Možnosti síťování hydrogelů přírodními látkami

Martin Hrabovský

Bakalářská práce
2014

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	Martin Hrabovský
Osobní číslo:	T11443
Studijní program:	B2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor:	Polymerní materiály a technologie
Forma studia:	prezenční
Téma práce:	Možnosti síťování hydrogelů přírodními látkami

Zásady pro vypracování:

Vypracování rešerše v oblasti hydrogelů:
- přehled používaných polymerních materiálů
- možnosti síťování hydrogelů
- charakterizace fyzikálních vlastností hydrogelů

Experimentální část
- příprava síťovaných biopolymerních hydrogelů
- charakterizace připravených hydrogelů
- zhodnocení budoucího aplikačního přínosu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

1) Ch. Harrats, S. Thomas, G. Groeninckx: Micro- and Nanostructured Multiphase Polymer Blend Systems: Phase Morphology and Interfaces
2) M. Chasin, R. Langer: Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **10. ledna 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **28. května 2014**

Ve Zlíně dne 7. února 2014

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ……. Obor: …….

P R O H L Á Š E N Í

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby [1)];
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 [2)];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

[1] *zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:*
(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.
(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.
(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.
[2] *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*
(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).
[3] *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*
(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.
(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.
(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je věnována hydrogelům na bázi biodegradabilních biopolymerů, vhodným pro použití v medicíně. Teoretická část práce se soustřeďuje na polymery používané pro přípravu hydrogelů a jsou rovněž představeny antiseptické látky přírodního původu, vhodné pro použití v hydrogelové matrici. Stručně jsou zmíněny i metody charakterizace hydrogelů. V experimentální části je popsána příprava hydrogelů složených ze želatiny, alginátu sodného a přírodního síťovadla genipinu. Připravené vzorky byly charakterizovány stupněm botnání (termomechanická analýza, gravimetrie), byly stanoveny jejich viskoelastické vlastnosti (dynamická mechanická analýza), morfologie (SEM mikroskopie) a struktura (infračervená spektroskopie).

Klíčová slova: hydrogel, želatina, alginát sodný, genipin, viskoelastické vlastnosti

ABSTRACT

The bachelor thesis is dealing with hydrogels based on biodegradable biopolymers, suitable for medical applications. The theoretical part of the thesis is focused on polymers used for the hydrogel preparation. Antiseptic substances of natural origin suitable for use in a hydrogel matrix are introduced as well. In addition, methods for hydrogel characterization are briefly mentioned. The experimental part describes the preparation of hydrogels composed of gelatin, sodium alginate and natural crosslinker genipin. The prepared hydrogels were characterized by a degree of swelling (thermomechanical analysis, gravimetry), by their viscoelastic properties (dynamic mechanical analysis), morphology (SEM microscopy) and structure (infrared spectroscopy).

Keywords: hydrogel, gelatin, sodium alginate, genipin, viscoelastic properties

Poděkování

Rád bych poděkoval Doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za pomoc, cenné připomínky, rady a hlavně trpělivost, které mi věnovala při psaní této bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat Doc. Ing Tomáši Sedláčkovi, Ph.D. který mi pomáhal při praktické části bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

……

Hrabovský Martin

OBSAH

ÚVOD **10**

I TEORETICKÁ ČÁST **11**

1 HYDROGELY **12**

1.1 KLASIFIKACE 12

1.2 PŘÍPRAVA 13

1.2.1 Chemické síťování 14

1.2.2 Fyzikální síťování 14

2 MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU HYDROGELŮ **15**

2.1 MATRICE 15

2.1.1 Syntetické polymery 15

2.1.1.1 Polyvinylalkohol 15

2.1.1.2 Polyethyleglykol 16

2.1.1.3 Polyvinylpyrrolidon 16

2.1.2 Přírodní polymery 17

2.1.2.1 Algináty 17

2.1.2.2 Želatina 18

2.1.2.3 Chitosan 19

2.1.2.4 Kyselina hyaluronová 20

2.2 SÍŤOVACÍ ČINIDLA PRO PŘÍPRAVU HYDROGELŮ 21

2.2.1 Genipin 21

2.2.2 Kyselina kávová 22

2.2.3 Kyselina tanninová 22

2.3 AKTIVNÍ LÁTKY 23

2.3.1 Antiseptika na přírodní bázi 23

2.3.1.1 Esenciální oleje 24

2.3.1.2 Rostliny s obsahem antiseptických látek 26

3 CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ **28**

3.1 BOTNÁNÍ 28

3.1.1 Charakteristika botnání 28

3.2 REOLOGIE 29

3.3 IR-SPEKTROSKOPIE 30

3.4 MIKROSKOPIE 31

4 UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK **33**

4.1 VLIV PH A IONTOVÉ SÍLY 33

4.2 VLIV TEPLOTY 33

II PRAKTICKÁ ČÁST **35**

5 CÍLE PRÁCE **36**

6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE **37**

6.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE 37

6.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ 37

6.3 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ 37

6.3.1 Základní hydrogel (SA/G) 37

6.3.2 Hydrogel síťovaný genipinem (SA/G-GP) 38
6.4 CHARAKTERIZACE HYDROGELU 39
6.4.1 Botnání 39
6.4.2 Viskoelastické vlastnosti 39
6.4.3 FTIR 40
6.4.4 Elektronová mikroskopie 40
7 VÝSLEDKY A DISKUSE 41
7.1.1 Botnání 41
7.1.2 Viskoelastické vlastnosti 42
7.1.3 Elektronová mikroskopie (SEM) 46
7.1.4 FTIR – ATR spektroskopie 48
8 ZÁVĚR 50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 51
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 56
SEZNAM OBRÁZKŮ 58
SEZNAM TABULEK 59

ÚVOD

Hydrogely, jsou polymerní materiály, které mají trojrozměrnou strukturu sítě a mohou značně botnat, aniž by se rozpouštěly. Jejich aplikační možnosti jsou široké. Lze je použít v zemědělství k zachycování vody a následnému zvlhčování půdy v okolí kořenů uvolňující se kapalinou; další využití pak nacházejí v medicíně a farmacii, kde jsou aplikovány jako matrice pro podávání léku s řízeným uvolňováním. Mohou být také použity ve formě scaffoldů pro růst buněk v tkáňovém inženýrství. Užitečné jsou rovněž jako materiály přicházející do kontaktu s povrchem těla, kde mohou sloužit jako obvazy na popáleniny a náplasti na podávání léčiv.

Ošetřování ran hydrogelovými obvazy je v dnešní době považováno za velmi dobrou alternativu klasických obvazů. Tyto hydrogelové obvazy umožňují udržet vhodnou vlhkost rány, uvolňovat léčivou látku a pomoci tak lépe k hojení. Zabraňují také infekci, která by se mohla dostat do rány z okolního prostředí. Zvyšují i komfort pacienta, jelikož je hydrogel vlhký, mírní bolest a teplotu v okolí rány. Hydrogelové obvazy jsou dvojího typu. Ty, které slouží k hydrataci tkáně a mohou být z 90 % nabotnalé. Tyto obvazy jsou přikládány až v závěrečné fázi léčby rány, kdy je potřeba pokožku hydratovat. Druhý typ hydrogelového obvazu se přikládá na čerstvé rány, kdy je snaha zabránit vzniku strupu. Tento obvaz odsává tekutinu a zároveň může dodávat pomocné látky k hojení.

Hydrogely se připravují síťováním polymerů, a to chemickým, fyzikálním nebo kombinací těchto dvou metod. Síťují se především syntetické ale i přírodní polymery. Kombinace přírodního a syntetického polymeru poskytuje tzv. „HI-TECH“ hydrogel, který je v dnešní době ve středu pozornosti.

Tato práce se zabývá přípravou hydrogelu z alginátu sodného a želatiny, který je zesíťován přírodním síťovadlem s nízkou toxicitou, genipinem. V prvním kroku bylo cílem připravit hydrogel bez aktivní látky s vhodnými viskoelastickými a botnacími charakteristikami. Tento hydrogel pak může být použit jako nosič antiseptických látek v biomedicínských aplikacích, například v náplastech uvolňujících vhodné přírodní antiseptikum. Zavedení aktivní látky do hydrogelu a její uvolňování bude předmětem dalšího studia.

I. TEORETICKÁ ČÁST

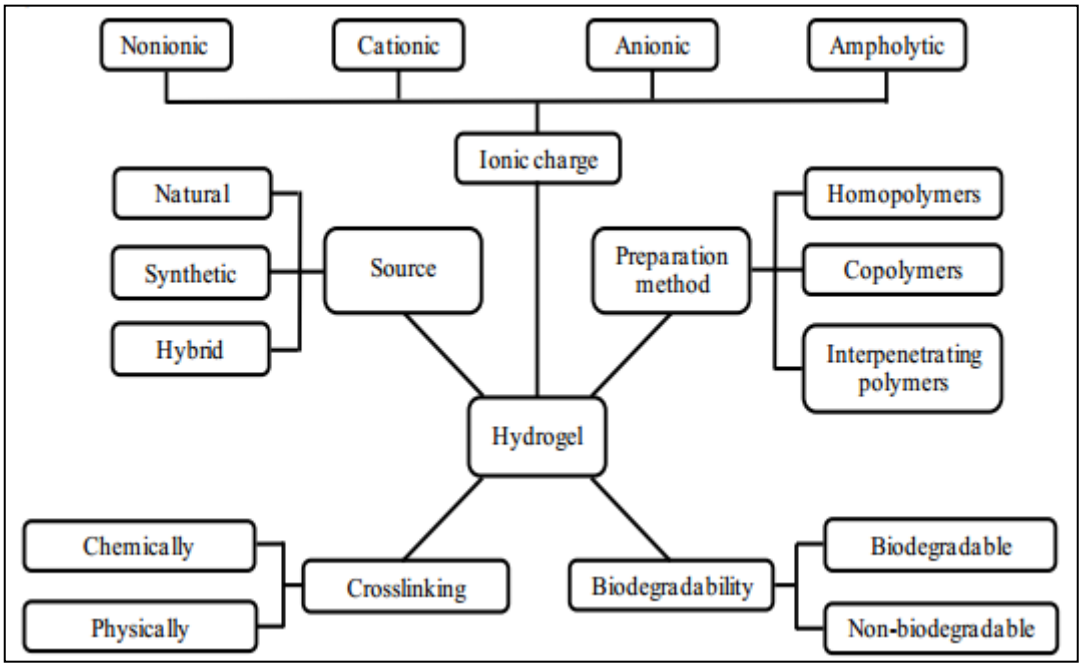
1 HYDROGELY

Hydrogely nebo obecně gely klasifikujeme jako tří rozměrné makromolekulární systémy, které mají schopnost botnat do rovnovážného stavu, aniž by došlo k jejich rozpuštění. Mohou tak absorbovat velké množství vody nebo biologických tekutin, což předurčuje jejich použití v medicíně, například při hojení ran. Aby vznikl samotný hydrogel, je třeba, aby se v jeho struktuře vytvořily intramolekulární vazby. Tyto materiály mají velmi dobré chemické fyzikální i mechanické vlastnosti v nabotnalém stavu[1].

1.1 Klasifikace

Hydrogely lze rozdělit do několika skupin a lze je klasifikovat podle řady hledisek. Jednou z možností je rozdělení na trvalé neboli chemické gely, které jsou síťovany kovalentní vazbou a dále na reverzibilní, neboli fyzikální gely, které jsou zesíťovány molekulárním zapletením. Tato zapletení mohou být rozrušena změnou fyzikálních podmínek nebo napětím (2).

Další možností jsou například klasifikace podle biodegrability, typu síťování, metody přípravy, náboje či původu. Klasifikace hydrogelů je přehledně uvedena na Obr. 1[3].



Obrázek 1: Klasifikace hydrogelů dle různých parametrů[3].

V případě rozdělení hydrogelů podle původu jejich složek je možné jmenovat dvě skupiny, a to na přírodní hydrogely, jejichž složkamy jsou přírodní polymery (alginat, chitosan, kolagen) a syntetické, tvoření polymery syntetickými (polyetylen oxid, polyhydroxy-1-ethylen).

Při klasifikaci podle složení pak rozdělujeme hydrogely na systémy tvořené homopolymery, kopolymery a hybridními polymery. Homopolymerní hydrogely jsou složeny jen z jednoho druhu hydrofilního monomeru, který je základní strukturní jednotkou této polymerní sítě. Homopolymery jsou zesíťovany dle povahy monomeru a polymerační techniky.

Kopolymerní hydrogely jsou složeny ze dvou nebo více různých monomerů, kde je alespoň jedna složka hydrofilní. A to v náhodném, blokovém či střídavém uspořádání polymerního řetězce. Hybridní polymerní hydrogel je složený ze dvou nezávisle zesíťovaných syntetických, přírodních nebo kombinací přírodních, syntetických hydrogelů. Z toho je jedna složka zesíťovaná a druhá je nezesíťovaná [2. 4].

Další rozdělení hydrogelů může být v závislosti na přítomnosti či absenci elektrického náboje, který se nachází na zesíťovaném polymerním řetězci, a to na neutrální, aniontové, kationové a amfolytické hydrogely. Mezi hydrogely bez náboje se řadí materiály tvořené polyvinylalkoholem, poly(2-prop-enamidem). Mezi iontové hydrogely se mohou zařadit ty, které jsou tvořeny např. želatinou [2, 4].

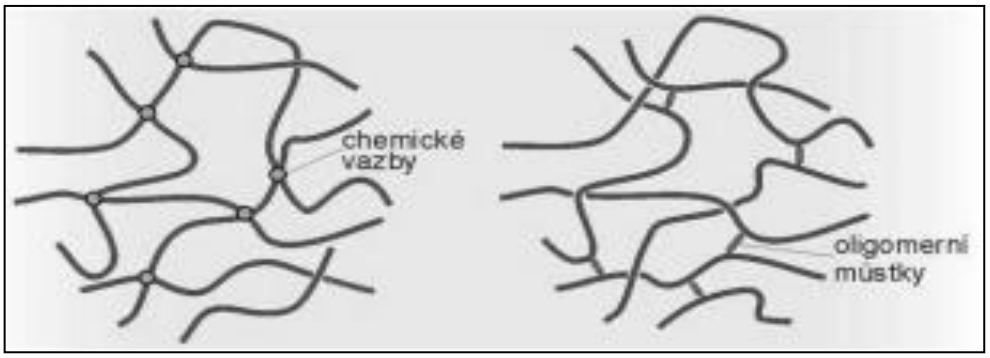
Mimo výše uvedené způsoby klasifikace je možno hydrogely dělit dále podle typu síťování, a to na materiály tvořené síťováním fyzikálním, nebo chemickým. Přes kovalentní vazby vzniklé chemickým síťováním se obvykle ještě vyskytují fyzikální sítě, které vylepšují vlastnosti hydrogelů [2. 4]

1.2 Příprava

Jak už bylo uvedeno výše, hydrogely jsou tvořeny polymerními sítěmi s hydrofilními vlastnostmi. Avšak do těchto hydrogelů je možno rovněž přidávat i hydrofobní polymery, které mají za úkol zlepšit jejich vlastnosti, a to především samotnou síť, pružnost a stabilitu ve vodném či pufrovaném prostředí [2].

