Příprava, charakterizace a biokompatibilita koloidního polyanilinu

Nela Maráková

Diplomová práce
2015

Univerzita Tomáše Bati ve Zlí
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Nela Maráková**
Osobní číslo:	**T13409**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Příprava, charakterizace a biologické vlastnosti koloidního polyanilinu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Vypracujte literární rešerši na zadané téma a zaměřte se na postupy vedoucí k přípravě polyanilinu v koloidní formě. Přehledně shrňte a komentuje současný stav této problematiky. Uveďte metody vhodné pro charakterizaci fyzikálně chemických vlastností polyanilinového koloidu i metody vhodné pro popis jeho interakce s biologickými systémy.**

II. Praktická část

1. **V praktické části připravte koloidní formu polyanilinu s využitím stabilizátorů jak polymerního charakteru, tak i surfaktantů. Velikost částic připraveného koloidu ověřte pomocí relevantních analytických metod. Vyberte vhodné vzorky s ohledem na složení a velikost částic a sledujte jejich interakci s buňkami. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] STEJSKAL, J. Colloidal Dispersions of Conducting Polymers. Journal of Polymer Materials. 2001, vol. 18, s. 225 258.
[2] JEEVANANDA, T., Joong Hee LEE a SIDDARAMAIAH. Preparation of polyaniline nanostructures using sodium dodecylsulphate. Materials Letters. 2008, vol. 62, issue 24, s. 3995-3998.
[3] BHADRA, Sambhu, Dipak KHASTGIR, Nikhil K. SINGHA a Joong Hee LEE. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. Progress in Polymer Science. 2009, vol. 34, issue 8, s. 783-810. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.003.
[4] LODISH, Harvey F. Molecular cell biology. 6th ed. New York: W.H. Freeman, c2008, 1 v. (various pagings). ISBN 978-071-6776-017.

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

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MARÁKOVÁ NELA Obor: CMTP-TTDM

PROHLÁŠENÍ

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 12.5.2015

.....

[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

Diplomová práce se zabývá problematikou přípravy, charakterizace a biokompatibility koloidního polyanilinu. Teoretická část je věnována polyanilinu, zejména jeho koloidní formě, problematice koloidních polyanilinových disperzí a jejich vhodných stabilizátorů. V této části práce jsou rovněž stručně popsány příprava, struktura a vlastnosti koloidů, metody jejich charakterizace a postupy vhodné pro stanovení biokompatibility. Praktická část se věnuje přípravě stabilní koloidní polyanilinové disperze s řízenou velikostí částic v přítomnosti vhodného stabilizátoru. Konkrétně byly použity tyto stabilizátory: poly *N*-(vinylpyrrolidon), kyselina hyaluronová, chitosan a surfaktanty (Tween 20, Triton X-100 a dodecylsulfát sodný (SDS)). Základní fyzikální a chemická charakterizace připravených koloidů byla provedena metodou dynamického rozptylu světla (DLS) a UV-VIS spektroskopií. Zároveň byl u vybraných koloidů zkoumán jejich cytotoxický účinek.

Klíčová slova: koloidní polyanilin, stabilizátor, stabilita, velikost částic, cytotoxicita.

ABSTRACT

The thesis deals with the preparation, characterization and biocompatibility of colloidal polyaniline. Theoretical part is devoted to polyaniline, mainly to its colloidal form and problems related to colloidal dispersions of polyaniline and their suitable stabilizers. In this part preparation, structure and properties of colloids are briefly described as well as theircharacterization methods and procedures suitable for determining the biocompatibility. The experimental part is focused on the preparation of stable colloidal polyaniline dispersions with controlled particle size in the presence of a suitable stabilizer. The following stabilizers were used: poly *N*-(vinylpyrrolidon), hyaluronic acid, chitosan, and surfactants (Tween 20, Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate (SDS)). Fundamental physical and chemical characterization of the prepared colloids was performed by dynamic light scattering (DLS) and UV-VIS spectroscopy. Selected colloids were also studied for their cytotoxicity.

Keywords: colloidal polyaniline, stabilizer, stability, particle size, cytotoxic effect.

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat vedoucí diplomové práce, paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za její trpělivost, cenné rady, poskytnuté materiály a vynaložený čas,

který věnovala vzniku této práce. Mé poděkování patří rovněž doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za cenné připomínky a rady a Ing. Zdence Kucekové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a velkou pomoc při provádění experimentů.

Touto cestou bych také chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za jejich podporu nejen při vzniku této práce, ale i během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD **10**

I TEORETICKÁ ČÁST **11**

1 POLYANILIN **12**

1.1 FORMY POLYANILINU 12

1.2 KOLOIDNÍ POLYANILIN 14

1.2.1 Disperzní polymerace 14

1.2.2 Disperzní polymerace anilinu 14

1.2.3 Stabilizátory 14

1.2.3.1 Vodorozpustné polymery 15

1.2.3.2 Surfaktanty 15

1.2.3.3 Částicové stabilizátory 15

1.2.3.4 Polymerní latexy 15

1.2.3.5 Blokové a roubované kopolymery 16

1.2.4 Princip tvorby polyanilinových koloidů 16

1.2.4.1 Koloid s polymerním stabilizátorem 16

1.2.4.2 Koloid s částicovým stabilizátorem 17

1.2.4.3 Koloid stabilizovaný surfaktantem 18

1.2.5 Standardní příprava koloidního polyanilinu podle IUPAC 19

1.2.6 Struktura a vlastnosti polyanilinových disperzí 19

1.2.6.1 Stabilita disperzí 19

1.2.6.2 Velikost částic 19

1.2.6.3 Struktura a tvar částic 20

1.2.6.4 Další vlastnosti disperzí 21

2 CHARAKTERIZACE **22**

2.1 DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA 22

2.2 UV-VIS SPEKTROSKOPIE 23

2.2.1 Elektronová absorpční spektra 24

3 BIOKOMPATIBILITA **28**

3.1 CYTOTOXICITA 28

3.1.1 Viabilita buněk 29

3.1.2 Přežitelnost buněk 29

3.1.3 Metody testování cytotoxicity *in vitro* 29

3.1.3.1 Klonogenní test 29

3.1.3.2 MTT test, test mitochondriálních funkcí 30

3.1.3.3 Průtoková cytometrie 30

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY **32**

4.1.1 Biologická aktivita koloidního polyanilinu 32

5 CÍLE PRÁCE **34**

II PRAKTICKÁ ČÁST **35**

6 MATERIÁL A METODY **36**

6.1 MATERIÁL 36

6.1.1 Použité chemikálie 36

6.1.2 Laboratorní sklo a plasty 36

6.1.3 Použité zařízení a pomůcky 36

6.2 DISPERZNÍ POLYMERACE ANILINU 37
6.2.1 Stabilizace pomocí PVP - modifikace postupu IUPAC 37
6.2.1 Stabilizace kyselinou hyaluronovou 38
6.2.2 Stabilizace chitosanem 38
6.2.1 Stabilizace surfaktanty 39
6.3 CHARAKTERIZACE KOLOIDNÍHO POLYANILINU 41
6.3.1 Velikost částic 41
6.3.2 Sledování průběhu polymerace koloidního polyanilinu UV-VIS 41
6.3.3 Stanovení koncentrace polyanilinu v koloidním roztoku 42
6.4 BUNĚČNÉ LINIE 43
6.4.1 Příprava vzorků pro stanovení cytotoxicity – dialýza 43
6.4.2 Použité buněčné linie 43
6.4.3 Trypsinizace a prekultivace 43
6.4.4 Přídavek testované látky 44
6.4.5 MTT test 44
7 VÝSLEDKY 46
7.1 CHARAKTERIZACE VELIKOSTI ČÁSTIC KOLOIDNÍHO POLYANILINU 46
7.1.1 Stabilizace PVP 46
7.1.2 Stabilizace v přítomnosti kyseliny hyaluronové a chitosanu 54
7.1.3 Stabilizace surfaktanty Triton X-100 a Tween 20 56
7.1.4 Stabilizace anionickým surfaktantem SDS 57
7.2 CHARAKTERIZACE KOLOIDNÍHO POLYANILINU POUŽITÉHO PRO STANOVENÍ CYTOTOXICITY 60
7.2.1 Sledování průběhu reakce 60
7.2.1.1 Stanovení velikosti částic koloidního polyanilinu S1-A a S1-C po dialýze 62
7.2.1.2 UV spektrum v 1 M HCl a stanovení koncentrace koloidu 63
7.3 CYTOTOXICKÝ ÚČINEK KOLOIDNÍHO POLYANILINU 65
ZÁVĚR 69
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 71
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 82
SEZNAM OBRÁZKŮ 83
SEZNAM TABULEK 85

ÚVOD

Polyanilin patří mezi nejčastěji studované vodivé polymery. Pozornost přitahuje zejména pro svou snadnou přípravu, dobrou ekologickou stabilitu a zajímavé elektrochemické vlastnosti. Polyanilin může běžně existovat v několika formách, které lze získat různým stupněm oxidace, či protonace. Tyto formy se vzájemně liší svými vlastnostmi, strukturou a následně i použitím. Zřejmě nejzajímavější formou polyanilinu je zelená, vodivá forma, tzv. emeraldinová sůl, která může přecházet na modrou, nevodivou bázi.

Ačkoli je příprava polyanilinu relativně jednoduchá, jeho využití je do určité míry omezeno velmi špatnou rozpustností v organických rozpouštědlech a nerozpustností ve vodném prostředí. Tento problém je možné vyřešit přípravou stabilních, vodných koloidních disperzí v přítomnosti vhodného stabilizátoru. Ke stabilizaci disperzních soustav lze využít řadu látek, jako jsou ve vodě rozpustné polymery, funkční polymery, kopolymery, částicové stabilizátory nebo povrchově aktivní látky, surfaktanty. Principy tvorby koloidu a metody/podmínky stabilizace bývají různé a mohou ovlivnit výsledný tvar a velikost částic i stabilitu disperze.

Polyanilin lze využít v řadě oblastí. K typickým patří například aplikace v ochraně proti korozi, katalýze organických reakcí, v palivových článcích, superkapacitátorech nebo elektrodách. Velmi zajímavé a slibné je také využití polyanilinu v oblasti biotechnologie a medicíny, avšak údaje o jeho kompatibilitě s biologickými systémy nejsou dosud dostatečně prozkoumány a v literatuře popsány.

Předložená diplomová práce se zaměřuje na problematiku koloidních polyanilinových disperzí a jejich vhodných stabilizátorů. Teoretická část práce se zabývá polyanilinem, zejména pak popisem koloidní formy polyanilinu, jejími vlastnostmi a možnostmi stabilizace. Dále jsou popsány metody charakterizace koloidů a v neposlední řadě i postupy vhodné pro stanovení jejich biokompatibility. Experimentální část práce je zaměřená na přípravu stabilního, koloidního polyanilinu v přítomnosti vhodného stabilizátoru, s cílem provést syntézu tak, aby bylo možno kontrolovat velikost disperzních částic. Připravený koloid je charakterizován vhodnými metodami (dynamický rozptyl světla, UV-VIS spektroskopie) a u vybraných vzorků je rovněž sledována jejich interakce s buňkami.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYANILIN

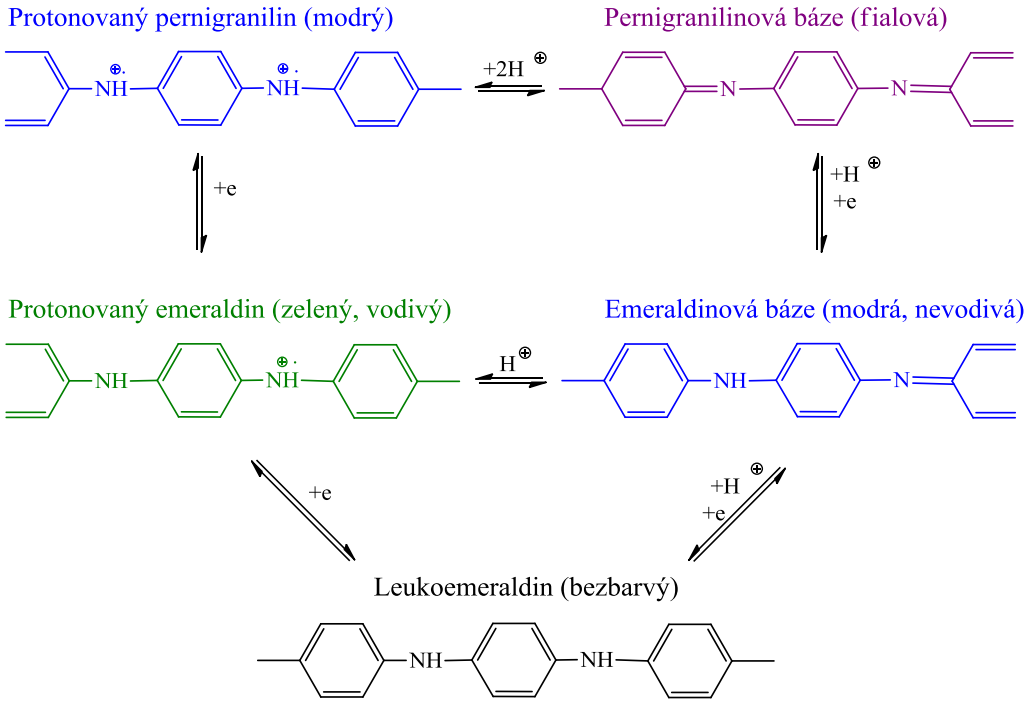
Polyanilin řadíme do skupiny vodivých polymerů, mezi které dále patří polyacetylen, polypyrrol, polythiofen, polyfenylen či poly-(*p*-fenylenvinylen). Vodivost polyanilinu je známá již celá desetiletí, avšak rostoucí zájem o vodivé polymery se projevil až na koci sedmdesátých let dvacátého století poté, co budoucí laureáti Nobelovy ceny za chemii Heeger, Mac Diarmid a Shirakawova publikovali své práce o polyacetylenu. [1]

Při pohledu do historie lze konstatovat, že polyanilin je pravděpodobně nejstarším syntetickým polymerem, který byl vůbec připraven. Byl získán již v roce 1826 německým chemikem Unverdorbenem jako vedlejší produkt pyrolytické destilace indiga. Zelené oxidační produkty anilinu, které bychom v současnosti nazvaly polyanilinem, pak popsal roku 1840 Fritzsche. V roce 1862 britský profesor chemie Lethby provedl elektrochemickou oxidaci anilinu, která po alkalizaci vedla k modře zbarvenému výslednému produktu, typickému pro polyanilinovou bázi. Začátkem minulého století, Green a Woodhead navrhli pro oxidační produkty anilinu strukturu oktameru a následující názvy jeho jednotlivých oxidačních forem: leukoemeraldin, emeraldin a pernigranilin. Polymerní povaha oxidačních produktů anilinu byla prokázána až o mnoho desítek let později, avšak výše uvedené názvy původně navržené pro oktamery jsou používány i v současnosti. V Československu byly syntetické postupy vedoucí k přípravě polyanilinu popsány roku 1968 Hozlem a kol. [1, 2, 3, 4]

1.1 Formy polyanilinu

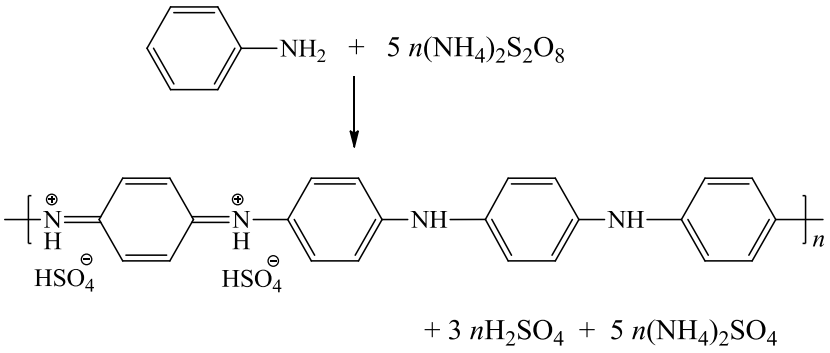
Vzhledem k dobré ekologické stabilitě a snadné přípravě přitahuje polyanilin velkou pozornost. Polyanilin existuje v řadě forem, které se od sebe navzájem liší různým stupněm oxidace, či protonace (Obr. 2). V závislosti na způsobu přípravy lze získat formy lišící se chemickou strukturou, stabilitou, zbarvením a především elektrickými vlastnostmi. Základní stabilní formou polyanilinu je zeleně zbarvená, vodivá polyanilinová, neboli emeraldinová sůl, pro kterou je typická vodivost v rozmezí 10^{-1} – 10^{1} S.cm^{-1} [3]. Obvykle vzniká oxidací anilinu, například ve formě hydrochloridu nebo sulfátu. Pokud je protonovaná emeraldinová sůl vystavena působení alkálií, vznikne nevodivá, modrá, emeraldinová báze, jejíž vodivost klesá až na 10^{-10} – 10^{-8} S.cm^{-1}[3]. Přechod mezi vodivou a nevodivou formou polyanilinu nastává při pH 4 – 5 [5, 58]. Některé literární zdroje pak uvádějí rozmezí 5 – 6 [1]. Tento proces je vratný [1]. Oxidací emeraldinu získáme protonovaný modrý pernigranilin, jehož báze má barvu fialovou. V tomto případě nastává přechod kyselina – báze při pH 0 – 1.

Modré formy, protonovaný pernigranilin a emeraldinová báze, mají odlišný barevný odstín. Redukcí emeraldinu lze pak získat bezbarvý, nevodivý leucoemeraldin. [1, 2, 3, 4]



Obr. 1. Formy polyanilinu: emeraldin může být oxidován na pernigranilin nebo redukován na leukoemeraldin. [1]

Jak již bylo zmíněno, samotná příprava polyanilinu je jednoduchá. Nejčastěji se připravuje oxidací anilinu peroxydvojsíranem amonným v kyselém vodném prostředí. Reakce je exotermní. Proces polymerace probíhá na vzduchu, při laboratorní teplotě a během několika minut vzniká produkt s prakticky stoprocentním výtěžkem (Obr. 2). [2, 3, 4]



Obr. 2. Rovnice oxidace polyanilinu. [1]

1.2 Koloidní polyanilin

Využití polyanilinu v různých aplikacích je do určité míry omezeno jeho nerozpustností ve vodném prostředí a velmi špatnou rozpustností v organických rozpouštědlech. Proto bylo značné úsilí věnováno přípravě lépe zpracovatelných forem tohoto polymeru. Jednou z možností jak vyřešit problém zpracovatelnosti je příprava vodné koloidní disperze tohoto polymeru. Koloidní forma polyanilinu se chová jako běžná, kapalná disperze a lze s ní jednoduše pracovat. [2, 4]

1.2.1 Disperzní polymerace

Disperzní polymerace je jednou z možností, jak připravit koloidní polyanilin. Tento typ reakce charakterizují následující vlastnosti: (1) monomer je mísitelný s reakčním médiem (na rozdíl od emulzní nebo suspenzní polymerace); (2) polymer, který vzniká během polymerace, zůstává za daných podmínek nerozpustný (stejně jako při srážecí polymeraci); a (3) makroskopickému srážení polymeru je zabráněno přítomností vhodného stabilizátoru. Výtěžkem disperzní polymerace jsou stabilní koloidní částice chráněné před další agregací povrchovou vrstvou stérického stabilizátoru. [3]

1.2.2 Disperzní polymerace anilinu

Reakční směs pro přípravu koloidního polyanilinu obsahuje (1) monomer (anilin nebo anilin hydrochlorid); (2) oxidační činidlo (zpravidla peroxydvojsíran amonný); (3) stérický stabilizátor; a (4) reakční médium (voda, kyselina). Podmínkou je rozpustnost všech reaktantů na začátku reakce. [3, 6]

1.2.3 Stabilizátory

Během disperzní polymerace dochází k navázání stabilizátoru na vysrážený polyanilin. Po vytvoření disperzní částice, stabilizátor vytvoří na povrchu částic plášť rozpustných řetězců, který jim stericky brání v jejich opětovné agregaci.

Ke stabilizaci disperzních soustav lze využít řadu látek, například ve vodě rozpustné polymery, funkční polymery, kopolymery, částicové stabilizátory, povrchově aktivní látky – surfaktanty a mnoho dalších. [3]

1.2.3.1 Vodorozpustné polymery

Při stabilizaci polyanilinových disperzí lze využít řadu ve vodě rozpustných polymerů. Mezi zástupce této skupiny stabilizátorů patří například: poly(vinyl alkohol) (PVAL), poly(*N*-vinylpyrrolidon) (PVP), poly(methyl vinyl ether) (PMVE) nebo ethery celulózy. Pokud nahlédneme do literatury, Stejskal a kol. [7] použili ve své práci pro přípravu polyanilinových disperzí hydroxymethylcelulózu a PVAL. Janča a kol. [8] pak stabilizovali polyanilin pomocí poly(vinyl alkohol-*co*-vinyl acetátu). Dalším zástupcem, velmi často zmiňovaným v literatuře je PVP, který ve své studii použili ke stabilizaci například Eisazadeh a kol. [9] a Reide a kol. [10]. [3]

1.2.3.2 Surfaktanty

Surfaktanty jsou další alternativou stabilizátorů využívaných pro přípravu stabilních polyanilinových koloidů. Produkty vyrobené polymerací v přítomnosti povrchově aktivní látky o nízké molekulové jsou v literatuře často popisovány jako „rozpustné" vodivé polymery [11]. První koloid stabilizovaný pomocí aniontové povrchově aktivní látky byl připraven DeArmitt a Armes [12] a to nahrazením minerální kyseliny v reakční směsi kyselinou dodecylbenzensulfonovou (DBSA). Stejný stabilizátor použili během polymerace anilinu také například Gospodinova a kol. [13]. Kuramoto a Tomita [14] publikovali postup, kdy byl anilin polymerován v přítomnosti dodecylbenzensulfonátu a Gill a kol. [15] použili při reakci jako stabilizátor dodecylsulfát sodný (SDS). Tato reakce vedla ke vzniku stabilní koloidní disperze. [3]

1.2.3.3 Částicové stabilizátory

Typickým představitelem stabilizátorů na bázi částic je ultra-jemný koloidní oxid křemičitý. Částice oxidu křemičitého o průměru 7 – 22 nm byly poprvé použity ke stabilizaci polyanilinových koloidů v práci Gilla a kol. [16, 17]. Výsledkem polymerace byla stabilní disperze částic o submikronové velikosti s výraznou morfologií připomínající maliny. Stejskal a kol. [18] publikovali přípravu koloidního polyanilinu s použitím oxidu křemičitého při různých reakčních podmínkách. Biwas a kol. [19] použili zase pro stabilizaci polyanilonové disperze oxid manganičitý a Ray a kol. [20] nanočástice oxidu zirkoničitého. [3]

1.2.3.4 Polymerní latexy

Další skupinou částicových stabilizátorů jsou polymerní latexy. Beadle a kol. [21] provedli polymeraci anilinu v přítomnosti komerčně dostupného chlorovaného kopolymerního latexu

s částicemi o velikosti 200 nm. Anilin v přítomnosti latexových částic polymerovali rovněž Terlemezyan a kol. [22] s cílem připravit kompozitní materiály. Vznik stabilních koloidních produktů za použití poly(butadien-ko-styren-*co*-2-vinylpyridinového) latexu publikovali ve své práci Xie a kol. [23]. [3]

1.2.3.5 Blokové a roubované kopolymery

Pro stabilizaci klasických polymerních disperzí v bezvodém prostředí jsou často používány blokové a roubované kopolymery [24, 25, 26]. Polymeraci anilinu v přítomnosti blokového polymeru polystyren-*block*-PEO vedoucí k tvorbě stabilních mikročástic, popisuje Sapurina a kol. [27]. Polymerace probíhala zčásti na rozhraní jádra a obalu micely, kde se setkávají anilin začleněný do jádra a oxidační činidlo, které je součástí kontinuální fáze. Jelikož je anilin částečně rozpustný i v kontinuální fázi, polyanilin vznikal rovněž zde. Výsledkem polymerace byly agregáty micel, jejichž jádra byla potažena vodivým polymerem [27, 28]. Cooper a Vincent [29] uveřejnili ve své práci postup oxidace anilinu v přítomnosti roubovaného kopolymeru, poly(ethyl-akrylát-*co*-styrenu)-graft-poly(ethylenoxidu), která vedla ke vzniku stabilní disperze. [3]

1.2.4 Princip tvorby polyanilinových koloidů

1.2.4.1 Koloid s polymerním stabilizátorem

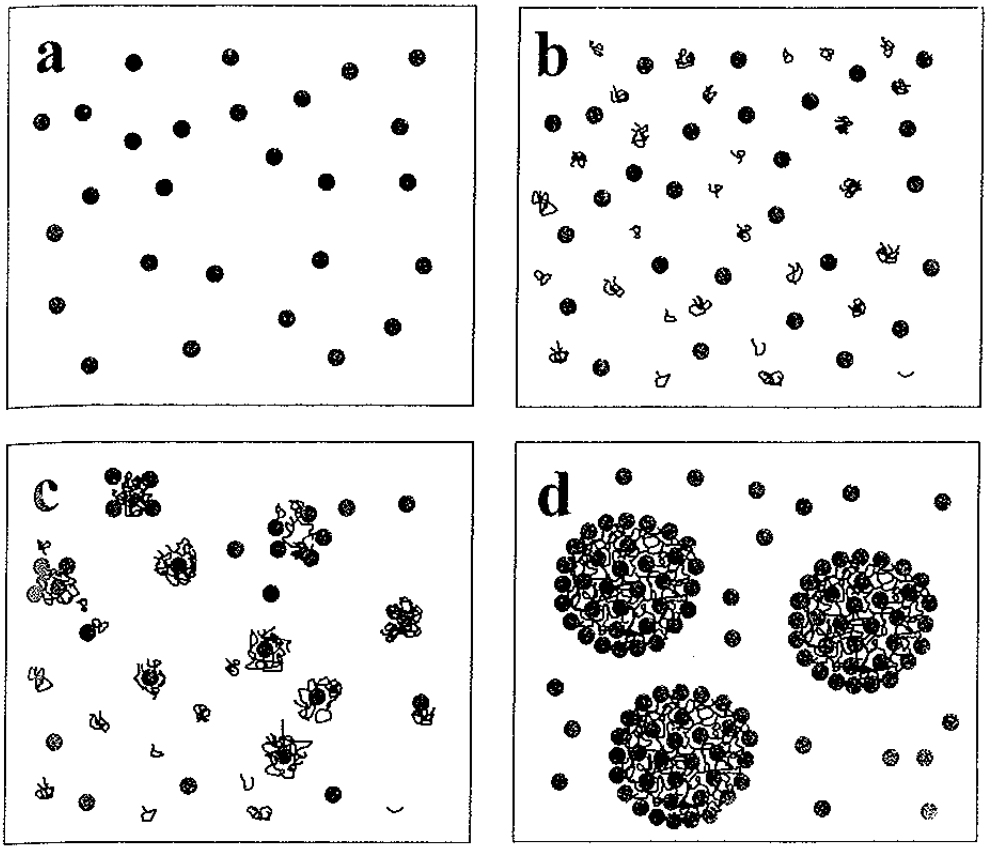
Při přípravě koloidní formy polyanilinu lze s výhodou využít jeho schopnosti adsorbovat se na jakékoliv povrchy, které jsou v kontaktu s reakční směsí. Oxidací anilinu v kyselém vodném prostředí dochází nejprve ke vzniku anilinových oligomerů. Ty jsou více hydrofobní než původní anilinové kationty a mají tendenci vydělovat se z vodného prostředí. Adsorbují se na dostupný povrch, jsou více reaktivní a iniciují další růst polyanilinových řetězců. [3, 6]

