomateriály. Dále je řešen vliv adheze minerálních plniv do polymerní matrice vysokohustotního polyetyleny (HDPE) na výsledné mechanické vlastnosti pomocí deformačního napětí v tahu. Experimentální část pak uzavírá popis experimentů zaměřených na vliv koheze na tokové vlastnosti minerálních plniv a mléčných produktů. Všechny výsledky z experimentální části byly použity jako součást publikací v impaktovaných odborných časopisech.

2 Technika impinging jet

Studium interakcí nano- a mikro-rozměrných částic na rozhraní pevné fáze/kapalné fáze se zaměřením na adsorpční/desorpční jevy je důležité v mnoha oblastech a průmyslových procesech. Např. pro lepší pochopení filtračních procesů, čištění odpadních vod, navrhování mikrofluidních zařízení, při výrobě papíru, charakterizaci polymerů nebo pochopení procesu zanášení membrán.¹⁻⁴ Pro přesné a úplné pochopení výše zmíněného fenoménu je potřeba během experimentů dodržovat přesně definované hydrodynamické a fyzikálně-chemické podmínky. Jedny z prvních technik používaných pro studium depozice částic splňující tyto podmínky byly založené na rotačním disku, který zároveň slouží jako substrát k adhezi. Výhodou těchto technik je jednoduchý a dobře popsáný charakter proudění kapaliny v blízkosti disku. Díky tomu, že tloušťka hydrodynamického a difuzního rozhraní je konstantní nad celým povrchem disku, je relativně jednoduché analytické řešení jednodimenzionální konvekčně-difuzní rovnice v blízkosti povrchu disku.⁵ Tuto techniku lze využít nejenom při studiu depozice částic, ale i v elektrochemii, kde rotační disk slouží jako pracovní elektroda.⁶ Další techniky používané ke studiu adsorpce/desorpce částic, které splňují kritéria přesně definované hydrodynamické podmínky, jsou založené na stagnačním toku. Mezi tyto techniky patří i systém impinging jet. Kromě konstantní tloušťky difuzního a hydrodynamického rozhraní v blízkosti stagnačního bodu je u těchto technik výhodou při použití transparentního substrátu možnost přímého pozorování kinetik depozice pomocí optického mikroskopu. U technik založených na rotačním disku nelze tento způsob pozorování depozice využít z důvodu rotačního pohybu disku. Symetrický radiální stagnační tok nazývaný také impinging jet byl poprvé popsán prof. van de Venem a prof. Dabrosem.^{7,8} Pro praktické studování depozice částic splňující tyto podmínky se využívají impinging jet cely s radiálním,⁹⁻¹³ paralelním¹⁴⁻¹⁶ nebo šikmým¹⁷ geometrickým uspořádáním, se

kterým lze provádět experimenty i na netransparentních substrátech. Tyto uspořádání využívají uniformního dvojdimenzionálního toku v okolí stagnačního bodu (centrum symetrie). V těsném okolí tohoto bodu nedochází k transportu hmoty konvenčním tokem kapaliny disperzního prostředí. Ve větších vzdálenostech od stagnačního bodu pak dochází k neuniformnímu proudění a transportu hmoty.⁸

Konfigurace impinging jet systému použité v rámci této disertační práce odpovídá původní geometrii navržené prof. Dabrosem a prof. van de Venem.⁸ Na obr. 1 je znázorněna geometrie depoziční cely spolu s nákresem radiální impinging jet (RIJ) instrumentace.



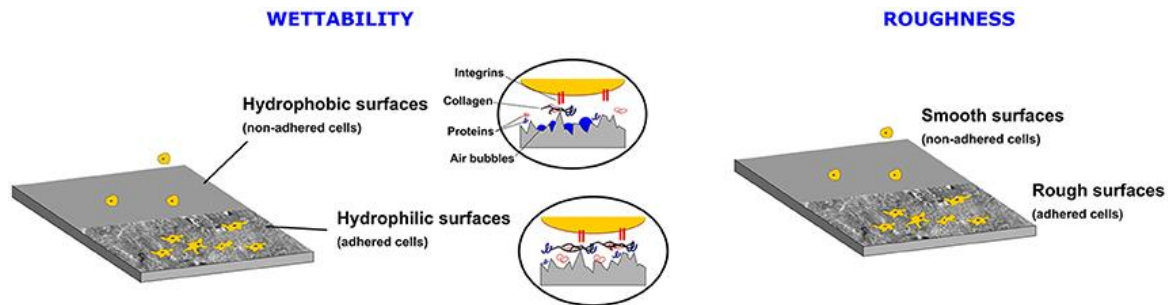
Obr. 1. Schéma geometrie RIJ cely (a), kde R značí poloměr vnitřní kapiláry, h je vzdálenost mezi koncem vnitřní kapiláry a kolektorem (substrát), U a V značí vektory normálové a radiální komponenty rychlosti proudění, z je vzdálenost od adsorpčního rozhraní a r značí radiální vzdálenost od osy symetrie. Schéma impinging jet instrumentace pro studium adsorpce/desorpce částic (b), kde M znázorňuje objektiv optického mikroskopu, 1 znázorňuje zásobní nádobu s disperzí, 2 představuje RIJ cely, 3 značí testovaný transparentní substrát a 4 je výstupní kapilára z RIJ cely.¹⁸ Copyright © Elsevier 2006.

3 Adheze buněk na povrch pevných látek

Adheze buněk má klíčovou roli při mnoha buněčných procesech např. růst, diferenciaci, morfogeneze, apoptóza, formování a regenerace tkání. Pochopení základních principů buněčné adheze a sledování změny síly adheze je důležité v mnoha oblastech např. tkáňovém inženýrství, vývoji biosenzorů, při tvorbě umělých kloubů a implantátů apod.^{19–23} Mechanismus buněčné adheze se dělí na dva základní typy. První typ bez účasti receptorů je založen na slabých nevázebných interakcích jako jsou vodíková vazba, elektrostatické interakce a Van der Waalsovy interakce mezi molekulami na povrchu buněčné membrány a funkčními skupinami na povrchu substrátu bez přítomnosti proteinů z extracelulární matrix (ECM).²⁴ Tento typ interakce nezajišťuje zprostředkování signálu mezi buňkou a jejím okolím.²⁵ Druhý typ mechanismu adheze buněk je založen na ligand-receptor vazbě a spočívá v adhezi buněk skrze proteiny jako je fibronektin, vitronektin, kolagen a laminin z ECM.^{26,27} Tyto proteiny se pak vážou na transmembránové receptory (integriny).^{24,28} Tento typ ligand/receptor interakce umožňující mezibuněčnou komunikaci s aktinovým cytoskeletem je důležitý zejména pro buňky, které jsou závislé na ukotvení na substrát („anchorage dependence cells“).²⁹ Pokud tento typ buněk nemá na buněčné membráně navázány proteiny z ECM nebo si nevytvoří vlastní, dojde k apoptóze do 48 hodin.^{30,31}

3.1 Fyzikálně-chemické jevy ovlivňující adhezi buněk

Rozsah a síla adheze buněk silně závisí na fyzikálně chemických vlastnostech povrchu materiálu zejména na smáčivosti, chemické povaze, polaritě a velikosti volné povrchové energie. Hydrofobní nebo hydrofilní povaha povrchu je jeden z nejdůležitějších parametrů při adhezi buněk na substrát. Adhezní proteiny z ECM se ve vyšších koncentracích vážou na hydrofobní povrch, ale v rigidní a denaturované formě.^{24,32} Tento jev silně ovlivňuje sílu adheze a růst buněk a působí na adhezi negativně. Naopak hydrofilní povrchy podporují adhezi buněk, protože se ECM proteiny vážou ve své přirozené formě.³³ Důležitá je také míra hydrofilní povahy substrátu. V případě superhydrofilních povrchů s kontaktním úhlem smáčení pro vodu menším než 5° dochází ke snížení adsorpce ECM proteinů z důvodu vzniku silných odpudivých sil mezi proteiny a navázanou tenkou vrstvou vody na povrchu substrátu.^{19,34}



Obr. 2. Schématické znázornění vlivu smáčivosti a drsnosti povrchu na adhezi buněk.³⁵ Copyright © RSC 2016.

Ideální podmínky smáčení pro adhezi buněk jsou odlišné pro různé substráty a jsou silně ovlivněny povrchovou topologií, povrchovým nábojem a v neposlední řadě typem a koncentrací funkčních skupin na povrchu.³⁶ Na smáčivost mají největší vliv kyslíkové funkční skupiny (hydroxylové, karboxylové a etherové).³⁷ V případě adheze HeLa buněk na povrch s kyslíkovými funkčními skupinami se ideální smáčivost pohybuje kolem 50° pro vodu.³² Dalším důležitým parametrem při adhezi buněk na substrát je povrchová drsnost, která se dělí na makrodrsnost (100 μm a více), mikrodrsnost (100 nm – 100 μm) a nanodrsnost (méně jak 100 nm). Schématické znázornění vlivu smáčivosti a drsnosti substrátu na buněčnou adhezi je znázorněno na obr. 2.

3.2 Využití 2D uhlíkových nanomateriálů jako substrát pro adhezi buněk

2D uhlíkové nanomateriály jako je grafen a GO nacházejí stále větší uplatnění v neustále se rozvíjejících biomedicínských aplikacích, v oblastech jako cílená doprava léčiv,^{38–41} příprava biomateriálů pro umělé orgány,^{42,43} biosenzory,^{44–47} neurální inženýrství,⁴⁸ fototermální terapie a teranostika.^{68–70} Ve výše uvedených aplikacích nacházejí tyto materiály uplatnění především díky svým specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem jako je vynikající tepelná vodivost, velká specifická plocha povrchu, vynikající mechanická pevnost, specifické optické vlastnosti a vynikající biokompatibilita.^{52–54} Grafen svojí strukturou připomínající včelí plástev se skládá z uhlíků s sp^2 hybridizací, které tvoří dvojrozměrnou síť. Pokud se grafen oxiduje např. pomocí studené plazmy, vzniká derivát GO, který má na svých uhlících připojené kovalentně navázané

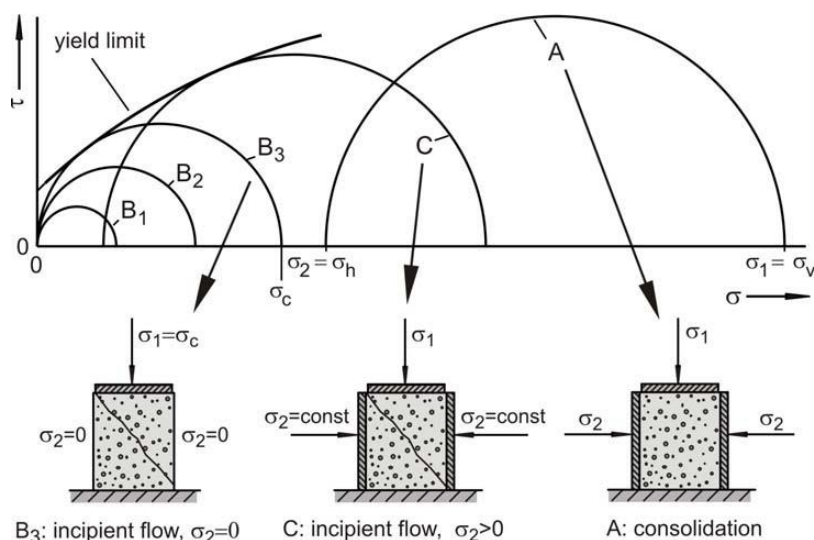
kyslíkové funkční skupiny. Nejčastěji lze na povrchu GO najít funkční skupiny hydroxylové (-OH), epoxidové (=O) a karboxylové (-COOH). Díky těmto funkčním skupinám je GO rozpustný ve vodě, má větší povrchovou energii, polárnější povrch a je tedy vhodnější substrát pro adhezi buněk. Tyto funkční skupiny pak interagují s adhezními proteiny pomocí kovalentních vazeb, elektrostatických interakcí, vodíkových můstků a π - π interakcí. Míra proliferace pak závisí na obsahu kyslíkových funkčních skupin na povrchu.⁵⁵

4 Základy reologie partikulárních látek

Práškové materiály patří mezi partikulární látky. Tyto látky se vyznačují tím, že jsou tvořeny pevnou fází, kterou obklopuje fáze tekutá (kapalina, plyn). Pro sypké práškové materiály je tekutá fáze plyn (nejčastěji vzduch). Kombinace těchto dvou složek pak udává celkové mechanické chování. Základním charakteristickým rysem práškových materiálů je schopnost přenášet smykové napětí v klidovém stavu, což se v praxi projevuje tak, že k toku materiálů nestačí pouze gravitační síla jako u kapalin. Je tedy nutné dodat sílu k překonání vnitřního tření. Manipulaci s těmito látkami často komplikuje existence tzv. kohezních sil, jejichž vliv roste úměrně s rostoucí kontaktní plochou velikostí částic práškového materiálu. Se zmenšováním částic pak většinou dochází ke zvětšování těchto kohezních sil.^{56,57} Tokové vlastnosti práškových materiálů jsou ovlivněny spoustou faktorů jako velikost, pórovitost, plocha povrchu, tvrdost, štěpnost částic apod. Měření tokových vlastností partikulárních látek je pak velice náchylné na vnější vlivy zejména na vlhkost a vibrace.⁵⁸⁻⁶² Mezi partikulárními látkami působí vazebné mechanismy, které jsou příčinou stavu napjatosti mezi částicemi. Mechanický styk způsobený přímým kontaktem částic se projevuje vznikem třecí vazby. Toto silové působení se označuje v praxi jako vnitřní tření. Pro partikulární látky je typická vlastnost schopnost přenášení vnitřního tření i za klidového stavu. V partikulárních látkách je ve styku velké množství částic s různým tvarem, orientací a s rozdílnou velikostí kontaktních ploch, proto je nutné sledovat vnitřní tření v objemu, který se pro praktické účely označuje jako smyková zóna.⁵⁶