1.2.1 Chemické síťování

Chemické síťování je postup, kterým se vytváří stabilnější hydrogely s lepšími mechanickými vlastnostmi, než mají hydrogely fyzikálně síťované. Chemického síťování může být dosaženo různými reakcemi, při kterých mezi atomy na polymerním řetězci vznikají kovalentní a iontové vazby [3, 5].

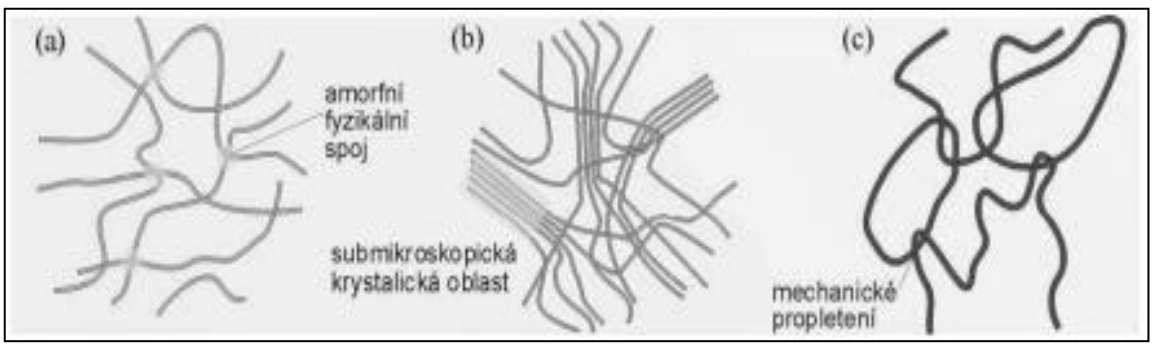


Obrázek 2: Schematické znázornění kovalentního síťování [39]

1.2.2 Fyzikální síťování

Fyzikální sítě v hydrogelech jsou tvořeny slabými, fyzikálními vazbami. Vazby, které se zde objevují, jsou především vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly nebo hydrofobní vazby. Prostřednictvím těchto slabých vazebných sil se makromolekulární řetězce spojují v uzlových bodech. Podle intenzity a struktury fyzikální sítě pak rozlišujeme silné a slabé gely.

Silné gely jsou spojeny v uzlových bodech, pevně a chovají se tedy podobně jako gely síťované chemicky a jsou pružné. Slabé gely jsou pak elastické pouze při nízkých hodnotách mechanického napětí. Jakmile dosáhnou a překročí statickou mez toku, začnou se nevratně deformovat [3, 5].



Obrázek 3: Gely síťované (a) silné gely, (b) gel se submikroskopickými krystalickými oblastmi, (c) gel tvořen spleteninami [39]

2 MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU HYDROGELŮ

Z praktického hlediska je možno materiály vhodné pro přípravu hydrogelů rozdělit na přírodní, syntetické a hybridní. Dále je také potřeba brát v úvahu budoucí použití připravovaného hydrogelu. Mezi přírodní materiály můžeme zařadit například chitosan, algináty, želatinu, kolagen, kyselinu hyaluronovou a mnoho dalších látek. Mezi materiály syntetické řadíme především polyethylenglykol, polyvinylalkohol, poly(2-propenamid) a další. V poslední řadě se objevují i hybridní materiály. Tyto materiály jsou složeny z různých směsí přírodních a syntetických materiálů.

2.1 Matrice

2.1.1 Syntetické polymery

2.1.1.1 Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol je syntetický polymer se strukturou 1,3-glykolu. Je to bílý prášek rozpustný ve vodě, kyselinách a je odolný organickým rozpouštědlům. Polyvinylalkohol se vyrábí hydrolýzou polyvinylacetátu rozpuštěného v metanolu za katalýzy hydroxidem sodným. Stupeň hydrolýzy a stupeň polymerace ovlivňují vlastnosti vzniklého polyvinylalkoholu. Polyvinylalkohol je tepelně stálý do 45 °C, při teplotě blízké 85 °C měkne, v okolí 150 °C se dá lehce tvarovat a při 200 °C se rozkládá. Stabilita, pevnost, protažení a flexibilita je zvyšována vzrůstající molekulovou hmotností polymeru.

Polyvinylalkohol dokáže absorbovat velké množství vody a při vyšších koncentracích reaguje s vodními alkáliemi za vzniku gelů. Gel obsahuje acetátové skupiny, které mohou ovlivňovat jeho vlastnosti.

Využití polyvinylalkoholu je velmi široké díky jeho vlastnostem a biodegrabillitě. Používá se v textilním průmyslu k úpravě vláken, při výrobě barev, lepidel a, kosmetiky. Ve zdravotnictví se například využívá na výrobu vstřebatelných chirurgických nití, obvazů nebo náplastí. Pro svou schopnost vázat vodu a vytvářet gel se využívá při léčebných procesech, kdy urychluje určité fáze hojení [1, 5].

2.1.1.2 Polyethyleglykol

Polyetylenglykol (PEG) se řadí mezi polyétherové polymery. Je tvořen dvou uhlíkovými atomy spojenými polyétherovými vazbami. Podle toho, jak je definován konstrukční monomer tohoto polymeru, je odvozen i jeho název. Lze se tedy setkat i s názvem poly(ethylenoxid) nebo poly(oxyethylen). PEG je chemicky inertní a netoxický polymer, což jej předurčuje k využití v medicíně. Stabilita, pevnost, protažení a flexibilita je zvyšována vzrůstající molekulovou hmotností polymeru [6].

Vlastnosti PEG závisí, obdobně jako u ostatních polymerů, na jeho molekulové hmotnosti. Například PEG 600 s molekulovou hmotností 600 $g.mol^{-1}$ má rozsah teploty tání 17-22 °C,. takže při pokojové teplotě může být kapalný. PEG 800-2000 $g.mol^{-1}$ se vyznačují pastovitou konzistencí. Je-li molekulární hmotnost nad 3000 $g.mol^{-1}$ má PEG pevnou strukturu a je ve formě vloček nebo prášku. Molekulová hmotnost muže dosáhnout až na 35 000 $g.mol^{-1}$.Se stoupající molekulovou hmotností stoupá tvrdost ale i teplota tání a to až k 60 °C. Důležitou vlastností PEGu je rozpustnost ve vodě. Nízkomolekulární PEG 600 je mísitelný s vodou v jakémkoli poměru, ale i pevný a prstovitý PEG je dobře rozpustný[6].

Využití PEG je ve farmaceutickém průmyslu velmi široké. V kapalné formě se přidává jako plnivo do želatinových tablet, aniž by tabletě snížil tvrdost. Lineární PEG s vysokou molekulovou hmotností vykazuje antiapoptickou aktivitu, která může být využita při ochraně a obnově buňky či tkáně. Úplné vysvětlení proč jsou PEG s delšími řetězci účinnější, než s krátkými není ještě známo [6,7]. Hydrogely, ve kterých je součást PEG se využívají jako nosiče léků nebo scaffoldy pro regeneraci tkání [7].

2.1.1.3 Polyvinylpyrrolidon

Monomer polyvinylpyrolidonu (PVP) je N-vinyl-2pyrrolidon. Je to bílý až žlutý prášek s charakteristickým zápachem. Je velmi dobře rozpustný ve vodě ale i v některých organických rozpouštědlech (alkoholy, kyseliny, laktamy) a je netoxický [8].

PVP se označuje K-hodnotou, která je vypočtena z jeho relativní viskozity ve vodě. Například PVP s komerčním názvem Povidon K 12 má molekulovou hmotnost 2000 až 3000 $g.mol^{-1}$. PVP také tvoří stabilní sloučeniny nebo komplexy s některými účinnými látkami, jako je třeba jód, který se využívá k desinfekci. Také jej lze využít v léčivech s postupným uvolňováním. PVP je možno síťovat silnou zásadou, čímž se stane nerozpust-

ným [9]. Dále se využívá pro přípravky v oční medicíně, zejména v kapkách proti vysychání očí a v roztocích pro kontaktní čočky [8].

Hydrogely na bázi PVP jsou známy především svým využitím v krytí ran a popálenin. Uvádí se však, že mají špatné mechanické vlastnosti a nízkou botnací kapacitu. Pokud se PVP smíchá s některým polysacharidem, začnou se vlastnosti hydrogelu zlepšovat. V současnosti se proto zkoumají tyto modifikované hydrogely[9].

2.1.2 Přírodní polymery

Přírodní polymery (biopolymery) jsou polymerní látky, které se vyskytují v přírodě v živých organismech. Patří zde čtyři základní typy sloučenin.

- Polypreny (kaučuk, gutaperča),
- Polysacharidy (celulosa, chitin, pektin),
- Bílkoviny (kolagen, myosin, enzymy),
- Nukleové kyseliny (RNA, DNA).

Biopolymery jsou charakteristické pravidelnou stavbou tvořenou několika definovanými základními jednotkami a mají také přesné prostorové uspořádání. [10, 11]. Vybrané biopolymery jsou stručně charakterizovány níže v textu.

2.1.2.1 Algináty

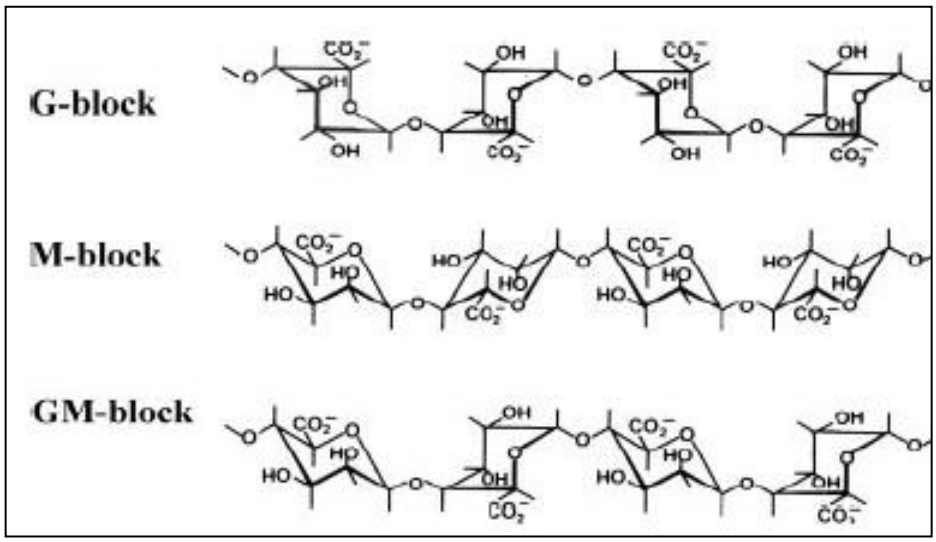
Jako algináty jsou označovány soli kyseliny alginové [12]. V přírodě se vyskytují v hnědých mořských řasách *Phaeophycae*, známých pod názvem chaluha. Algináty se nalézají v pevné stěně této řasy a zaujímají asi 40 % její sušiny. Podílí se na funkci strukturní a jsou součástí intracelulární matrice, která ovlivňuje mechanickou pevnost.

Dalším zdrojem alginátů mohou být i bakterie a to bakterie rodu *Azobacter* a *Pseudomonas,* u kterých bylo prokázáno, že se jejich některé extracelulární polysacharidy podobají složením i vlastnostmi alginátům. Tyto algináty se označují jako bakteriální algináty. Zatím není zcela zřejmé, jaké úlohy v bakteriích plní. Je pouze známo, že se podílí na tvorbě spor, které vytváří ochrannou vrstvu, chránící sporu před vyschnutím [12].

Algináty jsou negativně nabité, lineární, nevětvené kopolymery β-*D*-mannurové (M) a α -*L*-guluronové kyseliny (G), které jsou spojeny β-(1,4)-glykosidickými vazbami. Po hydrolýze a frakcionaci lze algináty rozdělit do tří skupin, ve kterých se střídají různé dlouhé

úseky obsahující pouze molekuly M nebo G nebo smíšené MG [13]. Základní struktura makromolekuly alginátu je uvedena na Obr. 4.

Farmaceutický průmysl často vyžaduje přesné složení molekuly alginátů, které však není možné zajistit produkcí z mořských řas. Proto se k farmaceutickým účelům využívá především polymerů bakteriálního původu. Jak již bylo uvedeno výše, jsou dva druhy bakterií schopné produkce alginátu. Bakterie *Pseudomonas aureginosa* je však patogenní, proto není pro farmaceutické aplikace příliš vhodná. Naopak *Azobacter vinelandii* je neškodná, půdní bakterie, která má i řadu jiných zajímavých vlastností. Například, dokáže vázat vzdušný dusík a známé je i její použití v biotechnologiích [13].



Obrázek 4: Struktura makromolekuly alginátu [13]

Algináty jsou schopné tvořit termostabilní gely a filmy. Gelace je způsobena interakcí karboxylátových skupin s dvojmocnými kationty. Jsou-li např. vápnikové kationty součástí vodné disperze alginátu sodného, lze výměnou sodíkových kationů za vápníkové získat gel. Přednostně se ionty Ca^{2+} váží na poly-guluronové jednotky alginátu. Ionty kovů v různých koncentracích mají vliv na vlastnosti gelu (pórovitost, stabilitu, …)[14]

Takto vyrobené gely se používají v různých odvětvích, jako je medicína, farmacie, potravinářství, biotechnologie.

2.1.2.2 Želatina

Želatina e průhledná, pevná látka nažloutlé barvy, bez zápachu a bez chuti. Vyrábí se kyselou nebo alkalickou hydrolýzou kolagenu. Kyselým způsobem se zpracovávají vepřové kosti, kožky a rybí kůže. Princip výroby spočívá v tom, že se výchozí materiál vloží do

kyselé lázně. Poté se vytáhne a po proprání vodou se následně zahřívá k bodu varu. Tím dojde k denaturaci kolagenu a vznikne želatina typu A. Alkalickým způsobem se zpracovávají spíše hovězí kůže, které se nejdříve nasolí nebo povápní. Kůže se nechají odležet. V tomto procesu se zmýdelní tuková tkáň nebo složky, které obsahuje a dále se rozruší rohová vrstva kůže. Vápněním se uvolňuje struktura kolagenu a ulehčuje se tak převod kolagenu do vodného roztoku. Po vápnění se opět kolagen propírá a upraví se na požadované pH a stejně jako u kyselého typu výroby se zahřívá. Takto vzniklá želatina nese značení B [12, 15].