Koloidní částice polyanilinu vznikají polymerací anilinu v prostředí s vhodným stabilizátorem, který, dle publikovaných studií, přebírá roli povrchu, na který se polyanilin adsorbuje. Anilinové oligomery se pak během polymerace postupně adsorbují na řetězce stabilizátoru (Obr. 5a). Dochází k růstu polyanilinového řetězce a k vytvoření polyanilinového jádra (Obr.5b), v jehož blízkosti pak probíhá další polymerační proces, kde vznikají stále nové oligomery a polyanilinové řetězce. Koloidní částice polyanilinu se dále formuje a roste (Obr 5c). [6]

Obr. 3. Vznik koloidní částice polyanilinu. [6]

1.2.4.2 Koloid s částicovým stabilizátorem

Model tvorby koloidní částice polyanilinu lze ilustrovat i na příkladu částic tvořených polyanilinem a oxidem křemičitým [30]. Na začátku polymerace je jedinou koloidní složkou v polymerační směsi částicový stabilizátor, oxid křemičitý (Obr. 4a). V průběhu polymerace dochází ke vzniku anilinových oligomerů (Obr. 4b), které se následně připojí ke sterickému stabilizátoru chemickým roubováním nebo fyzikální adsorpcí (Obr. 4c). Částice oxidu křemičitého jsou částečně nebo zcela potaženy polyanilinem a dochází k vytvoření polyanilinových jader. Jádra v průběhu polymerace rostou a postupně vzniká disperzní částice (Obr. 4d). [3, 6]



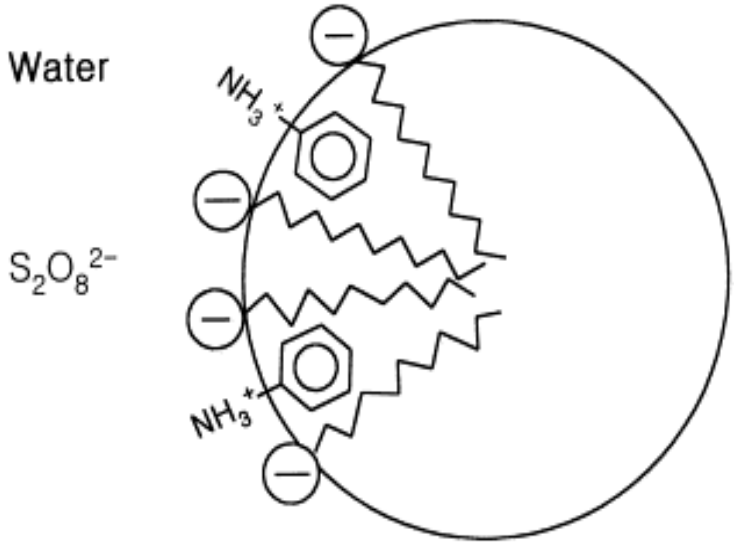
Obr. 4 Model tvorby polyanilinových částic v přítomnosti stabilizátoru, oxidu křemičitého. [3]

1.2.4.3 Koloid stabilizovaný surfaktantem

Zcela odlišný mechanismus tvorby koloidních částic, byl navržen pro případ, že reakce je vedena v přítomnosti povrchově aktivní látky (surfaktantu). Pokud polymerace probíhá přímo v micele surfaktantu, je umístění reaktantů v micelách jedním z nedůležitějších faktorů, které výrazně ovlivňují reakční kinetiku, selektivitu a výtěžek reakce. Místo začlenění solubilizované látky úzce souvisí s její chemickou povahou. Nepolární, vysoce hydrofobní látky jsou začleněny v uhlovodíkovém jádru micely. Polární nebo povrchově aktivní molekuly jsou naopak solubilizovány na povrchu micely. [31]

Pro vysvětlení polymerace anilinu ve formě anilinového kationtu v kyselém vodném prostředí v přítomnosti surfaktantu laurylsulfátu sodného (SDS) navrhli Kuramoto a kol. [32] mechanismus, při kterém se anilinové kationty adsorbují pomocí elektrostatických interakcí na povrch micely a anionické skupiny SDS jsou zcela začleněny do vodné fáze. Určitá část Na^+ protiiontů je však navázána na micelu a v kyselém prostředí může dojít k potlačení elektrické dvojvrstvy, což vede k redukci hustoty náboje micel. [31]

Na základě literární studie, lze předpokládat, že většina anilinových monomerů se solubilizuje na rozhraní fáze micela – voda (Obr. 5). Dále je zřejmé, že některé z nich se mohou adsorbovat na povrchu micely a ve velmi malém množství mohou existovat ve vodné fázi. [31]



Obr. 5 Schéma začlenění anilinu v prostředí HCl do micely SDS. [31]

1.2.5 Standardní příprava koloidního polyanilinu podle IUPAC

Při praktické přípravě koloidního polyanilinu podle IUPAC, kde je jako stabilizátor použit vodorozpustný polymer polyvinylpyrolidon (PVP), se rozpustí 2.59 g (20 mmol) anilinu hydrochloridu a 2.0 g stabilizátoru (PVP) v 50 ml vody. Odděleně se ve stejném množství vody rozpustí 5.71 g (25 mmol) peroxydvojsíranu amonného, oba roztoky se smíchají a nechají polymerovat. Reakční směs po chvíli postupně modrá; nejprve se tvoří pernigranilinová forma polyanilinu, která po skončení polymerace přechází na konečný, zelený emeraldin. Proces polymerace proběhne při laboratorní teplotě ca za 10 minut. Při snížené teplotě (1 – 0 °C) je reakce ukončena přibližně za 1 hodinu. Reakce je exotermní. [3, 6]

1.2.6 Struktura a vlastnosti polyanilinových disperzí

Studie zabývající se vlastnostmi polyanilinových disperzí jsou zaměřeny především na zkoumání jejich elektrických a optických vlastnosti. Ostatní vlastnosti, jako je viskozita polyanilinových disperzí v závislosti na obsahu polyanilinu [33] nebo závislost na hustotě částic [34], byly dosud v literatuře popsány jen zřídka. Pro následné použití koloidních polyanilinových disperzí má zásadní význam jejich koloidní stabilita. [3]

1.2.6.1 Stabilita disperzí

Polyanilinové disperze vykazují obvykle velmi dobrou dlouhodobou stabilitu. Avšak pouhé vizuální posouzení stability disperze nemusí být vždy spolehlivé. Dobrým ukazatelem stability je velikost částic a její případné změny během skladování. Tento parametr lze stanovit metodou dynamického rozptylu světla (DLS). Průměrná velikost částic stabilních polyanilinových disperzí, stanovená metodou DLS se nemění ani po měsících a letech skladování. [3, 7, 35, 36]

1.2.6.2 Velikost částic

Velikost částic lze charakterizovat výše zmíněnou metodou DLS a elektronovou mikroskopií [30, 37]. Velikost částic získaná metodou DLS je obvykle o něco vyšší ve srovnání s rozměry získanými elektronovou mikroskopií. Tento rozdíl lze přisuzovat buď rozdílu mezi hydrodynamickým průměrem částice (získaným na základě difuzního koeficientu rozptylovou metodou) a skutečným poloměrem (získaným elektronovou mikroskopií) nebo změnám velikosti částic vznikajícím při přípravě vzorku (pro elektronový mikroskop suché vzorky, pro DLS částice pozorované v kapalném prostředí). [3]

Velikost částic polyanilinových disperzí může být ovlivněna řadou faktorů, například výběrem reakčního média, teplotou a dalšími podmínkami reakce. Se zvyšujícím se poměrem stabilizátor/monomer se průměrná velikost koloidních částic polyanilinu snižuje [36, 38, 39]. Velikost částic je možné ovlivnit také mícháním reakční směsi v kombinaci s vhodným stabilizátorem. Takto byla snížena velikost částic při použití PVAL jako stabilizátoru, na velikost částic polyanilinové disperze stabilizované pomocí PVP však nemělo míchání žádný vliv. Disperze mohou být také doprovázeny makroskopickou sraženinou polyanilinu a to zejména při nízkém poměru stabilizátor/monomer. Dále bylo zaznamenáno, že při vyšší reakční teplotě došlo ke zvýšení velikosti částic [18, 30, 36]. Větší velikost částic je také často spojována se změnou kulové morfologie. [3]

1.2.6.3 Struktura a tvar částic

Vlastnosti a stabilita disperzních částic jsou často interpretovány na základě předpokladu, že částice mají morfologii „jádro-obal“. U vodivých polymerů se jádro s největší pravděpodobností skládá z polymeru se začleněným sterickým stabilizátorem tzn., že má kompozitní charakter [40, 41]. [3]

Plášť, který je vytvořený ze sterického stabilizátoru, se nachází se na povrchu jader, zabraňuje jejich kontaktu a tím odpovídá za koloidní stabilitu. Částice se strukturou „jádro-obal“ vznikají při disperzní polymeraci klasických monomerů, jako je například styren, kdy monomer způsobuje bobtnání vznikající částice a polymerace probíhá uvnitř částic. [3]

To neplatí v případě monomeru anilinu, který bobtnání vznikajícího polymeru nezpůsobuje. Jeho polymerace probíhá v kontinuální fázi, kde dochází k agregaci mikročástic vysráženého polymeru spolu s adsorbovaným sterickým stabilizátorem do větších objektů. Také v tomto případě sterický stabilizátor vytváří obal na povrchu částic a ty pak mohou mít kompozitní strukturu. Sterický stabilizátor se začleňuje do disperzních částic a to zejména v případě, že polymerace probíhá při vysokém poměru stabilizátor/monomer. [3]

Částice vznikající při disperzní polymeraci klasických monomerů mají dokonalý kulový tvar a typickou velikost částic v rozsahu mikrometrů. Naopak disperzní polymerace anilinu často vede ke vzniku nekulové morfologie částic. Tato jedinečná vlastnost vyvolává velký zájem. V literatuře [26, 42] byly popsány polyanilinové částice, které měly tvar rýžového zrna nebo jehlice s různou velikostí polydisperzity. [3]

1.2.6.4 Další vlastnosti disperzí

Přestože polynilinové disperze obsahují částice vodivého polymeru, elektrická vodivost, vodných disperzí byla zkoumána pouze Sulimenkem a kol. [43]. Vodivost reakční směsi při polymeraci anilinu na polyanilin vzrostla dvojnásobně. V tomto případě dospěli autoři k závěru, že změna vodivosti v průběhu polymerace byla spíše způsobena zvýšením iontové síly reakční směsi, než tvorbou vodivého polyanilinu. [3]

Reologické vlastnosti polyanilinových disperzí byly zkoumány také jen zřídka. Ghosh a kol. [44] studovali viskozitu polyanilinové disperze stabilizované PVP a zjistili, že viskozita závisí na poměru koncentrací polyanilin/PVP jen velmi málo. Wu a kol. [45] viskozimetrickým měřením prokázali, že vodné roztoky sulfonovaného polyanilinu měly koloidní a nikoliv molekulární povahu. [3]

2 CHARAKTERIZACE

2.1 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS), rovněž nazývaný jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS) je v současné době široce používán pro stanovení velikosti koloidních částic. [46, 47]

DLS je metoda vhodná pro měření velikosti částic v submikronové oblasti [48, 49, 50]. Jejím základem je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Fluktuace intenzity rozptýleného světla jsou způsobeny Brownovým pohybem částic a souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na nestacionárních částicích disperzní fáze [51]. Čím rychleji částice difundují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Rychlost těchto změn závisí tedy přímo na pohybu molekuly. Okamžitou hodnotu fluktuace intenzity v čase τ popisuje pro kulové částice stejného tvaru autokorelační funkce $g(\tau)$ definovaná vztahem:

$$g(\tau) = exp\ [-\tau/\tau_C] \tag{1}$$

kde τ_C je tzv. relaxační čas, který je charakterizován jako doba potřebná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Parametr τ_C je v úzkém vztahu k difuznímu koeficientu D rozptylujících částic, který lze vyjádřit pomocí rovnice:

$$\tau_C = 1/Dq^2 \tag{2}$$

kde q je hodnota vlnového vektoru, určená vlnovou délkou primárního světelného paprsku λ a úhlem θ, pod nímž je měřena intenzita rozptýleného světla:

$$q = (4\pi/\lambda)\ sin(\theta/2) \tag{3}$$

Na základě Stokesovy-Einsteinovy rovnice lze pak vypočítat pomocí translačního difuzního koeficientu D velikost částic:

$$d(H) = kT/3\pi\eta D \tag{4}$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, D je translační difuzní koeficient, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí. [51, 52]

Stejně jako řada dalších metod má DLS své výhody a nevýhody. Mezi nesporné výhody této techniky patří rychlé a snadné měření trvající od několika sekund až po několik minut. Metoda je absolutní, a tak kalibrace s částicemi se známou distribucí velikosti není nutná. Navíc je pro měření potřeba velmi jen malé množství vzorku. Hlavní výhodou této techniky je omezení jejího použití na systémy s velikostí částic od několika nanometrů do několika mikronů (4-5μm). [46, 49, 51, 53]

Dalším kritickým bodem aplikace DLS je čištění a plnění měřící kyvety. V případě, že měřený roztok obsahuje prach, nebo mikrobubliny, může dojít k narušení nebo překrytí signálu vzorku a měření pak může být ovlivněno artefakty. Proto je nutná filtrace všech používaných kapalin, zvláště vody, a důkladné čištění kyvet. [46, 51, 53]

DLS je vhodná metoda pro charakterizaci velikosti částic latexů, pigmentů, emulzí, micel a liposomů. Své uplatnění si tato metoda našla také v oblasti biologie a mikrobiologie, při určování velikosti materiálů jako jsou bakterie, viry a DNA. [53, 54]

Metodu DLS použili pro stanovení velikosti části koloidního polyanilinu ve své práci například Kuceková a kol. [94]

2.2 UV-VIS spektroskopie

Podstatou ultrafialové a viditelné spektroskopie je absorpce elektromagnetického záření (UV-VIS) zředěnými roztoky molekul v rozsahu vlnových délek 200–800 nm. Při absorpci elektromagnetického záření v tomto intervalu dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. [55]

Látky, které absorbují záření s vlnovou délkou pod 380 nm, se jeví lidskému oku jako bezbarvé. Látky, které absorbují vlnové délky v rozsahu od 380 do 770 nm, vnímáme jako barevné. Pokud látka absorbuje konkrétní vlnovou délku (tedy určitou barvu), pak se jeví zbarvená tzv. doplňkovou (komplementární) barvou. [56]

Jedním ze stěžejních vztahů UV-VIS spektrometrie je Lambert-Beerův zákon (5), který definuje absorbance jako veličinu přímo úměrnou koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy.

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda . c l \tag{5}$$

Kde A_λ je absorbance, ε_λ molární absorpční koeficient (charakteristický pro danou látku; $dm^3.mol^{-1}.cm^{-1}$), c je látková koncentrace ($mol.dm^{-3}$) a l je tloušťka absorbující vrstvy (cm). [55]

Molární absorpční koeficient, nazývaný také jako extinkční koeficient je silně závislý na vlnové délce a odpovídá absorbanci při jednotkové tloušťce absorbující vrstvy a jednotkové molární koncentraci. Absorbance je aditivní veličinou, absorbují-li záření dané vlnové délky dvě a více složek, je celková absorbance součtem absorbancí jednotlivých složek. Lambert-Beerův zákon platí pouze pro zředěné roztoky o koncentrací přibližně 10^{-2} mol.dm^{-3}, záření musí být monochromatické a absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám během měření. [55, 57]

2.2.1 Elektronová absorpční spektra

Spektra v UV-VIS oblasti souvisejí s přeskoky elektronů ve vnějších molekulových orbitalech a proto jsou označována jako molekulová. [55]

Vnitřní energie molekuly je dána součtem energie elektronové, vibrační a rotační. Uvedené energie nabývají pouze určitých diskrétních hodnot, které odpovídají příslušným energetickým hladinám. Mezi základní a excitovanou elektronovou hladinou je daleko větší rozdíl energií (10^2 kJ.mol^{-1}), než mezi dvěma sousedními vibračními hladinami nebo rotačními hladinami, kde je rozdíl nejmenší (10^{-2} kJ.mol^{-1}). [55]

Při přechodu molekuly do stavu o vyšší energii se však téměř nikdy neuplatňuje pouze samotný elektronový přeskok, ale dojde rovněž ke změně rotační i vibrační energie. Molekula se za standardních podmínek nachází na základní vibrační hladině a její elektrony nejsou excitovány. Absorpci fotonu příjme molekula energii, která vede k přechodu elektronu na excitovanou hladinu a molekula pak přejde na jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin. To umožní absorpci fotonů jen o málo se lišících energií a vytvoření velmi blízkých absorpčních čar ve spektru, které splývají v pás. Proto mají všechna molekulová spektra charakter pásový, na rozdíl od atomových spekter, která jsou čárová. Charakteristikou každého absorpčního pásu je pak vlnová délka, při níž absorbance dosahuje maximální hodnoty. [55]

Typy elektronových přechodů souvisí s vazebnými (π, σ), anti-vazebnými (XX) a nevazebnými (n) atomovými a molekulovými orbitaly. Polohu pásu určují energie orbitalů, mezi kterými dochází k přechodu elektronu při excitaci. Elektronové přechody rozdělujeme takto:

a) $\pi \rightarrow \pi^*$**:** charakteristické pro sloučeniny s násobnou vazbou a konjugované sloučeniny;

c) $n \rightarrow \pi^*$**:** v nenasycených sloučeninách s volným elektronovým párem a π-elektrony;

b) $n \rightarrow \sigma^*$**:** v nasycených sloučeninách, které obsahují atomy O, N, S a halogeny;

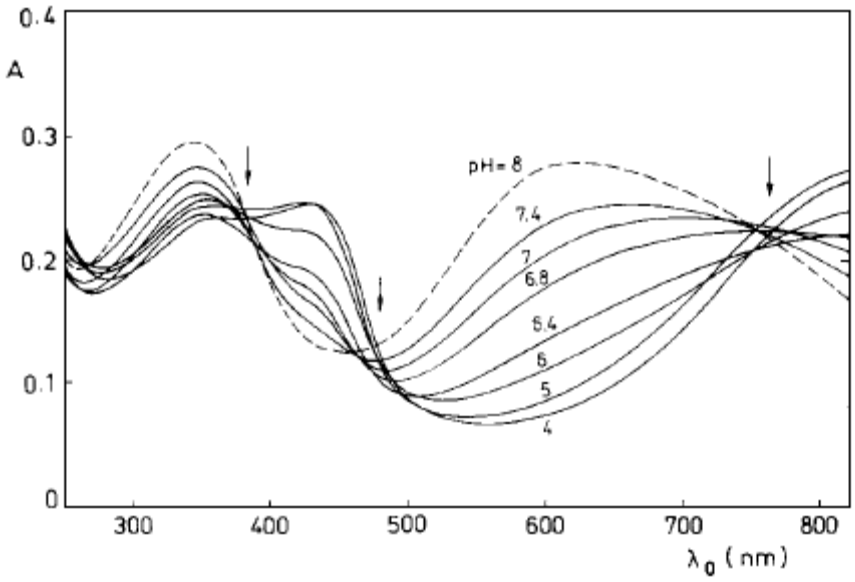
d) $\sigma \rightarrow \sigma^*$ **:** ve sloučeninách s absorbancí vlnových délek do 200 nm ve vakuové UV oblasti.

UV-VIS spektroskopii je možné využít například ke zjištění koncentrace sloučenin, které ve své molekule obsahují chromofory nebo v průtočných celách detektorů různých separačních metod (například kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza). Pro kvalitativní analýzu se UV-VIS spektra využívají jako doplňková k identifikaci neznámých organických látek. Metoda je rychlá, přesná, experimentálně nenáročná a patří mezi nejstarší využívané fyzikálně-chemické metody. [55]

Problematikou UV-VIS spekter koloidního polyanilinu se zabývali ve své práci Stejskal a Kratochvíl [58], kteří zkoumali absorpční spektrum polyanilinového koloidu, ve vodném prostředí a jako stabilizátor použili PVAL. U polyanilinové báze připravené v alkalickém prostředí roztoku amoniaku a poté v *N*-methylpyrrolidonu byly nalezly vždy dva absorpční pásy, jejichž maxima si byla blízká. Výsledek práce [58] potvrzují i další zdroje, které uvádějí, že typické absorpční spektrum pro modrou polyanilinovou bázi má dva absorpční pásy umístěné mezi 315-345 a 610-650 nm [59, 60] a je závislé na přípravě a/nebo zpracování polyanilinu. [58]

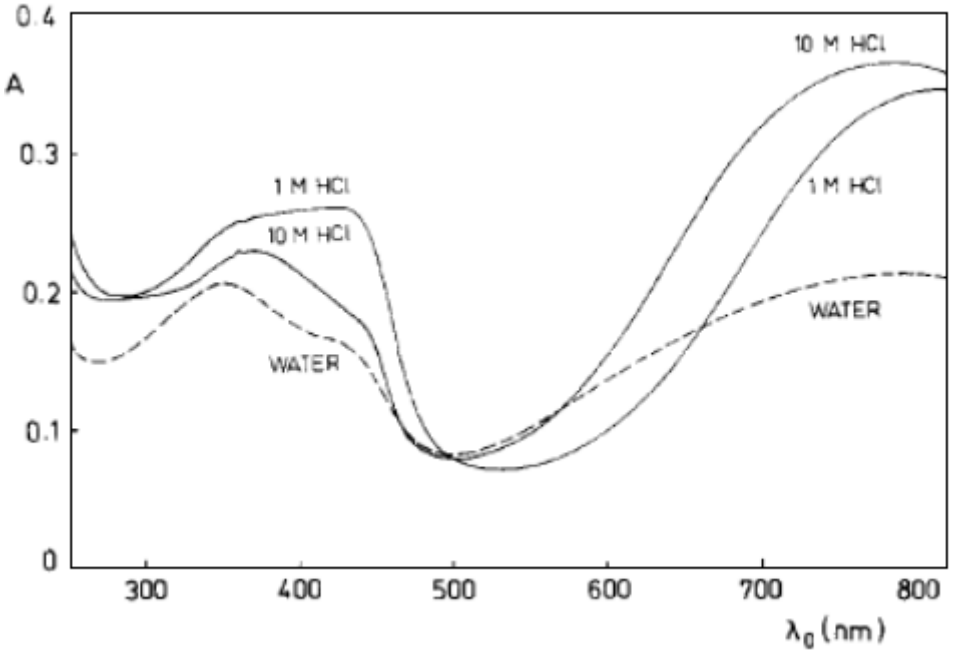
V kyselém prostředí u protonované formy polyanilinu byla zaznamenána přítomnost tří absorpčních pásů při vlnových délkách 350, 430 a 810 nm. Výsledky se opět shodují s dostupnou literaturou, která pro protonovaný polyanilin uvádí přítomnost těchto tří absorpčních pásů při 325-360 nm [61, 62], 400-430 nm [59, 62, 63] a 780-826 nm [61, 64, 65]. Řada publikací [60, 66, 67] však rovněž informuje o sjednocení prvních dvou skupin pásů nebo o jejich zkreslení v jeden pík s lokálním maximem mezi 380 a 420 nm. [58]

Předmětem zájmu práce [58] bylo také studium absorpčního spektra koloidního polyanilinu v závislosti na změně pH disperzního média (Obr. 6). Autoři zaznamenali, že první pík ve spektru polyanilinu v blízké UV oblasti měnil svou polohu při přechodu z alkalického do kyselého prostředí jen minimálně a jeho poloha závisela na pH jen zanedbatelně. Druhý absorpční pás při 430 nm byl na spektru patrný pouze při pH< 7 a po přechodu do alkalického prostředí vymizel. V červené části spektra (610 nm) pak autoři zaznamenali pík typický pro polyanilinovou bázi v alkalickém prostředí, poloha píku byla závislá na pH a s jeho snížením se pík posunul do pásma s maximem při vyšších vlnových délkách, které je typické pro kyselé prostředí (810 nm). [58]



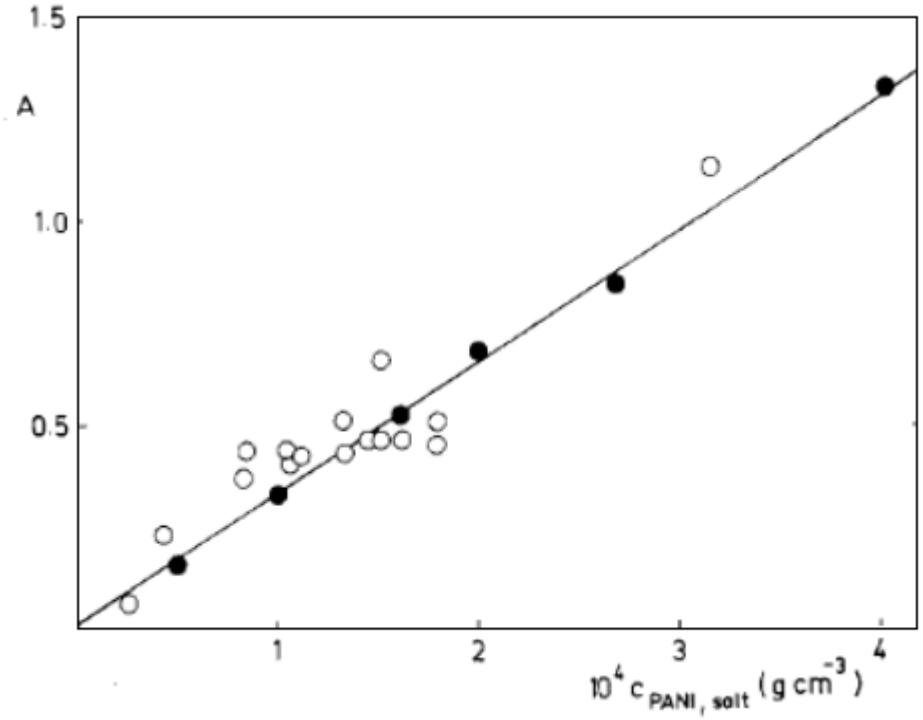
Obr. 6 Absorpční spektra polyanilinové disperze v závislosti na pH. [58]

