

Hydrogelní filmy na bázi chitosanu pro topikální aplikace

Bc. Hana Doudová

Diplomová práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Hana Doudová
Osobní číslo: T210060
Studijní program: N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia: Kombinovaná
Téma práce: Hydrogelní filmy na bázi chitosanu pro topikální aplikace

Zásady pro vypracování

Diplomová práce se bude zabývat přípravou a charakterizací hydrogelních filmů určených pro topikální aplikace jako jsou obvazové materiály, náplasti, či pleťové masky. Náplní práce bude zpracování literární rešerše na téma hydrogelů na bázi chitosanu, a jejich využití jako biomateriálů nebo kosmetických přípravků s důrazem na kožní aplikace. V experimentální části bude probíhat příprava a charakterizace filmů na bázi chitosanu zesílovaných pomocí netoxického sířovadla rovněž na bázi polysacharidu. Bude zkoumán vliv množství sířovadla na vlastnosti hydrogelů jako bobtnání, porozita či hustota sítě. Následně bude hydrogel nasycen roztokem biologicky aktivní látky a bude studována kinetika jejího uvolňování v závislosti na vlastnostech hydrogelů.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Kim, U.-J.; Lee, Y. R.; Kang, T. H.; Choi, J. W.; Kimura, S.; Wada, M. Protein Adsorption of Dialdehyde Cellulose-Crosslinked Chitosan with High Amino Group Contents. *Carbohydrate Polymers* 2017, 163 (Supplement C), 34-42.
- [2] L. Münster, Z. Capáková, M. Fišera, I. Kuřitka, J. Vicha, *Carbohydrate Polymers* 2019, 218, 333-342.
- [3] H. Hamedí, S. Moradi, S. M. Hudson, A. E. Tonelli, *Carbohydrate Polymers* 2018, 199, 445-460.
- [4] J. Fu, F. Yang, Z. Guo, *New J. Chem.* 2018, 42, 17162-17180.
- [5] M. Muchová, L. Münster, Z. Capáková, V. Mikulcová, I. Kuřitka, J. Vicha, *Materials Science and Engineering: C* 2020, 116, 111242.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Jan Vicha, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Jednou z hlavních výhod hydrogelů pro biomedicínské a kosmetické aplikace je jejich biologická kompatibilita, snadná rozložitelnost, dostupnost, nenákladnost a také nulová toxicita, k čemuž je ale nutné použití netoxických síťovacích činidel. Ty lze získat z přirozeně dostupných biopolymerů. Příkladem takového síťovadla je dialdehyd celulózy (DAC), který je získáván selektivní oxidací celulózy. Tato práce se věnuje přípravě a charakterizaci hydrogelů na bázi částečně acetylovaného chitosanu zesíťovaného pomocí DAC a zkoumání jejich potenciálu pro topikální aplikace v kosmetice a medicíně, jmenovitě reologických vlastnosti, buněčné proliferace, cytotoxicity a rychlosti uvolňování aktivní látky z hydrogelu.

Klíčová slova: chitosan, dialdehyd celulózy, hydrogel, biologicky aktivní látky, kinetika uvolňování

ABSTRACT

One of the main advantages of hydrogels for biomedical and cosmetic applications is their biocompatibility, easy degradability, availability, low cost, and also zero toxicity, which requires the use of non-toxic crosslinking agents. These can be obtained from naturally available biopolymers. An example of such crosslinker is cellulose dialdehyde (DAC), which is obtained from the selective oxidation of cellulose. This thesis deals with the preparation and characterization of hydrogels based on partially acetylated chitosan crosslinked by DAC and the investigation of their potential for topical application in cosmetics and medicine, namely rheological properties, cell proliferation, cytotoxicity, and release of the active substance from the hydrogel.

Key words: chitosan, dialdehyde celluloses, hydrogel, biologically active substances, release kinetics

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D., za vedení, rady, trpělivost a pomoc při psaní této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Monice Muchové a Ing. Simoně Káčerové za velkou pomoc během praktické části této práce a Ing. Alžbětě Vávrové a Ing. Kateřině Štěpánkové za neméně důležitou psychickou podporu. Nakonec chci poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu během celého studia.

„No one knows what the future holds. That's why its potential is infinite.”

- Rintaro Okabe

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOMATERIÁLY	11
1.1 POLYSACHARIDY.....	11
1.2 CHITOSAN.....	12
1.2.1 Chitosan v kosmetice.....	15
1.3 CELULÓZA.....	16
1.3.1 Dialdehyd celulózy.....	17
2 HYDROGELY	19
2.1 HYDROGELY V KOSMETICE.....	19
2.2 KLASIFIKACE.....	19
2.3 STRUKTURA HYDROGELŮ.....	21
2.4 SYNTÉZA HYDROGELŮ.....	22
2.4.1 Fyzikální síťování.....	22
2.4.2 Chemické síťování.....	23
2.4.3 Metoda Schiffových bází.....	23
2.5 PARAMETRY SÍTĚ.....	24
2.6 METODY STUDIA HYDROGELŮ.....	25
2.6.1 Viskoelastické vlastnosti.....	25
2.6.2 Morfologie.....	27
2.6.3 BET analýza.....	28
2.6.4 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).....	28
2.6.5 Uvolňování látek z hydrogelu.....	29
3 BIOAKTIVNÍ LÁTKY V KOSMETICE	31
3.1 VITAMINY.....	31
3.1.1 Vitamin A.....	31
3.1.2 Vitamin C.....	32
3.1.3 Vitamin B ₃	33
3.2 ROSTLINNÉ SLOŽKY.....	34
3.2.1 Rutin.....	35
3.2.2 Kofein.....	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
4 CÍL PRÁCE	38
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY.....	39
5.2 PŘÍSTROJE A METODY.....	39

