



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**FÁZOVÁ SEPARACE V SYSTÉMU AMINOJÍL-
BIOPOLYMER**

PHASE SEPARATION IN THE SYSTEM OF AMINOCCLAY-BIOPOLYMER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Plotěná

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1104/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Michaela Plotěná**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Fázová separace v systému aminojíl-biopolymer

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na biomedicínské aplikace aminojílu a způsoby studia.
2. Na základě rešerše vybrat vhodné látky a postupy pro studium komplexu aminojíl-hyaluronan.
3. Připravit a prostudovat dostupnými metodami komplex hyaluronan-aminojíl z hlediska mechanických a strukturních vlastností.
4. Zhodnotit připravený komplex z hlediska použitelnosti v biomedicínských aplikacích.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michaela Plotěná
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Záměrem této diplomové práce bylo prostudovat strukturu a vyhodnotit vlastnosti hydrogelu připraveného interakcí aminojílu s biopolymerem. Ze zástupců biopolymerů byl vybrán hyaluronan sodný o nízké až střední molekulové hmotnosti a polystyrensulfonát sodný. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že fázová separace probíhá pouze při interakci aminojílu s hyaluronanem o střední molekulové hmotnosti (MMW). V experimentální části byly provedeny analýzy tohoto vzorku za účelem zjištění vzniku fázově separovaného hydrogelu při ovlivnění roztoku iontovou silou, zkoumání zániku hydrogelu v různých organických rozpouštědlech, stabilita hydrogelu za extrémních teplotních podmínek, vliv skladování na jeho degradaci, aj. Viskoelastické vlastnosti byly experimentálně prokázány metodou reologie a termickou analýzou byla zjištěna vázaná voda. Inhibice mikroorganismů byla potvrzena pomocí antibakteriálních difúzních testů. Všechny experimenty byly provedeny za účelem uplatnění hydrogelu Aj-HyA (MMW) v oblasti medicínských aplikací, konkrétně pro moderní metodu vlhkého hojení ran kůže.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to study the structure and to evaluate the properties of the hydrogel prepared by the interaction of the aminoclay with the biopolymer. Representatives of the biopolymers were selected from low to medium molecular weight sodium hyaluronate and sodium polystyrenesulfonate. On the basis of the experiments carried out, it was found that phase separation takes place only when the aminoclay interacts with medium molecular weight hyaluronan (MMW). In the experimental part, analyzes of this sample were carried out in order to determine the formation of phase-separated hydrogel by influencing the solution by ionic strength, investigation of hydrogel extinction in various organic solvents, stability of hydrogel under extreme temperature conditions, the effect of storage on its degradation, etc. Viscoelastic properties were experimentally proven by rheology and thermal analysis detected binding water. Inhibition of microorganisms was confirmed by antibacterial diffusion assays. All experiments were carried out for the use of the Aj-HyA hydrogel (MMW) in the field of medical applications, specifically for the modern method of wet wound healing of the skin.

KLÍČOVÁ SLOVA

aminojíl, kyselina hyaluronová, hydrogely, využití v biomedicínských aplikacích

KEYWORDS

aminoclay, hyaluronic acid, hydrogels, use in medical applications

PLOTĚNÁ, M. *Fázová separace v systému aminojíl-biopolymer*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 51 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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 vedoucímu mé diplomové práce, Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za věnovaný čas a odborné vedení. Poděkování patří také Ing. Zuzaně Adamcové za podnětné náměty a připomínky ohledně celé práce. Dále děkuji za přínosnou spolupráci a pomoc Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za předané znalosti v oblasti reologie, Ing. Petře Matouškové Ph.D. za odbornou spolupráci v oblasti biotechnologií, Ing. Jakubu Tkaczovi, Ph.D. a Ing. Jiřímu Másilkovi, Ph.D. za věnovaný čas a v neposlední řadě paní Leoně Kubíkové za trpělivost a čas, který mi věnovala nejen při termogravimetrickém měření.

Speciální poděkování patří mé rodině, bez které by studium nebylo možné. Velice jim děkuji za podporu a trpělivost v průběhu celého mého studia.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Úvodem o jílech	8
2.2 Aminojíl	9
2.3 Hydrogely	11
2.4 Kyselina hyaluronová	12
2.5 Skenovací elektronová mikroskopie	14
2.6 Reologie	15
2.7 Termická analýza	16
2.8 Antimikrobiální testy	17
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	18
3.1 Interakce aminojílu s léčivem či biopolymery	18
3.2 Nanokompozitní komplex aminojílu tvořící hydrogel	20
4 CÍL PRÁCE	23
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
5.1 Chemikálie	24
5.2 Přístroje	25
5.3 Příprava vzorků	25
5.3.1 Příprava aminojílu	25
5.3.2 Příprava vzorků obsahující aminojíl a biopolymer	25
5.3.3 Příprava vzorků pro termická a mechanická měření	26
5.4 Metody charakterizace hydrogelu Aj-HyA	26
5.4.1 Charakterizace struktury hydrogelu pomocí SEM a XRD	26
5.4.2 Studium stability hydrogelu	26
5.4.3 Opracovatelnost hydrogelu	27
5.4.4 Termická a mechanická měření	27
5.4.5 Antimikrobiální testy	28
5.4.6 Fluorescenční test	28
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	29
6.1 Interakce aminojílu s biopolymery	29
6.2 Charakterizace struktury hydrogelu	30
6.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie	30
6.2.2 Rentgenová prášková difrakce	32
6.3 Studium stability hydrogelu Aj-HyA	33
6.3.1 Vliv iontové síly na vznik hydrogelu	33
6.3.2 Stabilita hydrogelu v organických rozpouštědlech	34

6.3.3	Stárnutí hydrogelu	34
6.4	Opracovatelnost hydrogelu	35
6.4.1	Vliv rehydratace	35
6.4.2	Vliv mletí a rehydratace	36
6.4.3	Cyklické mražení a tání	37
6.5	Studium termických a mechanických vlastností	38
6.5.1	Termická analýza	38
6.5.2	Reologická analýza	40
6.5.3	Zkouška pevnosti v tahu	42
6.6	Antimikrobiální testy	43
6.6.1	Fluorescenční vlastnosti hydrogelu	44
7	ZÁVĚR	45
8	LITERATURA	48
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZNAČEK A SYMBOLŮ	54
9.1	Použité zkratky	54
9.2	Použité symboly	55
10	PŘÍLOHY	56

1 ÚVOD

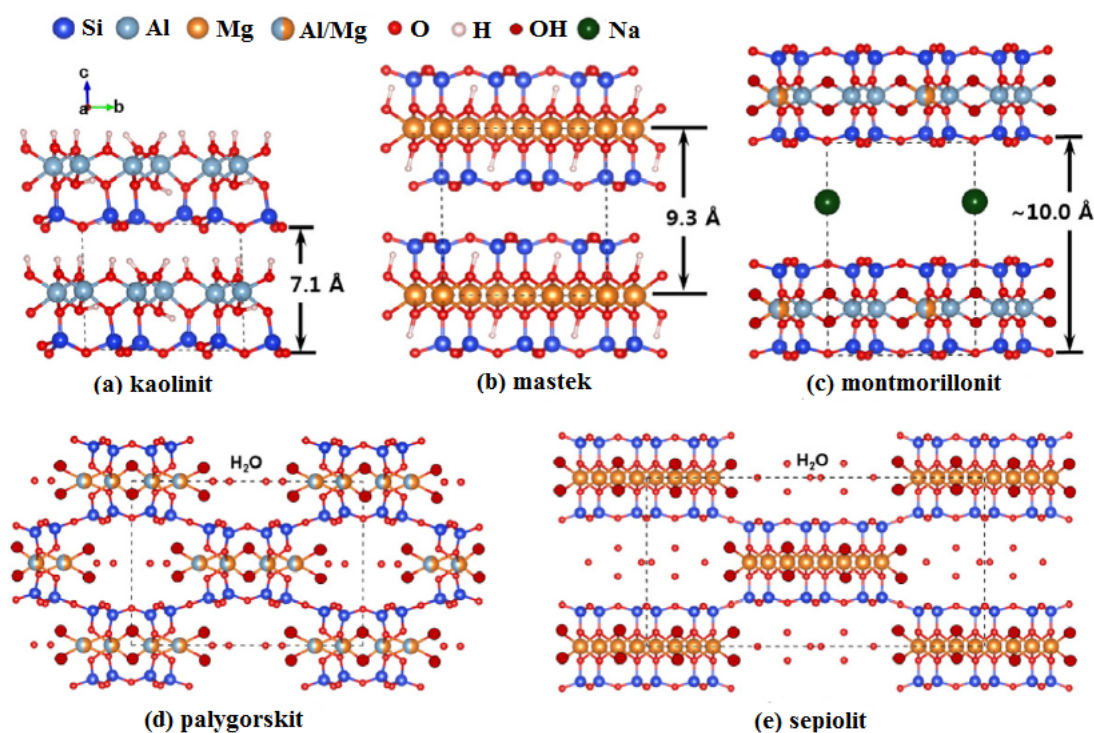
Přírodní jíly a jílové minerály jsou lidmi využívány již od pradávna. Množství způsobů jejich využití přesahuje stovku, avšak jednou z moderních aplikací je jejich využití jako matrice pro léčiva. Pro využití ve farmacii je nutné znát a docílit přesnou čistotu, texturu a hlavně fyzikálně-chemickou identifikaci použitých komponentů. Přírodní jílové minerály vždy obsahují mnoho nečistot, které je potřeba eliminovat, což je často velmi obtížné. Proto se vynakládá velké úsilí připravit tyto látky synteticky [1, 2]. Umělá syntéza umožňuje navázání organické části, kterou lze měnit v závislosti na použitých surovinách. Jedním z nových a velice populárních anorganicko-organických hybridů je tzv. aminojíl, který má na své anorganické matici navázanou 3-aminopropyllovou skupinu. Aminoskupina zajišťuje úplné rozpuštění ve vodě a dále umožňuje homogenní interakci se záporně nabitými biomolekulami či syntetickými polymery. Pomocí takto získaných nanokompozitů je možné připravit fázovou separací různé typy hydrogelů, které jsou velice žádané v medicínských aplikacích (krytí ran, náhrada měkkých tkání, nosiče pro léčivo, aj.) [3]. Perspektivním materiálem pro přípravu hydrogelů je biopolymer hyaluronan, jelikož má významné biologické účinky a žádané vlastnosti [4].

V bakalářské práci kolegyně Anny Procházkové [5] bylo zjištěno, že přidáním roztoku hyaluronanu (MMW) do roztoku aminojílu dochází ke vzniku hydrogelu vláknité struktury. Vzhledem k tomu, že se jedná o zcela nový a neprozkoumaný materiál, byla její práce průkopnickou prvotní studií zaměřenou na charakterizaci výše uvedeného komplexu. V návaznosti na její dosavadní experimenty je předmětem této práce rozšíření a prostudování strukturních a mechanických vlastností hydrogelu Aj-HyA. Poznatky z této práce mohou přispět k dalšímu vývoji na poli hydrogelů využitelných v biomedicínských aplikacích, konkrétně se nabízí využití pro vlhké hojení ran.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Úvodem o jílech

Přírodní jíly a jílové minerály hrají důležitou roli v oblasti stavebních a kosmetických produktů již od starověku. V současné době jsou čím dál častěji používány ve farmaceutickém průmyslu, a to vzhledem ke své biologické kompatibilitě, nízké toxicitě a schopnosti zapouzdřit (interkalovat) biomolekulu či léčivo. Pro schopnost interkalace velkého množství molekul jsou využívány především planární jíly (fylosilikáty). Pro tuto skupinu jílových minerálů je charakteristická porézní, vrstevnatá struktura. Matrice je tvořena oktaedry $[MA_4]^-$, tetraedry $[SiO_4]^-$ a kationty (např. Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , K^+), které kompenzují záporný náboj. Podle typu silikátových vrstev, obsahu mezivrsteví a náboje na vrstvě jsou fylosilikáty rozděleny do skupin. Pro farmaceutické využití je nejčastěji používanou skupinou kaolinit, mastek, montmorillonit, palygorskít a sepiolit Obr.2.1 [3, 6, 7].

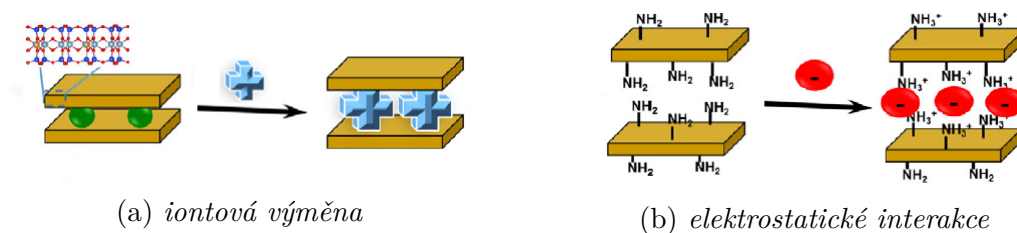


Obrázek 2.1: Nejčastěji používané druhy fylosilikátů ve farmacii [6]

V závislosti na druhu jílu je možné interkalovat do jejich mezivrstevního prostoru různé typy molekul. Ve farmacii se přírodní jíly již využívají pro nosiče léčiv, kde nabízí kontrolované a postupné uvolňování, zlepšenou rozpustnost komplexu ve vodě a dokonce cílené dopravení v organismu. Nezanedbatelnou výhodou jílu pro tuto aplikaci je také to, že jsou ekologicky nezávadné a jsou připraveny z běžně dostupných surovin. Běžně se s jílovými minerály se zapouzdřeným léčivem můžeme setkat, napří-

klad jílový minerál montmorillonit řídí uvolnění léku ibuprofenu. Do struktury jílových minerálů lze místo léčiva navázat i nerozpustné polymery nebo amfifilní organické molekuly a vytvořit tak fázovou separací nanokompozitní hydrogely, které zlepšují výše uvedené požadované vlastnosti [6, 8, 9].

To, jakou vazbou a jak silně se naváže molekula na jílový minerál, je ovlivňováno chemickou strukturou mezivrstev jílu. **Interkalace** do struktury jílu může proběhnout buďto formou **iontové výměny** Obr.2.2a anebo formou **elektrostatické interakce** Obr.2.2b [6].



Obrázek 2.2: Schématické znázornění zapouzdření [6]

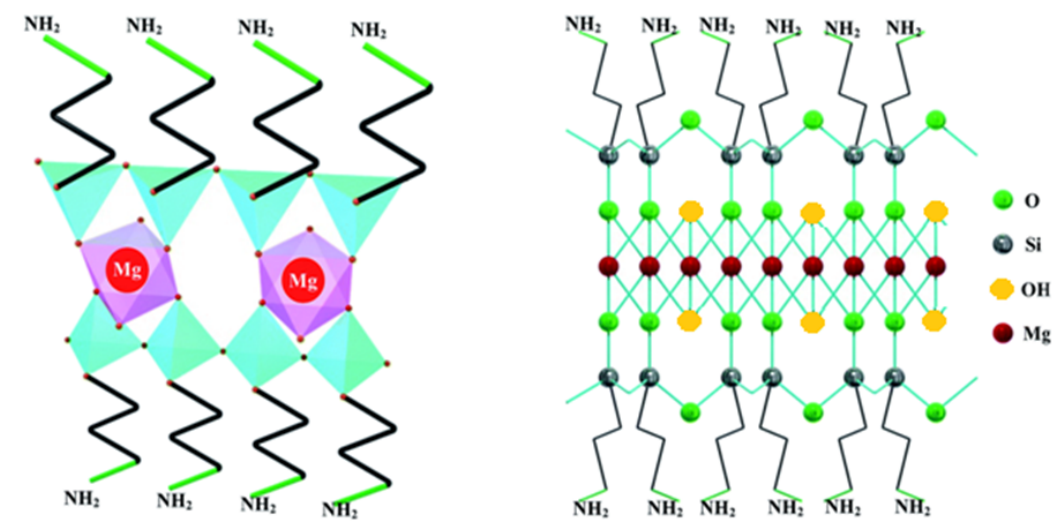
Míru navázání a uvolnění molekuly ovlivňuje jednak druh interkalace, ale především to, zda je použit jíl přírodní či syntetický. Ekonomicky výhodnější je získat analogy přírodních jílu synteticky, tedy uměle, než je obtížně čistit a extrahovat z přírodních formy. Další nevýhodou přírodních jílu je také to, že jejich složení závisí na geologické lokaci a genezi, což může být velkým problémem ve farmacii, kde je nutné znát přesnou čistotu, texturu a hlavně fyzikálně-chemickou identifikaci. Proto se vynakládá velké úsilí co nejjednodušeji synteticky připravit látky imitující anorganickou matici o definovaném složení [2, 6].

Mann [10] syntetizoval a charakterizoval anorganicko-organický hybrid, jehož uspořádaná matrice je stejná jako u přírodních jílových minerálů. Na této matrici je navíc kovalentně ukotvena organická část, kterou lze měnit v závislosti na použitých surovinách.

Pokud je použit jako organický prekurzor 3-aminopropyltriethoxysilan a anorganický prekurzor chlorid hořečnatý, lze syntetizovat aminojíl s hořečnatými kationty [3, 10].

2.2 Aminojíl

Aminojíl (Aj) je hořečnatý vrstevnatý silikát substituovaný aminopropylovými skupinami (Obr. 2.3). Matrice aminojílu se svojí strukturou podobá přírodní formě mastku. Anorganická část obsahuje krystalovou mřížku tvořenou vrstvou oktaedrů a dvěma vnějšími vrstvami tetraedrů. Vnitřní oktaedrický list se skládá z kationtů hořčíku a hydroxylových skupin. Vnější tetraedrické vrstvy jsou tvořené z křemíkových kationtů a kyslíkových aniontů. Na této krystalické mřížce je kovalentně navázaná aminopropylová skupina. Obecný vzorec aminojílu je $R_8Si_8Mg_6(OH)_4$, kde R je $NH_2(CH_2)_3$ [3].



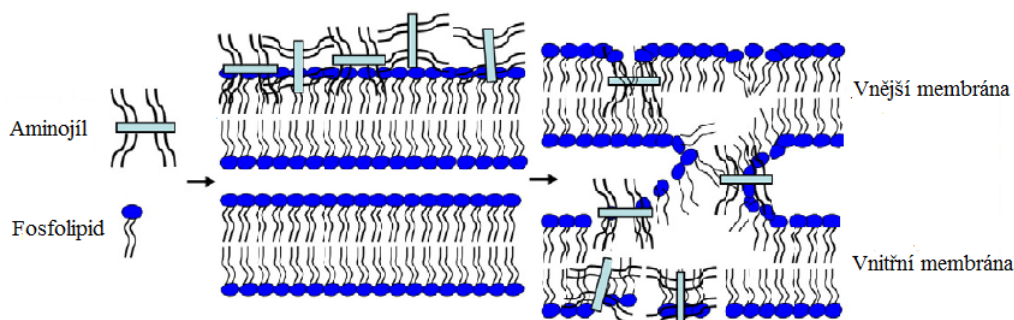
Obrázek 2.3: Struktura aminojílu [11]

Aminojíl je připravován jednoduchou sol-gel metodou při laboratorní teplotě. Do ethanolového roztoku hexahydrátu chloridu hořečnatého je za stálého míchání po kapkách přidáván 3-aminopropyltriethoxysilan. Tento organický prekurzor pomáhá autokatalyzovat reakci díky své zásadité povaze a umožňuje zesíťování anorganického prekurzoru [10]. Tento anorganický prekurzor lze substituovat a do struktury aminojílu vnést různé kationty, např. vápenaté či železité, ale i anionty, např. dusičnané [12].

Důležitou vlastností aminojílu je jeho dispergace ve vodném prostředí. Toto polární rozpouštědlo způsobí protonaci aminoskupin a exfoliaci (rozvrstvení resp. odlupování) organokrystalových vrstev. Destičky aminojílu jsou v této disperzi dlouhé 30–150 nm a široké přibližně 2–4 nm. Díky bazickým aminoskupinám se hodnota pH ve vodném roztoku pohybuje okolo 9,6 a zeta potenciál může dosahovat až +25 mV. Přidáním méně polárního rozpouštědla, jako je ethanol, vyvolává deprotonaci aminoskupin, což vede k jeho opětovnému srážení [3].

Vodný roztok aminojílu vykazuje nízkou toxicitu vůči savcím buňkám, protože nevyvolává buněčnou smrt i při koncentracích kolem $1000 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Bylo však prokázáno, že vykazuje toxicitu vůči některým mikroorganismům, jako jsou bakterie, houby a mikrořasy (např. gram pozitivní bakterie *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*, gram negativní bakterie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* a houbový kmen *Candida albicans*). Buněčnou smrt způsobuje kladná aminopropyllová skupina, která je schopna elektrostaticky interagovat s negativně nabitou lipidovou membránou buňky. Tato interakce naruší permeabilitu membrány, což vede k úniku bakteriálního obsahu a buněčné smrti Obr. 2.4 [13].