4.1 Tokové vlastnosti práškových materiálů

Tokové vlastnosti práškových materiálů silně závisí na adhezních silách mezi částicemi. Tyto adhezní síly vznikají několika mechanismy. Pro jemně zrnité materiály s minimální vlhkostí je adheze mezi částicemi způsobena převážně Wan der Walsovými a elektrostatickými interakcemi. Wan der Walsovy interakce jsou způsobeny rozdílnými dipóly atomů a molekul, zatímco elektrostatické interakce jsou zapříčiněny rozdílným elektrickým potenciálem na povrchu částic. U práškových materiálů, které obsahují hodně vlhkosti, jsou adhezní síly způsobeny převážně kapalnými můstky. Tyto můstky se vytvářejí převážně prostřednictvím kapaliny s nízkou viskozitou. Intenzita těchto interakcí závisí převážně na velikosti a chemickému složení povrchu interagujících částic. Se snižující se velikostí interagujících částic dochází ke zvyšování adhezních sil, proto práškové materiály s velmi malou velikostí špatně tečou. Souhrnně se pak materiály se špatnými tokovými vlastnostmi označují jako kohezní.^{56,63} Při kompresi práškových materiálů externí silou dochází k plastickým deformacím na kontaktních plochách stýkajících se částic, což zapříčiní zvětšení ploch povrchu. Tento jev potom vede také ke zvýšení adhezních sil mezi částicemi a využívá se např. při výrobě tablet.⁶¹ Důležitou charakteristikou u práškových materiálů je mezní stav napjatosti. Tok u většiny práškových materiálů (netýká se volně tekoucích) nastane až po překročení mezního stavu napětí, kdy dojde k překonání mezičásticových interakcí. K určení mezního stavu napjatosti se používá jednoosá zkouška tlakem, která je založena na zatížení práškového materiálu ve válci. V první fázi se vzorek konsoliduje působením vertikálního napětí σ_v , které současně vyvolá horizontální napětí σ_h (podle poměru napětí K). Hodnota smykového napětí τ je 0. Tento stav při konsolidaci na grafu závislosti τ/σ (obr. 3) je znázorněn pomocí Mohrovy kružnice A.⁵⁶ Pokud $\tau = 0$, pak větší hlavní normálové napětí $\sigma_1 = \sigma_v$ a zároveň menší hlavní napětí $\sigma_2 = \sigma_h$. V druhé fázi se odstraní stěny válce při současném zachování tvaru konsolidovaného materiálu. Vzorek je potom zatěžován postupně zvětšujícím se vertikálním napětím. Tento děj je znázorněn na obr. 3 pomocí Mohrových kružnic B_1 , B_2 a B_3 . Protože po odstranění stěn válce nepůsobí na materiál žádné horizontální normálové napětí σ_H ($\sigma_2=0$), všechny Mohrovy kružnice začínají na ose σ v bodě 0. Při určitém napětí σ_1 , dojde k selhání vzorku a materiál začne téct (Mohrova kružnice B_3).



Obr. 3. Znázornění grafu závislosti smykového napětí na normálovém napětí s vyznačenou mezní křivkou (yield limit) určenou Mohrovými kružnicemi B_3 a C ; v dolní části je schematicky znázorněn počátek toku B_3 , C (incipient flow) a konsolidace práškového materiálu A (consolidation) odkazující na jednotlivé Mohrovy kružnice.⁵⁶ Copyright © Springer 2008.

Toto napětí se značí jako prostá mez skluzu σ_c . Při menším napětí nedojde u konsolidovaného vzorku k selhání a dochází pouze k elastickým deformacím, jak je patrné v případě Mohrových kružnic B_1 a B_2 , které se nachází pod mezní křivkou. Pokud aplikujeme na konsolidovaný vzorek kromě σ_v také konstantní σ_h , posune se nám Mohrova kružnice na ose σ doprava. Pokud aplikujeme dostatečně velké napětí a dosáhneme mezní křivky, dojde k toku materiálu (Mohrova kružnice C). Protože je průběh mezní křivky závislý na napětí při konsolidaci, má materiál pro každé konsolidační napětí charakteristickou mezní křivku. K charakterizaci práškových materiálů v praxi se používá toková funkce ff_c , která představuje závislost mezních stavů napjatosti na konsolidačním napětí. Podle této funkce lze rozdělit partikulární látky do několika kategorií, které jsou znázorněné v tabulce 1.^{56,57}

Tab. 1. Tabulka klasifikace tokových vlastností práškových materiálu v závislosti na velikosti indexu toku ff_c .⁵⁶

toková funkce	patrikulární látky
$ff_c < 1$	netekoucí
$1 < ff_c < 2$	velmi kohezní
$2 < ff_c < 4$	kohezní
$4 < ff_c < 10$	lehce tekoucí
$ff_c > 10$	volně tekoucí

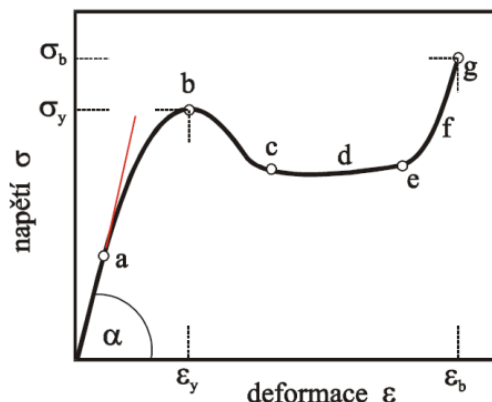
5 Polymerní kompozitní materiály

Pevnostní chování pevných látek souhrnně označuje odolnost materiálů proti porušení soudružnosti. Jeden z parametrů je pevnost v tahu, kterou se autor disertační práce zabývá dále v sekci řešené problému. Každý materiál má určité mezní vlastnosti, které při překročení vedou k lomu materiálů. Lom je charakterizován tvorbou nového povrchu vyvolanou vnějším mechanickým napětím. Mezi hlavní faktory ovlivňující pevnost materiálu patří struktura, chemické složení a vnější podmínky jako je tlak, teplota a čas. Některé mechanické charakteristiky materiálů jako např. moduly pružnosti jsou závislé na celém objemu materiálu. Mechanické vlastnosti materiálů jak např. pevnost jsou závislé převážně na strukturálních nepravidelnostech jako trhliny a pukliny.⁶⁴

5.1 Mechanické chování polymerních kompozitů v jednoosém tahu

Mezi často používané experimentální metody hodnotící mechanické chování polymerů patří jednoosá tahová zkouška. Z průběhu této zkoušky také vychází většina teorií popisující pevnostní chování materiálů zejména z důvodu strukturní srozumitelnosti a experimentální jednoduchosti. V závislosti na rozsahu deformací lze sledovat lineární a nelineární chování nebo lom testovaného materiálu. Pro tento typ měření se používají trhací stroje, které nejčastěji pracují v režimu konstantní rychlosti deformace. Vzorek se uchytí mezi dvě upínací čelisti, z nichž jedna se pohybuje konstantní rychlostí vůči druhé. Snímá se průběh síly v závislosti na deformaci. Typický průběh křivky závislosti napětí na deformaci je znázorněn na tzv. pracovním diagramu

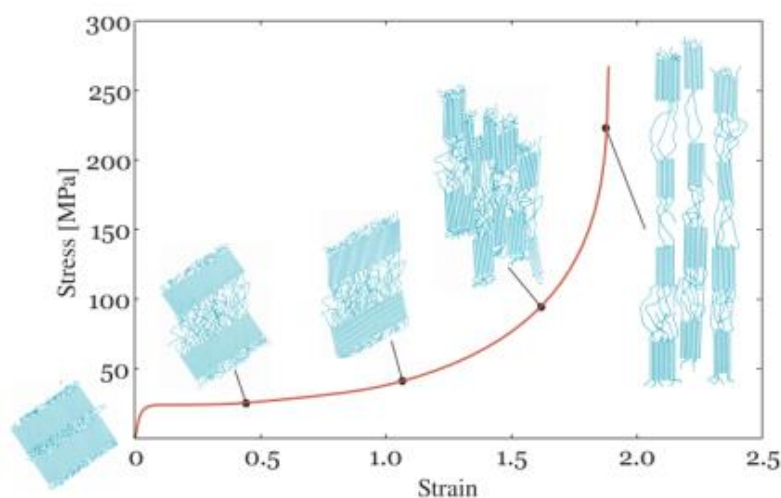
(obr. 4). Z tohoto diagramu lze vyčíst důležité materiálové charakteristiky. Samotný tvar křivky je specifický pro každý materiál a lze z něj vyčíst jak je materiál pevný, tvárný, křehký apod. Směrnice křivky v počátku ($E = \sigma/\varepsilon$) definuje Youngův modul pružnosti, který je charakteristický pro daný materiál. Mez kluzu (Yield point) značí bod, kdy se elastické deformace změní na deformace plastické a nevratné. Tento bod je určen hodnotami ε_y a σ_y a na křivce je zpravidla v prvním maximu nebo podle některých norem v místě, kde se křivka začíná zřetelně odchylovat od lineárního průběhu. Dále je v diagramu důležitý konečný bod křivky, který značí přetržení materiálu. Plocha pod křivkou odpovídá deformační práci a značí míru houževnatosti.^{64,65} Deformace PE v tahu vlivem vnějšího napětí je ovlivněno semikrystalickou povahou materiálu.⁶⁴



Obr. 4. Graf závislosti napětí σ na deformaci testovaného materiálu ε (pracovní diagram tahové zkoušky), kde bod (a) značí Youngův modul pružnosti, (b) horní mez kluzu, (d) přirozený dlužící poměr, (e) vyčerpání plasticity, (f) oblast zpevnění, (g) lom materiálu, ε_y a σ_y značí napětí a deformaci na mezi kluzu, σ_y je pevnost v tahu a ε_b značí tažnost materiálu.⁶⁴ Copyright © Univerzita Tomáše Bati 2004.

Na obr. 5 je znázorněn graf závislosti napětí v tahu na deformaci testovaného vzorku se znázorněnými změnami v mikro-struktuře polymeru během deformačních zkoušek. Na počátku nejsou pozorovány žádné deformace a zatížení je neseno převážně tuhými krystalickými lamelami. Po překročení meze kluzu jsou deformace způsobeny kombinací přesouvání amorfni fáze a klouzáním krystalických lamel. Struktura jednotlivých krystalických lamel není v této fázi zatížením ovlivněna. S rostoucím napětím a deformací (1-1,5) lze vidět zvýšení orientace krystalické a amorfni fáze polymeru ve směru vnějšího napětí. Při další deformaci po překročení

hodnoty 1,5 dochází ke zpevnění materiálu, což se projeví na křivce prudkým nárůstem napětí. V této fázi nazývané oblast zpevnění je amorfni fáze natažená na maximální hodnotu a dochází k rozvinutí a lámání krystalických lamel, tento jev je pak patrný na lomových plochách, které mají charakteristický hrubý a rozvlákněný povrch. Při dalším zvyšování napětí dojde k selhání materiálu, které se projeví přetržením. Změny v mikrostruktuře lamel a při deformaci včetně fáze zpevnění jsou zobrazeny na obr. 5.^{64,66}



Obr. 5. Graf závislosti napětí σ na deformaci testovaného PE materiálu s vyznačenými změnami v mikrostruktuře polymerní matrice.⁶⁶

6 Cíle disertační práce

Hlavním cílem předložené disertační práce bylo pochopení a popsání mezifázových procesů a jevů, které mají význam v biomedicínské a technické praxi. Jedná se zejména o pochopení vztahů mezi fyzikálně chemickými jevy ovlivňující adsorpční/desorpční proces vybraných polymerních částic a biologických entit jako např. buněk na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka pomocí hydrodynamických a smykových sil. K tomuto účelu bylo potřeba realizovat a konstrukčně upravit systém na bázi technologie impinging jet, kde je depozice řízená difuzí a uvolnění adherovaných částic/buněk z povrchu iniciován laminárním tokem v okolí stagnačního bodu.

Mezi další cíle patřilo studium a pochopení mezifázových jevů na rozhraní pevná látka/pevná látka se zaměřením na vliv kohezních a adhezních sil mezi plnivem a matricí na mechanické vlastnosti v kompozitních materiálech. K tomuto účelu byl zkoumán vliv intenzity a časového průběhu deformačního napětí ve formě jednoosého namáhání na deformaci kompozitů. Dalším cílem byla charakterizace kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u práškových materiálů pomocí mechanického smyku. Experimentální část je rozdělena do dvou logických částí. V první části řešené problémy se autor věnuje diskuzi výsledků z experimentů zaměřených na adsorpční/desorpční proces na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka pomocí techniky impinging jet. Druhá část je zaměřena na experimentálním studiu mezifázových jevů na rozhraní pevná látka/pevná látka a pevná látka/plyn pomocí deformačního a smykového mechanického napětí.

Přehled cílů v bodech

- 1-** Studium a pochopení interakcí na fázovém rozhraní pevná látka/kapalina.
- 2-** Konstrukce a realizace systému pro měření kinetiky depozice/ uvolňování částic na bázi technologie impinging jet.
- 3-** Charakterizace a pochopení vlivů topologie, smáčení, volné povrchové energie a chemického složení testovaných povrchů na proces adsorpce/desorpce na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka.
- 4-** Experimentální studium kinetiky uvolňování lidských nádorových buněk (HeLa) adherovaných na uhlíkové 2D-nanomateriály za přesně definovaných fyzikálních podmínek.
- 5-** Zaměření výzkumné činnosti na experimentální studium vlivu topografie povrchu na kinetiku depozice latexových polystyrenových částic za přesně definovaných fyzikálních podmínek na polymerní substrát (ZEONOR) upravený technikou nano-embosování.
- 6-** Experimentální studium vlivu adheze minerálních plniv do polymerní matrice na fázovém rozhraní pevná látka/pevná látka na výsledné mechanické vlastnosti kompozitu pomocí deformačního napětí.

7- Studium vlivu kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u partikulárních látek na tokové vlastnosti s využitím smykové cely.

7 Řešená problematika s využitím systému impinging jet

7.1 Studium depozice modelových částic (PS) na nanostrukturovaných polymerních površích

Tato studie byla zaměřena na výzkum vlivu topografie povrchu na depozici modelových polystyrenových latexových částic s velikostí 1,1 μm na modifikované polymerní substráty. Povrchová úprava polymeru na bázi cyklického olefinu (Zeonoru) byla prováděna metodou nano-embosování. Autor disertační práce se podílel na rešerši a sepisování publikace „impinging jet study of the deposition of colloidal particles on synthetic polymer (Zeonor)“ publikovaném v časopisu International journal of mass and heat transfer (2014). V rámci této řešené problematiky se autor disertační práce podílel provedením a vyhodnocením impinging jet experimentů, měření a vyhodnocením volných povrchových energií testovaných substrátů. Pro impinging jet experimenty bylo použito originální uspořádání depoziční cely navržené Dąbrošem, Van de Venem a Adamczykem. Toto uspořádání je často zmiňováno jako „radial impinging jet cell“ (RIJ).^{7,8,67} Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) a AFM měření byly provedeny kolegy z regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM). Embosovaný Zeonor byl připraven Mgr. Jiřím Čechem, Ph.D. z DTU Nanotech (Dánsko).