Dále se práce zabývala závislostí absorpčních spekter na koncentraci HCl v disperzním médiu. Optická spektra polyanilinové disperze v 1M a 10 M HCl a ve vodě jsou uvedena na Obr. 7. Zatímco se první absorpční pás (350 nm) měnil s koncentrací HCl jen málo, druhý absorpční pás (430 nm) vykazoval složitější chování. V práci autoři uvedli, že absorpční pás byl dobře patrný již v 0.01 M roztoku kyseliny chlorovodíkové a zůstal zachován i v 1 M HCl. Další zvyšování koncentrace kyseliny však vedlo k jeho postupnému snižování. [58]



Obr. 7 Absorpční spektra polyanilinové disperze v 1M a 10M HCl. [58]

V publikaci [58] byl určen i molární absorpční koeficient, který je spolu s Lambert-Beerovým zákonem možné použít pro výpočet koncentrace protonované formy polyanilinového koloidu (soli). Při výpočtu absorpčního koeficientu byla koncentrace polyanilinové soli stanovena z hmotnosti pevných látek po vysrážení koloidní polyanilinové disperze v methanolu a po odečtení známé hmotnosti PVAL (byl použit jako stabilizátor). Absorpční koeficient polyanilinového koloidu dispergovaného v 1M HCl, s lokálním maximem mezi 350 a 420 nm, získali autoři vynesením závislosti absorbance *A* tohoto lokálního maxima proti koncentraci soli *c* (stanovené výše popsaným postupem). Tímto způsobem byla získána lineární závislost a absorpční koeficient byl stanoven ze směrnice této přímkové závislosti jako ε = 31 500 + 1700 cm^2/g polyanilin hydrochloridu (Obr. 8). [58]



Obr. 8 Maximální absorbance A s lokálním maximem mezi 350-420 nm v závislosti na koncentraci polyanilinové soli. Různé disperze, zředěné 60 krát (●); zásobní disperze o známé koncentraci polyanilinu zředěná v různém rozsahu (○). [58]

3 BIOKOMPATIBILITA

Biokompatibilita je klíčovou vlastností potřebnou pro jakýkoliv materiál, který má být v přímém styku s tkáněmi. Je definována jako schopnost materiálu plnit požadovanou funkci s ohledem na klinickou aplikaci bez vyvolání jakýkoliv nežádoucích lokálních nebo systémových účinků na organismus nebo pacienta. Slouží k vytváření nejvhodnější příznivé buněčné nebo tkáňové reakce v dané situaci, k podpoře funkčnosti a k optimalizaci klinicky odpovídajícího výkonu léčby. Biokompatibilní materiály by neměly vyvolávat imunitní reakci, neměly by vykazovat toxické, antigenní, karcinogenní a mutagenní vlastnosti. Materiál může být klasifikován jako biokompatibilní až ve chvíli, kdy byl vystaven celé řadě testů (*in vitro* testy, klinické studie atd.), které jsou definovány v mezinárodních normách. [68, 69, 70, 71, 72]

3.1 Cytotoxicita

Jedním ze základních testů, které umožňují lépe porozumět biokompatibilitě materiálů je test potenciální cytotoxicity. Cytotoxicita je vlastnost matriálu, která nemá přesnou definici a liší se v závislosti na povaze studie. Cytotoxické účinky mohou být například spojeny s buněčnou smrtí nebo mohou vést ke změně metabolismu buňky. Obecně platí, že cytotoxicita jakéhokoliv materiálu vyjadřuje jeho potenciál vyvolat nepříznivou odezvu buněk. [73, 74]

Cytotoxicita musí být testována u látek, které mají přijít do styku s buňkami, buď proto, že se zkoumané sloučeniny používají jako léčiva, zdravotnické prostředky nebo kosmetické přípravky. Ve výsledku pak musí být prokázáno, že jsou tyto látky netoxické. [73]

Konkrétní volba testu pro stanovení cytotoxicity závisí na typu studie, povaze testovaného materiálu a předpokládaném místě použití. Testování cytotoxicity se provádí *in vitro* na buněčných liniích a zahrnuje sledování morfologických změn v buňkách, posouzení integrity buněčné membrány, měření životaschopnosti buňky a specifických aspektů buněčného metabolismu. [73]

Vlastní testování lze rozdělit do několika tříd, z nichž se blíže budeme zabývat viabilitou (životaschopností) a přežitelností buněk. [73]

3.1.1 Viabilita buněk

Životaschopnost je okamžitá nebo krátkodobá odpověď buněk například na změnu integrity membrány nebo porušení určité metabolické dráhy, například v souvislosti s buněčnou proliferací. [73]

Testy viability jsou krátkodobé a používají se k měření podílu životaschopných buněk vystavených potenciálně traumatizujícímu procesu (primární členění, separace buněk nebo kryogenní skladování). Odrážejí porušení integrity buněčné membrány, které se projeví buď vychytáváním barviva, pro které je normálně buněčná membrána nepropustná (trypanová modř), nebo uvolněním barviva, které je zadržováno ve zdravých buňkách (neutrální červeň). Tento okamžitý účinek látky na buňky nemusí vždy předvídat jejich konečné přežití. [73]

3.1.2 Přežitelnost buněk

Ačkoliv jsou krátkodobé testy pohodlné a obvykle rychle a snadno proveditelné, jsou schopny identifikovat pouze buňky, které jsou mrtvé (propustné) jen v době testu. Často se však účinek toxických látek projeví na buňkách až o několik hodin nebo dokonce dní později. Povaha zkoušek požadovaná pro měření životaschopnosti buněk v delším časovém horizontu je tedy odlišná, protože v době, kdy se měření provádí, mohou mrtvé buňky zmizet. Z tohoto důvodu jsou k průkazu přežití buněk používány dlouhodobé testy, jelikož krátkodobá toxicita může být reverzibilní. Přežitelnost buněk tedy znamená dlouhodobé zachování jejich regenerační schopnosti a to po pět a více generací. Efektivním ukazatelem míry přežití je schopnost buněk tvořit kolonie tzv. plating efficiency. [73]

3.1.3 Metody testování cytotoxicity *in vitro*

3.1.3.1 Klonogenní test

Klonogenní test může být proveden více způsoby a umožňuje sledovat nejen míru přežití buněk, ale zejména schopnost jejich dalšího rozmnožování (zachování schopnosti reprodukce). [73]

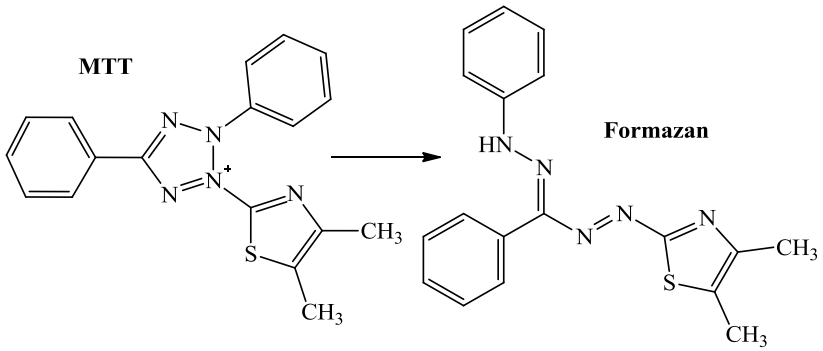
Principem metody je výsev buněčné suspenze v exponenciální fázi růstu v diluční řadě nejčastěji na více-jamkové desky. Délka inkubace se odvíjí od rychlosti růstu jednotlivých buněčných linií a povahy cytotoxinu, zpravidla se pohybuje od 1 do 3 týdnů. Před vlastním vyhodnocením jsou buňky fixovány a obarveny například krystalovou violetí. Při následném

hodnocení se spočítá počet vytvořených kolonií skládajících se z více než 50 buněk (více než 50 generací). [73, 76]

3.1.3.2 MTT test, test mitochondriálních funkcí

MTT test byl poprvé popsán Mossmannem v roce 1983. Jedná se o univerzální metodu používanou pro stanovení životaschopnosti buněk. [73]

MTT (3-[4,5- dimethyl-2- thiazolyl]-2,5- diphenyl-2H- tetrazolium bromid) je žluté ve vodě rozpustné tetrazoliové barvivo, které se redukuje živými, nikoli mrtvými buňkami na fialový produkt formazan, nerozpustný ve vodném prostředí.



Obr. 9 Redukce MTT na formazan.

Princip testu je založen na vystavení buněk, které se nacházejí v exponenciální fázi růstu, cytotoxické látce. Doba expozice je obvykle stanovena jako doba potřebná pro maximální poškození buněk, přičemž je také ovlivněna stabilitou cytotoxické látky. Po odstranění cytotoxické látky se buňky ponechají proliferovat tak, aby se zdvojnásobila jejich populace. Tím je možné odlišit životaschopné, proliferující buňky od těch neživotaschopných, které se již množit nemohou. Počet přeživších buněk je poté stanoven nepřímo, pomocí redukce MTT barviva, ke které dochází na mitochondriální membráně respirací přeživších buněk. Množství formazanu se následně určí spektrofotometricky, za použití vhodného rozpouštědla při vlnové délce 540 nebo 570 nm. Vyšší hodnoty absorbance (více redukovaného formazanu) odpovídají vyššímu počtu přeživších buněk. [73]

3.1.3.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry) je rychlá přesná a reprodukovatelná metoda, která slouží k analýze biologických částic a buněk, které procházejí přístrojem v proudu nosné

kapaliny, přes paprsek světla (laseru). Umožňuje současné měření několika buněčných parametrů najednou (například velikost buněk, jejich přesný počet, granularitu, intenzitu fluorescence) a poskytuje zároveň přehled o distribuci těchto parametrů v populaci buněk zkoumaného vzorku. [77]

K vlastní analýze fyzikálně-chemických vlastností buněk dochází během jejich průchodu laserovým paprskem. Ve chvíli kdy buňka paprsek zkříží, dojde k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu bývá označován jako přímý rozptyl (forward scatter, FSC) nebo boční rozptyl (side scatter, SSC). FSC je úměrný velikostí buňky a SSC je indikátor vnitřní buněčné struktury. Detekována je rovněž fluorescence procházejících buněk nebo částic, přičemž intenzita fluorescence jednotlivých buněk odpovídá množství struktur, které na sebe vážou fluorescenční barviva (fluorochromy). Fluorescenční barvivo navázané na analyzované buňky nebo částice absorbuje světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně část takto absorbovaného světla emituje. Emitované světlo má však odlišnou vlnovou délku, než světlo absorbované. [77, 78]

Vlastní zařízení, průtokový cytometr, se skládá ze tří hlavních systémů: fluidního, optického a elektronického. Fluidní systém přepravuje částice do speciálního prostoru, kde dochází ke křížení dráhy laserového paprsku a proudu těchto částic (buněk). Optický systém se skládá z laseru a ze soustavy optických filtrů, umožňujících detekci světelného signálu příslušnými optickými detektory. Systém elektronický pak převádí světelné signály na elektrické, které mohou být analyzovány počítačem [77, 78].

Průtoková cytometrie má široké využití nejen v klinické praxi jako významná diagnostická metoda v hematologii, onkologii a imunologii, ale také v základním biologickém výzkumu. [79]

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Současné studie zabývající se problematikou koloidního polyanilinu jsou především věnovány polyanilinovým disperzím připraveným různými metodami stabilizace, se zaměřením na jejich materiálové vlastnosti (vodivost, elektrochemické chování, stabilita) a potenciální aplikace (například ochrana proti korozi [80, 81], katalýza organických reakcí [82]). Vedle standardní metody dle IUPAC [6] kde jsou polyanilinové disperze stabilizovány běžně užívanými sterickými stabilizátory (například PVP nebo PVAL), byl nedávno Cruz-Silvou a kol. [83] publikován postup, kdy byl anilin enzymaticky polymerován chitosanem (sterický stabilizátor) v přítomnosti toluensulfonové nebo kafrsulfonové kyseliny. Výsledkem této práce byly stabilní koloidní disperze s velikostí částic pod 200 nm. Dostupné studie také popisují polymeraci anilinu v micele [31, 84], v reverzní micele [80, 85] nebo v emulzi [86, 87]. Kim a kol. [31] popsali přípravu koloidních nanočástic polyanilinu v přítomnosti micelárního roztoku SDS ve vodném prostředí. Takto připravená disperze byla stabilní a velikost jejích částic se pohybovala v rozmezí 10-20 nm. Obdobného výsledku dosáhli ve své práci také Han a kol. [88], kteří provedli polymeraci anilinu v přítomnosti vodného roztoku kyseliny dodecylbenzensulfonové (DBSA). Vzniklý koloid byl stabilní s velikosti částic 20-30 nm.

4.1.1 Biologická aktivita koloidního polyanilinu

Ačkoli je polyanilin zkoumán již řadu let, jeho biologické vlastnosti byly dosud popsány jen vzácně. Zároveň jsou tyto studie zaměřeny především na běžný polyanilinový prášek a polyaniliné filmy. Jmenovitě byly například popsány cytotoxicita, dráždivost, senzibilizace [89] a antibakteriální vlastnosti [90, 91] polyanilinového prášku připraveného v souladu s postupem stanoveným IUPAC [6]. Další studie zabývající se biologickými vlastnostmi, jako je *in-vivo* reakce tkání a polyanilinu, jsou většinou testovány na polyanilinových filmech připravených na různých nosných plochách [92] a na polyanilinových kompozitech [93]. [94]

Biologická aktivita koloidního polyanilinu byla poprvé zkoumána Kucekovou a kol. [94] teprve nedávno. Testovaný koloid byl připraven standardním způsobem [6] s PVP jako stabilizátorem. Jedním z cílů této studie bylo rovněž stanovení cytotoxicity koloidu. Výsledky ukázaly, že viabilita buněk se po kontaktu s koloidem snižovala s jeho rostoucí koncentrací v kultivačním médiu. Zatímco práh cytotoxicity koloidního polyanilinu aplikovaného na buňky HaCaT byl v blízkosti koncentrace 345 $\mu g.ml^{-1}$, v případě druhé testované buněčné

linie, NIH/3T3, byla tato koncentrace nižší (105 $\mu g.ml^{-1}$). Analogické výsledky byly publikovány také v práci Oh a kol. [95], kteří testovali cytotoxicitu polyanilinu ve formě nanočástic (rovněž s PVP jako stabilizátorem), které se lišily poměrem délky a šířky (aspect ratio). V této studii autoři nepozorovali žádný znatelný vliv na životaschopnost buněk při koncentraci polyanilinu nižší, než 25 $\mu g.ml^{-1}$. Významné snížení životaschopnosti buněk poprvé zaznamenali nad koncentrací 100 $\mu g.ml^{-1}$.

Kuceková a kol. [94] rovněž provedli studii, ve které se zabývali rozlišením zdravých, apoptotických a nekrotických buněk po ošetření polyanilinem a oxidativním vzplanutím neutrofilů. V této části práce zjistili, že počet zdravých, nekrotických a apoptických buněk rovněž závisí na koncentraci polyanilinového koloidu a že kritická koncentrace polyanilinu je pro biologicky bezpečné aplikace 150 $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla také uvedena jako koncentrační limit pro aktivitu neutrofilů tzn., že pod touto hodnotou koloidní polyanilin nebyl schopen stimulovat produkci reaktivních forem kyslíku. [94]

V publikaci [94] byly zkoumány také antibakteriální vlastnosti koloidu. Autoři uvádí, že citlivost bakterií na koloidní polyanilin je závislá na druhu bakterie. Jako příklad jsou uvedeni dva zástupci gram-negativních bakterií. U bakterie *Escherichia coli* pozorovali inhibici růstu, již při koncentraci koloidního polyanilinu 3 500 $\mu g.ml^{-1}$, u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byl antibakteriální účinek poprvé zaznamenán při nejvyšší testované koncentraci 8 500 $\mu g.ml^{-1}$. Antibakteriální aktivita pozorována v této studii byla porovnána se studií publikovanou Gizdavic-Nikolaidis a kol. [96] provedenou na polyanilinovém prášku. Porovnání bylo provedeno na základě podobnosti metod používaných pro antibakteriální testování. Gizdavic-Nikolaidis a kol. [96] připravili „koloidní formu“ re-suspendací standardního polyanilinového prášku v živné půdě. Srovnání výsledků ukázalo, že polyanilinový koloid má vyšší antibakteriální aktivitu, než re-suspendovaný polyanilinový prášek. [94]

5 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce bylo zpracovat zadané téma formou literární rešerše a soustředit se na problematiku koloidních polyanilinových disperzí a jejich vhodných stabilizátorů. Cílem bylo rovněž popsat vlastnosti koloidů, věnovat se metodám jejich charakterizace a v neposlední řadě i postupům vhodným pro stanovení jejich biokompatibility;

V praktické části bylo úkolem připravit stabilní koloidní polyanilin v přítomnosti vhodného stabilizátoru a provést syntézu tak, aby bylo možno kontrolovat velikost disperzních částic. Dalším úkolem bylo provést základní fyzikální a chemickou charakterizaci připraveného koloidu a testovat jeho interakci s buňkami.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Materiál

6.1.1 Použité chemikálie

- Anilin hydrochlorid (Sigma Aldrich, ≥98 %)
- Anilin (Sigma – Aldrich, ≥ 99.5 %)
- Ammonium persulfát (Sigma Aldrich, 98 %)
- Kyselina chlorovodíková (HCl, 35 %)

Polyanilinová disperze byla připravena v přítomnosti pěti rozdílných stabilizátorů:

- Poly-*N*-vinylpyrrolidon (PVP, M = 36 000 g. mol^{-1}, type K9Y, Fluka)
- Kyselina hyarulonová (HA-A (M = 1.8 – 2.1 10^6 $g.mol^{-1}$); HA-B (M = 50.28 10^3 $g.mol^{-1}$))
- Chitosan, číslo produktu C3646, stupeň deacetylace > 75 %, molekulová hmotnost neuvedena (Sigma Aldrich)
- Dodecylsulfát sodný (SDS, lauryl sulfát sodný), anionický surfaktant, HLB 40 (Sigma – Aldrich, ≥98.5 % (GC))
- Triton X-100 (TX 100, Polyethylene glycoltert-octylphenyl ether), neionický surfaktant, HLB 13.5 (Sigma Aldrich)
- Tween 20 (TW 20, Polyethylenglykol sorbitan monolaurát), neionický surfaktant, HLB 16.7 (Sigma Aldrich)

6.1.2 Laboratorní sklo a plasty

Laboratorní sklo používané pro biologické testy, bylo sterilizováno horkým vzduchem při teplotě 160 °C po dobu 240 minut. Laboratorní plasty byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Veškerý materiál, který byl použit při práci v biologických laboratořích (mikrotitrační destičky, špičky, zkumavky aj.) byl dekontaminován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut v autoklávu.

6.1.3 Použité zařízení a pomůcky

- Analytické váhy Denver Summit, SI-A203A (Merci)
- Autokláv Steam Stelirizer, 3870ELPV-D (Tuttnauer)
- Automatické mikropipety Eppendorf Research (Eppendorf)
- Centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf)

- Fotometr Infinite M200 Pro NanoQuant (Tecan)
- Inkubátor Heracell 150i (ThermoScientific)
- Laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP (ThermoScientific)
- Spektrální fotometr photo Lab 6600 UV-VIS (WTW)
- Světelný mikroskop s fázovým kontrastem Olympus IX 81 (Olympus)
- ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- A další běžně používané sklo (kádinky, tyčinky, zkumavky) a laboratorní plasty (mikrotitrační destičky, špičky pro automatické mikropipety, kyvety)

6.2 Disperzní polymerace anilinu

6.2.1 Stabilizace pomocí PVP - modifikace postupu IUPAC

Jednotlivé vzorky byly připraveny oxidací anilin hydrochloridu (0.2 M) peroxydvojsíranem amonným (APS) o koncentraci 0.25-0.01 M v přítomnosti vodného roztoku PVP (2 %; M = 36 000 $g.mol^{-1}$). Přesné složení reakčních směsí je uvedeno v Tab. 1. Anilin hydrochlorid byl rozpuštěn v 5 ml vodného roztoku PVP o koncentraci 40 $g.l^{-1}$. Polymerace byla zahájena přídavkem 5 ml vodného roztoku APS o dané koncentraci. Reakční směs byla krátce zamíchána a ponechána v klidu polymerovat:

a) při 20 °C;

b) při 0 °C.

Reakce byla ukončena při teplotě 20 °C během 10 minut, při teplotě 0 °C do 40 minut.

Tab. 1 Složení reakčních směsí pro přípravu koloidního PANI v přítomnosti stabilizátoru PVP. Polymerace byla provedena při 0 a 20 °C

Teplota *Označení vzorku*		Koncentrace (anilin hydrochlorid)		Koncentrace (APS)	
20 °C	0 °C	(M)	(g)	(M)	(g)
P1-A	*P2-A*	0.20	0.250	0.25	0.571
P1-B	*P2-B*	0.20	0.250	0.20	0.456
P1-C	*P2-C*	0.20	0.250	0.15	0.342
P1-D	*P2-D*	0.20	0.250	0.10	0.228
P1-E	*P2-E*	0.20	0.250	0.05	0.114
P1-F	*P2-F*	0.20	0.250	0.01	0.023

6.2.1 Stabilizace kyselinou hyaluronovou

Vzorky koloidu byly připraveny oxidací anilin hydrochloridu (0.2 M) APS o různé koncentraci v přítomnosti stabilizátoru, kyseliny hyaluronové o dvou různých molekulových hmotnostech, HA-A (M = 1.8 – 2.1 10^6 g.mol^{-1}) nebo HA-B (M = 50.28 10^3 g.mol^{-1}). Přesné složení jednotlivých reakčních směsí je uvedeno v Tab. 2.

V první sadě experimentů byl použit vodný roztok HA-A o koncentraci 2–0.5 %. Koncentrace anilin chloridu (0.2 M) a APS (0.05 M) byla konstantní. V druhé sadě experimentů byla použita HA-B o koncentraci 1-0.5 % a měnila se koncentrace APS.

Vlastní experiment probíhal následovně: anilin hydrochlorid byl rozpuštěn v 5 ml vodného roztoku HA-A nebo HA-B. Polymerace byla zahájena pomalým, postupným přidáváním 5 ml vodného roztoku APS, které trvalo ca 10 minut. Reakční směs byla během přídavku APS míchána a poté ponechána v klidu polymerovat při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena po 40 minutách.

Tab. 2 Složení reakčních směsí pro přípravu koloidního PANI v přítomnosti stabilizátoru kyseliny hyaluronové. Ve vzorcích HA-A byla použita HA s M = 1.8 – 2.1 x 10^6 g.mol^{-1} a HA-B s M = 50.28 10^3 g.mol^{-1}

Označení vzorku Koncentrace HA (%)		Koncentrace (anilin hydrochlorid)		Koncentrace (APS)	
		(M)	(g)	(M)	(g)
HA-A1	2.0	0.2	0.259	0.05	0.114
HA-A2	1.0	0.2	0.259	0.05	0.114
HA-A3	0.5	0.2	0.259	0.05	0.114
HA-B1	1.0	0.2	0.259	0.05	0.114
HA-B2	0.5	0.2	0.259	0.05	0.114
HA-B3	0.1	0.2	0.259	0.05	0.114
HA-B4	1.0	0.2	0.259	0.01	0.023
HA-B5	0.5	0.2	0.259	0.01	0.023
HA-B6	0.1	0.2	0.259	0.01	0.023

6.2.2 Stabilizace chitosanem

Jednotlivé vzorky byly připraveny oxidací (1) anilin hydrochloridu (0.2 M) (CH-A) nebo (2) anilinu (2 hm%) (CH-B) peroxydvojsíranem amonným (APS) o různé koncentraci v přítomnosti roztoku chitosanu. Všechny reaktanty byly rozpuštěny v 1M HCl. Chitosan byl

rozpouštěn přes noc za stálého míchání. Přesné složení reakčních směsí je uvedeno v Tab. 3.

Vlastní experiment probíhal následovně: Anilin hydrochlorid/anilin byl rozpuštěn v 5 ml roztoku chitosanu. Polymerace byla zahájena postupným přidáváním 5 ml roztoku APS (10 minut) za stálého míchání. Reakční směs byla poté nechána v klidu polymerovat při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena během 40 minut. Příprava vzorků CH-B probíhala obdobně, avšak polymerace byla provedena v ultrazvukové lázni.

Tab. 3 Složení reakčních směsí pro přípravu koloidního PANI v přítomnosti stabilizátoru chitosanu. Polymerace provedená s anilin hydrochloridem (CH-A) a anilinem (CH-B)

Označení vzorku Koncentrace CH (%)		Koncentrace (Anilin hydrochlo-rid)		Koncentrace (APS)	
		(M)	(g)	(M)	(g)
CH-A1	0.5	0.2	0.259	0.05	0.114
CH-A2	0.1	0.2	0.259	0.05	0.114

Označení vzorku Koncentrace CH (%)		Koncentrace (Anilin)	Koncentrace (APS)	
		(hm. %)	(M)	(g)
CH-B1	1.0	2	0.05	0.114
CH-B2	0.5	2	0.05	0.114
CH-B3	0.1	2	0.05	0.114
CH-B4	1.0	2	0.01	0.023
CH-B5	0.5	2	0.01	0.023
CH-B6	0.1	2	0.01	0.023

6.2.1 Stabilizace surfaktanty

Pro přípravu koloidního polyanilinu stabilizovaného surfaktanty byly použity SDS, Triton X-100 a Tween 20. Roztok 0.1 M (nebo 1 M HCl) byl připraven přidáním 35 % HCl do demineralizované vody, a použit jako vodná fáze micelárního roztoku. Přesné složení pro každou reakční směs je uvedeno v Tab. 4.