Struktura aminojílu byla potvrzena práškovou rentgenovou difrakcí, která dokazuje jeho krystalickou strukturu. Mezirovinná vzdálenost mezi destičkami aminojílu (d_{001}) je 1,6 nm, což odpovídá aminopropyllové skupině směřované do mezivrstevního prostoru. Transmisním elektronovým mikroskopem byla (TEM) prokázána vrstvenatá lamelární struktura [3].



Obrázek 2.4: Působení aminojílu v buněčných membránách mikroorganismů [13]

Hlavní motivací syntézy je využití aminojílu jako matrice ve farmaceutickém a nanobiotechnologickém průmyslu. Pokud je aminojíl rozpuštěn ve vodě, dochází k jeho exfoliaci a protonaci aminových skupin. V této dispergované fázi na něj mohou být navázány negativně nabitě molekuly pomocí fyzikálních či chemických interakcí.

Aminojíl by tedy mohl reálně sloužit jako matrice pro léčivo či biomolekuly, kde by v organismu tento komplex mohl vést ke stabilizaci a ochraně před vnějšími vlivy prostředí. Tato problematika je více rozvedena v kapitole 3.

Aminojíl je velkým přínosem i v dalších aplikačních odvětvích. Může být použit v oblasti výroby katalyzátorů pro stabilizaci kovových nanočástic nebo v oblasti životního prostředí byly provedeny studie na vychytávání nežádoucích kationtů těžkých kovů z půdy. Aminojíl dále dokáže stabilizovat disperzi chromoforů či fluoroforů, což bylo prozatím diskutováno pouze v oblasti diod emitující světlo (LED) nebo UV lamp. Jako templát může sloužit také pro přípravu uhlíkových nanoteček využitelných ve fotokatalýze či mikroelektronice. Jelikož je aminojíl toxický pro mikroorganismy, může být použit pro čištění vody, anebo jako přídatná antimikrobiální složka materiálů využitelných v medicíně. Aminojíl lze také použít pro přípravu hydrogelových nanokompozitů. Tato oblast výzkumu je opět více rozvedena v kapitole 3 [3, 12].

2.3 Hydrogely

Hydrogely jsou nedílnou součástí přírody (např. těla rostlin, bakteriální biofilmy, hydratované složky extracelulární matrix, aj.). Lidstvo používá agar a želatinu pro různé aplikace již dlouho, avšak moderní historii hydrogelů můžeme datovat od roku 1955, kdy Otto Wichterle získal patent na hydrofilní gel zvaný polyHEMA a začala tak éra umělých syntetizovaných hydrogelů určených pro lékařské aplikace [14].

Jako makromolekulární gely označujeme koloidní disperzní soustavu tvořenou disperzním podílem a disperzním prostředím. V případě gelů je disperzní prostředí kapalina a disperzní podíl pevná látka (částice). Částice jsou spolu vázány fyzikálně či chemicky a tvoří trojrozměrnou souvislou síť prostupující celým disperzním prostředím. Tudíž i když je prostředí kapalné, vykazují gely mechanické vlastnosti pevných látek. Vysušením rozpouštědla vzniká xerogel. Opětovné přidání rozpouštědla může způsobit v některých případech botnání xerogelu a je možné gel znovu získat (re-

verzibilní gely). Podle druhu disperzního prostředí gely dělíme na hydrogely, kdy je disperzním prostředím voda a organogely, kdy je rozpouštědlem organická látka [15].

Hydrogely obsahují hydrofilní polární skupiny, mezi které patří hydroxylové ($-OH$), karboxylové ($-COOH$), amidické ($-CONH$) nebo sulfonické ($-SO_3H$) skupiny. Ty váží primárně vázanou vodu pomocí iontových či vodíkových interakcí. Po primární hydrataci dochází k odkrytí hydrofobních skupin, které váží sekundární vodu. Osmotickou silou může být navíc dovnitř hydrogelu vháněna tzv. volně vázaná voda. Díky všem těmto interakcím je hydrogel schopen pojmout až tisícinásobek hmotnosti vody [16].

Pro přípravu hydrogelů se již běžně využívají jak syntetické polymery (polyvinylalkohol (PVA), polyethylenglykol (PEG), polyakryláty), tak i přírodní polymery (agaróza, algináty, kolagen, kyselina hyaluronová, atd.) [17]. Avšak stále větší pozornost se ubírá k nanokompozitním hydrogelům, které kombinují výhody vrstvených jílových minerálů a v nich interkalovaných polymerů či amfifilních organických molekul. Takto připravené hydrogely mají vylepšené vlastnosti. Jsou více mechanicky stabilní, lépe reagují na vnější stimuly, mají větší botnavost a vykazují podle výzkumů tzv. samoregenerační vlastnosti [18].

Design inteligentních hydrogelů je zkoumán mnoho let, ale přesto jsou stále objevovány nové koncepty, které posunují hranice v biomedicínských aplikacích. Je známo, že hydrogely zadržují velký obsah vody, vykazují určitý stupeň flexibility, jsou biokompatibilní a propouštějí malé molekuly. Toho je využíváno pro výrobu kontaktních čoček, obvazových materiálů, katetrů, aj. Inteligentní hydrogely navíc umí reagovat na vnější stimuly. Pokud hydrogel reaguje na specifické molekuly, může být použit jako biosenzor. Hydrogely citlivé na změnu světla, elektrického, magnetického pole nebo tlaku se využívají například pro cílené dávkování léků. Nanokompozitní hydrogely tvořené organojíly s interkalovanými polymery jistě patří mezi inteligentní materiály budoucnosti, protože mohou odstranit dosavadní nedostatky běžně používaných hydrogelů, mezi které patří pomalá doba odezvy na podněty, hystereze spojená se stavy zapnutí a vypnutí nebo změna mechanických vlastností spojená se změnou velikosti hydrogelu [17, 19].

Hydrogely se hojně používají pro vlhký způsob hojení ran, jelikož jsou schopny rehydratovat suchou tkáň a absorbovat nežádoucí sekret. Nabízí tak moderní krycí prostředek, který vytváří optimální prostředí pro zrychlení procesu hojení rány a přináší rychlejší úlevu pro pacienta. Bylo prokázáno, že k hydrataci tkáně a k jejich rychlejšímu hojení napomáhá kyselina hyaluronová [20].

2.4 Kyselina hyaluronová

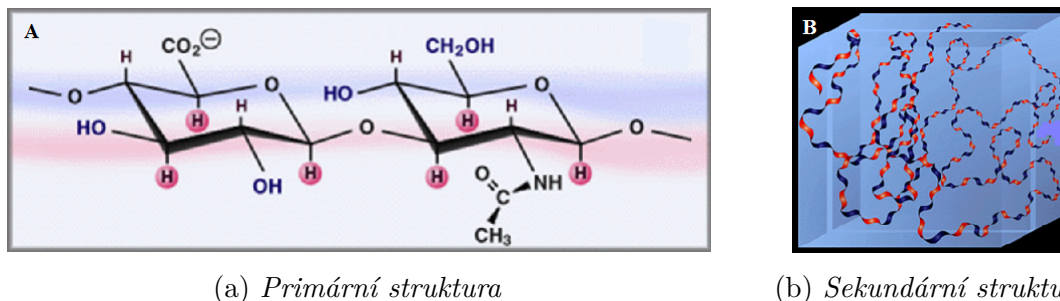
Jednou z prvních složek, která je v místě vzniku rány syntetizována a podporuje její normální hojení, je kyselina hyaluronová (HyA). Další úlohou je hydratace rány, čímž je podporována syntéza dalších složek pojivové tkáně a množení buněk. V organismu se kyselina hyaluronová vyskytuje ve formě polyaniontu jako sodná nebo draselná sůl, proto již v osmdesátých letech minulého století byl přijat dodnes používaný název hyaluronan.

Hyaluronan se nevyskytuje jen v pojivových tkáních. U obratlovců se jednak se může vyskytovat jako vázaná forma v extracelulární matrix, anebo může existovat volně jako humektant (kůže), lubrikant (klouby), látka udržující tvar (oční bulva) nebo jako složka výplňové hmoty (pupeční šňůra) některých orgánů. Jeho unikátní vlastnosti, a s nimi spjatá úloha v organismu, závisí na molekulové hmotnosti. Vysokomolekulární hyaluronan má spíše lubrikační funkci a protizánětlivé vlastnosti, oproti tomu nízkomolekulární má regulační funkci a podporuje zánětlivé procesy v těle. Bylo prokázáno, že čím nižší je molekulová hmotnost, tím vyšší je biologická aktivita. Vysokomolekulární hyaluronan slouží hlavně jako strukturní jednotka, avšak nízkomolekulární má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách [21, 22].

Kyselina hyaluronová je polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Typickým znakem je struktura tvořená z opakujících se disacharidických jednotek. Jedná se o monosacharid kyseliny glukuronové, která je glykosidickou vazbou β 1–3 spojena s dalším monosacharidem N-acetyl-D-glukosaminem. Jednotlivé disacharidické jednotky jsou pospojovány v lineární nevětvený polymer pomocí glykosidických vazeb β 1–4 [23, 24].

Primární struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní, jelikož všechny objemné polární části (karboxylové, hydroxylové) se nacházejí ve stericky výhodnější ekvatoriální poloze. Vodíkové atomy zaujímají méně výhodné axiální pozice, kde v roztoku tvoří nepolární hydrofobní oblast. Disacharidové jednotky v primární struktuře se spojují v lineární řetězec s vysokým stupněm polymerace. Jedna disacharidová jednotka má molekulovou hmotnost okolo 400 Da a její délka dosahuje v průměru téměř 1 nm. Počet takovýchto disacharidových jednotek může v HyA dosáhnout 10 000 a více.

Sekundární struktura je zpevněna primární strukturou disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Hyaluronan je schopen vázat velké množství vody (resp. rozpouštědla), díky četným hydroxylovým skupinám. Tyto hydrofilní oblasti se pravidelně střídají s oblastmi hydrofobními (Obr. 2.5a). Hydrofobní vodíkové oblasti umožňují agregaci s dalším antiparalelním řetězcem hyaluronanu v roztoku. Aby mohla vazba vzniknout, každá disacharidová jednotka se musí potočit o 180° vůči předchozí a následující jednotce. Tímto vzniká dvakrát stočená šroubovice, která ve fyziologickém roztoku tvoří strukturu náhodně stočené stuhly (Obr. 2.5b) [22, 24, 25].



Obrázek 2.5: *Primární struktura HyA s vyznačenými hydrofobními oblastmi a sekundární struktura náhodně stočené HyA ve fyziologickém roztoku [24]*

Díky tomu, že polymerní řetězec hyaluronanu má formu náhodného klubka, které váže velké množství vody, projevují se neobvyklé vlastnosti. První vlastností je proměnlivá difúze látek skrz klubko polymeru. Stuha hyaluronanu je totiž neustále v pohybu a efektivní „póry“ neustále mění svoji velikost. Takže malé molekuly (voda, elektrolyty) i velké makromolekuly difundují s různou pravděpodobností. Druhou unikátní vlastností je vysoká viskozita a elasticita v závislosti na koncentraci roztoku hyaluronanu a jeho molekulové hmotnosti. Další vlastností je změna chování při různém pH. Při pH 7 a vyšší se kyselina hyaluronová vyskytuje ve formě polyaniontu, kolem kterého jsou přidružené kationty pro udržení elektroneutrality. Tato disociovaná karboxylová skupina představuje místo, kam se mohou vázat různé druhy iontů. Tudíž karboxylové, avšak do jisté míry i hydroxylové skupiny, jsou vhodným místem pro modifikaci hyaluronanu [22, 24].

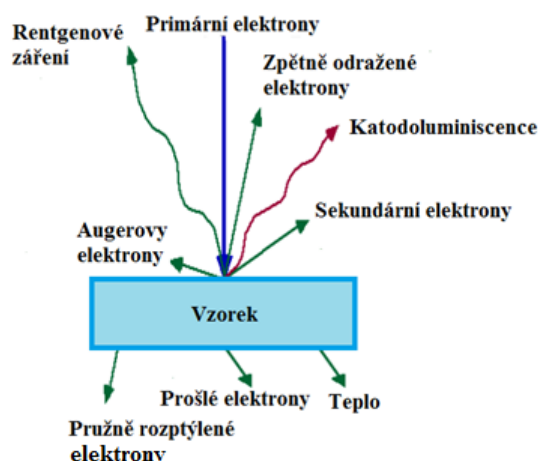
Pro jakékoliv použití je modifikace hyaluronanu nutná, jelikož je hyaluronan zcela odbouratelný v organismu. Hyaluronan se již používá v tkáňovém inženýrství chrupavek, pro hojení špatně hojitelných ran a jizev, pro cílenou distribuci léčiv (existuje afinita HyA k receptorům nádorové tkáně), v očních kapkách a péči o kontaktní čočky, v kosmetice pro výplň vrásek, oftalmologii, atd.

Dříve se hyaluronan extrahoval z různých živočišných zdrojů (synoviální tekutina, pupeční šňůra, kohoutí hřebínky, žraločí chrupavka, aj.). Dnes je však výhodnější fermentace bakterií kmene *Streptococcus* či *Pasteurella*. Po genetické úpravě je takto možné získat hyaluronan o vysokém výtěžku, vysoké molekulové hmotnosti a vysoké čistotě [16, 24].

2.5 Skenovací elektronová mikroskopie

Zdravým okem je možné rozlišit objekty o velikosti nad 0,1 mm. Tuto velikost považujeme za rozlišovací schopnost oka. Pro zobrazení menších předmětů je nutné použít mikroskopických technik, které poskytují obrazy mikrostruktur. Protože mezní rozlišovací schopnost je úměrná vlnové délce použitého záření a elektrony mají podstatně kratší vlnovou délku než fotony, má elektronový mikroskop mnohem vyšší rozlišovací schopnost. Může tudíž dosáhnout mnohem vyššího efektivního zvětšení (až 1 000 000×).

Nejvyužívanějšími základními elektronovými mikroskopy jsou mikroskopy **transmisní** (TEM) a **skenovací** (SEM). V této práci byl použit SEM pro jednoduchou přípravu vzorků a možnosti prvkové analýzy. Princip SEM spočívá v emisi elektronů z wolframové katody, které jsou urychleny kladným napětím na anodě. Tento primární svazek je fokusován elektromagnetickými čočkami a dopadá bod po bodu a řádek po řádku na povrch vzorku. Výsledný obraz se vytváří postupným skenováním. Při dopadu primárních elektronů ze zdroje dochází k interakci se vzorkem. Může docházet k excitaci elektronů vzorku, které se detekují jako sekundární elektrony, může docházet ke zpětnému odrazu, anebo elektrony naopak mohou projít skrz vzorek. Při rekombinaci excitovaných elektronů dochází ke vzniku dalších signálů, například katodoluminiscence a rentgenového záření (Obr. 2.6).



Obrázek 2.6: Interakce primárních elektronů se vzorkem a vzniklé signály detekovány v SEM [26]

TEM využívá k detekci prošlé elektrony. SEM pro zobrazení povrchu nejčastěji využívá sekundární a zpětně odražené elektrony. Ty jsou přijaty detektorem a následně je zpracován výsledný obraz. Podle typu detektoru lze získat informace nejen o povrchové topografii, ale i chemickém složení. Například pomocí energiově disperzního spektrometru (EDS) lze charakterizovat rentgenové záření a zjistit prvkovou analýzu.

Vzorky do SEM mohou být téměř libovolně veliké (pokud je dostatečně velká vakuová komora), avšak musí být elektricky vodivé. U elektricky nevodivých vzorků je nutné jejich naprášení nanovrstvou uhlíku, zlata apod. [26, 27].

2.6 Reologie

Působením vnější síly se mohou různé materiály různě deformovat. Reologie popisuje vztahy mezi silou (resp. napětím) vloženu na těleso a mírou deformace tělesa. Základní teorie popisují ideální materiál. Jednou ze základních teorií je teorie Isaaca Newtona popisující ideální kapaliny. Při definování tohoto zákona je nutné vycházet z představy kapaliny mezi dvěma deskami. Newtonské kapaliny při zvýšení vnější síly (tečné napětí) nemění svoje vlastnosti (zejména dynamickou viskozitu), jelikož veškerou vloženu energii disipují na teplo. Tento Newtonův zákon je dán vztahem:

$$\sigma_{xy} = \eta \cdot \gamma_{xy} \quad (2.1)$$

kde σ_{xy} je smykové napětí, η je dynamická viskozita a γ_{xy} je smyková rychlost. Tečné napětí u newtonovských kapalin je lineárně závislé na smykové rychlosti a dynamická viskozita se nemění.

U nenewtonských tomu tak není a tento vztah neplatí. Viskozita může v závislosti na tečném napětí nebo rychlosti deformace vzrůstat (dilatantní materiály) nebo klesat (pseudoplastické materiály), proto se označuje jako viskozita zdánlivá.

Další ze základní teorie popisující **ideální pevné látky** je teorie Roberta Hooka. Ideální pevné látky se působením vnější síly chovají jako dokonalá pružina. Nedochozí totiž k disipace energie a deformace je tedy dokonale vratná, neboli elastická. Po odlehčení pak pružná deformace zmizí. Hookův zákon je dán tvarem:

$$\delta = G_E \cdot \varepsilon \quad (2.2)$$

kde δ je tečné napětí, ε je relativní prodloužení a konstantou úměrnosti je G_E Youngův (elastický) modul pružnosti.

Reálné materiály však nejsou ideálními modely. Vykazují jak viskózní vlastnosti kapaliny, tak elastické vlastnosti tuhého materiálu, a proto se nazývají viskoelastické. Elastickou složku popisuje tzv. elastický modul G' a viskózní chování popisuje ztrátový modul G'' . Poměr těchto modulů pak vypovídá o míře elastického či viskózního charakteru a nazývá se ztrátový úhel δ . Je-li ztrátový úhel větší než 45° , analyzovaný vzorek se chová spíše jako viskózní kapalina. Pokud by byl ztrátový úhel menší než 45° , vykazuje chování elastického materiálu. Hodnota ztrátového úhlu je dána vztahem:

$$\tan(\delta) = \frac{G'}{G''} \quad (2.3)$$

Mezi viskoelastické materiály řadíme například gely, které se chovají jako kapaliny, i když mají soudržnost pevných látek. Nejjednodušší způsobem jak určit gelový charakter, je umístit materiál pod konstantní napětí a sledovat deformaci v čase. Tento typ testu se nazývá **dynamický** (tokový, tzv. „*creep*“). V praxi je rotační reometr schopen vzorek mechanicky deformovat pomocí dvou desek, kdy je jedna deska ukotvena staticky a druhá se otáčí různou rychlostí a silou. Výstupem měření je toková křivka vyjadřující závislost viskozity na smykové rychlosti.

Druhým typem testu je test **oscilační**. Z tohoto testu lze zjistit bod, kdy se materiál mění z viskoelastické kapaliny na viskoelastickou pevnou látku. Měření opět pobíhá na rotačním reometru, kde je opět dolní deska statická a horní osciluje s různou intenzitou. U tohoto testu je možné nastavit **deformační mód** (tzv. „*strain sweep*“), kdy je frekvence oscilace konstantní a mění se hodnota amplitudy deformace. Ve druhém případě se jedná o frekvenční mód (tzv. „*frequency sweep*“), kdy je konstantní amplituda deformace a mění se oscilace v rozmezí frekvence [28, 29, 30, 31].

2.7 Termická analýza

U termické analýzy se sledují změny fyzikálně chemických vlastností materiálu při ohřevu. Existují různé typy termických analýz, které se rozdělují podle sledovaných vlastností.

Termogravimetrie (TG) je základní metodou termické analýzy. Studuje změny hmotnosti v závislosti na teplotě. Tato závislost je znázorněna termogravimetrickou křivkou. Její derivací získáme DTG křivku, která popisuje rychlost hmotnostní změny v závislosti na teplotě. Druhou nejpoužívanější analýzou je **diferenční termická analýza** (DTA), která měří teplotní rozdíl mezi vzorkem a standardem při ohřevu

či chladnutí. Výsledná křivka vykazuje maxima a minima podle toho, zda se jedná o exotermní či endotermní reakci.

Pokud je sledována entalpie a tepelný tok, jedná se o diferenční skenovací kalorimetrii. Dále mohou být například sledovány rozměry a mechanické vlastnosti, optické vlastnosti, atd. [32].

2.8 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální látky působí proti mikroorganismům, tzn. proti bakteriím, virům, houbám a parazitům. Účinek antimikrobiální látky však může být rozdílný. Pokud látka pouze brání růstu mikroorganismů, nazýváme ji látkou bakteriostatickou. Pokud však dochází i buněčné smrti, jedná se o látky **bakteriocidní**. K testování účinnosti antimikrobiální látky jsou užívány difuzní a diluční metody.