Co se týká chemického složení, je želatina polyamfolytický, přírodní polymer obsahující 19 aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Může být hydrolyzována proteolytickými enzymy až na původní aminokyseliny nebo peptidové fragmenty.

Ve vodném prostředí želatina botná a při pokojové teplotě vytváří gely. Při zahřátí nad 37 °C pak přechází do roztoku [14]. Želatinové gely jsou tepelně reverzibilní. Tvorba gelu je způsobena tvorbou vodíkových můstků v molekule želatiny. Struktura vytvořeného gelu závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech želatiny a koncentraci obsažené želatiny v gelu. Jelikož želatinové gely ve svém nativním stavu mají špatné mechanické vlastnosti pro zvýšení pevnosti a soudržnost gelů kombinuje želatina s jinými polymery [16].

Želatina je netoxická, nekarcinogenní a biologicky degradovatelná. Díky těmto vlastnostem nachází uplatnění ve farmacii a biomedicíně [11].

2.1.2.3 Chitosan

Chitosan je nejznámější a nejdůležitější z derivátů chitinu. Strukturně se jedná o lineární semikrystalický polysacharid tvořen *N*-acetyl-β-*D*-glukosaminem spojeným β-(1,4)-glykosidickou vazbou [12]. Získává se alkalickou deacetylací chitinu, nejčastěji hydroxidem sodným nebo enzymatickým působením *N* – deacetylasy [17].

Vlastnosti chitosanu závisí na mnoha faktorech, například na koncentraci deacetylačního činidla, typu deacetylace (stupeň deacetylace se uvádí v procentech, obvykle 60 – 100%), hmotnostním zlomku chitinu, jeho původu a na použité zásadě. Deacetylace může být provedena homogenním nebo heterogenním způsobem. Homogenní metoda vychází z disperze chitin – zásada a poskytuje amorfní produkt se zvýšeným obsahem náhodně rozložených *N* – acetylovaných volných glukosaminových jednotek. Touto metodou vzniká chitosan rozpustný ve vodě, který má stupeň acetylace 48 – 55 % s nízkou molekulovou

hmotností. Alkalická deacylace probíhá rychle až ke stupni konverze 75 – 85 %. Po tomto stupni roste acetylace velmi pomalu [17].

Chitosan má velmi dobré biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Vzhledem k těmto vlastnostem je vhodný pro farmaceutické a medicínské aplikace. Uplatnění nalezne ale také v kosmetice, konzervaci potravin, čištění vody i pro impregnaci textilií [16 17]

Ve farmaceutických a medicínských odvětvích se chitosan stal velmi zajímavou látkou. Využívá se jako systém pro transport léčiv, kdy hlavním doménou je řízené uvolňování a cílení léčiva. Dalším významnou vlastností je, že chitosan vykazuje antibakteriální účinky, ať už vůči grampozitivním (*Staphylococcus aureas, Bacillus subtilis, ...*) tak i gramnegativním bakteriím (*Pseudomonas aeruginosa, Escheria coli, ...*). Jsou zaznamenány dokonce i jeho fungicidní účinky [17]

2.1.2.4 Kyselina hyaluronová

Molekula kyseliny hyaluronové (resp. její sodné soli hyaluronanu) se skládá z β-D-glukuronové kyseliny a β-N-acetyl-glukosaminu, vázaných mezi sebou β-(1,3)-glykosidickou vazbou. Molekula není rozvětvená a má molekulovou hmotnost 10^5 až 10^6 g.mol^{-1}, což odpovídá přibližně 2000 disacharidovým jednotkám [12].

Kyselina hyaluronová je hlavní intracelulární složkou pojivových tkání, ve kterých hraje důležitou roli v lubrikaci kloubů, buněčné diferenciace a růstu buněk. Dále má schopnost na sebe vázat velké množství vody a tím přispívat k hydrataci tkáně. Účastní se také imunologických procesů jako signální molekula. Vykazuje i dobré antioxidační vlastnosti a působí jako absorbent volných radikálů [16, 18].

Výrobu, či izolaci kyseliny hyaluronové je možno provádět několika způsoby. Záleží na tom, kam výsledný produkt směřuje, jestli bude používán ve farmaceutického nebo kosmetického průmyslu.

Prvním z možných postupů je výroba kyseliny hyaluronová z pupeční šňůry nebo kohoutích hřebínků. Tyto materiály se zmrazí, tím se rozruší buněčné stěny, následně se rozřežou na malé kousky. Poté se tyto kousky extrahují etanolem s přídavkem cetylpyridinium chloridu, chloroformu a vody. Takto získaný produkt se musí ještě upravit na požadované pH [18].

Další alternativou jsou biotechnologické postupy využívající bakterií, a to *Streptococcus equi, Streptococcus zoopidemicus, Streptococcus pneumoniae.* Kultivace těchto kmenů buněk se provádí v roztocích glukózy s obsahem kvasinek a soli při 33 °C a pH 8,5. Oslabené kmeny buněk se následně purifikují a v získané kyselině hyaluronové se snižuje obsah bílkovin. Takto připravena kyselina hyaluronová neobsahuje žádné znečištění živočišného původu. Naopak se zde mohou objevit bakteriální endotoxiny, těžké kovy a nukleové kyseliny.

Účinná metoda přípravy kyseliny hyaluronová je rovněž enzymatická syntéza. Při této metodě se používá enzym *hyaluronsynthasa*, který syntetizuje disacharidové struktury kyseliny hyaluronové. Konečný počet opakujících disacharidových jednotek může být 10000 i více [19].

Oblast využití kyseliny hyaluronové je velmi široká. Od různých kosmetických přípravků, které hydratují pokožku až po medicínské a farmaceutické aplikace. V tomto odvětví se využívá jako nosič účinných látek s řízeným uvolňováním. Používá se rovněž na výrobu zesíťovaných gelů, které se nazývají hylany. Tyto gely jsou velmi elastické. Připravují se chemickým síťováním, například formaldehydem v neutrálním prostředí nebo divinylsulfonem [12,19].

2.2 Síťovací činidla pro přípravu hydrogelů

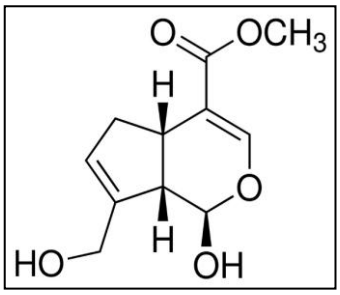
Síťovací činidla mohou být syntetického (glutaraldehyd), nebo přírodního charakteru. Jelikož je tato práce zaměřena na přípravu čistě přírodních hydrogelů, jsou níže uvedeny některé z přírodních síťovacích činidel.

2.2.1 Genipin

Genipin je aglykon odvozený od iridoidních glykosidů nazývaných geniposidy, které jsou přítomny v plodech rostliny gardénie jasmonidas *Gardenia jasminoides,* rostoucí na dálném východě a *Genipa americana,* jejíž domovem je tropická Amerika, Mexiko a Argentina [20, 21]

Genipin je hlavně využíván jako přírodní síťovadlo pro proteiny, kolagen, želatinu a chitosan. Je to bílá krystalická látka s molární hmotností 226 $g.mol^{-1}$ [22]. Dříve se využíval jako potravinářské modré barvivo. Pozorováním tvorby dimerů genipinu v přítomnosti glycinu vedlo k úvaze, využít jej jako kovalentní síťovadlo, a to především proteinů, které obsahují zbytky primárních aminových skupin. Jelikož má nižší toxicitu než alternativní

síťovadlo glutaraldehyd, je vhodným kandidátem pro využití ve farmaceutickém průmyslu [21, 22].

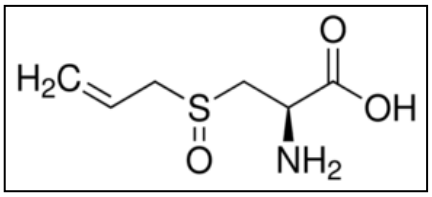


Obrázek 5: Molekula genipinu

2.2.2 Kyselina kávová

Kyselina kávová (kyselina 3,4-dihydroxyskořicová) je žlutá pevná látka s molární hmotností 180,16 $g.mol^{-1}$. Je složena z fenolických funkčních skupina stejně jako genipin. Kyselina kávová je obsažena běžně v plodinách, jako jsou kávová zrna, čajové listy a brambory.

Toto síťovadlo je používáno při síťování polymerů obsahujících aminovou skupinu. Stejně jak genipin vytváří kovalentní vazby [23, 24].

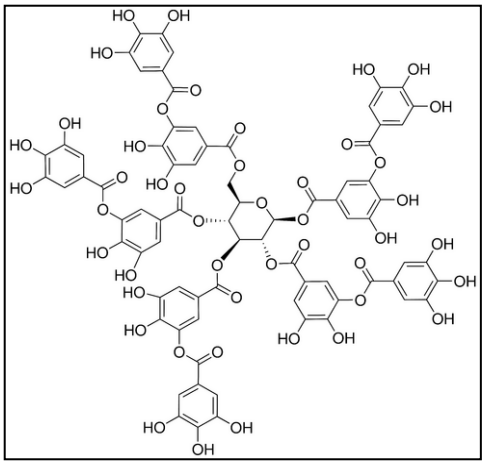


Obrázek 6: Molekula kyseliny kávové

2.2.3 Kyselina tanninová

Dalším přírodním síťovadlem vhodným pro síťování hydrogelů je kyselina taninová, která byla použita v práci [25] k síťování želatiny. Touto reakcí, provedenou při pH 9 vznikly nerozpustné hydrogely. Pomocí NMR pak bylo zjištěno, že při síťování dochází k reakci mezi aminoskupinou želatiny a fenolickou skupinou síťovala za vzniku kovalentních vazeb C-N, které tvoří síť.

Kyselina tanninová se získává ze škumpy čínské *Rhus chinensis.* je to světle žlutá až nahnědlá krystalická látka, řadící se mezi polyfenolové látky. Má antibakteriální a antioxidační účinky a je schopna vázat na sebe bílkoviny [26].



Obrázek 7: Molekula kyseliny tanninové

2.3 Aktivní látky

Aktivní látku lze definovat mnoha způsoby. Záleží, jak na ni pohlížíme a v jakém oboru je toto slovo používáno. V této práci se jedná o biologicky aktivní látku.

Biologicky aktivní látka je taková látka, která ovlivňuje život organismů tím, že se podílí na jejich stavbě nebo fungování [27]. Aktivní látky na přírodní bázi lze rozdělit podle funkce do několika skupin, které se liší svými účinky a následně i použitím. V práci budou představeny antiseptické látky.

2.3.1 Antiseptika na přírodní bázi

Antiseptikum je definováno jako látka zabraňující infekci a sepsi, tedy zaplavení organismu bakteriemi nebo otravě krve [28]. Antiseptika jsou antimikrobiální látky, které zabíjejí nebo inhibují růst a dělení mikroorganismů. Jsou dostatečně netoxické pro aplikaci na živou tkáň. Základním rozdílem mezi antibiotiky a antiseptiky je mechanismus účinku a jeho specificita. Antibiotika zasahují specificky do metabolismu a stavby mikrobů, antiseptika působí nespecificky na všechny buňky, narušují buněčný metabolismus, denaturují bílko-

viny a lipidy v buněčných stěnách. Stupeň účinku na lidské a bakteriální buňky je různý. Mnohdy jde o otázku koncentrace antiseptika, která je ještě baktericidní, ale zároveň netoxická k lidským buňkám. Antiseptika mají široké spektrum účinku a rezistence na ně vzniká jen vzácně [29]. Antiseptické vlastnosti byly prokázány u řady přírodních látek, z nichž některé jsou představeny v další části práce.

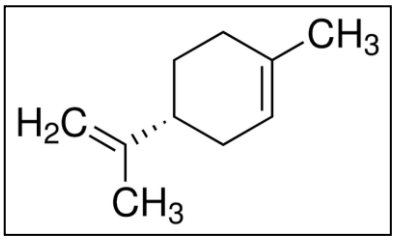
2.3.1.1 Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou bioaktivní látky přítomné v rostlinách, jsou lipofilní, ve vodě nerozpustné a vykazují řadu biologicky zajímavých vlastností. Nejdůležitějšími reprezentanty jednotlivých skupin chemických sloučenin obsažených v esenciálních olejích jsou monoterpeny, seskviterpeny a deriváty fenylpropanu. Antisepticky působí například limonen, karvakrol, thymol nebo eugenol [32].

Limonen

Limonen se řadí mezi monoterpenové uhlovodíky. Podle optické izomerie rozlišujeme *R*-limonen a *L*-limonen. Rozdělení mezi těmito izomery je velmi jednoduché *R*-limonen má pach po pomerančích, zatímco L-limonen má zápach po borovicích a terpentýnu.

R-limonen se vyskytuje v různých přírodně se vyskytujících éterických olejích. Jeho funkcí je předcházení dehydratace rostlin a potlačení mikrobiálního růstu při poranění rostlin. Tato přírodní látka vykazuje antibakteriální, antivirové a fungistatické účinky [30, 31]. Limonen inhibuje syntézu ubichinonu, který je nezbytný pro dělení buněk a tím je donutí k apoptóze [31].



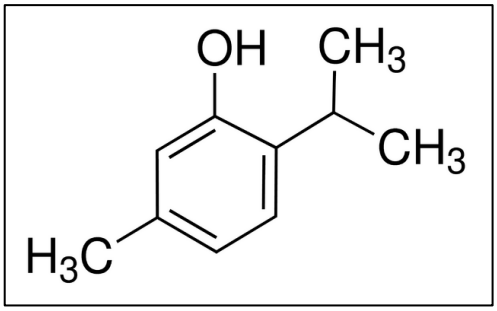
Obrázek 8: Molekula limonenu

Thymol

Thymol je základní složkou tymianového oleje (*Thymus vulgaris*), vyskytuje se v Oreganu (*Origanum vulgare L.*) a Majoránce zahradní (*Origanum majorana*). Tato látka se

řadí mezi deriváty fenylpropanu. Extrahuje se ve formě bílých krystalů, které mají silné antiseptické vlastnosti.

Thymol působí silně fungicidními a bakteriocidními účinky zvláště na gram-pozitivní bakterie a *Helicobacter pylori.* Také působí parazitům (*Trypanosoma*) a hlístům. Nicméně, se má za to, že je tymol toxický. Mezi toxické příznaky patří nevolnost, zvracení, podráždění, srdeční a dýchací kolaps [32].

