



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

OPTIMALIZACE PODMÍNEK POSTUPU GELACE HYROXYETHYLCELULOZY A HYALURONANU POMOCÍ KYSELINY CITRONOVÉ

OPTIMIZATION OF CONDITION OF PROCEDURE OF GELATION
HYDROXYETHYLCELLULOSE USING CITRIC ACID

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

NATÁLIE BUREŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

Ing. ANDREA KARGEROVÁ, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1000/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Natálie Burešová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Optimalizace podmínek postupu gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu pomocí kyseliny citronové

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámení se s použitými látkami
2. Najít postup gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Natálie Burešová
Student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývala hydrogely, které mají výhodu v zadržení velkého množství vody, to umožňuje velké možnosti aplikací, například v medicíně. Reaktanty síťovací reakce byl hyaluronan a hydroxyethylcelulóza. Síťovacím činidlem zde byla kyselina citronová, což je látka netoxická a finančně nenákladná. Hydroxyethylcelulóza a hyaluronan byly pro síťování vybrány na základě dostupných publikací. Vzniklé gely by se díky netoxickému síťovacímu činidlu mohli využít hlavně v medicíně. Hlavním cílem bakalářské práce byla optimalizace postupu gelace hydroxyethylcelulózy a nazezení vhodného postupu gelace. Vybraný vhodný postup gelace byl aplikován na směs hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu ve dvou různých hmotnostních poměrech a na hyaluronan samotný. Za chemicky zesíťené byly považovány vzorky, které obsahovaly samotnou hydroxyethylcelulózu a směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 3:7.

ABSTRACT

The bachelor thesis dealt with hydrogels, which have the advantage detention large quantities of water, it allows large potential applications, such as in medicine. Hyaluronan and hydroxyethylcellulose were the reactants of crosslinking reaction. Citric acid was crosslinking agent which is nontoxic and inexpensive. Hydroxyethylcellulose and hyaluronan for crosslinking reaction were selected on the finding from available publications. The resulting gels can be used mainly in medicine because they are nontoxic. The main aim of the thesis was optimalizacion process of gelation and hydroxyethylcellulose and finding a suitable gelation process. Selected gelation procedure is applied to a mixture of hydroxyethyl cellulose and hyaluronan in two different weight ratios and hyaluronan. Chemically cross-linked were considered samples, which contained hydroxyethylcellulose and then a mixture of hyaluronate and hydroxyethyl cellulose in a weight ratio of 3:7.

Klíčová slova

Hydrogely, hyaluronan, hydroxyethylcelulóza, kyselina citronová, gelace

Key words

Hydrogels, hyaluronan, hydroxyethylcellulose, citric acid, gelation.

BUREŠOVÁ, N. *Optimalizace podmínek postupu gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu pomocí kyseliny citronové*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Andree Kargerové, Ph.D. a prof. Ing. Miloslavovi Pekaři, CSc. za ochotu a podmětne připomínky k práci.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Hyrogely.....	8
2.2	Rozdělení gelů.....	8
2.2.1	Reverzibilní gely.....	8
2.2.2	Kovalentní gely.....	8
2.2.3	Fyzikálně síťované gely.....	9
2.2.4	Ireverzibilní gely.....	10
2.2.5	Další rozdělení gelů	10
2.3	Vlastnosti gelů.....	10
2.3.1	Stárnutí gelu.....	10
2.3.2	Ovlivnění průběhu gelace	11
2.4	Kyselina citronová	11
2.5	Hydroxyethylcelulóza	12
2.6	Hyaluronan (kyselina hyaluronová).....	13
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	14
3.1.1	Hyrogely na bázi celulózy zesíťované kyselinou citronovou.....	14
3.1.2	Vliv kyseliny citronové na zesíťování hydrogelů na bázi celulózy na osteogenní diferenciaci	16
4	PRAKTICKÁ ČÁST	18
4.1	Materiály a gelace	18
4.1.1	Materiály.....	18
4.1.2	Gelace hydroxyethylcelulózy	18
4.2	Gelace hyaluronanu.....	20
5	VÝSLEDKY	21
5.1	Gelace hydroxyethylcelulózy.....	21
5.1.1	Zesíťování vzorků při 80°C po dobu 24 hodin.....	21
5.1.2	Zesíťování vzorků s předsušením při 30°C po dobu 24 hodin a sušením při 80°C po dobu 24 hodin	25
5.1.3	Zesíťování vzorků s předsušením při 30°C po dobu 12 hodin a sušením při 80°C po dobu 12 hodin.....	28

5.1.4	Zesítení vzorků s předsušením při 30°C po dobu 20 hodin a sušením při 80°C po dobu 24 hodin.....	28
5.1.5	Zesítení vzorků při 30°C do úplného vysušení vzorků.....	30
5.1.6	Zesítení vzorků při 50°C po dobu 5 dní.....	31
5.2	Gelace hyaluronanu.....	32
5.2.1	Zesítení 0,1 g hyaluronanu.....	32
5.2.2	Zesítení 0,1 g hydroxyethylcelulózy.....	34
5.2.3	Zesítení směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v poměru 7:3	35
5.2.4	Zesítení směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v poměru 3:7	36
6	ZÁVĚR.....	39
7	ZDROJE.....	40

1 ÚVOD

Gely jsou disperzní systémy, které obsahují pevné částice, vytvářející trojrozměrnou síť, prostupující disperzním kapalným disperzním prostředím. Jsou obecně charakterizovány jako pevná, rosolovitá hmota, zachovávající svůj tvar. Mají schopnost zadržení velkého množství vody, této vlastnosti se využívá v mnoha odvětvích, například medicína, biologie, potravinářství a průmysl.

Příprava hydrogelů se uskutečňuje reakcí polymeru a síťovacího činidla, proces se obecně nazývá gelace či síťování. V bakalářské práci se využívá síťování chemické, což znamená vázání řetězců polymeru k sobě kovalentními nebo iontovými vazbami pomocí síťovacího činidla. V bakalářské práci je jako síťovací činidlo kyselina citronová, která není tolik nákladná a toxická, na rozdíl od ostatních síťovacích činidel, například formaldehyd.

Cílem bakalářské práce je využití kyseliny citronové jako nového síťovacího činidla použitého při gelaci hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu. Při úspěšném síťování by se vzniklé gely mohly využít hlavně v biologii a lékařství, z důvodu netoxicity síťovacího činidla, a také podobnosti gelů lidským tkáním.

Hydroxyethylcelulóza byla pro síťování vybrána na základě zveřejněných publikací, které se zabývají gelací hydroxyethylcelulózy a její sodné soli pomocí kyseliny citronové. Sodná sůl hydroxyethylcelulózy je její anionický derivát, z tohoto důvodu byl jako druhý polymer pro síťování vybrán hyaluronan, který se v aniontové formě vyskytuje v roztocích. Zesítnění směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy pomocí netoxické kyseliny citronové by mohlo přinést větší využití hlavně v medicíně.

Hlavním cílem bakalářské práce je nalezení správného postupu gelace samotné hydroxyethylcelulózy. Vybraný nejlepší postup je dále aplikován na samotný hyaluronan a na směsi hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu ve dvou různých hmotnostních poměrech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydrogely

Gely jsou disperzní systémy, obsahující pevné částice (disperzní podíl), které vytvářejí trojrozměrnou síť, prostupující kapalným disperzním prostředím [1].

Jednotlivé gely jsou prostorově uspořádány do trojrozměrné makromolekulární sítě. Makromolekulární síť vytváří souvislou strukturu, která prostupuje disperzním systémem. Pokud se mezi makromolekulami vytvoří dostatečné množství spojů, může makromolekulární síť vzniknout z roztoku lineárního polymeru nebo z lineárního polymeru samotného [2]. Mají schopnost zadržet velké množství vody, což je ovlivněno okolním prostředím [3].

Gely mají některé vlastnosti pevných látek, přestože disperzní prostředí je kapalné. Hustota gelů je podobná hustotě kapalných látek, ale pružnost a také elasticita jsou podobné pevným látkám. Jsou obecně charakterizovány jako rosolovitá, pevná hmota, která zachovává svůj tvar.

Využívají se v mnoha odvětvích, například v lékařství a biologii, protože tvoří velkou část živých organismů. V potravinářství se využívají jako zahušťovadla a různé přísady ve formě želatiny. Další využití nacházejí v průmyslu při výrobě lepidel, umělých vláken, barviv a zpracování kůží [4].

2.2 Rozdělení gelů

Gely se rozdělují na 4 základní kategorie: reverzibilní, ireverzibilní, kovalentní a fyzikální.

2.2.1 Reverzibilní gely

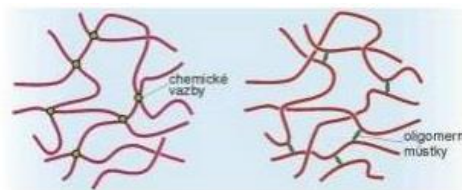
Při vysoušení reverzibilních gelů dochází ke zmenšování jejich objemu a mohou vznikat kompaktní xerogely. Gely jsou schopné přecházet zpět do původního stavu přijmutím disperzního prostředí. Tento proces se nazývá bobtnání. Reverzibilní gely vznikají bobtnáním xerogelů nebo z roztoků lineárních polymerů [4].

2.2.2 Kovalentní gely

Kovalentní makromolekulární gely tvoří svými chemickými vazbami nekonečnou trojrozměrnou síťovitou strukturu, viz obrázek 1 [4]. Trojrozměrnou síťovitou strukturu označujeme nekonečnou, protože makromolekula je mnohem větší než běžné makromolekuly. Tato struktura vznikne například síťovací polymerací nebo při síťování lineárního polymeru [2].

Při síťování lineárního polymeru nejdříve vznikají menší makromolekuly. Hmotnost makromolekul a systém jejich rozvětvení roste. Nejrychleji rostou největší makromolekuly, které na sebe navazují další velké celky a vzniká tak trojrozměrná síť. Po dosažení bodu gelace vzniká nekonečná trojrozměrná síť [5]. Hmotnost rozpustného podílu klesá a hmotnost gelového podílu roste.

Síťovací polymerace je kopolymerace dvou-funkčního polymeru s více-funkčním. Kopolymerace je chemická řetězová reakce. Ze dvou nebo více monomerů vznikne makromolekulární látka (kopolymer) [2].



Obrázek 1 Kovalentně síťované gely [4]

Charakteristika síťové struktury

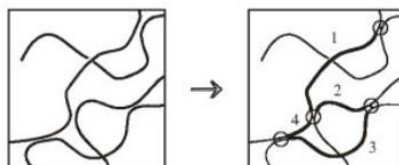
V gelové struktuře rozlišujeme dva základní pojmy, uzel sítě a řetězec. Uzel sítě je místo, ve kterém bývá síť spojena vulkanizací (chemická reakce, jejímž produktem je makromolekula velkých rozměrů) nebo navázáním vícefunkčního monomeru. Řetězcem se nazývá část sítě, jež se nachází mezi jednotlivými uzly. Síťovitá struktura se zřetelně změní, jestliže dojde k zesílení primárních lineárních řetězců. Rozměr řetězců je vzdálenost uzlů, ve kterých je řetězec zapojen. U síťování lineárních řetězců obvykle vznikají čtyř-funkční uzly.