7.1.1 Charakterizace povrchu

Jako substrát pro depozici částic byl použit syntetický polymer Zeonor (Zeon chemicals, Japonsko) ve formě fólií s různou tloušťkou (50 μm a 100 μm). Povrch Zeonoru byl modifikován embosováním dvěma odlišnými vzory (pyramidovým a vlnitým). Označení, popis a geometrické parametry jednotlivých vzorů jsou shrnuty v tab. 2.

Tab. 2: Popis a označení jednotlivých vzorků.

vzorek	x (nm)	y (nm)	z (nm)	Popis vzorku
1_Z50_V	-	-	-	nemodifikovaný Zeonor, tloušťka 50 μm
2_Z50_E1	375	375	170	embosovaný Zeonor: tloušťka 50 μm , vzor E1
3_Z100_V	-	-	-	nemodifikovaný Zeonor, tloušťka 100 μm
4_Z100_E2	440	50	170	embosovaný Zeonor vzor: tloušťka 100 μm , E2

Velikost kontaktních úhlů smáčení a s tím spojená velikost volné povrchové energie substrátu silně ovlivňuje depozice částic. Úhly smáčení pro jednotlivé kapaliny nemodifikovaných a embosovaných povrchů jsou shrnuty v tab. 3. Naměřené kontaktní úhly smáčení pro vodu u povrchově nemodifikovaných vzorků Zeonoru, které byly v rozsahu od 96,8 ° pro vzorek 3_Z100_V do 99 ° pro vzorek 1_Z50_V, odráží jejich hydrofobní charakter. Po povrchové modifikaci embosováním vzory E1 a E2 došlo k zesílení hydrofobního charakteru, což se projevilo zvýšením kontaktních úhlů smáčení na 105 ° a 102,4 °.

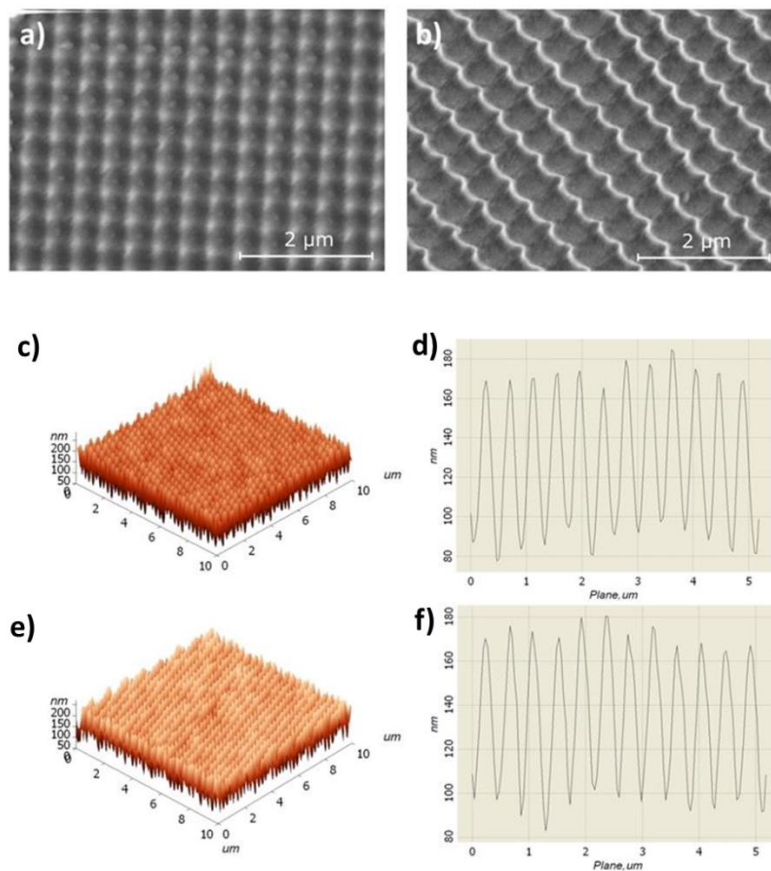
Tab. 3: hodnoty statických kontaktních úhlů smáčení měřených metodou sedící kapky pro jednotlivé substráty.

vzorek	kontaktní úhly smáčení θ (°)			
	voda	glycerol	ethylenglykol	DMSO
1_Z50_V	99.06 \pm 2.29	81.17 \pm 2.97	70.05 \pm 0.56	64.99 \pm 1.25
2_Z50_E1	104.99 \pm 0.98	89.82 \pm 2.41	67.85 \pm 1.63	56.03 \pm 1.97
3_Z100_V	96.79 \pm 1.87	92.55 \pm 0.54	67.64 \pm 0.49	60.27 \pm 0.89
4_Z100_E2	102.43 \pm 1.53	82.44 \pm 2.07	68.00 \pm 2.28	60.61 \pm 0.32

Pro výpočet volných povrchových energií byly změřeny kontaktní úhly smáčení pro glycerol, etylenglykol a DMSO. Souhrn spočítaných volných povrchových energií včetně polární a disperzní složky pro všechny vzorky je uveden v tab 4.

Tab. 4: Souhrn spočítaných volných povrchových energií a jejich polárních a disperzních složek podle modelu Owens - Wendt - Rabel - Kaelble.

vzorek	volná povrchová energie (mJ/m ²)		
	celková	disperzní	polární
1_Z50_V	24.63 ± 3.77	21.49 ± 6.68	3.15 ± 4.05
2_Z50_E1	37.17 ± 8.83	36.52 ± 8.23	0.65 ± 0.88
3_Z100_V	30.00 ± 11.51	27.03 ± 12.66	2.97 ± 2.19
4_Z100_E2	31.92 ± 6.74	30.43 ± 8.50	1.49 ± 2.10



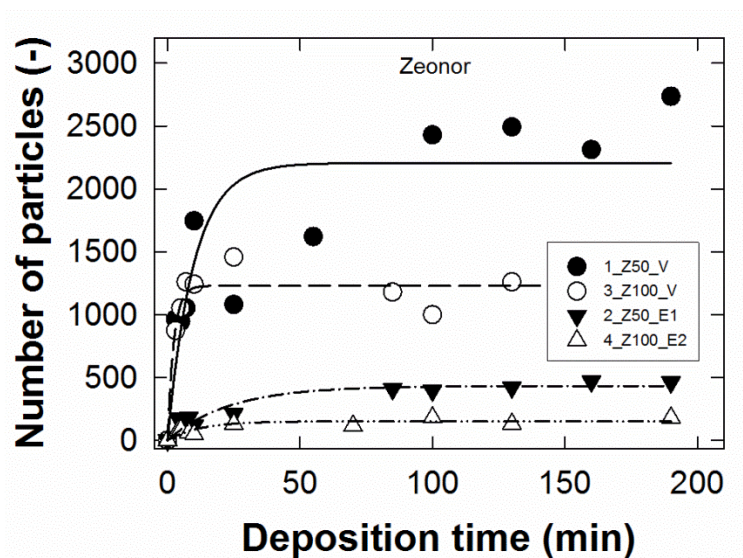
Obr.6. SEM snímky povrchu Zeonoru po embosování pyramidovým vzorem E1 (a) a vlnitým vzorem E2 (b); AFM snímky s profilovými řezy povrchu Zeonoru po embosování s pyramidovým vzorem E1 (c)(d) a vlnitým vzorem E2 (e)(f).¹¹ Copyright © Elsevier 2014.

U všech sledovaných vzorků dominuje disperzní složka volné povrchové energie, polární složku lze považovat za minoritní. Nejnižší volná povrchová energie byla naměřena u nemodifikovaného substrátu 1_Z50_V (24,6 mJ/m²). Z výsledků je zřejmé, že embosování oběma vzory vede ke zvýšení volné povrchové energie. Nejvíce je tento jev patrný u pyramidového vzoru E1 kde došlo ke zvýšení o 50 % z původní hodnoty 24,6 mJ/m² na 37,2 mJ/m². Charakterizace povrchu byla provedena pomocí metod SEM a AFM (viz obr. 6). Ze snímků je patrné, že embosovaný povrch je vysoce homogenní u obou studovaných povrchů s embosovanými vzory E1 a E2. Snímky topografie povrchu ze SEM velice dobře korespondují s výsledky mapování povrchu pomocí AFM.

7.1.2 Depozice polystyrenových latexových částic pomocí techniky impinging jet

Polystyrenové latexové kulovité mikročástice byly vybrány jako dostupný a běžně používaný testovací disperzní systém s širokým rozsahem velikostí částic a různým stupněm polydisperzity.⁶⁸ Pro impinging jet experimenty byly použity polystyrenové latexové částice s velikostí 1,1 μm, zeta-potenciálem -20 mV a koncentrací 5×10⁶ částic/cm². Pro eliminaci elektrostatických interakcí během depozice byla disperze připravena ve vodném roztoku 1×10⁻³ M KCl s výsledným pH 7. Vypočítaná hodnota κ_a při našich experimentálních podmínkách byla 59. Naměřené kinetiky depozice záporně nabitých latexových částic o rozměru 1,1 μm na embosované a nemodifikované testované substráty pomocí techniky impinging jet jsou shrnuty na obr. 7. Byl pozorován exponenciální nárůst počtu deponovaných částic během depozice pro všechny testované substráty. Z experimentů je patrné, že i přes zvýšení volné povrchové energie v důsledku úpravy povrchu nano-embosováním (viz tab. 4) bylo pozorováno snížení celkového počtu deponovaných polystyrenových latexových částic na povrch takto upravených substrátů ve srovnání s nemodifikovaným povrchem Zeonoru s nižší volnou povrchovou energií. Domníváme se, že toto snížení celkového počtu deponovaných částic je zapříčiněno lokalizovaným mikro vířením v kapalně vrstvě, která se nachází v těsné blízkosti nad strukturovaným povrchem. Tohoto jevu lze všeobecně využívat při depozici s hydrodynamickou fokusací. Je zřejmé, že povrchový design ovlivňuje celkovou aktivitu povrchu. Povrch Zeonoru s pyramidálním vzorem E1 je třikrát více aktivní ve srovnání s povrchem Zeonoru s vlnitým vzorem E2. Tento rozdíl je

pravděpodobně zapříčiněn již zmíněnou hydrodynamickou fokusací, která je více patrná u povrchu s pyramidovým vzorem.



Obr.7. Kinetiky depozice polystyrenových latexových částic získané technikou impinging jet pro jednotlivé substráty.¹¹ Copyright © Elsevier 2014.

Tab. 5: Spočítané parametry depozice polystyrenových částic na testované substráty: τ_{bloc} – čas potřebný k ustálení počtu deponovaných částic (blokovací čas) (s), n – celkový počet deponovaných částic v ustáleném stavu (-), j_c – rychlost depozice v okolí stagnačního bodu.

vzorek	τ_{bloc} (min)	n_{∞} (-)	j_c (1/min)
1_Z50_V	9.82 ± 3.53	2206 ± 206	196.20
2_Z50_E1	23.1 ± 5.7	431.4 ± 2.7	18.72
3_Z100_V	2.32 ± 0.54	1230 ± 44	533.11
4_Z100_E2	12.2 ± 4.1	150.5 ± 1.7	12.83

Tento předpoklad je podpořen rozsahem blokovacích časů pro jednotlivé vzorky, kde u povrchu s pyramidovým vzorem E1 se čas potřebný k ustálení počtu deponovaných částic (blokovací čas) zvýšil dvakrát v porovnání s nemodifikovaným Zeonorem. (tab. 5 pro 1_Z150_V a 2_Z50_E1). U vzorku s vlnitým vzorem 3_Z100_E2 bylo pozorováno zvýšení blokovacího času šestkrát ve srovnání s nemodifikovaným Zeonorem 3_Z100_V. Tyto závěry velice dobře korespondují s pozorováním rychlosti depozice v blízkosti stagnačního bodu j_c , kde je patrné razantní snížení u embosovaných vzorků.

7.1.3 Shrnutí

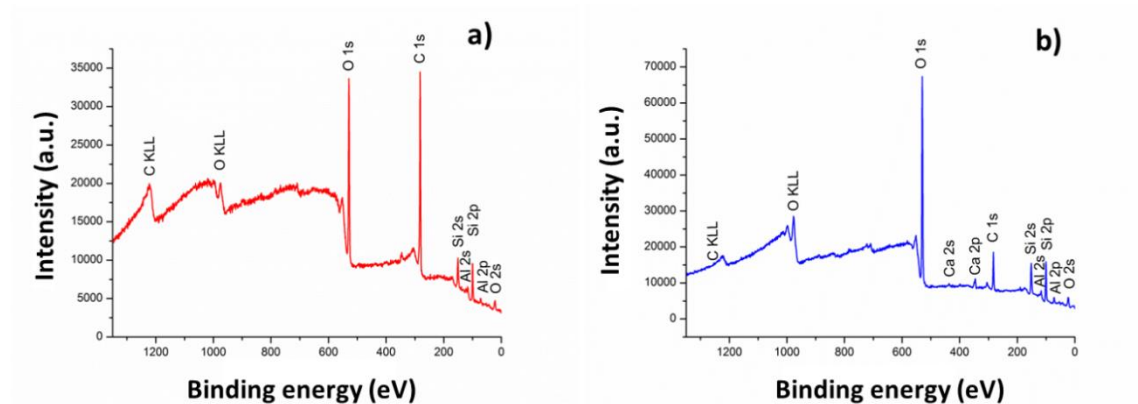
Tato studie byla zaměřena na depozici latexových částic na povrch syntetického polymeru Zeonoru pomocí techniky impinging jet. Topografie povrchu Zeonoru byla upravena pomocí nano-embosováním dvěma odlišnými vzory, tyto úpravy byly charakterizovány pomocí AFM a SEM. Depozice záporně nabitých (-20 mV) latexových částic o velikosti 1,1 μm probíhala při laboratorní teplotě (25 °C) a průtoku 2,3 g/min ($Re = 10$). Z grafu závislosti počtu deponovaných částic na čase je patrný exponenciální průběh až do ustálení rovnovážného stavu. Získané kinetiky depozice byly fitovány pomocí teoretického blokovacího modelu, díky kterému lze vypočítat čas potřebný k ustálení počtu deponovaných částic (blokovací čas) a rychlost depozice. I přes zvýšení volné povrchové energie v důsledku úpravy povrchu nano-embosováním bylo pozorováno snížení celkového počtu deponovaných polystyrenových latexových částic na povrch takto upravených substrátů ve srovnání s nemodifikovaným povrchem Zeonoru s nižší volnou povrchovou energií. Tento jev pravděpodobně způsobený hydrodynamickou fokusací v kapalně vrstvě v těsné blízkosti nad embosovaným povrchem. Toto tvrzení je podporováno vypočítanými depozičními parametry, kde u pyramidálního vzoru došlo k zdvojnásobení blokovacího času ve srovnání s čistým nemodifikovaným Zeonorem. V případě vlnitého vzoru došlo k šestnásobnému navýšení hodnoty blokovacího času. V obou případech došlo také k snížení počáteční rychlosti depozice částic.