Diluční metody jsou ekonomicky a laboratorně náročnější než testy difuzní. Nenáročná **difúzní metoda** využívá tuhé agarové medium, na které je rovnoměrně nanesen mikroorganismus. Po zaschnutí se na připravené medium nadávkuje určité množství analyzovaného vzorku. Podle způsobu nanášení testované látky se difuzní metoda dělí na jamkovou difuzní metodu a diskovou difuzní metodu. U diskové metody se analyzovaný vzorek dávkuje na tuhé agarové medium, kdežto u jamkové metody se nejprve v agarovém mediu vyhloubí jamka definovaných rozměrů, do které je teprve vzorek napipetován. Poté dochází k difúzi testované látky médiem a antimikrobiální účinek se stanovuje podle velikosti inhibiční zóny kolem analyzovaného vzorku.

Bakterie *Serratia marcescens* (Kmen: *Proteobacteria*, Třída: *Gammaproteobacteria*, Řád: *Enterobacteriales*, Čeleď: *Enterobacteriaceae*, Rod: *Serratia*) se běžně vyskytují v našem okolí (příroda, koupelny domácností, nemocnice). U člověka je však nutné být obezřetný, jelikož tato bakterie vyvolává meningitidu, infekci ran, infekci dýchacích i močových cest, absces plic, aj.

Bakterie *Micrococcus luteus* (Kmen: *Actinobacteria*, Třída: *Actinobacteria*, Řád: *Actinomycetales*, Čeleď: *Micrococcaceae*, Rod: *Micrococcus*) se primárně vyskytuje v pokožce savců. Sekundárně se vyskytuje v mase, půdě a vodě. V přírodě a považuje se za neškodný druh bakterie, avšak u lidí s oslabenou imunitou může vyvolat meningitidu, pneumonii, aj. [33, 34].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jíly a jílové minerály díky dobré biokompatibilitě, vysoké adsorpční schopnosti, chemické inertnosti a mechanické stabilitě podněcují neustálý zájem v oblasti medicínských aplikací. Synteticky připravený aminojíl přitahuje v současné době velkou pozornost, a to díky jednoduché přípravě a zajímavým vlastnostem (dispergace ve vodném prostředí, kde jsou destičky o velikosti v řádu nanometrů, nízká toxicita a mírné antimikrobiální vlastnosti) [3].

Jak již bylo předesláno dříve, aminojíl pro všechny aplikace obecně slouží jako podpurná stabilní matrice pro syntézu různých komplexů, která je schopna zlepšit výsledné vlastnosti kompozitu. V biomedicínské oblasti, kde se aminojíl používá pro zvýšení stability a odolnosti biomolekuly či léčiva, jsou výzkumy v relativně pokročilé fázi. Proto je větší část rešerše věnována právě tomuto tématu. Oblast využití fázově separovaných kompozitů na bázi aminojílu a syntetického polymeru je teprve v začátcích, i když již bylo publikováno několik možností. Doposud však nebyla publikována možnost syntézy hydrogelu pomocí aminojílu a přírodního biopolymeru, což je předmětem této diplomové práce.

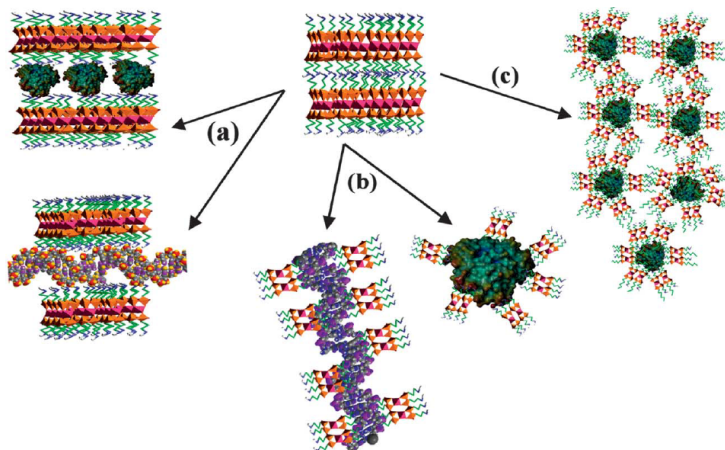
3.1 Interakce aminojílu s léčivem či biopolymery

L. Yang a jeho tým [35] syntetizovali komplex aminojílu a léku telmisartanu (TEL). Samotný lék vykazuje nízkou rozpustnost v závislosti na pH. Při hodnotě pH 1,2 vykazuje TEL plné rozpuštění během patnácti minut, nicméně v rozmezí pH od 4 do 6,8 je uvolňování zanedbatelné. Jelikož se tento lék podává orálně (pro léčení arteriální hypertenze), nedochází v gastrointestinálním traktu k dostatečnému uvolnění. Tento problém vyřešilo navázání TEL na matici aminojílu Aj. Bylo prokázáno, že komplex Aj-TEL vykazuje lepší rozpustnost ve vyšších hodnotách pH. Při hodnotách pH 6,8 (resp. 4,0) došlo k uvolnění 100 % (resp. 75 %) léčiva již po dvou hodinách, avšak při použití samotného telmisartanu došlo k uvolnění zanedbatelně. Důvodem takového zlepšení by mohla být změna pH mikroprostředí a změna krystalinity léčiva. Výsledky tedy ukazují, že komplex aminojílu s léčivem může zvýšit biologickou dostupnost špatně rozpustného léčiva.

Podobná studie probíhala u léku flurbiprofenu (FB), kdy dalším cílem skupiny L. Yanga [36] bylo zlepšení biologické dostupnosti léčiva FB, který je špatně rozpustný ve vodě. Obecně se odhaduje, že 40 % až 70 % všech nových chemických komplexů s léčivy, vykazují nedostatečnou rozpustnost ve vodě, což vede k omezené rozpustnosti a špatné absorpci léku. Proto existuje neustálá potřeba efektivních nosičů, které budou zlepšovat biologickou dostupnost špatně rozpustných léčiv. Ve studii bylo prokázáno, že z komplexu aminojíl-flurbiprofen bylo rozpuštěno po třiceti minutách více než 60 % léčiva a celé rozpuštění ve vodě proběhlo v průběhu dvou hodin. Za kyselých podmínek (tj. pH 1,2) komplex FB-AJ zvýšil rozpuštění FB až o 47,1 % během jedné hodiny, což je třikrát vyšší než u neupraveného FB.

U kurkuminu (Cur) bylo prokázáno, že inhibuje buněčné přežití nádorových buněk a podporuje jejich apoptózu bez rozvoje vedlejších účinků. Avšak extrémně nízká rozpustnost ve vodě a špatná biologická dostupnost představují hlavní překážky k lékařské aplikaci. **S. Wang** a jeho tým [37] představili jednoduchou přípravu komplexu aminojíl-kurkumin, jehož cílem bylo zlepšit rozpustnost, stabilitu a biologickou dostupnost Cur. V porovnání s volným Cur, komplex s AJ se snadno disperguje ve vodném prostředí a zvyšuje stabilitu léčiva v alkalickém prostředí. Co je důležitější, Aj-Cur byl relativně účinnější než volný Cur proti různým rakovinám buněčné linie v důsledku zvýšené rozpustnosti, stability a buněčného příjmu. Tedy, výsledky prokázaly, že Aj-Cur může být potenciálním lékem pro léčbu různých zhoubných nádorů.

Na exfoliovaný aminojíl lze navázat nejen záporně nabitě molekuly léčiva, ale i biomolekuly jako je například DNA, hemoglobin či enzymy (glukóza oxidáza) [3]. Interkalace biomolekul do struktury může být různá a tím pádem vznikají různé typy struktur nanokompozitů, viz obr. 3.1.

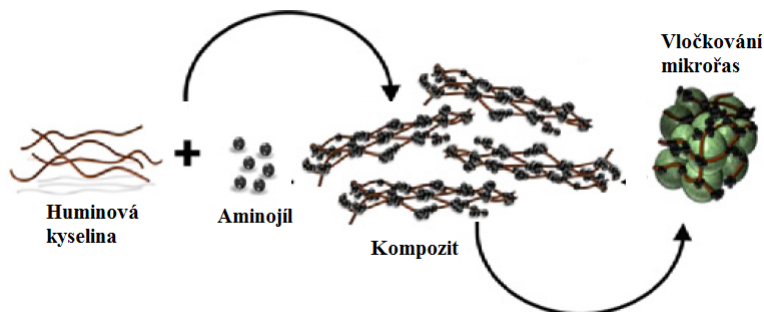


Obrázek 3.1: Příprava bionanokompozitů: (a) vmezeření proteinů či DNA do struktury aminojílu, (b) obalování jednotlivých záporně nabitých biopolymerů či klastrů, (c) syntéza částečně uspořádaných nadstruktur [3]

Tým **Avinashe J. Patila** [38] se věnoval zapouzdření šroubovice DNA do vrstev aminojílu. Jejich výsledky potvrzují, že aminojíl je užitečný prostředek pro posílení chemické, tepelné a mechanické stability izolované molekuly DNA, popř. více jejích souborů. Takové funkční komponenty by měly zvýšit potenciál v nanobiotechnologiích a v odvětví neviróvé genové transfekce. Komplex Aj-DNA může být připraven klasicky rozpuštěním aminojílu ve vodě a přidáním biomolekuly, anebo pomocí frakcionace gelovou chromatografií, kdy každá z metod vede k odlišnému typu komplexu.

Aminojíl se v další studii přidával v různých koncentracích k modelovému proteinu albuminu (BSA), aby zvýšil stabilitu při lyofilizaci. Různými analytickými metodami bylo prokázáno, že je aminojíl schopen udržet strukturální stabilitu BSA v průběhu procesu i při skladování. Kromě toho, aminojíl vykazoval větší ochranný účinek na agregaci proteinu ve srovnání s běžnými sacharidy. Tyto výsledky naznačují, že by aminojíl mohl být použit jako alternativní stabilizátor pro proteiny při sušení mrazem [39].

Young-Chu Lee [40] syntetizoval kompozit interakcí aminojílu s huminovou kyselinou pro vychytávání olejnatých mikrořas, které slouží k výrobě bionafty (Obr. 3.2).

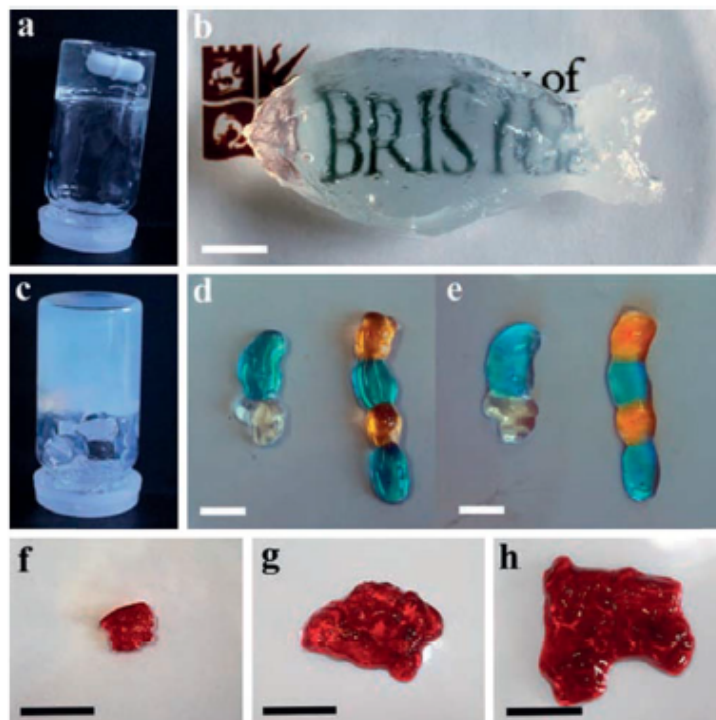


Obrázek 3.2: Interakce aminojílu s huminovou kyselinou tvořící kompozit pro vychytávání mikrořas [40]

3.2 Nanokompozitní komplex aminojílu tvořící hydrogel

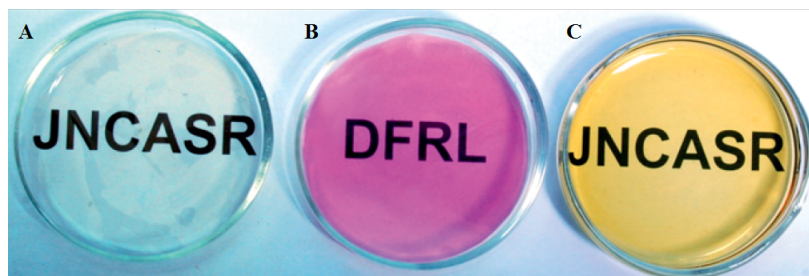
Tým J. E. Martina [41] připravil nanokompozitní, nekovalentně zesíťovaný hydrogel pomocí aminojílu a polyvinylpyrrolidonu (PVP). Do vodného roztoku PVP byl v pevném skupenství přidán aminojíl. Nejprve se vytvořila čirá viskózní disperze a během 3–5 dnů došlo při laboratorní teplotě k samovolné tvorbě transparentního hydrogelu (Obr. 3.3a). Při zvýšení obsahu aminojílu došlo ke snížení doby vzniku hydrogelu a vzrostla jeho tuhost. Hydrogel bylo možné vylisovat do požadovaného tvaru (obr. 3.3b) a vykazoval stabilitu ve vodě i v organických rozpouštědlech (tetrahydrofuran, aj.).

Byl také připraven hydrogel obsahující ibuprofen (PVP-Aj-Ibu). Tvorba gelu byla pozorována téměř ihned, hydrogel byl tužší a méně transparentní než vzorky neobsahující ibuprofen (obr. 3.3c). Zajímavý je fakt, že čerstvě nařezané kusy hydrogelu PVP-Aj a PVP-Aj-Ibu se při styku opět spojily. Tato, podle autorů tzv. samoregenerační schopnost, se však vytrácela se stárnutím vzorků (více než 15 dnů u kompozitu PVP-Aj-Ibu a více než 24 dnů u kompozitu PVP-Aj). Jednotlivé kusy bylo možné zabarvit methylenovou modří a oranží 2. Po opětovném spojení začala probíhat pomalá difúze barviva přes hranici segmentů (obr. 3.3d, obr. 3.3e). Oba typy hydrogelů (PVP-Aj i PVP-Aj-Ibu) lze vysušit a rehydratovat. Absorpce rozpouštědla a objemová expanze je výrazná (obr. 3.3f a 3.3h). Nanokompozitní hydrogel byl analyzován pomocí FTIR spektroskopie, práškové rentgenové difrakce a reologického měření.



Obrázek 3.3: (a) *Hydrogel PVP-AJ*, (b) *Tvarování hydrogelu PVP-AJ (měřítko 1 cm)*, (c) *komplex PVP-AJ-Ibu*, (d) *přilnavost hydrogelů bezprostředně po kontaktu a (e) po 3 h (měřítko 1 cm)*, (f-h) *rehydratace hydrogelu PVP-AJ po (f) 0, (g) 24 a (h) 72 hodinách (měřítko 2 cm)* [41]

Jelikož přírodní jílové minerály např. smektit, kaolinit či bentonit jsou omezeně rozpustné ve vodě, při interakci syntetickými polymery dochází k nehomogennímu smíchání. To vede ke snížení plasticity kompozitu při vysokých zátěžích a možnosti prasknutí. Proto tým **G. Johnsyho** [42] použil aminojíl, který je zcela dispergovatelný ve vodě a tudíž dochází k homogennímu síťování s polyvinylalkoholem (PVA). Takto byl vytvořen nanokompozitní transparentní film (obr 10A), který výrazně zlepšoval výsledné vlastnosti kompozitu. Nanokompozit Aj-PVA vykazoval vyšší pevnost v tahu (48 MPa) než samotný PVA (35 MPa) a vyšší mezní napětí (200 %) oproti komplexu přírodního jílu s PVA (100 %). Tyto mechanické vlastnosti se ještě zlepšily po přidání nanočástic zlata (Obr. 3.4b) a stříbra (Obr. 3.4c). Struktura inkorporovaných částic byla prokázána rentgenovou práškovou difrakcí, skenovací elektronovou mikroskopií a infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací. Dále byly zjištěny bariérové vlastnosti vůči kyslíku, kdy se rychlost přenosu kyslíku snižovala se vzrůstajícím podílem aminojílu v komplexu Aj-PVA. Další výhodou je antimikrobiální účinek (markantnější přidávkem nanočástic kovů), který spolu se zmíněnými mechanickými a bariérovými vlastnosti nabízí komplexu Aj-PVA mnoho potenciálních aplikací, například v inteligentních obalových materiálech určených nejen pro potravinářský průmysl.



Obrázek 3.4: Zleva: (a) nanokompozitní film Aj-PVA, (b) Aj-PVA s přidavkem zlatých nanočástic a (c) s přidavkem stříbrných nanočástic [41]

Dále byly zkoumány hydrogelové komplexy s aminojílem, které vykazovaly luminescenční vlastnosti. Aminojíl byl použit jako matrice poutající fluorofory, u kterých tak nedocházelo k fluorescenčnímu zhášení a dokonce zvyšoval kvantový výtěžek fluorescence. Aminojíl lze modifikovat třemi způsoby. První možností je modifikace přímo struktury aminojílu zavedením chelatovaného těžkého kovu. Druhou možností je navázání fluorescenční látky na povrch aminojílu a třetí možností je interakce aminojílu s uhlíkovými nanotečkami. Aplikační zájem je však prozatím směřován k UV lampám emitující bílé světlo a LED diodám, u kterých je možné ladit barevnost luminescence [43, 44]. Touto problematikou se podrobněji zabývá Bc. Anna Procházková ve své diplomové práci „Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu aminojílů“ [45].

4 CÍL PRÁCE

V předchozí práci mé kolegyně pojednávající o interakci aminojílů s polyelektrolyty přírodního původu [5] bylo zmíněno, že smísením roztoku aminojílu s roztokem hyaluronanu (MMW) vzniká po protřepání relativně pevný hydrogel vláknitého charakteru. Tento hydrogel vzniká elektrostatickou interakcí a následnou fázovou separací z roztoku. V práci byly stanoveny koncentrační a objemové poměry roztoků aminojílu a hyaluronanu sodného, které vedly ke vzniku sraženiny. Po vizuální stránce celistvá sraženina vzniká pouze v případě, je-li hyaluronan přidáván do roztoku aminojílu postupně a v daných objemech. Naopak jednorázovým přidáním roztoku hyaluronanu do roztoku aminojílu vznikají rozbalené sraženiny (zejména při použití více koncentrovaného roztoku HyA). Pomocí optického mikroskopu byla potvrzena vláknitá struktura Aj-HyA. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) prokázala, že hydrogel obsahuje jak hyaluronan, tak i aminojíl (nedošlo pouze k samovolnému shluknutí HyA) a nakonec reologickým měřením viskoelastivity byl prokázán gelový charakter sraženiny Aj-HyA.

Cílem mé práce je ověřit strukturu a prostudovat vlastnosti vláknitého hydrogelu Aj-HyA (MMW). Dále jsem se zaměřila na interakci aminojílu s nízkomolekulárním hyaluronanem sodným a polystyrensulfonátem sodným.

Rešeršní část mé práce byla zaměřena na dosavadní publikované informace z oblasti využití aminojílu, popřípadě vytvořeného nanokompozitu se syntetickým polymerem, v medicínských aplikacích.