5.2.1	Reologická měření	39
5.2.2	SEM analýza	39
5.2.3	Nasycení hydrogelů biologicky aktivní látkou a průběh uvolňování.....	40
5.2.4	FTIR	40
5.2.5	Cytotoxicita	40
5.2.6	Růst buněk v přítomnosti vzorků	41
5.3	PŘÍPRAVA DAC, SCN A SCN-DAC HYDROGELŮ	41
5.3.1	Příprava DAC	41
5.3.2	Příprava SCN	43
5.3.3	Příprava SCN/DAC hydrogelů.....	44
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
6.1	FT-IR ANALÝZA.....	46
6.2	STANOVENÍ PARAMETRŮ SÍTĚ.....	47
6.3	VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI	50
6.4	SEM ANALÝZA.....	55
6.5	NASYCENÍ HYDROGELŮ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKOU A PRŮBĚH UVOLŇOVÁNÍ.....	56
6.6	CYTOTOXICITA.....	58
6.7	BUNĚČNÁ PROLIFERACE	59
	ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM TABULEK.....	70

ÚVOD

V posledních několika desetiletích se ve všemožných oblastech prosazuje trend návratu zpátky k přírodě. Označení BIO dělá produkty čím dál populárnější, ať už se jedná o potraviny, kosmetiku nebo průmyslové výrobky.

Biomateriály se těší u výrobců i spotřebitelů velké oblibě nejen z etického hlediska (tlak společnosti na ochranu přírody, omezování znečištění životního prostředí, zmenšení ekologické stopy), ale taktéž z pohledu zdravotního. Biomateriály z přírodních zdrojů přinášejí nespočet benefitů, jako je nulová toxicita a minimum nežádoucích účinků, ale také snadná příprava a takřka neomezené množství obnovitelných vstupních surovin.

Hydrogely jsou látky, které jsou schopné na sebe navázat množství vody rovné až několikasetnásobku vlastní váhy. Nacházejí poté uplatnění v mnoha odvětvích, například farmacii a kosmetologii. Využití lze jako sterilní krytí otevřených ran, ke zvlhčení pokožky anebo je nasytit aktivní látkou. Jsou-li vybrány vhodné materiály, díky snadné modifikaci hydrogelů je možné přesně upravit rychlost uvolňování této látky a její koncentraci.

Co se kosmetiky týče, v komerčním využití se s hydrogely setkáváme ve formě pleťových masek. Zákazníky lákají na přívětivou cenu, variabilitu a snadnou aplikaci. Na pleti jsou příjemné, oproti krémovým a slupovacím maskám po nich nevzniká nepořádek a na rozdíl od plátýnkových jsou schopny perfektně přilnout k pokožce a nevznikají u nich tvrdé záhyby, takže nedřou a netlačí. Jsou pružné a drží tvar, proto je pohodlné použít je pouze lokálně, například jako polštářky na kruhy pod očima. Tato práce se věnuje přípravě a charakterizaci hydrogelních biomateriálů založených na bipolymerech pro topikální aplikace v kosmetice ale také medicíně.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Biomateriály jsou vyráběny a zpracovávány tak, aby byly vhodné pro použití jako zdravotnické prostředky nebo jejich součásti, a jsou obvykle určeny k dlouhodobému kontaktu s biologickými systémy. Pokud jsou použity v lidském těle, musí splňovat požadavky na biokompatibilitu. Biokompatibilitou se rozumí snášenlivost látek v biologickém prostředí; biokompatibilní materiál je posuzován podle interakce s prostředím, a to dle cytotoxicity, toxikologie, alergických, karcinogenních, teratogenních či mutagenních reakcí, vlivu na infekční procesy a podle rozsahu a kvality biodegradace. Materiál by tedy neměl být toxický pro živé buňky a organismy, je důležité, aby neovlivňoval fyziologické procesy, nevyvolával zánětovou reakci, nevolňoval potenciálně jedovaté látky či jinak nepoškozoval organismus. Nedodržení biokompatibility a toxicita může vést k odmítnutí implantátů a dalším vážným zdravotním problémům. [1]

Biomateriály využívané v medicíně ve formě implantátů by měly být dostatečně pevné a odolné proti opotřebení a také vykazovat nízký koeficient tření při interakci s tělesnými tkáněmi. Zvýšení koeficientu tření nebo snížení odolnosti proti opotřebení může způsobit uvolnění a znehodnocení implantátu. Dále se hodnotí odolnost proti korozi. Z chemického hlediska je lidské tělo vysoce okysličený solný elektrolyt s pH kolem 7,4 a teplotou 37 °C, který navíc společně s přítomností iontů chlóru v tělních tekutinách tvoří ideální podmínky ke vzniku koroze. Implantát vyrobený z korodujícího biomateriálu může do těla uvolňovat například kovové ionty, které následně vyvolávají zánětlivé reakce. [1]

1.1 Polysacharidy

Polysacharidy jsou biopolymery tvořené mono- nebo disacharidy, které jsou navzájem propojeny prostřednictvím glykosidických vazeb. Vznikají kondenzační reakcí, to znamená, že se polymer tvoří postupným přidáváním monomerů na aktivní místa v řetězové reakci. Mezimolekulární asociace a uspořádání řetězce ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti polysacharidů. Přítomnost hydroxylových skupin v opakujících se jednotkách umožňuje polysacharidům snadno vytvářet kovalentní vazby jak uvnitř jednoho, tak i mezi vícero řetězci. Díky tomu bývají nerozpustné, tvoří gely a mívají filmotvorné vlastnosti. [2]

Polysacharidy lze získat z rostlinných, živočišných a mikrobiálních zdrojů. Některé polysacharidy mají potenciál pro biomedicínské aplikace, především chitosan, algináty, dextran, celulóza, škrob, kyselina hyaluronová, cyklodextrin a pullulan. Materiály získávané z přírodních zdrojů mají obvykle lepší biokompatibilitu a biologickou rozložitelnost