7.2 Studium adheze buněk (HeLa) na planárních površích (G, GO, sklo)

Tato studie je zaměřena na využití techniky impinging jet při zkoumání a kvantifikaci adheze HeLa buněk na povrch grafenu (G) a GO. Naměřené kinetiky uvolňování adherovaných buněk, který byl aktivovaný laminárním prouděním o síle 9,4 nN, přispěly k hlubšímu pochopení interakce nádorových buněk a 2D-uhlíkových nanomateriálů. Chemické složení, topografie povrchu, volná povrchová energie testovaných substrátů byly charakterizovány pomocí rentgenové fotoelektronové mikroskopie (XPS), AFM, SEM a měření kontaktních úhlů smáčení. V rámci této řešené problematiky se autor disertační práce podílel na provedení a vyhodnocení impinging jet experimentů, přípravě GO oxidací grafenu pomocí studené plazmy, měření a vyhodnocení volných povrchových energií, vyhodnocení výsledků z metod: XPS, AFM a Ramanovy spektroskopie. Dále se podílel na rešerši a sepisování publikace „Flow induced HeLa cell detachment kinetics show that oxygen-containing functional groups in graphene oxide are potent cell adhesion enhancers“ publikovaném v odborném časopisu *Nanoscale* (2019). XPS, SEM, AFM měření a kultivace HeLa buněk byly provedeny kolegy z regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM). K testování velikosti adheze buněk adherovaných na testované substráty byla použita technika impinging jet. V této studii byla použita stejná depoziční cela jako při experimentech s modifikovaným Zeonorem. Průtok byl nastaven na $Re \approx 40,5$ během všech experimentů.

7.2.1 Charakterizace povrchu

Pro impinging jet experimenty byly použity následující substráty: transparentní jednovrstvý grafen na skleněném substrátu (25x25) mm (Graphene Supermarket, USA); GO získaný modifikací z grafenu pomocí studené plazmy; skleněné krycí sklo (18x18x01) mm (Menzel – Gläser, Německo). Chemické složení, smáčivost, topografie a volná povrchová energie povrchu hrají při adhezi buněk na povrch materiálu důležitou roli, proto bylo nutné podrobně charakterizovat testované substráty.⁶⁹ Na XPS přehledových spektrech lze vidět, že grafen se skládá převážně z atomů uhlíku a obsahuje pouze malé množství kyslíku (obr. 8). Po úpravě povrchu grafenu pomocí studené plazmy se množství kyslíku razantně zvýšilo, což je zapříčiněno navázáním kyslíkových funkčních skupin na povrch grafenu.



Obr.8.

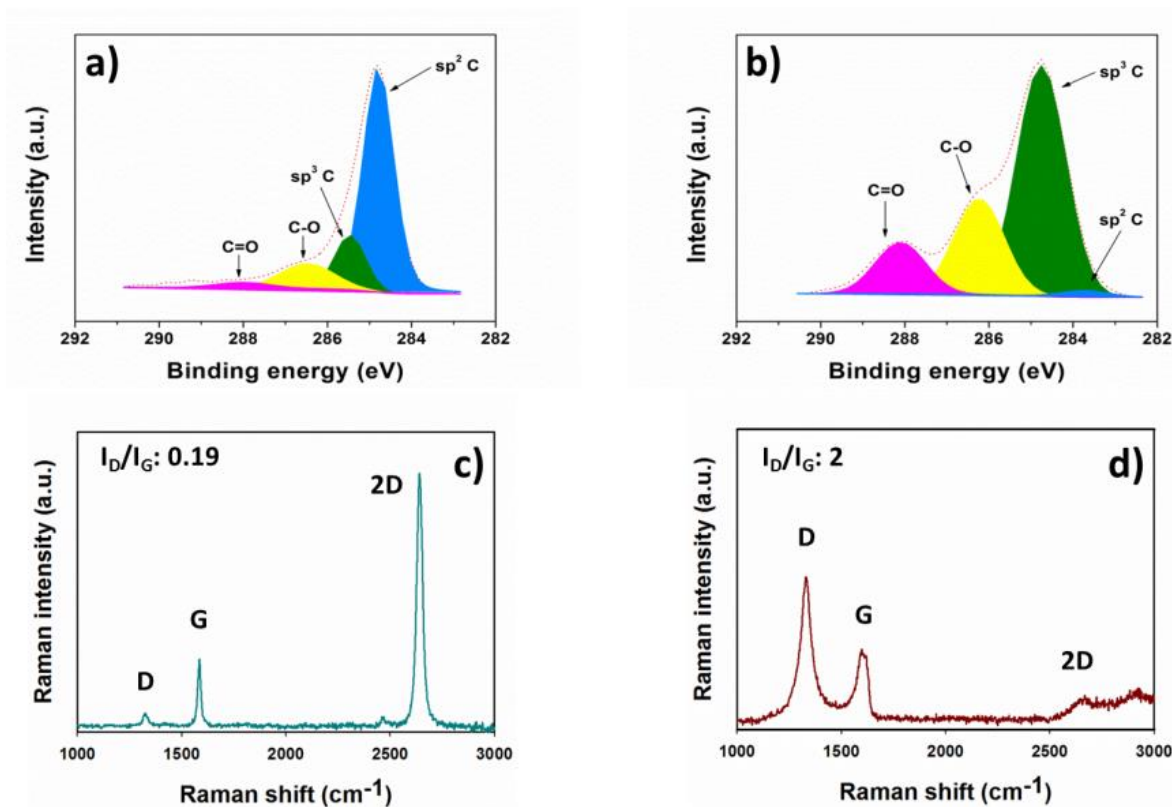
Obr.8. Naměřené XPS přehledové spektra grafenu (a) a GO (b) připraveného pomocí studené plazmy.⁷⁰ Copyright © RSC 2019.

Tab. 6: Chemické složení povrchu (vyjádřené v procentech) a pozorované poměry sp^2/sp^3 uhlíku pro grafen a GO.

vzorek	chemické složení povrchu (%) a poměry sp^2/sp^3 uhlíku				
	sp^2 C	sp^3 C	C-O	C=O	sp^2/sp^3
grafen	66.7	15.6	12.3	2.7	4.3
GO	3.0	53.4	29.1	12.4	0.06

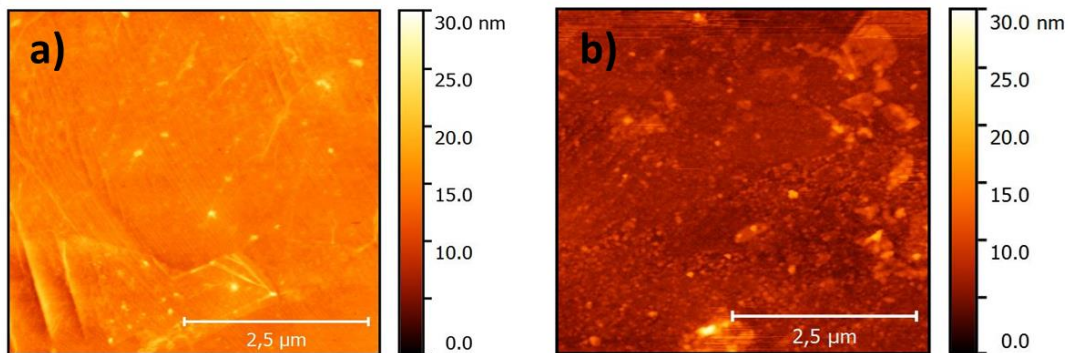
Píky pozorované při vazebných energiích 286,2 a 288,1 eV u C 1s XPS spekter s vysokým rozlišením (obr. 9a,b) odpovídají kyslíkovým funkčním skupinám C-O a C=O, které byly detekovány na povrchu grafenu a GO. Vystavení povrchu grafenu působení studené plazmy má také za následek snížení intenzity píku sp^2 C a jeho červený posun z 284,8 eV na 283,7 eV. Relativní zastoupení kyslíkových funkčních skupin se zvýšilo z původních 15 % na 41,5 % (viz tab. 6). Rozdílné chemické složení substrátů bylo také charakterizováno pomocí Ramanovy spektroskopie. Ve spektrech grafenu i GO lze vidět typické G, D a 2D pásy (obr. 9c,d). Ostrý a symetrický 2D pás s I_{2D}/I_G poměrem 3,7 vypovídá, že se grafen nachází v jedné vrstvě.^{71,72} Nicméně přítomnost D pásu a I_D/I_G poměru 0,19 značí přítomnost strukturálních defektů, které mohou být zapříčiněny částečnou oxidací grafenu (obr. 9a). Naměřené spektrum pro GO odráží jeho strukturu, která je bohatá na sp^3 defekty. Tyto defekty jsou zodpovědné za vysokou hodnotu

I_D/I_G (2) a červený posun G pásu o 21 cm^{-1} ve srovnání s grafenem.^{73,74} Tyto data se shodují s výsledky XPS analýzy.



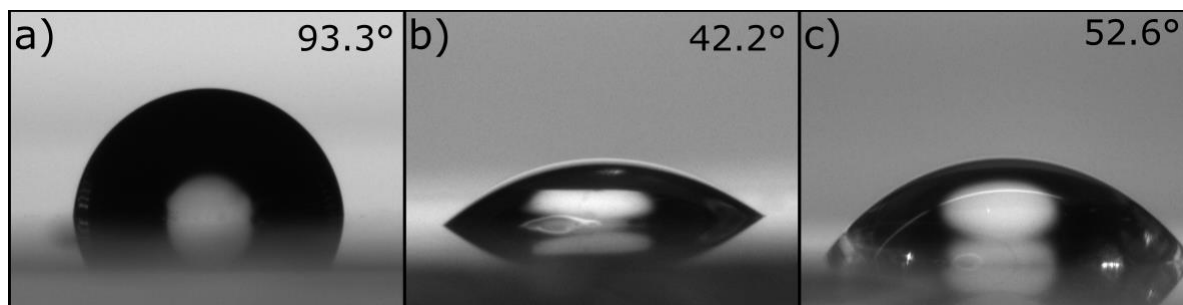
Obr. 9. Naměřené a fitované C 1s XPS spektra s vysokým rozlišením povrchu grafenu (a) a GO připraveným pomocí studené plazmy (b); Ramanova spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 632.8\text{ nm}$) povrchu grafenu (c) a GO (d) připraveným pomocí studené plazmy.⁷⁰ Copyright © RSC 2019.

Topografie a drsnost povrchu testovaných materiálů byla analyzována metodou AFM (obr. 10). Drsnost povrchu grafenu byla $1,28\text{ nm}$, drsnost povrchu GO pak $1,25\text{ nm}$. Tyto naměřené hodnoty poukazují na to, že úprava pomocí studené plazmy neovlivnila morfologii povrchu. Impinging jet experimenty tedy byly prováděny na površích se stejnou morfologií ale s odlišným chemickým složením.



Obr 10. Snímky z mapování povrchové topografie grafenu (a) a GO (b) získané pomocí metody AFM⁷⁰. Copyright © RSC 2019.

Adheze buněk na substrát silně závisí na polaritě, volné povrchové energii, smáčivosti povrchu a schopnosti adsorbovat ECM proteiny jako je kolagen, vitronektin, fibronectin a laminin.⁷⁵ Tyto proteiny se vážou relativně ve velkých koncentracích na hydrofobní povrchy, nicméně v rigidní a denaturované formě díky intramolekulárním protein–protein interakcím a intermolekulárním interakcím protein–substrát. Toto chování negativně ovlivňuje adhezi a růst buněk. Naopak na hydrofilní povrch se proteiny z ECM mají tendenci vázat v jejich přirozené formě, což podporuje adhezi buněk. Naměřený kontaktní úhel smáčení vody na povrchu grafenu $93,3^\circ \pm 1,1^\circ$ odráží jeho hydrofobní charakter (tab. 7 a obr. 11a). Kontaktní úhel smáčení vody na povrchu GO připraveným pomocí studené plazmy byl razantně nižší ($42,9 \pm 5,9^\circ$). Toto snížení je způsobeno povrchovou oxidací, díky které je povrch více hydrofilním (tab. 7 a obr. 11b).



Obr. 11. Snímky použité k určení rovnovážných kontaktních úhlů smáčení sedící kapky vody na povrchu grafenu (a), GO (b) a skla (c).⁷⁰ Copyright © RSC 2019.

Rozsah této změny lze určit určen pomocí spočítané volné povrchové energie zahrnující polární a disperzní části (viz tab. 8). Volná povrchová energie pro grafen byla $36,3 \pm 1,5 \text{ mJ/m}^2$, zatímco pro GO $46,9 \pm 9,4 \text{ mJ/m}^2$. Během oxidace dochází na povrchu k vytvoření kyslíkových funkčních skupin, které mají za následek zvýšení polární složky volné povrchové energie z $0,72 \pm 0,27 \text{ mJ/m}^2$ pro grafen na $8,3 \pm 3,2 \text{ mJ/m}^2$ pro GO. Díky úpravě pomocí studené plazmy se povrch grafenu stává hydrofilním a tudíž podporuje adhezi a růst buněk.⁶⁹

Tab. 7: Kontaktní úhly smáčení jednotlivých kapalin pro grafen, GO a sklo měřeny metodou sedící kapky při 24°C.

vzorek	kontaktní úhly smáčení θ (°)		
	voda	diodometan	ethylenglykol
grafen	93.3 ± 1.1	47.3 ± 1.5	68.0 ± 3.3
GO	42.9 ± 5.9	40.6 ± 2.2	27.6 ± 1.4
sklo	52.6 ± 4.2	56.6 ± 1.8	44.4 ± 4.5

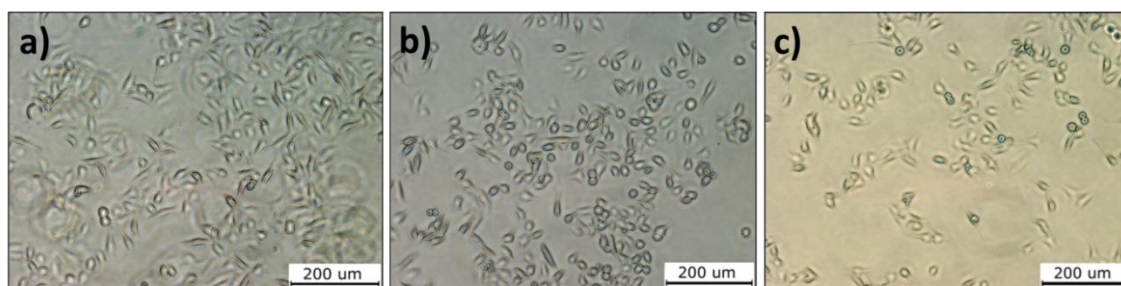
Funkční skupiny na povrchu GO umožňují vytvoření slabých vazebných interakcí (elektrostatické interakce, vodíkové můstky) s proteiny, které se nachází v ECM. Z tab. 8 je patrné, že povrch grafenu je více hydrofobní než povrch skla, nicméně grafen je lepší substrát pro adhezi buněk díky interakcím π -elektronového oblaku s hydrofobními jádry proteiny z ECM. To se projeví např. větší konfluenci po 2 denní inkubaci v porovnání se skleněným substrátem (viz. obr. 12).