Síťovitou strukturu ovlivňují podmínky, kterým jsou gely vystaveny. Mezi vlastnosti gelů patří bobtnání. Znamená to, že se jednotlivé uzly od sebe vzdalují a řetězce se napřimují. Této vlastnosti se využívá při absorbování přebytečné vlhkosti [2]. Kovalentní gely se nemůžou přeměnit na roztok. Gely absorbují plyn nebo kapalinu a tím se zvětšuje jejich objem. Procesu se říká bobtnání [5].

2.2.3 Fyzikálně síťované gely

Fyzikálně síťované gely vznikají spojováním polymerních řetězců. Úseky makromolekulárních řetězců se za působení fyzikálních sil spojují do útvarů, které mají funkci uzlů, viz obrázek 2 [4]. Spoje, které vznikají tímto způsobem, jsou v jednom nebo dokonce i ve třech rozměrech daleko větší než kovalentní uzly. Používáme tedy název spojné nebo uzlové oblasti. Znatelně delší makromolekuly jsou schopné se začlenit do více než jedné uzlové oblasti. To znamená, že se po délce řetězce střídají zapojené části s volnými úseky, zachovávající si ohebnost a tepelný pohyb. Doba, za kterou se jednotlivé uzly spojí je různá, proto je s ní nutné dále počítat. Gely se silnými spoji jsou elastické, podobně jako kovalentní gely. U gelů se slabými spoji je elasticita pozorována pouze při nižších napětích. Pokud se napětí zvyšuje, tak se uzly u gelů se slabými spoji rozpadají a síť zaniká. Jestliže se překročí tzv. statická mez toku, soustava se trvale deformuje a začne se chovat jako kapalina.

Mezi fyzikální uzly patří také “zapleteniny“, které se tvoří projevem přitažlivých sil. Elasticky se struktura chová jen dočasně, za určitou dobu se řetězce rozpletou a vzdalují se od sebe. Jakmile přestane působit elastická síla, nastává relaxace. “Zapleteniny“ vznikají a zanikají za dynamické rovnováhy, roztok se může trvale deformovat v závislosti na charakteristické době relaxace a můžou tak vznikat pseudogely. Pseudogel je sloučenina, která pouze vypadá jako gel. V síti, která má spojně oblasti s dlouhou životností nejdou uzly přeskupovat. Síť není možné ani zdokonalit. Přesto v síti probíhají samovolné reorganizační procesy, při kterých se snižuje Gibbsova energie. Při reorganizačních procesech dochází ke zrání gelu [2].



Obrázek 2 Vznik gelu z lineárního polymeru a uzly sítě [2]

2.2.4 Ireverzibilní gely

Ireverzibilní gely při vysoušení nemění svůj objem, ale jsou porézní. Jsou schopné absorbovat určité množství kapaliny. Ovšem nikdy nevznikne původní hydrogel. Ireverzibilní gely mají omezenou absorpční schopnost na rozdíl od reverzibilních gelů.

2.2.5 Další rozdělení gelů

Gely se dále dělí na organické a anorganické podle chemické povahy pevných částic (disperzního podílu). Podle disperzního prostředí se gely dělí na hydrogely a organogely. Zvláštními gely jsou izogely. Izogely jsou makromolekulární gely, jejichž disperzním prostředím je monomer pevných částic (disperzního podílu) např. polystyren ve styrenu [6].

2.3 Vlastnosti gelů

Gely jsou charakteristické tím, že vykazují vlastnosti viskoelastického tělesa. Gely svým chováním tvoří přechod mezi ideálně kapalným a tuhým tělesem. Pokud je hodnota viskozity viskoelastického materiálu při nízkých smykových rychlostech konstantní, tak má gel vlastnosti kapalných látek. Jestliže se zvyšuje smyková rychlost, tak viskozita viskoelastického materiálu klesá a gel má vlastnosti tuhých látek [7].

Reverzibilní a ireverzibilní gely s fyzikálními spoji mají tixotropní vlastnosti. Jestliže jsou síly, které poutají disperzní částice slabé, je možné zatřepat s gelem a vzniká sol. V solu, který je nechaný v klidu po čase dojde k samovolné gelaci – tixotropie [6].

2.3.1 Stárnutí gelu

U gelů reverzibilních a ireverzibilních časem narůstá množství spojů. Síťovitá struktura se začne smršťovat, část kapaliny, která byla v gelu původně obsažena, vytéká a nastává jev zvaný synereze. Synereze znamená samovolné vytékání kapaliny z gelu, na základě smršťování síťovité struktury během stárnutí gelu [6].

V průběhu stárnutí dochází ke zhoršení mechanických vlastností. Je pozorován nárůst doby potřebné k relaxaci soustavy poté, co byla nějakým způsobem zatížena [8].

2.3.2 Ovlivnění průběhu gelace

Zvýšením teploty, při které v soustavě nedojde k nevratným chemickým změnám, gel nevzniká a roste tepelný pohyb jednotlivých částí. Následkem toho klesá počet i životnost vazeb mezi makromolekulami. Naopak snížení teploty podporuje vytvoření gelu.

Rostoucí koncentrace vždy podporuje gelaci roztoků vysokomolekulárních látek. Čím větší je srážení makromolekul nebo částí, které zvyšují počet vazeb, tvořící se v jednotce objemu gelu. V ředěných roztocích je možná tvorba gelu, jestliže je tvar molekul protáhlý.

pH má vysoký vliv na schopnost gelace vodných roztoků elektrolytů, které jsou vysokomolekulární a amfoterní. Nejlépe gelace probíhá, při hodnotě pH izoelektrického bodu.

Většina gelů vykazuje takzvanou anizotropii, tyto gely jsou v rostlinách a tělech živočichů. Anizotropie je závislá na podmínkách vzniku gelu. Příčinou anizotropie je nerovnoměrná deformace nebo nerovnoměrná objemová koncentrace při vysoušení [4].

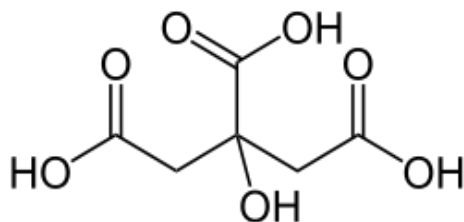
2.4 Kyselina citronová

Kyselina citronová je slabá trikarboxylová hydroxykyselina (obsahuje OH skupinu). Ve velkém množství se vyskytuje v citronech. Může se v menším množství vyskytovat v jiných druzích ovoce, například v rybízu, dále v bramborech a v obilninách. Ve stopovém množství se vyskytuje v mléce a mase.

Při pokojové teplotě, je kyselina citronová bíle zbarvená krystalická látka, může být bezvodá, a také jako monohydrát. Dobře se rozpouští ve vodě, ethanolu, methanolu a v dalších podobných polárních rozpouštědlech. Kyselina citronová zabraňuje tvorbě krystalů ve výrobcích z cukru. Chemické vlastnosti má kyselina citronová totožné s ostatními karboxylovými kyselinami [9]. Kyselina citronová se vyrábí průmyslově nepravou fermentací sacharidů pomocí *Aspergillus niger*, což je plíseň, která při kvašení produkuje právě kyselinu citronovou. Po proběhnutí kvašení je kultura zfiltrována a kyselina se z roztoku vysráží hydroxidem vápenatým. Ze vzniklé soli se potom kyselina citronová získává použitím kyseliny sírové.

Kyselina citronová a její soli mají základní biologické funkce. Například se kyselina citronová vyskytuje jako meziprodukt při Krebsově cyklu (cyklus kyseliny citrónové), který probíhá ve všech živých buňkách [10]. Velké využití má tato kyselina v potravinářství, používá se jako potravinářská přísada, je označena kódem E330. V konzervárenství se používá ke snížení pH, kde působí jako antioxidant. Využívá se také jako stabilizátor ve výrobcích, které obsahují ovoce. Pomocí kyseliny citronové lze vytvořit některé gely [11].

Kyselina citronová a její soli, které mají dobrou afinitu k iontům kovů, se používají v široké škále aplikací: například v nealkoholických nápojích, jako antioxidanty v potravinách, dále jako činidlo pro ionty kovů a jako mořidlo při barvení [10].



Obrázek 3 Vzorec kyseliny citronové

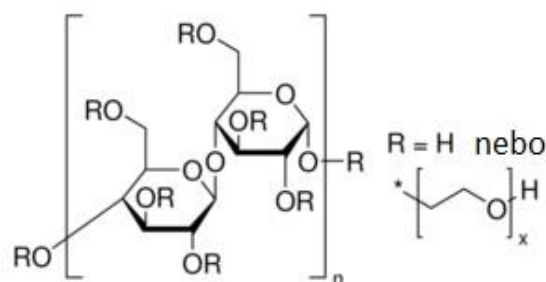
2.5 Hydroxyethylcelulóza

Hydroxyethylcelulóza je nepolární polymer, který má schopnost zahušťovat, vázat, emulgovat, zpevňovat, stabilizovat, vytvářet filmy, dispergovat, poskytovat ochranné koloidní účinky a zadržovat vodu. Hydroxyethylcelulóza se jmenuje podle dvou základních složek: celulóza a hydroxyethylové boční řetězce, viz obrázek 4. Díky těmto řetězcům je možné hydroxyethylcelulózu rozpustit ve vodě.

Při vyrábění hydroxyethylcelulózy reaguje celulóza s hydroxidem sodným a vzniká nabobtnaná alkalická celulóza. Nabobtnaná alkalická celulóza má větší chemickou reaktivitu než čistá celulóza.

Dále alkalická celulóza reaguje s ethylenoxidem a produktem této reakce je hydroxyethylcelulóza. V reakci se atomy vodíku v hydroxylových skupinách celulózy nahrazují hydroxyethylovými. Substituované molekuly na celulozovém řetězci je možno popsat stupněm substituce a molární substitucí. Stupeň substituce určuje průměrný počet hydroxylových pozic na anhydridoglukózové jednotce, která reagovala s ethylenoxidem. Každá anhydridoglukózová jednotka celulózy poskytuje molekule tři hydroxylové skupiny, což je maximum. Molární substituce je průměrný počet ethylenoxidových molekul, jestliže zreagovaly s každou anhydridoglukózovou jednotkou. V okamžiku, kdy se hydroxyethylenová skupina připojí, může hned reagovat s dalšími ethylenoxidovými jednotkami. Reakce teoreticky může pokračovat, pokud je ethylenoxid stále k dispozici.

Hydroxyethylcelulóza má jak už bylo dříve zmíněno schopnost zadržovat obsah vody v přípravcích na požadované úrovni. To umožňuje přípravkům redukovat obsah vody, například ve stavebnictví. Jelikož je hydroxyethylcelulóza nepolární, to znamená, že je stabilní v roztocích s vysokou koncentrací solí. Například v kosmetice je tato vlastnost využívána k zahuštění deodorantů [12].



Obrázek 4 Základní strukturální jednotky hydroxyethylcelulózy [28]

2.6 Hyaluronan (kyselina hyaluronová)

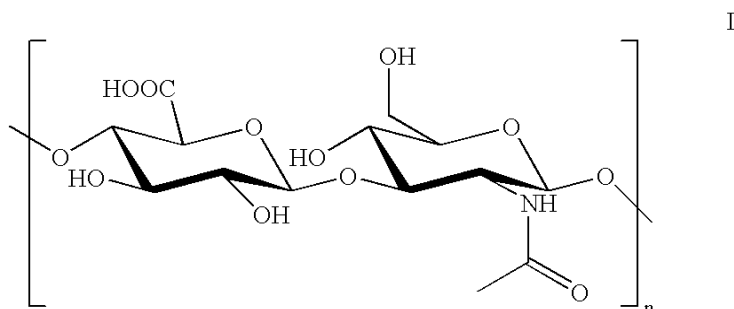
Kyselina hyaluronová se v živých organismech spíše vyskytuje ve formě její sodné a draselné soli. Proto se často využívá výraz hyaluronan. Kyselina hyaluronová byla poprvé izolovaná z hovězího sklivce [27].