V první sadě experimentů, byla měněna koncentrace anilinu v rozsahu 0.03-0.1 M, přičemž koncentrace SDS (0.2 M) byla konstantní. Ve druhé sadě experimentů se měnila koncentrace

SDS a konstantní zůstala koncentrace anilinu (0.03 M) a APS. Ve třetí sadě experimentů byl měněn poměr anilin/APS, při konstantní koncentraci SDS (0.2 M) a anilinu (0.03 M).

Pro přípravu polyanilinové disperze obsahující stabilizátory Triton X-100 a Tween 20 byla zvolena koncentrace anilinu 0.03 M, koncentrace Triton X-100 byla 0.1 M, koncentrace Tween 20 0.05 M a poměr anilin/APS činil 2:1.

Vlastní experiment probíhal následovně: do 40 ml reakční směsi byl za míchání, po kapkách po dobu 15 minut přikapáván APS rozpuštěný v 10 ml 1 M, resp. 0.1 M HCl (složení jednotlivých reakčních směsí je uvedeno v Tab. 4). Poté byla směs ponechána v klidu polymerovat. Reakce byla ukončena během dvou hodin, včetně doby přikapávání APS.

Tab. 4 Složení reakčních směsí pro přípravu polyanilinu v přítomnosti surfaktantů

Stabilizátor *Označení vzorku*		Koncentrace (stabilizátor)		Koncentrace (anilin)		Koncentrace HCl (M)	Poměr anilin/APS
		(M)	(g)	(M)	(g)		
SDS	*S1-A*	0.20	2.884	0.03	0.140	0.1	2:1
	S1-B	0.20	2.884	0.05	0.233	0.1	2:1
	S1-C	0.20	2.884	0.08	0.373	0.1	2:1
	S1-D	0.20	2.884	0.10	0.465	0.1	2:1
	S2-A	0.40	5.768	0.03	0.279	1	2:1
	S2-B	0.60	8.652	0.03	0.279	1	2:1
	S3-A	0.20	2.884	0.03	0.279	1	1:1
	S3-B	0.20	2.884	0.03	0.279	1	1:1.5
	S3-C	0.20	2.884	0.03	0.279	1	1:2
Triton X-100	*TX 100*	0.10	3.235	0.03	0.279	1	2:1
Tween 20	*TW 20*	0.05	3.079	0.03	0.279	1	2:1

6.3 Charakterizace koloidního polyanilinu

6.3.1 Velikost částic

Měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Pro měření bylo použito příslušné množství vzorku koloidu v 1 ml 1M HCl, která byla 2x filtrována přes filtr s velikostí pórů 0.22 μm. Všechna měření velikosti částic byla prováděna při teplotě 25 °C a rozptylovém úhlu 173 °. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno softwarem použitého přístroje a velikost částic byla vyjádřena jako z-průměr velikosti koloidní částice, což je intenzitně vážený střední průměr velikosti, který je nejčastěji používanou veličinou pro vyjádření velikosti částic z měření DLS. Byl rovněž stanoven index polydisperzity PdI, jenž vyjadřuje šířku distribuce velikostí částic přítomných ve vzorku.

Dále byla pomocí DLS stanovena změna velikosti koloidních částic v průběhu polymerační reakce koloidu, kde byl stabilizátorem PVP. Pro experiment byly výše uvedeným postupem připraveny polymerační směsi (P1-B, P1-F). Z každé směsi byly po 0, 1, 2, 4, 6, 8 a 10 minutách od zahájení polymerace postupně odebírány 2 μl reakční směsi do 1 ml 1M HCl, která byla 2x filtrována přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0.22 μm a byly měřeny hodnoty velikosti částic.

6.3.2 Sledování průběhu polymerace koloidního polyanilinu UV-VIS

Sledování průběhu polymerace probíhalo na spektrálním fotometru photo Lab 6600 UV-VIS. Reakční směsi (S1-A) a (S1-C) byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 5.2.3. Absorpční spektrum bylo zaznamenáno v rozsahu vlnových délek 200-800 nm v závislosti na rychlosti barevné změny reakční směsi, která odrážela rychlost probíhající polymerace. Barevná změna polymerační směsi začala po indukční době (ca 5 – 15 min) od ukončení přídavku APS. Ze vzorku (S1-A) bylo vždy přesně odpipetováno 140 μl reakční směsi do 3 ml 1M HCl a absorpční spektra byla měřena po 15, 25, 30, 40, 50, 60, 120, 240, 480 minutách a 24 hodinách. Ze vzorku (S1-C) bylo vždy přesně odváženo 0.062 g reakční směsi do 3 ml 1M HCl, absorpční spektra byla měřena po 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 240, 480 minutách a 24 hodinách.

6.3.3 Stanovení koncentrace polyanilinu v koloidním roztoku

Koncentrace polyanilinu v koloidním roztoku byla stanovena pro vzorky S1-A a S1-C. Vzorky byly připraveny přesným odpipetováním 1 M HCl a příslušného množství koloidního roztoku polyanilinu (S1-A nebo S1-C), Tab. 5. Absorpční spektra koloidů byla měřena v rozsahu vlnových délek 200-800 nm na spektrálním fotometru photo Lab 6600 UV-VIS (WTW). Poté byly odečteny hodnoty absorbance při odpovídající maximální vlnové délce 375 nm, pro S1-A (0.546) a S1-C (0.465), ze kterých byly dále vypočteny hodnoty koncentrace jednotlivých vzorků koloidního polyanilinu pomocí Lambert-Beerova zákona (Rov. 5). Výpočet koncentrace polyanilinu byl proveden na základě hodnoty absorpčního koeficientu ε (31 500 cm^2/g.cm) publikované Stejskalem a Kratochvílem [59] a hodnoty absorbance A změřené pro příslušný roztok (Tab. 5). Příklad výpočtu je uveden níže. Výsledná koncentrace byla následně vynásobena příslušným ředěním a je rovněž uvedena v Tab. 5.

$$c_{S1-A} = \frac{A_\lambda}{\varepsilon_\lambda \cdot l} = \frac{0.546}{31500 cm^2/g \cdot 1 cm} = 1.73 \cdot 10^{-5} g.ml^{-1} = 17.3\ \mu g.ml^{-1}$$

Tab. 5 Hodnoty absorbancí pro vzorky koloidu S1-A a S-C, jejich koncentrace a odpovídající koncentrace polyanilinu v koloidu

Vzorek	Množství koloidu [µl]	Množství 1 M HCl [ml]	Absorbance	Koncentrace polyanilinu [µg.ml^{-1}]
S1-A	100	2.90	0.546	520.0
S1-C	50	2.95	0.465	885.7

Koncentrace polyanilinu 520 µg.ml^{-1} (S1-A) a 885.7 µg.ml^{-1} (S1-C) byly použity jako výchozí hodnoty (100 %) pro další výpočty koncentrací polyanilinu (µg.ml^{-1}) pro stanovení cytotoxicity (viz Tab. 13).

6.4 Buněčné linie

6.4.1 Příprava vzorků pro stanovení cytotoxicity – dialýza

Testované vzorky (S1-A, S1-C) byly před vlastním testováním cytotoxity podrobeny dialýze. Dialýza byla provedena proti 0.2 M HCl, která byla připravena smícháním potřebného množství 35 % HCl s destilovanou vodou. Pro dosažení maximální permeability byla nejprve dialyzační membrána Float-A-Lyzer G2 ponořena na 10 minut do 10 % roztoku etanolu, poté důkladně propláchnuta a následně vložena na 20 minut do destilované vody. Do takto připravené dialyzační membrány bylo odpipetováno 10 ml vzorku, membrána byla uzavřena a vložena do 600 ml 0.2 M HCl. Dialýza trvala 48 hodin a v jejím průběhu byl dialyzační roztok celkem 5x vyměněn (po 2, 4, 8, 16, 24 hodinách).

6.4.2 Použité buněčné linie

V rámci studie byly použity buňky buněčné linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco´s Modified Eagle Medium, s vyšším obsahem glukózy, ke kterému bylo dle návodu pro kultivaci buněk přidáno 10 % telecího séra a antibiotikum (Penicillin/Streptomycin, 100 U/ml (100 $\mu g.ml^{-1}$), PAA Laboratories GmbH). Buňky byly kultivovány jako adherentní kultura v polystyrenových kultivačních nádobách (TPP). Podmínky kultivace (teplota 37 °C, konstantní relativní vlhkost a 5% atmosféra oxidu uhličitého) byly zajištěny pomocí inkubátoru Heracell 150i.

6.4.3 Trypsinizace a prekultivace

Po dostatečném namnožení adherovaných buněk, které byly zkontrolovány pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem Olympus IX 81, byla provedena samotná prekultivace buněk. Všechny níže popsané kroky byly provedeny v laminárním boxu s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP. Nejprve bylo z kultivační nádoby s buňkami co nejdokonaleji odsáto kultivační médium. Všechny zbytky média a séra (obsahuje Ca^{2+} ionty, které inhibují trypsin) byly poté odstraněny krátkým opláchnutím fosfátovým pufrem (PBS; 0.2 $ml.cm^{-2}$ plochy misky) a jeho opětovným odsátím. Dále byl přidán trypsin (0.1 $ml.cm^{-2}$ plochy misky), jehož úkolem bylo přerušení vazeb jak mezi adherovanými buňkami a kultivačním povrchem, tak i mezi jednotlivými buňkami. Působení trypsinu probíhalo v inkubátoru Heracell 150i za průběžné kontroly mikroskopem Olympus IX 81 a trvalo do oddělení buněk, nejdéle však po dobu 20 minut. Po dokonalém oddělení buněk bylo do této nádoby přidáno stejné množství kultivačního média, jako bylo množství přidaného trypsinu

a roztok s buňkami byl pomocí pipety převeden do centrifugační zkumavky. Centrifugace byla provedena na centrifuze Eppendorf 5702 R při teplotě 37 °C, po dobu tří minut, při rychlosti 1100 rpm. Po centrifugaci byly buňky koncentrovány na dně zkumavky a po odsátí supernatantu byl jejich přibližný počet 2.10^7. Pro další práci byly buňky naředěny kultivačním médiem na požadovanou koncentraci 1.10^5 buněk/ml. Takto připravené buňky byly nasazeny do 96 jamkových polystyrenových testovacích destiček v objemu 100 µl do každé z jamek. Celkem byly připraveny 3 destičky, které byly následně kultivovány po dobu 24 hodin v inkubátoru Heracell 150i.

6.4.4 Přídavek testované látky

Testování cytotoxicity bylo provedeno v souladu s ISO normou 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“ s drobnými úpravami. Po uplynutí doby potřebné pro prekultivaci bylo médium z jamek odsáto a následně nahrazeno roztoky koloidního polyanilinu o příslušné koncentraci v množství 100 µl. Na základě předběžných testů byly použity tyto koncentrace koloidů: 1; 0.9; 0.8; 0.7; 0.6; 0.5; 0.4; 0,3; 0.2; 0.1; 0.05 a 0.01 %, kterým odpovídaly koncentrace polyanilinu vzorku S1-A a S1-C ($\mu g.ml^{-1}$) uvedené v Tab. 13. Všechny testy byly provedeny čtyřikrát a jako reference bylo použito čisté kultivační médium bez testovaných složek. Testované koncentrace koloidu byly ředěny čistým kultivačním médiem, například koncentrace koloidu 1 % byla získána smícháním 1 µl 100% koloidního polyanilinu s 99 µl média. Po přidání jednotlivých roztoků byly buňky opět 24 hodin kultivovány v inkubátoru Heracell 150i.

6.4.5 MTT test

K posouzení cytotoxického účinku byl použit MTT test. Po uplynutí 24 hodinové kultivace byly z jamek odsáty roztoky o výše uvedených koncentracích koloidu, v případě kontroly pak médium. Poté bylo do jamek s buňkami přidáno čisté médium a MTT o koncentraci 0,5 $mg.ml^{-1}$. Buňky s MTT byly následně čtyři hodiny kultivovány. Po uplynutí této doby bylo z každé jamky nejprve odpipetováno 40 µl roztoku, které bylo ponecháno v pipetě. Zbylý roztok byl odsán a ponechaných 40 µl bylo vráceno zpět do jamky. Dále bylo přidáno 80 µl dimethylsulfoxidu a po 15 minutách kultivace bylo provedeno spektrofotometrické vyhodnocení cytotoxicity přístrojem Infinite M200 Pro NanoQuant, při vlnové délce 570 nm a referenční vlnové délce 690 nm.

Odstranění odlehlých hodnot bylo provedeno pomocí Dixonova Q testu. Pro vyhodnocení byly použity pouze střední průměrné hodnoty a dle požadavků mezinárodní normy ISO

10993-5 [97] byla použita následující stupnice cytotoxického účinku testovaných vzorků: (a) necytotoxický účinek (množství viabilních buněk vyšší než 80 %); (b) slabě cytotoxický účinek (množství viabilních buněk 60 – 80 %); (c) středně cytotoxický účinek (množství viabilních buněk 40 – 60 %); (d) silně cytotoxický účinek (množství viabilních buněk menší než 40 %).

7 VÝSLEDKY

7.1 Charakterizace velikosti částic koloidního polyanilinu

Velikost částic koloidního polyanilinu připraveného v přítomnosti různých typů stabilizátorů byla sledována za pomocí měření velikosti částic stanovených, jako „z-průměr“ částic na přístroji Zeta Nano ZS. Tento z-průměr vyjadřuje intenzitně váženou střední hodnotu velikosti všech částic přítomných v disperzi. Dále jsou uvedeny distribuční křivky velikosti částic získané z „intenzitní“ distribuce, které mají informační hodnotu především v případě vzorků s bimodální nebo multimodální distribucí velikosti částic (přítomnost dvou a více píků). Tyto údaje poskytují informaci o velikosti částic v každém z přítomných píků, stejně jako o zastoupení částic s různými velikostmi ve vzorku vyjádřené jako procenta (%) z celkového množství částic. Jako další informace jsou uvedeny střední hodnoty indexu polydisperzity (PdI), ze kterých lze usuzovat na šířku distribuce částic ve vzorku.

V rámci kontroly měření byla stanovena opakovatelnost měření velikosti částic disperzí (z-průměr), která byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (Sr) tří stanovení.

7.1.1 Stabilizace PVP

Cíl připravit částice koloidního polyanilinu s řízenou velikosti byl nejprve řešen pomocí modifikace základního postupu publikovaného v [6]. Tato modifikace byla použita pro přípravu polyanilinové disperze s PVP jako stabilizátorem (PANI-PVP) při teplotě a) 20 °C a b) 0 °C pro různé koncentrace APS (0.25-0.01 M), (Tab. 5). V Tab. 5 jsou uvedeny informace o z-průměru velikosti částic, hodnoty PdI a jejich relativní směrodatné odchylky (Sr). Jelikož bylo v průběhu charakterizace disperzí pomocí DLS zjištěno, že se velikosti částic nemění, byly některé vzorky měřeny pouze jednou, a proto zde není uvedena Sr.

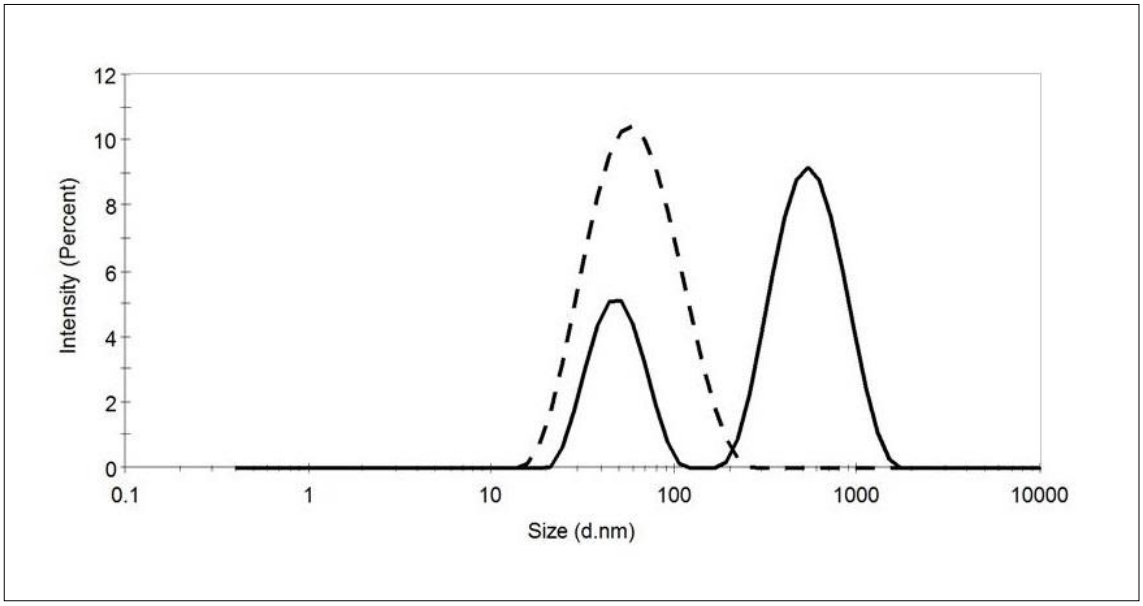
Z výsledků v Tab. 5 je zřejmé, že při teplotě 20 °C došlo se změnou koncentrace APS i ke změně velikosti koloidních částic. Obecně lze pozorovat, že ve dvou nejvyšších koncentracích APS (0.25 a 0.2 M) byla velikost částic nejvyšší (> 360 nm). Při koncentraci APS 0.15-0.05 M se velikost částic snížila a pohybovala kolem 270 nm. Dosud uvedené vzorky vykazovaly monomodální distribuce, svědčící o přítomnosti jedné populace částic. Další snížení koncentrace APS na 0.01 M, vedlo k přípravě koloidu s velikostí částic 124 nm a bimodální distribucí, kde hlavní populace částic měla velikost nad 500 nm a tvořila více jak 70 % částic a vedlejší populace měla velikost částic mezi 50-60 nm a tvořila ca 30 % všech částic (Obr. 10). Na Obr. 10 je zaznamenána distribuce částic/polymerních klubek samotného PVP a

PANI-PVP připraveného s ASP o koncentraci 0.01 M. Z distribučních křivek je zřejmé, že při nízké koncentraci APS zůstává v disperzi i samotný polymerní stabilizátor PVP. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že vzhledem k nízké koncentraci jednoho z monomerů (APS) nedošlo k dostatečnému růstu polymeru polyanilinu na všech PVP řetězcích. Z výsledků této studie tedy plyne, že na velikost částic koloidního polyanilinu má vliv i poměr mezi stabilizátorem a oxidačním činidlem. Při nízké koncentraci oxidačního činidla (APS), zůstává v reakční směsi i samotný PVP a ve vyšších koncentracích APS vznikají větší částice.

Tab. 6 Hodnoty velikosti částic PANI-PVP v závislosti na koncentraci APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu připraveného při teplotě 0 °C a 20 °C

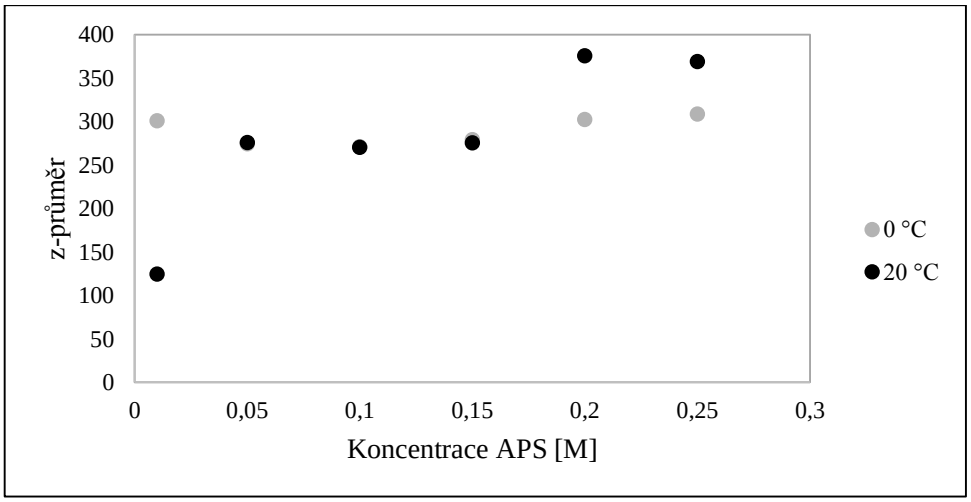
t (°C)	vzorek	Koncentrace APS (M)	z-průměr (nm)	Sr (%)	PdI	Sr (%)	Distribuce*
20	P1-A	0.25	369	2.6	0.213	11.6	MM
	P1-B	0.20	376	0.2	0.232	7.9	MM
	P1-C	0.15	275	1.3	0.181	3.9	MM
	P1-D	0.10	270	1.1	0.185	10.3	MM
	P1-E	0.05	276	1.9	0.225	5.4	MM
	P1-F	0.01	124	11.5	0.910	17.1	UM
0	P2-A	0.25	309	0.4	0.176	8.4	MM
	P2-B	0.20	303	N*	0.200	N	MM
	P2-C	0.15	279	1.9	0.194	16.0	MM
	P2-D	0.10	271	N	0.237	N	MM
	P2-E	0.05	274	N	0.272	N	MM
	P2-F	0.01	301	N	0.325	N	MM

Poznámka*: N…nestanoveno, MM…monomodální, BM…bimodální, UM…unimodální

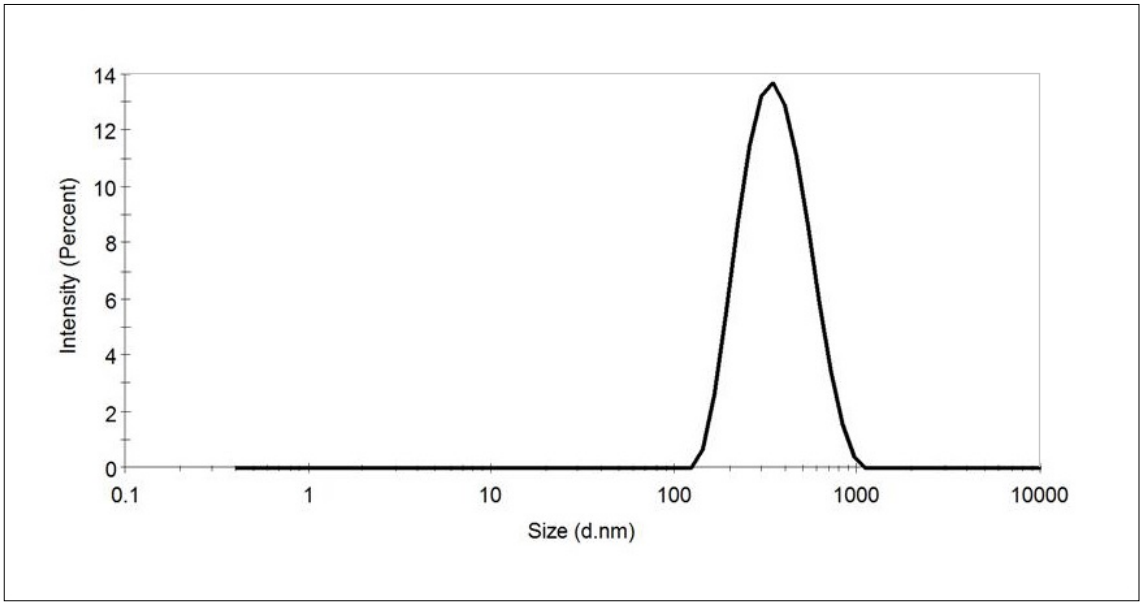


Obr. 10 Distribuce velikosti částic čistého PVP (přerušovaná čára) a vzorku P1-F o koncentraci APS 0.01 M (plná čára).

V případě, kdy byla polymerace provedena při teplotě 0 °C, se velikost částic při změně koncentrace APS pohybovala v rozmezí 270 – 310 nm (Obr. 11) a distribuce velikostí částic byly monomodální (Obr. 12).



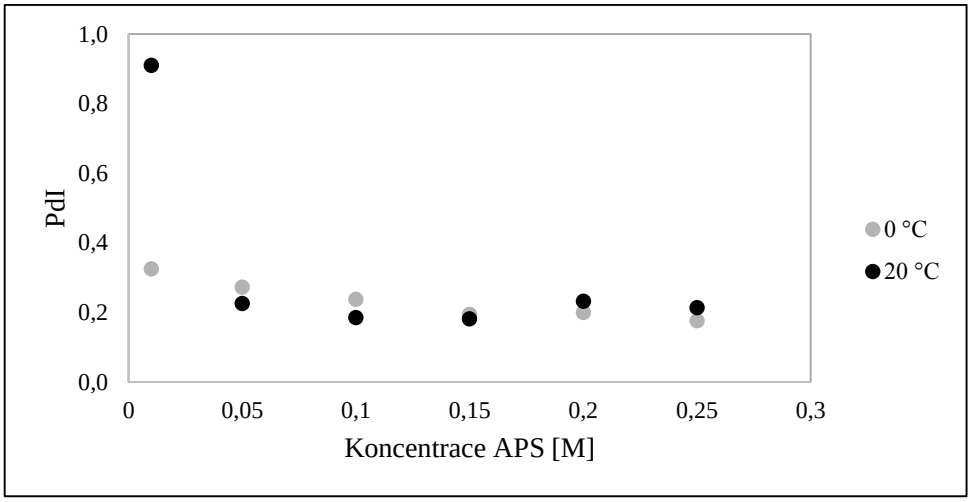
Obr. 11 PANI-PVP závislost z-průměru velikosti částic na koncentraci APS; provedení reakce při teplotě 0 a 20 °C.



Obr. 12 Ukázka monomodální distribuce velikosti částic PANI-PVP (teplota 0 °C, koncentrace APS = 0.25 M).