Tab. 8: Celková volná povrchová energie substrátů s polárním a disperzním příspěvkem vypočítaná pomocí aproximace podle OWRK.

vzorek	volná povrchová energie (mJ/m^2)		
	celková	polární	disperzní
grafen	36.3 ± 1.5	0.7 ± 0.3	35.6 ± 1.2
GO	46.9 ± 9.4	8.3 ± 3.2	38.7 ± 5.9
sklo	43.2 ± 11.7	30.1 ± 4.5	13.2 ± 7.2

7.2.2 Impinging jet experiments

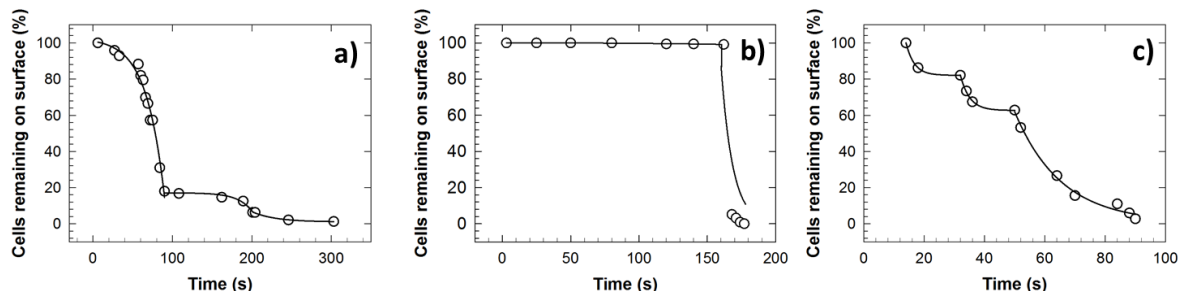
Ke zkoumání buněčné adheze na povrchu grafenu, GO a skla pomocí techniky impinging jet byla použita lidská buněčná nádorová linie cervix adenocarcinoma HeLa. Ze snímků z optického mikroskopu zachycující růst buněk na testovaných substrátech po 48 hodinové kultivaci jsou patrné rozdíly v dosažené konfluenci pro jednotlivé substráty. Buňky dosáhly 80 % konfluence na povrchu GO, 60 % na povrchu grafenu a 40 % na povrchu skla (obr. 12). U všech sledovaných buněk lze vidět proces mitózy, který značí normální chování buněk během kultivace.



Obr. 12. HeLa buňky po 48 hodinové kultivaci na povrchu GO (a) grafenu (b) a skla (c); snímky byly pořízeny na inverzním mikroskopu Olympus IX 70 se světlením 10 x, vloženo měřítko: 200 μm .⁷⁰ Copyright © RSC 2019.

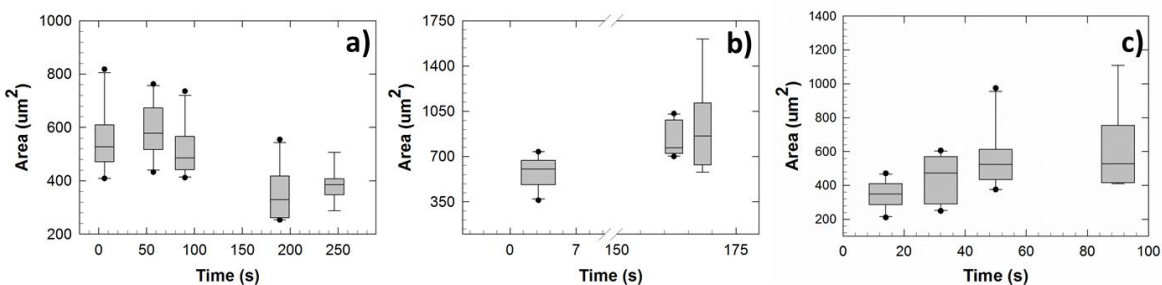
Charakterizace kinetik odtrhu adherovaných buněk na jednotlivých substrátech byla provedena pomocí techniky impinging jet. Uvolňování buněk ze substrátu bylo iniciováno laminárním prouděním o $Re \approx 40.5$ odpovídajícím tangenciální síle 9,5 nN. Čas potřebný k odtržení 80 % buněk adherovaných na povrch grafenu byl $90 \pm 8,7$ s, zatímco pro buňky adherované na skleněný substrát $68,6 \pm 6,6$ s. V případě substrátu GO byl pozorován téměř dvojnásobný čas potřebný k uvolnění 80 % adherovaných buněk ($168 \pm 16,3$) ve srovnání s povrchem grafenu. Tyto výsledky se shodují se závěry dřívější studie, která se zabývala efektivitou GO jako substrátu pro adhezi savčích buněk.⁷⁶ Pozorované kinetiky uvolňování buněk z povrchu grafenu a skla se skládají se ze dvou kroků (obr. 13). V případě grafenu je patrný prudký pokles počtu adherovaných buněk v prvním kroku s následným poklesem rychlosti odtrhu v druhém kroku. V případě povrchu skla se rychlost uvolňování razantně nemění. Naopak kinetika uvolňování

buněk adherovaných na povrch GO probíhá v jednom prudkém kroku s výraznou periodou, kde odtrh buněk nebyl pozorován.



Obr. 13. Kinetiky uvolňování HeLa buněk z povrchu grafenu (a) GO (b) a skla (c). Experimenty byly prováděny s populací čítající stovky buněk⁷⁰. Copyright © RSC 2019.

Také bylo zjištěno, že na povrchu GO a skla se buňky s menší adhezí plochou uvolňují přednostně oproti buňkám s větší adhezí plochou (viz obr. 14). Lze předpokládat, že u buněk s menší adhezí plochou vzniká méně vazeb mezi buněčnými receptory a proteiny z ECM. Síla adheze tedy úměrně klesá se zmenšující se adhezí plochou buňky.⁷⁷ Odlišné chování bylo pozorováno v případě povrchu grafenu, kde se přednostně uvolňovaly buňky s větší adhezí plochou oproti buňkám s menší adhezí plochou, u kterých docházelo k uvolnění v pozdější fázi.



Obr. 14. Vztah mezi velikostí adhezí plochy buněk a jejich časem uvolnění z povrchu grafenu (a), GO (b) a skla (c).⁷⁰ Copyright © RSC 2019.

7.2.3 shrnutí

Tato studie se zabývala adhezí HeLa buněk na povrch grafenu a GO. Pro srovnání byl jako referentní materiál použit skleněný substrát. Chemické složení, morfologie a volná energie testovaných povrchů byly charakterizovány pomocí metod XPS, AFM, Ramanovy spektroskopie a měření kontaktních úhlů smáčení. Ke stanovení kinetik uvolňování HeLa buněk adherovaných na studovaných substrátech byla použita technika impinging jet. Z výsledků experimentů je patrné, že smáčivost povrchu je jeden z klíčových faktorů určující velikost adheze. Čas potřebný pro uvolnění 80 % adherovaných buněk na povrch GO naznačuje, že je možné tento materiál použít jako substrát zesilující adhezi buněk a mohl by být potenciálně použit při konstrukci biosenzorů. Uvolnění buněk z povrchu bylo u všech testovaných substrátů iniciováno silou 9,4 nN a probíhalo ve dvou krocích v případě povrchu grafenu a skla. Jednokroková kinetika u GO s dlouhou periodou, kde nebyl odtrh buněk pozorován vůbec, pravděpodobně souvisí se silnější adhezí buněk způsobenou přítomností kyslíkových funkčních skupin na povrchu GO. Tento fenomén je patrný i u druhého kroku kinetiky uvolňování z povrchu grafenu, kde je patrné razantní snížení rychlosti uvolňování buněk, které je pravděpodobně zapříčiněno právě kyslíkovými nečistotami na povrchu grafenu. Dále bylo zjištěno, že se buňky s větší adhezí plochou na povrchu grafenu uvolňují přednostně oproti buňkám s menší adhezí plochou. Opačný trend byl pozorován v případě skla a GO.

8 Další řešená problematika

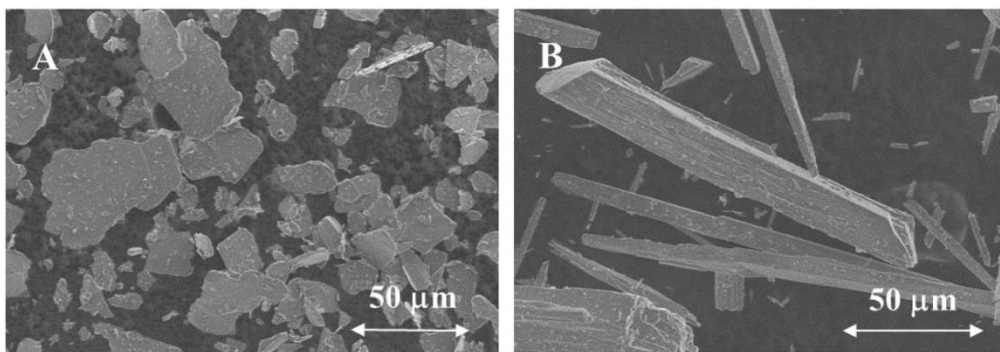
V této sekci se autor disertační práce věnuje řešeným problémům založených na pochopení mezifázových jevů na rozhraní pevná látka/pevná látka se zaměřením na vliv kohezních a adhezních sil mezi částicovým plnivem a polymerní maticí na výsledné mechanické vlastnosti polymerních kompozitů. Pro studium mezifázových jevů bylo použito mechanické deformační napětí. Experimenty byly zaměřeny na studium vlivu tvaru minerálních částicových plniv a jejich adhezi do polymerní matrice na elasticko-plastické chování kompozitních polymerů. Další část obsahuje výsledky z charakterizace kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u partikulárních látek s využitím smykové cely. Experimenty v této části byly zaměřeny na studiu

tokových vlastností minerálních částicových plniv pro polymerní kompozity a mléčných produktů.

8.1 Vliv tvaru minerálních plniv na mechanické chování kompozitů polyetylen/slída a polyetylen/wollastonit.

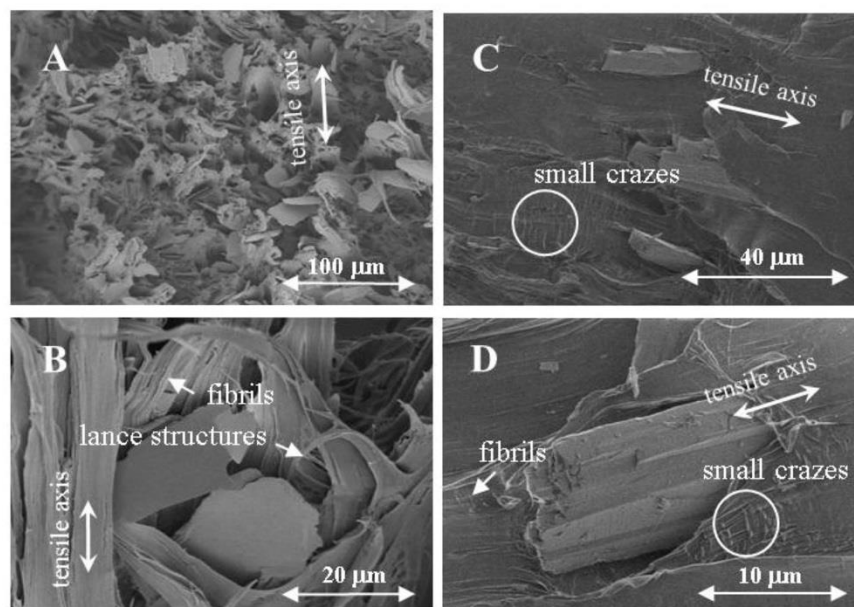
Tato studie se zabývala vlivem tvaru částic minerálních plniv na mechanické vlastnosti kompozitu připravených ze slídy a wollastonitu v matici vysokohustotního polyetylen (HDPE). Autor této disertační práce se podílel na tomto výzkumu testováním mechanických vlastností polymerních kompozitů včetně vyhodnocení výsledků. Kompozitní polymery byly připraveny kolegy z technologické fakulty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Výsledky z níže uvedených experimentů byly použity v publikaci „Effect of filler particle shape on plastic-elastic mechanical behavior of high density poly(ethylene)/mica and poly(ethylene)/wollastonite composites“ publikované v odborném impaktovaném časopise Composites part B (2018).

Slída se používá jako plnivo v polovodičích, izolátorech, plastech a nátěrových hmotách a patří mezi hlinitokřemičitany se složitější strukturou, která se označuje T-O-T (tetraedr-oktaedr-tetraedr). Základem planárního uspořádání jsou dvě tetraedrické sítě ve vzájemné hexagonální symetrii, mezi kterými je oktaedrická síť. Díky tomuto uspořádání vykazuje slída dokonalou štěpnost v bazální rovině. Na SEM snímku (obr. 15a) lze vidět planární nepravidelné uspořádání částic s průměrnou velikostí 30 μm a tloušťkou 1,7 μm . Wollastonit je chemickým složením křemičitan vápenatý, který se nejčastěji vyskytuje v trojklonné krystalové soustavě, má jehlicovitý tvar s průměrnou velikostí částic (150 \times 20 \times 10) μm (obr. 15b).^{78,79} V průmyslu se často používá jako pigment v nátěrových hmotách. Ve stavebním průmyslu jako náhražka azbestů nebo v metalurgickém průmyslu je přidáván do směsí ke svařování oceli. Hlavním cílem této studie bylo zjistit vliv tvaru částic wollastonitu a slídy na výsledné mechanické vlastnosti HDPE polymerního kompozitu.