Hyaluronan je vysokomolekulární, lineární biopolysacharid, v jehož struktuře se opakovaně vyskytuje disacharidová jednotka. Disacharidová jednotka obsahuje glukuronovou kyselinu a *N*-acetyl-glukosamin. Cukerné kruhy jsou spojeny vazbami β -1,3 a β -1,4 glykosidickými vazbami, viz obrázek 5. V molekule se může vyskytovat přes 10 000 monomerů. Molekulová hmotnost se díky tomu pohybuje kolem 4 MDA, což znamená 400 Da na disacharidovou jednotku. Monomer má délku kolem jednoho nanometru, proto délka řetězce se pohybuje okolo 10 μ m [13, 14, 15, 16].

Hyaluronan je součástí extracelulárních matrix v tkáních a v kůži, dále je hyaluronan součástí sklivce a díky němu se dobře zobrazují objekty na sítnici [17]. Je také součástí chrupavek, napomáhá pohyblivosti kloubů, díky jeho viskoelastické vlastnosti. Hyaluronan je také přítomný v pupeční šňůře a v raných stádiích vývoje embrya [18]

Hyaluronan je hydrofobická látka, tedy je schopná zadržet velké množství vody. Vodný roztok hyaluronanu je viskózní, jeho viskozita závisí na koncentraci roztoku a na molekulové hmotnosti hyaluronanu v roztoku. Hyaluronan se v roztoku chová jako polyaniont [20].

Široké využití má hyaluronan v lékařství. Používá se při hojení popálenin a ran na kůži nebo při diabetických defektech. Hyaluronan se v poraněné ráně štěpí na malé fragmenty, které jsou schopny aktivovat imunitní buňky. Hyaluronan je v ráně také syntetizován a vytváří vlhké prostředí, které v ráně napomáhá hojení a množení buněk. Hojení ran s použitím hyaluronanu je velmi efektivní a ve většině případů bez jizev [21, 22].



Obrázek 5 Základní strukturální jednotky hyaluronanu [29]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Hydrogely na bázi celulózy zesíťované kyselinou citronovou

Demitri a spol. [10] použili pro přípravu hydrogelů dva deriváty celulózy, sodnou sůl karboxymethylcelulózy a hydroxyethylcelulózu. Aby hydrogely na bázi celulózy účinně nabobtnaly, byla nutná přítomnost chemicky zesíťované trojrozměrné sítě. Síť bylo možno připravit následujícími cestami. Esterifikace je jedna z metod, která se provádí s použitím sloučenin formaldehydu. Sloučeniny formaldehydu jsou ovšem toxické, takže je nutné použít jiné, alternativní esterifikační činidla. Hydrogely, které mají absorpční vlastnosti, reagovaly ve vodných roztocích karboxymethylcelulózy a hydroxyethylcelulózy. Hydrogely byly zesíťované síťovacími činidly divinylsulfonem nebo karbodiimidem.

V této studii [10] byla použita kyselina citronová, jako nové síťovací činidlo. Kyselina citronová je levnější a není toxická ve srovnání s jinými činidly, které se dříve používaly. Hydrogely vytvořené pomocí sodné soli karboxymethyl celulózy, hydroxyethylcelulózy a kyseliny citronové byly syntetizovány a charakterizovány pomocí diferenční skenovací kalorimetrie a technikou zvanou infračervená, spektroskopická Fourierova transformace.

Nedávno byla kyselina citronová použita jako síťovací činidlo v různých systémech derivátu celulózy. Například, studie optimálních podmínek pro reakci kukuřičného škrobu a kyseliny citronové za vzniku rezistentního škrobu a studie tepelné stability citrátových výrobků ze škrobu [25].

Koma a jeho kolegové provedli zesíťování hydroxypropyl-methyl celulózy s kyselinou citronovou zahříváním reakčních činidel a určili míru zesíťování, viz obrázek 6 [23]. Podle Zhou a ostatních kolegů má reakce dvě hlavní fáze polyfunkčních karboxylových kyselin s celulózu, ty vzhledem k upevnění polyfunkčních karboxylových kyselin prostřednictvím esterifikace celulózové hydroxylové skupiny produkují příčnou vazbu mezi celulózovými řetězci [24]. Tento mechanismus je založen na střední formaci anhydridu. Skupina karboxylové kyseliny se připevní na celulózu a hydroxylová skupina se připojí přes esterifikační činidlo reakcí prvního cyklického anhydridu. Tím vznikla nová jednotka karboxylové kyseliny v kyselině citronové, která má dobré chemické navázání. Tím lze vytvořit novou intramolekulární anhydridovou skupinu s přilehlou jednotkou karboxylové kyseliny. Další reakce s hydroxylovou celulózu jiného řetězce pak může vést k zesíťování.

Vzorky hydrogelů byly získány reakcí sodné soli karboxymethylcelulózy a hydroxyethylcelulózy s kyselinou citronovou, kde kyselina citronová hraje roli síťovacího činidla. Reakce probíhala ve vodném prostředí podle následujícího postupu. Prvně se celkový polymer (koncentrace 2%) za použití směsi sodné soli karboxymethylcelulózy a hydroxyethylcelulózy (s hmotnostním poměrem 3:1) rozpustil v destilované vodě. Potom se roztok jemně míchal při pokojové teplotě, dokud nebyl roztok čirý. Přítomnost hydroxyethylcelulózy způsobuje spíše mezimolekulární než intramolekulární zesíťování. Ve skutečnosti je účinnost zesíťování špatná, jestliže se použije pouze sodná sůl karboxymethylcelulózy.

Sodná sůl karboxymethylcelulózy se používá kvůli elektrostatickému odpuzování mezi polyelektrolytickými řetězci, a také má vysoký stupeň substituce hydroxylových skupin na uhlíku C6, což je nejvíce reaktivní poloha. Sodná sůl karboxymethylcelulózy se rozpouští pomalu. Tudiž, první hydroxyethylcelulóza se k vodě přidala až po 5 minutách. Tím se získal čirý roztok s mírně zvýšenou viskozitou, pak se přidala sodná sůl karboxymethylcelulózy a roztok se míchal, dokud nevznikl čirý roztok, jehož viskozita se zvýšila výrazně. Nakonec se přidala kyselina citronová v různých koncentracích (1,75%, 2,75%, 3,75%, 10% a 20% w/w polymeru), aby byly získány vzorky s různými stupni zesíťování.

Tyto konečné roztoky byly použity pro výrobu vzorků o velikosti 10 mm. Všechny vzorky se nejprve předsušily při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin za účelem odstranění absorbované vody a pak se udržovaly při teplotě 80 °C po dobu síťovací reakce.

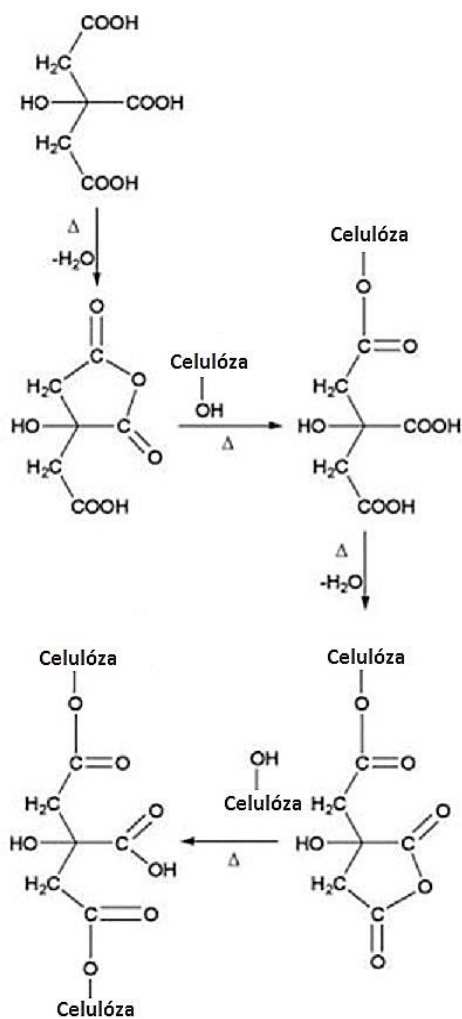
Vzorky obsahující čistou hydroxyethylcelulózu nebo čistou sodnou sůl karboxymethylcelulózy, zesíťované s kyselinou citronovou byly připraveny za stejných experimentálních podmínek. Všechny vzorky byly analyzovány infračervenou, spektroskopickou Fourierovou transformací. Bobtnací poměr se měřil vážením vzorků před a po ponoření do destilované vody po dobu 24 hodin.

Práce ukazuje, že se kyselina citronová může použít jako síťovací činidlo směsí sodné soli karboxymethylcelulózy a hydroxyethylcelulózy. Mechanismus esterifikace vycházel ze střední formace anhydridu. Mechanismus byl navržen k vysvětlení reakce celulózových polymerů s kyselinou citronovou.

Síťovací reakce byla pro směs sodná sůl karboxymethylcelulózy/hydroxyethylcelulózy pozorována diferenční skenovací kalorimetrií, nebo infračervenou spektroskopickou Fourierovou transformací.

Průběh různých síťovacích reakcí byl sledován pomocí spekter z infračervené spektroskopické Fourierovi transformace. Spektra byly získány při různých reakčních časech za přebytku kyseliny citronové. Bobtnací poměr, který byl monitorován v různých reakčních časech, potvrzuje, že reakční cesta byla stanovena z infračervené spektrometrické Fourierovi transformace. Optimální stupeň bobtnání pro praktické aplikace byl dosažen použitím nízkých koncentrací kyseliny citronové. Hydrogel, který se získal pomocí metody, popsané v tomto článku, má mnoho výhod. Výrobní náklady jsou nízké a během jeho syntézy nevzniká žádný toxický meziprodukt.

Další studie mohou být specificky určeny k využití superabsorbentů v zemědělství. V zemědělství je třeba strategicky využít vodu, protože častým problémem je její nedostatek [10].



Obrázek 6 Mechanismus reakce celulózy s kyselinou citronovou [10]

3.2 Vliv kyseliny citronové na zesítnění hydrogelů na bázi celulózy na osteogenní diferenciaci

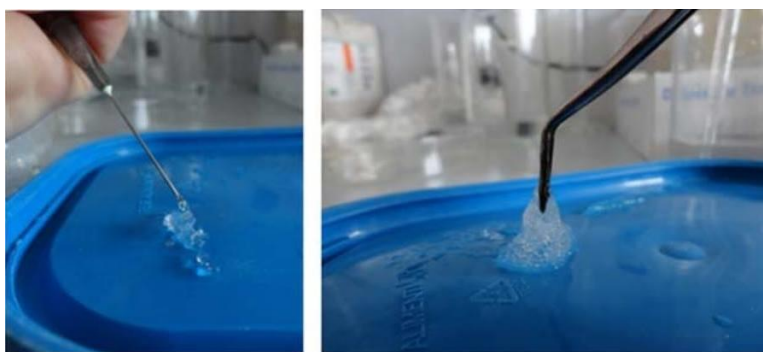
Různé gely byly připraveny k posouzení jejich přiměřených interakcí se zvolenou buněčnou linií. Dva různé deriváty celulózy byly použity k přípravě sodné soli karboxymethylcelulózy a hydroxyethylcelulózy. Karboxymethylcelulóza je derivát celulózy s karboxymethylovými skupinami ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$), které se vážou na některé z hydroxylových skupin vázaných na některé z hydroxylových skupin glukopyranózových monomerů, tvořících páteř celulózy. Tato funkční skupina je zodpovědná za vysokou sorpční kapacitu v důsledku účinku Donnan. Hydroxyethylcelulóza je neiontový polymer, který je schopen vytvořit stabilní síť s nižší sorpční kapacitou. Vzorky byly připraveny pomocí dvojitého esterifikačního síťování za použití kyseliny citronové.