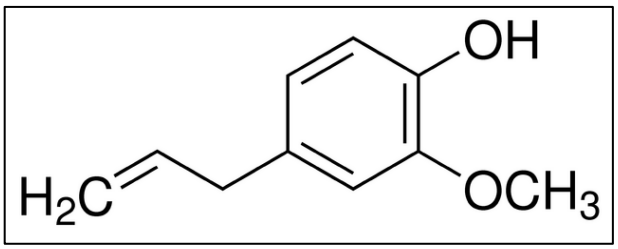


Obrázek 9: Molekula thymolu

Eugenol

Je látka, která se zejména nachází v tvrdých plodech Nového koření (*Pimenta diocia L.*), kde tvoří eugenol 60-80 % éterického oleje. Nejvíce eugenolu se nachází ve skořici (*Cinnamonum verum*), podle druhu rostliny se liší i obsah eugenolu. U Cejlonského druhu je v esenciálním oleji 80-88 % eugenolu a u Seychelského druhu 87-96 %. Tato světle žlutě olejovitá kapalina je dobře rozpustná v organických rozpouštědlech.

Eugenol vykazuje širokou antimikrobiální aktivitu vůči gram-pozitivním, gram-negativním, acidorezistentním bakteriím, plísním i parazitům. Byly i prokázány jeho anestetické a antipyretické vlastnosti [32].



Obrázek 10: Molekula eugenolu

2.3.1.2 Rostliny s obsahem antiseptických látek

Čajovník australský

Strom kajeput střídavolistý *Malaluca Alternifolia* lidově znám jako čajovník australský. K výrobě oleje se používají výhradně listy. Olej z této rostliny *(Tea tree oil)* je čirý nebo lehce nazlátlý a má specifickou kafrovou vůni. Jeho vlastností se využívá v kosmetice i medicíně, ale pouze ve zředěné formě, protože čistý olej vyvolává nežádoucí reakce.

Jeho listy obsahují okolo padesáti organických sloučenin, jako jsou α-pinen, β-pinen, α-terpinen, limonen, terpinen-4-ol a mnoho dalších. Terpinen-4-ol byl definován jako důležitá germicidní látka (ničí choroboplodné zárodky). Jiné složky oleje usnadňují vstřebávání do pokožky [33, 34]. Olej z čajovníku australského je účinný proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím, také je účinný proti plísním a kvasinkám. Předpokládá se, že jeho mikrobicidní působení spočívá v narušení buněčné stěny bakterie a v následné denaturaci proteinů [34].

Heřmánek pravý

Matricaria recutita L. neboli heřmánek pravý je jednoletá bylina, která má jednoduché, bílé okvětní lístky uložené okolo klenutého, žlutého lůžka, které je uvnitř duté. Heřmánek se bohatě využívá v léčitelství ať už vnitřně nebo zevně. Zevně působí heřmánek antisepticky a to již při nízkých koncentracích, pomáhá hojit špatně se hojící rány, popáleniny a vyrážky.

Účinnou látkou v heřmánku je silice, která obsahuje terpenové uhlovodíky (azulen, bisabolen, bisabolol, thujon), aromatické kyseliny (kyselina salicylová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina 4-methoxybenzenová, kyselina kávová), kumariny, flavonoidy a vitamíny (vitamín C)[35].

Česnek setý

Česnek setý *Allium sativum* je cibulovitá rostlina původem ze Střední Asie, odkud se rozšířila do celého světa. Vzhledem ke svým účinkům na lidský organismus je považován za jednu z nejcennějších plodin na zemi. Působí antisepticky, čehož se využívalo po staletí a pozitivně ovlivňuje celkový zdravotní stav. Česnek obsahuje vitamíny, minerální látky a bioaktivní látky. [36].

Hlavní účinnou látkou obsaženou v česneku je allicin. Je to lehce nažloutlá olejovitá tekutina česnekovitého zápachu a štiplavé chuti. Vzniká působením enzymu *allinázy* na allin,

při mechanickém porušení buněk. Antiseptická účinnost je závislá na přítomnosti kyslíku. Pokud je kyslíku málo bude působení allicinu méně účinné.

Dalšími bioaktivními látkami přítomnými v česneku jsou ajoen, který je produktem rozpadu allicinu a skordinin, který má mírné antibiotické účinky [37].

Výčet přírodních látek s antiseptickými vlastnostmi, které by bylo možno použít v hydrogelech, není zajisté úplný. Zde byly vyjmenovány jen ty nejběžnější antiseptické látky obsažené v rostlinách, se kterými se lze běžně setkat.

3 CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ

3.1 Botnání

Hydrogely v kontaktu s rozpouštědlem botnají omezeně. Po absorbování určitého množství rozpouštědla se mezi hydrogelem a rozpouštědlem ustaví rovnovážný stav. Při botnání vzrůstá objem hydrogelu a tím i dochází k elastické deformaci [38].

Omezené botnání je pohlcování kapaliny gelem, který při tom zvětšuje svůj objem až do stádia elastického hydrogelu a další kapalinu nepřijímá. U hydrogelů jejichž matrice tvořena polymery může tato situace nastat dvěma způsoby.

- Polymer je omezeně mísitelný s rozpouštědlem a tím vznikají dvě fáze: nasycený roztok polymeru v rozpouštědle a nasycené rozpouštědlo v polymeru (nabotnalý hydrogel) [40].
- Hydrogel má prostorovou síť tvořenou kovalentními vazbami, které brání odpoutávání jednotlivých makromolekula jejich přechodu do roztoku.

Lze se však setkat i s neomezeným botnáním, což je pohlcování kapaliny hydrogelem, které se nezastaví a za přítomnosti dostatečného množství rozpouštědla vede k dosažení takového stupně nabotnání, kdy se makromolekuly polymeru, ze kterého je hydrogel tvořen uvolňují do prostředí. Takto botnají hydrogely stabilizované fyzikální sítí.

O tom, jestli bude docházet k omezenému nebo neomezenému botnání rozhoduje pevnost uzlů v síti, struktura hydrogelu, vztah k rozpouštědlu i fyzikální podmínky [39, 40].

3.1.1 Charakteristika botnání

Botnání lze popsat několika parametry, které jsou uvedeny v této části práce.

- Stupeň nabotnání Q je definován jako hmotnost kapaliny pohlcené hydrogelem vztažená ke hmotnosti vysušeného hydrogelu. Stupeň nabotnání je funkcí času, po který botnání probíhá a zjišťuje se jako přírůstek hmotnosti nebo měřením objemu pohlcené kapaliny. Matematicky je definován Rov. (1)

$$Q = \frac{m_1 - m_0}{m_0} = \frac{\rho \cdot \Delta V}{m_0} \ , \tag{1}$$

kde m_1 je hmotnost nabotnaného hydrogelu, m_0 je hmotnost hydrogelu před botnáním, ρ je hustota kapaliny, ΔV je objem pohlcené kapaliny.

- Objemový koeficient botnání Φ udává poměr objemu nabotnalého hydrogelu k objemu hydrogelu v nenabotnalém stavu.
- Botnací tlak určuje afinitu hydrogelu k botnání v daném rozpouštědle. Gel botná, pokud má nižší tlak než je botnací tlak. Jestli se aplikuje vyšší tlak, než je botnací tlak, začne být kapalina vypuzována. Takto se dá ovlivňovat stupeň nabotnání [40].

3.2 Reologie

Reologie je věda, která studuje tvarové změny látek vzniklé působením vnějších sil. U hydrogelů se reologie věnuje především stanovení jejich viskoelastických vlastností. Viskoelastické materiály vykazují chování, které je kombinací mechanických vlastností viskózní tekutiny a pevné látky vykazující elasticitu. Působením napětí se v případě viskózních tekutin deformace lineárně zvyšuje v závislosti na čase, zatímco u materiálů elastických závisí deformace jen na velikosti napětí.

Informace o viskoelastických vlastnostech hydrogelů podle odezvy vzorku na smykovou deformaci poskytuje dynamická mechanická analýza. V dynamickém experimentu je materiál vystaven cyklickému namáhání

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \ , \tag{2}$$

kde γ_0 je amplituda smykové deformace, ω je oscilační frekvence a t je čas.

Mechanická odezva materiálu, vyjádřená jako smykové napětí σ viskoelastického materiálu, se nachází mezi odezvou ideálního elastického tělesa a ideální viskózní tekutinou. Pro vztah napětí a deformace při viskoelastickém namáhání platí rovnice:

$$\sigma = G(\omega)\gamma_0 \sin(\omega t + \delta p) \tag{3}$$

kde δ je fázový posun mezi napětím a deformací

Absolutní dynamický modul pružnosti ve smyku je pak definován Rov. (4).

$$G = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \tag{4}$$

Reálná složka dynamického modulu charakterizuje pevnostní vlastnosti materiálu (Rov. 5).

$$G' = \frac{\sigma_0'}{\gamma_0} \tag{5}$$

Imaginární složka dynamického modulu popisuje jeho viskózní charakter (Rov. 6).

$$G'' = \frac{\sigma_0''}{\gamma_0} \tag{6}$$

Poměr mezi viskózním modulem a modulem elasticity se nazývá ztrátový modul kde δ je fázový úhel (Rov. 7).

$$tg\delta = \frac{G''}{G'} \tag{7}$$

Při nižších hodnotách fázového posunu $\delta \rightarrow 0$ převažují elastické vlastnosti, naopak při vyšších hodnotách fázového posunu $\delta \rightarrow \frac{\pi}{2}$ převažují tlumící vlastnosti u viskoelastických materiálů [41].

3.3 IR-spektroskopie

Metoda infračervené spektroskopie (IR) je založena na interakci elektromagnetického záření o vlnočtu 10 – 10 000 cm^{-1} s analyzovanou látkou Toto záření má již takovou energii, které svou absorpcí do molekuly změní její rotační nebo vibrační stav. Podle rozsahu vlnočtů dělíme IR spektroskopii na spektroskopii v blízké (10000 – 4000 cm^{-1}), střední (4000 - 400 cm^{-1}) a vzdálené oblasti (400 – 10 cm^{-1}).

Infračervenými spektry se tedy sledují vibrační a rotační přechody v molekulách. Pokud jsou tyto stavy spojeny se změnou dipólových momentů, dochází k adsorpci konkrétních kvant záření, která jsou charakteristická pro každou molekulu. Nejvíc adsorpčních pásů pro organické molekuly se nachází ve střední IR oblasti [42]. V praxi existuje řada experimentálních postupů, které lze při IR analýze využít. K běžným metodám patří následující.

- FTIR metoda pracuje na principu interference spektra, které na rozdíl od disperzních přístrojů měří interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Aby bylo možné zisk klasický spektrální záznam, vyžadují tyto přístroje použití matematické metody Fourierovy transformace. Při měření dopadá na detektor vždy cely svazek záření, což umožňuje i provedení experimentů, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, tj. měření silně absorbujících vzorků. S těmito přístroji lze provádět i měření s nástavci pro analýzu pevných či kapalných vzorků v odraženém světle – reflektanční infračervená spektroskopie (DRIFT).

- DRIFT metoda byla vyvinuta na zkoumání práškových vzorků. Při této technice se infračervené záření přivádí na práškový vzorek, část je absorbována, část je odražena ve formě spekulární složky a část je rozptýlena.
- ATR metoda je založena na principu jednoduchého nebo vícenásobného odrazu záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřícího krystalu. Svazek paprsků je přiveden do krystalu, tak aby vyhovoval podmínce úplného odrazu. Vzorek je v dokonalém kontaktu s ATR krystalem, aby bylo dosaženo dostatečného průniku záření do vzorku. Pokud měrný vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, bude v totálně odraženém záření vlna zeslabena. Možností vícenásobného odrazu se získá velmi kvalitní spektrum. Jelikož je vzorek v těsném kontaktu s krystalem je tato metoda vhodná pro charakterizaci hydrogelů [43, 44]. Pro výrobu měrných ATR krystalů se nejčastěji používá selenid zinečnatý (ZnSe), germánium (Ge), nebo křemík (Si). Následný výběr krystalu pro měření závisí, v jaké oblasti IR spekter bude analýza prováděna, na tvrdosti materiálu nebo jeho pH [44].

3.4 Mikroskopie

Mikroskopie umožňuje studování povrchů materiálů, které nejsou viditelné pouhým okem. Způsoby mikroskopického rozlišování závisí na druhu záření přicházejícího do objektu (světlo, UV-záření, IR-záření), nebo na uspořádání optické soustavy mikroskopu. Pokud nestačí rozlišovací schopnost světelné mikroskopie, lze využít elektronovou nebo mikroskopii atomárních sil [45].

Pro studium hydrogelů je vhodná mikroskopie elektronová, jelikož poskytuje informace o vnitřní struktuře materiálu. Zvláště důležité je sledovat velikosti pórů nebo rozložení, či homogenitu připraveného materiálu. Tyto vlastnosti mají vliv na celkové chování hydrogelů.

Elektronová mikroskopie využívá k zobrazování pohybující se elektrony. Ty mají dle de Broglieho teorie vlnovou povahu. Látky jsou studovány ve vakuu pomocí elektronového svazku vznikajícího emisí elektronů. Svazek elektronů dále je fokusován elektrickým či magnetickým polem, což umožňuje dosažení žádaného zvětšení. Elektrony interagují se studovaným vzorkem, čímž se vytváří obraz.

Složení tubusu elektronového mikroskopu je téměř analogické s mikroskopem optickým. Obsahuje zobrazovací systém skládající se z elektromagnetických čoček, clon a také elektronovou tryskou, která vytváří zdroj elektronů [46].

Typy elektronových mikroskopů se liší podle způsobu zobrazeni. Nejčastěji jsou používány následující mikroskopické techniky

- TEM – transmisní elektronový mikroskop, využívá průchodu elektronu vzorkem. Pro zvětšení kontrastu se do vzorku přidávají těžké kovy (Pb, Os).
- SEM – skenovací elektronový mikroskop zobrazuje povrch materiálu prostřednictvím sekundárních nebo odražených elektronů. Sekundární elektrony, mají přibližnou energii 50 eV a vystupují z hloubky řádově desítek nm, kopírují tedy povrch vzorku, čímž se a získává informace o jeho topografii.[46]

4 UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK

Uvolňování aktivní látky z matrice, a tedy i z hydrogelu, lze sledovat pomocí analýzy rozpouštědla, ve kterém byl hydrogel vložen. Tuto analýzu je možno provést například pomocí UV-VIS spektrofotometrie, kde je však třeba dbát na to, aby aktivní látka v UV-VIS oblasti absorbovala. Další vhodnou metodou může být sledování změn pH roztoku a podle povahy aktivní látky lze rovněž využít dalších metod, jako je odměrná analýza či chromatografie.