Z publikací vyplývá, že pro zjištění strukturní charakterizace se využívá elektronové mikroskopie, rentgenové práškové difrakce a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Pro zjištění základních viskoelastických vlastností hydrogelů se používá metoda reologie. Pomocí termogravimetrického měření je pak zjišťován obsah vody a sušiny hydrogelů. Pro tuto diplomovou práci jsem všechny vyjmenované metody prakticky použila, a to na Fakultě chemické VUT v Brně. Jelikož je aplikační potenciál hydrogelu Aj-HyA zaměřen na oblast medicínských aplikací, z rešerší vyplývá, že je třeba zjistit zejména antibakteriální, rehydratační a tzv. samoregenerační vlastnosti. Dále je důležité determinovat chování hydrogelu ve fyziologickém roztoku nebo za extrémních teplotních podmínek. Z vyhodnocených výsledků této práce bude na závěr zhodnocen aplikační potenciál hydrogelu Aj-HyA pro zmíněnou medicínskou oblast, konkrétně se nabízí použití pro vlhké krytí ran.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Chemikálie

Příprava aminojílu

3-aminopropyltriethoxysilan	CAS: 919-30-2, Sigma Aldrich, šarže 612108-00-0
Hexahydrát chloridu hořečnatého	CAS: 7791-18-6, Lachner, šarže PP/2012/11656
Ethylalkohol 96 % p.a	Lachner, šarže 220313

Příprava hydrogelu

Hyaluronan sodný	LMW HyA, Mw = 450 kDa, Contipro, šarže 208-125 MMW HyA, Mw = 850 kDa, Contipro, šarže 211-7794
Polystyren sulfonát sodný	CAS: 25704-18-1, Sigma – Aldrich, šarže 434574-100G
Chlorid sodný	CAS: 7647-14-5, Penta, šarže 210621616

Organická rozpouštědla

Amoniak	I. č. 007-001-01-2, Penta, šarže 2106210616
Kyselina octová	CAS: 64-19-7, Lachner, PP/2011/07485
Toluen	I. č. 601-021-00-3, Penta, šarže 2103100316
Chloroform	I. č. 602-006-00-4, Penta, šarže 2008060815
Dichlormethan	I. č. 602-004-00-2, Penta, šarže 2109010916
Isopropylalkohol	I. č. 603-117-00-0, Penta, šarže 171116112
Methanol	CAS: 67-56-1, Lachner, 20038-AT0
Ethylenglykol	Lachema
Methyl terc-butylether	CAS: 1634-04-4, Lachner, I.č. 603-181-00-x
Aceton	I. č. 606-001-00-8, Penta, šarže 1902110216
Dimethylsulfoxid	CAS: 67-68-5, Penta, šarže 1909150914
N,N-dimethylformamid	CAS: 68-12-2, Sigma – Aldrich, šarže 33120-2,5-R
Tetrahydrofuran	CAS: 109-99-9, Lachner, I.č. 603-025-00-0
Ethanol laboratorní	
Demineralizovaná voda	Miliphore: Mili-Q, Purelab: ELGA

Antimikrobiální testy

<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 1569 Česká sbírka mikroorganismů v Brně
<i>Serratia marcescens</i>	CCM 8587 Česká sbírky mikroorganismů v Brně

5.2 Přístroje

Odstředivka Rotofix 32, Hettich Zentrifugen
Sušárna Venticell, BMT Medical Technology
Přístroj Pure lab
UV lampa Krüss, Merci
RTG difraktometr Empyrean, Panalytical
spektrometr Nicolet iS50
SDT Q600 (TA Instruments) + thermo nicolet IS10
TA-instruments Q5000
Reometr AR G2, TA Instruments
ZWICK Z010 zařízení pro tah
Elektronový mikroskop Zeiss EVO LS10

5.3 Příprava vzorků

5.3.1 Příprava aminojílu

Aminojíl byl připraven pomalým přikapáváním 1,3 ml 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES) do roztoku chloridu hořečnatého (0,84 g) rozpuštěného v ethanolu (20 g). Vzniklá bílá suspenze byla míchána do té doby, než se odpařilo rozpouštědlo. Po odpaření bylo přidáno 20 ml ethanolu (promytí silanolových skupin), směs byla odstředěna (4000 ot/min, 5 min) a vysušena při 50 °C. Dále byl nutný krok exfoliace jílu. Vysušený meziprodukt byl rozpuštěn v deionizované vodě a precipitován ethanolom. Vzniklá suspenze byla odstředěna, promyta opět ethanolom a vysušena při 50 °C. Z tohoto poměru surovin byl výtěžek cca 0,4 g.

5.3.2 Příprava vzorků obsahující aminojíl a biopolymer

5.3.2.1 Interakce aminojílu s hyaluronanem sodným

Do vodného roztoku aminojílu (4 ml) o koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl jednorázově napietován roztok hyaluronanu o střední (MMW, 800-1000 kDa) molekulové hmotnosti (4 ml) a koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorky s obsahem hyaluronanu (LMW, 300-500 kDa) byly připraveny stejnou cestou o stejných objemových poměrech, avšak různých koncentracích (2,5; 5 a $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$). Všechny vzorky byly poté protřepány, aby došlo k fázové separaci.

Pro studium vlivu iontových byl před přidáním roztoku hyaluronanu přidán chlorid sodný v množství 0,045 g NaCl (fyziologický roztok), 0,09 g NaCl a 1,8 g NaCl.

5.3.2.2 Interakce aminojílu s polystyrensulfonátem

Opět do vodného roztoku aminojílu (4 ml o koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl napietován jednorázově roztok polystyrensulfonátu o koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a objemovém množství 4 ml. Dále byly připraveny vzorky obsahující HyA ($5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) a PSS

($10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) o různých objemových poměrech. Vzorky byly poté protřepány a byla zjišťována fázová separace.

5.3.3 Příprava vzorků pro termická a mechanická měření

Byly připraveny tři vzorky vláknitého hydrogelu Aj-HyA (MMW) postupem popsaným v kapitole 5.3.2.1. Jeden ze vzorků byl vysušen při 50°C a rehydratován deionizovanou vodou (5 ml). Druhý vzorek byl zmražen při -18°C a třetí vzorek byl ponechán čerstvý pro porovnání.

5.4 Metody charakterizace hydrogelu Aj-HyA

5.4.1 Charakterizace struktury hydrogelu pomocí SEM a XRD

Měření struktur samotného aminojílu a vysušeného hydrogelu Aj-HyA probíhaly na skenovacím elektronovém mikroskopu Zeiss EVO LS10. Na vzorky byla fyzikálně deponována vrstva kovu (směs zlata a palladia) z plynné fáze pomocí Sputter Coateru. Konkrétní nastavení přístroje je uvedeno vždy pod příslušnou fotografií vzorku.

Pomocí rentgenové práškové difrakce (XRD) byly zjištěny difraktogramy aminojílu a vysušeného hydrogelu Aj-HyA (MMW) na přístroji Empyrean. Nastavení přístroje je uvedeno v tabulce 5.1.

Aminojíl byl pro obě analýzy připraven standardní metodou, viz kapitola 5.3. Vláknitý hydrogel Aj-HyA byl připraven dle postupu popsaným v kapitole 5.3.2.1 a následně byl ponechán při laboratorní teplotě k vysušení.

Tabulka 5.1: Parametry nastavení XRD přístroje

Parametr	Nastavení
Materiál anody	měď
Vlnová délka $K_{\alpha 1}$ a $K_{\alpha 2}$	$1,541 \times 10^{-10}$ a $1,544 \times 10^{-10}$ m
Generované napětí a proud	40 kV a 30 mA
Snímek jednoho bodu	95,88 s
Snímání	3,8 – 65° théta
Krok skenu	0,01313 $^\circ$ théta

5.4.2 Studium stability hydrogelu

Vizuálně byl zkoumán vliv iontové síly na fázovou separaci hydrogelu Aj-HyA. Dále byla zjišťována rozpustnost samotného aminojílu a dezintegrace hydrogelu Aj-HyA (MMW) v organických rozpouštědlech. Ke vzorkům bylo vždy přidáno 0,5 ml příslušného organického rozpouštědla (viz výčet chemikálií). Pokud nedošlo k okamžité dezintegraci, pak vzorky se nechali na třepačce do druhého dne. Pokud k rozpuštění opět nedošlo, vzorky byly okyseleny kyselinou octovou (0,5 ml). Dále byla proměřena

pomocí FTIR analýzy skupina pěti vzorků pomocí spektrometru Nicolet iS50. Výčet připravených vzorků je zobrazen v tabulce 5.2. Tímto měřením se zjistily výše intenzity u různě starých a různě skladovaných vzorků. Aminojíl byl pro všechny výše uvedené experimenty připraven postupem popsáním v kapitole 5.3.1 a hydrogel Aj-HyA (MMW) v kapitole 5.3.2.1.

Tabulka 5.2: Seznam a popis vzorků

Vzorek	Příprava
1	Aminojíl v pevném stavu
2	Hydrogel Aj-HyA (MMW) skladován v lednici po dobu 7 dnů
3	Xerogel Aj-HyA (MMW) skladován za laboratorní teploty po dobu 7 dnů
4	Xerogel Aj-HyA (MMW) skladován za lab. teploty po dobu 7 dnů, rehydratován
5	Čerstvý hydrogel Aj-HyA (MMW) připraven ze zásobních roztoků skladovaných po dobu 7 dnů (HyA v lednici a Aj za lab. teploty)

5.4.3 Opracovatelnost hydrogelu

Nejprve byl vizuálně zkoumán vliv rehydratace a botnání xerogelu Aj-HyA. Dále byla vizuálně zkoumána rehydratace u rozemletých vzorků xerogelu Aj-HyA. Byly připraveny čtyři vzorky hydrogelu Aj-HyA (MMW), které byly přes noc vysušeny v sušárně při . Po vysušení byly dva vzorky rozemlety. Ke vzorkům byla napipetována deionizovaná voda, a to jednorázově (5 ml), anebo postupně po 1 ml (do 5 ml). Vzorky byly ponechány čtyři hodiny při laboratorní teplotě a byla zjišťována schopnost rehydratace a velikost botnání. V posledním experimentu byl připraven vzorek Aj-HyA (MMW), který byl zmrazen při -18°C a poté rozmrazen. U tohoto vzorku porovnávána pouze vizuální stránka s čerstvým vzorkem. Všechny vzorky byly připraveny dle postupu uvedeným v kapitole 5.3.2.1.

5.4.4 Termická a mechanická měření

Diferenciální termická analýza čerstvé, rehydratované a rozmražené sraženiny Aj-HyA (MMW) byla provedena na analyzátoru SDT Q600 (TA Instruments) + thermo nicolet IS10. Byla nastavena atmosféra argonu s teplotním rozsahem od laboratorní teploty po 1200°C .

Termogravimetrická analýza předchozích tří vzorků Aj-HyA (MMW) byla provedena na přístroji TA-instruments Q5000. Při všech termogravimetrických experimentech byl nastaven režim ohřevu s krokem $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ v teplotním rozsahu od laboratorní teploty do 200°C a okolní atmosférou dusíku.

Reologické testy u stejných vzorků Aj-HyA (MMW) byly proměřeny pomocí reometru AR G2, od firmy TA Instruments. Všechny parametry měření jsou uvedeny v tabulce 5.3.

Všechny tři vzorky byly podrobeny oscilačnímu reologickému měření pro zjištění viskoelastických vlastností. Nejdříve byl proveden deformační test, jehož výsledkem je

Tabulka 5.3: Parametry reologického měření všech tří vzorků Aj-HyA

Parametr	Nastavení
Senzor	Deska-deska (ocel), 8 mm
Podmínky	5 minut, 25 °C
Rozsah amplitud deformace	0,01-1000 % (0,3 % vybráno z LVO)
Frekvence oscilací	0,01-20 Hz (1,0 Hz v deformačním testu)
Počet bodů na dekádu	6
Mód	logaritmický
Mezera	0,5 mm

závislost viskoelastických modulů (paměťového a ztrátového) na amplitudě deformace při konstantní hodnotě frekvence oscilací. V oblasti lineární viskoelastivity (LVO) byla vybrána jistá hodnota napětí, která byla použita pro následující frekvenční testy. U frekvenčních testů je zvolená hodnota deformace (napětí) konstantní a měnila se frekvence otáčení.

Dále na univerzálním zkušebním zařízení pro tah ZWICK Z010 byly testovány vzorky čerstvé, rehydratované a rozmražené sraženiny Aj-HyA (MMW) pro zjištění mechanických statických vlastností pomocí tahu.

Přípravy čerstvé, rehydratované a rozmražené sraženiny Aj-HyA (MMW) pro všechny výše uvedené analýzy jsou popsány v kapitole 5.3.2.1.

5.4.5 Antimikrobiální testy

Testování bylo provedeno pomocí dvou druhů bakterií. Jednalo se o gram negativních bakterie *Serratia marcescens* a gram pozitivních bakterií *Micrococcus luteus*. Nejprve byly standardním způsobem připraveny obě bakteriální kultury, tedy bylo zaočkováno tekuté médium, které bylo inkubováno 24 h v termostatu při optimální teplotě 37 °C. Z takto připraveného média byly na misky s agarem rovnoměrně naneseny obě bakteriální kultury a po jejich zaschnutí byly naneseny i analyzované vzorky (formou jamek či disků v závislosti na viskozitě materiálu). Po 24 hodinách byly vzorky zkontrolovány a byly odečteny velikosti vzniklých inhibičních zón. Antimikrobiální vlastnosti byly testovány u roztoku aminojílu ($10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), sraženiny Aj-Hya a roztoku kolem sraženiny Aj-HyA. Aminojíl byl připraven standardním způsobem viz kapitola 5.3.1 a hydrogel Aj-HyA byl připraven způsobem popsaným v kapitole 5.3.2.1. Pro srovnání byla testována i sterilovaná voda a roztok hyaluronanu ($5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$).

5.4.6 Fluorescenční test

Vzorek aminojílu a vzorek hydrogelu i xerogelu Aj-HyA (MMW) byly na závěr práce pro zajímavost dány pod UV lampu ozařující vlnovou délkou 254 nm a 365 nm.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Interakce aminojílu s biopolymery

K roztoku aminojílu (4 ml, $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl napipetován roztok příslušného biopolymeru o různém objemovém a koncentračním poměru (tabulka 6.1). Po protřepání byla vizuálně zjišťována fázová separace. Příprava vzorků je popsána v kapitole 5.3.2.1 a 5.3.2.2.

Tabulka 6.1: Interakce aminojílu s biopolymery

Vzorek	Biopolymer	Koncentrační a objemové poměry
1	MMW HyA	5 ml $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ MMW HyA
2	LMW HyA	5 ml $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ LMW HyA
3		5 ml $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ LMW HyA
4		5 ml $2,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ LMW HyA
5	MMWHyA LMW HyA	2,5 ml $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ LMW HyA + 2,5 ml $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ MMW HyA
6	PSS	5 ml $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ AJ + 5 ml $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ PSS
7	PSS LMW HyA	3 ml $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ PSS + 1 ml $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ MMW HyA
8		2 ml $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ PSS + 2 ml $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ MMW HyA



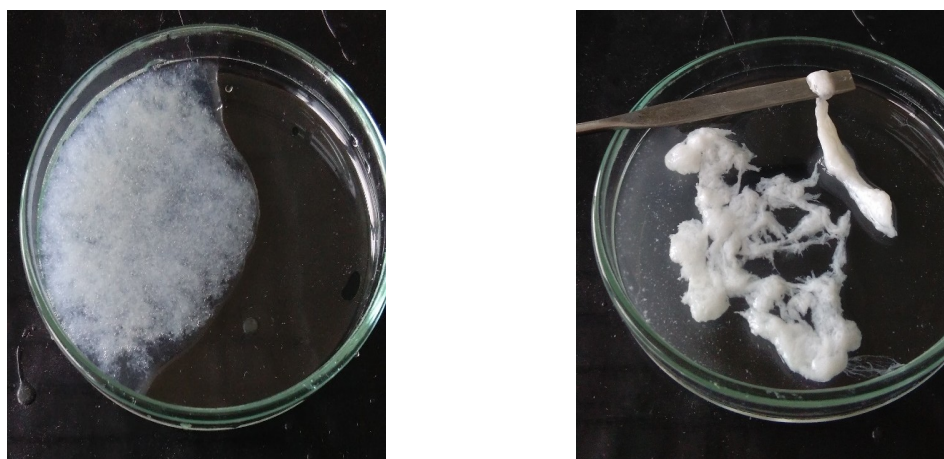
Obrázek 6.1: Vzniklá sraženina aminojílu a MMW HyA – referenční vzorek č. 1

Bylo zjištěno, že k tvorbě gelovité sraženiny dochází i interakcí aminojílu s LMW hyaluronanem. Sraženiny však nemají tak komplexní tvar jako s MMW HyA a ne všechna vytvořená vlákna se začleňují do vzniklého komplexu (obr. 6.2). Interakcí aminojílu s PSS (vzorek č. 6) nedošlo ke vzniku žádných pozorovatelných útvarů, smísením roztoků vznikla zakalená disperzní soustava, kde nebyl pozorován ani vláknitý charakter. Pokud se však smísil aminojíl s roztokem obsahujícím PSS i HYA, došlo ke tvorbě sraženiny či pouze jen vláknitých částic, a to dle poměru Aj i HyA (obr. 6.3). Sraženiny však neměly tak pevný charakter a na první pohled neobsahovaly tolik

vázané vody jako běžně připravované komplexy AJ-HyA (MMW) (obr. 6.1). Proto byl pouze tento vzorek vybrán pro sadu experimentů, jejichž výsledky by měli přinést představu o struktuře a vlastnostech nanokompozitu aminojílu s biopolymerem hyaluronanem sodným (MMW).



Obrázek 6.2: Vlákňité precipitáty aminojílu s LMW HyA zleva vzorek č. 2, č. 3, č. 4 a č. 5

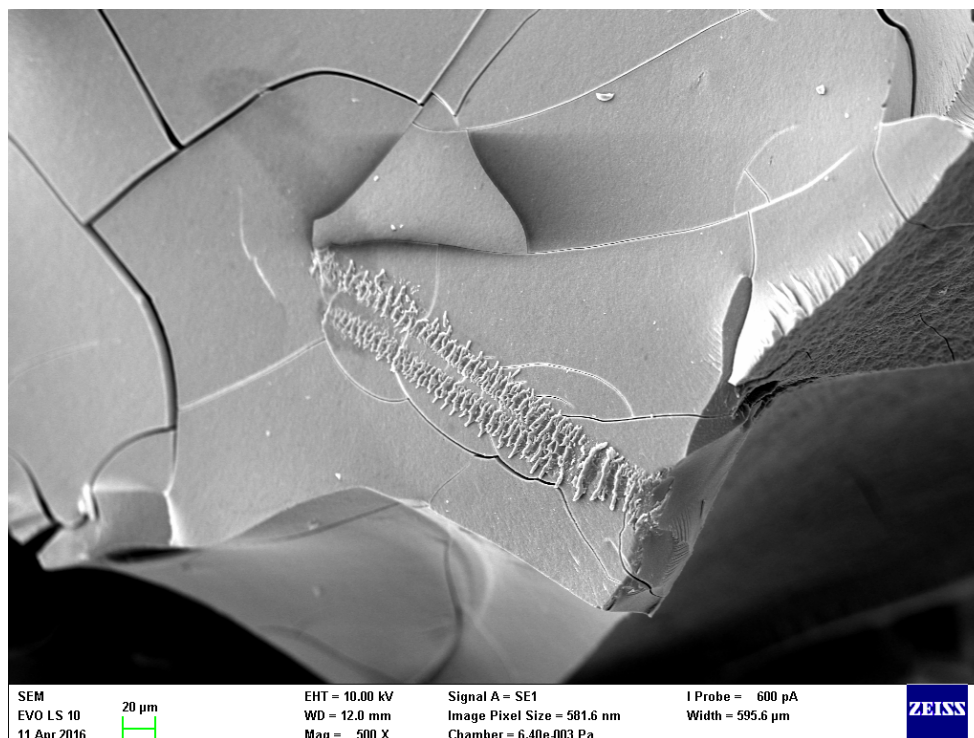


Obrázek 6.3: Interakce aminojílu s PSS – zleva vzorky č. 7 a č. 8

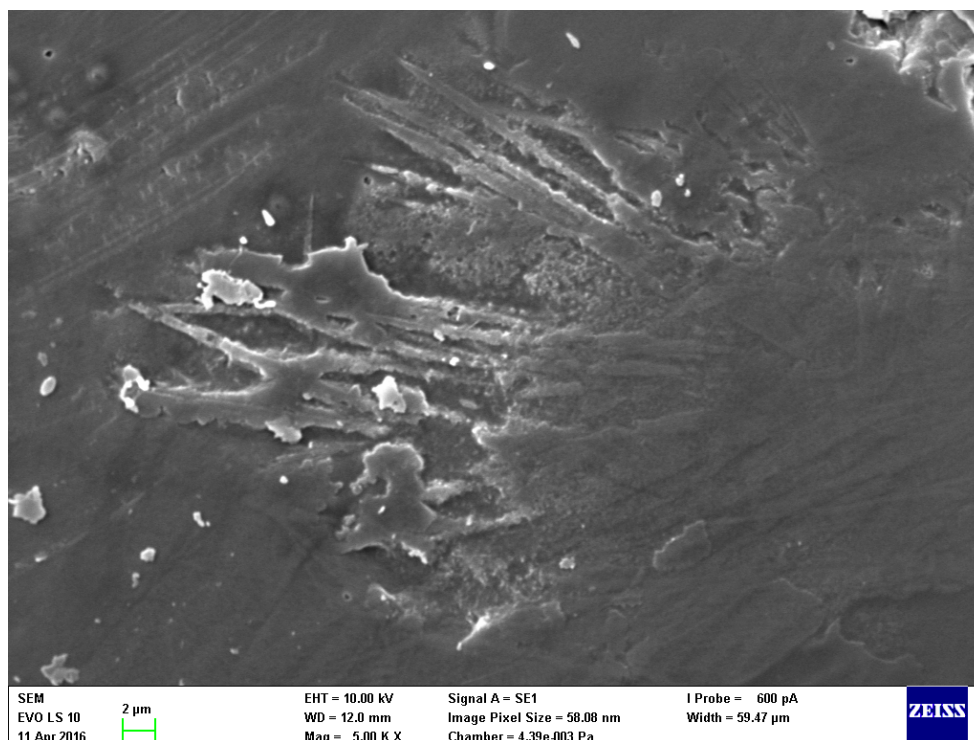
6.2 Charakterizace struktury hydrogelu

6.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie

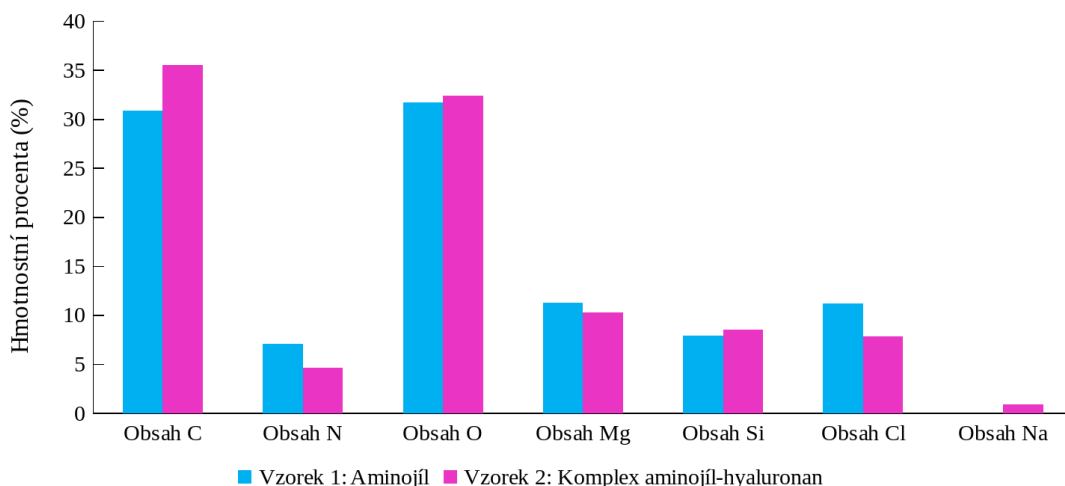
Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byla sledována struktura samotného aminojílu v pevném stavu (viz obr. 6.4) a vláknitého hydrogelu vzniklého interakcí aminojílu a hyaluronanu (MMW), viz obr. 6.5. Aminojíl byl připraven postupem popsaným v kapitole 5.3.1 a hydrogel Aj-HyA (MMW) v kapitole 5.3.2.1. U obou vzorků byla provedena prvková analýza, která je zobrazena na obrázku 6.6.