Vzorky hydrogelů byly získány reakcí karboxymethylcelulózy a hydroxyethylcelulózy s kyselinou citronovou (20% w/w na hmotnost polymeru) v destilované vodě. Kyselina citronová zde sloužila jako síťovací činidlo. Celková koncentrace polymeru 2% (na hmotnost vody) byla použita pro dva deriváty celulózy. Deriváty celulózy byly míchány v destilované vodě při laboratorní teplotě, dokud

nevznikl čirý roztok. Tento konečný roztok byl použit pro vytváření vzorků o tloušťce 10 mm. Všechny vzory byly nejprve předsušeny při teplotě 30°C po dobu 24 hodin, za účelem odstranění adsorbované vody a potom byly sušeny při teplotě 80°C po dobu 12 hodin, aby ve vzorcích proběhla síťovací reakce. Po 12 hodinách byla do vzorků zpětně doplněna destilovaná voda, vzorky absorbovaly vodu a nabobtnaly, viz obrázek 7.

Hydrogely z hydroxyethylcelulózy a karboxymethylcelulózy byly porovnávány s čistou hydroxyethylcelulózou a karboxymethylcelulózou, kvůli kontrole pro charakterizaci analýzy. Připravené hydrogely se mohou použít v invazivní chirurgii k opravě defektu kosti.

Kyselinu citronovou lze použít jako funkcionalizované činidlo pro výrobu hydrogelů z hydroxyethylcelulózy a karboxymethylcelulózy. Zesítnění kyselinou citronovou zvyšuje hydrofilnost a drsnost povrchu celulózových hydrogelů, je možné vytvořit dobrý hydrogelový substrát. Hydrogelový substrát může stimulovat osteogenní diferenciaci expresí kostních markerů. Celulózové hydrogely by mohly mít velký potenciál v použití jako plnivo v kostní reparaci a regeneraci [26].



Obrázek 7 Vzorek gelu po zpětném doplnění vody [26]

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Materiály a gelace

4.1.1 Materiály

Kyselina citronová: bezvodá; $M = 192,13$ g/mol; číslo šarže PP/2014/06580; Lach-Ner, s.r.o.

2-Hydroxyethylcelulóza: $M = 250\ 000$ g/mol; číslo šarže 308633-5006; Sigma Aldrich, Co.

Sodium Hyaluronát: 1 500–1 750 kDa; číslo šarže 214-9062; Contipro Biochem s.r.o.

Ultračistá deionizovaná voda: přístroj PURELAB, Option R7/15; ELGA

4.1.2 Gelace hydroxyethylcelulózy

Nejprve bylo naváženo 0,2 g hydroxyethylcelulózy (2 hm. %). Navážka byla zalita 9,8 ml ultračisté deionizované vody. Roztok byl dán na magnetické míchadlo po dobu alespoň 24 hodin. Kyselina citronová měla vždy koncentraci 5%, 10% a 20% (w/w polymeru), kvůli získání různých stupňů zesílení. Kyselina citronová byla přidávána několika různými způsoby, které jsou popsány níže. Dále byly roztoky nality na Petriho misky, vždy 5 ml. Nakonec byly vzorky dávány do sušárny, aby mohla proběhnout síťovací reakce. Vzorky byly sušeny při různých teplotách a v různých časech, viz níže. Na základě poznatků z literatury byla gelována samotná hydroxyethylcelulóza, směsi hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu a hyaluronanu samotného.

Zesílení vzorků při 80°C po dobu 24 hodin

Vzorky byly připravovány celkem ve čtyřech sériích. Jednalo se o 4 postupy gelace, které se navzájem lišily dvěma různými způsoby přidávání kyseliny citronové do roztoku a vzorky byly sušeny otevřenými nebo zavřenými víčky.

V první sérii byla kyselina citronová přidávána do vzorků současně s hydroxyethylcelulózą a obě sloučeniny byly zality 9,8 ml ultračisté deionizované vody. Po 24 hodinách na magnetické míchačce byly vzorky v Petriho miskách sušeny v sušárně při 80°C po dobu 24 hodin se zavřenými víčky.

Ve druhé sérii byla kyselina citronová přidávána stejně jako v první sérii. Vzorky v Petriho miskách byly ovšem sušeny v sušárně při 80°C po dobu 24 hodin s otevřenými víčky.

Ve třetí sérii byla kyselina citronová do vzorků přidávána až po rozpuštění hydroxyethylcelulózy (na magnetické míchačce po dobu 24 hodin). Vzorky v Petriho miskách byly sušeny po dobu 24 hodin v sušárně při 80°C, se zavřenými víčky.

Ve čtvrté sérii byla kyselina citronová do vzorků přidávána stejně jako ve třetí sérii. Vzorky v Petriho miskách byly sušeny při 80°C po dobu 24 hodin s otevřenými víčky.

Zesílení vzorků s předsušením při 30°C po dobu 24 hodin a sušením při 80°C po dobu 24 hodin

Vzorky byly připravovány celkem ve čtyřech sériích. Postup se od předchozího liší tím, že zde bylo nově zavedeno předsušení. Všechny vzorky byly předsušeny v sušárně při 30°C po dobu 24 hodin. Při předsušení se ze vzorků vypařila

absorbovaná voda a díky absorpci lépe probíhala síťovací reakce kyseliny citronové a hydroxyethylcelulózy.

Zesítnění vzorků s předsušením při 30°C po dobu 12 hodin a sušením při 80°C po dobu 12 hodin

Vzorky byly připravovány celkem ve čtyřech sériích. Všechny vzorky byly předsušeny, stejně jako v minulém postupu. Zde byla pouze zkrácena doba předsušení při 30°C z 24 hodin na 12 hodin, a také sušení při 80 °C z 24 hodin na 12 hodin. Doba předsušení i sušení byla zkrácena kvůli zjištění, zda na odpaření absorbované ultračisté deionizované vody a síťovací reakci není potřeba kratší doba než 24 hodin.

Zesítnění vzorků s předsušením při 30°C po dobu 20 hodin a sušením při 80°C po dobu 24 hodin

Vzorky byly připravovány celkem ve čtyřech sériích. Všechny vzorky byly opět předsušeny, ale po jinou dobu než v minulém postupu. Výsledky z předešlého postupu nevyšly dobře, proto bylo předsušení při 30°C zvýšeno alespoň na 20 hodin, také bylo zvýšeno sušení při 80°C zpět na 24 hodin.

Zesítnění vzorků při 30°C do úplného vysušení vzorků

Vzorky byly připravovány celkem ve čtyřech sériích. Bylo zkoušeno vzorky sušit při 30°C, dokud se vzorky plně nevysušily. Cílem bylo zjistit, zda síťovací reakce nebude lépe probíhat při nižší teplotě, ale delší dobu.

V první sérii byla kyselina citronová přidávána do vzorků současně s hydroxyethylcelulózou a obě sloučeniny se zalily 9,8 ml ultračisté deionizované vody. Po 24 hodinách na magnetické míchačce byly vzorky v Petriho miskách dány sušit na 30°C se zavřenými víčky, dokud se vzorky plně nevysušily.

Ve druhé sérii byla kyselina citronová přidávána do vzorků stejně jako v první sérii. Vzorky v Petriho miskách byly ovšem dány sušit s otevřenými víčky, dokud se vzorky plně nevysušily.

Ve třetí sérii byla kyselina citronová do vzorků přidávána až po rozpuštění hydroxyethylcelulózy na magnetické míchačce po dobu 24 hodin. Vzorky v Petriho miskách byly sušeny na 30°C se zavřenými víčky, dokud se vzorky plně nevysušily.

Ve čtvrté sérii byla kyselina citronová do vzorků přidávána stejně jako ve třetí sérii. Vzorky v Petriho miskách byly dány sušit na 30°C s otevřenými víčky, dokud se vzorky plně nevysušily.

Zesítnění vzorků při 50°C po dobu 5 dní

Z výsledků z předchozího postupu bylo rozhodnuto vzorky sušit při konstantní teplotě, pouze s otevřenými víčky a s přidáním kyseliny citronové až po rozpuštění hydroxyethylcelulózy ve vodě.

Vzorky byly připraveny rozpuštěním hydroxyethylcelulózy v 9,8 ml ultračisté deionizované vody na magnetické míchačce po dobu 24 hodin. Poté byla do vzorků přidána kyselina citronová. Vzorky se v Petriho miskách sušily při 50°C s otevřenými víčky.

4.2 Gelace hyaluronanu

Gelace hyaluronanu probíhala celkem ve 3 sériích. Z postupů gelace hydroxyethylcelulózy se ukázalo, že na způsobu přidání kyseliny citronové do roztoku nezáleží. Z tohoto důvodu se u gelace hyaluronanu kyselina citronová přidávala pouze jedním způsobem, a to současně s hyaluronanem a hydroxyethylcelulózou. Všechny vzorky ve všech třech sériích se sušily v otevřených lahvičkách z polyethylenu, viz obrázek 8. Lahvičky z polyethylenu se ukázaly jako lepší reakční nádoby, vzniklé produkty šly z lahviček snadno vyjmout. Produkty se daly na Petriho misku s větším povrchem, než byl povrch produktu, poté se lépe pozorovalo chování produktu při zpětném doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody. Otevřené reakční nádoby, při gelaci hydroxyethylcelulózy, ukázaly daleko lepší výsledky, než zavřené reakční nádoby. Sušení vzorků s otevřenými víčky poskytlo lepšího vysušení vzorků, teplo působilo přímo na roztok vzorku. Vzniklý film po sušení, byl po zpětném doplnění ultračisté deionizované vody, daleko stabilnější než film, který vznikl sušením při zavřených víčkách. Z tohoto důvodu bylo při gelaci hyaluronanu zvoleno předsušení a sušení vzorků pouze s otevřeným víčkem polyethylenové lahvičky.

V první sérii bylo naváženo 0,1 g hyaluronanu a množství kyseliny citronové, v odpovídajících koncentracích – 5%, 10% a 20% (w/w polymeru). Navážka byla doplněna 9,9 ml ultračisté deionizované vody. Roztok byl dán na magnetickou míchačku po dobu 24 hodin, aby se hyaluronan ve vodě rozpustil. Po rozpuštění hyaluronanu ve vodě byl vzorek dán do lahviček, vždy 5 ml. Polyethylenové lahvičky s roztokem byly dány do sušárny, nejprve na předsušení při 30°C po dobu 20 hodin, a poté na sušení při 80°C po dobu 24 hodin. Následně byl do vzorků doplňován 0,5 ml ultračisté deionizované vody.

Ve druhé sérii bylo naváženo 0,3 g hydroxyethylcelulózy, 0,7 g hyaluronanu a množství kyseliny citronové odpovídající koncentracím 5%, 10% a 20% (w/w polymeru). Další postup je totožný s první sérií.