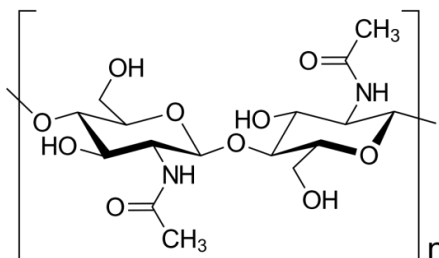
v porovnání s jejich syntetickými protějšky. Jsou netoxické povahy a jejich strukturní podobnost s glykosaminoglykany napomáhá snadnějšímu přijetí implantátu původní tkáni. Mnoho polysacharidů nelze rozpustit v organických rozpouštědlech, proto je vývoj biomateriálu náročný a výsledný produkt nemusí vždy splňovat potřebné požadavky. Bez ohledu na tato omezení se v současnosti daří vyrábět hydrogely na bázi celulózy, chitosanu, alginátů, škrobu nebo želatiny, které se následně v biomedicíně využívají jako umělé tkáně, tzv. skafoldy, filmy, mikro- a nanočástice, umělé červené krvinky a cévní štěpy.[2]

Jen výjimečně se stává, že by jediný polymer měl všechny požadované vlastnosti, proto se obvykle používá směs dvou nebo tří polymerů, případně se přidávají syntetické polymery, jako jsou polyethylenglykol nebo polykaprolakton. Díky tomu lze vlastnosti konečného produktu upravovat dle zadaných požadavků. Existují i další modifikační metody polymerů a jejich směsí, ty hlavní lze rozdělit na chemické, fyzikální a biologické. Nejčastěji se používají modifikace chemické, které spočívají v naroubování dalších řetězců či funkčních skupin na hlavní polymerní řetězec, což vede k lepší bioaktivitě a rozpustnosti polysacharidů. Fyzikální a biologické metody mění fyzikálně-chemické vlastnosti pouze změnou molekulové hmotnosti polysacharidů.[2]

Polysacharidy jsou běžně používané v kosmetice, kde slouží jako zahušťovadla, modifikátory reologie, stabilizátory emulzí, filmotvorná, suspenzační, dispergační anebo stabilizační činidla. Schopnost zadržovat vodu z nich činí účinné humektanty při přípravě hydratačních přípravků. Polysacharidy hydratují pokožku a zabraňují transepidermální ztrátě vody (TEWL), čímž zanechávají pokožku jemnou a hladkou. Ve většině případů vykazují polysacharidy neneutonské tokové chování, tudíž viskozita klesá s rostoucí rychlostí smyku. To je výhodné v případě kosmetických krémů a mlék, protože je tím zabráněno nechtěnému roztékání kosmetického přípravku, zároveň je však možno dosáhnout rovnoměrné aplikace na kůži.[3]

1.2 Chitosan

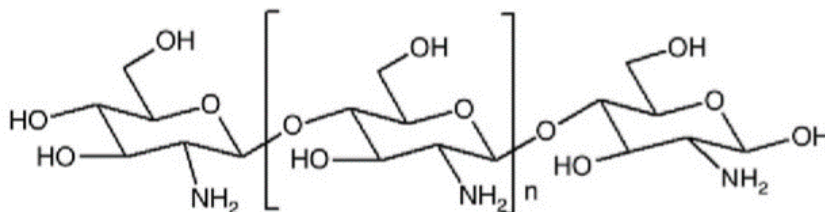
Chitosan se připravuje z chitinu, tedy přirozeně se vyskytujícího polysacharidu, který se nachází v exoskeletu korýšů a v buněčných stěnách hub. Chitin je polysacharid složený z jednotek N-acetyl-D-glukosaminu navzájem spojených 1,4- β -glykosidickou vazbou. Struktura chitinu je znázorněna na Obrázku 1. [4–6]



Obrázek 1: Chemická struktura chitinu

Chitin je v medicíně známý pro svoji biokompatibilitu. Jeho největším záporem bránícím v širším využití je jeho nerozpustnost ve většině rozpouštědel včetně vody. Ta je způsobena přítomností acetamidových skupin, které tvoří velmi silné vodíkové vazby v chitinové struktuře. Proto se využívají jeho deriváty.

Chitosan vzniká deacetylací chitinu v přítomnosti alkalických hydroxidů, jako je třeba hydroxid sodný. Tento proces nikdy nevede ke 100% deacetylaci, chitin se ale mění na chitosan ve chvíli, kdy stupeň deacetylace překročí 50 %. Většina jednotek v řetězcích chitosanu tedy existuje v deacetylované formě jako 2-amino-2-deoxy-β-D-glukopyranóza (Obrázek 2), čímž se sníží počet míst pro vznik vodíkových vazeb a výsledný produkt se tak stává rozpustným v kyselině.[4, 5]



Obrázek 2: Chemická struktura chitosanu[7]

Výsledný stupeň deacetylace chitosanu udává počet přítomných aminoskupin, které jsou na rozdíl od acetamidových skupin reaktivní a umožňují následnou modifikaci, například navázání aktivní látky. Stupeň deacetylace může být stanoven použitím několika metodami, jako je třeba infračervená spektroskopie, titrace, NMR spektroskopie a plynová chromatografie.[4] Rozdíly mezi chitinem a chitosanem jsou také shrnuty v Tabulce 1.