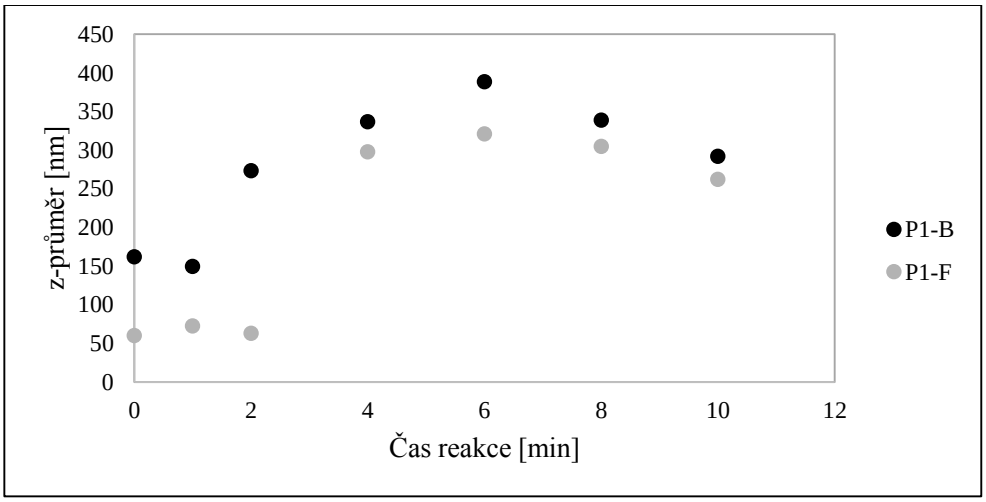
Pokud porovnáme oba způsoby přípravy a) 20 °C a b) 0 °C je zřejmé, že v případě nižší teploty neměla koncentrace APS na výslednou velikost částic významný vliv. Jinak tomu bylo při teplotě 20 °C, kdy došlo ve vyšších koncentracích APS (0.2-0.25 M) k nárůstu velikosti částic, což lze vidět i na Obr. 11. Koloid připravený s APS o nejnižší koncentraci 0.01 M pak vykazoval hodnotu z-průměru nižší (viz diskuse výše). Co se týká hodnot PdI, při obou reakčních teplotách byly indexy polydisperzity téměř shodné, rozdíl nastal až u vzorku připraveného s APS o koncentraci 0.01 M (Obr. 13), kdy PdI koloidního polyanilinu připraveného při teplotě 20 °C byl výrazně vyšší.

V případě vyšší teploty a nízké koncentrace APS měla zřejmě na výslednou velikost částic vliv i krátká reakční doba (10 minut), zapříčiněná právě vyšší teplotou, kdy pravděpodobně nedošlo k dostatečnému navázání polyanilinu na přítomný stabilizátor (PVP). Naproti tomu při teplotě 0 °C byla reakční doba ca 40 minut, a tak i přes nižší poměr oxidačního činidla (APS) došlo k vytvoření částic s monomodální distribucí. Vysvětlení lze pravděpodobně hledat v nízké reakční teplotě. Je totiž známo, že při nižších teplotách probíhá polymerace do vyšších molekulových hmotností a větší velikost částic při reakční teplotě 0 °C může být výsledkem tohoto efektu. Velikost částic závisí tedy nejen na teplotě, ale i na poměru stabilizátoru a oxidačního činidla a době reakce.



Obr. 13 PANI-PVP závislost PdI na koncentraci APS v reakční směsi.

V dalším experimentu byla sledována změna velikosti částic PANI-PVP v závislosti na reakčním čase při standardní koncentraci PVP a anilin hydrochloridu a dvou rozdílných koncentracích APS, 0.2 M a 0.01 M. Výsledky byly vyhodnoceny stejným způsobem, jako tomu bylo v předchozím případě a jsou uvedeny v Tab. 7 a na Obr. 14. Z tohoto obrázku je zřejmé, že při vyšší koncentraci APS (0.2 M) velikost částic s prodlužující se dobou reakce nejprve rostla a poté došlo k její mírné redukci. Obdobné výsledky byly zaznamenány i pro nižší koncentraci APS. Zde se velikost částic během prvních dvou minut pohybovala v oblasti pod 100 nm, poté došlo k jejímu zvýšení, přičemž maximální velikost 298 nm byla naměřena v šesté minutě reakce. Poté opět nastal mírný pokles ve velikosti částic až na konečnou hodnotu 262 nm. Tato velikost částic se s dalším prodloužením reakčního času již neměnila.



Obr. 14 PANI-PVP: závislost z-průměru na reakčním čase (P1-B: koncentrace APS = 0.2 M, P1-F: koncentrace APS = 0.01M).

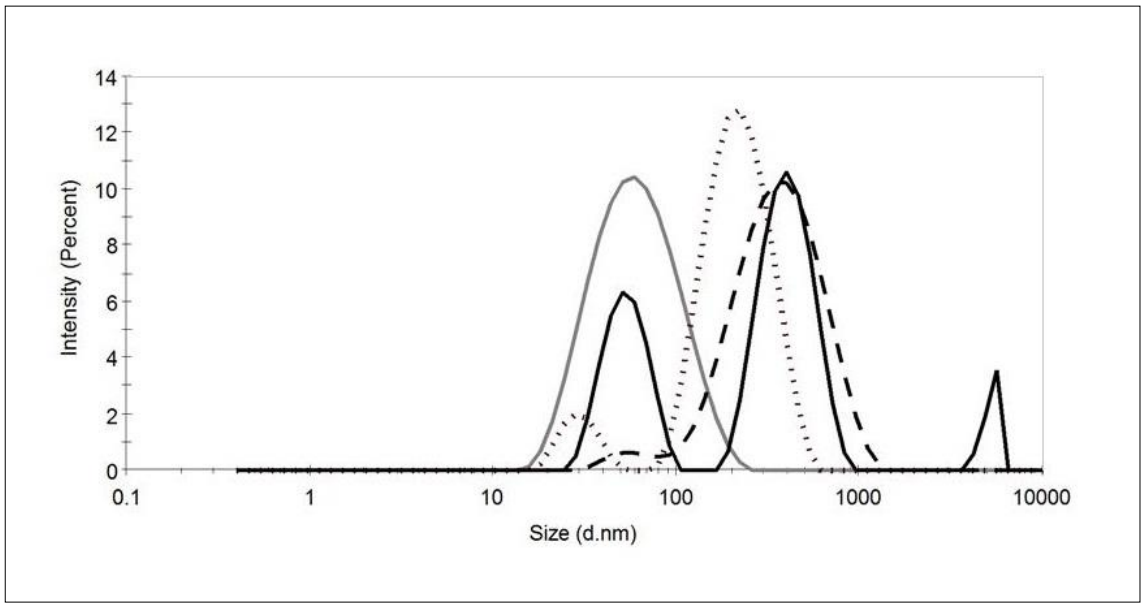
Tab. 7 Hodnoty velikosti částic PANI-PVP v závislosti na čase (z-průměr) a indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu

čas (min)	Vzorek	Koncentrace APS (M)	z-průměr (nm)	Sr (%)	PdI	Sr (%)	Distribuce
0	P1-B	0.20	161.8	7.9	0.624	16.0	UM
1			149.4	1.7	0.320	2.0	BM
2			273.4	0.8	0.291	1.0	BM
4			336.6	1.1	0.268	1.9	MM
6			388.5	2.1	0.271	8.3	MM
8			338.8	0.9	0.257	3.1	MM
10			292.0	0.9	0.166	5.6	MM
0	P1-F	0.01 (0.023)	59.9	6.0	0.313	17.6	BM
1			72.5	2.3	0.358	18.3	BM
2			62.9	2.2	0.383	4.5	UM
4			297.6	0.3	0.330	3.2	BM
6			320.7	0.5	0.670	1.0	UM
8			304.7	4.2	0.697	7.7	UM
10			261.9	0.2	0.732	0.7	UM

Jelikož distribuce částic zaznamenané během polymerační reakce nebyly pouze monomodální, jsou zde pro lepší vysvětlení průběhu polymerace uvedeny i distribuční křivky velikostí částic (Obr. 15 a 16).

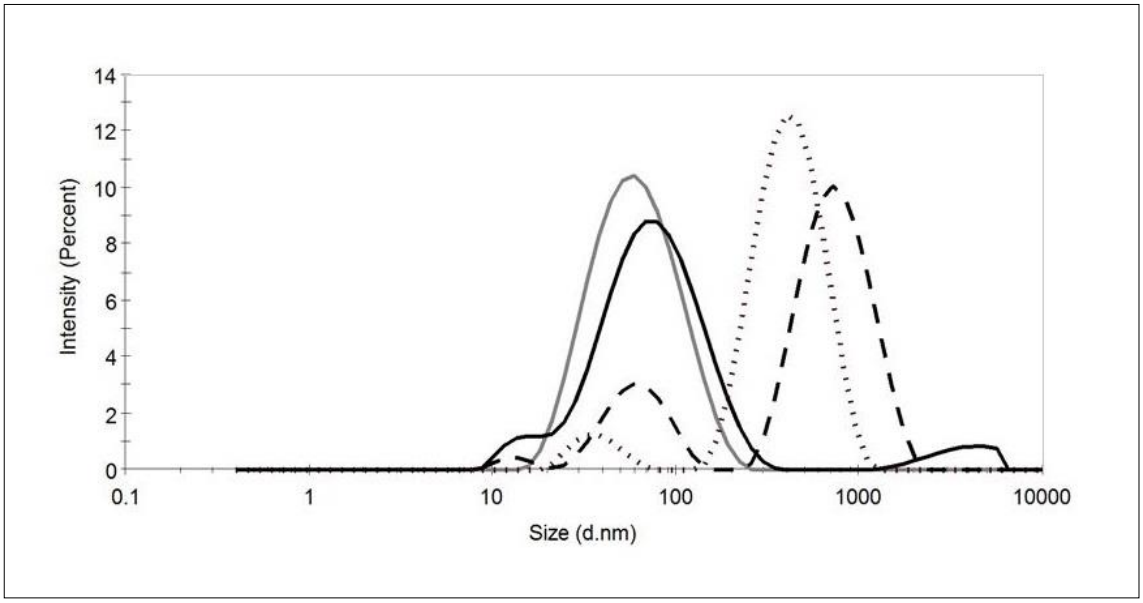
Pokud se podíváme na Obr. 15, je patrné, že distribuční křivky vzorků PANI-PVP připravených s vyšší koncentrací APS (0.2 M) byly během prvních dvou minut reakce multimodální. Ihned na začátku reakce (zelená křivka, 0 minut) byly ve vzorku přítomny tři frakce, první o velikosti částic 300 – 400 nm, která tvořila ca 65 % všech částic, druhá o velikosti 40 – 50 nm, jejíž procentuální zastoupení bylo ca 30 % a třetí frakce s velikostí nad 5 μm tvořila asi 5 % všech částic. V první minutě pak byla distribuce částic bimodální, kde hlavní populaci 92 % tvořily částice o velikosti kolem 230 nm a vedlejší populaci 8 % částice o velikosti okolo 30 nm. V další minutě došlo k dalšímu snížení procentuálního zastoupení částic s menší velikosti a 97 % pak tvořily částice o velikosti kolem 450 nm. Poté, v delších reakčních časech, už byly všechny distribuční křivky monomodální. Pokud naměřená data porov-

náme s distribuční křivkou zaznamenanou pro PVP (červená křivka), lze soudit, že na začátku reakce, během prvních dvou minut bylo v reakční směsi přítomné i samotné PVP. Zřetelně je rovněž vidět, jak se zastoupení tohoto polymerního nosiče v průběhu reakce snižuje a dochází k růstu polyanilinového řetězce na koloidním stabilizátoru.



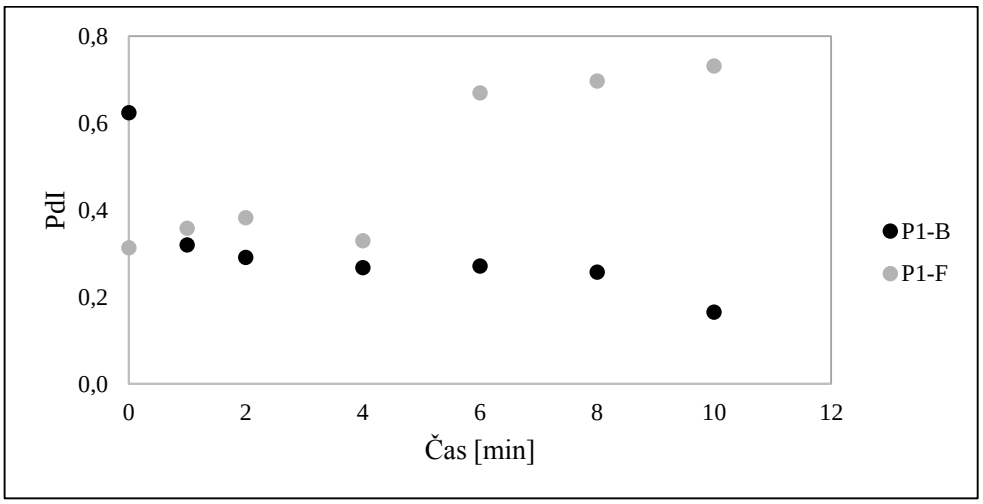
Obr. 15 Distribuce velikosti částic PANI-PVP v závislosti na čase, vzorek P1-B (koncentrace APS = 0.2 M). Samotný PVP (plná šedá čára), P1-B na počátku polymerace (0 minut; plná černá čára), P1-B v 1 minutě (tečkovaná čára), P1-B ve 2 minutě (přerušovaná čára).

Z Obr. 16 je zjevné, že v případě nižší koncentrace APS (0.01 M) byl během prvních dvou minut přítomen zejména samotný PVP, kde hlavní populaci (98 %) tvořily částice o velikosti 80 – 100 nm. Během následujících minut velikost částic rostla, ve čtvrté minutě pak hlavní populaci tvořily částice o velikosti ca 400 nm a v desáté minutě částice s velikostí okolo 750 nm. Jejich procentuální zastoupení bylo zpravidla více jak 80 %. Vedlejší populaci tvořily částice s velikostí 40 – 60 nm a tvořily maximálně 20 % z celkového množství částic. Od čtvrté minuty tedy docházelo k výraznějšímu navázání polymeru na přítomný stabilizátor, přičemž poměr oxidačního činidla a stabilizátoru byl nízký. Tím lze vysvětlit i skutečnost, že i v desáté minutě byla distribuční křivka stále bimodální a byla zde zjevně přítomná populace svědčící o přítomnosti nezreagovaného PVP. Stejně jako v případě PANI-PVP připraveného při 20 °C při koncentraci 0.01 M APS, zde měly významnou roli vedle poměru stabilizátor/oxidační činidlo i reakční čas a teplota.



Obr. 16 Distribuce velikosti částic PANI-PVP v závislosti na čase, vzorek P1-F (koncentrace APS = 0.01 M). Samotný PVP (šedá plná čára), P1-F ve 2 minutě (černá plná čára), P1-F ve 4 minutě (tečkovaná čára), P1-F v 10 minutě (přerušovaná čára).

Na Obr. 17 jsou znázorněny změny indexu polydisperzity u vzorků koloidů připravených s APS o koncentraci (0.2 M). Je patrné, že hodnota PdI byla ihned na začátku reakce vysoká, pak následoval jeho výrazný pokles, který byl do osmé minuty téměř konstantní, další snížení nastalo ještě v desáté minutě. V případě reakce provedené s koncentrací APS 0.01 M byl pozorován opačný průběh. Kdy se na začátku reakce index polydisperzity pohyboval v rozmezí 0.3 – 0.4, v šesté minutě došlo k jeho prudkému nárůstu a poté se dále mírně zvyšoval. Numerické vyjádření hodnot PdI odpovídá průběhu reakce popsanému výše.



Obr. 17 PANI-PVP závislost PdI na čase (P1-B: koncentrace APS = 0.2 M, P1-F: koncentrace APS = 0.01M).

7.1.2 Stabilizace v přítomnosti kyseliny hyaluronové a chitosanu

V další sérii experimentů byl modifikovaný postup dle IUPAC použit i pro přípravu koloidního polyanilinu v přítomnosti vysokomolekulárních polysacharidů, kyseliny hyaluronové (PANI-HA) o dvou různých molekulových hmotnostech, HA-A (M = 1.8 – 2.1 10^6 g.mol^{-1}) nebo HA-B (M = 50.28 10^3 g.mol^{-1}) a chitosanu (PANI-CH).

V případě PANI-HA byly vzorky koloidu připraveny nejprve v přítomnosti vodného roztoku HA-A o koncentraci 2–0.5 % (Tab. 8). Vzorek HA-A1 připravený s obsahem 2 % stabilizátoru zprvu vykazoval koloidní charakter s velikostí částic ~ 1 μm. Tyto částice byly však natolik velké, že během následujících 24 hod došlo k jejich sedimentaci. Zbylé vzorky (HA-A2, HA-A3) s nižším obsahem HA pak vytvořily ihned během reakce polymerní prášek. U vzorků HA-B, kde byla použita kyselina hyaluronová s nižší molekulovou hmotností, přičemž se měnila koncentrace APS, se během reakce vytvořil ve všech případech ihned prášek, a proto nebyla velikost částic pomocí DLS měřena (Tab. 7). Obdobné chování bylo pozorováno i v publikaci [29], kde byl jako stabilizátor použit polyethylenoxid. Pokud byl použit polymer s vyšší molekulovou hmotností (M > 10^6), vznikl při polymeraci koloid, byla-li molekulová hmotnost poethylenoxidu nízká, neměl již stabilizační funkci a byl připraven polyanilin ve formě prášku.

Tab. 8 Hodnoty velikosti částic PANI-HA v závislosti na koncentraci HA a APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu

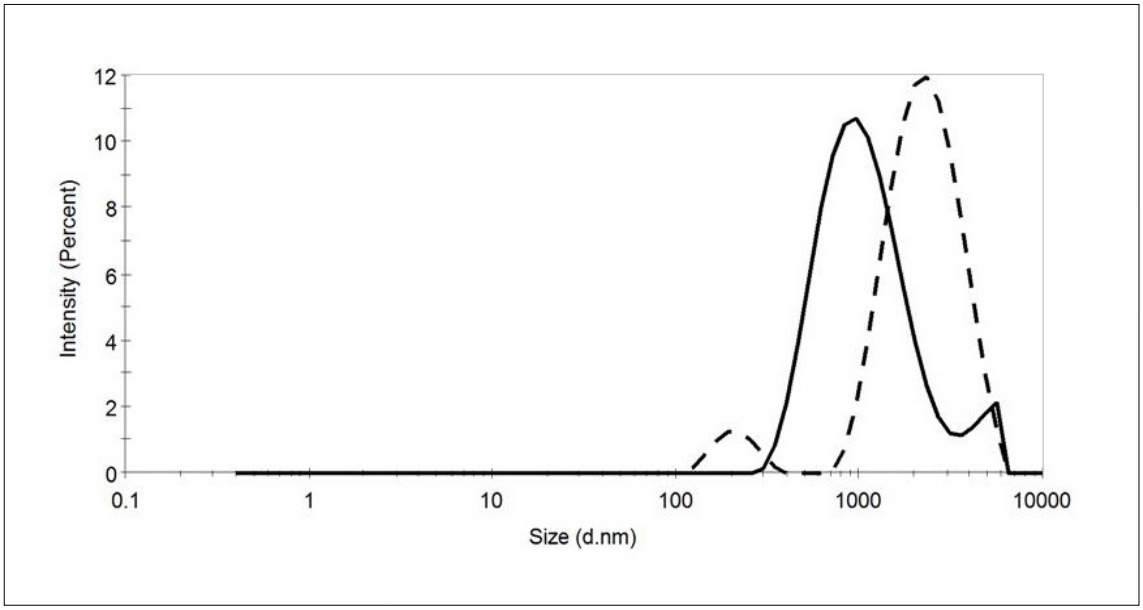
Označení vzorku Koncentrace HA (%)		Koncentrace APS (M)	z-průměr (μm)	Sr (%)	PdI	Sr (%)	Distribuce
HA-A1	2.0	0.05	1.3	3	0.474	7	UM
HA-A2	1.0	0.05	5.1	2	0.516	20	MM
HA-A3	0.5	0.05	6.1	13	0.346	30	MM
HB-B1	1.0	0.05	4.8	5	0.655	47	BM
HB-B2	0.5	0.05	3.9	23	0.509	10	BM
HB-B3	0.1	0.05	prášek	N	N	N	N
HB-B4	1.0	0.01	prášek	N	N	N	N
HB-B5	0.5	0.01	prášek	N	N	N	N
HB-B6	0.1	0.01	prášek	N	N	N	N

Dále byl pro reakci použit vysokomolekulární typ chitosanu, který nebyl při pH dané reakce zcela rozpustný a tvořil mírně turbidní disperzi, ve které byly přítomny částice nedokonale rozpustného polymeru. Při postupu, kdy byly jednotlivé vzorky připraveny oxidací anilin hydrochloridu (CH-A) APS o různé koncentraci, viz Tab. 8, došlo u obou vzorků (CH-A1, CH-A2) ihned k vytvoření velmi hrubé disperze s velikostí částic okolo 3 μm. Tyto částice viditelně sedimentovaly.

V druhém případě byl anilin hydrochlorid nahrazen anilinem (CH-B); použité koncentrace chitosanu, APS a velikosti částic v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tab. 9. Vzorky, které byly připraveny v přítomnosti 1 a 0.5 % chitosanu, nezávisle na koncentraci APS, se jevily jako polyanilinové koloidy s bimodální distribucí velikosti částic. Nejlepších výsledků pak bylo dosaženo při složení reakčních směsí 1 % chitosanu a 0.05 M (CH-B1), nebo 0.5 % chitosanu a 0.01 M APS (CH-B5), viz Obr. 18. Velikost koloidních částic pro vzorek CH-B1 byla ca 1 μm a pro vzorek CH-B4 ca 0.7 μm. Tyto částice byly zastoupeny z více jak 90 %. Minoritní podíl dalších populací částic tvořilo maximálně 10 %. Připravené koloidy však nebyly stabilní a během 24 hodin byla ve vzorcích pozorována sedimentace částic. V případě použití 0.1 % chitosanu se vytvořila hrubá disperze s velikostí částic ca 4 μm.

Tab. 9 Hodnoty velikosti částic PANI-CH v závislosti na koncentraci chitosanu a APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu

Označení vzorku Koncentrace CH (%)		Koncentrace APS (M)	z-průměr (μm)	Sr (%)	PdI	Sr (%)	Distribuce
CH-A1	0.5	0.05	3.0	1	0.267	17	BM
CH-A2	0.1	0.05	2.9	2	0.236	17	BM
CH-B1	1.0	0.05	0.9	2	0.361	5	BM
CH-B2	0.5	0.05	1.7	6	0.594	29	BM
CH-B3	0.1	0.05	3.3	16	0.414	9	BM
CH-B4	1.0	0.01	1.6	3	0.368	13	BM
CH-B5	0.5	0.01	0.7	3	0.330	19	BM
CH-B6	0.1	0.01	4.3	21	0.996	1	MM



Obr. 18 Příklady distribucí velikosti částic PANI-CH o koncentraci chitosanu 1 %. Obsah APS: plná čára 0.05 M (CH-B1), přerušovaná čára 0.01 M (CH-B4).

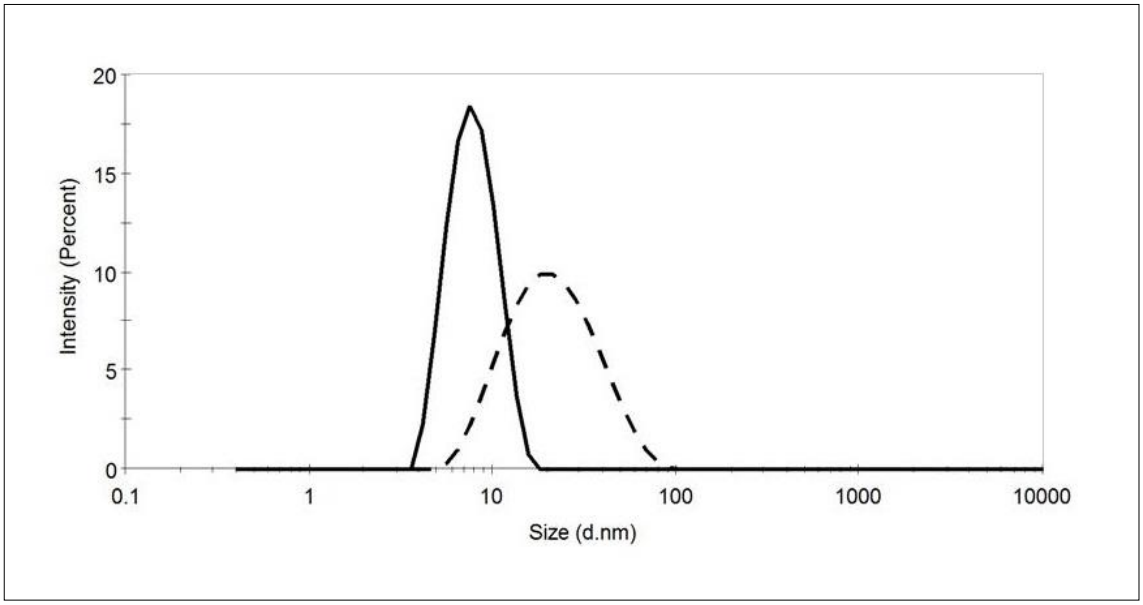
7.1.3 Stabilizace surfaktanty Triton X-100 a Tween 20

Další možností, jak připravit koloidní polyanilin s částicemi o menší velikosti, bylo použití neionických surfaktantů Triton X-100 (PANI-TX 100) a Tween 20 (PANI-TW 20).

Z tabulky 10 je zřejmé, že menší částice vznikaly v přítomnosti Tween 20, jako stabilizátoru, přičemž jejich průměrná velikost byla 8 nm. Velikost částic koloidního polyanilinu se stabilizátorem Triton X-100 pak byla ca 18 nm. Z Obr. 19 plyne, že distribuce obou vzorků byly monomodální a koloidní polyanilin stabilizovaný neionickým surfaktantem Tween 20 měl nižší průměrnou velikost a užší distribuci velikosti částic.