Ve třetí sérii bylo naváženo 0,7 g hydroxyethylcelulózy a 0,3 g hyaluronanu a množství kyseliny citronové odpovídající koncentracím 5%, 10% a 20% (w/w polymeru). Další postup je totožný s postupy v první a druhé sérii.

Byl vyroben ještě jeden srovnávací vzorek pouze s hydroxyethylcelulózou. Nejprve bylo naváženo 0,1 g hydroxyethylcelulózy a množství odpovídající koncentracím 5%, 10% a 20% (w/w polymeru). Dále bylo pokračováno stejným postupem jako ve všech třech sériích.



Obrázek 8 Lahvička z polyethylenu

5 VÝSLEDKY

5.1 Gelace hydroxyethylcelulózy

Na základě poznatků, získaných z literatury [10,26] byl předpokládán průběh síťovací reakce založen na vzniku anhydridu z kyseliny citronové a následné navázání polymeru, v této kapitole pouze hydroxyethylcelulózy. Za správný a úspěšný průběh gelace hydroxyethylcelulózy je považován vznik nerozpustného filmu v ultračisté deionizované vodě.

5.1.1 Zesítnění vzorků při 80°C po dobu 24 hodin

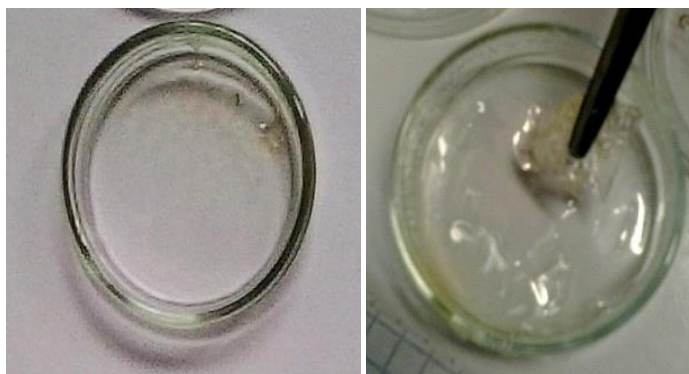
Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

V první a třetí sérii se roztoky kyseliny citronové a hydroxyethylcelulózy sušily se zavřenými víčky a vzorky se plně nevysušily. Po 24 hodinovém sušení vznikly polo vysušené vzorky, které byly vysušené pouze kolem okrajů Petriho misky, uprostřed byl nevysušený, viskózní roztok, viz obrázek 9. Po zpětném doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody vysušené okraje vzorků začaly vodu absorbovat a povrch okrajů zvrásnil. Během 2 minut se vysušené okraje rozpadaly a nakonec se rozpustily. Po necelých 3 minutách měly vzniklé, viskózní roztoky shodný vzhled s roztoky, které se dávaly do sušárny.



Obrázek 9 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Ve druhé a čtvrté sérii se vzorky sušily s otevřenými víčky a plně se vysušily. Ve všech vzorcích se vytvořil film, průhledná či jemně nažloutlá a tuhá vrstva produktu síťovací reakce hydroxyethylcelulózy a kyseliny citronové v Petriho misce, viz obrázek 10 vlevo. Následně po doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se povrch filmu rýhoval a film začal absorbovat ultračistou deionizovanou vodu. V průběhu absorbování ultračisté deionizované vody se film postupně rozpadal, až se opět rozpustil ve viskózní roztok, který měl u všech vzorků stejný vzhled jako před sušením. Na obrázku 10 vpravo je vzorek vyfocen ihned po zpětném doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody, film stále ještě absorbuje a zatím se ještě nerozpadá.



Obrázek 10 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Během gelace vzorků s koncentrací kyseliny citronové 5 % nevznikl ani jeden správně zesíťovaný vzorek. Vzorky sušené se zavřenými víčky se nevysušily v celém svém objemu, ale pouze na okrajích Petriho misky. Důvodem je nejspíše krátký čas na průběh síťovací reakce, během které se nestihla odpařit všechna voda, dalším důvodem jsou také zavřená víčka, která nedaly dobrý průchod tepla přímo do roztoku. V průběhu doplnění ultračisté deionizované vody se vzorek přeměnil za 2 minuty opět na viskózní roztok. Naopak vzorky sušené s otevřenými víčky se plně vysušily za vzniku filmu, ale po zpětném doplnění ultračisté deionizované vody se v rozmezí 3–4 minut postupně rozpustil zpět na viskózní roztok.

Ve vzorcích se objevovalo nažloutlé zbarvení, které je způsobeno naváženou, práškovou hydroxyethylcelulózou, která má žlutou barvu. Dva různé postupy přidávání kyseliny (přidávání kyseliny současně s hydroxyethylcelulózou, přidávání kyseliny až po rozpuštění hydroxyethylcelulózy v ultračisté deionizované vodě) citronové do roztoku neměly na výsledky gelace žádný vliv.

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Ve všech čtyřech sériích se vzorky plně vysušily a vytvořil se film.

V první a třetí sérii byl u vzorků vzniklý film bezbarvý, viz obrázek 11 vlevo. V průběhu zpětného doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se povrch filmu začal vlnit, viz obrázek 11 vpravo. Film postupně absorboval celý objem ultračisté deionizované vody a začal se trhat. Přibližně po 4 minutách se film ve vodě rozpustil a vznikl opět viskózní roztok.



Obrázek 11 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Ve druhé a čtvrté sérii byl u vzorků vzniklý film nažloutlý, viz obrázek 12 vlevo. Během doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se povrch filmu vrásnil, viz obrázek 12 vpravo. Film absorboval všechnu ultračistou deionizovanou vodu a postupně se rozpadal. Po přibližně 4 minutách se film ve vodě rozpustil a opakovaně vznikl viskózní roztok.



Obrázek 12 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

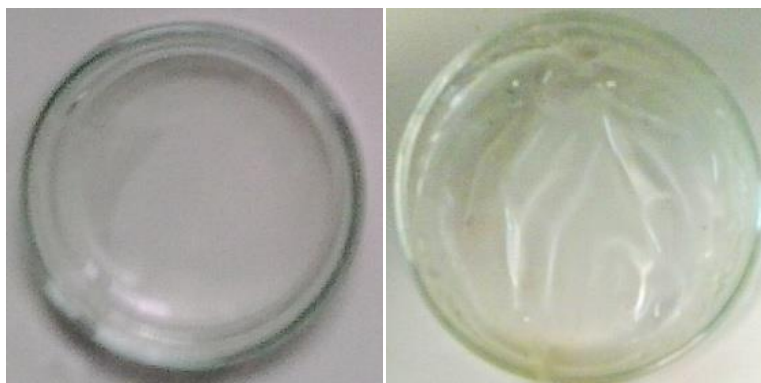
Vzorky s koncentrací kyseliny citronové 10 % nebyly ani v jedné sérii zesíťeny správně. Ve všech vzorcích vznikl film, ale ten se po nejdéle 4 minutách po zpětném doplnění ultračisté deionizované, absorbované vody rozpustil za vzniku viskózního roztoku. Vzorky sušené se zavřenými víčky měli vzniklý film křehčí, film vydržel o minutu kratší dobu nerozpuštěný v ultračisté deionizované vodě oproti vzorkům sušenými se zavřenými víčky. Nepatrně větší stabilita filmu, vzniklého sušením s otevřenými víčky, může být způsobena lepšího prostupu tepla do roztoku a tím lepší průběh síťovací reakce.

Ve vzorcích ve druhé a čtvrté sérii se u vzniklých filmů objevovalo nažloutlé zbarvení, způsobené žlutou barvou, navážené, práškové hydroxyethylcelulózy. Odlišné postupy přidávání kyseliny citronové neměli na výsledky žádný vliv obdobně jako u vzorků s koncentrací kyseliny citronové 5 %.

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Stejně jako u vzorků s kyselinou citronovou o koncentraci 10 % se všechny vzorky plně vysušily a vytvořil se film.

V první sérii byl vytvořený film bezbarvý, viz obrázek 13 vlevo. Po zpětném doplnění ultračisté deionizované vody se povrch filmu začal vrásnit, viz obrázek 13 vpravo. Ultračistá deionizovaná voda začala pomalu prostupovat objemem filmu. Jakmile film absorboval celé množství ultračisté deionizované vody, zahájilo se postupné rozpadání a film se nakonec ve vodě rozpustil. Vzorky při této koncentraci měli nejstabilnější film, který vydržel nerozpuštěný 6 minut. Na obrázku 13 vpravo je patrné nažloutlé zbarvení, může být způsobeno žlutým zbarvením hydroxyethylcelulózy, která je ve vzorku navážená.



Obrázek 13 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Ve druhé a čtvrté sérii se vytvořil nažloutlý film, viz obrázek 14 vlevo. V průběhu doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se na povrchu filmu tvořily vlny, viz obrázek 14 vpravo. Jakmile film absorboval celý 1 ml ultračisté deionizované vody, začal se postupně rozpadat, až se přibližně po 6 minutách rozpustil a vznikl viskózní roztok.



Obrázek 14 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Ačkoliv vzniklé filmy u vzorků s kyselinou citronovou o koncentraci 20 % vydržely nejdéle ze všech koncentrací, nedají se považovat za správně zesítěné produkty síťovací reakce. Vzorky sušené s otevřenými víčky poskytly opět stabilnější film, ale i ten se rozpustil přibližně po 6 minutách, což je stále moc krátká doba na to, aby se film dal považovat za produkt správně proběhnuté síťovací reakce.

U některých vzorků bylo znovu zjevné žluté zbarvení, příčinou je nejspíše žluté barva práškové hydroxyethylcelulózy, která je navážená v roztoku. Různé způsoby přidání kyseliny citronové do roztoku vzorků neměly na výsledky gelace hydroxyethylcelulózy žádný vliv.

Shrnutí:

Sušení při 80°C po dobu 24 hodin je nesprávný postup pro gelaci hydroxyethylcelulózy pomocí kyseliny citronové. U vzorků s koncentrací kyseliny citronové 5% se vzorky v první a třetí sérii vzorky vůbec nevysušily, u ostatních vzorků se vytvořené filmy po zpětném doplnění ultračisté deionizované vody rozpustili během max. 6 minut, což je moc krátká doba na to, aby bylo možné říct, že vzniklé filmy z tohoto postupu jsou produkty síťovací reakce.

5.1.2 Zesítnění vzorků s předsušením při 30°C po dobu 24 hodin a sušením při 80°C po dobu 24 hodin

Po 24 hodinovém předsušení na 30°C se ze vzorků vypařila absorbovaná voda a vzorky byly téměř vysušené. Po sušení se ve všech vzorcích vytvořil film. U vzniklých filmů se někdy objevilo nažloutlé zbarvení, které bylo nejspíše způsobeno žlutou barvou hydroxyethylcelulózy, která byla do vzorků navažována. Žluté zbarvení se spíše objevovalo u filmů, vzniklých sušením při otevřených víčkách, patrně z důvodu lepšího prostupu tepla do roztoku. Na obrázcích jsou vyobrazeny vzorky pouze po zpětném doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody, protože vzniklé filmy po sušení mají vždy téměř stejný vzhled, jako vzorky z předchozího postupu. Výsledky z předchozího postupu ukázaly, že různé způsoby přidávání kyseliny citronové do roztoku nemají na výsledky gelace žádný vliv. Přesto zde byla kyselina přidávána dvěma způsoby, současně s hydroxyethylcelulózou anebo až po rozpuštění hydroxyethylcelulózy ve vodě. Výsledky gelace se ovšem opět nelišily.