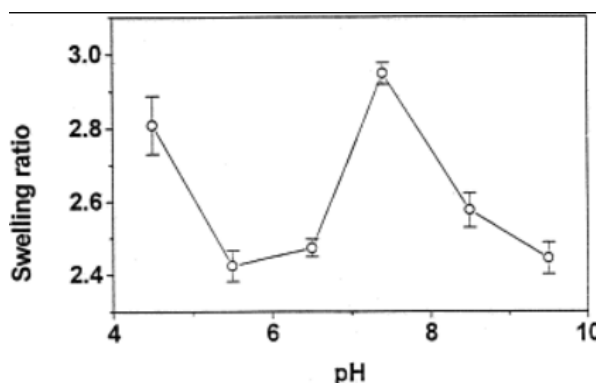
Tabulka 1: Srovnání chitinu a chitosanu

	Chitin	Chitosan
Definice	amidový derivát glukózy	lineární glukosaminový polysacharid
Chemická struktura	acetamidové skupiny, bez volných aminových skupin	dominance volných aminových skupin
Zdroj	primární složka buněčných stěn hub, exoskelet členovců, rybí šupiny	deacetylací chitinu alkalickou látkou (např. NaOH)
Využití	zemědělská hnojiva	filtrační systémy, nosiče aktivních látek

Netoxický a biokompatibilní chitosan je cennou komoditou v mnoha oblastech výzkumu, jako je chemie, biochemie a biomedicína. Chitosanové nanočástice a mikročástice jsou vyvíjeny pro cílené dodávání léčiv a genovou terapii. [8, 9]

Chitosanové hydrogely jsou často zmiňovány v souvislosti s jejich antimikrobiální a antifungální aktivitou. To je z velké části způsobeno kladným nábojem chitosanových hydrogelů, které mohou sloužit jako chelační činidlo reagující se záporně nabitými ligandy, jako jsou ty na povrchu bakterií. [8, 9]

Chitosan vykazuje citlivost na pH, což bylo dokázáno například studií provedenou Shu et al. (2001) zkoumající filmy citrát/chitosan. Bobtnání filmů bylo nejvyšší při pH 5,5 a 6,5 (2,45–2,50x) kvůli významné elektrostatické přitažlivosti mezi citrátem a chitosanem, což je znázorněno na Obrázku 3. [10]



Obrázek 3: Závislost bobtnacího poměru na pH prostředí [10]

Snížení pH oslabilo iontové vazby a tím usnadnilo bobtnání filmu (bobtnací poměr 2,83 při pH 4,5). Když bylo pH nižší než 4,5, film citrátu/chitosanu nabobtnal ještě výrazněji a disocioval se během 24 hodin, jelikož v této oblasti pH nebylo pozorováno žádné iontové zesítnění. [10]

Chemické a fyzikální vlastnosti chitosanu se mohou výrazně lišit v závislosti na stupni deacetylace a jeho molekulové hmotnosti. [9, 11] Nejčastěji studované jsou jeho chemické, fyzikální, mechanické a antimikrobiální vlastnosti.

1.2.1 Chitosan v kosmetice

Chitosan lze nalézt ve složení řady vlasových produktů, jako jsou šampony, oplachy, prostředky pro trvalou ondulaci, vlasová barviva, stylingové vody, laky na vlasy a vlasová tonika. Chitosan a jeho kationtové deriváty mají schopnost interagovat s keratinem obsaženým ve vlasech a vytvářet průhledné, elastické filmy na vlasových vláknech. Tyto filmy zlepšují měkkost a pevnost vlasů a zabraňují jejich poškození, vedou ke zvýšení tloušťky vlasů a ke zlepšení mechanických vlastností a celkového vzhledu. [6, 12]

Lze jej použít i v péči o ústní dutinu zaměřené na prevenci (zubní pasty, ústní vody), jejímž cílem je předcházet onemocněním zubů a dásní. Zubní kaz vzniká procesem fermentace sacharidů v důsledku metabolismu bakterií. Dochází při něm ke vzniku silných organických kyselin, jako jsou laktát, formiát a pyruvát, které způsobují demineralizaci povrchu zubu. Díky svému pKa, které se u chitosanu pohybuje v rozmezí 5,1 až 6,5 (v závislosti na M_w chitosanu a stupni deacetylace), plní chitosan funkci pufovací látky bránící vzniku zubního plaku. [6, 12]

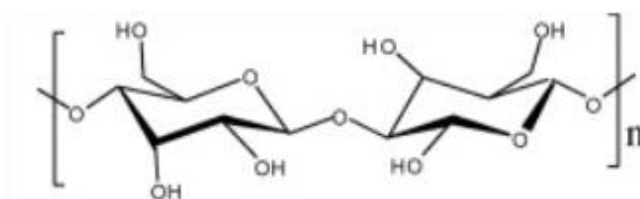
Chitosany a jejich deriváty nesou kladný elektrický náboj a mají relativně vysokou molekulovou hmotnost, díky které k pokožce dobře přilnou a dlouho se na ní udrží, tudíž mohou fungovat jako zvlhčovač pokožky. Například aplikace rozpustného derivátu chitosanu, karboxymethylchitosanu (CMCS) se v kosmetice dělí do pěti hlavních oblastí: jako činidlo pro absorpci a zadržování vlhkosti, antimikrobiální činidlo, antioxidační činidlo, přenašeč aktivních látek a stabilizátor emulzí. 0,25% vodný roztok CMCS byl z hlediska schopnosti zadržovat vlhkost srovnatelný s 20% vodným roztokem propylenglykolu a viskozita byla téměř stejná jako u kyseliny hyaluronové (HA), sloučeniny známé pro svoji vynikající schopnost zadržovat vlhkost. V poslední době jsou chitosany a jejich deriváty podrobněji zkoumány pro jejich využití jakožto aplikačního systému pro léčiva a kosmetiku.