4.1 Vliv pH a iontové síly

Botnání hydrogelu, a tím i uvolňování aktivní látky z jeho matrice, je závislé na řadě obecných faktorů. Jedním z parametrů je hustota sítě vzniklé během síťování. Pokud se hustota sítě zvýší, klesne stupeň nabotnání a sníží se tak uvolňování aktivní látky. Je nutné brát v úvahu i parametr rozpustnosti daného rozpouštědla. Dalšími důležitými faktory jsou pH a iontová síla média ve kterém je hydrogel umístěn a které jsou důležité především pro hydrogely na bázi polyelektrolytů. Vliv pH byl například popsán při botnání hydrogelu na bázi želatiny a chitosanu, kde se vzrůstem pH vzrostla stabilita sítě a snížilo se tak uvolňování aktivní látky. V iontově síťovaných hydrogelech může být změnou pH modifikována hustota sítě. Zvýšení iontové síly snižuje repulze mezi řetězci a způsobuje smrštění polymerního řetězce, čímž se botnání sníží. Hydrogely z vysoce polárních polymerů (např. některé deriváty celulózy) vyžadují pro zbotnání polární rozpouštědla, ve kterých vznikají dipolólové interakce nebo vodíkové můstky mezi molekulami polymeru a rozpouštědla. Iontově síťované hydrogely mohou botnat v kyselých i zásaditých roztocích, čímž se zvyšují potenciální aplikace tohoto hydrogelu. Pokud se hodnota pH snižuje, zvyšuje se i botnání. Uvolňování látek z tohoto hydrogelu je navíc ovlivněno odpudivými interakcemi mezi volnými aminoskupinami želatiny nebo chitosanu.

Uvolňování aktivní látky je také závislé na rozmístění aktivní látky v síti, dále na její molární hmotnosti a rozpustnosti [47].

4.2 Vliv teploty

Uvolňování aktivní látky v závislosti na změnách teploty využívají tzv. termosenzitivní hydrogely. V závislosti na okolní teplotě mohou tyto materiály botnat nebo se smršťovat. Termosenzitivní hydrogely mohou být klasifikovány do tří skupin, na pozitivně a negativně senzitivní a teplotně reverzibilní. Rozdělení závisí na tom, kde má hydrogel kritickou

teplotu rozpouštění. Pokud je to horní kritická teplota (UCST) jedná se o pozitivně termocitlivý hydrogel. Takový hydrogel reaguje při teplotách nižších než UCST. Jedná-li se o dolní kritickou teplotu (LCST) mluvíme o negativně termocitlivých hydrogelech. Tepelně reverzibilní gely jsou pak ty, které jsou schopny opakovaného přechodu sol-gel se změnou teploty.

Systém *on-off* uvolňování aktivní látky z hydrogelu je závislý na postupné změny teploty okolí. Při dosažení určité hraniční teploty se začne gel smršťovat a tím vytvářet hustší síť, kterou aktivní látka neprojde [48, 49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo připravit základní hydrogelovou matrici složenou z alginátu sodného (SA) a želatiny (G), (SA/G). V dalším kroku bylo úkolem tuto matrici síťovat přírodním síťovadlem genipinem (GP) a připravený hydrogel (SA/G-GP) pak charakterizovat pomocí následujících metod:

- SEM-mikroskopie (morfologie);
- FTIR-ATR spektroskopie (obsah charakteristických funkčních skupin);
- DMA (viskoelastické vlastnosti);
- Gravimetrie, TMA (stupeň botnání hydrogelu).

6 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

6.1 Použité materiály a chemikálie

Pro přípravu hydrogelu byly použity následující materiály

- Alginát sodný (W201502), molární hmotnost ca 40000 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Želatina (typ B z hovězí kůže), Bloomovo číslo 225, molární hmotnost 142000 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Poly(ethylen glykol),(PEG), molární hmotnost 3500-4500 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Genipin (G4796), molární hmotnost 226,23 g/mol (Sigma-Aldrich).
- Chlorid sodný NaCl, čistota p. a., molární hmotnost 92,10 (Penta).
- Glycerol (ρ = 1,258 kg/m^3) molární hmotnost 58,44 g/mol (Penta)
- Destilovaná voda ($\rho_{20°C}$= 998,21 kg/m^3)

6.2 Použité přístroje a vybavení

- SEM-skenovací elektronový mikroskop (VEGA3-LMU,TESCAN, ČR)
- FTIR spektrometr s ATR nástavcem (Nicolet 320, Nicolet Instrument Corp., USA)
- Dynamický mechanický analyzátor,
- DMA (Mettler Toledo, DMA/SDTA 861, Švýcarsko)Termomechanický analyzátor, TMA (Mettler Toledo TMA/SDTA 841, Švýcarsko)
- Rotační viskozimetr (Anton-Paar MCR 502, Polsko)
- Další laboratorní vybavení, analytické váhy, kádinky, magnetické míchadlo s ohřevem (Heildolph), ultrazvuková lázeň (PS-40 Hz), míchadlo, exikátor.

6.3 Příprava hydrogelů

6.3.1 Základní hydrogel (SA/G)

Nejprve byla provedena příprava základní hydrogelové matrice složené z želatiny a alginátu sodného (SA/G) v poměru 1:1 (m/m). Množství jednotlivých surovin potřebné k přípravě tohoto nezesíťovaného hydrogelu jsou uvedena v Tab. 1. Byl použit následující postup. Ve vodě bylo při 60 °C za současného míchání (150 rpm) rozpuštěno příslušné množství želatiny. Poté byl přidán alginát sodný a směs byla dále míchána po dobu 30 mi-

nut. Po dostatečné homogenizaci byl dále přidán NaCl a glycerol a otáčky míchadla byly sníženy na 100 rpm. Při těchto otáčkách byla směs míchána dalších 15 minut. Na závěr byl po malých dávkách přidán PEG. Po dobrém promíchání byla kádinka se směsí vložena do ultrazvukové lázně (PS-40 Hz). Lázeň byla předehřátá na teplotu 60 °C. Po vložení kádinky do lázně byl na 15 minut zapnut ultrazvuk, aby byly ze směsi vytěsněny vzduchové bubliny. V konečném kroku byla směs nalita do formy a ponechána při laboratorní teplotě vysušit v exikátoru.

6.3.2 Hydrogel síťovaný genipinem (SA/G-GP)

Množství síťovadla, genipinu, i doba síťování byly zvoleny na základě předchozích testů uvedených v práci [3]. Obdobně jako při přípravě hydrogelové matrice byla nejprve ve vodě rozpuštěna želatina (60 °C, otáčky 130 rpm). Po jejím rozpuštění byla teplota snížena na 37 °C a bylo přidáno 1 hm. % genipinu (vztaženo na hmotnost želatiny). V přítomnosti síťovadla byla želatina dále míchána 3 hodiny, dokud nezískala tmavě modrou barvu, která značila, že proběhla síťovací reakce. Po této době byl přidán alginát a směs se opět 15 min míchala. Po vmíchání alginátu byly přidány NaCl a glycerol a otáčky byly zvýšeny na 170 rpm. Následně byl přisypán PEG a směs byla dalších 15 min míchána. Po této době byl hydrogel v kádince přemístěn do ultrazvukové lázně (PS-40Hz) předehřáté na 37 °C a ponechán v ní po dobu 30 minut. Vzniklý gel byl vysušen v exsikátoru při laboratorní teplotě. Po celou dobu byla kádinka s gelem zakrytá hliníkovou fólií, což zabránilo nadměrnému odpařování vody.

Tabulka 1: Složení hydrogelů

Hydrogel	Množství složky [% hm.]						
	SA	G	PEG	Glycerol	NaCl	Voda	Genipin
SA/G	7	7	7	7	2	70	_
SA/G-GP	7	7	7	7	2	69,93	0,07

6.4 Charakterizace hydrogelu

6.4.1 Botnání

Stupeň botnání připravených hydrogelů byl stanoven gravimetricky a pomocí TMA.

Gravimetrické stanovení

Vysušené hydrogely byly zváženy na analytických vahách s přesností 0.1 mg a byly ponořeny do kádinky s destilovanou vodou. Vzorky byly v časových intervalech 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 a 24 hodin z vody vytaženy, jemně osušeny a opětovně váženy. Měření bylo prováděno při teplotě 25 °C. Množství kapaliny pohlcené hydrogelem (%) bylo stanoveno podle vztahu $Q = [(m_1 – m_0)/m_0] \times 100$, kde m_0 je hmotnost suchého a m_1 zbotnalého hydrogelu.

TMA

Nejprve byla nastavena nulová hodnota tloušťky dna misky, určené pro umístění vzorku. Z vysušeného hydrogelu bylo vyseknuto tělísko o průměru 2 mm, které bylo do této misky vloženo. Miska se vzorkem byla umístěna pod sondu působící na hydrogel silou 0.05 N. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Po ustálení přístroje byla do misky pomalu přikapávána destilovaná voda. Nejprve v kratších časových intervalech a poté po 20 minutách tak, aby byl hydrogel s vodou neustále v kontaktu. Byla měřena změna rozměru vzorku způsobená botnáním. Množství tekutiny přijaté hydrogelem (%) bylo stanoveno ze vztahu $Q = [(l_1 – l_0)/l_0] \times 100$, kde l_0 je výška suchého a l_1 zbotnalého hydrogelu.

6.4.2 Viskoelastické vlastnosti

Viskoelastické vlastnosti byly měřeny pomocí DMA a rotačního reometru Anton Paar (geometrie deska-deska).

Rotační reometr

Pro měření byla použita nabotnalá tělíska (25 °C), která byla vyseknuta těsně před měřením. Tělíska o průměru 10 mm byla vložena mezi paralelní desky reometru a okraje byly potřeny silikonovým olejem, aby se zabránilo vysychání vzorku. Všechna měření byla provedena v lineárním viskoelastickém režimu v rozsahu frekvencí 0.1 až 100 rad/s při teplotě 37 °C. Následně byla měřená teplotní závislost v rozmezí teplot od +5 °C do +42 °C při konstantní frekvenci 5 Hz a teplotním vzrůstu 0.5 °C/min.

DMA

Vzorky hydrogelu byly vystaveny botnání a poté byla vyseknuta tělíska o průměru 5 mm. Nejprve bylo chování hydrogelů hodnoceno v závislosti na změně frekvence, a to v rozsahu 0.1-100 Hz při 37 °C. V dalším kroku byly hodnoty dynamického modulu pružnosti, elastického modulu, ztrátového modulu a tan δ zbotnalých hydrogelů zaznamenány jako funkce teploty v teplotním rozsahu +5 °C do +42 °C při konstantní frekvenci 10 Hz. Rychlost vzrůstu teploty činila 2 °C/min.

6.4.3 FTIR

Chemické složení hydrogelů bylo stanoveno FTIR spektroskopií s ATR technikou. Bylo využito ZnSe krystalu. Před měřením bylo charakterizováno pozadí a byla provedena korekce spekter na atmosférické jevy (vzdušná vlhkost, CO, CO2). Měření probíhalo v rozmezí vlnočtů 400 cm^{-1} až 4000 cm^{-1}.

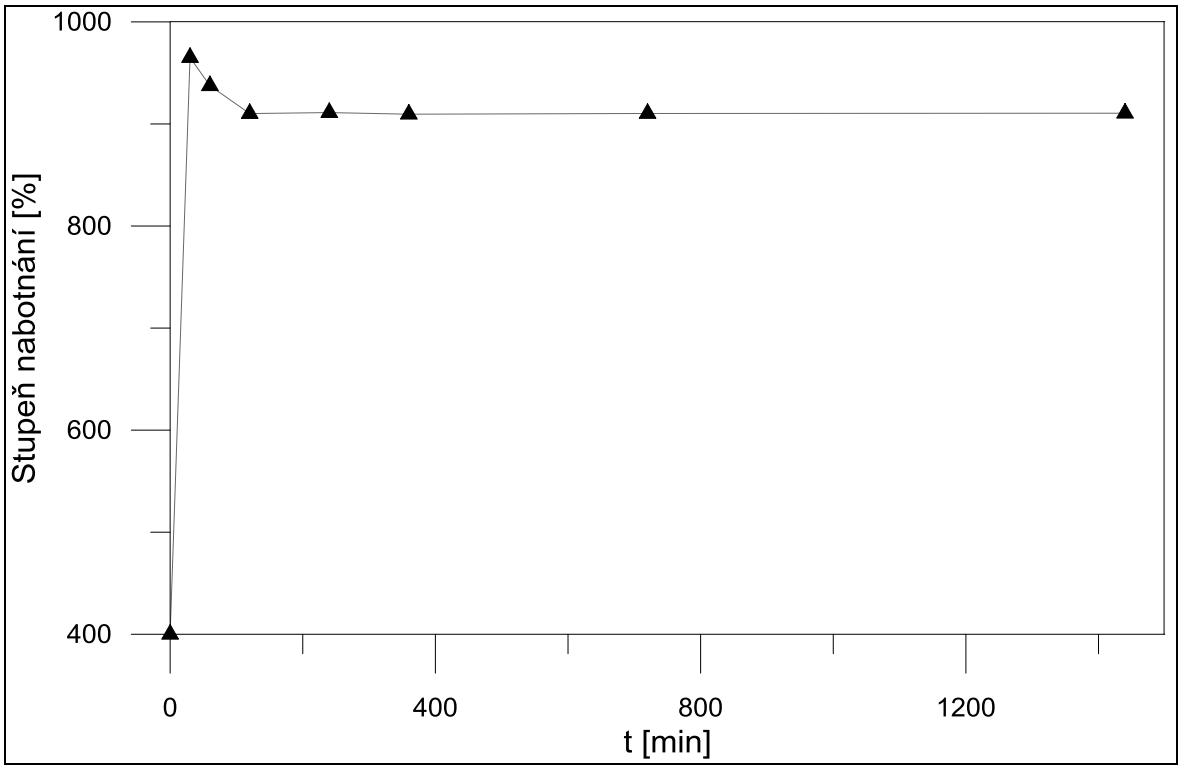
6.4.4 Elektronová mikroskopie

Vnitřní struktura vysušeného hydrogelu byla stanovena pomocí SEM mikroskopie na přístroji Tescan Vega II LMU. Před pozorováním byl hydrogel rozříznut a vzorek byl potažen tenkou vrstvou zlata ve vakuu. Poté byl vložen do mikroskopu a byl pozorován při zvětšení 0.5kx, 1kx a 5kx.