Obrázek 6.4: Snímek aminojílu pomocí SEM, zvětšení 500×



Obrázek 6.5: Snímek vysušeného komplexu j-HyA (MMW) pomocí SEM, zvětšení 5000×



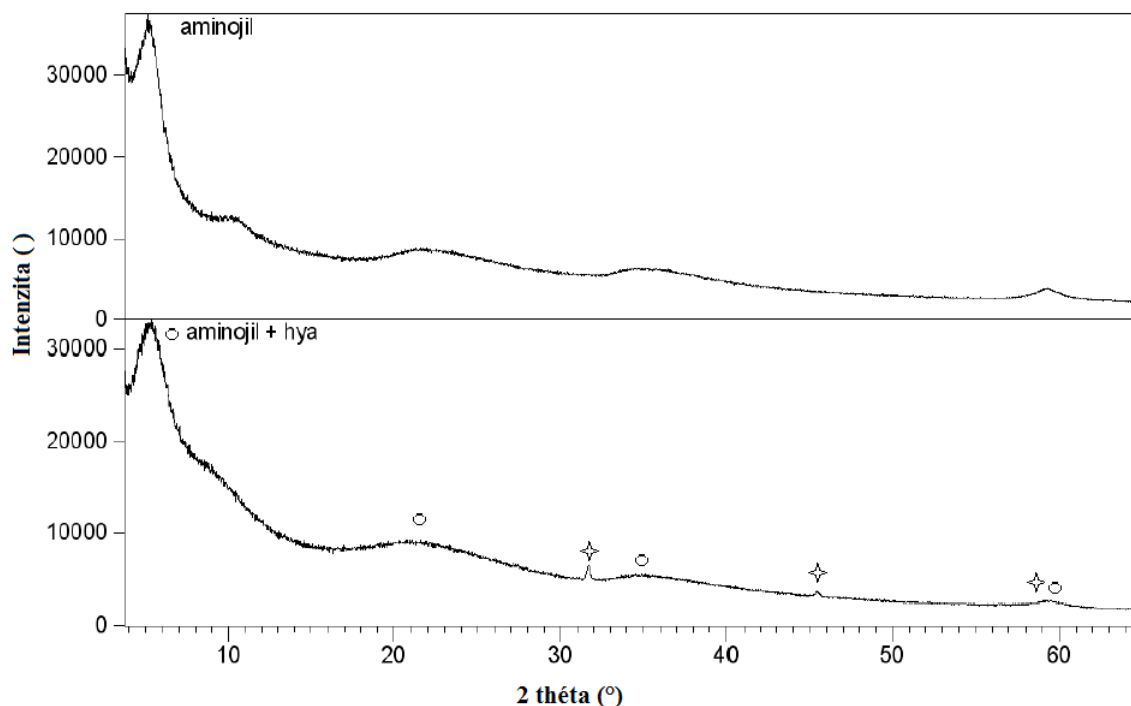
Obrázek 6.6: Prvková analýza samotného aminojílu a hydrogelu aminojíl-hyaluronan (MMW)

U aminojílu byla pozorována hladká, vrstevnatá 3D struktura s občasnými prasklinami. Dále byla pozorována vláknitá struktura vysušeného komplexu aminojíl-hyaluronan, která byla v nevysušeném vzorku sledována pouhým okem. Prvková analýza byla provedena pro každý vzorek na dvou různých místech. Výstup měření je uveden jako průměr hodnot obou míst. Oproti předešlému měření je pozorován nižší obsah chloridů ve vzorku aminojílu (cca 11 %, dříve cca 17 %), je tedy znatelná optimalizace přípravy aminojílu. Ve vzorku komplexu aminojíl-hyaluronan došlo ke změnám prvkového složení, nicméně změny nejsou nijak výrazné, vyjma obsahu uhlíku a chloru. Navíc je zde dokázána přítomnost sodíku, která je způsobena přidavkem hyaluronanu sodného.

6.2.2 Rentgenová prášková difrakce

Struktura aminojílu a xerogelu Aj-HyA (MMW) byla prostudována také pomocí rentgenové práškové difrakce. Difraktogramy obou měření jsou uvedeny na obrázku 6.7. Z nich můžeme provést základní identifikaci a vypočítat strukturální charakteristiky krystalické mřížky. Záměrem této analýzy bylo porovnání krystalografického charakteru aminojílu u obou vzorků. Vzorek hydrogelu byl připraven postupem popsáním v kapitole 5.3.2.1 a byl ponechán k vyschnutí při 50 °C.

Pomocí XRD analýzy byla ověřena krystalická struktura aminojílu. První a největší difrakce odpovídá rozteči destiček aminojílu, ve které je navázána aminopropyllová skupina. Další píky odpovídají krystalické struktuře anorganického jílového minerálu ze skupiny mastku. Vzorek obsahující hyaluronan má více amorfní strukturu a navíc, což je zajímavé, obsahuje vykrytalizované částice chloridu sodného, které zřejmě vznikly interakcemi iontů prekurzorů. Detailní struktury jsou uvedeny příloze na obrázku 10.1 a obrázku 10.2.



Obrázek 6.7: Difraktogram vzorku aminojilu a xogelu Aj-HyA (MMW), kde jsou hvězdičkou označeny píky NaCl a kolečkem charakterizace aminojilu

6.3 Studium stability hydrogelu Aj-HyA

6.3.1 Vliv iontové síly na vznik hydrogelu

Vizuálně byl zkoumán vliv iontové síly na fázovou separaci hydrogelu Aj-HyA. Celý popis experimentu je popsán v kapitole 5.3.1. Vizuální porovnání všech vzniklých sraženin je uveden na obrázku 6.8.



Obrázek 6.8: Vlákenná sraženina bez přídavku NaCl, přídavek 0,045 g NaCl (fyziologický roztok), 0,09 g NaCl a 1,8 g NaCl

Fyziologický roztok je 0,9% roztok chloridu sodného (NaCl) a je jedním z nejzákladnějších roztoků v medicíně. Cílem tohoto experimentu bylo ověřit vznik sra-

ženiny při úpravě iontové síly pomocí NaCl. Bylo prokázáno, že iontová síla ovlivní fázovou separaci a tedy vznik sraženiny. Bez přídavku chloridu sodného je sraženina nadýchaná, rozvolněná a bez viditelného zákalu. Přídavkem 0,045 g NaCl (0,15 M fyziologický roztok) je více kompaktní a dochází k mírnému bílému zákalu okolního roztoku, který je způsoben větším počtem iontových struktur rozptylujících světlo. Bílý zákal se zvyšuje s dalšími přídavky chloridu sodného. S největším přídavkem chloridu sodného je fázová separace minimální a zákal okolního roztoku je největší. V tomto případě chloridové anionty přidané do roztoku aminojílu interagují s exfoliovanými destičkami aminojílu a po přídavku hyaluronanu sodného nenastává takové interakce a fázové separaci. Z toho je usouzeno, že počet elektricky nabitých částic přítomných v okolí dispergovaného aminojílu ovlivní interakci s jakýmkoliv druhem biopolymeru.

6.3.2 Stabilita hydrogelu v organických rozpouštědlech

Nejprve byla charakterizována rozpustnost v organických rozpouštědlech samotného aminojílu, dále pak rozpustnost hydrogelu Aj-HyA (MMW). Popis přípravy experimentu je uveden v kapitole 5.4.2.

Bylo zjištěno, že aminojíl je možné rozpustit v etylenglykolu, avšak oproti deionizované vodě je rozpouštění velice pomalé. Přídavek kyseliny octové k nerozpuštěným vzorkům by měl způsobit protonaci aminoskupin a usnadnit tak rozpustnost. Nicméně bylo zjištěno, že aminojíl je po okyselení rozpustný pouze v methanolu, ale není rozpustný ve všech dalších organických rozpouštědlech, a to ani po okyselení soustavy.

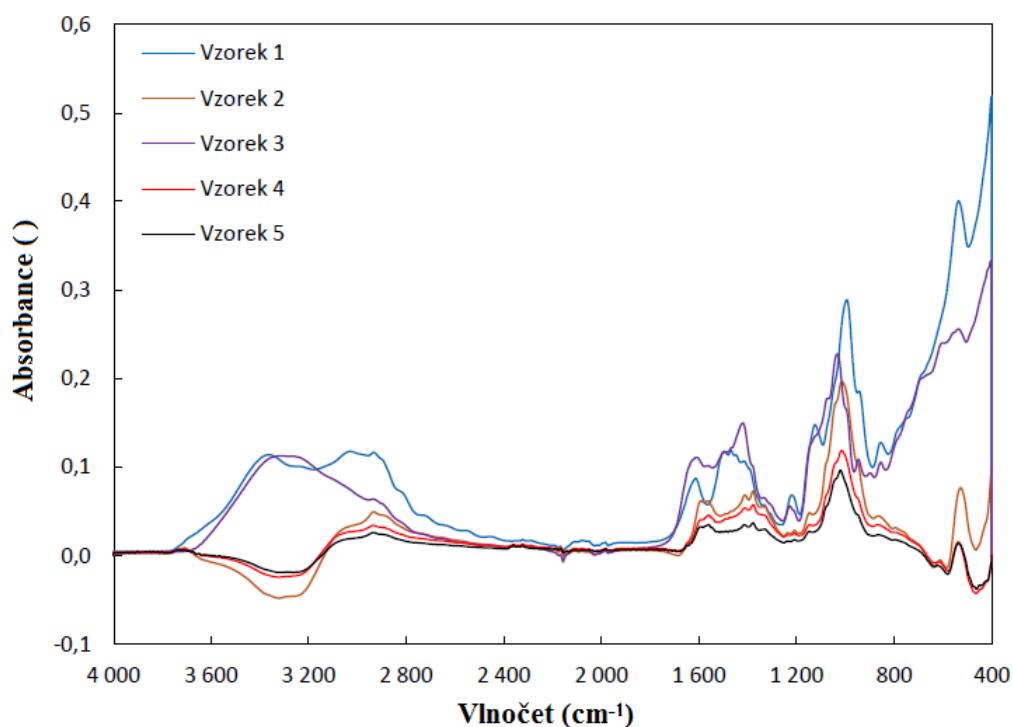
K fázové přeměně a rozpouštění vláknitého hydrogelu Aj-HyA (MMW) došlo pouze u amoniaku, nicméně po okyselení došlo k okamžitému rozpouštění u dichlormethanu, chloroformu, methylacetátu a methyl terc-butyl etheru. Po delším časovém úseku došlo po okyselení i k rozpouštění u vzorku obsahující toluen a demineralizovanou vodu.

6.3.3 Stárnutí hydrogelu

Měření FTIR analýzy byly zjištěny intenzity absorpance v závislosti na vlnočtu u různě starých a různě skladovaných vzorků Aj-HyA (Obr. 6.9). Výčet připravených vzorků je zobrazen v tabulce 5.2.

V případě proměření vzorků sraženin byla vedle aminojílu prokázána i přítomnost charakteristických skupin hyaluronanu. Pík o vlnočtu cca 1150 cm^{-1} je charakteristický pro glykosidickou vazbu C–O–C. Na přítomnost etheru poukazují polohy pásů 1205 a 1235 cm^{-1} . Vibrace vazeb v karboxylových skupinách C=O a C–O– jsou v polohách o vlnočtech kolem 1595 cm^{-1} , resp. 1330 , 1375 a 1410 cm^{-1} . Dále je možné pozorovat pík o vlnočtu cca 1565 cm^{-1} , který poukazuje na přítomnost vazby N–H v amidové vazbě.

Obecně lze u spekter pozorovat relativně nízkou intenzitu absorpance, a to do hodnoty 0,5. Vliv degradace HyA je tedy patrný se srovnáním čerstvého vzorku, u kterého dosahovali hodnoty absorpance až dvojnásobných hodnot (srovnáno z ana-



Obrázek 6.9: Naměřená FTIR spektra pro připravené vzorky aminojílu a jeho komplexů vzniklých interakcí s HyA se zachovalou intenzitou absorbance

lýzy uvedené v bakalářské práci Anny Procházkové [5]). Dále je patrná degradace i v hůře pozorovatelných oblastech poukazujících na přítomnost glykosidické vazby (oblast kolem 1150 cm^{-1}). Vliv skladování roztoku aminojílu na jeho degradaci nebyl doposud nikde popsán, nicméně i tento fakt by se mohlo projevit na snížení intenzity absorbance.

Dále byla pozorována degradace vzorku komplexu aminojíl-hyaluronan po jeho rehydrataci po 7 dnech (srovnání vzorků 3 a 4). K výrazné pozorovatelné degradaci vzorku po vysušení sraženiny (srovnání vzorků 2 a 3) nedošlo, zde jsou pouze pozorovatelné změny v oblasti v okolí vlnočtu 500 cm^{-1} , což může být způsobeno odstraněním vody ze struktury aminojílu. Spektrum ve zmíněné oblasti u vzorku 3 je podobné právě spektru naměřeného čistého aminojílu (vzorek 1).

6.4 Opracovatelnost hydrogelu

6.4.1 Vliv rehydratace

Čerstvá hydrogelová fáze byla ponechána při 50 °C vyschnout a bylo zjišťováno, zda je xerogel schopen rehydratace a návratu do původního stavu. Výsledky jsou ukázány na obrázku 6.10.

Velice zajímavé je zjištění, že xerogel Aj-HyA je schopen rehydratace, což je důležitým faktem pro budoucí použití. Rehydratovaný vzorek je viditelně plošší, ve formě



Obrázek 6.10: Zleva: hydrogel Aj-Hya, před vyschnutí, jeho vysušená forma a forma rehydratovaná

tenkého filmu, který se jeví kompaktnější. U tohoto rehydratovaného filmu byl zjišťován obsah vody pomocí termogravimetrického měření a viskoelastické vlastnosti pomocí reologie.

6.4.2 Vliv mletí a rehydratace

Dále byla zkoumána rehydratace a botnání u rozemletých vzorků xerogelu Aj-HyA. Příprava čtyři vzorků hydrogelu Aj-Hya je popsána v kapitole 5.3.2.1.

Měřené vzorky:

Vzorek č. 1: Rozemletý vzorek, jednorázový přídavek vody (5 ml)

Vzorek č. 2: Rozemletý vzorek, postupný přídavek vody po 1 ml

Vzorek č. 3: Nerozemletý vzorek, jednorázový přídavek vody (5 ml)

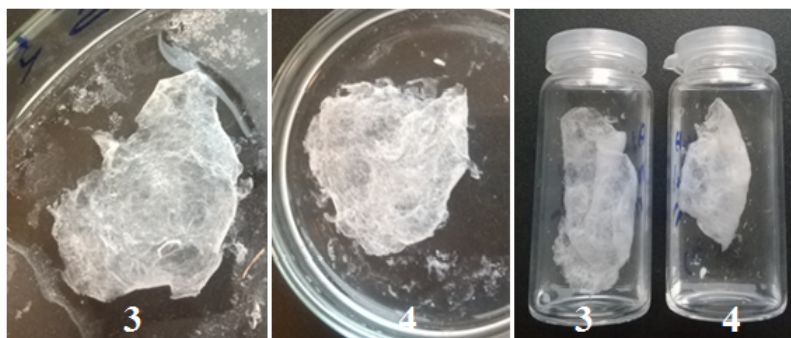
Vzorek č. 4: Nerozemletý vzorek, postupný přídavek vody po 1 ml

Fotodokumentace k celému experimentu je zobrazena na obrázku 6.11 a obrázku 6.12.



Obrázek 6.11: Zleva: Rozemleté vzorky č. 1 a č. 2. ihned po rehydrataci a po čtyřech hodinách

Rozemleté vzorky se po přidavku demineralizované vody nespojily v jeden celek, viditelně však nabobtnaly a po čtyřech hodinách ještě markantněji. Nerozemleté vzorky při rehydrataci také absorbovaly část vody a v této fázi bylo možné vrstvu



Obrázek 6.12: Zleva: nerozemleté vzorky č. 3 a č. 4 ihned po rehydrataci a po 4 hodinách

hydrogelu sloupnout a bez narušení přemístit. Rehydratovaný hydrogel nenabobtnal do 3D rozměru jako před vysušením, zůstal plochý a kompaktnější. Mezi jednorázovým a postupným přidavkem demineralizované vody nebyl shledán viditelný rozdíl na rehydrataci pro oba typy hydrogelů.

6.4.3 Cyklické mražení a tání

Byly provedeny experimenty ověřující chování a stabilitu hydrogelu při jeho zmrazení (obr. 6.13). Po zmrazení se gel vrací do původního stavu, a to při cyklickém mražení a tání. Vizualně nebyly pozorované změny ve tvaru či pevnosti v porovnání s čerstvým vzorkem a vzorkem po rozmražení (i opakovaném). Rozmražený hydrogel Aj-HyA byl charakterizován pomocí termogravimetrického měření pro zjištění obsahu vázané vody a pomocí reologie byly zjištěny viskoelastické vlastnosti. Tyto experimenty jsou uvedeny níže v experimentální části.

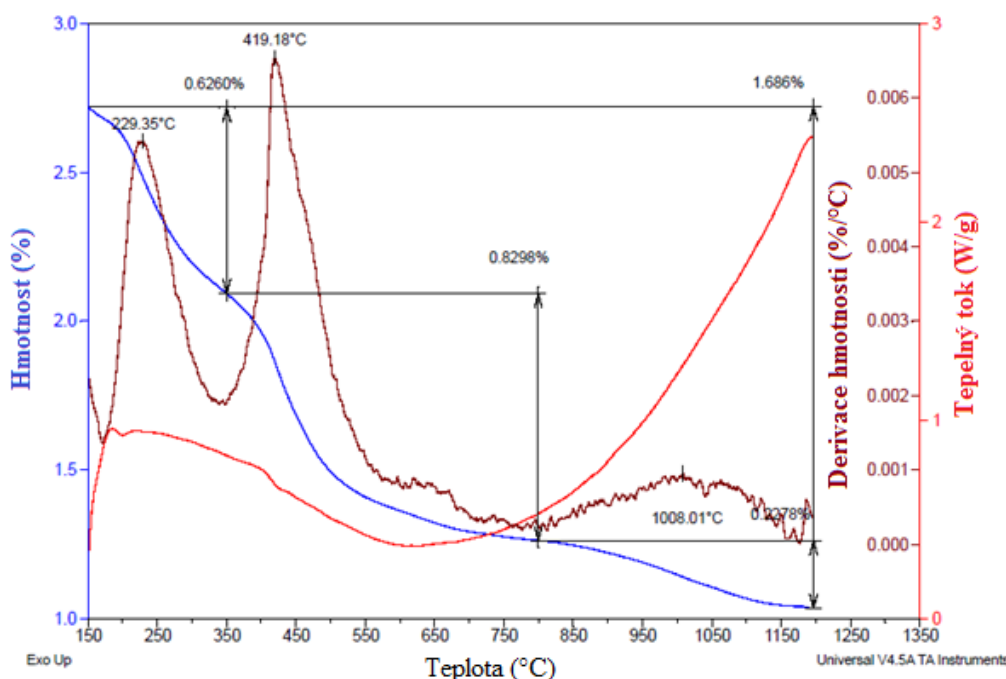


Obrázek 6.13: Zmražený vzorek hydrogelu Aj-HyA (MMW)

6.5 Studium termických a mechanických vlastností

6.5.1 Termická analýza

Nejprve byla zjištěna termostabilita čerstvé sraženiny Aj-HyA (MMW) pomocí diferenční termické analýzy (DTA). Měření probíhalo od laboratorní teploty až po 1200 °C. Modrá křivka znázorňuje závislost úbytku hmotnosti na vzrůstající teplotě (TG), hnědá křivka je její derivací (DTG) a konečně červená křivka je křivka DTA, kde jsou vykresleny endotermické a exotermické změny dějící se ve vzorku. Celý průběh měření je znázorněn na obrázku 6.14.