Mezi výhody zapouzdření účinných látek v polymerní matrici patří jejich ochrana před okolním prostředím a možnost řízeného uvolňování. Chitosan může být použit také jako stabilizátor emulze. Přítomnost chitosanu během tvorby emulzí olej ve vodě vede ke zvýšení stability kyselých (pH 3) emulzí obsahujících izoláty syrovátkové bílkoviny. Tento účinek byl potvrzen zvýšenou viskozitou, stabilitou krémování a menší tvorbou kapiček v emulzích. [13]

1.3 Celulóza

Celulóza je v přírodě nejrozšířenější makromolekulární polysacharid. Ve formě celulózy se nachází asi 50 % uhlíku v rostlinách. Tvoří například 40-45 % sušiny ve dřevě, obsah v bavlně dokonce přesahuje 90 %. Tím se bavlna stává výborným zdrojem celulózy používané např. k výrobě filtrů z mikrovláken. Obvykle se celulóza vyskytuje ve směsi s hemicelulózou a ligninem.[14]

Celulóza se skládá z jednotek β -D-glukózy navzájem spojených β -1,4-glykosidickými vazbami. Celulóza tedy obsahuje tři prvky: uhlík, vodík a kyslík, a strukturu její jednotky lze sumárně vyjádřit jako $C_6H_{10}O_5$. Chemická struktura je znázorněna na Obrázku 4. Jelikož se jedná o makromolekulární polysacharid, celulóza se často označuje jako $(C_6H_{10}O_5)_n$, kde n značí stupeň polymerace. Hodnota n pro dřevité vlákno se pohybuje v závislosti na jeho druhu mezi 6 000 až 8 000, pro bavlněné vlákno je zhruba 14 000.[14]



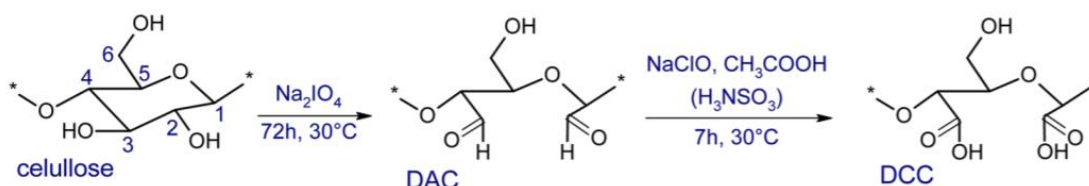
Obrázek 4: Chemický vzorec celulózy [15]

Analýzou struktury celulózy pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) byly identifikovány různé formy celulózy. Celulóza dělí na bakteriální celulózu, mikrofibrilovanou celulózu, mikrokrystalickou celulózu, síťovanou celulózu, nanokrystalickou celulózu a jim odpovídající komplexy.[14]

1.3.1 Dialdehyd celulózy

Pro praktické využití celulózy je v některých případech třeba pozměnit její vlastnosti. Toho lze dosáhnout například její oxidací a následnou solubilizací. Solubilizace je proces, při kterém se mění délka řetězce a zvyšuje rozpustnost ve vodě. K přeměně celulózy na dialdehyd dochází při oxidaci hydroxylových skupin na C2 a C3 pomocí jodistanu sodného (NaIO_4) na dvojici aldehydových skupin, při čemž se současně štěpí vazba C2-C3 anhydroglukopyranosidového cyklu. Celulóza je smíchána s jodistanem sodným (NaIO_4) v poměru 1:1,2 a ponechána reagovat v temnu po dobu 72 hodin při teplotě 30 °C. Výsledným produktem je dialdehyd celulózy (DAC) se stupněm oxidace vyšším než 95 %. Přebytečný NaIO_4 je následně neutralizován přidávkem ethylen glykolu, čímž dojde k ukončení reakce. [16]

Výhodou aldehydových skupin v DAC je jejich vysoká reaktivita. Díky tomu mohou být přeměněny na jiné funkční skupiny (například primární alkoholy, karboxyláty nebo iminy). Například další oxidací DAC lze připravit dikarboxycelulózu (DCC). Tuto reakci znázorňuje Obrázek 5.[16]



Obrázek 5: Schéma přípravy DCC [16]

DCC je netoxický a dobře rozpustný materiál s dobře definovaným složením, vhodný k použití v biologických aplikacích. Přidáním kyseliny amidosulfonové do reakční směsi lze ovlivnit jeho molekulovou hmotnost. DCC obsahuje dvě karboxylové skupiny na každou oxidovanou monomerní jednotku a je schopen tvořit cheláty, např. s protinádorovými léčivy jako je cisplatina. V případě konjugátů cisplatina-DCC současně nabízí velmi vysokou účinnost vázání (90–98 %) a vysokou přenosovou kapacitu. Tyto konjugáty zůstávají dobře rozpustné ve vodném prostředí, aniž by docházelo k uvolňování navázaného léčiva. Rychlost uvolňování léčiv lze ovlivnit modifikací molekulové hmotnosti nosiče a změnou pH prostředí; při pH 5,5 je 2x rychlejší než při pH 7,4, což v praxi umožňuje využít kyselou povahu okolí nádorů. [16]

DAC lze také využít jako síťovací činidlo pro přípravu hydrogelů. Pojem síťování znamená vytvoření vazeb mezi molekulami polymerů. Propojení polymerních řetězců vede ke vzniku dlouhých větvených sítí. Se zvětšující se složitostí celé sítě vzniká i četné množství uzlů mezi jednotlivými polymery. Vyšší počet uzlů přispívá k nižší rozpustnosti celé sítě a ke vzniku hydrogelu. O pevnosti a charakteru vznikajícího materiálu rozhoduje i podnět, který vedl k zesílení jednotlivých polymerů.[17]

2 HYDROGELY

Hydrogely jsou trojrozměrné zesíťované struktury skládající se z hydrofilních polymerních systémů. Hydrogely bobtnají v důsledku absorpce velkého množství vody či jiného rozpouštědla, což z nich činí cenné materiály pro různá využití. Hydrogelová struktura obsahuje vazby mezi polymerními strukturami, kterých lze dosáhnout pomocí metod zesíťení, jako je fyzikální metoda, chemická metoda, enzymatická metoda, vysokoenergetické ozáření, fotochemická reakce a roubování.[18]

Hydrogely jsou prakticky aplikovány v různých odvětvích, jako jsou masky v kosmetice, analgetické náplasti, zavlažovače půdy, prostředky zabraňující rosení a regulátory vlhkosti, potravinářské konzervanty, zahušťovadla, farmaceutické nosiče aktivních látek, skafoldy ve tkáňovém inženýrství nebo v medicíně jako šetrné krytí na otevřené rány. [19]