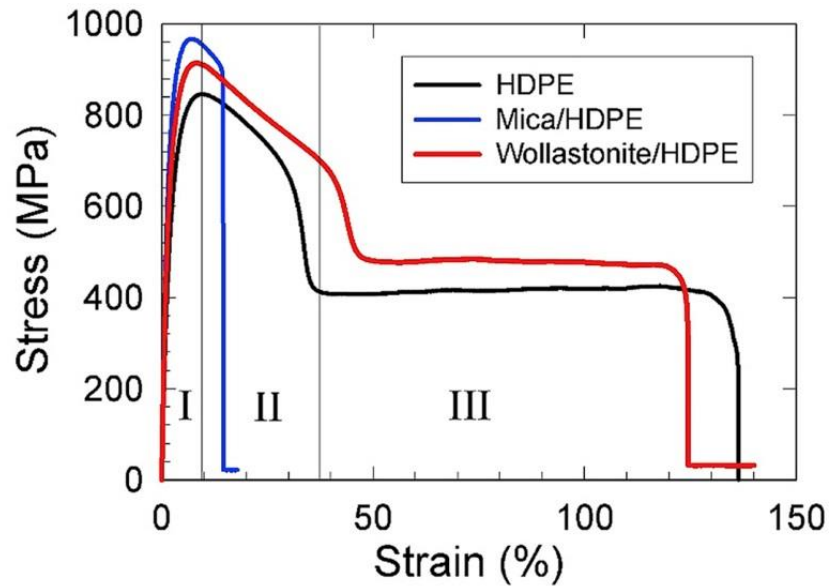
Obr. 15. SEM snímky studovaných minerálních plniv: slída (A) a wollastonit (B).⁸⁰ Copyright© Elsevier 2018.

Na SEM snímcích z analýzy lomových ploch testovaných kompozitů se slídou i wollastonitem, které vznikly během pevnostních zkoušek v jednoosém tahu, lze vidět plastické deformace HDPE vláken, které jsou pro tento polymer typické a projevují se vznikem ostruh.⁸¹ Výskyt malých dutinek kolem částic minerálních plniv během tahových zkoušek značí relativně slabou adhezi mezi částicemi a HDPE matricí při zatížení (platí pro slídu i wollastonit), (obr. 16b,d). Nicméně přítomnost puklin v okolí jednotlivých částic wollastonitu v kolmém směru vůči mechanické deformaci (vyznačeny kroužkem na obr. 16c,d) poukazuje na silnější adhezi částic na matrici v případě kompozitu wollastonit/HDPE ve srovnání s kompozitem slída/HDPE, u kterého tyto pukliny nebyly pozorovány. Orientace šíření trhlin je nejlépe viditelná při tahových zkouškách na zkušebních tělesech typu „dog bone“ připravených technologií vstřikování plastů, u kterých trhliny vznikají ve vnitřních částech vzorku, kde jsou makromolekuly polymeru málo orientované. Tyto trhliny se pak šíří směrem ven k povrchu kompozitu, kde jsou makromolekuly polymeru orientované podélně ve směru deformace, kde se zastaví.⁸²



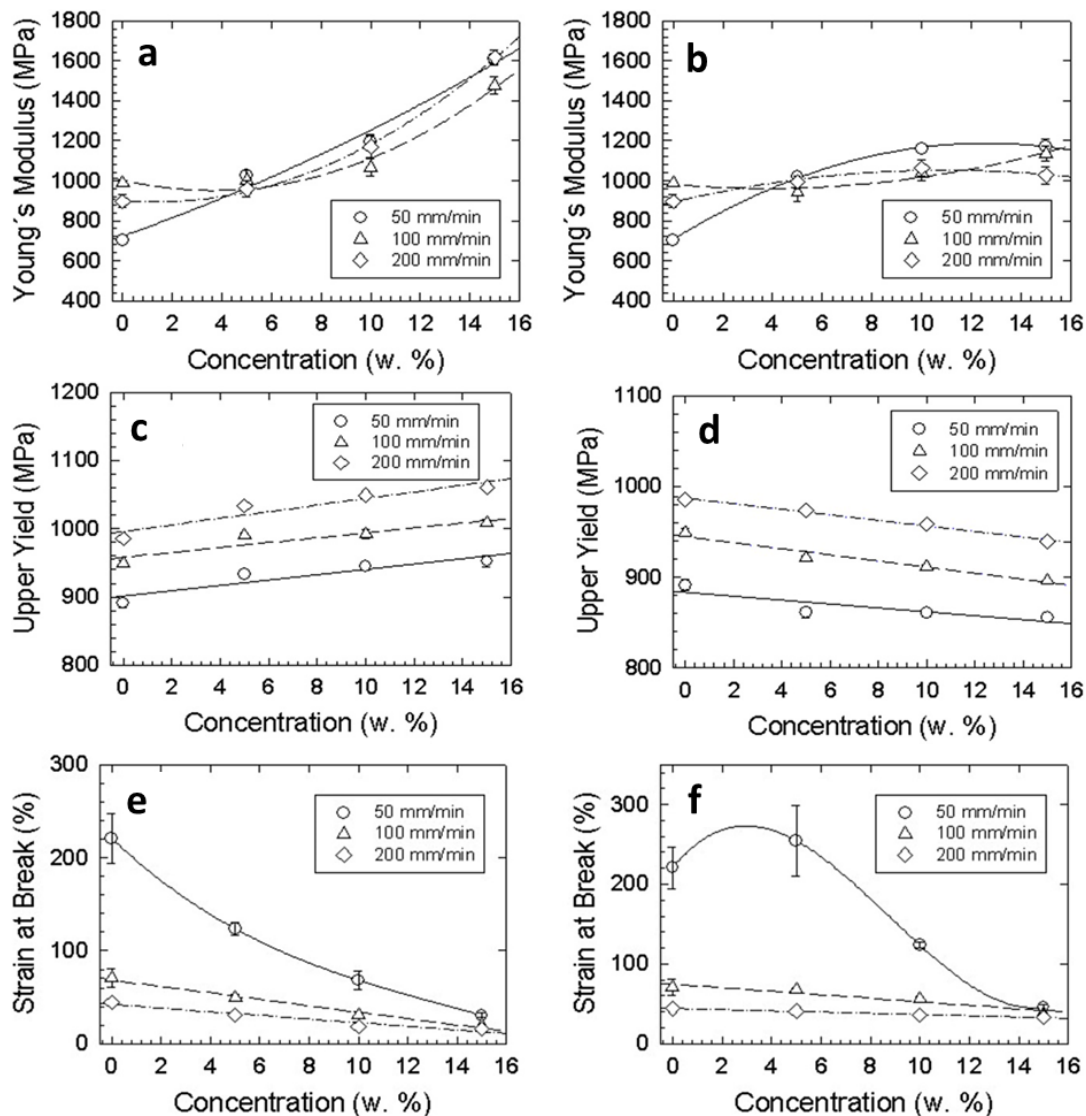
Obr. 16. SEM snímky na lomových plochách studovaných kompozitů. A, B - kompozit slída/HDPE po tahové zkoušce (koncentrace 15 % slídy). C, D – kompozit wollastonit/HDPE po tahové zkoušce (koncentrace 15 % wollastonitu); tahové zkoušky byly provedeny při rychlosti deformace 50mm/min.; na obrázku je šipkami znázorněn směr deformace v tahu (tensile axis), deformovaná HDPE vlákna (fibrils), vznik ostruh (lance structures) a kroužkem vyznačené trhliny (small crazes).⁸⁰ Copyright © Elsevier 2018.

Mechanické chování testovaných kompozitů při zkouškách pevnosti v tahu je znázorněno na grafu závislosti napětí na deformaci (obr 17). Graf lze rozdělit na 3 základní oblasti, oblast I – elastické chování, oblast II – elasticko-plastické a oblast III – plastické chování. Podobné chování lze vidět i u kompozitu HDPE s dutými kuličkami uhlíčitanu vápenatého.⁸³ V případě kompozitu slída/HDPE bylo pozorováno zvýšení tuhosti a křehkosti ve srovnání s čistým HDPE a kompozitem wollastonit/HDPE s typickým elasticko–plastickým chováním.



Obr. 17. Graf závislosti napětí na deformaci zkušebního materiálu při rychlosti deformace v tahu 50 mm/min pro jednotlivé HDPE kompozity s koncentrací plniva 15 w. % Experimenty byly opakovány 10x při teplotě 22 °C.⁸⁰ Copyright © Elsevier 2018.

V případě obou typů kompozitů došlo po přidání minerálních plniv ke zvýšení Youngova modulu pružnosti v tahu při rychlosti deformace 50 mm/min (obr. 18a, 18b) z původní hodnoty 703 ± 73 MPa pro čistý HDPE na 1609 ± 93 MPa pro kompozit slída/HDPE a 1173 ± 107 MPa pro kompozit wollastonit/HDPE. Navýšení elastického chování o 129 % v případě kompozitu slída/HDPE je dáno vyšším stupněm krystalinity ve srovnání s kompozitem wollastonit/HDPE, který je více amorfní a vykazuje spíše plastické chování. Pozorované výsledky potvrdily dřívější studie v oblasti polymerních kompozitů, kde tuhá plniva zvyšují Youngův model pružnosti kompozitů úměrně s rostoucí koncentrací.^{84,85} Na obr. 18c a 18d lze vidět rozdílný vliv jednotlivých plniv na horní mez kluzu. V případě kompozitu wollastonit/HDPE dochází k navýšení horní meze kluzu se zvyšující se koncentrací wollastonitu, tento trend se shoduje s předešlou prací Liang a spol.⁸⁶



Obr. 18. Grafy znázorňující vliv koncentrace slída (a,c,e) a wollastonitu (b,d,f) na pevnostní charakteristiky kompozitů: Youngův modul pružnosti (a,b), horní mez kluzu (c,d) a prodloužení materiálu při přetržení (e,f).⁸⁰ Copyright © Elsevier 2018.

U kompozitu slída/HDPE bylo pozorováno opačné chování. Tyto výsledky potvrzují, že kompozit slída/HDPE vykazuje větší tuhost než kompozit wollastonit/HDPE. Na obr. 18e a 18f jsou znázorněny grafy závislosti koncentrace jednotlivých plniv na prodloužení materiálu při přetržení pro různé rychlosti deformace. Z výsledků pro rychlost deformace 100 a 200 mm/min je patrné lineární chování, kde zvyšování koncentrace minerálních plniv vede ke snížení výsledného protažení materiálu, což značí větší křehkost ve srovnání s čistým HDPE. Nelineární průběh lze

vidět pro rychlost deformace 50 mm/min, kde u kompozitu wollastonit/HDPE s koncentrací plniva 5 % dochází ke zvýšení výsledného protažení materiálu o 15 %.

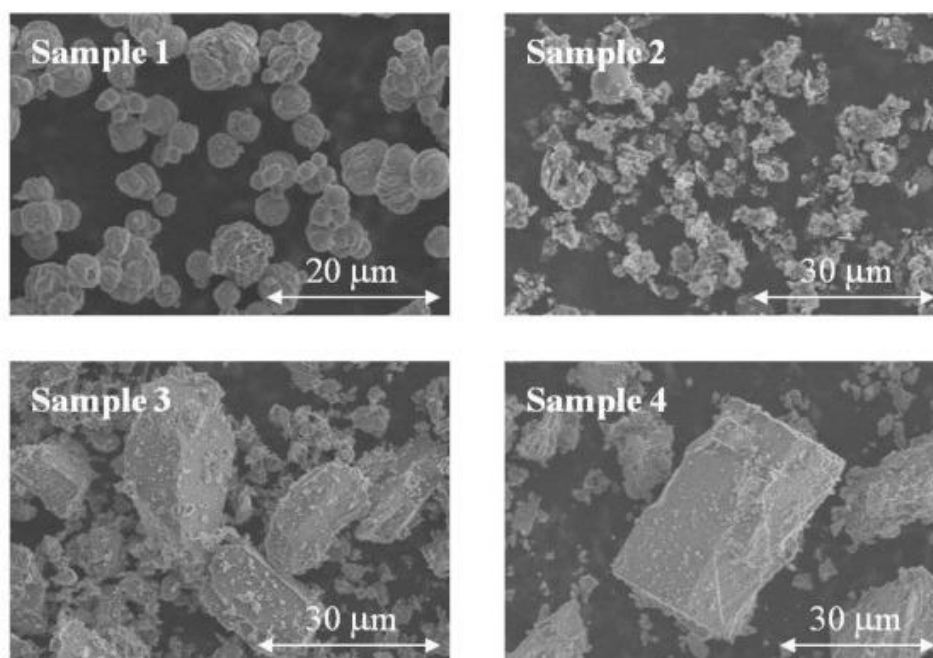
8.2 Charakterizace kohezních sil u partikulárních látek pomocí mechanického smykového napětí a aeračních testů.

V této poslední části se autor disertační práce zabývá studiem kohezních sil na fázovém rozhraní pevná látka/plyn u práškových materiálů. K tomuto účelu byly provedeny experimenty se smykovou celou (konfigurace FT4 Freeman Technology). Autor se podílel na realizaci reologických experimentů a vyhodnocení výsledků. Výsledky z těchto experimentů pak byly použity v následujících publikacích: „Hollow spheres as nanocomposite fillers for aerospace and automotive composite materials applications“ (Composites Part B – Engineering, 2016). V této sekci se autor zabývá pouze výsledky z práškové reologie, na kterých se podílel. Pro hlubší pochopení dané problematiky a kompletní výsledky jsou jednotlivé publikace přiloženy v sekci přílohy. Všechny experimenty byly realizovány na přístroji FT4 Freeman (Freeman Technology, UK)

8.2.1 Charakterizace reologických vlastností dutých částic uhličitanu vápenatého s možným využitím jako plnivo v kompozitních materiálech pro letecký a automobilový průmysl.

V současnosti se zvyšuje poptávka po syntetických polymerech v automobilovém a leteckém průmyslu, která je zaměřená na použití polyetylenu, polypropylenu a polyamidu jako materiály pro komponenty exteriéru, interiéru a ostatních funkčních částí dopravních prostředků.⁸⁷ Z počátku byly minerály do polymerních matric používány pro snížení výrobní ceny.⁸⁸ V důsledku vývoje technologií zpracování minerálů a nerostných surovin a nových technologií v polymerní chemii se začaly minerální plniva používat jako funkční aditiva, díky kterým kompozity získávají specifické mechanické vlastnosti.⁸⁹⁻⁹¹ Přítomnost nano- a mikro-rozměrných dutých částic v kompozitech má za následek zvýšení modulu pružnosti a zvýšení absorpce energie při tlakovém zatížení.⁹¹ Tato studie byla zaměřena na studiu reologického chování

práškových minerálních plniv ve formě dutých kuliček a lamelárních částic (obr. 19) pro použití v kompozitních polymerech na bázi polyolefinů.