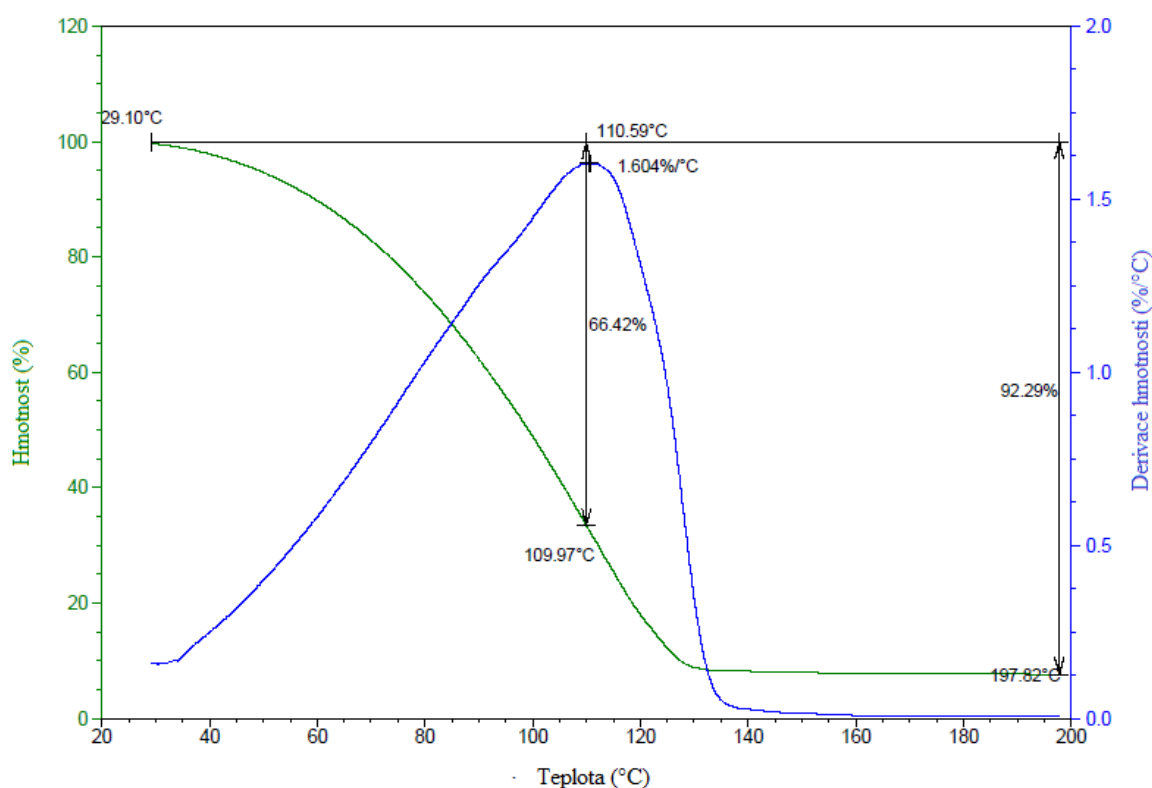


Obrázek 6.14: Měření termických vlastností (DTA) čerstvého vzorku hydrogelu Aj-HyA

Jelikož čerstvý vzorek Aj-HyA obsahuje mnoho vody, dochází již před nastavením přístroje k jejímu vypařování. Proto měl přístroj DTA problém nastavit nulu a spustit měření. Po spuštění měření (150 °C) se však již stihla vypařit vázaná voda ze vzorku. Tím pádem pro měření dalších vzorků bylo nutné přejít k pomalejšímu ohřevu jen do nižší teploty, abychom byly schopni určit celkové množství vody, který je vzorek schopen přijmout. Proto byla znovu provedena termická analýza, a to pomocí termogravimetrického měření, pouze do teploty 200 °C (uvedena níže). Nicméně měření DTA čerstvé sraženiny Aj-HyA (MMW) ukázalo rozklad komponent při vysokých teplotách (až 1200 °C). Termogravimetrická modrá křivka vykazuje největší hmotnostní ztráty ve třech krocích. Nejprve dochází k dehydrataci vody ze vzorku, následuje rozklad organické části (pyrolýza aminopropylových skupin) a poslední je

rozklad anorganické matrice aminojílu. Hnědá křivka je její derivací a vykazuje tři inflexní body při 229,35 °C, 419,19 °C a 1008,01 °C . Zde dochází k maximální rychlosti úniku látek z důvodů již výše popsanych. Červená křivka (DTA) popisuje nejprve endotermní reakci, která je potřebná k dehydrataci vzorků a dále následuje nástup exotermní reakce způsobené termickým rozkladem.

Termogravimetrická analýza čerstvé, rehydratované a rozmražené sraženiny Aj-HyA probíhala v teplotním rozsahu od laboratorní teploty do 200 °C a okolní atmosférou dusíku. Cílem této analýzy bylo určit vázanou vodu ve vzorku a hmotnost sušiny. Ve spektrech všech tří vzorků se objevuje na křivce jeden zlom okolo 100 °C, což odpovídá vysušení vody. Všechny naměřené hodnoty tří vzorků jsou uvedeny v tabulce 6.2. Termogravimetrická křivka čerstvé sraženiny Aj-HyA je uvedena na obr. 6.15, ostatní jsou uvedeny v příloze (obr. 10.3, obr. 10.4).



Obrázek 6.15: Záznam termogravimetrického měření vybraného vzorku čerstvé sraženiny Aj-HyA

Zelená křivka z TG měření ukazuje závislost hmotnosti na vzrůstající teplotě. Derivací této křivky byla zjištěna DTG křivka (modrá křivka) s jedním vrcholem odpovídající inflexnímu bodu, kde dochází při určité teplotě k maximální rychlosti úniku látek. Inflexní body jsou u všech tří vzorků vykresleny ostře a udávají teplotu, kdy je ze vzorku vysušena většina vody (viz hmotnostní úbytek). Termogravimetrická křivka začíná u všech vzorků klesat ihned po začátku měření, tudíž k dehydrataci dochází již při nízkých hodnotách teplot a je velmi těžké stanovit reálnou hodnotu začátku vysušování. Důležitým parametrem je hodnota sušiny, která se pohybuje

v rozmezí 7,11 % až do hodnoty 9,84. Což znamená, že čerstvý hydrogel Aj-HyA je schopen pojmout 92,89 % vody, rehydratovaný vzorek Aj-HyA 90,16 % a rozmražený vzorek 92,89 % vody. Tyto hodnoty se od sebe neliší nijak markantně, což je velkým přínosem pro budoucí aplikaci, jelikož komplex Aj-HyA neztrácí schopnost vázat vodu ani za extrémních teplotních podmínek.

Tabulka 6.2: Souhrnné výsledky tří vzorků hydrogelu Aj-HyA měřené termogravimetrickou metodou

Aj-HyA	Navážka (mg)	Počáteční teplota (°C)	Inflexní bod (%/°C)	Teplota v inflexním bodě (°C)	Hmotnostní úbytek (%)	Obsah sušiny (%)	Obsah vody (%)
čerstvý	27,902	29,10	1,604	110,59	66,42	7,71	92,29
rehydr.	23,804	26,73	1,915	104,16	82,35	9,84	90,16
zmražený	29,662	25,84	1,569	117,54	61,46	9,11	90,89

6.5.2 Reologická analýza

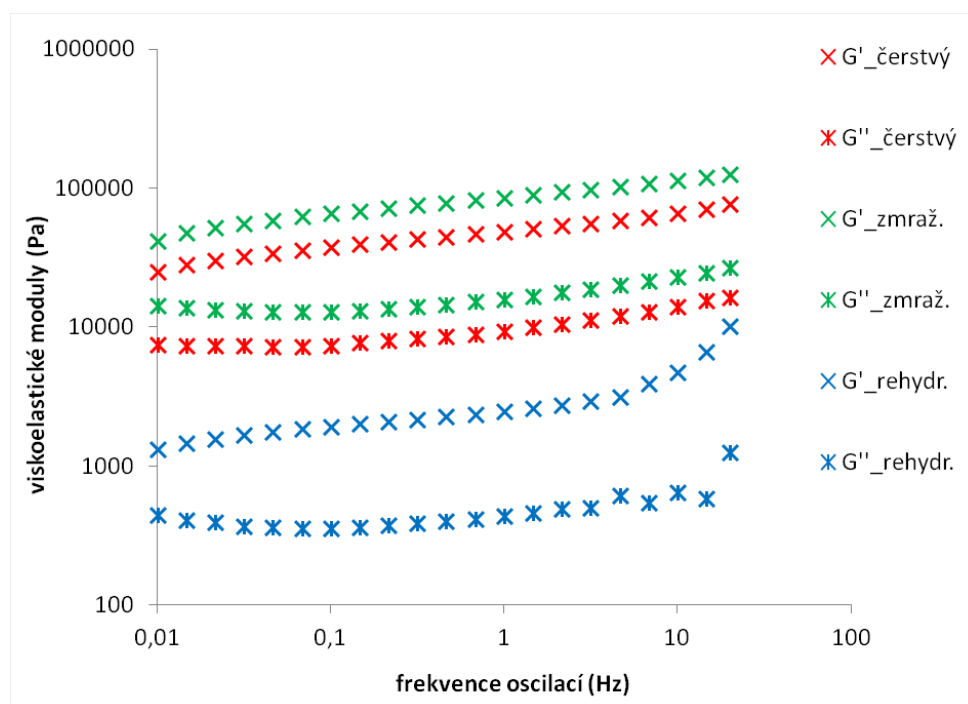
Vzorky čerstvé, rehydratované a mražené sraženiny Aj-HyA (MMW) byly podrobeny oscilačnímu reologickému měření. Pro toto měření byla vybrána geometrie deska-deska, jelikož je vhodná pro měření vzorků gelů. Nejprve byla na rotačním reometru nastavena konstantní frekvence smykového napětí a měřila se smyková deformace pro čerstvou sraženinu Aj-HyA (obr. 10.5 a obr. 10.6 jsou uvedeny v příloze). Tímto testem bylo určeno, při jak velké hodnotě deformace se začne gelová struktura bortit. Od hodnoty 0,01 % amplitudy deformace dochází ve vzorku k vratným viskoelastickým změnám, a to až po hodnotu 10 %. Od této hodnoty již změny deformace vratné nejsou. Tento rozsah hodnot amplitudy deformace se nazývá jako lineární viskoelastická oblast (LVO). Z této lineární oblasti viskoelasticity byla pro následující frekvenční měření vybrána hodnota 0,3 %. Výsledkem frekvenčního měření všech tří vzorků je závislost viskózního modulu G'' a elastického modulu G' na frekvenci oscilací (Obr. 6.16) a dále závislost ztrátového úhlu δ na již zmíněné frekvenci oscilací (Obr. 6.17).

Ze závislosti viskózního G'' a elastického modulu G' na frekvenci oscilací bylo zjištěno, že u každého ze tří vzorků je elastický modul G' vyšší než viskózní modul G'' , což znamená, že elastické chování všech vzorků převažuje nad viskózním chováním. Moduly čerstvého vzorku hydrogelu a rozmraženého vzorku vykazují stejný vzrůstající trend. Hodnoty modulů u rehydratovaného vzorku jsou posunuty níž oproti ostatním vzorkům, což značí menší viskoelastický charakter. Navíc křivka nekopíruje další dva zmíněné vzorky, jelikož se zvyšující se frekvenci roste strměji hodnota obou modulů.

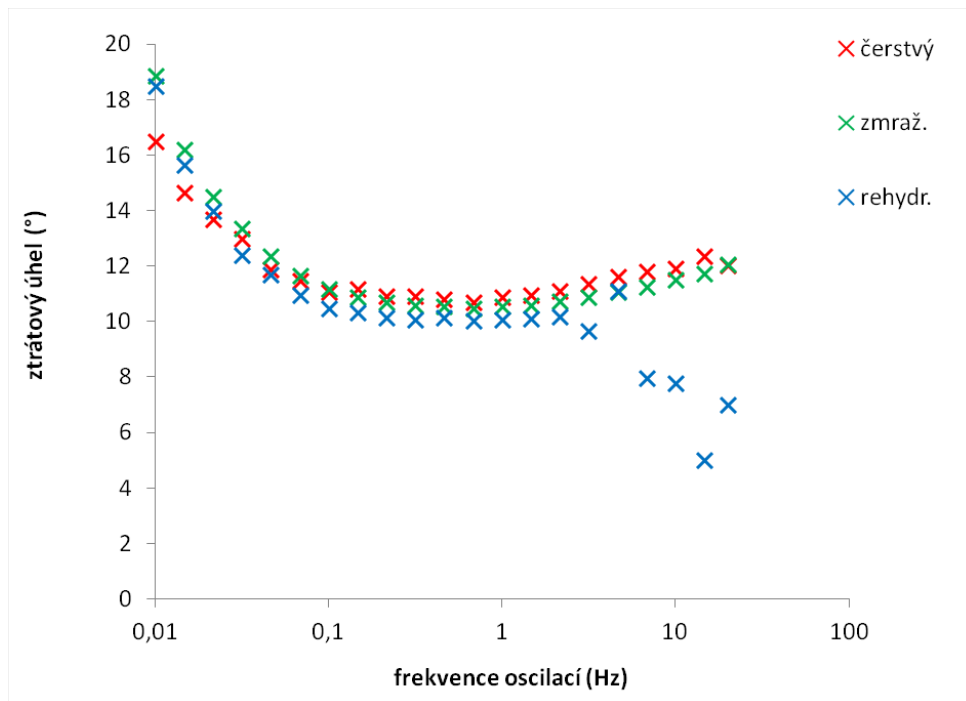
Hodnota ztrátového úhlu 0° by charakterizovala dokonalé Hookovo elastické těleso, naopak pro dokonalé Newtonské viskózní těleso by se tato hodnota rovnala 90° . Pokud by tedy hodnota byla pod 45° , jednalo by se o těleso spíše elastické, naopak

hodnoty nad 45° vykazují spíše viskózní charakter. Z grafu na obrázku 6.17 je patrné, že všechny tři vzorky hydrogelu vykazují hodnoty úhlů pod 20° a tudíž vykazují spíše tuhý charakter, což znamená, že se jedná o gely elastické. Opět čerstvý vzorek hydrogelu Aj-HyA (MMW) a rozmražený vzorek hydrogelu Aj-HyA (MMW) vykazují stejné viskoelastické vlastnosti, avšak rehydratovaný vzorek hydrogelu Aj-HyA (MMW) se oproti nim při vyšších hodnotách frekvence mírně liší.

Na začátku měření mají všechny křivky ztrátového úhlu stejnou klesající tendenci, to znamená, že při nízkých hodnotách frekvence oscilací se u všech vzorků projevuje více viskózní charakter. Se zvyšující se frekvencí oscilací mají křivky čerstvého a rozmraženého vzorku stoupající tendenci, tedy tendenci se chovat více elasticky, avšak křivka rehydratované sraženiny tuto tendenci nemá.



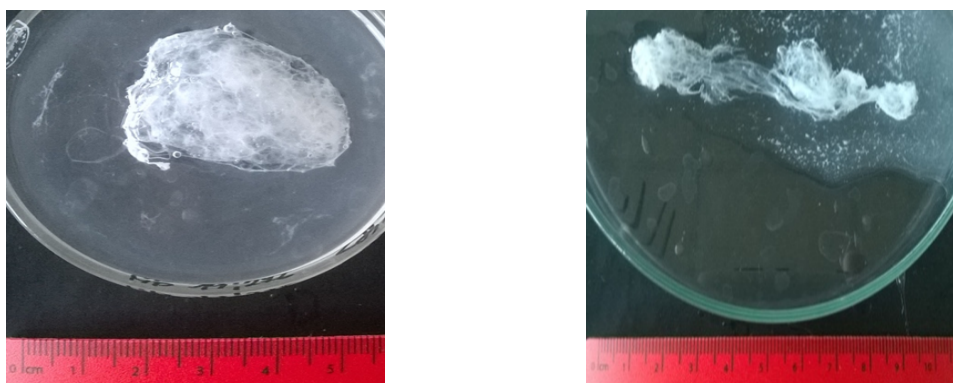
Obrázek 6.16: Závislost viskózního G'' a elastického modulu G' na frekvenci oscilací pro vzorek čerstvého, rehydratovaného a rozmraženého hydrogelu Aj-HyA (MMW)



Obrázek 6.17: Závislost ztrátového úhlu na frekvenci oscilací pro čerstvý, rehydratovaný a rozmražený hydrogel Aj-HyA (MMW)

6.5.3 Zkouška pevnosti v tahu

Cílem mechanické zkoušky pevnosti v tahu bylo zjistit napěťové a deformační charakteristiky před přetrženým hydrogelu Aj-HyA. Byly připraven čerstvý vzorek, rehydratovaný a rozmražený (viz kapitola). Avšak hydrogely bylo těžké uchytit do čelistí trhačíchho zařízení tak, aby výsledek analýzy byl exaktní. Nicméně obr. 6.18 dokazuje určitou pevnost v tahu čerstvého hydrogelu Aj-HyA (MMW) a přetržení vláken nastává po protažení hydrogelu do zhruba dvojnásobku původní délky. Protažení materiálu však není homogenní v celém objemu, dochází k postupnému přetrhávání od vnějších vláken a materiál se stává křehčím, ohebnějším a méně pevným.



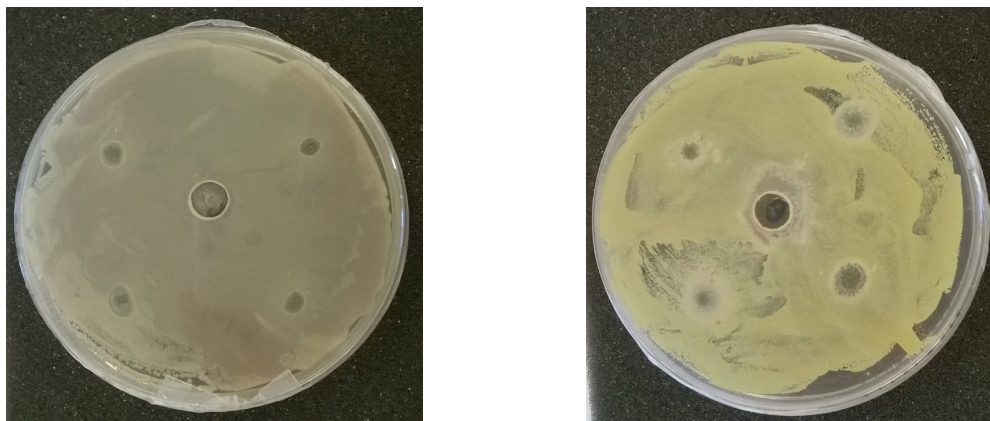
Obrázek 6.18: Pevnost v tahu vláknitého hydrogelu Aj-HyA

6.6 Antimikrobiální testy

Kultivace mikroorganismů a antimikrobiální testy probíhaly ve spolupráci s Ústavem chemie potravin a biotechnologií na Fakultě chemické VUT v Brně. Antimikrobiální testy byly provedeny pro roztok samotného aminojílu ($10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), pro vláknitý hydrogel Aj-Hya (MMW příprava viz kapitola 5.3.2.1) a roztok kolem sraženiny. Tyto vzorky byly testovány na gram negativní bakterie *Serratia marcescens* a gram pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*. Velikosti vzniklých inhibičních zón všech vzorků jsou uvedeny v tabulce 6.3. Na obrázku 6.19 jsou zobrazeny inhibiční zóny hydrogelu Aj-HyA pro oba typy bakterií.