První zesíťovaný HEMA hydrogel byl syntetizován v roce 1960 Ottou Wichterlem a Drahoslavem Límem. Jeho vysoká hydrofilita a biokompatibilita umožnila velké množství praktických aplikací. Už po několika desetiletích se tento materiál široce používá ve formě kontaktních čoček. Později byly u hydrogelů pocházejících z přírodních polymerů (kolagenu a žraločí chrupavky) zkoumány možnosti jejich aplikace jako sterilního krytí na popáleniny. S rychlým rozvojem tkáňového inženýrství byly hydrogely použity jako matrice pro buněčný růst a nosič růstových faktorů vedoucích k regeneraci tkání. [19]

2.1 Hydrogely v kosmetice

V kosmetickém odvětví se hydrogely aplikují především lokálně (na kůži nebo vlasy) a používají se také v péči o ústní dutinu. Hydrogely používané v kosmetických přípravcích mohou být založeny na různých biopolymerech, například kolagen, želatina, kyselina hyaluronová, alginát, chitosan, xantanová guma, pektin, škrob, celulóza a její deriváty. Hydrogely na bázi biopolymerů se používají k vývoji nových kosmetických produktů, jako jsou třeba zkrášlovací masky. [6]

2.2 Klasifikace

Hydrogely se lze klasifikovat podle různých hledisek, např. podle jejich původu na přírodní a syntetické.

Přírodní polymery, jako je kolagen, želatina, kyselina hyaluronová, fibrin, alginát sodný, chitosan, dextran nebo cyklodextrin pocházejí z přírodních zdrojů a vyznačují se dobrou

biokompatibilitou a biologickou odbouratelností. Hydrogely připravené na bázi těchto polymerů taktéž přejímají jejich vlastnosti.[19, 20]

Syntetické hydrogely jsou zesíťované polymery vzniklé adiční reakcí nebo polymerací s otevřením kruhu za uměle vytvořených podmínek. Jako základ pro přípravu syntetických hydrogelů se obvykle používají kyselina polyakrylová a její deriváty, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a jeho kopolymery nebo polyvinylpyrrolidon. Syntetické hydrogely mají výhodu ve snadné průmyslové výrobě a lze u nich přesněji modifikovat jejich vlastnosti. Ve srovnání s přírodními polymerními hydrogely však mohou mít špatnou biokompatibilitu, bioaktivitu a biologickou rozložitelnost.[19, 20]

Na základě mechanismu tvorby trojrozměrné síťové struktury lze hydrogely rozdělit na chemické a fyzikální.

Chemické hydrogely vznikají chemickým zesíťováním mezi molekulami a toto zesíťování je nevratné. Tyto hydrogely obvykle vykazují výbornou stabilitu a mají dobré mechanické vlastnosti.[19]

Fyzikální hydrogely jsou především trojrozměrné sítě tvořené nekovalentními vazbami, jako je elektrostatická interakce, vodíková vazba, zapletení řetězců a hydrofobní interakce mezi lineárními molekulami. Fyzikální hydrogely obvykle vykazují reverzibilní konverzi sol/gel, protože k přerušení fyzikálních interakcí mezi molekulami není potřeba velké množství energie. Při jejich přípravě nedochází k žádné chemické reakci.[19]

Dalším kritériem rozdělení může být rozložitelnost, tudíž lze rozlišovat mezi biodegradabilním a nebiodegradabilním hydrogelem.[19]

Většina přírodních polymerních hydrogelů je biodegradabilní. Trojrozměrné struktury těchto hydrogelů tak mohou být porušeny a následně zanikat za přirozených podmínek působením mikroorganismů a enzymů. Vazba mezi jednotlivými řetězci a uvnitř molekulárních řetězců je pak přerušena a pevnost hydrogelu se postupně snižuje. Nakonec je hydrogel rozložen na malé molekuly.[19]

Biologicky neodbouratelné jsou takové hydrogely, které nevykazují citlivost na environmentální podněty a mohou si po dlouhou dobu zachovat stabilní strukturní, fyzikální a chemické vlastnosti. Mezi biologicky nerozložitelné hydrogely se řadí většina syntetických hydrogelů připravených chemickým síťováním.[19]

Na základě jejich citlivosti na vnější podněty lze hydrogely rozdělit na hydrogely „chytré“ (reagující na okolní prostředí) a běžné (na prostředí nereagující).[19, 20]

Hydrogely reagující na okolní prostředí, označované také jako „chytré“, mohou reverzibilně reagovat na vnější podněty. Když je hydrogel vystaven změnám okolního prostředí, jako je teplota, pH, iontová síla, světlo, tlak, elektrické nebo magnetické pole, změní se jeho trojrozměrná síťová struktura. Bobtná nebo se smršťuje, mění svůj tvar nebo své mechanické a optické vlastnosti v reakci na okolní podněty. Hydrogel se automaticky vrátí do nižšího ustáleného stavu vnitřní energie, jakmile tyto podněty zmizí. Například hydrogely citlivé na teplo jsou typem hydrogelu, který vykazuje teplotně indukované zmenšování nebo zvětšování objemu. Termocitlivý hydrogel ve své síti obsahuje jak hydrofilní, tak hydrofobní funkční skupiny v určitém poměru. Při nízkých teplotách tvoří hydrofilní skupiny na polymerním řetězci vodíkové vazby s molekulami vody. Interakce polymeru s vodou je silnější než interakce polymer-polymer. Jak se teplota zvyšuje, vodíková vazba mezi polymerem a vodou se postupně oslabuje. U řady polymerních materiálů je tako zlomová teplota blízká teplotě těla (37 °C), proto mají tyto materiály potenciál v oblasti medicíny pro řízené dodávání léčiv.[19–21]

Hydrogely nereagující na okolní prostředí jsou pro svoji stabilní strukturu a fyzikální a chemické vlastnosti za různých podmínek prostředí vhodné pro některé speciální aplikace. Například agaróza je vysoce hydrofilní, biologicky odbouratelná a nenesé téměř žádný náboj. Jako hydrogel je zředěna adsorbována citlivými biomakromolekulami, proto se často používá jako podpůrná matrice pro imunoelektroforézu, což je typ laboratorního testu používaného k identifikaci určitých proteinových molekul produkovaných imunitním systémem). [19]