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

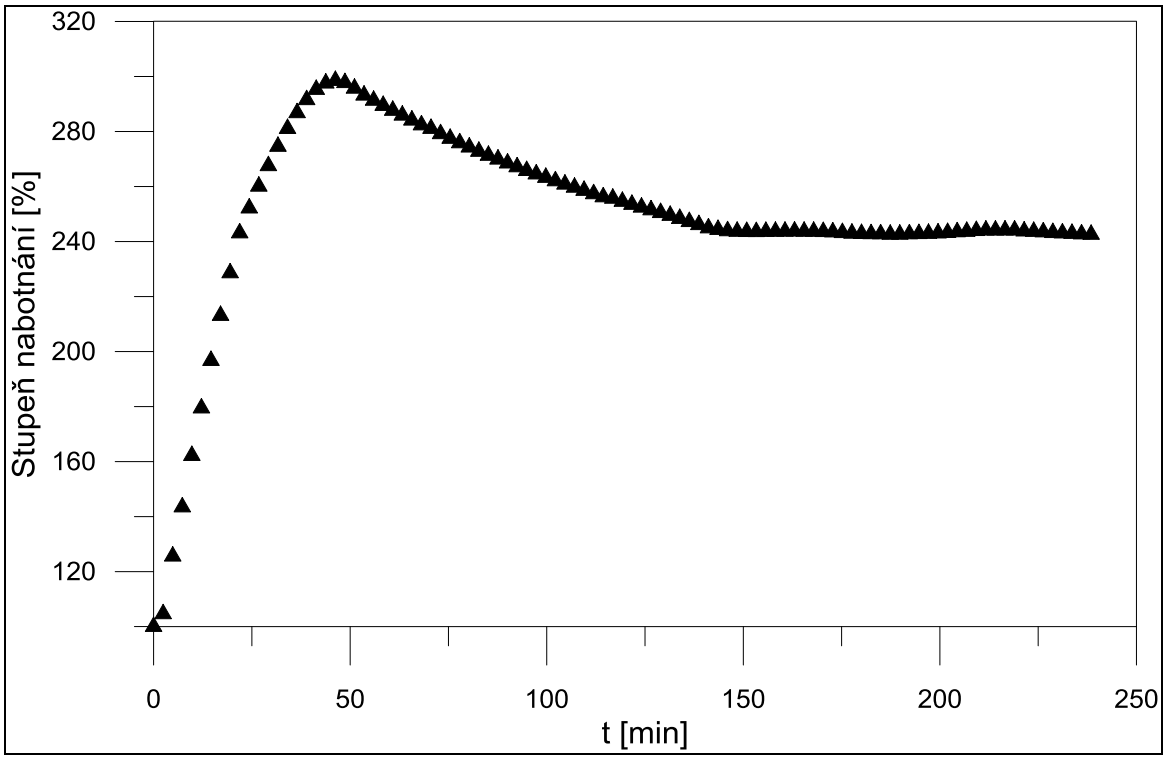
7.1.1 Botnání

Botnání hydrogelu probíhalo při 25 °C, v destilované vodě. Schopnost hydrogelu botnat souvisí v praxi s jeho schopností absorbovat tekutiny, například exsudát z rány. Na Obrázku 12 je znázorněn stupeň nabotnání stanovený v závislosti na čase. Jak je vidět, hydrogel dosáhl maximálního stupně nabotnání poměrně rychle, a to již během první hodiny. Po této době se začal stupeň botnání snižovat. Tato skutečnost by mohla být způsobena vymýváním želatiny nebo alginátu z matrice hydrogelu. Vzhledem k tomu, že genipinem je síťována želatina, bylo by pravděpodobnější, že je vymýván nezesíťovaný alginát sodný. Další možností jak tento efekt vysvětlit je, že hydrogel přijal v první fázi botnání nadbytečné množství vody a poté teprve přešel do rovnovážného stavu nabotnání, který nastal ca po 150 minutách. Srovnáním s hydrogelem o stejném složení připraveným v práci [3] je možné konstatovat, že hydrogel připravený v práci [3] botnal méně (max. stupeň nabotnání byl 500 %) a maximálního stupně nabotnání bylo dosaženo později, ca po 4 hodinách, po kterých botnání zvolna klesalo.



Obrázek 11: Stupeň nabotnání hydrogelu SA/G-Gp při 25°C.

Na přístroji TMA, pomocí kterého bylo botnání rovněž stanoveno, probíhá analýza následovně: na zkušební tělísko hydrogelu působí určitou, předem zvolenou, sílou sonda a měří se rozdíl velikostí vzniklých botnáním hydrogelu, ke kterému je během měření přidávána voda. Výsledky z TMA jsou graficky znázorněny na Obrázku 12. Z obrázku je zřejmé, že maximálního stupně nabotnání dosáhnul hydrogel za 50 minut a rovnovážného stupně nabotnání pak po ca 150 minutách. Tato skutečnost je v souladu s gravimetrickým měřením. Absolutní hodnoty stupně nabotnání stanovené TMA a gravimetricky je obtížné srovnávat, protože jde o dvě principiálně odlišné techniky, avšak botnací křivky stanovené oběma metodami mají podobný průběh. Zdá se, že metoda TMA lépe popisuje počáteční fázi botnání, kdy je hydrogel v kontaktu s kapalinou krátký čas.



Obrázek 12: Botnací závislost hydrogelu SA/G-Gp měřená na TMA při 25°C a přítlačné síle 0,05N.

7.1.2 Viskoelastické vlastnosti

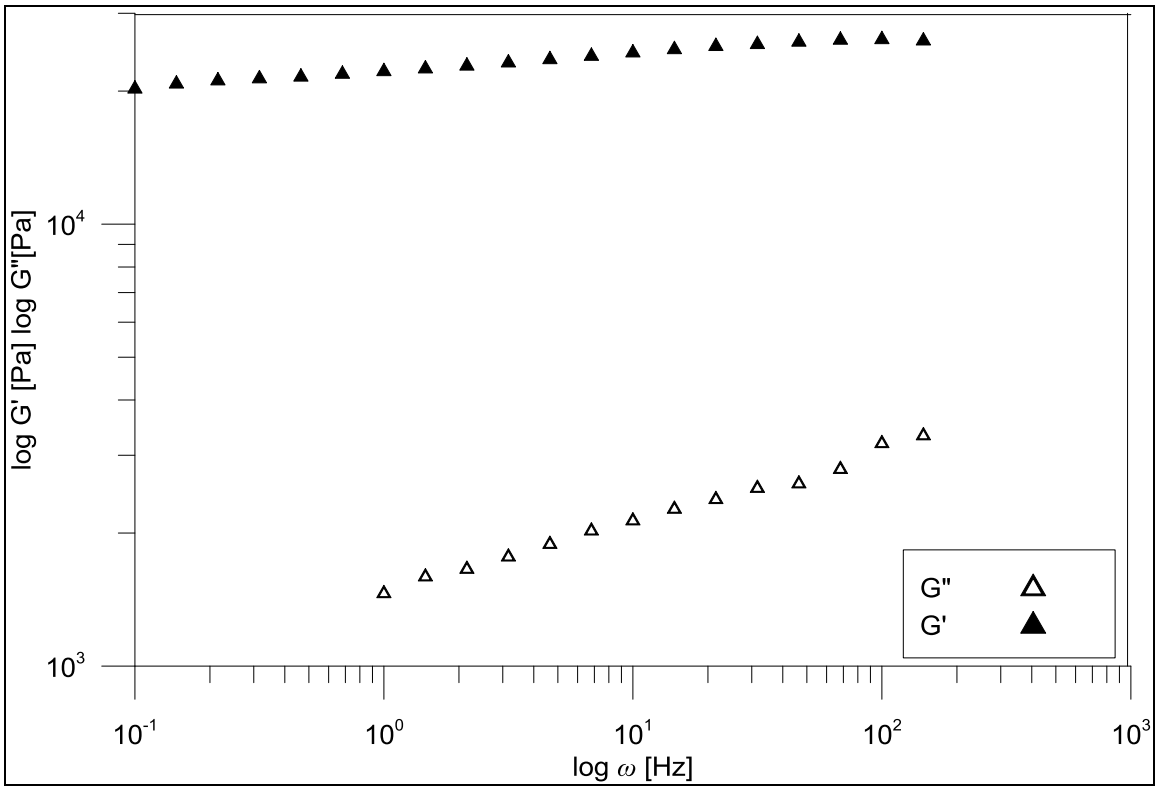
Frekvenční závislost viskoelastických vlastností připraveného hydrogelu stanovená pomocí DMA je, uvedena na Obrázku 14. Měření bylo prováděno na vzorcích po 30 minutách botnání. Jak je z tohoto obrázku patrné hodnoty elastického G‘ a ztrátového G“ modulu vykazují jen nevýznamnou závislost na frekvenci. Materiál se po celou dobu chová visko-

elasticky, přičemž převládá elastická složka. Frekvenčně nezávislé chování je způsobeno zesíťováním molekul, čímž se vytvoří pevná polymerní síť, pro kterou je viskoelastické chování typické. Obrázek 14 dokumentuje charakteristické chování kovalentně zesíťovaného, pevného gelu. Viskoelastické vlastnosti lze popsat i pomocí ztrátového úhlu tan δ , který je zobrazen na Obrázku 15. Je zřejmé, že křivka má rostoucí trend, na rozdíl od výsledků zaznamenaných analýzou obdobného hydrogelu, které jsou uvedeny v práci [3]. Tam je pozorován pozvolný pokles tan δ v závislosti na frekvenci a uvádí se, že hydrogel se chová frekvenčně nezávisle. Hydrogel, který byl připraven v této bakalářské práci, však vykazuje *G'* modul vyšší a ztrátový úhel tan δ nižší. Tyto rozdíly by mohly být způsobeny různým stupněm zesíťování obou hydrogelů, ke kterému by mohlo dojít v souvislosti s drobnými rozdíly při jeho přípravě.

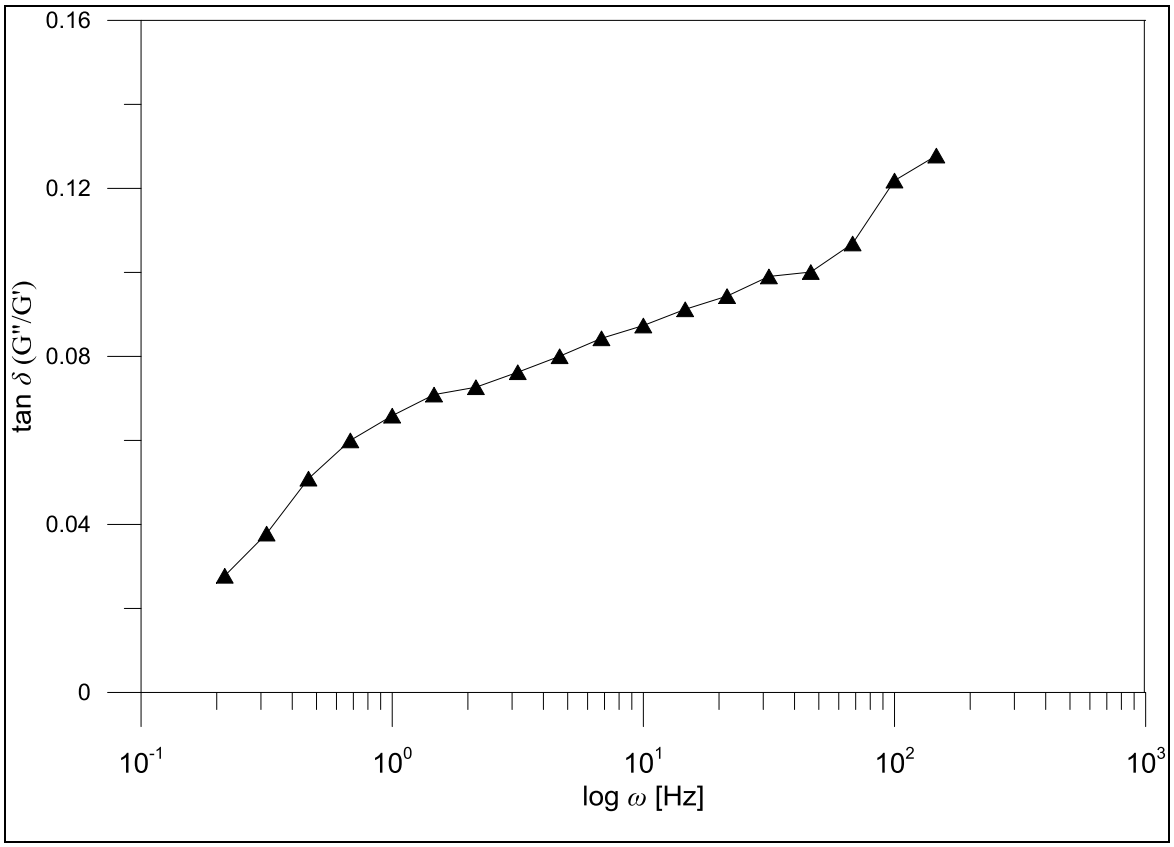
Na Obrázku 16 je uvedeno porovnání viskoelastických vlastností měřených pomocí DMA a rotačního viskozimetru. Z grafu jsou patrné rozdíly mezi výsledky získanými oběma metodami. Elastický modul *G'*, stanovený rotačním viskozimetrem v závislosti na zvyšující se frekvenci roste, zatímco výsledky z DMA ukazují (jak již bylo diskutováno výše), že jeho frekvenční závislost je téměř lineární. Takto rozdílné hodnoty a trendy by mohly být způsobeny jiným typem namáhání a rozdílným uspořádáním měřícího systému u obou metod Rovněž absolutní hodnoty *G'* jsou rozdílné a více se k sobě blíží se zvyšující se frekvencí. Nicméně vysvětlení tohoto nesouladu není jednoduché a bude předmětem dalších testů.

Závislost viskoelastických vlastností na teplotě popisuje Obrázek 17. Jsou na něm srovnány vlastnosti zesíťovaného vzorku SA/G-GP se vzorkem, který síťován nebyl. Při tomto měření byl hydrogel nejprve ochlazen na 5 °C a následně zahříván na 42 °C a poté opět chlazen zpět ze 42 °C na 5°C při stálé oscilaci 10 Hz. Měření elastického modulu pomocí DMA ukazuje, že hydrogel vykazuje v závislosti na teplotě hysterezní chování.