Tabulka 6.3: Stanovení antimikrobiální aktivity - velikost inhibičních zón (mm)

	Aj disk	Aj jamka	HyA	⊙ Aj-HyA	Aj-HyA	Aj-HyA
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	4,25	6,5
<i>Micrococcus luteus</i>	2,15	1,9	-	1,6	5,75	10



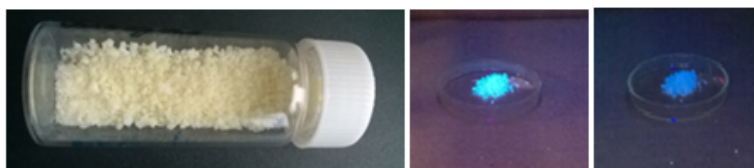
Obrázek 6.19: Fotografie vlevo - *Serratia marcescens*, vpravo - bakterie *Micrococcus luteus*. Uprostřed v jamce je nadávkován roztok kolem sraženiny Aj-HyA. Okolo jamky je diskovou metodou nanesen vzorek Aj-HyA

Dosažené výsledky tedy potvrzují, že aminojíl vykazuje bakteriostatické vlastnosti u gram pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*. Nevykazuje však bakteriostatické vlastnosti u gram negativní *Serratia marcescens*. Důvodem může být malá koncentrace použitého aminojílu ($10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$), jelikož gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu svrchu překrytou druhou membránou, kdežto u grampozitivních tato druhá vrstva chybí. Aminojíl byl dávkován jak formou disku, kdy inhibiční zóna spolu s nadávkovaným vzorkem činila 2,15 mm, tak formou jamky (1,9 mm). Hyaluronan je tělu vlastní látka a nevykazuje žádné antibakteriální vlastnosti, což bylo ověřeno. Roztok kolem sraženiny Aj-HyA byl napipetován do jamky o velikosti 8 mm. Tento vzorek prokázal bakteriostatické vlastnosti pouze u gram pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, kdy velikost inhibiční zóny dosáhla 1,6 mm.. Vláknitý hydrogel Aj-HyA (MMW) vykazuje bakteriostatické účinky, jak u gram pozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, tak i gram

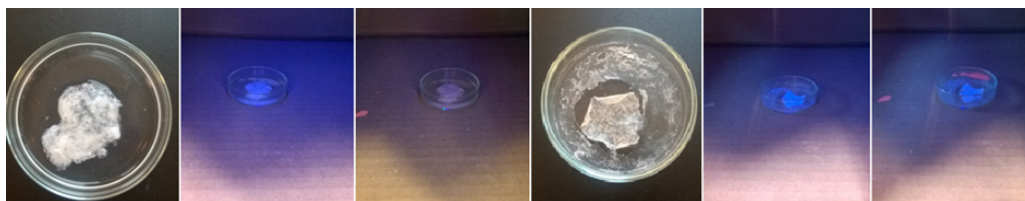
negativní *Serratia marcescens*. Dávkovány byly čtyři různě velké vzorky hydrogelu Aj-HyA formou diskové difúzní metody, z nichž můžeme konstatovat, že čím větší byl nanesen vzorek, tím větší inhibiční zóna byla utvořena. Jelikož roztok Aj-HyA kolem sraženiny vykazuje antimikrobiální účinky pouze u bakterie *Micrococcus luteus*, z tohoto usuzují, že tento roztok obsahuje pouze nezreagovaný aminojíl, který se nevsrážel s HyA.

6.6.1 Fluorescenční vlastnosti hydrogelu

Jelikož samotný aminojíl vykazuje luminiscenci v modré oblasti spektra pod UV lampou při 254 nm a 365 nm (Obr. 6.20), byla zjišťována luminiscence i pro hydrogel Aj-HyA (MMW) připravený dle návodu v kapitole 5.3.2.1.



Obrázek 6.20: Zleva: aminojíl na denním světle a pod UV lampou při 254 nm a 365 nm



Obrázek 6.21: Hydratovaný a vysušený vzorek Aj-HyA pod UV lampou při 254 nm a 365 nm

Pro zajímavost na závěr práce bylo zjištěno, že hydrogel Aj-HyA vykazuje luminiscenci v modré oblasti spektra pod UV lampou při 250 nm a 360 nm (Obr. 6.21). Luminiscence se jeví výraznější po vysušení vzorku hydrogelu. Autofluorescence komplexu je přisuzována defektům v krystalové mřížce aminojílu. V organismu lze pomocí fluorescenčně značených materiálů pozorovat jejich výskyt a působení, což je užitečné například pro cílené dopravení léčiv.

7 ZÁVĚR

Aminojíl je nový, synteticky připravený anorganicko-organický hybrid, který díky své dispergovatelnosti ve vodě může interagovat se záporně nabitými biomolekulami či syntetickými polymery. Takto lze připravit fázovou separací nanokompozitní hydrogely, které jsou velice žádané v medicínských aplikacích. Doposud však nebyla publikována možnost syntézy takového nanokompozitního hydrogelu pomocí aminojílu a přírodního biopolymeru, což bylo předmětem této diplomové práce.

Nejprve byla provedena rešerše ohledně biomedicínských aplikací aminojílu, na jejímž základě byly navrženy experimenty pro studium komplexu aminojílu s biopolymerem. Všechny navržené experimenty v této práci se zaměřovaly na výše zmíněnou oblast medicíny. Nejprve byl z řad biopolymerů vybrán hyaluronan sodný. Bylo zjištěno, že elektrostatickou interakcí vodného roztoku aminojílu s roztokem hyaluronanu sodného (MMW) vzniká po protřepání a následné fázové separaci vláknitý hydrogel Aj-HyA. Pro srovnání byl připraven i hydrogel obsahující aminojíl a nízkomolekulární (LMW) hyaluronan popř. polystyrensulfonát sodný (PSS). Po přidání LMW HyA do roztoku aminojílu dochází k částečné fázové separaci, avšak ne všechna vlákna se začleňují do komplexu. S PSS nedochází k žádné fázové separaci. Pokud je ovšem k PSS přidán HyA, dochází k částečné fázové separaci a vzniku drobné sraženiny. Kompaktní hydrogelový kompozit vzniká pouze při reakci vodného roztoku aminojílu s roztokem hyaluronanu sodného (MMW). Tato výsledná požadovaná kompozice byla tedy předmětem dalšího zkoumání.

Výsledkem mých experimentů bylo zjištění, že struktura hydrogelu Aj-HyA (MMW) je tvořena jak aminojílem, tak i hyaluronanem sodným, což bylo prokázáno pomocí prvkové analýzy SEM. Následně byla porovnávána krystalická struktura aminojílu a vysušené formy hydrogelu Aj-HyA pomocí XRD, kdy nedošlo k výraznému posunu mezirovinných vzdáleností destiček aminojílu vlivem vmezeření biopolymeru.

Po fázi zjištění základní struktury, byly následně zkoumány vlastnosti a chování hydrogelu Aj-HyA (MMW) za různých podmínek. Vznik hydrogelů je obecně ovlivňován iontovou silou. Při simulaci podmínek jako jsou v lidské plazmě (roztok o koncentraci 0,15 M) bylo zjištěno, že dochází ke vzniku hydrogelu Aj-HyA, přičemž výsledná sraženina má kompaktní charakter.

Dalším postupem bylo zkoumáno, jak bude sraženina hydrogelu reagovat v organických rozpouštědlech. Z hlediska medicíny je totiž důležité, aby hydrogel vykazoval stejné vlastnosti a charakter i při změně prostředí. K odstranění fází a rozpuštění vláknitého hydrogelu Aj-HyA (MMW) pomocí organických rozpouštědel došlo pouze u vodného roztoku amoniaku, nicméně po okyselení kyselinou octovou došlo k okamžitému rozpuštění i u vzorku dichlormethanu, chloroformu, methylacetátu a methyl terc-butyl etheru. Důležité je i časové hledisko, protože k rozpuštění vzorku Aj-HyA (MMW) po okyselení došlo v roztoku toluenu a demineralizované vodě, a to až po 20 hodinách působení.

Z hlediska optických vlastností nemá hydrogel Aj-HyA transparentní podobu, což může být u aplikace krytí ran nevýhodou, jelikož nelze kontrolovat průběh hojení.

Pro vlhké krytí ran je důležitá schopnost materiálu do sebe absorbovat sekret z rány. Proto byl hydrogel vysušen při 50 °C a následně byla zkoumána schopnost znovu vázat vodu a nabotnat. Experiment prokázal, že xerogel částečně vodu rehydratuje, avšak nabotná do jiného tvaru, než byl původní. V další části pokusu jsem xerogel rozemlela a zjistila, že rehydratací vzorky sice zase nabotnají, avšak se již nespojí v jeden celek. U rehydratovaného nerozemletého vzorku byl termogravimetricky zjišťován obsah vázané vody a pomocí reologie byl zkoumán viskoelastický charakter. Výsledky analýz jsou uvedeny níže.

Dále byla prověřována schopnost stability hydrogelu za extrémních teplotních podmínek. Při zmražení (a to i opakovaném) hydrogel vizuálně nejevil žádné rozdílné vlastnosti oproti čerstvě připraveným vzorkům. Tato skutečnost byla více prozkoumána pomocí termogravimetrie a reologie (uvedeno níže). Na opačné straně stupnice teplot, tedy zahřátím vzorku hydrogelu Aj-HyA (MMW) v teplotní komoře DTA až do 1200 °C bylo zjištěno, že vzorek je díky anorganické matici teplotně velice stabilní. Křivka DTA vykazovala tři inflexní body při 50 229,35 °C, 419,19 °C a 1008,01 °C. Při těchto hodnotách teplot dochází nejprve k dehydrataci vzorku, následně k rozkladu organické části a poté k rozkladu anorganické matrice. Jelikož vysoušení vody z gelové fáze začíná již při nízkých hodnotách teplot (důležitá informace pro skladování vzorků), byl nutný experiment i s pomalým ohřevem vzorku – tedy pouze do teploty 200 °C - pomocí metody termogravimetrické. U tohoto měření byl zjištěn rozdílný obsah vody u čerstvého vzorku hydrogelu Aj-HyA (92,29 %), rehydratovaného vzorku (90,16 %) a vzorku rozmraženého (90,89 %). Nicméně tyto rozdíly mezi hodnotami nejsou nijak markantní, což je velkým přínosem pro budoucí aplikaci, neboť i při změně podmínek je hydrogel schopen do sebe většinu vody opět nasáknout. Tato voda zajišťuje hydrataci rány, což je žádoucí pro rychlejší hojení lidských buněk.

Dalším aspektem, který bylo nutno posoudit, je skladování připraveného gelu. Vliv degradace skladovaných vzorků za různých podmínek byl proveden pomocí FTIR analýzy. Na základě snížených hodnot intenzit absorpance těchto vzorků oproti čerstvě připravenému vzorku Aj-HyA (MMW) bylo prokázáno, že největší degradaci vykazoval čerstvý hydrogel Aj-HyA (MMW) připraven ze zásobních roztoků skladovaných po dobu 7 dnů (roztok HyA byl skladován v lednici a Aj za laboratorní teploty). Z celé analýzy vyplývá, že stáří a skladování vzorků má vliv na míru intenzity elektrostatické interakce mezi aminojílem a hyaluronanem.

Dále byly zjišťovány mechanické vlastnosti hydrogelu. Reologickým měřením bylo prokázáno, že rehydratace či zmražení sraženiny Aj-HyA (MMW) nemá zásadní vliv na viskoelastické vlastnosti. V závislosti velikosti ztrátového úhlu na frekvenci oscilací totiž všechny vzorky vykazovaly hodnoty pod 20° ztrátového úhlu, což znamená docílení elastické vlastnosti tuhého gelu. Z hlediska stability tvaru hydrogel sice drží molekuly vody, avšak není tvarově pevný a nedá se z něj vyříznout požadovaný tvar. To má za následek, že pevnost v tahu a zjištění maximální hodnoty síly potřebné pro přetržení hydrogelu není možné exaktně změřit.

Pro snížení rizika vzniku infekce jsou u vlhkého hojení ran důležité antimikrobiální vlastnosti. Proto jsem v dalším experimentu zjišťovala bakteriostatický účinek. Jednoznačně byl prokázán bakteriostatický účinek hydrogelu Aj-HyA u gram pozitivní bakterie *Micrococcus luteus* a gram negativní *Serratia marcescens*. Tato vlastnost byla

zjištěna změřením velikostí inhibičních zón na agarové plotně, kdy mohu konstatovat, že čím objemově větší byl nanesený vzorek, tím větší inhibiční zóna byla vytvořena.

Pokud jde o zhodnocení zkoumaných systémů z hlediska jejich použitelnosti pro biomedicínské aplikace, konkrétně se nabízí vlhké krytí ran, je nutné provést další experimenty. Pro navazující experimenty navrhuji studovat bariérové vlastnosti hydrogelu Aj-HyA, jelikož je nutné vzniklé poranění na kůži chránit před vnějšími vlivy. Bariérové vlastnosti se stanovují pomocí propustnosti pro plyny a páry, které mohou prostupovat skrz gel permeací nebo únikem přes mikroskopické póry či defekty. Dále navrhuji sledovat difúzní procesy hydrofobní a hydrofilní látky skrz hydrogel, které by mohly naznačit difúzi skrz hydrogel. V neposlední řadě navrhuji zavést modelovou aktivní látku do hydrogelové matrice a sledovat její uvolňování do simulovaného lidského organismu, popřípadě zjistit vnější stimul pro její řízené uvolnění.

8 LITERATURA

- [1] VISERAS, C.; CERESO, P.; SANCHEZ, R.; aj.: Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science*, ročník 48, č. 3, 2010: s. 291 – 295, ISSN 0169-1317.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131710000219>
- [2] LOPEZ-GALINDO, A.; VISERAS, C.; CERESO, P.: Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products. *Applied Clay Science*, ročník 36, č. 1–3, 2007: s. 51 – 63, ISSN 0169-1317, doi:<http://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.016>, clays and HealthClays in Pharmacy, Cosmetics, Pelotherapy, and Environment Protection.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131706001451>
- [3] DATTA, K. K. R.; ACHARI, A.; ESWARAMOORTHY, M.: Aminoclay: a functional layered material with multifaceted applications. *J. Mater. Chem. A*, ročník 1, 2013: s. 6707–6718, doi:10.1039/C3TA00100H.
URL <http://dx.doi.org/10.1039/C3TA00100H>
- [4] NEČAS, J.; Barošíková, L.; Brauner, P.; aj.: *Hyaluronic acid (hyaluronan)*: a review. ročník 8, 2008: str. 397–411, [cit. 2017-03-15].
URL <http://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
- [5] PROCHÁZKOVÁ, A.: *Interakce aminojílů s polyelektrolyty přírodního původu*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 35 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [6] YANG, J.-H.; LEE, J.-H.; RYU, H.-J.; aj.: Drug–clay nanohybrids as sustained delivery systems. *Applied Clay Science*, ročník 130, 2016: s. 20 – 32, ISSN 0169-1317, doi:<https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.01.021>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131716300229>
- [7] CARRERRO, M. I.; POZO, M.: Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry: Part I. Excipients and medical applications. *Applied Clay Science*, ročník 46, č. 1, 2009: s. 73 – 80, ISSN 0169-1317, doi:<https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.07.017>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016913170900177X>
- [8] PLACHÁ, D.: Sorpce par naftalenu na organicky modifikovaný Vermikulit. *Chemické listy*, ročník 105, 2011: s. 186–192, ISSN 1213-7103.
URL http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_03_186-192.pdf

- [9] de PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V.: Organoclays: Properties, preparation and applications. *Applied Clay Science*, ročník 42, č. 1–2, 2008: s. 8 – 24, ISSN 0169-1317, doi:<https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.02.006>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131708000495>
- [10] Burkett, S. L.; Press, A.; Mann, S.: Synthesis, Characterization, and Reactivity of Layered Inorganic-Organic Nanocomposites Based on 2:1 Trioctahedral Phyllosilicates. *Chemistry of Materials*, ročník 9, č. 5, 1997: s. 1071–1073, doi: 10.1021/cm9700615.
URL <http://dx.doi.org/10.1021/cm9700615>
- [11] Yang, L.; Lee, Y.-C.; Kim, M. I.; aj.: Biodistribution and clearance of aminoclay nanoparticles: implication for in vivo applicability as a tailor-made drug delivery carrier. *J. Mater. Chem. B*, ročník 2, 2014: s. 7567–7574, doi: 10.1039/C4TB00953C.
URL <http://dx.doi.org/10.1039/C4TB00953C>
- [12] Lee, Y.-C.; Choi, Y.-S.; Choi, M.; aj.: Dual-end functionalized magnesium organo-(phyllo)silicates via co-condensation and its antimicrobial activity. *Applied Clay Science*, ročník 83–84, 2013: s. 474 – 485, ISSN 0169-1317, doi:<https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.10.007>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131712002657>
- [13] Chandrasekaran, G.; Han, H.-K.; Kim, G.-J.; aj.: Antimicrobial activity of delaminated aminopropyl functionalized magnesium phyllosilicates. *Applied Clay Science*, ročník 53, č. 4, 2011: s. 729 – 736, ISSN 0169-1317, doi: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.07.001>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169131711002407>
- [14] RATNER, B. D.: Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. [online]. 3. Amsterdam: Elsevier, 2013 [cit. 2017-04-30]. ISBN 978-008-0877-808.
URL https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpBSAIMM06/viewerType:toc/root_slug:biomaterials-science-an
- [15] NOVÁK, J.; BARTOVSKÁ, L.; BUREŠ, M.; aj.: Fyzikální chemie II. Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 319 s. ISBN 807080436X.
- [16] VELCER, T.: *Hyaluronanové hydrogely na bázi CTAT*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 102 s. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [17] VLADKOVA, T. G.: *Surface Engineering of Polymeric Biomaterials*. Smithers Rapra, 2013. ISBN 1847356583.
URL https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpSEPB0007/viewerType:toc/root_slug:surface-engineering-of

- [18] Zhao, L. Z.; Zhou, C. H.; Wang, J.; aj.: Recent advances in clay mineral-containing nanocomposite hydrogels. *Soft Matter*, ročník 11, 2015: s. 9229–9246, doi:10.1039/C5SM01277E.
URL <http://dx.doi.org/10.1039/C5SM01277E>
- [19] ROY; Niladri; SAHA, N.; aj.: *Inteligentní hydrogely*. Centrum výzkumu zdravotnických materiálů, Univerzitní institut, Univerzita Tomáše Bati. Zlín, 2012.
URL https://www.researchgate.net/profile/Lenka_Jelinkova/publication/230710197_Inteligentni_hydrogely/links/54745b140cf2778985abda1c.pdf
- [20] POSPÍŠILOVÁ, A.: *Léčba chronických ran moderními krycími prostředky*. Dermatovenerologická klinika LF MU a FN Brno, 2010.
URL <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2010/06/04.pdf>
- [21] Frenkel, J. S.: The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal*, ročník 11, č. 2, 2014: s. 159–163, ISSN 1742-481X, doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x.
URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x>
- [22] VELEBNÝ, V.: *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2009. Teze habilitační práce.
- [23] Schiraldi, C.; La Gatta, A.; De Rosa, M.: Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. 2010, kap. 20, s. 387–412, ISBN 978-953-307109-1.
URL <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>
- [24] HASCALL, L. T., V.: Hyaluronan: Structure and physical properties. Glycoforum [online], 1997, [cit. 2017-04-04].
URL [Dostupnéz:http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#IV](http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#IV)
- [25] Scott, J.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. Glycoforum. Glycoforum [online], 1998, [cit. 2017-04-04].
URL [Dostupnéz:http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html](http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html)
- [26] LEDNICKÝ, F.: *Mikroskopie a morfologie polymerů*. Díl 1., Mikroskopie polymerů a preparační techniky. Liberec: Technická univerzita, 2009, 71 s. ISBN 9788073724863.
- [27] CAIS, J.: *Elektronová mikroskopie. Metalografie*. 1. Praha: Centrum pro studium vysokého školství, 2015. ISBN 978-80-86302-67-6.
- [28] HOLUBOVÁ, R.: *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.