2.3 Struktura hydrogelů

V závislosti na způsobu přípravy, iontovém náboji nebo fyzikálních vlastnostech, hydrogely mohou být rozděleny do několika kategorií s ohledem na jejich strukturu. Na základě způsobu přípravy se může jednat o hydrogely homopolymerní, kopolymerní, multipolymerní nebo interpenetrující polymerní hydrogely. [22]

Homopolymerní hydrogely jsou zesíťované sítě jednoho typu hydrofilní monomerní jednotky, zatímco kopolymerní hydrogely vznikají zesíťováním dvou komonomerních

jednotek, z nichž alespoň jedna musí být hydrofilní, aby byly bobtnatelné. Multipolymerní hydrogely se vyrábějí ze tří nebo více komonomerů, které spolu reagují. Interpenetrující hydrogely obsahují dvě různé polymerní sítě, přičemž se první připravená síť nechá nabobtnat v roztoku dalšího monomeru. Ten reaguje a vytváří druhou prolínající se síťovou strukturu.[22]

Na základě jejich iontových nábojů mohou být hydrogely rozděleny na neutrální, aniontové, kationtové nebo amfolytické. Na základě fyzikálních strukturních rysů systému je lze klasifikovat jako amorfní, semikrystalické, vodíkově vázané nebo komplexní struktury. V amorfních hydrogelech jsou makromolekulární řetězce uspořádány náhodně. Semikrystalické hydrogely se vyznačují hustými oblastmi uspořádaných makromolekulárních řetězců, kde vodíkové vazby vedou k vytvoření trojrozměrné struktury. Strukturální hodnocení hydrogelů ovšem ukazuje, že jen zřídka jsou pozorovány ideální sítě.[22]

Řetězce hydrogelu jsou vzájemně spojeny pomocí spojovacích bodů. Jako tyto body mohou fungovat třeba atomy uhlíku, obvykle se však jedná o chemické můstky, jako je například acetalový můstek v případě zesíťovaného poly(vinylalkoholu). Jindy může být spojení makromolekulárních řetězců způsobeno vodíkovými můstky a van der Waalsovými silami, jako je tomu v případě struktury glykoproteinové sítě tělesného hlenu. Síťová struktura může zahrnovat také další spojení, která mohou být buď jednoduchými spleťenci trvalé nebo semipermanentní povahy, nebo uspořádanými řetězci tvořícími krystaly.[22]

2.4 Syntéza hydrogelů

Hydrogely lze připravit různými způsoby, například chemickým síťováním, fyzikálním síťováním, síťováním způsobeném UV zářením nebo polymeračním roubováním. Řízenou polymerací je možné připravit hydrogely s různým složením, velikostí, tvarem a morfologií.[23]

2.4.1 Fyzikální síťování

Hlavní výhodou přípravy fyzikálních gelů spočívá v tom, že k jejich zesíťování není potřeba síťovací činidlo, čímž tedy odpadá nutnost jej po zreagování vymývat. Hydrogely s fyzikální sítí je možné připravit například opakovaným chlazením a zahříváním polymerního roztoku, pomocí vodíkových vazeb, iontovou interakcí nebo agregací za vyšších teplot. Hydrogely s fyzikální sítí mívají ve srovnání s hydrogely s kovalentními vazbami křehčí strukturu,

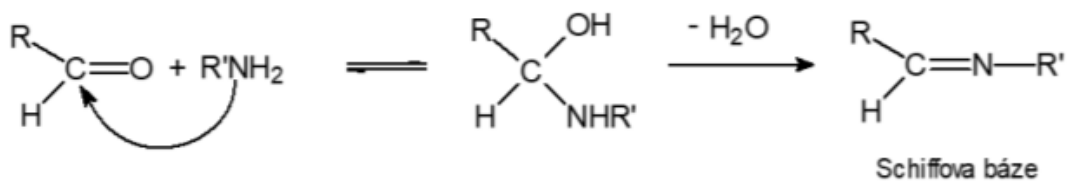
nicméně přítomnost vodíkových vazeb anebo iontových interakcí vede k dostatečné stabilitě systému.[23–25]

2.4.2 Chemické síťování

Mezi hlavní způsoby chemického síťování se řadí metoda roubování monomerů a použití síťovacího činidla za účelem propojení dvou řetězců polymeru. Chemické síťování znamená vytváření kovalentních vazeb mezi vícero řetězci polymeru a síťovacím činidlem nebo krátkými řetězci roubovaného polymeru. Polymerní řetězce lze propojit se síťovacími činidly reakcí na funkčních skupinách (hydroxylových, karboxylových a aminových). Reakci polymerů s vhodnými bi- nebo polyfunkčními sloučeninami obvykle stačí spustit zahřátím na vyšší teplotu, případně přidávkem katalyzátoru.[23–25]