Tab. 10 Hodnoty velikosti částic PANI-TW 20 a PANI-TX 100 (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu

Označení vzorku Koncentrace stabilizátoru (M)		z-průměr (nm)	Sr (%)	PdI	Sr (%)	Distribuce
TW 20	0.05	8	0.5	0.059	11	MM
TX 100	0.10	18	0.1	0.211	3	MM

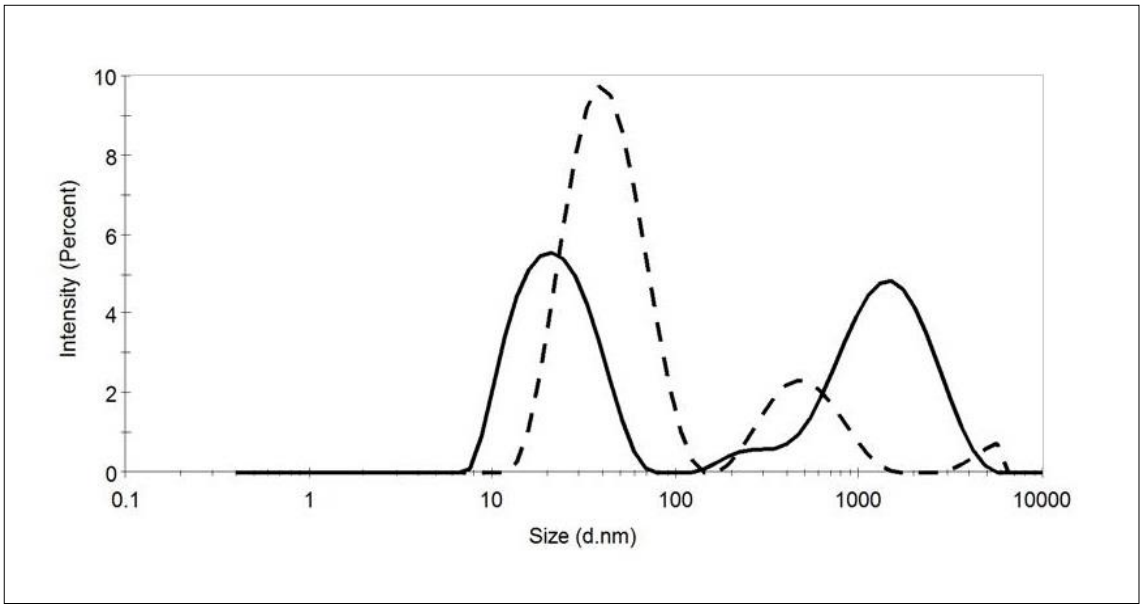


Obr. 19 Distribuce velikosti částic PANI-TW 20 (plná čára) a PANI-TX 100 (přerušovaná čára).

7.1.4 Stabilizace anionickým surfaktantem SDS

Vedle neionických surfaktantů, byl ke stabilizaci koloidního polyanilinu použit, také anionický surfaktant dodecylsulfát sodný (PANI-SDS). V tomto případě byly provedeny tři série experimentů, označené jako S1, S2, S3, lišící se způsobem přípravy (složení jednotlivých reakčních směsí je uvedeno v Tab. 11).

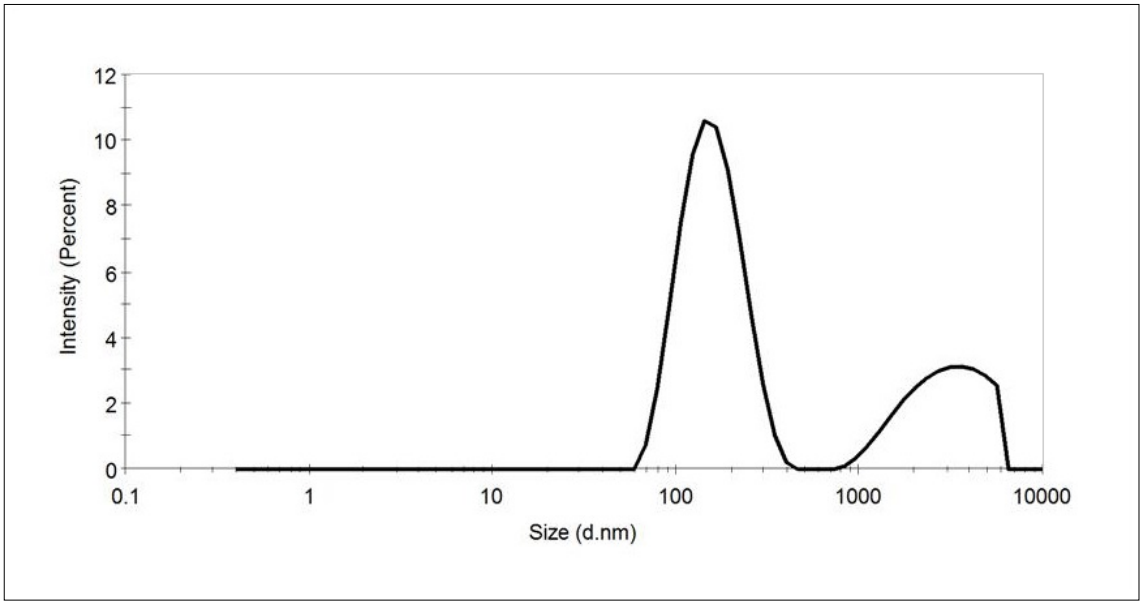
V první sadě experimentů (S1-A až S1-D), byla měněna koncentrace anilinu v rozsahu 0.03-0.1 M, přičemž koncentrace SDS (0.2 M) zůstala konstantní. Distribuce velikosti částic byly převážně multimodální a se zvyšující se koncentrací anilinu rostla i velikost částic. V případě nejnižší koncentrace anilinu (0.03 M) byly přítomny dvě populace částic, kdy více jak 80 % tvořily částice o velikosti ca 50 nm a zbylých 20 % částice o velikosti kolem 1 μm. Při koncentraci 0.05 M anilinu byly v populaci přítomny také dvě frakce částic, a to částice o velikosti ca 1.5 μm a ca 25 nm. Procentuální zastoupení každé z frakcí bylo ca 50 %, mírně převažovala frakce s většími částicemi (Obr. 20). S dalším zvyšováním koncentrace anilinu došlo k dalšímu růstu velikostí částic, kdy částice o velikosti 1-1.5 μm tvořily převážnou část populace (90 %). Lze tedy konstatovat, že se zvyšující se koncentrací anilinu roste i velikost koloidních částic a zároveň roste i viskozita připravovaných disperzí. Přechod z velikosti částic v oblasti nanometrů do oblasti mikrometrů nastává při koncentraci anilinu 0.05 M. Připravené disperze byly stabilní a v průběhu času nebyla zaznamenána sedimentace částic.



Obr. 20 Změna distribuce velikosti částic PANI-SDS se změnou koncentrace anilinu. Přerušovaná čára – 0.03 M anilin, plná čára – 0.05 M anilin.

Ve druhé sadě experimentů (S2-A, S2-B), se měnila koncentrace SDS a konstantní zůstala koncentrace anilinu (0.03 M) a APS. Opět byly pozorovány dvě a více frakcí, přičemž hlavní populaci tvořily částice o velikosti pod 100 nm (> 80 %) a vedlejší částice s velikostí okolo 2-4 μm. Oba vzorky (S2-A, S2-B) byly nestabilní v čase a během jednoho měsíce došlo k částečnému zakalení disperze a vytvoření našedlé struktury připomínající „krystaly".

Ve třetí sadě experimentů (S3-A až D) byl měněn poměr anilin/APS při konstantní koncentraci SDS (0.2 M) a anilinu (0.03 M). Velikost částic vyjádřená jako z-průměr se ze změnou poměru anilin/APS výrazně neměnila a pohybovala se v rozmezí 180-250 nm. Distribuce byly převážně multimodální s velikostí částic do 300 nm (> 85 %) a s menším podílem částic o velikosti 3-4 μm (max. 15 %). Tyto koloidy rovněž nebyly stabilní a během 48 hodin došlo k sedimentaci částic.



Obr. 21 Příklad distribuce velikostí částic PANI-SDS. Vzorek S3-B, poměr anlin/APS 1:1.5.

Tab. 11 Hodnoty velikosti částic PANI-SDS v závislosti na koncentraci anilinu, HCl a poměru anilin/APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu

Označení vzorku Konc.* (M)		Konc. (M)		Poměr AN/APS	z-průměr	Sr (%)	PdI	Sr (%)	Distribuce
		AN*	HCl						
S1-A	0.20	0.03	0.1	2:1	46	1.0	0,375	1.4	MM
S1-B	0.20	0.05	0.1	2:1	50	0.7	0.690	0.5	MM
S1-C	0.20	0.08	0.1	2:1	989	5.1	0.319	6.7	BM
S1-D	0.20	0.10	0.1	2:1	1757	2.2	0.501	25.9	BM
S2-A	0.40	0.03	1	2:1	69	1.7	0.515	3.3	MM
S2-B	0.60	0.03	1	2:1	59	2.5	0.429	3.2	MM
S3-A	0.20	0.03	1	1:1	194	4.9	0.565	16.6	BM
S3-B	0.20	0.03	1	1:1.5	185	0.8	0.572	5.3	BM
S3-C	0.20	0.03	1	1:2	242	5.1	0.647	7.6	MM

Poznámka*: Konc. …koncentrace, AN…anilin

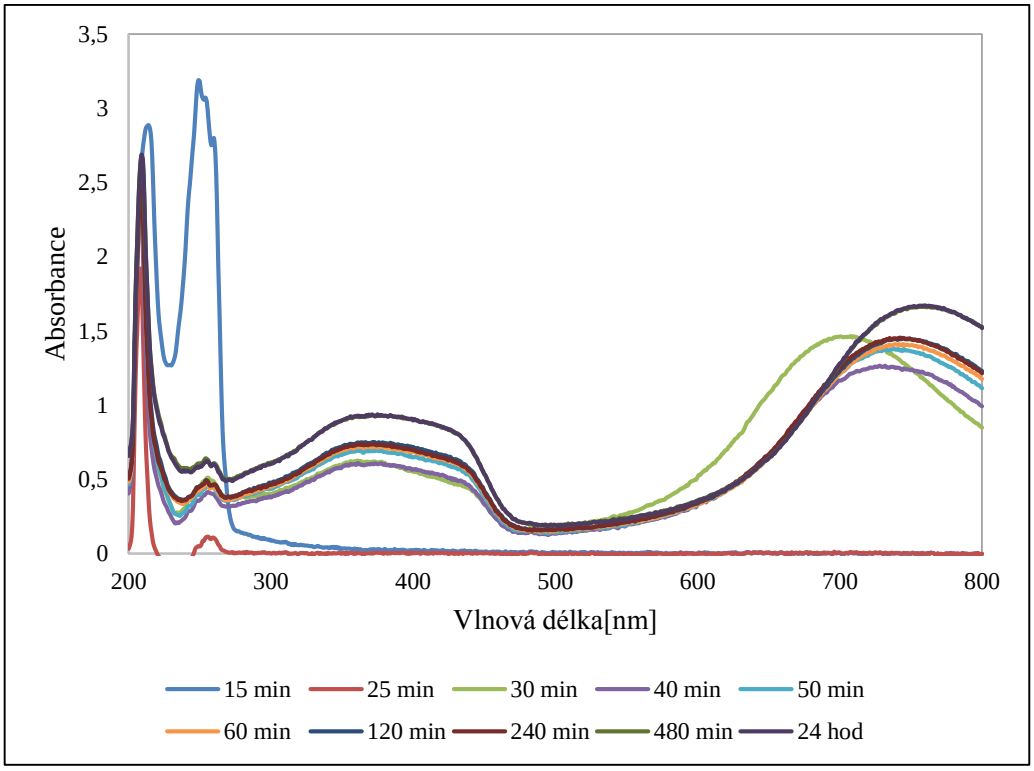
7.2 Charakterizace koloidního polyanilinu použitého pro stanovení cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxického účinku byly vybrány vzorky koloidního polyanilinu, stabilizované anionickým surfaktantem SDS. Z celé série experimentů byly zvoleny dva reprezentativní vzorky (S1-1 a S1-C) lišící se velikostí částic. Koncentrace anilinu vzorku S1-A byla 0.03 M, vzorku S1-C byla 0.08 M. Poměr anilin/APS (2:1) a koncentrace SDS (0.2 M) byly ponechány konstantní (Tab. 11). U obou vzorků byl před vlastním stanovením cytotoxicity sledován průběh polymerace v čase, byla provedena dialýza (pro odstranění nezreagovaných monomerů) a byla stanovena koncentrace a velikost polyanilinových nanočástic. Výsledky těchto testů jsou uvedeny níže.

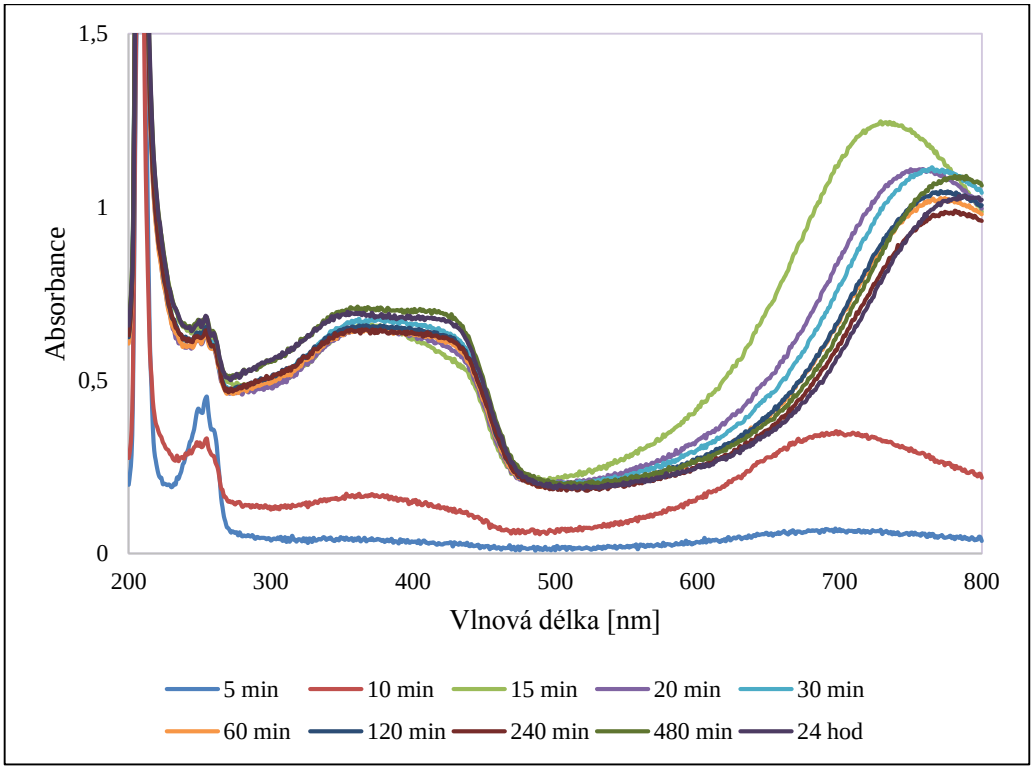
7.2.1 Sledování průběhu reakce

U vzorků S1-A (0.03 M anilin) a S1-C (0.08 M anilin) byl nejprve sledován průběh reakce v závislosti na rychlosti barevné změny reakční směsi, která odrážela rychlost probíhající reakce. Absorpční spektra byla měřena metodou UV-VIS v rozsahu vlnových délek 200-800 nm (Obr. 22 a 23). U vzorku S1-A byla první viditelná barevná změna, z původně bezbarvé do žluté, pozorována 15 minut po ukončení přídavku APS, u vzorku S1-C s vyšší koncentrací anilinu byla tato doba kratší, stejný přechod nastal 5 minut od posledního přídavku APS. Během následujících 10 minut pokračovala barevná změna přes světle zelenomodrou až na tmavě zelenomodrou barvu a do 30 minut u obou vzorků vzniklo tmavě zelené zabarvení, typické pro polyanilinovou sůl.

Pokud se podíváme na grafy průběhu polymerace zaznamenané na Obr. 22 a 23, lze z nich učinit závěr, že reakce proběhla u obou vzorků rychle. Je to zřejmé zejména u vzorku S1-C (Obr. 23), kde byla polymerace ukončena již po 20 minutě. Poté už byl pozorován jen pozvolný růst koncentrace polyanilinu, která se výrazně nezměnila ani po 24 hodinách. Průběh polymerace vzorku S1-A byl o něco pomalejší a v principu byla reakce ukončena po 40 minutách. U vzorku S1-A byla koncentrace polymeru do 240 minuty téměř konstantní a poté, mezi 240 a 480 minutou, nastal velký skok, který u vzorku S1-C pozorován nebyl. Vyšší množství anilinu (0.08 M) u vzorku S1-C způsobilo, že reakční směs byla viskóznější a připomínala spíše emulzi, oproti S1-A, která měla charakter běžného roztoku. Vlivem vyšší viskozity mohl být průběh reakce S1-C (v delších reakčních časech) pozvolnější a nedošlo ke skokovému nárůstu koncentrace.



Obr. 22 Průběh sledování polymerace vzorku S1-A (0.03 M anilin) v čase UV-VIS spektroskopií.



Obr. 23 Průběh sledování polymerace vzorku S1-C (0.08 M anilin) v čase UV-VIS spektroskopií.

7.2.1.1 Stanovení velikosti částic koloidního polyanilinu S1-A a S1-C po dialýze

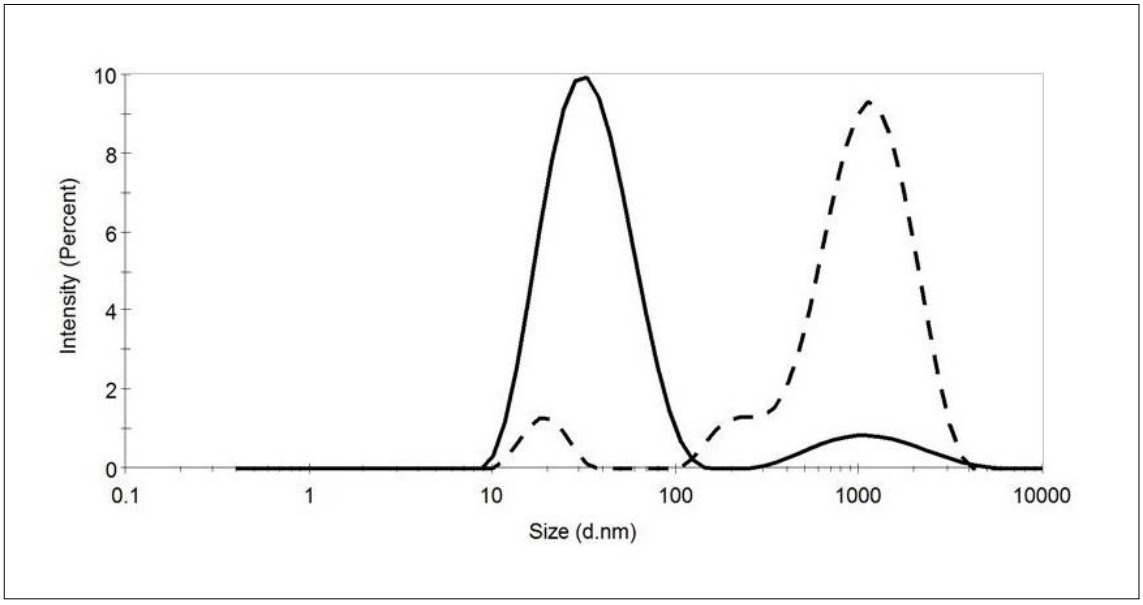
Dialýza připravených polyanilinových koloidů byla provedena s cílem odstranit nezreagované monomery a stabilizátor, aby bylo možno tyto vzorky bezpečně aplikovat na buňky. Velikost částic koloidního polyanilinu (S1-A, S1-C) připraveného v přítomnosti stabilizátoru SDS byla sledována za pomocí měření velikosti částic („z-průměr“) na přístroji Zeta Nano ZS. Protože byly distribuce velikosti částic bimodální, jsou vedle z-průměru a střední hodnoty indexu polydisperzity (PdI) (Tab. 12) uvedeny také distribuční křivky velikosti částic získané z „intenzitní“ distribuce (Obr. 24). V rámci kontroly měření byla stanovena opakovatelnost měření velikosti částic disperzí (z-průměr), která byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (Sr) tří stanovení.

Samotné měření probíhalo na vzorcích, které byly podrobeny 48 hod dialýze proti 0.2 M HCl. Výsledky stanovení velikosti částic obou vzorků (S1-A, S1-C) jsou uvedeny v Tab. 12.

Z výsledků v Tab. 12 je zjevné, že se změnou koncentrace anilinu se měnila i velikost koloidních částic. Obecně lze pozorovat, že při vyšší koncentraci anilinu (0.08 M) byla velikost částic podstatně vyšší (586 nm), než při koncentraci anilinu 0.03 M, kde se velikost částic pohybovala kolem 30 nm. Pokud se zaměříme na distribuci velikosti částic (Obr. 24) je zřejmé, že ve vzorku byly v obou případech přítomny dvě populace částic. U vzorku S1-A (z-průměr 32 nm) tvořily více jak 90 % částice o velikosti 45 nm, zbylých 10 % připadlo částicím o velikosti 1-4 μm. Hlavní populace částic vzorku S1-C měla velikost ca 1.2 μm a její procentuální zastoupení bylo 90 %, zbylých 10 % tvořily částice o velikosti maximálně 20 nm (z-průměr 586 nm).

Tab. 12 Hodnoty velikosti částic PANI-SDS v závislosti na koncentraci anilinu (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu

Vzorek	Koncentrace anilinu (M)	z-průměr (nm)	Sr (%)	PdI	Sr (%)	Distribuce
S1-A	0.03	32	1.9	0.322	2.3	BM
S1-B	0.08	586	3.2	0.629	7.3	BM



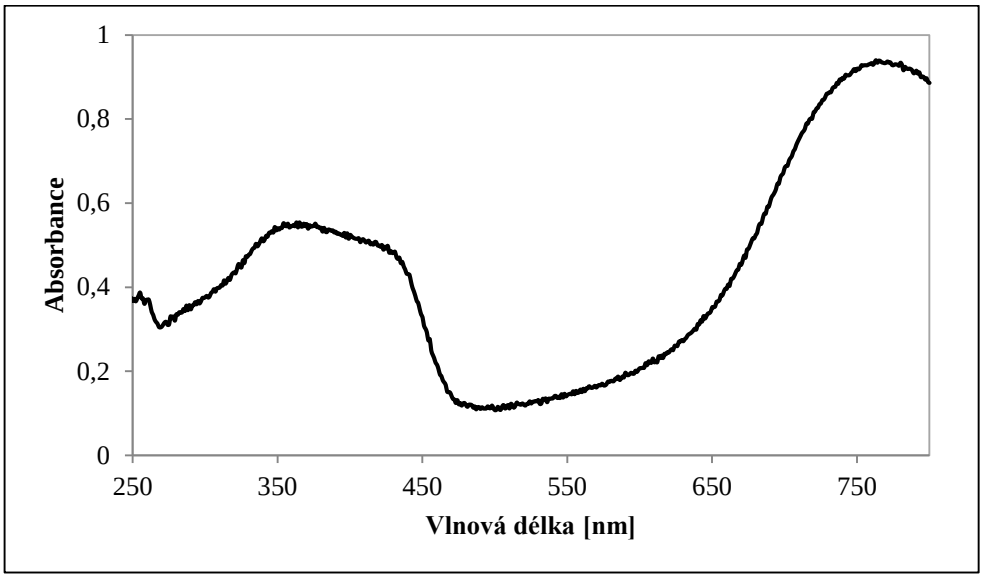
Obr. 24 Distribuce velikosti částic PANI-SDS po dialýze. Vzorek S1-A o koncentraci anilinu 0.03 M (plná čára), vzorek S1-C o koncentraci anilinu 0.08 M (přerušovaná čára).

7.2.1.2 UV spektrum v 1 M HCl a stanovení koncentrace koloidu

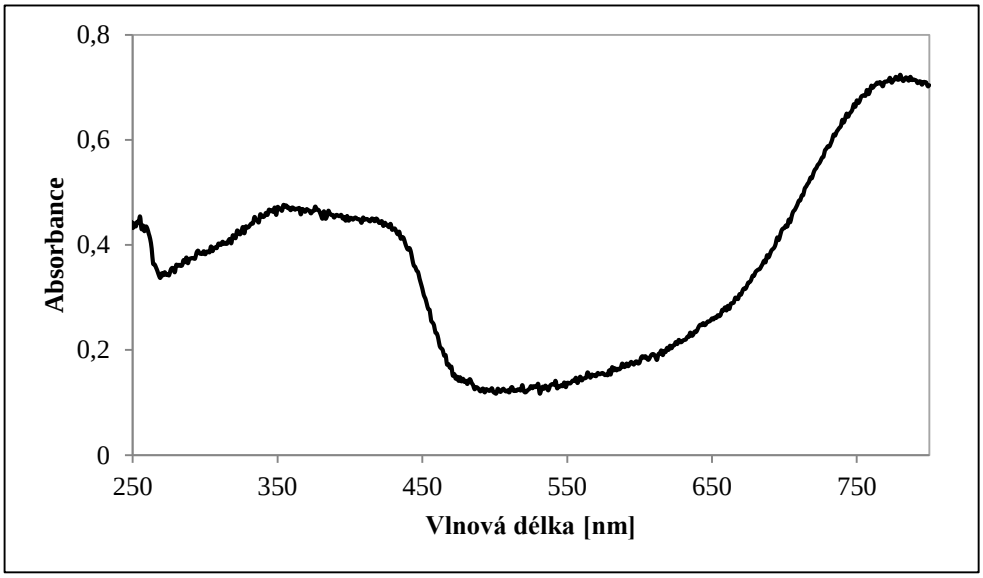
Aby bylo možné vypočítat koncentraci polyanilinu v jednotlivých vzorcích koloidních disperzí S1-A a S1-C, které byly použity v experimentu pro stanovení cytotoxicity, muselo být nejprve změřeno absorpční spektrum dané disperze. Spektra byla naměřena v 1 M HCl, poté byla odečtena hodnota absorbance (S1-A a S1-C) při maximální vlnové délce 375 nm a vypočtena koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona (Rov. 5). Postup pro stanovení koncentrace polyanilinu v koloidu je uveden v práci Stejskala a Kratochvíla [58]. Výsledky stanovení koncentrací polyanilinu v koloidu S1-A a S1-C jsou uvedeny v Tab. 13.

UV-VIS spektrum připravených koloidů je uvedeno na Obr. 25 (S1-A) a na Obr. 26 (S1-C). Z Obr. 25 i 26 je zřejmé, že první lokální maxima (S1-A, S1-C), určené ze závislosti absorbance A na vlnové délce λ se pohybovala v rozmezí 340-400 nm. Pokud srovnáme tato spektra s dostupnou literaturou, tak Stejskal a Kratochvíl [58], kteří použili pro stabilizaci koloidu PVAL, nalezli první lokální maximum v rozmezí vlnových délek 350-420 nm a druhé detekovali při vlnové délce 810 nm. Široký pás v oblasti 350 nm odpovídá $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodu (přechod mezi valenčním a vodivostním pásem). Další dva pásy ve viditelné oblasti spektra při 430 a 810 nm pak souvisí s přechody mezi stavy polaronů [98]. Dále je v článku Stejskala a Sapuriny [6] dokumentována přítomnost absorpčních maxim koloidu stabilizovaného pomocí PVP při vlnové délce 392 a 854 nm. Ze srovnání těchto výsledků je patrné, že první oblasti lokálních maxim jsou téměř identické a nezávislé na typu stabilizátoru. Druhý absorpční pás, který uvádí obě výše uvedené práce, je detekován při vlnové délce nad 810 nm.