- [29] CHEN; T.N., D.; WEN, Q.; aj.: *Rheology of Soft Materials. Annual Review of Condensed Matter Physics*. [online]. 2010, 1, 301-322 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120. ISSN 1947-5454.
URL [Dostupnéz:http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120](http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120).
- [30] GRILLET, N. B. W. a. L. M. G., Anne M.: *Polymer Gel Rheology and Adhesion*. Rheology [online]. USA: Sandia National Laboratories, 2012, s. 60-80 [cit. 2017-04-13]. ISBN 978-953-51-0187-1.
URL [Dostupnéz:http://www.intechopen.com/books/rheology/rheology-and-adhesion-of-polymer-gels](http://www.intechopen.com/books/rheology/rheology-and-adhesion-of-polymer-gels).
- [31] MOTYKA, A.: *An introduction to rheology with an emphasis on application to dispersions*. Journal of Chemical Education [online]. Easton: American Chemical Society, 1996, roč. 73, č. 4, s. 374 [cit. 2017-04-13].
URL <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/pdf/10.1021/ed073p374>.
- [32] KLOUŽKOVÁ, A.; ZEMENOVÁ, P.; KLOUŽEK, J.; aj.: *Termická analýza*. Vysoká škola chemicko-technologická. Praha, 2012. Dostupné také z: [tren.svscht.cz/sil/sites/default/files/Termická20analýza.pdf](http://www.vscht.cz/sil/sites/default/files/Termická20analýza.pdf).
- [33] NĚMEC, M.; KOTOUČKOVÁ; L.; aj.: *MINIATLAS MIKROORGANISMŮ*. Fakulta potravinářské a biochemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze [online]. 2013 [cit. 2017-04-13].
URL <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>.
- [34] MATOUŠKOVÁ, P.: *Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických přípravcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 156 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..
- [35] Yang, L.; Shao, Y.; Han, H.-K.: Improved pH-dependent drug release and oral exposure of telmisartan, a poorly soluble drug through the formation of drug-aminoclay complex. *International Journal of Pharmaceutics*, ročník 471, č. 1–2, 2014: s. 258 – 263, ISSN 0378-5173, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.009>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314003263>
- [36] YANG, L.; HAN, H.-K.; CHOI, S.-K.; aj.: *3-aminopropyl functionalized magnesium phyllosilicate as an organoclay based drug carrier for improving the bioavailability of flurbiprofen*. *International Journal of Nanomedicine*. International Journal of Nanomedicine [online]. 2013, 8(1), 4147-4155 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.2147/IJN.S51756. ISSN 11769114.
URL <https://www.dovepress.com/3-aminopropyl-functionalized->

magnesium-phyllsilicate-as-an-organoclay-peer-reviewed-article-IJN.

- [37] Wang, S.; Cao, H.; Shao, Z.: Hydrophilic aminoclay-curcumin nanohybrids for enhanced chemotherapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, ročník 12, č. 2, 2016: s. 512 –, ISSN 1549-9634, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.186>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963415004116>
- [38] Patil, A. J.; Li, M.; Dujardin, E.; aj.: Novel Bioinorganic Nanostructures Based on Mesolamellar Intercalation or Single-Molecule Wrapping of DNA Using Organoclay Building Blocks. *Nano Letters*, ročník 7, č. 9, 2007: s. 2660–2665, doi: 10.1021/nl071052q, pMID: 17705435, <http://dx.doi.org/10.1021/nl071052q>.
URL <http://dx.doi.org/10.1021/nl071052q>
- [39] SONG, S. H. L. a. H.-K. H., Jae Geun: *Biophysical evaluation of aminoclay as an effective protectant for protein stabilization during freeze-drying and storage*. International Journal of Nanomedicine [online]. Dove Medical Press, 2016, 2016(11), 6609-6619 [cit. 2017-04-14]. DOI: 10.2147/IJN.S122726. ISSN 11769114.
URL www.dovepress.com/biophysical-evaluation-of-aminoclay-as-an-effective-protectant-for-pr-peer-reviewed-article-IJN
- [40] Lee, Y.-C.; Oh, S. Y.; Lee, H. U.; aj.: Aminoclay-induced humic acid flocculation for efficient harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. *Biore-source Technology*, ročník 153, 2014: s. 365 – 369, ISSN 0960-8524, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.103>.
URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413018658>
- [41] Martin, J. E.; Patil, A. J.; Butler, M. F.; aj.: Guest-Molecule-Directed Assembly of Mesostructured Nanocomposite Polymer/Organoclay Hydrogels. *Advanced Functional Materials*, ročník 21, č. 4, 2011: s. 674–681, ISSN 1616-3028, doi:10.1002/adfm.201002138.
URL <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201002138>
- [42] Johnsy, G.; Datta, K. K. R.; Sajeevkumar, V. A.; aj.: Aminoclay: A Designer Filler for the Synthesis of Highly Ductile Polymer-Nanocomposite Film. *ACS Applied Materials & Interfaces*, ročník 1, č. 12, 2009: s. 2796–2803, doi:10.1021/am9005226, pMID: 20356159, <http://dx.doi.org/10.1021/am9005226>.
URL <http://dx.doi.org/10.1021/am9005226>
- [43] RAO; Venkata, K.; DATTA, K. K. R.; aj.: Highly Pure Solid-State White Light Emission from Solution Processable Soft Hybrids. *Advanced Materials* [online]. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2013, 25(12): 1713-1718 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1002/adma.201204407. ISSN 09359648.

URL <http://onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/10.1002/adma.201204407/pdf>

- [44] WANG, P. L. a. H. L., Tianren: *Color-tunable luminescence of organoclay-based hybrid materials showing potential applications in white LED and thermosensors*. ACS applied materials and interfaces [online]. 2014, 6(15): 12915 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1021/am5028555.

URL <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/ipdf/10.1021/am5028555>

- [45] PROCHÁZKOVÁ, A.: *Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu aminojílů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 53 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZNAČEK A SYMBOLŮ

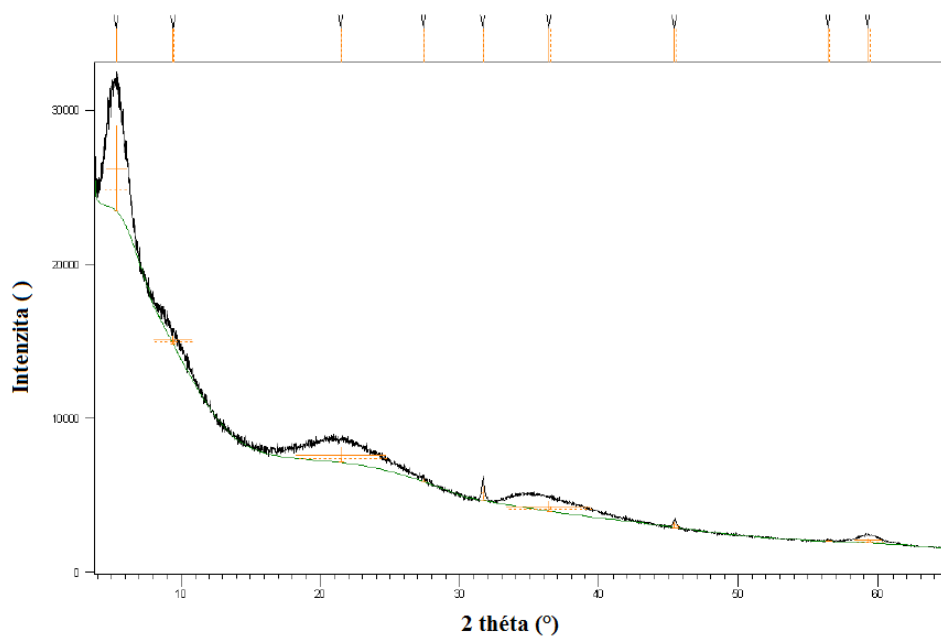
9.1 Použité zkratky

APTES	3aminopropyltriethoxysilan
Aj	aminojíl
Aj-HyA	komplex aminojílu a hyaluronanu sodného
BSA	hovězí sérový albumin
Cur	curcumin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTA	diferenční termická analýza
DTG	derivační termogravimetrie
EDS	energievě disperzní spektrofotometr
FB	flurbiprofen
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HyA	hyaluronan sodný
Ibu	ibuprofen
LED	dioda emitující světlo
LMW	nízkomolekulární hyaluronan sodný
LVO	oblast lineární viskoelastivity
MMW	hyaluronan sodný o střední molekulové hmotnosti
PSS	polystyrensulfonát
PHEMA	poly(2-hydroxyethyl-methakrylát)
PEG	polyethylenglykol
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TG	termogravimetrie
TEL	telmisartan
TEM	transmisní elektronový mikroskop
UV	ultrafialové světlo

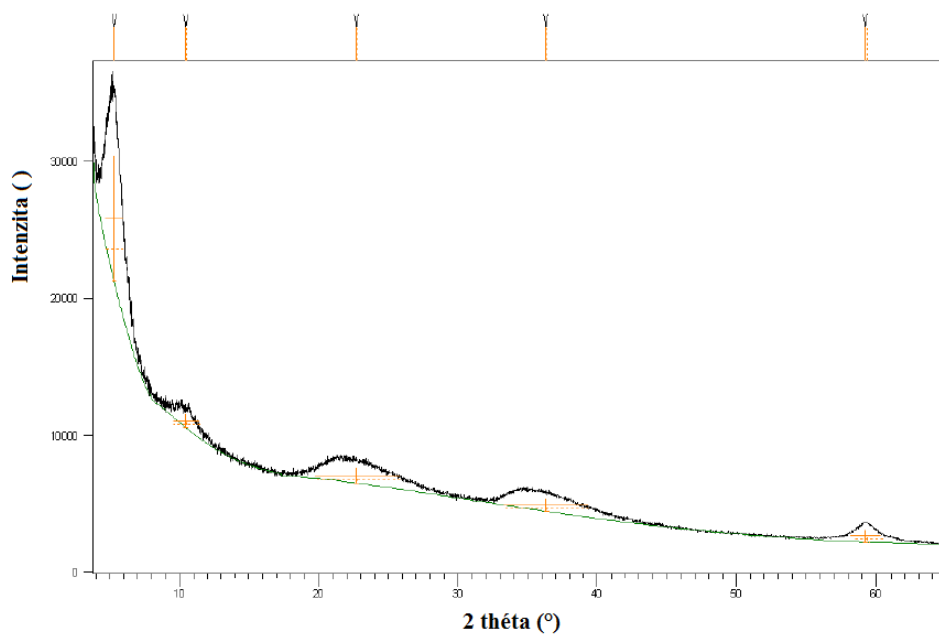
9.2 Použité symboly

\AA	Ångstrom
β	typ glykosidické vazby
d_{001}	mezirovinná vzdálenost
σ_{xy}	smykové napětí
η	dynamická viskozita
γ_{xy}	smyková rychlost
σ	mechanické napětí
ε	relativní prodloužení
G_E	Youngův modul pružnosti
δ	ztrátový úhel
G'	elastický (paměťový) modul
G''	viskózní (ztrátový) modul

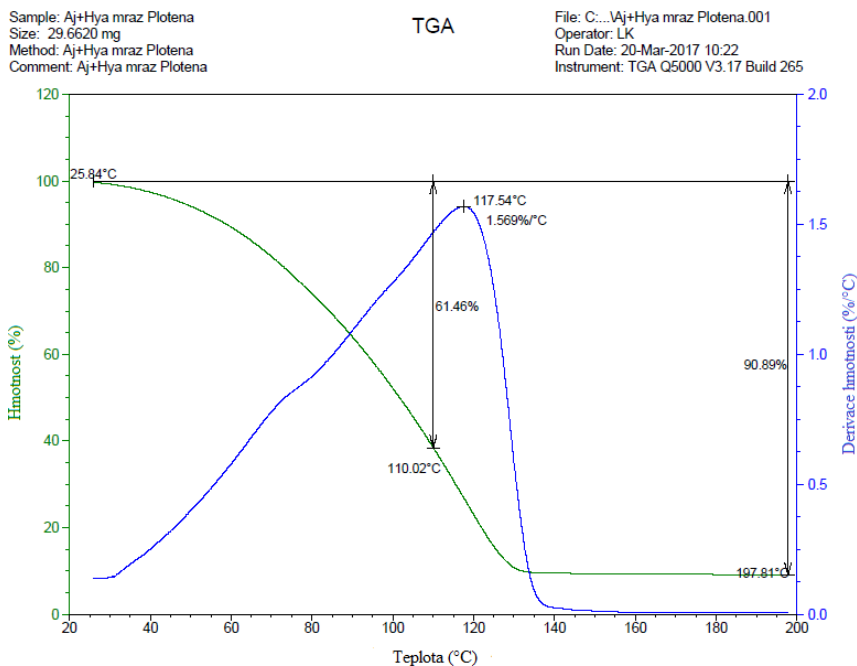
10 PŘÍLOHY



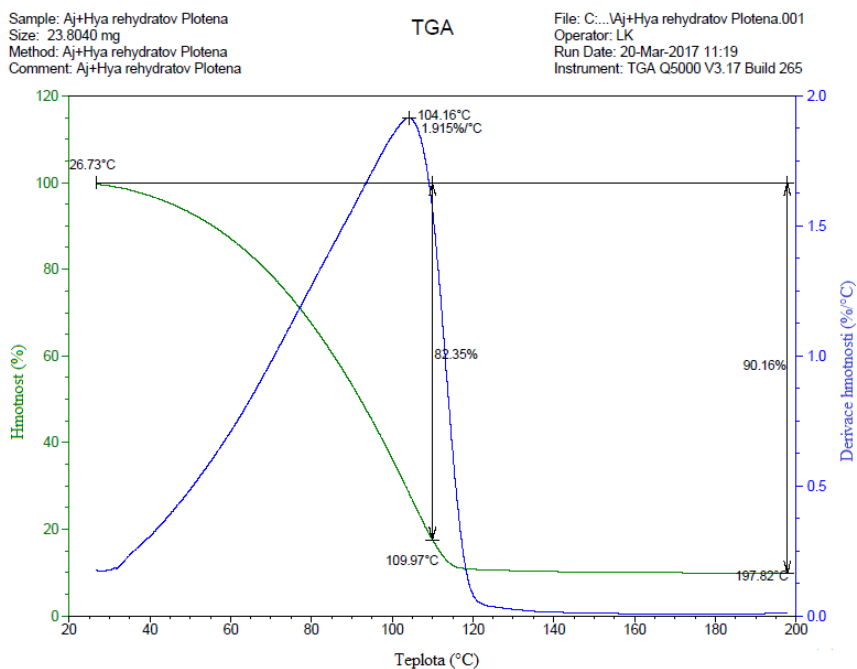
Obrázek 10.1: *Difraktogram xerogelu Aj+HyA*



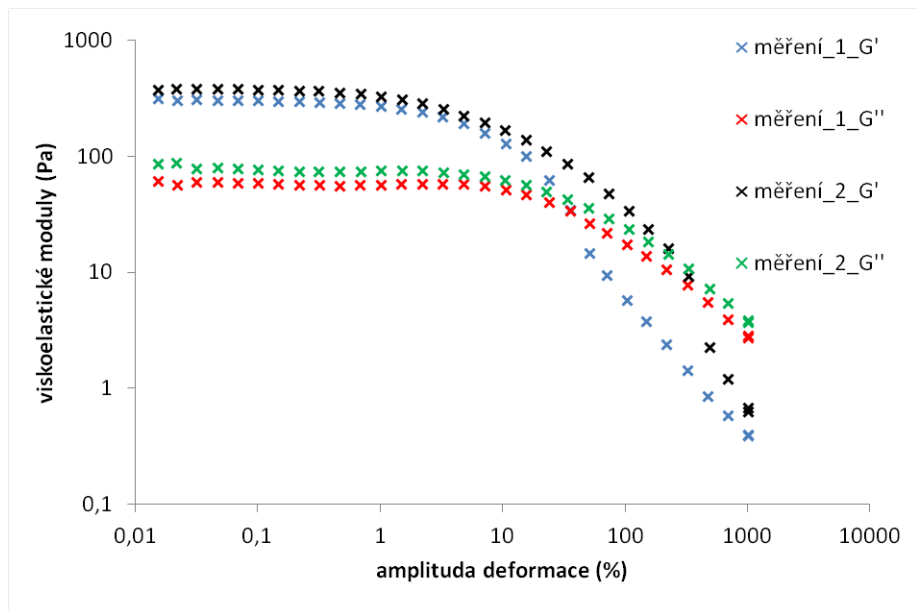
Obrázek 10.2: *Difraktogram vzorku aminojílu*



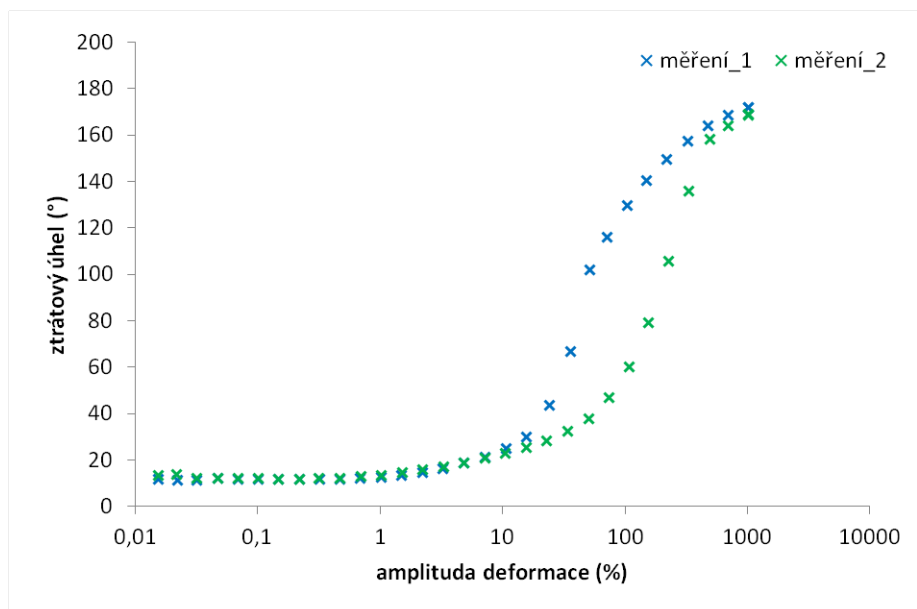
Obrázek 10.3: Termogravimetrická analýza rozmraženého vzorku hydrogelu Aj-HyA (MMW)



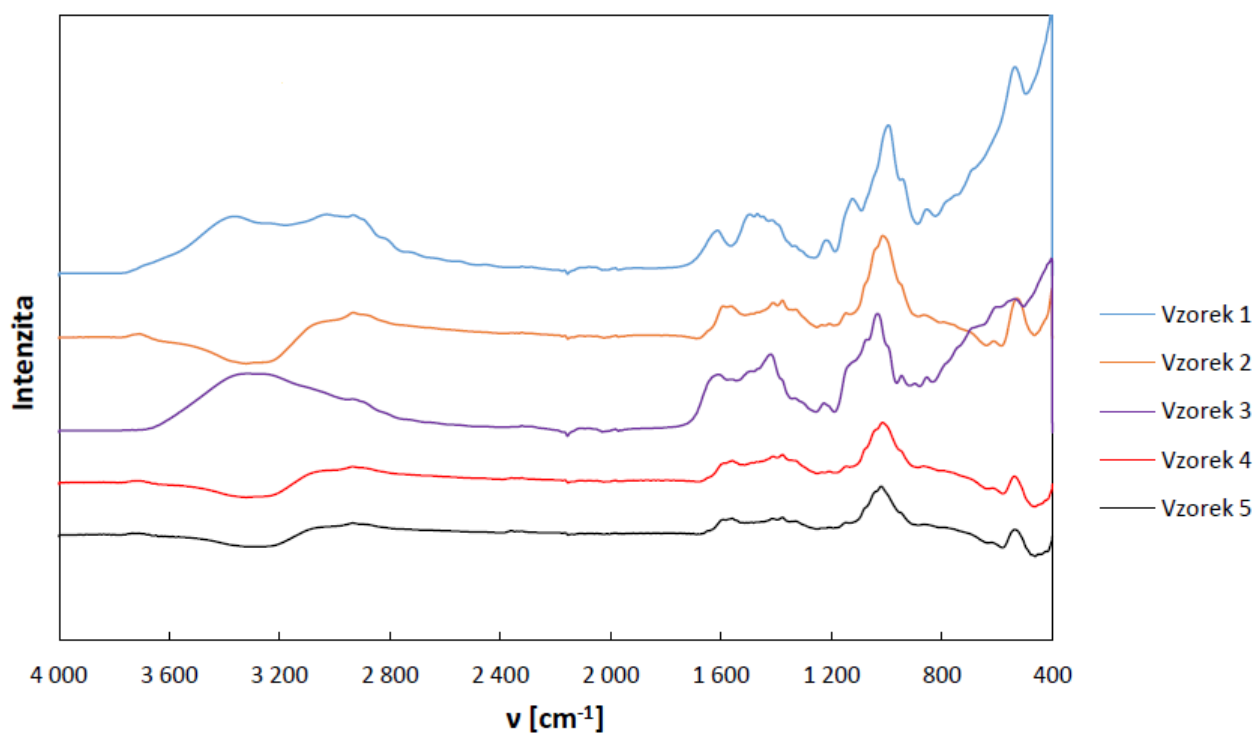
Obrázek 10.4: Termogravimetrická analýza rehydratovaného vzorku hydrogelu Aj-HyA (MMW)



Obrázek 10.5: Měření závislosti ztrátového a paměťového modulu na amplitudě deformace pro čerstvý vzorek hydrogelu Aj-HyA (MMW)



Obrázek 10.6: Závislost ztrátového úhlu na amplitudě deformace pro čerstvý vzorek hydrogelu Aj-HyA (MMW)



Obrázek 10.7: Naměřená spektra aminojílu a různě skladovaných vzorků Aj-HyA pomocí FTIR