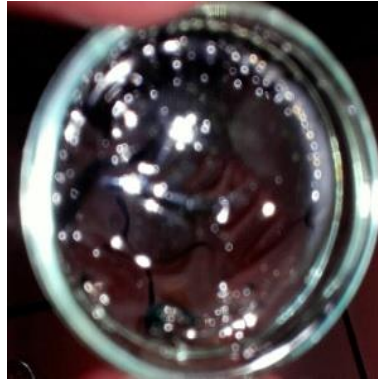
Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

U vzorků v první a třetí sérii se po předsušení vypařila téměř všechna absorbovaná voda a po následném sušení u všech vzorků vytvořil nažloutlý či bezbarvý film. Předsušení mělo na výsledek vzorků pozitivní vliv, protože se na rozdíl od postupu v kapitole 4.1.1 vzorky vysušily v celém svém objemu. Po zpětném doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se povrch filmu začal nejprve vrásnit, viz obrázek 15, poté se veškerý objem ultračisté deionizované vody absorboval a film nabobtnal. Nabobtnalá struktura filmu vydržela po dobu 24 hodin, nakonec všechny vzorky ztuhly zpět na film.



Obrázek 15 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Vzorky ve druhé a čtvrté sérii se během předsušení ze vzorků odpařila všechna absorbovaná voda a po sušení u všech vzorků vznikl převážně nažloutlý film. Po doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody po sušení se povrch filmu začal rýhovat, viz obrázek 16. Jakmile se všechna voda absorbovala do filmu, vznikla nabobtnalá struktura, která vydržela po dobu přibližně 24 hodin, nakonec všechny vzorky postupně ztuhly nazpátky.



Obrázek 16 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Předsušení na 30°C zaznamenalo velké zlepšení při gelaci hydroxyethylcelulózy. Vzorky o poměrně malé koncentraci kyseliny citronové 5 %, dokázaly během předsušení a následném sušení plně vysušit. Vzniklé filmy se ve ultračisté deionizované vodě zpětně nerozpustily, ale zůstaly nabobtnalé po dobu zhruba 24 hodin.

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

V první a třetí sérii se na základě předsušení a sušení vytvořil bezbarvý nebo nažloutlý film. Během doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se povrch filmu začal vrásnit, viz obrázek 17 a film začal celý objem ultračisté deionizované vody absorbovat. Vytvořila se nabobtnalá struktura filmu, která vydržela 24 hodin, nakonec se přeměnila znovu na film.



Obrázek 17 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Ve druhé a čtvrté sérii u vzorků vznikl opět nažloutlý či bezbarvý film. Při zpětném doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se povrch filmu začal vlnit, viz obrázek 18, po absorbování celého objemu ultračisté deionizované vody se vytvořila nabobtnalá struktura filmu. Nabobtnalá struktura vydržela po dobu 24 hodin, potom ztuhla zpátky na film.



Obrázek 18 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Podobně jako u předchozí koncentrace kyseliny citronové ve vzorcích (5 %) i zde mělo předsušení vzorků pozitivní vliv na průběh síťovací reakce. Vzniklé filmy, zpětně doplněné 1 ml ultračisté deionizované vody, vytvořily nabobtnalou strukturu, která vydržela po dobu 24 hodin, poté ztuhla zpět na film.

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Výsledky vzorků s kyselinou citronovou o koncentraci 20 % jsou totožné s výsledky, kde byla kyselina citronová v koncentraci 5 % a 10 %. Všechny vzorky ve všech 4 sériích se po předsušení téměř celé vysušily a po sušení se vytvořil bezbarvý či nažloutlý film. Po zpětném doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody, se zahájilo vrásnění povrchu filmu, poté vznikla nabobtnalá struktura filmu, viz obrázek 19. Po necelých 24 hodinách nabobtnalá struktura filmu ztuhla zpátky na film.



Obrázek 19 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %, po doplnění H₂O

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 % se ukázaly jako nejlepší a dají se považovat za produkty síťovací reakce. Nabobtnalá struktura filmu zde vydržela po nejdelší dobu 24 hodin. Kyselina citronová jako síťovací činidlo je zde ve větším množství než u předchozích koncentrací, proto byly výsledky síťování u koncentrace 20 % lepší v porovnání s ostatními koncentracemi.

Shrnutí:

V postupu bylo nově zavedené předsušení vzorků při 30°C, na základě poznatků z literatury [26] za účelem odstranění absorbované vody. Předsušení mělo na výsledky pozitivní vliv. Absorbovaná voda se vypařila a u vzorků mohla lépe probíhat síťovací reakce při sušení, kde zvýšená teplota působila přímo na hydroxyethylcelulózu a kyselinu citronovou. Nejlepší výsledky přinesly vzorky

s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %, vzniklá nabobtnalá struktura filmu vydržela přibližně 8 hodin, poté se přeměnila zpátky na film.

5.1.3 Zesíťení vzorků s předsušením při 30°C po dobu 12 hodin a sušením při 80°C po dobu 12 hodin

Po 12 hodinách předsušení se ve všech sériích vzorky nevysušily, absorbovaná voda se téměř nevypařila a po 12 hodinách sušení u žádného vzorku nevznikl film, ale pouze polo vysušený, viskózní roztok.

Vzorky v první a třetí sérii po předsušení nebyly vůbec vysušené. Příčinou nevysušení vzorků mohla být zavřená víčka a rovněž krátká doba předsušení. Po 12 hodinách sušení vzorky nebyly plně vysušené, pouze kolem okrajů Petriho misky, a proto se do vzorků ani zpětně nedoplňoval 1 ml ultračisté deionizované vody.

Vzorky ve druhé a čtvrté sérii se po předsušení lehce vysušily, ale velká část objemu vzorku byla stále nevysušená. Nejspíše je to způsobeno tím, že vzorky byly předsušeny a sušeny při otevřených víčkách. Po sušení vzorky nebyly vysušené natolik, aby vznikl film. Ani ve druhé a čtvrté sérii nebyla do vzorků zpětně doplňována ultračistá deionizovaná voda v množství 1 ml.

Shrnutí:

Výsledky ukázaly, že 12 hodin na předsušení a následné sušení, je příliš krátká doba na odpaření absorbované vody, vysušení i vzniku filmu. Výsledky vzorků ve všech koncentracích kyseliny citronové byly velice podobné s výsledky z kapitoly 4.1.1. Z tohoto důvodu se do vzorků zpětně nedoplňovala ultračistá deionizovaná voda, protože by z polo vysušených vzorků vznikl viskózní roztok.

5.1.4 Zesíťení vzorků s předsušením při 30°C po dobu 20 hodin a sušením při 80°C po dobu 24 hodin

Z výsledků z předchozího postupu vyplynulo, že při předsušení na 30°C po dobu 12 hodin a sušení při 80°C také po dobu 12 hodin nevychází dobré výsledky. Ze vzorků se po předsušení nevypařila všechna absorbovaná voda a během sušení u žádného vzorku nevznikl film. Vzorky byly stále polo vysušené. Z důvodu nevysušených vzorků z předchozího postupu se předsušení zvýšilo na 20 hodin a sušení zpět na 24 hodin. Po předsušení se vypařila téměř všechna absorbovaná voda. Po následném sušení se ve všech vzorcích vytvořil film a po zpětném doplnění 1 ml vody se ve vzorcích vytvořila nabobtnalá struktura v celém objemu vzorku, která se po čase opět přeměnila na film. Odlišné způsoby přidávání kyseliny citronové neměly na výsledky žádný vliv.

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Ve vzorcích ve všech 4 sériích byly vzorky po předsušení téměř vysušené, následně se během sušení vytvořil film. Zbarvení vzniklých filmů bylo bezbarvé nebo nažloutlé. Nažloutlé zbarvení filmu mohlo být způsobeno navázkou práškové, žluté hydroxyethylcellulózy nebo sušením vzorků při otevřených víčkách, kde se teplo dostalo přímo k roztoku kyseliny citronové a hydroxyethylcelulózy. Při doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se postupně vrásnil povrch filmu, viz obrázek 20. Jakmile film absorboval všechnu ultračistou deionizovanou vodu, vytvořila se nabobtnalá struktura filmu. Během necelých 24 hodin se nabobtnalá struktura proměnila opět na film.



Obrázek 20 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Ve všech 4 sériích se během předsušení ve vzorcích odpařila absorbovaná voda, téměř v celém svém množství. Po sušení byly vzorky plně vysušené a vznikl bezbarvý či nažloutlý film. Nažloutlé zbarvení bude nejspíše způsobeno ze stejných důvodů uvedených výše. Následně se do vzorků doplnil 1 ml ultračisté deionizované vody, která se postupně vstřebala do filmu za vzniku nabobtnalé struktury filmu, viz obrázek 21. Přibližně po 24 hodinách se nabobtnalá struktura přeměnila zpět na film.



Obrázek 11 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Obdobně jako u vzorků s kyselinou citronovou o koncentraci 5 % a 10 % se ve všech 4 sériích po předsušení vypařila absorbovaná voda téměř v celém svém objemu. Po sušení se vzorky vysušily a vznikl nažloutlý nebo bezbarvý film. Nažloutlé zbarvení některých filmů je opět způsobeno z důvodů uvedených výše. Do vzorků byl následně doplněn 1 ml ultračisté deionizované vody. Ihned po doplnění se povrch filmů začal vrásnit, viz obrázek 22. Jakmile film absorboval veškeré množství ultračisté deionizované vody vytvořila se nabobtnalá struktura filmu, která vydržela zhruba 24 hodin. Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 % přinesly nejstabilnější produkty síťovací reakce hydroxyethylcelulózy s kyselinou citronovou.



Obrázek 22 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Shrnutí:

Výsledky gelace hydroxyethylcelulózy pomocí kyseliny citronové vyšly nejlépe ze všech dosavadních postupů. Vzniklé nabobtnalé struktury vydržely v průměru 12 hodin, nejdéle stabilní byly vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %. Vzniklé produkty se dají považovat za chemicky zesítěné. Jako ideální se jeví předsušení po dobu 20–24 hodin, kdy se vypaří potřebné množství absorbované vody a vzorek je dobře připraven na síťovací reakce při 80°C po dobu 24 hodin.

5.1.5 Zesítnění vzorků při 30°C do úplného vysušení vzorků

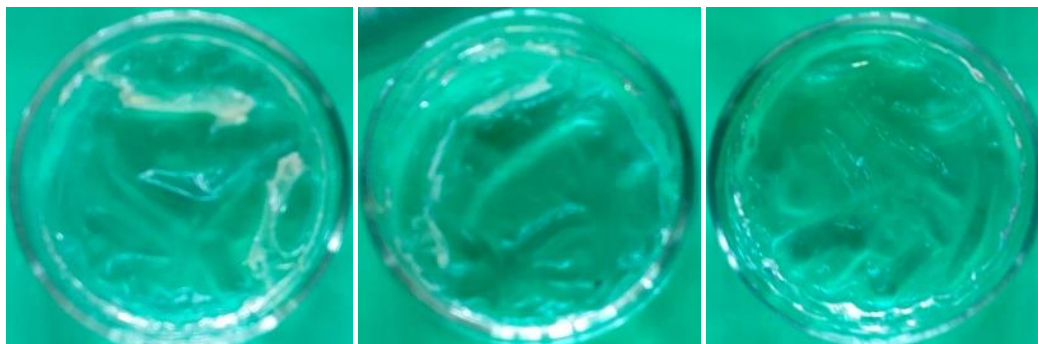
Vzorky byly ve všech sériích sušeny po dobu pěti dnů za konstantní teploty.