V diplomové práci bylo druhé absorpční spektrum zřetelně detekováno při vlnové délce 750 nm (Obr. 26 a 27) a v porovnání s publikací [6] a [58] se nacházelo v oblasti kratších vlnových délek. Podle [58] vzrůst absorbance v oblasti vlnových délek mezi 800 a 1100 nm ukazuje na vyšší lokalizaci náboje v polymeru. Naproti tomu užší maximum mezi 750 a 800 nm je spojováno s vysokou delokalizací nositelů náboje.



Obr. 25 Absorpční spektrum polyanilinové disperze PANI-SDS v 1 M HCl, koncentrace anilinu 0.03 M.



Obr. 26 Absorpční spektrum polyanilinové disperze PANI-SDS v 1 M HCl, koncentrace anilinu 0.08 M.

7.3 Cytotoxický účinek koloidního polyanilinu

Cytotoxické působení vybraných koloidů (S1-A, S1-C) bylo posouzeno metodou MTT na buněčné linii embryonálních myších fibroblastů NIH/3T3. Zvolená metoda spočívá v redukci žlutého barviva MTT v živých a metabolizujících buňkách na fialový, nerozpustný formazan, po jehož rozpuštění se měří intenzita zabarvení spektrofotometricky, při vlnové délce 570 nm. Cytotoxický účinek byl vyjádřen pomocí viability buněk, která udává míru životaschopnosti buněk odolných vůči působení koloidů, vztažené k počtu buněk v čistém kultivačním médiu. Pro posouzení cytotoxického účinku koloidů byla použita následující stupnice uvedená v mezinárodní normě ISO 10993-5 (kap. 6.4.5): (a) necytotoxický účinek (množství viabilních buněk vyšší než 80 %); (b) slabě cytotoxický účinek (množství viabilních buněk 60 – 80 %); (c) středně cytotoxický účinek (množství viabilních buněk 40 – 60 %); (d) silně cytotoxický účinek (množství viabilních buněk menší než 40 %).

Souhrnné výsledky životaschopnosti buněk v přítomnosti koloidního polyanilnu (S1-A, S1-B) stabilizovaného dodecylsulfátem sodným (PANI-SDS) jsou spolu s koncentrací koloidu (%) a koncentrací polyanilinu v koloidu ($\mu g.ml^{-1}$) uvedeny v Tab. 13.

Pro samotné testování byly záměrně vybrány vzorky s větší (S1-C) a menší velikostí částic (S1-A), viz Tab. 12. Z výsledků uvedených v Tab. 13 plyne, že vzorek S1-A s menší velikostí částic (ca 30 nm) vykazoval silně toxický účinek až do koncentrace polyanilinu 1.6 $\mu g.ml^{-1}$, přičemž viabilita buněk se pohybovala v intervalu 20-30 %. To je zřejmé i z mikroskopického zobrazení uvedeného na Obr. 28 A. Při koncentraci polyanilinu 1 $\mu g.ml^{-1}$ byla zaznamenána střední cytotoxicita, s viabilitou 41 %. Viditelný nárůst životaschopnosti buněk byl poprvé zaznamenán při koncentraci polyanilinu 0.5 $\mu g.ml^{-1}$, od této hodnoty už byly pozorovány jen necytotoxické účinky s množstvím viabilních buněk vyšším než 85 %. Vzorek S1-C s částicemi o velikosti ca 580 nm byl silně cytotoxický až do koncentrace polyanilinu 3.5 $\mu g.ml^{-1}$ (viabilita < 30 %). Při koncentraci 2.7 $\mu g.ml^{-1}$ pak byla zaznamenána střední cytotoxicita s množstvím životaschopných buněk 55 % a další koncentrace polyanilinu ($\leq$ 1.8 $\mu g.ml^{-1}$) už byly pro buňky necytotoxické. Viabilita buněk ležela v rozmezí 84-96 %.

Tab. 13 Cytotoxický účinek PANI-SDS vyjádřený jako absorbance ± směrodatná odchylka (SD)a dle stupnice mezinárodní normy ISO 10993-5. Uvedeny jsou i koncentrace koloidu (%) a polyanilinu v koloidu (μg.ml^{-1})

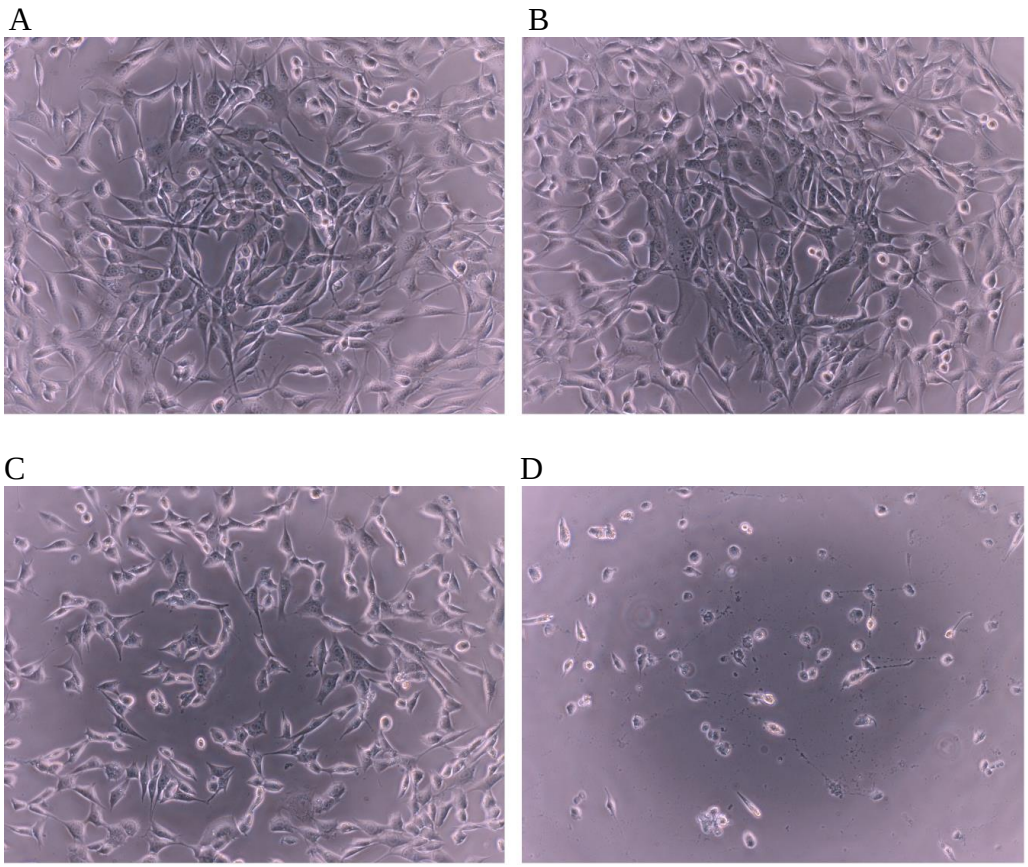
Konc. koloidu (%)	Vzorek S1-A			Vzorek S1-C		
	PANI* (μg.ml^{-1})	Absorbance ± SD	Viabilita (%)	PANI (μg.ml^{-1})	Absorbance ± SD	Viabilita (%)
1	5.2	0.128 ± 0.006	24	8.9	0.110 ± 0.006	21
0.9	4.7	0.132 ± 0.006	25	7.9	0.126 ± 0.007	24
0.8	4.2	0.147 ± 0.012	28	7.1	0.141 ± 0.007	26
0.7	3.6	0.145 ± 0.009	27	6.2	0.152 ± 0.012	29
0.6	3.1	0.143 ± 0.015	27	5.3	0.140 ± 0.017	26
0.5	2.6	0.150 ± 0.017	28	4.4	0.130 ± 0.006	25
0.4	2.1	0.128 ± 0.007	24	3.5	0.130 ± 0.010	24
0.3	1.6	0.134 ± 0.009	25	2.7	0.290 ± 0.010	55
0.2	1.0	0.218 ± 0.004	41	1.8	0.447 ± 0.009	84
0.1	0.5	0.494 ± 0.013	93	0.9	0.477 ± 0.014	90
0.05	0.3	0.454 ± 0.008	85	0.4	0.481 ± 0.014	90
0.01	0.05	0.502 ± 0.015	95	0.09	0.509 ± 0.004	96

Poznámka*: PANI …koncentrace polyanilinu

Na Obr. 27 jsou uvedeny fotografie buněk vystavených účinku koloidu S1-C při různých koncentracích. Při koncentraci 0.1 % (Obr. 27 B) můžeme pozorovat, že morfologicky i početně jsou buňky srovnatelné s referencí (Obr. 27 A), zatímco u vzorku, který dosáhl střední cytotoxicity (koncentrace koloidu 0.03, Obr 27 C) je oproti referenci viditelný úbytek buněk a mírné morfologické změny. Při koncentraci 0.3 % nebyly již pozorovány žádné adherentní buňky, které by měly typický charakter fibroblastů.

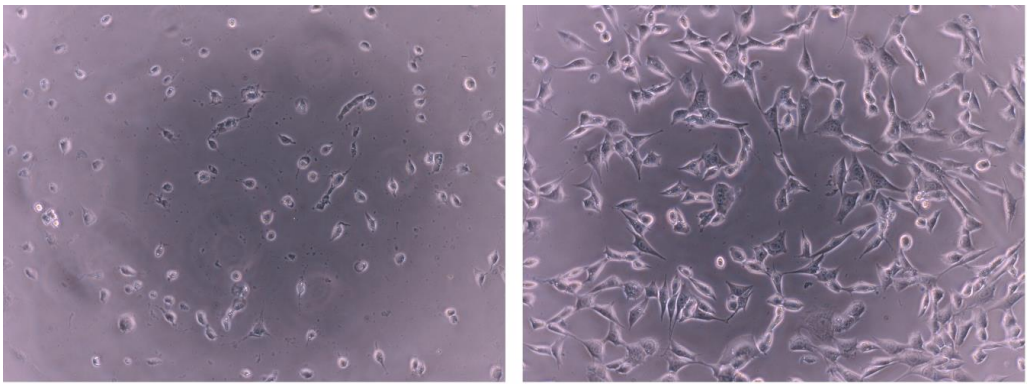
Při porovnání výsledků obou vzorků je z Tab. 13 zřejmé, že vyšší cytotoxicitu vykazoval vzorek S1-A, u kterého byla k přípravě použita koncentrace anilinu 0.03 M. V rozmezí koncentrací 1-0.3 % koloidu v roztoku vykazovaly vzorky S1-A a S1-C silně cytotoxický účinek; viditelný rozdíl nastal při koncentraci koloidu 0.4 %. Ve vzorku S1-A tato koncentrace koloidu odpovídala koncentraci polyanilinu 1.6 μg.ml^{-1} a jeho účinek byl stále silně cytotoxický. Oproti tomu vzorek S1-C, který měl při stejné koncentraci koloidu vyšší koncentraci polyanilinu (2.7 μg.ml^{-1}) vykazoval střední cytotoxicitu. To je zřejmé i z Obr. 28, na kterém můžeme pozorovat, že při koncentraci koloidu 0.3 % dochází u vzorku S1-A (A) v porovnání s S1-C (B) k výrazné změně morfologie a úbytku buněk. Prakticky na Obr. 28 A nejsou

pozorovány žádné životaschopné buňky. Obdobné chování buněk bylo pozorováno i v přítomnosti ostatních testovaných koncentrací koloidu (0.2-0.01 %). Tato skutečnost, tedy vyšší cytotoxicita při nižší koncentraci polyanilinu, mohla být způsobena rozdílem velikosti částic polyanilinového koloidu v testovaných vzorcích. Lze se domnívat, že částice vzorku S1-A s menší velikostí (<100 nm) mohly snadněji prostupovat přes plazmatickou membránu do buněk, oproti částicím vzorku S1-C s velikostí ca 580 nm. Další možné vysvětlení je, že při nižší koncentraci anilinu v reakční směsi zůstalo v disperzi více volného SDS (který se nepodařilo odstranit dialýzou), jehož micely mají rovněž velikost menší než 100 nm. Bez navázaného polyanilinu mohou mít tyto micely vyšší cytotoxický účinek, než s polyanilinem.



Obr. 27 Fotografie buněk při testu cytotoxicity PANI-SDS vzorku S1-C: (A) reference, (B) koncentrace koloidu 0.1 % (koncentrace polyanilinu 0.9 µg.ml^{-1}); (C) koncentrace koloidu 0.3 % (koncentrace polyanilinu 2.7 µg.ml^{-1}); (D) koncentrace koloidu 0.4 % (koncentrace polyanilinu 3.5 µg.ml^{-1})

A B



Obr. 28 Fotografie buněk při testu cytotoxicity PANI-SDS; (A) vzorek S1-A (koncentrace koloidu 0.3 %, koncentrace polyanilinu 1.6 µg.ml^{-1}), (B) vzorek S1-B (koncentrace koloidu 0.3 %, koncentrace polyanilinu 2.7 µg.ml^{-1}). Zvětšení 100x.

Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.1.1. cytotoxicitou koloidního polyanilinu se dosud zabývali pouze Kuceková a kol. [94], kteří testovali koloid o koncentraci v rozmezí 520 až 20 µg.ml^{-1}, připravený standardním způsobem podle IUPAC s PVP jako stabilizátorem [6]. Ve své práci uvedli, že práh cytotoxicity koloidního polyanilinu aplikovaného na buňky NIH/3T3 je 105 µg.ml^{-1}. Při této koncentraci byla viabilita buněk 78 % a zvyšovala se až na 83 % (20 µg.ml^{-1}). Cytotoxický práh, zaznamenaný v diplomové práci, byl 0.5 µg.ml^{-1} (S1-A), resp. 1.8 µg.ml^{-1} (S1-C), kdy byla viabilita buněk vyšší než 80 %. Při srovnání výsledků obou prací je na první pohled zřejmé, že cytotoxicita koloidu připraveného s SDS jako stabilizátorem je podstatně vyšší, i když samotné koloidy obsahují podstatně méně polyanilinu. Tento rozdíl mezi koloidem stabilizovaným PVP a SDS je s nejvyšší pravděpodobností zapříčiněn vyšší cytotoxicitou samotného SDS. SDS je známý jako iritant kůže, způsobuje vážné podráždění očí a může způsobit podráždění dýchacích cest. V rámci studie byla stanovena také jeho cytotoxicita, kde práh cytotoxicity čistého SDS byl 0.002 µg.ml^{-1} a odpovídal viabilitě buněk 80 %. Pro přípravu koloidů byl použit 0.2 M SDS (56.8 µg.ml^{-1}), což je koncentrace mnohonásobně vyšší, ve srovnání s výše uvedenou koncentrací, která již pro buňky není cytotoxická. Tato koncentrace 56.8 µg.ml^{-1} je koncentrací SDS stanovenou u koloidů S1-A a S1-C před dialýzou. Po dialýze množství SDS v koloidu již ověřeno nebylo. Další studie by se tedy mohly zaměřit na přípravu koloidního polyanilinu s nižším množstvím SDS, nebo na dokonalejší způsob, jak z disperzí SDS odstranit.

ZÁVĚR

Cíle předložené diplomové práce byly následující: (1) příprava stabilní koloidní disperze polyanilinu s řízenou velikostí částic modifikací postupu podle IUPAC; (2) příprava koloidního polyanlinu s využitím jiného stabilizátoru, než běžně užívaného PVP a (3) stanovení cytotoxického účinku koloidu s částicemi o velikosti menší a větší než 100 nm na vybrané buněčné linie.

V teoretické části práce byl nejprve představen koloidní polyanilin, u kterého byly podrobněji popsány způsoby stabilizace a druhy stabilizátorů. V další části byla charakterizována metoda DLS pro stanovení velikosti částic a UV-VIS spektroskopie. Na závěr byla z obecného hlediska popsána biokompatibilita se zaměřením na cytotoxicitu a byl shrnut současný stav řešené problematiky přípravy a vlastností koloidního polyanilinu.

V praktické části byla nejprve provedena standardní příprava koloidu stabilizovaného PVP za různých reakčních podmínek. Bylo zjištěno, že změna koncentrace oxidačního činidla (APS) velikost částic polyanilinového koloidu výrazně neovlivnila. V dalším dílčím testu byl pomocí DLS sledován růst velikosti koloidních částic v čase, kdy v krátkých reakčních časech byly ve vzorcích detekovány částice o velkosti menší než 50 nm, které se pak během prodlužující se reakční doby zvětšovaly.

Poté byla provedena úspěšná příprava koloidního polyanilinu stabilizovaného biopolymery modifikací postupu dle IUPAC. Nejlepší stabilizační efekt zde vykazoval chitosan. Výsledkem reakce byl disperzní systém s koloidními částicemi o velikosti 0.7 – 4 μm. Koloidy však měly malou koloidní stabilitu a jejich částice v průběhu času sedimentovaly.

Příprava koloidu v přítomnosti surfaktantů Tween 20, Triton X-100 a SDS byla opět úspěšná, avšak pouze vzorky obsahující SDS vykazovaly charakteristické rysy koloidu s obsahem vodivé polyanilinové formy. Navíc se zde podařilo připravit vzorky, jejichž částice se výrazně lišily velikostí, která byla jak menší než 100 nm, tak také výrazně větší, než tento velikostní limit.

Charakterizace všech připravených vzorků byla provedena pomocí DLS. Koloidy stabilizované SDS pak byly charakterizovány podrobněji a pozornost byla věnována vzorkům označeným jako S1-A a S1-C. V tomto případě byl sledován průběh polymerace v čase (UV-VIS), velikost částic (DLS) a cytotoxicita. Výsledky analýz ukázaly, že průběh polymerace je rychlý a že průměrná velikost disperzních částic závisí na koncentraci anilinu, přičemž

s rostoucí koncentrací anilinu velikost disperzních částic rostla. Průměrná velikost koloidních částic v S1-A (0.03 M anilin) byla ca 30 nm a S1-C (0.05 M anilin) ca 580 nm. Stanovené UV-VIS spektrum odpovídalo spektrům publikovaným v literatuře a vykazovalo dvě charakteristická maxima, z nichž první bylo detekováno v oblasti 340-400 nm a druhé v oblasti 750 nm.

Na základě Lambert-Beerova zákona byla stanovena koncentrace polyanilinu v koloidu, která sloužila pro výpočet jeho skutečné koncentrace v disperzi. Tyto hodnoty pak byly použity při stanovení cytotoxicity.

Výsledky zkoušek cytotoxicity ukázaly, že v testovaném rozsahu koncentrací mají vzorky silně cytotoxické (viabilita < 30 %) až necytotoxické účinky (viabilita > 80 %). Práh cytotoxicity koloidu s menšími částicemi byl zaznamenán při koncentraci 0.5 $\mu g.ml^{-1}$ polyanilinu v disperzi. Práh cytotoxicity u koloidu, který obsahoval částice větší, byl zaznamenán při koncentraci 1.8 $\mu g.ml^{-1}$ polyanilinu v disperzi.

Závěrem lze konstatovat, že výsledná velikost částic a stabilita disperzí úzce závisí na typu a koncentraci stabilizátoru, obsahu obou monomerů a reakčních podmínkách. Výsledky rovněž naznačují, že koloidy s menší velikosti částic zřejmě vykazují vyšší cytotoxické účinky. Pro potvrzení tohoto předpokladu by však bylo potřeba provést další testy a věnovat této problematice další úsilí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] STEJSKAL, J. Polyanilin: vodivý polymer. *Otevřená věda*[online]. Dostupné z: http://archiv.oterenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/16.pdf

[2] PROKEŠ, J., J. STEJSKAL a M. OMASTOVÁ. Polyanilin a polypyrrol – dva představitelé vodivých polymerů. *Chemické listy*. 2001, vol. 95, s. 484-492. ISSN: 0009-2770.

[3] STEJSKAL, J. Colloidal dispersions of conducting polymers. *Journal of Polymer Materials*. 2001, vol. 8, s. 225-258.

[4] MARÁKOVÁ, N. *Antimikrobní vlastnosti koloidního polyanilinu.* Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

[5] STEJSKAL, J., P. KRATOCHVÍL a A. D. JENKINS. Polyaniline: Forms and formation. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1995, vol. 60, issue 10, s. 1747-1755. DOI: 10.1135/cccc19951747.

[6] STEJSKAL, J. a I. SAPURINA. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2005, vol. 77, č. 5, s. 815-826. DOI: 10.1351/pac200577050815.

[7] STEJSKAL, J., M. ŠPIRKOVÁ, A. RIEDE, M. HELMSTEDT, P. MOKREVA a J. PROKEŠ. Polyaniline dispersions 8. The control of particle morphology. *Polymer*. 1999, vol. 40, issue 10, s. 2487-2492. DOI: 10.1016/S0032-3861(98)00478-9.

[8] JANČA, J., D. MOINARD, E. JANČOVÁ a N. GOSPODINOVA. Characterization of polyaniline and poly(m-toluidine)-based nanoparticles of ultranarrow particle size distribution. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 2001, vol. 6, 1-2, s. 213-228. DOI: 10.1080/10236660008034659.

[9] EISAZADEH, H., G. SPINKS a G. G. WALLACE. Electrodeposition of polyaniline and polyaniline composites from colloidal dispersions. *Polymer International*. 1995, vol. 37, issue 2, s. 87-91. DOI: 10.1002/pi.1995.210370201.

[10] RIEDE, A., J. STEJSKAL a M. HELMSTEDT. In-situ prepared composite polyaniline films. *Synthetic Metals*. 2001, vol. 121, 1-3, s. 1365-1366. DOI: 10.1016/S0379-6779(00)00852-3.

[11] HEEGER, A. Polyaniline with surfactant counterions: Conducting polymer materials which are processible in the conducting form. *Synthetic Metals*. 1993, vol. 57, issue 1, s. 3471-3482. DOI: 10.1016/0379-6779(93)90462-6.

[12] DEARMITT, C. a S. P. ARMES. Colloidal dispersions of surfactant-stabilized polypyrrole particles. *Langmuir*. 1993, vol. 9, issue 3, s. 652-654.

[13] GOSPODINOVA, N., P. MOKREVA, T. TSANOV a L. TERLEMEZYAN. A new route to polyaniline composites. *Polymer*. 1997, vol. 38, issue 3, s. 743-746. DOI: 10.1016/S0032-3861(96)00698-2.

[14] KURAMOTO, N. a A. TOMITA. Aqueous polyaniline suspensions: Chemical oxidative polymerization of dodecylbenzene-sulfonic acid aniline salt. *Polymer*. 1997, vol. 38, issue 12, s. 3055-3058.

[15] GILL, M. T., S. E. CHAPMAN, C. L. DEARMITT, F. L. BAINES, C. M. DADSWELL, J. G. STAMPER, G. A. LAWLESS, N. C. BILLINGHAM a S. P. ARMES. A study of the kinetics of polymerization of aniline using proton NMR spectroscopy. *Synthetic Metals*. 1998, vol. 93, issue 3, s. 227-233. DOI: 10.1016/S0379-6779(98)00016-2.

[16] GILL, M., S. P. ARMES, D. FAIRHURST, S. N. EMMETT, G. IDZOREK a T. PIGOTT. Particle size distributions of polyaniline-silica colloidal composites. *Langmuir*. 1992, vol. 8, issue 9, s. 2178-2182. DOI: 10.1021/la00045a018.

[17] GILL, M., F. L. BAINES a S. P. ARMES. Some observations on the preparation of colloidal polyaniline - silica composites. *Synthetic Metals*. 1993, vol. 55, 2-3, s. 1029-1033. DOI: 10.1016/0379-6779(93)90194-2.

[18] STEJSKAL, J., P. KRATOCHVÍL, S. P. ARMES, S. F. LASCELLES, A. RIEDE, M. HELMSTEDT, J. PROKEŠ a I. KŘIVKA. Polyaniline Dispersions. 6. † Stabilization by colloidal silica particles. *Macromolecules*. 1996, vol. 29, issue 21, s. 6814-6819. DOI: 10.1021/ma9603903.

[19] BISWAS, M., S. SINHA RAY a Y. LIU. Water dispersible conducting nanocomposites of poly(*N*-vinylcarbazole), polypyrrole and polyaniline with nanodimensional manganese (IV) oxide. *Synthetic Metals*. 1999, vol. 105, issue 2, s. 99-105.

[20] RAY, S. S. a M. BISWAS. Water-dispersible conducting nanocomposites of polyaniline and poly(*N*-vinylcarbazole) with nanodimensional zirconium dioxide. *Synthetic Metals*. 2000, vol. 108, issue 3, s. 231-236.

[21] BEADLE, P., S. P. ARMES, S. GOTTESFELD, C. MOMBOURQUETTE, R. HOULTON, W. D. ANDREWS a S. F. AGNEW. Electrically conductive polyaniline-copolymer latex composites. *Macromolecules*. 1992, vol. 25, issue 9, s. 2526-2530. DOI: 10.1021/ma00035a035.

[22] TERLEMEZYAN, L., M. MIHAILOV a B. IVANOVA. *Electrically conductive polymer blends comprising polyaniline*. *Polymer Bulletin*. 1992, vol. 29, s 283-287.

[23] XIE, Z. LIU a J. GUO. Electrically conductive polyaniline/poly(butadiene-*co*-styrene-*co*-2-vinylpyridine) latex composites. *Angewandte Makromolekulare Chemie*. 1996, vol. 243, issue 1, s. 117-128. DOI: 10.1002/apmc.1996.052430110.

[24] DAWKINS, J. V. a G. TAYLOR. Flocculation studies of non-aqueous poly(methyl methacrylate) dispersions stabilized by AB block copolymers of polystyrene and poly(dimethyl siloxane). *Colloid and Polymer Science*. 1980, vol. 258, issue 1, s. 79-84. DOI: 10.1007/BF01474957.

[25] HIRZINGER, B., M. HELMSTEDT a J. STEJSKAL. Light scattering studies on core–shell systems: determination of size parameters of sterically stabilized poly(methylmethacrylate) dispersions. *Polymer*. 2000, vol. 41, issue 8, s. 2883-2891. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00472-3.

[26] COLEMAN, D. Dispersion Polymerization in Organic Media, K. E. J. Barrett, Ed., John Wiley. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*. vol. 13, issue 9, s. 575-576. DOI: 10.1002/pol.1975.130130913.

[27] SAPURINA, I., J. STEJSKAL a Z. TUZAR. Polymerization of aniline in the presence of block copolymer micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2001, vol. 180, 1-2, s. 193-198. DOI: 10.1016/S0927-7757(00)00746-9.