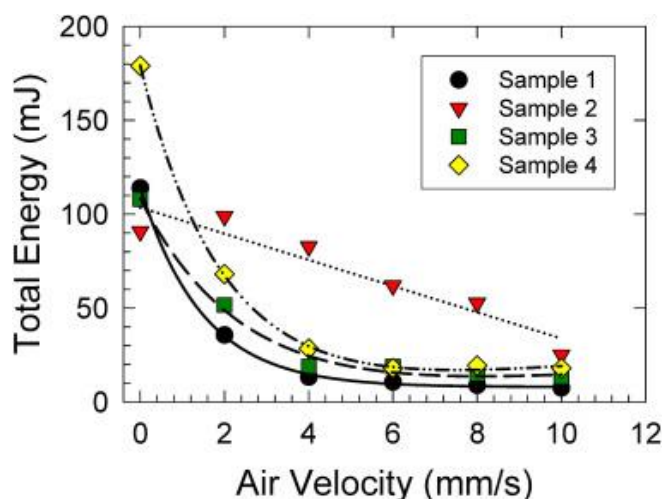
Obr. 19. SEM snímky studovaných kompozitních plniv, kde sample 1 = duté kuličky Ca_2CO_3 , sample 2 = kalcinovaný jíł, sample 3 = dolomit a sample 4 = kalcinovaný kaolin.⁷⁰ Copyright © Elsevier 2016.

Z měření aerace jednotlivých minerálů je patrné, že sférické duté kuličky díky svému aerodynamickému tvaru vykazují nejmenší hodnotu aerační energie při průtoku vzduchu 10 mm/s (7,5 mJ) a mají nejvyšší aerační poměr 15,1 ve srovnání s ostatními minerály lamelárního charakteru (aerační energie pro kalcinovaný jíł byla naměřena 25,1mJ). Vysoký aerační poměr odráží dobré fluidizační vlastnosti materiálu. Ty jsou naopak špatné u částic s nepravidelným planárním tvarem z důvodu vzniku turbulentního proudění kolem jednotlivých částic. Toto chování se pak nejvíce projevilo u kalcinovaného jílu nejnížší hodnotou aerační citlivosti (0,152). Nízká aerační citlivost je typická pro kohezni práškové materiály. Parametry jako aerační energie (AE), aerační poměr (AR), energie toku (BFE) a normalizovaná aerační citlivost (NAS) jsou shrnuty v tab. 9.

Tab. 9: Přehled výsledků z aeračních měření kde BFE značí energii toku, AE_10 aerační energii, AR je aerační poměr a NAS představuje normalizovanou aerační citlivost.

Vzorek	BFE	AE_10	AR_10	NAS
	[mJ]	[mJ]	[-]	[s/mm]
duté kuličky	114.1	7.5	15.1	0.344
kalcinovaný jíł	90.8	25.1	3.6	0.152
dolomit	107.9	13.4	8.1	0.261
kalcin. kaolin	179.3	18.0	9.9	0.310

Poměrně silně kohezní chování kalcinovaného jílu, které je způsobeno kohezí mezi jednotlivými částicemi, se projevilo odlišným průběhem křivky v grafu závislosti celkové energie na rychlosti proudění (viz obr. 20). Výsledky z měření aerace byly následně potvrzeny experimenty se smykovou celou, kde byly zjištěny nízké hodnoty indexu toku pro kalcinovaný jíł (3,67), dolomit (3,01) a kalcinovaný kaolin (3,81). Tyto nízké hodnoty odrážející spíše kohezní charakter částic. Ve srovnání s vyšším indexem toku pro duté kuličky uhličitanu vápenatého (4,71), který je typický pro dobře tekoucí materiály. Parametry z měření pomocí smykové cely jsou shrnuty v tabulce 10. Závislost smykového napětí na normálovém napětí se sestrojenými Mohrovými kružnicemi pro jednotlivé materiály je znázorněna na obr. 21. Kompletní výsledky z akustických měření a měření náboje zkoumaných práškových materiálů jsou dostupné v publikaci, která je přiložena v plném znění jako příloha D. Duté kuličky uhličitanu vápenatého byly následně využity pro výrobu kompozitu s HDPE.⁸³

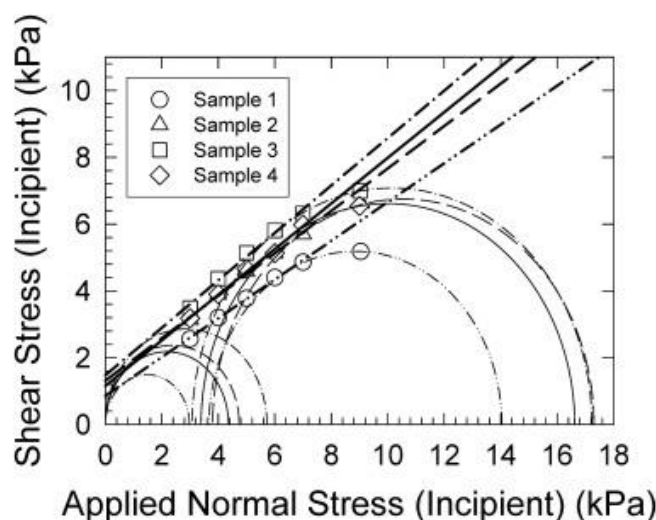


Obr. 20. Graf závislosti celkové energie (mJ) na rychlosti proudění (mm/s) pro studované vzorky kde sample 1 = duté kuličky Ca_2CO_3 , sample 2 = kalcinovaný jíł, sample 3 = dolomit a sample 4 = kalcinovaný kaolin. ⁷⁰
Copyright © Elsevier 2016.

Tab. 10: Tabulka shrnující výsledné parametry z měření se smykovou celou, kde ff_c značí index toku, AIF je vnitřní úhel tření, BD je hustota a AIF (E) představuje efektivní úhel vnitřního tření.

Vzorek	koheze [kPa]	ff_c [-]	AIF [°]	BD [g/ml]	AIF [E] [°]
duté kuličky	0.86	4.71	30.13	1.95	35.86
kalcinovaný jíł	1.30	3.67	32.55	1.17	39.89
dolomit	1.48	3.01	35.34	1.92	44.20
kalcin. kaolin	1.15	3.81	34.53	2.36	41.39

Z výsledku je patrné, že tvar částic má velký vliv na tokové vlastnosti zkoumaných práškových minerálních plniv. Duté kuličky uhličitanu vápenatého mají charakter volně tekoucího práškového materiálu ve srovnání s lamelárními částicemi kalcinovaného kaolinu, který vykazoval kohezní charakter. Toto chování je způsobeno kohezními silami mezi jednotlivými částicemi. To bylo následně potvrzeno měřením aerace, kde v případě kalcinovaného kaolinu byla naměřena dvojnásobná hodnota aerační energie ve srovnání s částicemi uhličitanu vápenatého.



Obr. 21. Závislosti smykového napětí (τ) na normálovém napětí (σ) se sestrojenými Mohrovými kružnicemi pro studované práškové materiály: duté kuličky Ca_2CO_3 (symbol kruh), kalcinovaný jíl (symbol trojúhelník), dolomit (symbol čtverec) a kalcinovaný kaolin (symbol kosočtverec).⁷⁰ Copyright © Elsevier 2016.

9 Závěr

Cílem této práce bylo pochopení a popsání fyzikálně-chemických jevů ovlivňující adsorpci a desorpci částic a biologických entit jako např. buněk na fázovém rozhraní kapalina/pevná látka. Pro tento účel byl upraven a realizován systém na bázi techniky impinging jet pro měření kinetik depozice a uvolňování částic pomocí laminárního toku v okolí stagnačního bodu. V rámci této problematiky byl testován vliv topografie povrchu polymeru (Zeonoru) upraveného nano-embosováním dvěma rozdílnými vzory. Získané kinetiky depozice modelových polystyrenových latexových částic na takto upravené povrchy ukázaly, že nano-embosování silně ovlivňuje aktivitu povrchu. I přes zvýšení volné povrchové energie v důsledku nano-embosování bylo pozorováno výrazné snížení rychlosti depozice a celkového počtu deponovaných částic ve srovnání s nemodifikovaným povrchem polymeru. Tento jev je pravděpodobně způsobený hydrodynamickou fokusací v kapalně vrstvě v těsné blízkosti nad povrchem polymeru. V rámci studia odtrhávání HeLa buněk adherovaných na 2D-uhlíkaté nanomateriály pomocí techniky impinging jet byl sledován vliv chemického složení, morfologie a smáčení testovaných povrchů na adhezi buněk. Z Výsledků je patrné, že kyslíkové funkční skupiny na povrchu GO zesilují

adhezi HeLa buněk. Získané kinetiky uvolňování buněk naznačují, že se GO jeví jako potenciálně vhodný substrát zesilující adhezi buněk pro konstrukci biosenzorů.

V další části předložené práce byl zkoumán vliv tvaru a adheze částicových minerálních plniv do polymerní matrice na mechanické vlastnosti polymerních kompozitů pomocí jednoosého namáhání v tahu. Z výsledků je patrné, že adheze částicových plniv do polymerní matrice HDPE silně ovlivňuje plasticko-elastické chování kompozitu. V případě kompozitů slída/HDPE a wollastonite/HDPE došlo v obou případech k navýšení Youngova modulu pružnosti přímo úměrně se zvětšující se koncentrací jednotlivých plniv. V případě kompozitu slída/HDPE došlo také k navýšení horní meze kluzu spolu s rapidním snížením prodloužení materiálu při přetržení, což značí vyšší tuhost a křehkost materiálů ve srovnání s čistým HDPE a kompozitem wollastonite/HDPE.

Součástí předložené práce bylo také studium vlivu kohezních sil mezi částicemi partikulárních látek na fázovém rozhraní pevná látka/plyn na tokové vlastnosti testovaných práškových materiálů. V rámci této problematiky byl pomocí mechanického smyku a aeračních testů zkoumán vliv kohezních sil na tokové vlastnosti partikulárních látek. Experimenty byly zaměřeny na studium minerálních částicových plniv s možným využitím v polymerních kompozitech, charakterizaci tokových vlastností mléčných produktů jako je syrovátka a sušené mléko.

Výsledky z této disertační práce jsou podrobně popsány v sekci řešené problémy. Poznatky získané během experimentální práce pomocí techniky impinging jet přinášejí nové poznatky v oblasti interakcí 2D-uhlíkových nanomateriálů s buňkami a v oblasti vlivu topografie povrchu a nanodrsnosti polymerů na depozici částic. Dále byly prohloubeny dosavadní poznatky z oblasti polymerních částicových kompozitů se zaměřením na vliv adheze minerálních částicových plniv do polymerní matrice HDPE. Lze tedy konstatovat, že autor práce splnil vytyčené cíle. Všechny výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech, které jsou uvedeny v plném znění v sekci přílohy.

10 Summary

The aim of this thesis was to understand and describe the influence of the physicochemical phenomena on particle deposition and cell detachment processes on the solid/liquid phase interface. For this purpose, a system based on an impinging jet technique for the measuring deposition and detachment kinetics induced by laminar flow near stagnation point was adjusted and implemented. The influence of the topography of the Zeonor surface, modified by nano-embossing by two different templates, was tested. Obtained kinetics of the polystyrene latex particles deposition on modified Zeonor surface have shown, that nano-embossing significantly influenced the activity of the surface. Despite the fact, that embossing of the Zeonor surface caused increasing of the SFE, a decrease of the total number of deposited particles and lower deposition rates were observed in comparison to the virgin Zeonor surfaces. This phenomenon is probably caused by hydrodynamic focusing in a thin liquid layer above the Zeonor surface. Another study was focused on HeLa cells adhesion on 2D carbon-based nanomaterials with focus on the influence of the surface chemical composition, surface topology and surface wetting on the cell adhesion. According to results, it is evident, that oxygen-containing functional groups on GO surface enhanced cell adhesion. Obtained detachment kinetics indicate, that GO is a potent cell adhesion enhancer and could be used as a substrate for the construction of biosensors.

In the next part of the thesis, the effect of the mineral filler shape, size and adhesion into the polymer matrix was studied. This research was focused on the impact of the mineral fillers on the mechanical properties of HDPE composites by means of uniaxial stress testing. Results show that the adhesion of mineral fillers to the HDPE polymer matrix strongly influenced the plastic-elastic behaviour of the composite. The increase of mica/HDPE and wollastonite/HDPE of Young's modulus of elasticity was observed. In both cases, increasing was in proportion to the increasing concentration of the individual filler. In the case of the mica/HDPE composites an increase of the upper yield strength and rapid reduction of the elongation at break was observed. This behaviour indicates higher stiffness and brittleness of the material compared to the virgin HDPE and wollastonite/HDPE composite. In the case of the mica / HDPE composite, the upper yield strength also increased, together with a rapid reduction in elongation of the breakage material, indicating higher stiffness and brittleness of the materials compared to pure HDPE and

wollastonite/HDPE composites. Part of this thesis was also focused on the research of the influence of cohesive forces study in bulk solids on the flow properties of the tested powder materials. For this purpose, mechanical shear stress and aeration tests were used. Experiments were focused on the study of mineral fillers with possible use in polymer composites, characterization of flow properties of dairy products such as whey and dried milk.

Complete results are well described and discussed in the section solved problems on page 42. Experiments using impinging jet technique bring a new finding in the field of interactions of 2D-carbon based nanomaterials with HeLa cells and in the field of the surface nanoroughness impact on particle deposition process. Furthermore, understanding of the mineral filler adhesion to the polymer matrix impact on the mechanical properties of polymer composites was enhanced. In conclusion the author achieved the main aims of this thesis. All results, which are listed in the appendix section, were published in impact journals.