V první a třetí sérii se vzorky ani po pěti dnech nevysušily pravděpodobně z důvodu zavřených víček. Teplo neprostupovalo přímo k roztoku hydroxyethylcelulózy a kyseliny citronové. Teplota 30°C byla moc nízká na to, aby se vzorky vysušily i přes zavřená víčka. Proto nebyla do vzorků zpětně doplňovaná ultračistá deionizovaná voda.

Ve druhé a čtvrté sérii se vzorky plně vysušily a vznikl film. V průběhu zpětného doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody se povrch vzorků začal vrásnit, viz obrázek 23. Jakmile film ultračistou deionizovanou vodu absorboval, vytvořila se nabobtnaná struktura. Za přibližně 2–3 hodiny se nabobtnalá struktura proměnila zpět na film. Nejméně stabilní byl vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %. Nejvíce stabilní vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %.

Shrnutí:

Vzniklé produkty se nedají přímo považovat za chemicky zesíťené, ačkoliv se vzorky sušené s otevřenými víčky vysušily za vzniku filmu. Po doplnění ultračisté deionizované vody se z filmu vytvořila nabobtnaná struktura, která ovšem zůstala stálá pouze 2–3 hodiny. Na výsledky neměly žádný vliv odlišné postupy přidávání kyseliny citronové do vzorku. Ve vzorcích se neobjevilo nažloutlé zbarvení vzorků, což může být způsobeno nízkou teplotou sušení.



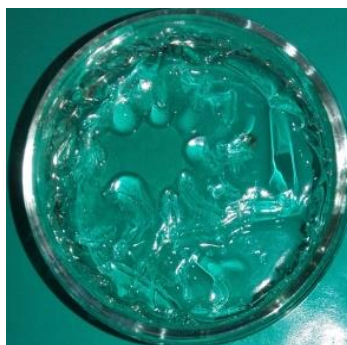
Obrázek 23 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %, 10 a 20%

5.1.6 Zesíťení vzorků při 50°C po dobu 5 dní

Ve všech vzorcích za dobu 5 dnů vznikl film. U některých vzorků se objevilo nažloutlé zbarvení, způsobené naváženou, práškovou hydroxyethylcelulózou, která má žlutou barvu a také přístup tepla přímo na roztok. V tomto postupu byl přidán vzorek navíc, který obsahoval stejné množství hydroxyethylcelulózy a kyseliny citronové, a to 0,2g. Během zpětného doplnění 1 ml ultračisté deionizované vody všechny vzorky absorbovaly ultračistou deionizovanou vodu, za postupného vrásnění povrchu filmu a vzniku nabobtnalé struktury, viz obrázek 24, 25. Nabobtnalá struktura vydržela přibližně 20 hodin, poté ztuhla zpět na film. Pouze vzorek s množstvím kyseliny citronové 0,2 g zůstal v nabobtnané struktuře o pár hodin déle než ve vzorcích s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %, 10 % a 20 %.



Obrázek 24 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %, 10 % a 20 %



Obrázek 25 Vzorek s kyselinou citronovou o hmotnosti 0,2 g

5.2 Gelace hyaluronanu

Na základě poznatků získaných z literatury [10, 26] byl předpokládán průběh síťovací reakce založen za vzniku anhydridu kyseliny citronové a následné navázání polymerů, hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu. Za správný a úspěšný průběh gelace je považován vznik nerozpustného filmu v ultračisté deionizované vodě.

5.2.1 Zestění 0,1 g hyaluronanu

Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Po předsušení na 30°C po dobu zhruba 24 hodin se vzorek v lahvičce téměř celý vysušil. Během sušení, při 80°C po dobu 24 hodin, se ve vzorku vytvořil bezbarvý, tenký film, viz obrázek 26 vlevo. Po doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody se povrch filmu začal rýhovat a postupně rozpouštět, viz obrázek 26 vpravo. Během 2–3 minut se film v ultračisté deionizované vodě rozpustil.

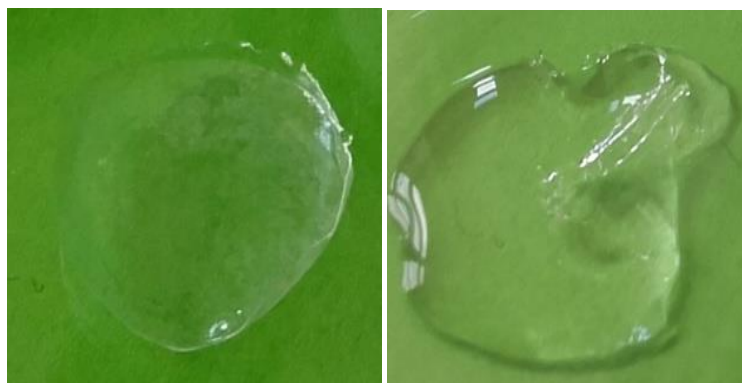


Obrázek 26 Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Neúspěšné zesílení vzorků může být pravděpodobně způsobeno nepřítomností hydroxyethylcelulózy v roztoku, která v kapitole 4.1 při správném postupu byla pomocí kyseliny citronové zesíťovaná. Hyaluronan nejspíše není schopný sám vytvořit gel pomocí kyseliny citronové.

Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Po předsušení se vzorek, podobně jako u vzorků s koncentrací 5 % kyseliny citronové téměř vysušil, během sušení opět vznikl tenký, bezbarvý film, viz obrázek 27 vlevo. Vytvořený film se po zpětném doplnění 0,5 ml ultračisté deioizované vody začal nejprve vrásnit na povrchu a poté se během 3 minut rozpustil, viz obrázek 27 vpravo.

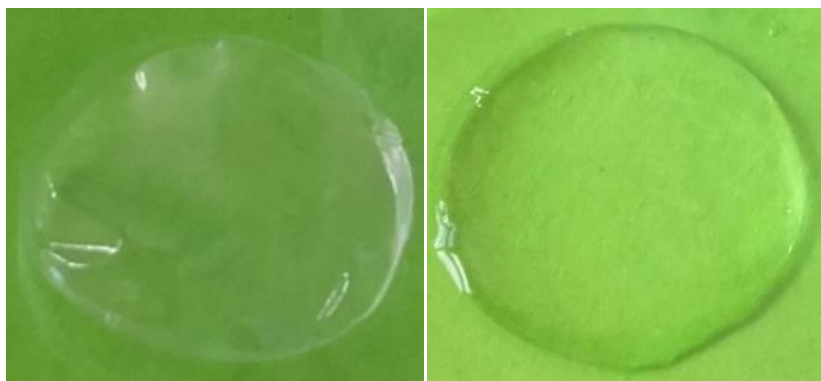


Obrázek 27 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Film se u vzorků rozpouštěl o pár sekund pomaleji než u vzorků s koncentrací kyseliny citronové 5%. Nepatrné pomalejší rozpouštění může být způsobeno větším množstvím kyseliny citronové ve vzorku. Chemicky zesítený produkt stále nevznikl, pravděpodobně kvůli nepřítomnosti hydroxyethylcelulózy v roztoku.

Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Podobně jako u vzorků o koncentracích kyseliny citronové 5 % a 10 % se při předsušení vzorek vysušil skoro v celém svém objemu. Během sušení se znovu vytvořil tenký, bezbarvý film, viz obrázek 28 vlevo. Vytvořený film se po zpětném doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody se během 4–5 minut rozpustil, viz obrázek 28 vpravo.



Obrázek 28 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Rozpuštění filmu v ultračisté deionizované vodě trvalo nejdéle ze všech 3 vzorků, nejspíše z důvodu největšího množství kyseliny citronové v roztoku. Nabobtnaná struktura filmu opět nevznikla.

Shrnutí:

Za chemicky zesítený se nedá považovat ani jeden vzorek. U vzorků po sušení vznikl tenký, bezbarvý film, ovšem po následném doplnění 0,5 ml vody se nevytvořila nabobtnalá struktura filmu, ale film se začal ihned rozpouštět. Ačkoliv byl použit správný postup gelace na základě výsledků z kapitoly 4.1, samotný hyaluronan není možné kyselinou citronovou zesíťovat,

5.2.2 Zesíťování 0,1 g hydroxyethylcelulózy

Síťování hydroxyethylcelulózy bylo při různých postupech podrobně popsáno v kapitole 4.1. Vzorky se při všech koncentracích během předsušení téměř vysušily v celém svém objemu. Po sušení se vytvořil tenký, nažloutlý film, viz obrázek 29. Nažloutlé zbarvení je nejspíše způsobeno žlutým zbarvením, práškové hydroxyethylcelulózy, která byla ve vzorcích použita, také otevřenými víčky lahvíček při sušení.



Obrázek 29 Vorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %, po sušení

Vzniklé filmy u vzorků ve všech třech koncentracích se po doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody nerozpustily. Filmy postupně absorbovaly vodu za vzniku nabobtnalé struktury filmu, viz obrázek 30. Nabobtnalá struktura filmu byla po uchycení pinzetou stabilní a pevná ve všech koncentracích, viz obrázek 31. Nejpevnější a nejstabilnější nabobtnaná struktura filmu vznikla ze vzorku s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %. Po 24 hodinách ztuhla zpátky ve film.



Obrázek 30 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %, 10 % a 20 %, po doplnění H₂O



Obrázek 31 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %, po doplnění H₂O

Shrnutí:

Chemicky zesítené byly vzorky o všech koncentracích kyseliny citronové. Vzniklé filmy se během doplnění ultračisté deionizované vody nerozpustily, ale vznikla nabobtnalá struktura filmu, která až do 24 hodinách ztuhla zpět ve film. Nejstabilnější a nejlépe zesítený byl vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %. Vzorek byl i druhý den lehce nabobtnalý a nebyl zcela ztuhlý zpět ve film.

5.2.3 Zesítení směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v poměru 7:3

Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

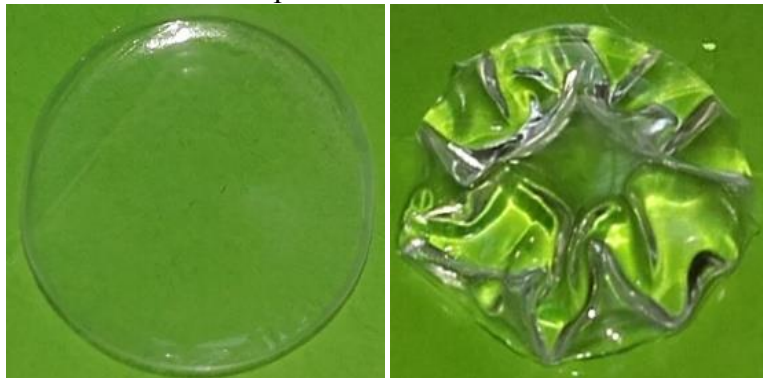
V průběhu předsušení se objem vzorku skoro celý vysušil, následně se během sušení vytvořil tenký, bezbarvý film, viz obrázek 32 vlevo. Přestože byla ve vzorku přítomna hydroxyethylcelulóza, film neměl žluté zbarvení z důvodu většího množství hyaluronanu (0,7 g). Vzniklý film se po doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody nerozpustil, ale ultračistou deionizovanou vodu absorboval, za vytvoření nabobtnalé struktury filmu, viz obrázek 33 vpravo. Nabobtnalá struktura vydržela 6 hodin, poté se film rozpustil.