[28] BEADLE, P. M., L. ROWAN, J. MYKYTIUK, N. C. BILLINGHAM a S. P. ARMES. Synthesis and characterization of sterically stabilized colloidal dispersions of polypyrrole using novel tailor-made water-soluble block copolymers of narrow molecular weight distribution. *Polymer*. 1993, vol. 34, issue 7, s. 1561-1563. DOI: 10.1016/0032-3861(93)90884-D.

[29] COOPER, E. C. a B. VINCENT. Electrically conducting organic films and beads based on conducting latex particles. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 1989, vol. 22, issue 11, s. 1580-1585. DOI: 10.1088/0022-3727/22/11/002.

[30] RIEDE, A., M. HELMSTEDT, V. RIEDE a J. STEJSKAL. Polyaniline dispersions 7. Dynamic light scattering study of particle formation. *Colloid*. 1997, vol. 275, issue 9, s. 814-820. DOI: 10.1007/s003960050153.

[31] KIM, B. J., S. G. OH, M. G. HAN a S. S. IM. Synthesis and characterization of polyaniline nanoparticles in SDS micellar solutions. *Synthetic Metals*. 2001, vol. 122, issue 2, s. 297-304. DOI: 10.1016/S0379-6779(00)00304-0.

[32] KURAMOTO, N. a A. TOMITA. Aqueous polyaniline suspensions: Chemical oxidative polymerization of dodecylbenzene-sulfonic acid aniline salt. *Polymer*. 1997, vol. 38, issue 12, s. 3055-3058. DOI: 10.1016/S0032-3861(96)00861-0.

[33] GHOSH, P., S. K. SIDDHANTA a A. CHAKRABARTI. Characterization of poly(vinyl pyrrolidone) modified polyaniline prepared in stable aqueous medium. *European Polymer Journal*. 1999, vol. 35, issue 4, s. 699-710. DOI: 10.1016/S0014-3057(98)00157-8.

[34] STEJSKAL, J., T. SULIMENKO, J. PROKEŠ a I. SAPURINA. Polyaniline dispersions 10. Coloured microparticles of variable density prepared using stabilizer mixtures. *Colloid*. 2000, vol. 278, issue 7, s. 654-658. DOI: 10.1007/s003960000312.

[35] CHATTOPADHYAY, D., M. CHAKRABORTY a B. M. MANDAL. Dispersion polymerization of aniline using hydroxypropylcellulose as stabilizer: role of rate of polymerization. *Polymer International*. 2001, vol. 50, issue 5, s. 538-544. DOI: 10.1002/pi.662. ISSN 0959-8103.

[36] GOSPODINOVA, N. a J. JANČA. Quasi-elastic light scattering study of the synthesis of tailor-made suspensions of uniform polyaniline-based nanoparticles. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 1998, vol. 4, issue 4, s. 323-332. DOI: 10.1080/10236669808009720. ISSN 1023-666x.

[37] RIEDE A., M. HELMSTEDT, V. RIEDE, J. STEJSKAL. Polyanline dispersions - 9 - dynamic light-scattering study of particle formetion using different stabilizers. *Langmuir*. 1998, vol. 14, issue 23, s. 6767-6771. DOI: 10.1021/la980365l. ISSN 0743-7463.

[38] ARMS, S. P. a B. VINCENT. Dispersions of electrically conducting polypyrrole particles in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1987, issue 4, s. 288-290. DOI: 10.1039/c39870000288. ISSN 0022-4936.

[39] FLITTON, R., J. JOHAL, S. MAEDA a S. P. ARMES. Synthesis of colloidal dispersions of polypyrrole-silica nanocomposites using "stringy" silica particles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1995, vol. 173, issue 1, s. 135-142. DOI: 10.1006/jcis.1995.1306. ISSN 00219797.

[40] LASCELLES, S. F., G. P. MCCARTHY, M. D. BUTTERWORTH a S. P. ARMES. Effect of synthesis parameters on the particle size, composition and colloid stability of polypyrrole-silica nanocomposite particles. *Colloid*. 1998, vol. 276, issue 10, s. 893-902. DOI: 10.1007/s003960050326. ISSN 0303-402x.

[41] TERRILL, N. J., T. CROWLEY, M. GILL a S. P. ARMES. Small-angle x-ray scattering studies on colloidal dispersions of polyaniline-silica nanocomposites. *Langmuir*. 1993, vol. 9, issue 8, s. 2093-2096. DOI: 10.1021/la00032a031. ISSN 0743-7463.

[42] WINNIK, M. A., R. LUKAS, W. F. CHEN a P. FURLONG. Studies of the dispersion polymerisation of methyl methacrylate in nonaqueous media. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*. 1987, vol. 10-11, issue 1, s. 483-501. DOI: 10.1002/masy.19870100124. ISSN 02580322.

[43] SULIMENKO, T., J. STEJSKAL, I. KŘIVKA aj. PROKEŠ. Conductivity of colloidal polyaniline dispersions. *European Polymer Journal*. 2001, vol. 37, issue 2, s. 219-226. DOI: 10.1016/S0014-3057(00)00104-X. ISSN 00143057.

[44] GHOSH, P., A. CHAKRABARTI a S. K. SIDDHANTA. Studies on stable aqueous polyaniline prepared with the use of polyacrylamide as the water soluble support polymer. *European Polymer Journal*. 1999, vol. 35, issue 5, s. 803-813. DOI: 10.1016/S0014-3057(98)00065-2. ISSN 00143057.

[45] WU, Q., Z. XUE, Z. QI a F. WANG. 2000. The microscopic morphology of highly sulfonated polyaniline. *Synthetic Metals*. 2000, vol. 108, issue 2, s. 107-110. DOI: 10.1016/S0379-6779(99)00173-3. ISSN 03796779.

[46] ŠEVČÍKOVÁ, P., V. KAŠPÁRKOVÁ, J. KREJČÍ a P. VLTAVSKÁ. Dynamic light scattering in analysis of colloidal systems. *Chemické listy*. 2014, vol. 108, issue 5, s. 479-482. ISSN 0009-2770.

[47] JACKSON, K. Dynamický rozptyl světla – Co, jak, proč? *Chemagazine*. 2007, vol. 1, s.12–14.

[48] DUNN, A. S. Modern methods of polymer characterization. Edited by H. G. Barth and J. W. Mays John Wiley. *Polymer International*. 1992, vol. 28, issue 1, s. 96-96. DOI: 10.1002/pi.4990280118. ISSN 09598103.

[49] HASSELLÖV, M., J. W. READMAN, J. F. RANVILLE a K. TIEDE. Nanoparticleanalysis and characterizationmethodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008, vol. 17, issue 5, s. 344-361. DOI: 10.1007/s10646-008-0225-x.

[50] PABST, W. E. GREGOROVÁ. *Charakterizace částic a částicových soustav*. Praha: VŠCHT, 2007.

[51] KVÍTEK. L., R. NOVOTNÝ a P. PIKAL. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické listy.* 1998, vol. 92, issue 5, s. 431.

[52] KASZUBA, M., D. MCKNIGHT, M. T. CONNAH, F. K. MCNEIL-WATSON a U. NOBBMANN. Measuring subnanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008, vol. 10, issue 5, s. 823-829. DOI: 10.1007/s11051-007-9317-4.

[53] MEYERS, R. A. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*. Chichester, WestSussex, U.K.: New York, 2011, 1 vyd., 2188 s. ISBN 97804709733321.

[54] HERRERA, M. L. *Analytical techniques for studying the physical properties of lipid emulsions*. Springer. London, 2012. ISBN: 978-1-4614-3255-5.

[55] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 2., upr. a dopl. vyd., 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[56] MILATA, Viktor. *Spektrálne metódy v chémii*. Bratislava: STU, 2004, 1. vyd., 327 s. ISBN 80-227-2049-6.

[57] ČŮTA, František. *Instrumentální analýza*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986, 1. vyd., 295 s.

[58] STEJSKAL J, KRATOCHVÍL P, N. RADHAKRISHAN. Polyaniline dispersions 2. UV-Vis absorption spectra. *Synth Met*, 1993, vol. 61, s.225-231.

[59] CAO, Y., P. SMITH a A. J. HEEGER. Spectroscopic studies of polyaniline in solution and in spin-cast films. *Synthetic Metals*. 1989, vol. 32, issue 3, s. 263-281. DOI: 10.1016/0379-6779(89)90770-4. ISSN 03796779.

[60] WAN, M. Absorption spectra of thin film of polyaniline. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 1992, vol. 30, issue 4, s. 543-549. DOI: 10.1002/pola.1992.080300404. ISSN 0887624x.

[61] RAY, A., G. E. ASTURIAS, D. L. KERSHNER, A. F. RICHTER a A. G. MACDIARMID. Polyaniline: Doping, Structure and derivatives. *Synth. Met.*, 1989, issue 29, El41

[62] MCMANUS, P. M., S. CH. YANG a R. J. CUSHMAN. Electrochemical doping of polyaniline: effects on conductivity and optical spectra. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1985, issue 22, s. 1556-1557. DOI: 10.1039/c39850001556. ISSN 0022-4936.

[63] NEOH, K. G., E. T. KANG a K. L. TAN. Spectroscopic studies of protonation, oxidation and light irradiation of polyaniline solutions. *Polymer*. 1992, vol. 33, issue 11, s. 2292-2298. DOI: 10.1016/0032-3861(92)90519-3. ISSN 00323861.

[64] PHILLIPS, S. D., G. YU, Y. CAO and A. J. HEEGER. Spectroscopy and transient photoconductivity of partially crystalline polyaniline. *Phys. Rev*. 1989, vol. 39, issue 15, s. 10 702-10707.

[65] GESKIN, V. M., Y. A. LETUCHY a Y. A. KATSMAN. Polyaniline in solution: characterization of acid-base equilibria by means of optical and ESR spectroscopy. *Synthetic Metals*. 1992, vol. 48, issue 2, s. 241-245. DOI: 10.1016/0379-6779(92)90065-Q. ISSN 03796779.

[66] GOSPODINOVA, N., P. MOKREVA a L. TERLEMEZYAN. Stable aqueous dispersions of polyaniline. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1992, issue 13, s. 923-924. DOI: 10.1039/c39920000923. ISSN 0022-4936.

[67] STEJSKAL, J., P. KRATOCHVÍL, N. GOSPODINOVA, L. TERLEMEZYAN a P. MOKREVA. Polyaniline dispersions. 3. Influence of the polymerization conditions. *Polymer International*. 1993, vol. 32. Issue 4, s. 401-405. DOI: 10.1002/pi.4990320411. ISSN 09598103.

[68] KIRKPATRICK, C. J., F. BITTINGER, M. WAGNER, H. KOHLER, T. G.VAN KOOTEN, C. L. KLEIN a M. OTTO. Current trends in biocompatibility testing. *Proc Inst Mech Eng H*. 1998, vol. 212, issue 2, s. 75–84.

[69] CHEN, H., L. YUAN, W. SONG, Z. WU a D. LI. Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. *Progress in Polymer Science*. 2008, vol. 33, issue 11, s. 1059-1087. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2008.07.006. ISSN 00796700.

[70] WILLIAMS, D. F. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008, vol. 29, issue 20, s. 2941-2953. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023. ISSN 01429612.

[71] DONARUMA, L. G. Definitions in biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 72 pp. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*. 1987, vol. 26, issue 9, s. 414-414. DOI: 10.1002/pol.1988.140260910. ISSN 03606384.

[72] WATAHA, J. C. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials*. 2012, vol. 28, issue 1, s. 23-40. DOI: 10.1016/j.dental.2011.08.595. ISSN 01095641.

[73] FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N. J.: Wiley-Liss, 2005, 642 s. ISBN 04-714-5329-3.

[74] BORALDI, F., C. COPPI, S. BORTOLINI, U. CONSOLO a R. TIOZZO. Cytotoxic evaluation of elastomeric dental impression materials on a permanent mouse cell line and on a primary human gingival fibroblast culture. *Materials*. 2009, vol. 2, issue 3, s. 934-944. DOI: 10.3390/ma2030934. ISSN 1996-1944.

[75] LALUPPA, J. A., T. A. McADAMS, E. T. PAPOUTSAKIS a W. M. MILLER. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Mater Res*. 1997, vol. 36, issue 3, s. 347–359.

[76] FRANKEN, N. A. P., et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006, vol. 1, issue 5, s. 2315-2319. DOI: 10.1038/nprot.2006.339. ISSN 1754-2189.

[77] SHAPIRO, H. M. *Practical flow cytometry*. 4th edition. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore : John Willey & Sons, 2003. 681 s. ISBN 978-04-7141-125-3.

[78] BERGQUIST, P. L., et al. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles*. 2009, vol. 13, issue 3, s. 389-401. DOI: 10.1007/s00792-009-0236-4. ISSN 1431-0651.

[79] SLANINOVÁ, Iva et al., 2008. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chemické listy* [online]. Č. 102, s. 427-433 [cit. 2015-04-14]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_06_427-433.pdf

[80] PERRIN, F. X., T. A. PHAN a D. L. NGUYEN. Preparation and characterization of polyaniline in reversed micelles of decylphosphonic acid for active corrosion protection coatings. *European Polymer Journal*. 2015, vol. 66, s. 253-265. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.052.

[81] KALENDOVÁ, A., D. VESELÝ, I. SAPURINA a J. STEJSKAL. Anticorrosion efficiency of organic coatings depending on the pigment volume concentration of polyaniline phosphate. *Progress in Organic Coatings*. 2008, vol. 63, issue 2, s. 228-237. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2008.06.005.

[82] DRELINKIEWICZ, A., A. ZIĘBA, J. W. SOBCZAK, M. BONAROWSKA, Z. KARPIŃSKI, A. WAKSMUNDZKA-GÓRA a J. STEJSKAL. Polyaniline stabilized highly dispersed Pt nanoparticles: Preparation, characterization and catalytic properties. *Reactive and Functional Polymers*. 2009, vol. 69, issue 8, s. 630-642. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2009.04.007.

[83] CRUZ-SILVA, R., A. ESCAMILLA, M. E. NICHO, G. PADRON, A. LEDEZMA-PEREZ, E. ARIAS-MARIN, I. MOGGIO a J. ROMERO-GARCIA. Enzymatic synthesis of pH-responsive polyaniline colloids by using chitosan as steric stabilizer. *European Polymer Journal*. 2007, vol. 43, issue 8, s. 3471-3479. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.05.027.

[84] KIM, B. J., S. G. OH, M. G. HAN a S. S. IM. Preparation of polyaniline nanoparticles in micellar solutions as polymerization medium. *Langmuir*. 2000, vol. 16, issue 14, s. 5841-5845. DOI: 10.1021/la9915320.

[85] HAN, D., Y. CHU, L. YANG, Y. LIU a Z. LV. Reversed micelle polymerization: a new route for the synthesis of DBSA–polyaniline nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2005, vol. 259, 1-3, s. 179-187. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.02.017.

[86] ANTONIETTI, M., R. BASTEN a S. LOHMANN. Polymerization in microemulsions — a new approach to ultrafine, highly functionalized polymer dispersions. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1995, vol. 196, issue 2, s. 441-466. DOI: 10.1002/macp.1995.021960201.

[87] KINLEN, P. J., J. LIU, Y. DING, C. R. GRAHAM a E. E. REMSEN. Emulsion polymerization process for organically soluble and electrically conducting polyaniline. *Macromolecules*. 1998, vol. 31, issue 6, s. 1735-1744. DOI: 10.1021/ma971430l. ISSN 0024-9297.

[88] HAN, M. G., S. K. CHO, S. G. OH a S. S. IM. Preparation and characterization of polyaniline nanoparticles synthesized from DBSA micellar solution. *Synthetic Metals*. 2002, vol. 126, issue 1, s. 53-60. DOI: 10.1016/S0379-6779(01)00494-5.

[89] HUMPOLÍČEK, P., V. KAŠPÁRKOVÁ, P. SÁHA a J. STEJSKAL. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals*. 2012, vol. 162, 7-8, s. 722-727. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.

[90] SESHADRI, D. T. a N. V. BHAT. Use of polyaniline as an antimicrobial agent in textiles. *Indian J. Fibre Text*. 2005, vol. 30, issue 2, s. 204–206. ISSN: 0975-1025.

[91] SHI, N., GUO X., JING H. GONG J., SUN C. a K. YANG. Antibacterial effect of the conducting polyaniline. *Journal of Materials Sience and Technology*. 2006, vol. 22, issue 3, s 289-290.

[92] LIU, S., J. WANG, D. ZHANG, P. ZHANG, J. OU, B. LIU a S. YANG. Investigation on cell biocompatible behaviors of polyaniline film fabricated via electroless surface polymerization. *Applied Surface Science*. 2010, vol. 256, issue 11, s. 3427-3431. DOI: 10.1016/j.apsusc.2009.12.046.

[93] FERNANDES, E. G. R., V. ZUCOLOTTO a A. A. DE QUEIROZ. Electrospinning of Hyperbranched Poly-L-Lysine/Polyaniline Nanofibers for Application in Cardiac Tissue Engineering. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2010, vol. 47, issue 12, s. 1203-1207. DOI: 10.1080/10601325.2010.518847.

[94] KUCEKOVÁ, Z., P. HUMPOLÍČEK, V. KAŠPARKOVÁ, T. PEREČKO, M. LEHOCKÝ, I. HAUERLANDOVÁ, P. SÁHA a J. STEJSKAL. Colloidal polyaniline dispersions: Antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, vol. 116, s. 411-417. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.027.

[95] OH, W. K., S. KIM, O. KWON a J. JANG. Shape-Dependent Cytotoxicity of Polyaniline Nanomaterials in Human Fibroblast Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2011, vol. 11, issue 5, s. 4254-4260. DOI: 10.1166/jnn.2011.3662.

[96] GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M. R., J. R. BENNETT, S. SWIFT, A. J. EASTEAL a M. AMBROSE. Broad spectrum antimicrobial activity of functionalized polyanilines. *Acta Biomaterialia*. 2011, vol. 7, issue 12, s. 4204-4209. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.07.018.

[97] HUMPOLÍČEK, P. a V. KAŠPÁRKOVÁ. Polymerní materiály ve zdravotnic-kých prostředcích a jejich biologické vlastnosti. *Plasty a kaučuk*. 2012, vol. 49, 7-8, s. 196-199. ISSN 0322-7340.

[98] WALLACE, G. G., G. M. SPINKS G. M., L. A. P. KANE-MAGUIRE a P. TEASDALE. *Conductive electroactive polymers. Intelligent Materials Systems*.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PVP	poly(*N*-vinylpyrrolidon)
PVAL	poly(vinyl alkohol)
DBSA	kyselina dodecylbenzensulfonová
SDS	Dodecylsulfát sodný
APS	Peroxydvojsíran amonný
HCl	Kyselina chlorovodíková
DLS	Dynamický rozptyl světla
PCS	Fotonová korelační spektroskopie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
O	Atom kyslíku
N	Atom dusíku
S	Atom síry
TX 100	Triton X-100
TW 20	Tween 20
UV-VIS	Ultrafialové a viditelné záření
HCl	Kyselina chlorovodíková
MTT	3-[4,5- dimethyl-2- thiazolyl]-2,5- diphenyl-2H- tetrazolium bromid
FSC	přímý rozptyl světla, forward scatter
SSC	boční rozptyl světla, side scatter
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
Sr	Relativní směrodatná odchylka
PdI	Index polydisperzity
HA	Kyselina hyaluronová
AN	Anilin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Formy polyanilinu: emeraldin může být oxidován na pernigranilin nebo redukován na leukoemeraldin. [1].....13

Obr. 2. Rovnice oxidace polyanilinu. [1].....13

Obr. 3. Vznik koloidní částice polyanilinu. [6].....17

Obr. 4 Model tvorby polyanilinových částic v přítomnosti stabilizátoru, oxidu křemičitého. [3].....17

Obr. 5 Schéma začlenění anilinu v prostředí HCl do micely SDS. [31].....18

Obr. 6 Absorpční spektra polyanilinové disperze v závislosti na pH. [58].....26

Obr. 7 Absorpční spektra polyanilinové disperze v 1M a 10M HCl. [58].....26

Obr. 8 Maximální absorbance A s lokálním maximem mezi 350-420 nm v závislosti na koncentraci polyanilinové soli. Různé disperze, zředěné 60 krát (●); zásobní disperze o známé koncentraci polyanilinu zředěná v různém rozsahu (○). [58].....27

Obr. 9 Redukce MTT na formazan......30

Obr. 10 Distribuce velikosti částic čistého PVP (přerušovaná čára) a vzorku P1-F o koncentraci APS 0.01 M (plná čára)......48

Obr. 11 PANI-PVP závislost z-průměru velikosti částic na koncentraci APS; provedení reakce při teplotě 0 a 20 °C......48

Obr. 12 Ukázka monomodální distribuce velikosti částic PANI-PVP (teplota 0 °C, koncentrace APS = 0.25 M)......49

Obr. 13 PANI-PVP závislost PdI na koncentraci APS v reakční směsi......50

Obr. 14 PANI-PVP: závislost z-průměru na reakčním čase (P1-B: koncentrace APS = 0.2 M, P1-F: koncentrace APS = 0.01M)......50

Obr. 15 Distribuce velikosti částic PANI-PVP v závislosti na čase, vzorek P1-B (koncentrace APS = 0.2 M). Samotný PVP (plná šedá čára), P1-B na počátku polymerace (0 minut; plná černá čára), P1-B v 1 minutě (tečkovaná čára), P1-B ve 2 minutě (přerušovaná čára)......52

Obr. 16 Distribuce velikosti částic PANI-PVP v závislosti na čase, vzorek P1-F (koncentrace APS = 0.01 M). Samotný PVP (šedá plná čára), P1-F ve 2 minutě (černá plná čára), P1-F ve 4 minutě (tečkovaná čára), P1-F v 10 minutě (přerušovaná čára)......53

Obr. 17 PANI-PVP závislost PdI na čase (P1-B: koncentrace APS = 0.2 M, P1-F: koncentrace APS = 0.01M). 53

Obr. 18 Příklady distribucí velikosti částic PANI-CH o koncentraci chitosanu 1 %. Obsah APS: plná čára 0.05 M (CH-B1), přerušovaná čára 0.01 M (CH-B4)..56

Obr. 19 Distribuce velikosti částic PANI-TW 20 (plná čára) a PANI-TX 100 (přerušovaná čára). 57

Obr. 20 Změna distribuce velikosti částic PANI-SDS se změnou koncentrace anilinu. Přerušovaná čára – 0.03 M anilin, plná čára – 0.05 M anilin. 58

Obr. 21 Příklad distribuce velikostí částic PANI-SDS. Vzorek S3-B, poměr anlin/APS 1:1.5......59

Obr. 22 Průběh sledování polymerace vzorku S1-A (0.03 M anilin) v čase UV-VIS spektroskopií......61

Obr. 23 Průběh sledování polymerace vzorku S1-C (0.08 M anilin) v čase UV-VIS spektroskopií......61

Obr. 24 Distribuce velikosti částic PANI-SDS po dialýze. Vzorek S1-A o koncentraci anilinu 0.03 M (plná čára), vzorek S1-C o koncentraci anilinu 0.08 M (přerušovaná čára). 63

Obr. 25 Absorpční spektrum polyanilinové disperze PANI-SDS v 1 M HCl, koncentrace anilinu 0.03 M......64

Obr. 26 Absorpční spektrum polyanilinové disperze PANI-SDS v 1 M HCl, koncentrace anilinu 0.08 M......64

Obr. 27 Fotografie buněk při testu cytotoxicity PANI-SDS vzorku S1-C: (A) reference, (B) koncentrace koloidu 0.1 % (koncentrace polyanilinu 0.9 μg.ml^{-1}); (C) koncentrace koloidu 0.3 % (koncentrace polyanilinu 2.7 μg.ml^{-1}); (D) koncentrace koloidu 0.4 % (koncentrace polyanilinu 3.5 μg.ml^{-1}) 67

Obr. 28 Fotografie buněk při testu cytotoxicity PANI-SDS; (A) vzorek S1-A (koncentrace koloidu 0.3 %, koncentrace polyanilinu 1.6 μg.ml^{-1}), (B) vzorek S1-B (koncentrace koloidu 0.3 %, koncentrace polyanilinu 2.7 μg.ml^{-1}). Zvětšení 100x. 68

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Složení reakčních směsí pro přípravu koloidního PANI v přítomnosti stabilizátoru PVP. Polymerace byla provedena při 0 a 20 °C.....37

Tab. 2 Složení reakčních směsí pro přípravu koloidního PANI v přítomnosti stabilizátoru kyseliny hyaluronové. Ve vzorcích HA-A byla použita HA s M = 1.8 – 2.1 x 10^6 g.mol^{-1} a HA-B s M = 50.28 10^3 g.mol^{-1}.....38

Tab. 3 Složení reakčních směsí pro přípravu koloidního PANI v přítomnosti stabilizátoru chitosanu. Polymerace provedená s anilin hydrochloridem (CH-A) a anilinem (CH-B).....39

Tab. 4 Složení reakčních směsí pro přípravu polyanilinu v přítomnosti surfaktantů.40

Tab. 5 Hodnoty absorbancí pro vzorky koloidu S1-A a S-C, jejich koncentrace a odpovídající koncentrace polyanilinu v koloidu.....42

Tab. 6 Hodnoty velikosti částic PANI-PVP v závislosti na koncentraci APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu připraveného při teplotě 0 °C a 20 °C.....47

Tab. 7 Hodnoty velikosti částic PANI-PVP v závislosti na čase (z-průměr) a indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu.....51

Tab. 8 Hodnoty velikosti částic PANI-HA v závislosti na koncentraci HA a APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu.....54

Tab. 9 Hodnoty velikosti částic PANI-CH v závislosti na koncentraci chitosanu a APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu.....55

Tab. 10 Hodnoty velikosti částic PANI-TW 20 a PANI-TX 100 (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu.....56

Tab. 11 Hodnoty velikosti částic PANI-SDS v závislosti na koncentraci anilinu, HCl a pomětu anilin/APS (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu.....59

Tab. 12 Hodnoty velikosti částic PANI-SDS v závislosti na koncentraci anilinu (z-průměr) a hodnoty indexu polydisperzity vzorků koloidního polyanilinu.....62

Tab. 13 Cytotoxický účinek PANI-SDS vyjádřený jako absorbance ± směrodatná odchylka (SD)a dle stupnice mezinárodní normy ISO 10993-5. Uvedeny jsou i koncentrace koloidu (%) a polyanilinu v koloidu (μg.ml^{-1}).....66