11 Seznam publikací

1. **J. Vlček**, L. Lapčík, J. Čech, B. Lapčíková: Impinging jet study of the deposition of colloidal particles on synthetic polymer (Zeonor), *International Journal of Heat and Mass Transfer* 78 (2014), 416-422. (IF = 3,891) **Příloha A**
2. L. Lapčík, B. Lapčíková, E. Otyepková, M. Otyepka, **J. Vlček**, F. Buňka, R. Salek: Surface energy analysis (SEA) and rheology of powder milk dairy products, *Food Chemistry* 147 (2015), 25-30. (IF = 4,946) **Příloha E**
3. L. Lapčík, M. Ruzala, M. Vašina, B. Lapčíková, **J. Vlček**, N. Rowson, R. Greenwood: Hollow spheres as nanocomposite fillers for aerospace and automotive composite materials applications, *Composites Part B: Engineering* 106 (2016), 74–80. (IF = 4,92) **Příloha D**
4. L. Lapčík, D. Mañas, B. Lapčíková, M. Vašina, M. Staněk, K. Čépe, **J. Vlček**, K. E. Waters, N. Rowson, R. Greenwood: Effect of filler particle shape on plastic-elastic mechanical behavior of high density poly(ethylene)/mica and poly(ethylene)/wollastonite composites, *Composites Part B: Engineering* 141 (2018), 92-99. (IF = 4,92) **Příloha C**
5. **J. Vlček**, L. Lapčík, M. Havrdová, V. Poláková, B. Lapčíková, T. Opletal, J. Froning, M. Otyepka: Flow induced HeLa cell detachment kinetics show that oxygen-containing functional groups in graphene oxide are potent cell adhesion enhancers, *Nanoscale* 11(2019), 3222-3228. (IF = 7,23) **Příloha B**
6. Kapitola v knize: *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications* – Smithers Rapra publishing; L. Lapčík, E. Otyepková, B. Lapčíková, M. Otyepka, **J. Vlček**, I. Kupská: Hyaluronic acid powder physico-chemical analysis for cosmetic and pharmaceutical processing, Smithers Rapra, 2014, Shrewsbury, UK.

12 Použitá literatura

- 1 M. Kamiti, *Colloids and Surfaces*, 1995, **100**, 117–129.
- 2 K. J. Kubiak, M. C. T. Wilson, T. G. Mathia and P. Carval, *Wear*, 2011, **271**, 523–528.
- 3 D. Y. Kwok, D. Li and A. W. Neumann, *Langmuir*, 1994, **10**, 1323–1328.
- 4 X. Jiang, M. Tong, H. Li and K. Yang, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **350**, 427–434.
- 5 R. A. W. M. Elimelech, J. Gregory, X. Jia, *Particle deposition and aggregation: measurement, modelling and simulation*, Butterworth-Heinemann, 1995.
- 6 N. M. Markovic, K. J. J. Mayrhofer, V. Stamenkovic, B. B. Blizanac, M. Arenz and D. Strmcnik, *Electrochim. Acta*, 2007, **53**, 3181–3188.
- 7 T. Dąbroś and T. G. . Van De Ven, *J. Colloid Interface Sci.*, 1982, **89**, 232–244.
- 8 T. Dabroś and T. G. M. van de Ven, *Colloid Polym. Sci.*, 1983, **261**, 694–707.
- 9 Z. Xia, H. L. Goldsmith and T. G. van de Ven, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 1073–1083.
- 10 Z. Adamczyk, B. Siwek and P. Warszyński, *J. Colloid Interface Sci.*, 2002, **248**, 244–254.
- 11 J. Vlček, L. Lapčík, J. Čech and B. Lapčíková, *Int. J. Heat Mass Transf.*, 2014, **78**, 416–422.
- 12 Z. Adamczyk, B. Siwek, M. Zembala and P. Warszyński, *J. Colloid Interface Sci.*, 1989, **130**, 578–587.
- 13 L. Lapčík, M. Fraštko and B. Lapčíková, *Int. J. Heat Mass Transf.*, 2012, **55**, 1513–1518.
- 14 Z. Adamczyk, L. Szyk and P. Warszyński, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **209**, 350–361.
- 15 M. Polverari and T. G. M. van de Ven, *Langmuir*, 1995, **11**, 1870–1876.
- 16 Z. Adamczyk, L. Szyk and P. Warszyński, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 1993, **75**, 185–193.

- 17 Z. Adamczyk, E. Musiał and B. Siwek, *J. Colloid Interface Sci.*, 2004, **269**, 53–61.
- 18 Z. Adamczyk, *Particles at interfaces: interactions, deposition, structure*, Elsevier/Academic Press, 2006.
- 19 J. Zheng, L. Li, H. K. Tsao, Y. J. Sheng, S. Chen and S. Jiang, *Biophys. J.*, 2005, **89**, 158–166.
- 20 B. M. Gumbiner, *Cell*, 1996, **84**, 345–357.
- 21 K. I. Nishijima, T. Fujiki, H. Kojima and S. Iijima, *Cytotechnology*, 2000, **33**, 147–155.
- 22 M. Suzanne and H. Steller, *J. Biol.*, 2009, **8**, 49.
- 23 H.-Y. Chang, C.-C. Huang, K.-Y. Lin, W.-L. Kao, H.-Y. Liao, Y.-W. You, J.-H. Lin, Y.-T. Kuo, D.-Y. Kuo and J.-J. Shyue, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 14464–14470.
- 24 N. Nath, J. Hyun, H. Ma and A. Chilkoti, in *Surface Science*, 2004, vol. 570, pp. 98–110.
- 25 L. Bačáková, V. Mareš, M. Grazia Bottone, C. Pellicciari, V. Lisá and V. Švorčík, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **49**, 369–379.
- 26 J. G. Steele, G. Johnson and P. A. Underwood, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1992, **26**, 861–884.
- 27 F. Grinnell and M. K. Feld, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 4888–4893.
- 28 M. M. Kozlov, *Nature*, 2010, **463**, 439–440.
- 29 D. Colman, *Advances in molecular and cell biology. Volume 16, Cell adhesion*, JAI Press, 1996.
- 30 A. J. Garcia, M. D. Vega and D. Boettiger, *Mol. Biol. Cell*, 1999, **10**, 785–798.
- 31 S. Huang, C. S. Chen and D. E. Ingber, *Mol. Biol. Cell*, 1998, **9**, 3179–3193.
- 32 A. K. Pannier, B. C. Anderson and L. D. Shea, *Acta Biomater.*, 2005, **1**, 511–522.
- 33 L. Bačáková, E. Filová, M. Pařízek, T. Ruml and V. Švorčík, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 739–767.

- 34 T. Ishizaki, N. Saito and O. Takai, *Langmuir*, 2010, **26**, 8147–8154.
- 35 D. Karazisis, A. M. Ballo, S. Petronis, H. Agheli, L. Emanuelsson, P. Thomsen and O. Omar, *Int. J. Nanomedicine*, 2016, **11**, 1367–1382.
- 36 Y. Arima and H. Iwata, *Biomaterials*, 2007, **28**, 3074–3082.
- 37 T. G. Ruardy, J. M. Schakenraad, H. C. van der Mei and H. J. Busscher, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1995, **29**, 1415–1423.
- 38 L. Liu, L. H. Klausen and M. Dong, *Nano Today*, 2018, **23**, 40–58.
- 39 S. Some, A. R. Gwon, E. Hwang, G. H. Bahn, Y. Yoon, Y. Kim, S. H. Kim, S. Bak, J. Yang, D. G. Jo and H. Lee, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 1–9.
- 40 V. Georgakilas, J. N. Tiwari, K. C. Kemp, J. A. Perman, A. B. Bourlinos, K. S. Kim and R. Zbořil, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 5464–5519.
- 41 J. Liu, L. Cui and D. Losic, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 9243–9257.
- 42 Z. Zhang, L. H. Klausen, M. Chen and M. Dong, *Small*, 2018, **14**, 1801983.
- 43 E. Nishida, H. Miyaji, A. Kato, H. Takita, T. Iwanaga, T. Momose, K. Ogawa, S. Murakami, T. Sugaya and M. Kawanami, *Int. J. Nanomedicine*, 2016, **11**, 2265–2277.
- 44 E. Morales-Narváez, A. R. Hassan and A. Merkoçi, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2013, **52**, 13779–13783.
- 45 A. M. H. Ng, Kenry, C. Teck Lim, H. Y. Low and K. P. Loh, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **65**, 265–273.
- 46 L. Gao, C. Lian, Y. Zhou, L. Yan, Q. Li, C. Zhang, L. Chen and K. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **60**, 22–29.
- 47 X. Yu, H. Cheng, M. Zhang, Y. Zhao, L. Qu and G. Shi, *Nat. Rev. Mater.*, 2017, **2**, 1–14.
- 48 Z. Zhang, R. Xu, Z. Wang, M. Dong, B. Cui and M. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 34736–34743.

- 49 Y. A. Cheon, J. H. Bae and B. G. Chung, *Langmuir*, 2016, **32**, 2731–2736.
- 50 Y. Zeng, Z. Yang, H. Li, Y. Hao, C. Liu, L. Zhu, J. Liu, B. Lu and R. Li, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1–10.
- 51 K. Yang, L. Feng, X. Shi and Z. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 530–47.
- 52 X. Huang, Z. Yin, S. Wu, X. Qi, Q. He, Q. Zhang, Q. Yan, F. Boey and H. Zhang, *Small*, 2011, **7**, 1876–1902.
- 53 A. K. Geim and K. S. Novoselov, *Nat. Mater.*, 2007, **6**, 183–191.
- 54 M. Allen, *Am. Chem. Soc.*, 2009, 184.
- 55 S. H. Ku, M. Lee and C. B. Park, *Adv. Healthc. Mater.*, 2013, **2**, 244–260.
- 56 D. Schulze, J. Schwedes and J. W. Carson, *Powders and bulk solids: Behavior, characterization, storage and flow*, Springer, 2008.
- 57 D. McGlinchey, *Characterisation of bulk solids*, Blackwell, 2005.
- 58 X. Y. Lu, L. Chen, C. Y. Wu, H. K. Chan and T. Freeman, *Materials (Basel)*, 2017, **10**, 592.
- 59 T. Freeman, K. Brockbank and B. Armstrong, in *Procedia Engineering*, 2015, vol. 102, pp. 35–44.
- 60 W. Nan, M. Ghadiri and Y. Wang, *Chem. Eng. Sci.*, 2017, **173**, 374–383.
- 61 C. Xu and J. Zhu, *Powder Technol.*, 2006, **161**, 135–144.
- 62 X. Fu, D. Huck, L. Makein, B. Armstrong, U. Willen and T. Freeman, *Particuology*, 2012, **10**, 203–208.
- 63 Q. Li, V. Rudolph, B. Weigl and A. Earl, *Int. J. Pharm.*, 2004, **280**, 77–93.
- 64 L. Lapčák and M. Raab, *Nauka o materiálech II*, Univerzita Tomáše Bati, 2004.
- 65 K. Friedrich, S. Fakirov and Z. Zhang, *Polymer composites : from nano-to-macro-scale*, Springer, 2005.

- 66 J. A. Alvarado-Contreras, *Micromechanical Modeling of Polyethylene*, University of Waterloo 2007.
- 67 Z. Adamczyk, B. Siwek, P. Warszyński and E. Musiał, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, **242**, 14–24.
- 68 M. R. Ferrick, J. Murtagh and J. K. Thomas, *Macromolecules*, 1989, **22**, 1515–1517.
- 69 L. Bačáková, E. Filová, M. Pařízek, T. Ruml and V. Švorčík, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 739–767.
- 70 J. Vlček, L. Lapčík, M. Havrdová, K. Poláková, B. Lapčíková, T. Opletal, J. P. Froning and M. Otyepka, *Nanoscale*, 2019, **11**, 3222–3228.
- 71 K. Krishnamoorthy, M. Veerapandian, K. Yun and S.-J. Kim, *Carbon N. Y.*, 2013, **53**, 38–49.
- 72 Z. Ni, Y. Wang, T. Yu and Z. Shen, *Nano Res.*, 2008, **1**, 273–291.
- 73 K. Vijayarangamuthu, S. Ahn, H. Seo, S.-H. Yoon, C.-M. Park and K.-J. Jeon, *Adv. Mater.*, 2016, **28**, 661–667.
- 74 M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, L. G. Cançado, A. Jorio and R. Saito, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 1276–1290.
- 75 L. Bachkova, V. Rybka, I. Míček, V. Hnatowicz and F. Kocourek, 1996, **17**, 1121–1126.
- 76 O. N. Ruiz, K. A. S. Fernando, B. Wang, N. A. Brown, P. G. Luo, N. D. McNamara, M. Vangsness, Y. P. Sun and C. E. Bunker, *ACS Nano*, , DOI:10.1021/nn202699t.
- 77 G. Truskey and T. Proulx, *Biomaterials*, 1993, **14**, 243–254.
- 78 N. I. Demidenko and G. B. Tel'nova, *Glas. Ceram.*, 2004, **61**, 183–186.
- 79 L. Lapčík, M. Vašina, B. Lapčíková, E. Otyepková and K. E. Waters, *Compos. Part B Eng.*, 2015, **77**, 304–310.
- 80 L. Lapčík, D. Mañas, B. Lapčíková, M. Vašina, M. Staněk, K. Čépe, J. Vlček, K. E.

- Waters, R. W. Greenwood and N. A. Rowson, *Compos. Part B Eng.*, 2018, **141**, 92–99.
- 81 B. Pukánszky, M. Van Es, F. H. J. Maurer and G. Vörös, *J. Mater. Sci.*, 1994, **29**, 2350–2358.
- 82 C. B. Bucknall, *Toughened plastics*, Applied Science Publishers, 1977.
- 83 L. Lapčík, D. Mañas, M. Vašina, B. Lapčíková, M. Řezníček and P. Zádrapa, *Compos. Part B Eng.*, 2017, **113**, 218–224.
- 84 J.-Z. Liang, J.-Q. Feng, C.-P. Tsui and C.-Y. Tang, *J. Thermoplast. Compos. Mater.*, 2015, **28**, 275–286.
- 85 L. Lapčík, P. Jindrová, B. Lapčíková, R. Tamblyn, R. Greenwood and N. Rowson, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, **110**, 2742–2747.
- 86 J. Z. Liang and Q. Q. Yang, *J. Thermoplast. Compos. Mater.*, 2007, **20**, 225–236.
- 87 B. Lapčíková, L. Lapčík, P. Smolka, R. Dlabaja and D. Hui, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, **102**, 1827–1833.
- 88 S. Ottani, A. Valenza and F. P. La Mantia, *Rheol. Acta*, 1988, **27**, 172–178.
- 89 B. L. Zhu, J. Wang, H. Zheng, J. Ma, J. Wu and R. Wu, *Compos. Part B Eng.*, 2015, **69**, 496–506.
- 90 R. Huang and P. Li, *Compos. Part B Eng.*, 2015, **78**, 401–408.
- 91 M. Porfiri and N. Gupta, *Compos. Part B Eng.*, 2009, **40**, 166–173.