Obrázek 32 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

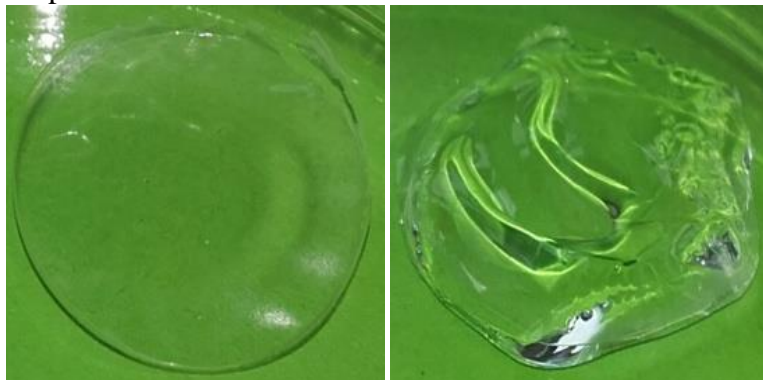
Podobně jako u předchozího vzorku s koncentrací kyseliny citronové 5 % se vzorek během předsušení téměř celý vysušil, po proběhnutí síťovací reakce při sušení se vytvořil tenký, bezbarvý film, viz obrázek 33 vlevo. Po zpětném doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody se u filmu vytvořila nabobtnalá struktura, viz obrázek 33 vpravo. Během 6 hodin se film rozpustil.



Obrázek 33 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Vzorek se po předsušení prakticky celý vysušil a během sušení se vytvořil tenký bezbarvý film, viz obrázek 34 vlevo. Stejně jako u předchozích dvou vzorků s koncentracemi 5 % a 10 %. Po doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody se film nerozpustil a vznikla nabobtnaná struktura filmu, viz obrázek 34 vpravo. Během 6,5 hodin se film rozpustil.



Obrázek 34 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20%

Shrnutí:

Vzorky se nedají považovat za chemicky zesítné. Ačkoliv se vytvořila po zpětném doplnění ultračisté deionizované vody nabobtnaná struktura filmu, tak se nakonec film rozpustil. Příčinou rozpuštění je nejspíše přebytek hyaluronanu ve vzorku a malé množství hydroxyethylcelulózy. Po uchycení nabobtnaných struktur filmů pinzetou byla patrná křehkost a náklonnost k rozpadnutí.

5.2.4 Zesítnění směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v poměru 3:7

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Během předsušení se vypařilo téměř celé množství absorbované vody a po následném sušení se vytvořil tenký, bezbarvý film, viz obrázek 35 vlevo. Stejně jako v předchozím postupu byl vzniklý film bezbarvý a neobjevilo se žluté zbarvení, což může být způsobeno přítomností hyaluronanu v roztoku. Vytvořený film se po doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody nerozpustil a vzniklá nabobtnaná struktura filmu po absorpci ultračisté deionizované vody, viz obrázek 35 uprostřed. Po uchycení vzorků pinzetou byla patrná stálost nabobtnané struktury, viz obrázek 35 vpravo. Nabobtnaná struktura filmu po 24 hodinách opět ztuhla ve film.



Obrázek 35 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 5 %

Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

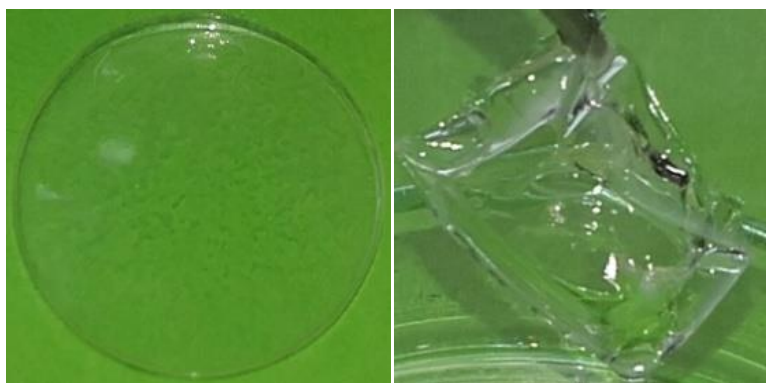
Při předsušení se vzorek prakticky celý vysušil a během sušení se vytvořil tenký, bezbarvý film, viz obrázek 36 vlevo, podobně jako u předchozího vzorku o koncentraci kyseliny citronové 5%. Během zpětného doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody nedošlo k rozpuštění filmu, vznikla nabobtnaná struktura filmu po absorbování ultračisté deionizované vody, viz obrázek 36 vpravo. Při uchycení nabobtnalé struktury filmu pinzetou nebyla patrná náchylnost k rozpadu. Během 24 hodin se vzorek přeměnil opět na film.



Obrázek 36 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 10 %

Vzorky s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Podobně jako u předchozích dvou vzorků o koncentracích kyseliny citronové 5 % a 10 %, byl vzorek po předsušení vysušený a během následného sušení se vytvořil tenký, bezbarvý film, viz obrázek 37 vlevo. Po zpětném doplnění 0,5 ml ultračisté deionizované vody se film nerozpustil a po absorbování ultračisté deionizované vody se vytvořila nabobtnaná struktura filmu, viz obrázek 37 vpravo. Struktura vzorku se nerozpadla ani po uchycení pinzetou. Během 24 hodin nabobtnaná struktura ztuhla zpět na film.



Obrázek 12 Vzorek s kyselinou citronovou o koncentraci 20 %

Shrnutí:

Všechny vzorky se dají považovat za chemicky zesítné. Film, vzniklý po sušení se po doplnění ultračisté deionizované vody nerozpustil, ani po několika hodinách (viz gelace směsi hyaluronanu a hydroxyethyl celulózy v poměru 7:3). Vytvořená nabobtnaná struktura vydržela po dobu 24 hodin a jako nejstabilnější a nejlépe zesítný se jevil vzorek s koncentrací kyseliny citronové 20 %. Směs obsahovala větší množství hydroxyethylcelulózy což může být důvodem správného zesítní vzorků.

6 ZÁVĚR

Na základě poznatků z literatury bylo vymyšleno několik postupů pro gelaci samotné hydroxyethylcelulózy. Pro gelaci směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy byl vybrán postup, při kterém byly všechny vzorky samotné hydroxyethylcelulózy chemicky zesíťené. Za chemicky zesíťené byly považovány vzorky, u kterých se vzniklý film nerozpustil po zpětném doplnění ultračisté deionizované vody.

Z postupů gelace hydroxyethylcelulózy vyplynulo, že je velice důležité předsušení při 30°C po dobu 20–24 hodin. Během předsušení se ze vzorků vypařila absorbovaná voda. Ve vzorku po předsušení tak zůstala pouze rozpuštěná hydroxyethylcelulóza a kyselina citronová, což poskytlo dobré podmínky pro následné sušení při 80°C a průběh síťovací reakce.

Za nejlepší postup bylo vybráno předsušení při 30°C a poté sušení při 80°C po dobu 24 hodin. Vzorky se musely sušit s otevřenými víčky, teplo tak působilo přímo na vzorek, což vedlo k odpaření absorbované vody v celém objemu. Síťovací reakce tak probíhala účinněji.

Za chemicky zesíťené byly považovány vzorky, obsahující samotnou hydroxyethylcelulózu a směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 3:7. V obou případech se vzniklý film v ultračisté deionizované vodě nerozpustil, ale vytvořila se nabobtnalá struktura filmu, která vydržela přibližně 24 hodin, poté ztuhla zpět ve film, ale nerozpustila se. Nejstabilnější byly vzorky s koncentrací kyseliny citronové 20 %, kyselina citronová zde byla v největším množství.

V případě dalších studií by bylo vhodné podrobněji prostudovat samotný průběh síťovací reakce, nejvhodnější teplotu a dobu pro správný produkt síťovací reakce. Dále by bylo vhodné prozkoumat vlastnosti gelů a provést jejich charakterizaci.

7 ZDROJE

- [1] NOVÁK, J.: Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz, Praha: VŠCHT, 2008.
- [2] POUCHLÝ, J.: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. VŠCHT v Praze, 2001
- [3] KAMINSKI, W., TOMCZAK, E. a JAROS, K.: Interactions of metal ions sorbed on chitosan beads desalination. 2008
- [4] BARTOVSKÁ, L. a ŠIŠKOVSKÁ, M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav 4. vyd., Praha: VŠCHT, 2002.
- [5] ALEMÁN, J.; a kol. Definitions of terms relating to the structure and procesing of sols, gels, networks, and norganic - organic hybrid materials., Pure Appl. Chem. 2007
- [6] BARTOVSKÁ, L. a ŠIŠKOVÁ, M.: Co je co v povrchové a koloidní chemii, Praha: VŠCHT, 2005
- [7] NGAH, W.S. Wan a FATINATHAN, S.: Adsorption of Cu(II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan–GLA beads and chitosan–alginate beads. Chemical Engineering Journal, 2008
- [8] CIPELLETTI, L., MANLEY, S.: Cipelletti, L.: Universal Aging Features in the Restructuring of Fractal Colloidal Gels. Phys. Rev. Lett. 2000
- [9] DAVIDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J.: Chemie potravin, 1. vyd. Praha, 1983.
- [10] DEMITRI, XH., SOLE DEL, R. et al.: Novel superabsorbent cellulose - based hydrogels crosslinked with citric acid.
- [11] Státní zdravotnický ústav: Přídavné látky v potravinách [online].
- [12] Hydroxyethyl Cellulose, Dow Chemical Company, USA [online] Dostupné z: http://www.dow.com/assets/attachments/industry/building_construction/Cellosi ze_brochure.pdf
- [13] VANDAME, E., BAETS, DE., STEINBUCHEL S.: Biopolymers – Polysaccharides 1. WileyVCH Verlag GmbH, 2002
- [14] HASCALL, V., LAURENT, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. Glycoforum, 1997
- [15] GIRISH, K., KEMPARAJU, K.: The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. Live Sciences, 2007
- [16] NEČAS, J., BAROŠÍKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLÁŘ, J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): Veterinární medicína, 2008
- [17] SCOTT, J.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. Glycoforum, 1998
- [18] WEIGEL, P.: Bacterial hyaluronan synthases. Glycoforum, 1998
- [19] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol Lett, 2007
- [20] LAPČÍK, L., LAPČÍK, Jr., L. DE SMEDT, S. a spol.: Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. Chemical Reviews, 1998

- [21] Hyiodine, [online] Dostupné z: <http://www.hyiodine.cz/>
- [22] SLAVKOVSKÝ, R., KOHLEROVÁ, R., JIROUTOVÁ, A., a spol.: Effects of hyaluronan and iodine on wound contraction and granulation tissue formation in rat skin wounds. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2009
- [23] COMA, V.; SEBTI, I.; PARDON, P.; PICHAVANT, F. H.; DESCHAMPS, A. *Carbohydr Polym*, 2003
- [24] ZHOU, Y. J.; LUNER, P.; CALUWE, P. *J Appl Polym Sci*, 1995
- [25] XIE, X. S.; LIU, Q.; CUI, S. W. *Food Res Int* 2006
- [26] RAUCCI, M. G., ALVAREZ - PEREZ, C., DEMITRI, C., GIUGLIANO, D., BENEDICTIS, V. De., SANNINO, A., AMBROSIO, L. "Effect of citric acid crosslinking cellulose-based hydrogels on osteogenic differentiation, 2014
- [27] HIRA, M., What Is the Best Way to Use Hyaluronic Acid on the Face, 1999 [online] Dostupné z: http://www.ehow.com/way_5611015_way-use-hyaluronic-acidface_.html
- [28] [online] Dostupné z: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/09368?lang=en®ion=CZ
- [29] [online] Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronic_acid