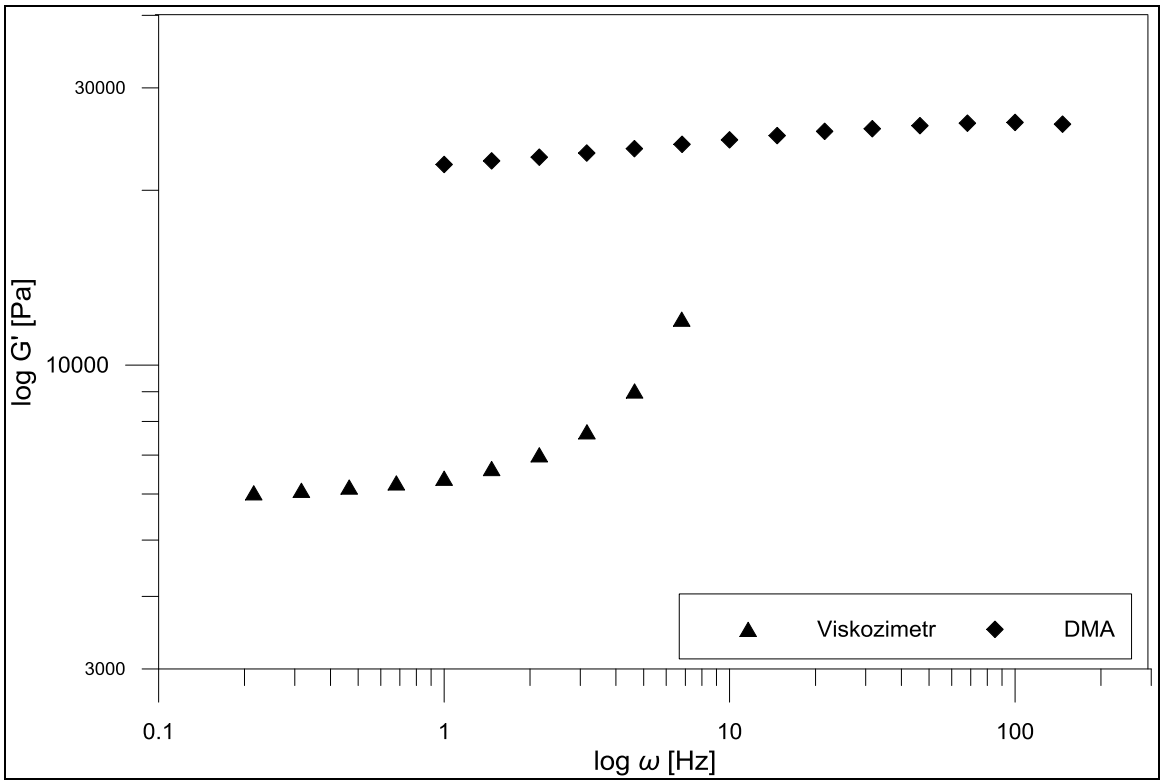
Obdobně jako v případě frekvenční závislosti, je i teplotní závislost modulu pružnosti stanovená viskozimetrem rozdílná ve srovnání s výsledky z DMA. Hodnoty *G'* zaznamenané při ohřevu i chlazení jsou nižší než z DMA a hysterezní chování není zřejmé. Obrázek rovněž ukazuje, že nezesíťovaný hydrogel se při teplotě nad 35 °C začíná rozpadat, což se projevuje poklesem hodnoty *G'*. To lze snadno vysvětlit skutečností, že želatina, která není stabilizovaná pomocí síťování, se při této teplotě začíná rozpouštět.



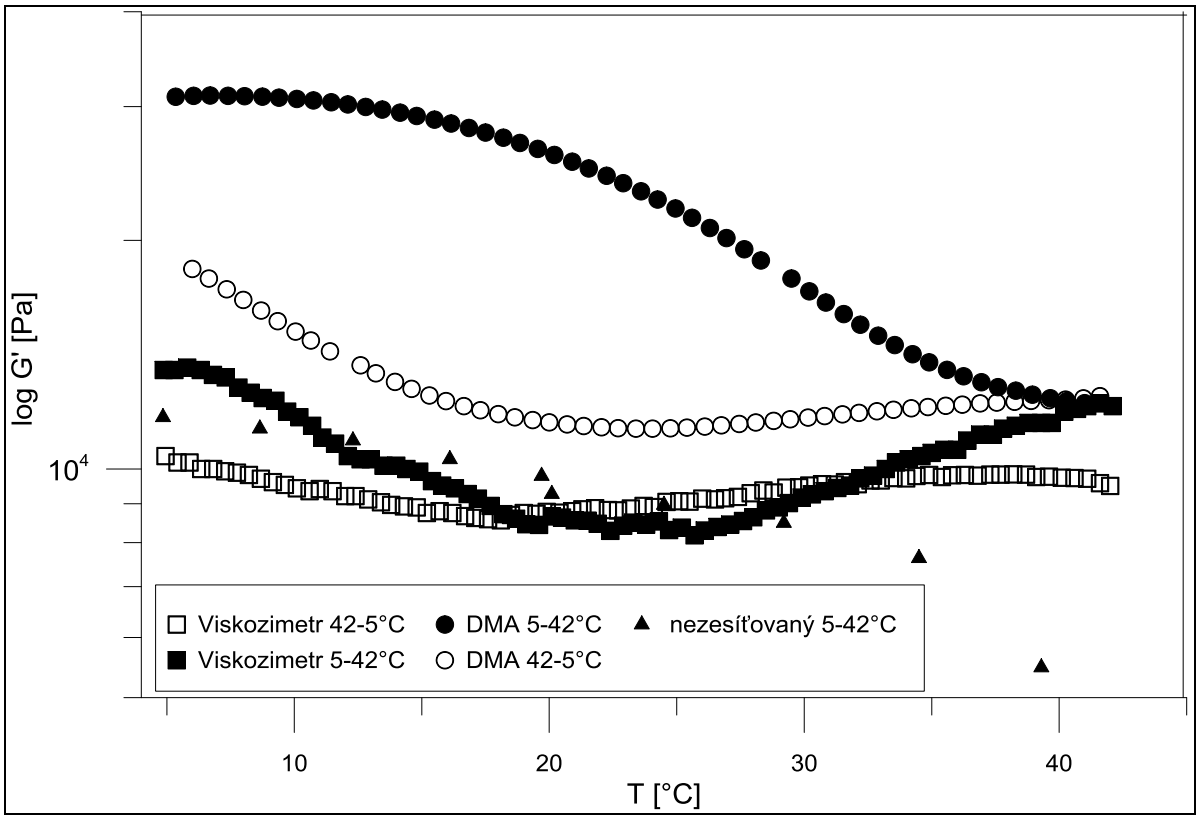
Obrázek 13: Elastický G‘ a ztrátový modul G“ hydrogelu SA/G-Gp v závislosti na frekvenci při 37 °C.



Obrázek 14: Závislost ztrátového úhlu tan δ na frekvenci při 37 °C.



Obrázek 15: Porovnání elastického modulu G‘ stanoveného pomocí DMA a viskozimetru při teplotě 37° C.

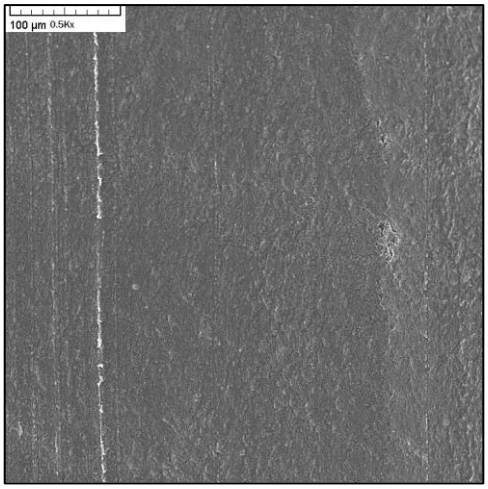


Obrázek 16: Visko-elastické vlastnosti hydrogelu SA/G-Gp v závislosti na teplotě; G'pro nezesíťovaný hydrogel byl stanoven pomocí reometru.

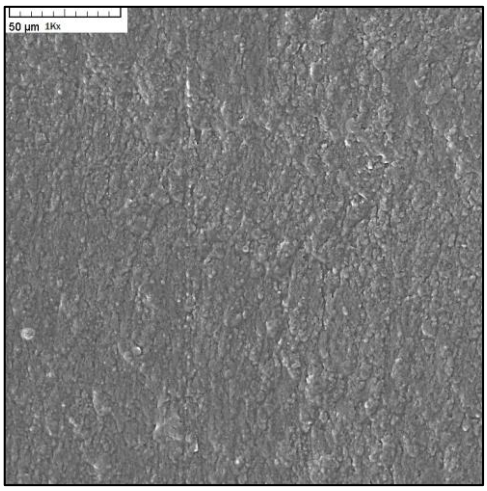
7.1.3 Elektronová mikroskopie (SEM)

Morfologie vysušených hydrogelů byla studována pomocí SEM mikroskopie. Z Obrázku 17, kde jsou mikroskopická zobrazení uvedena je zřejmé, že připravené vzorky jsou homogenní a nejsou na nich viditelné žádné velké póry nebo jiné nerovnosti. Teprve při zvětšení 5kx lze vidět vlastní strukturu hydrogelu ve větším detailu a jsou na ní patrná jednotlivá zrna a malé póry. Větší shluky a nehomogenity, které jsou při tomto zvětšení pozorovány, mohou být způsobeny tím, že během přípravy hydrogelu došlo nejdříve k síťování želatiny a teprve poté byl přidán alginát sodný. Tím nemuselo dojít k dostatečně homogennímu propojení obou složek.

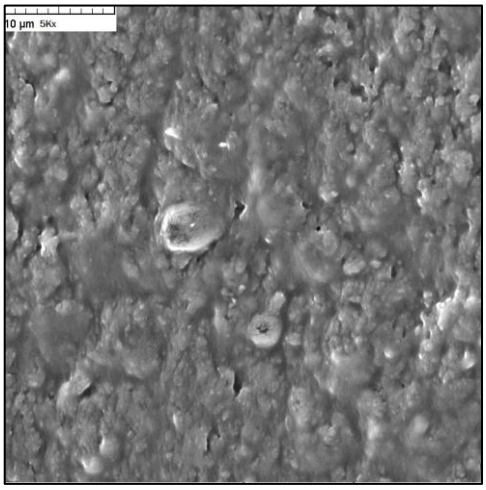
a)



b)



c)

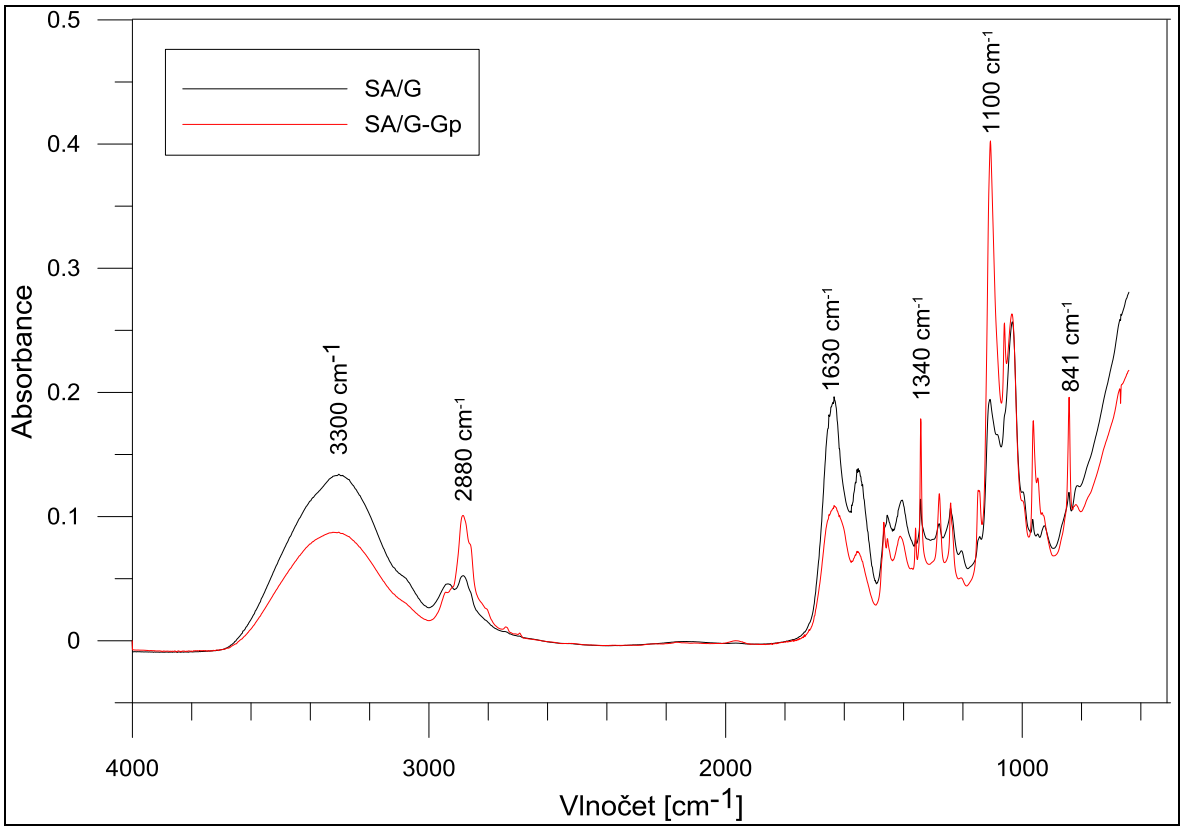


Obrázek 17: Snímek SEM hydrogelu SA/G-Gp zvětšení a) 0,5Kx, b) 1Kx, c) 5Kx

7.1.4 FTIR – ATR spektroskopie

Hydrogely byly měřeny na FTIR spektroskopu s nástavcem ATR a se ZnSe krystalem. Spektrum hydrogelu před a po síťování je zobrazeno na Obrázku 19.

Popisem spektra bylo zjištěno, že v oblasti 3100-3600 cm^{-1} je široký pás který značí OH skupinu; u nezesíťovaného hydrogelu je tento pás vyšší než u zesíťovaného. Následně je zde pás v rozmezí vlnočtů 2800-2900 cm^{-1} značící valenční vibrace nenasycených CH vazeb a u hydrogelu SA/G-GP je tento pás vyšší. Hned vedle tohoto pásu jsou u tohoto hydrogelu SA/G-Gp viditelné malé overtony, které jsou typickým znakem aromatického uhlovodíku. Typická oblast pro aminovou a amidovou deformační vibraci je oblast vlnočtu 1500-1640 cm^{-1}. U hydrogelu SA/G je tato oblast vyšší a to nejspíše proto, že hydrogel SA/G-GP má aminové vibrace v oblasti OH skupiny, která aminovou supinu překrývá. Následuje řada pásů v rozmezí vlnočtů 1250-1420 cm^{-1}, které jsou typické pro různé vibrace CH vazeb. U vlnočtu 1450 cm^{-1} se nachází oblast, kde se nachází OH deformační vibrace. Následuje významný vlnočet 1100 cm^{-1} kde se projevují valenční vibrace CO skupin, u hydrogelu SA/G-GP je tento pík významně vyšší jelikož genipin použitý jako síťovadlo má ve své molekule značný počet atomů kyslíku. Následné pásy v oblasti 1000-950 cm^{-1} značící oblast vinylových vibračních skupin. Vlnočet 840cm^{-1} je typický pro benzenová jádra. U konce spektra lze vidět zvyšující se pás typický pro halogen, který je hydrogelu přítomen díky přídavku NaCl.



Obrázek 18:Srovnání FTIR spekter zaznamenaných pro hydrogely SA/G (nesíťovaný) a SA/G-Gp (po síťování).

8 ZÁVĚR

V rámci experimentů provedených v bakalářské práci byl úspěšně připraven hydrogel, jehož matrici tvořil stejný poměr želatiny a alginátu sodného, zesíťovaný genipinem (SA/G-GP) a byly popsány jeho vlastnosti. Pro charakterizaci byly použity následující techniky: gravimetrie a TMA (stanovení stupně botnání), DMA (stanovení viskoelastických vlastností), FTIR spektroskopie (strukturní charakteristika) a SEM mikroskopie (morfologie).

Gravimetrickým stanovením, stejně jako pomocí DMA bylo zjištěno, že připravený hydrogel ochotně botná a krátce (ca po 1 hodině) dosahuje vysokého stupně nabotnání, který činí ca 900 %. Rovnovážný stupeň botnání pak nastává po 150 minutách. Po 24 hodinách, během kterých bylo botnání sledováno, byl hydrogel stále soudržný a nevykazoval známky rozpadu či rozpouštění.

DMA analýza prokázala, že hydogel vykazuje viskoelastické vlastnosti a že je dostatečně pevný jak při změnách teploty od 5 °C do 42 °C (při stálé oscilační frekvenci 10 Hz) tak i při namáhání v rozmezí frekvencí ležících v intervalu 0,1 – 100 Hz. Tato pevnost je způsobena zesíťovaním želatiny přítomné v matrici hydrogelu.

Z výsledků FTIR spektroskopie vyplývá, že zesíťovaný hydrogel obsahuje méně –OH skupin, zatímco skupin –CO a aromatických uhlovodíků více než nezesíťovaný hydrogel. Tato skutečnost je způsobena s velkou pravděpodobností přítomnosti síťovací látky genipinu.

Morfologické posouzení provedené pomocí SEM mikroskopie ukázalo, že co do struktury je připravený hydrogel homogenní a teprve při vyšších zvětšeních se objevují zrna a drobné nerovnoměrnosti v jeho uspořádání.

Předložená práce je prvním krokem výzkumu tohoto hydrogelu, který by mohl být dále využit ve formě krycího materiálu, schopného uvolňovat účinnou látku. Další práce bude proto zaměřena na zavedení vhodné aktivní látky do hydrogelové matrice, ať už nasátím z kapaliny při botnání, nebo vmícháním při přípravě. Plánováno je rovněž sledování uvolňování této látky v různých typech prostředí (pH) a při různých teplotách, které by co nejpřesněji simulovaly fyziologické prostředí těla. Podrobněji bude rovněž zkoumán vliv přípravy hydrogelu (rychlost otáček, teplota, typ použitého míchadla, doba homogenizace) na jeho viskoelastické chování a další relevantní vlastnosti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] OTTEMBRITE, R. M. a K. PARK. *Biomedical applications of hydrogels handbook* [online]. 1. vyd. New York: Springer, 2010 [cit. 2014-02-11]. ISBN 978-144-1959-195.

[2] H. GULREZ, S. K., S. AL-ASSAF., Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications.*Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011-08-01 [cit. 2014-02-11]. DOI: 10.5772/24553. Dostupné

[3] SAARAI, A.. *Hydrogels for biomedical applications: Hydrogely pro použití v biomedicíně: doctoral thesis summary*[online]. 1. vyd. Zlín: Tomas Bata University in Zlín, 2012, 55 s. [cit. 2014-02-11]. ISBN 978-80-7454-240-4.

[4] AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. InTech, 2013, s. - [cit. 2014-02-11]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006.

[5] STOKLASA, K., *Makromolekulární chemie I,* UTB Zlín, 2005, s 106

[6] Polyethylene Glycol (PEG) and PEGylation. *Pierce Protein Biology* [online]. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z:http://www.piercenet.com/method/polyethylene-glycol-peg-pegylation

[7] SUN, J., Y., WANG, a kol. PEG derived hydrogel: A novel synthesis route under mild condition. *Materials Letters* [online]. 2012, vol. 67, issue 1, s. 215-218 [cit. 2014-04-20]. DOI: 10.1016/j.matlet.2011.09.075

[8] FOLTTMAN, H a A QUADIR. Polyvinylpyrrolidone (PVP) – One of the Most Widely Used Excipients in Pharmaceuticals: An Overview. [online]. 2008, roč. 8, č. 6 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Documents/ENP/Review%20Articles/DDT-June-2008.pdf

[9] ROY, N., N. SAHA, T., KITANO a P., SAHA. Novel hydrogels of PVP-CMC and their swelling effect on viscoelastic properties. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2010, roč. 8, č. 6, NA-NA [cit. 2014-04-22]. DOI: 10.1002/app.32056.

[10] KLÁSEK, A., *Nauka o polymerech II: biopolymery*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1980, 115 s

[11] MOKREJŠ, P., F., LANGMAIER, *Aplikace přírodních polymerů.* Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, 90s. ISBN 978-80-7318-6

[12] Inovace.cz - Alginát – organické zlato. *Inovace.cz* [online]. [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: http://www.inovace.cz/novinky/542-alginat--organicke-zlato

[13] KONEČNÁ, L., *Vliv aplikace alginátů na vybrané vlastnosti tavených sýrů,* Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011

[14] SELL, S., P., S., WOLFE, a kol., *The use of natural polymers in tissue engineeringineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues polymers*[online]. 2010, roč 2, č.4 s .522-553 [cit. 2014-03-15]. DOI:10.1016/S0266-3538(03)00275-6.

[15] MLÁDEK, M., a kol., *Zpracování odpadů kožedělného průmyslu.* 1. vyd. Praha 1 : Nakladatelství technické literatury, n.p.,1971, 324 s. .

[16] TRUNKÁTOVÁ, A., *Polymerní nosiče léčiv,* Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009

[17] VAVŘÍKOVÁ, E., J., VINŠOVÁ. CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE. *Chemické listy* [online]. 2009, č. 1, s. 56-65 [cit. 2014-05-11]

[18] LAPČÍK, L. Jr., BOHDANECKÝ, M., LAPČÍK L., BAKOŠ, D., *Kyselina hyaluronová – príprava, struktura, vlastnosti, aplikácia. Chemické Listy 85,* 1991, str. 281-299.

[19] HASCALL, C. V., LAURENT, C. T. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. [cit. 2011-08-15]. Dostupné z: http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html.

[20] *Genipin 98% Purity: Challenge Bioproducts Co., Ltd* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://www.genipin.org/

[21] BUTLER, M. F. a Y.F. NG. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2003-12-15, vol. 41, issue 24, s. 3941-3953 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1002/pola.10960.

[22] Genipin. *Western Oregon University* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://www.wou.edu/las/physci/ch350/Projects_2006/Vaandering/Genipin.htm

[23] MOHTAR, N. F., C. O. PERERA a Y. HEMAR. Chemical modification of New Zealand hoki (Macruronus novaezelandiae) skin gelatin and its proper-

ties. Food Chemistry [online]. 2014, vol. 155, s. 64-73 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.043

[24] OSARAJU, S. L., A. PUVANENTHIRAN, P. LILLFORDNaturally crosslinked gelatin gels with modified material properties. *Food Research International* [online]. 2010, vol. 43, issue 10, s. 2385-2389 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.09.008.

[25] ZHANG, X., M., D., DO, a kol.. Chemical Cross-Linking Gelatin with Natural Phenolic Compounds as Studied by High-Resolution NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules* [online]. 2010-04-12, vol. 11, issue 4, s. 1125-1132 [cit. 2014-05-14]. DOI: 10.1021/bm1001284.

[26] CAO, N., Y. FU a J. HE. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids* [online]. 2007, vol. 21, issue 4, s. 575-584 [cit. 2014-05-14]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.07.001

[27] ŠTULÍK, K. *Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha, 2006. Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf

[28] LINHART, J., Slovník cizích slov pro nové století: základní měnové jednotky : abecední seznam chemických prvků : jazykovědné pojmy : 30 000 hesel. Litvínov: Dialog, 2002, 412 s. ISBN 8085843617.

[29] SLONKOVÁ, V., a V., VAŠKŮ. *Lokální antiseptické látky využívané při terapii chronických ran. Dermatologie dvouměsíčník pro praktické lékaře a pediatry*, Praha: Medakta s.r.o., 2007, roč. 1, č. 3, s. 107-109. ISSN 1802-1719

[30] RANČIĆ, A. M. SOKOVIĆ, a kol., ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LIMONENE. *IPLB* [online]. 2003, roč. 23, č. 23 [cit. 2014-05-11]. DOI: 615.218.9/.282:547.596.7.

[31] DVOŘÁKOVÁ, M., I. VALTEROVÁ a T. VANĚK. MONOTERPENY V ROSTLINÁCH. *Chemické listy - Oficiální časopis České společnosti chemické* [online]. 2011, č. 105, s. 839-845 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_11_839-845.pdf

[32] KHAN, I. a E. A. ABOURASHED. *Leung's encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs, and cosmetics*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2010, xxix, 810 p. ISBN 04-714-6743-X.

[33] Odborné informace: Tea tree olej a kosmetika. *Pentapharm CZ s.r.o.* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z:http://www.pentapharm.cz/odborne-informace/

[34] Tea Tree Oil: Tea tree olej a kosmetika. *Teatreeoil.eu* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://teatreeoil.eu/?tea-tree-oil

[35] Heřmánek pravý: Matricaria recutita. *PŘÍRODA.cz* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=105

[36] Česnek setý: nasevyziva.cz. *Naše výživa* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://www.nasevyziva.cz/sekce-zelenina/clanek-cesnek-sety-107.html

[37] Biologicky účinné látky obsažené v česneku: nasevyziva.cz. *Sportvital* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://www.sportvital.cz/zdravi/vyziva-a-zdravi/cesnek/biologicky-ucinne-latky-obsazene-v-cesneku/

[38] MEISSNER, B., *Fyzika polymerů*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984

[39] Pouchlý J., *Fyzikální chmeie makromolekulárních a koloidních soustav*, VŠCHT Praha, Praha 1998

[40] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, VŠCHT Praha, 2005, ISBN 80-7080-579-X

[41] MEISSNER, B.; ZILVAR, V. Fyzika polymerů: struktura a vlastnosti polymerních materiálů. 1. Vyd. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1987

[42] ČŮTA F., POPL M a kol., *Instrumentální analýza,* SNTL Praha 1986

[43] Infračervená spektroskopie a její techniky. *Laboratoř molekulární spektroskopie: VŠCHT Praha* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://lms.vscht.cz/Zverze/Infrared.htm

[44] FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z:http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf

[45] Elektronový mikroskop. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektronov%C3%BD_mikroskop

[46] KUBÍNEK, R., K. ŠAFÁŘOVÁ a M. VŮJTEK. *Elektronová mikroskopie* [online]. Olomouc, 2011 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z:http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/elmikro.pdf. Ostatní publikace. Univerzita Palackého v Olomouci.

[47] BERGER, J., M. REIST, J.M. MAYER, a kol., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, vol. 57, issue 1, s. 19-34 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00161-9.

[48] QIU, Y. a K. PARK. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2001, vol. 53, issue 3, s. 321-339 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00203-4

[49] PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. vol. 50, issue 1, s. 27-46 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00090-4.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyseliny
G	Absolutní dynamický modul pružnosti
G´	Reálný dynamický modul pružnosti
G“	Imaginární modul pružnosti
γ	Deformace
tg	Činitel vnitřního tlumení
σ	Napětí
ΔV	Objem pohlcené kapaliny
m_1	Hmotnost nabotnaného hydrogelu
m_o	Hmotnost hydrogelu před nabotnáním
ρ	Hustota kapaliny
Φ	Objemový koeficient botnání
IR	Infračervená oblast
FTIR	Fourierova transmisní infračervená spektroskopie
ATR	Zeslabená celková reflektance
LCST	Spodní kritická teplota
SA	Alginát sodný
G	Želatina
GP	Genipin
PEG	Polyethylenglykol.
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrolidon
Q	Stupeň botnání
RNA	Ribonukleová kyselina

SEM Skenovací elektronový mikroskop

TEM Transmisní elektronový mikroskop

UCST Horní kritická teplota

UV Ultrafialová oblast

VIS Oblast viditelného světla

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Klasifikace hydrogelů dle různých parametrů[3]. 12
Obrázek 2: Schematické znázornění kovalentního síťování [39] 14
Obrázek 3: Gely síťované (a) silné gely, (b) gel se submikroskopickými krystalickými oblastmi, (c) gel tvořen spleteninami [39] 14
Obrázek 4: Struktura makromolekuly alginátu [13] 18
Obrázek 5: Molekula genipinu 22
Obrázek 6: Molekula kyseliny kávové 22
Obrázek 7: Molekula kyseliny tanninové 23
Obrázek 8: Molekula limonenu 24
Obrázek 9: Molekula thymolu 25
Obrázek 10: Molekula eugenolu 25
Obrázek 11: Stupeň nabotnání hydrogelu SA/G-Gp při 25°C. 41
Obrázek 12: Botnací závislost hydrogelu SA/G-Gp měřená na TMA při 25°C a přítlačné síle 0,05N. 42
Obrázek 13: Elastický G‘ a ztrátový modul G“ hydrogelu SA/G-Gp v závislosti na frekvenci při 37 °C. 44
Obrázek 14: Závislost ztrátového úhlu tan δ na frekvenci při 37 °C. 44
Obrázek 15: Porovnání elastického modulu G‘ stanoveného pomocí DMA a viskozimetru při teplotě 37° C. 45
Obrázek 16: Visko-elastické vlastnosti hydrogelu SA/G-Gp v závislosti na teplotě; G’pro nezesíťovaný hydrogel byl stanoven pomocí reometru. 46
Obrázek 17: Snímek SEM hydrogelu SA/G-Gp zvětšení a) 0,5Kx, b) 1Kx, c) 5Kx 47
Obrázek 18:Srovnání FTIR spekter zaznamenaných pro hydrogely SA/G (nesíťovaný) a SA/G-Gp (po síťování). 49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení hydrogelů 38