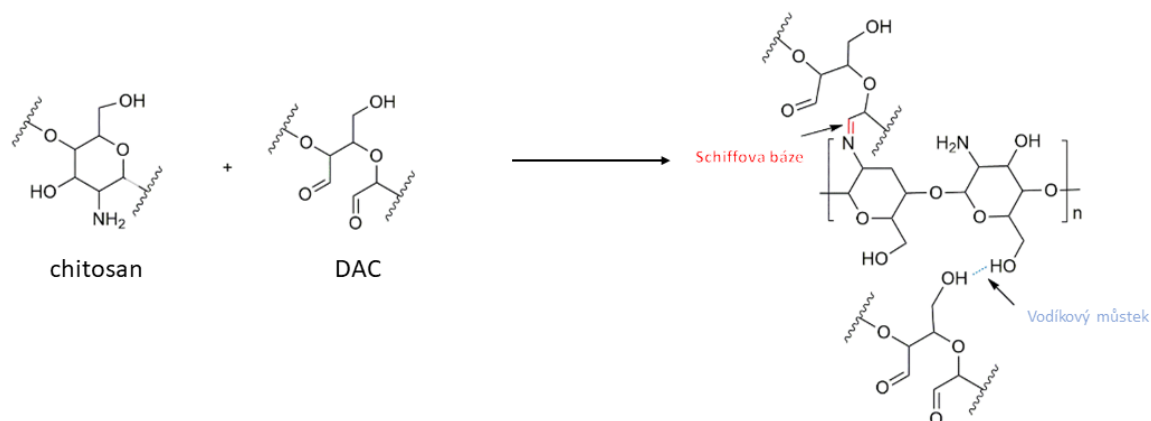
2.4.3 Metoda Schiffových bází

Metoda Schiffových bází se zakládá na reakci mezi chitosanem obsahujícím aminovou a aldehydickou funkční skupinou v DAC. Tato reakce je obecně znázorněna na Obrázku 6. [25, 26]



Obrázek 6: Schématické znázornění vzniku Schiffovy báze

Schiffova báze vznikne navázáním dusíku aminové složky na chirální uhlík karbonylové skupiny a následnou eliminací vody, čímž dojde ke vzniku vazby C=N. Tento typ reakce se běžně vyskytuje u některých biochemických enzymatických reakcí.[25, 26] Tento způsob síťování nevyžaduje příliš náročné podmínky reakce a lze jej tedy využít při práci s živými buňkami či jiným materiálem citlivým na okolní prostředí.[25, 27] Tato reakci probíhá také mezi DAC a chitosanem, čehož je využíváno také v této práci. Schéma této reakce je na Obrázku 7. Vzniklé hydrogely jsou síťovány kromě Schiffových bází také pomocí slabých interakcí, např. vodíkových můstků.



Obrázek 7: Znázornění vzniku Schiffovy báze u reakce chitosanu a DAC [26]

2.5 Parametry sítě

Schopnost hydrogelů zadržet vodu je způsobena přítomností hydrofilních skupin v polymerních řetězcích. Množství navázané vody se pohybuje do několika násobku až do tisícínásobku hmotnosti suchého hydrogelu. V závislosti na chemické struktuře polymeru, jeho typu, stupně zesítnění a kompatibility, se liší způsob samotného bobtnání.[28]

Bobtnání je jednou z vlastností hydrogelů, která závisí na parametrech hydrogelní sítě. Nejdůležitější parametry se získají za pomoci následujících rovnic[29]:

- 1) Procentuální zbobtnání

$$\text{Procentuální zbobtnání (\%)} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

Kde:

m_t = hmotnost zbobtnalého hydrogelu v čase t , m_0 = počáteční hmotnost vypraného a vysušeného hydrogelu

- 2) Obsah vody v rovnovážném stavu zbobtnání (equilibrium water content, EWC)

$$\text{EWC (\%)} = \frac{m_s - m_0}{m_s} \times 100 \quad (2)$$

Kde:

EWC = maximální množství vody absorbované hydrogelem (%), m_s = hmotnost hydrogelu zbobtnaného za laboratorních podmínek, m_0 = hmotnost vypraného a vysušeného hydrogelu

3) Gelová frakce

$$\text{Gelová frakce (\%)} = \frac{m_0}{m_{int}} \times 100 \quad (3)$$

Kde:

m_0 = hmotnost vysušeného a vypraného hydrogelu, m_{int} = hmotnost suchého, nevypraného hydrogelu

Gelová frakce je tedy definována jako hmotnostní poměr vysušeného zesíťovaného materiálu k hmotnostnímu poměru polymeru před promytím.[30]

2.6 Metody studia hydrogelů

2.6.1 Viskoelastické vlastnosti

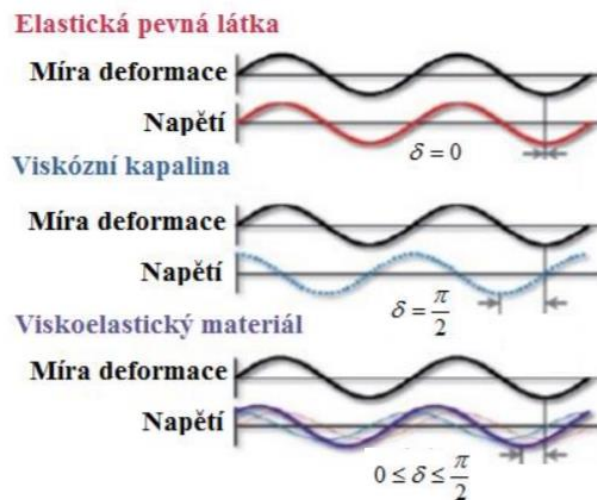
Viskoelastické látky se mohou za určitých podmínek chovat jako vazké kapaliny, za jiných podmínek jako pružná tělesa. Poté, co je ukončeno jejich namáhání, se částečně vrátí do původního stavu. Pro viskoelastické materiály existuje časová a teplotní závislost napětí a deformace na použitém tlaku, která ale nemusí být lineární, jako bývá u viskózních materiálů, nebo konstantní jako u materiálů elastických. [31]

V současnosti je k dispozici řada metod pro charakterizaci mechanických vlastností hydrogelových konstrukcí. Zkouška tahem neboli extenzometrie je jednou z nejběžnějších metod mechanické charakterizace. Zahrnuje deformaci materiálu při konstantní rychlosti prodloužení a zaznamenávání síly potřebné k udržení této rychlosti prodloužení. Síla a prodloužení materiálu se používají k získání grafu napětí versus deformace, ze kterého lze odvodit několik mechanických parametrů, jako je Youngův modul, mez kluzu a mez pevnosti v tahu. [31]

Další metodou je neomezený kompresní test, který zahrnuje stlačení hydrogelu mezi dvěma deskami. Síla potřebná ke stlačení hydrogelu a velikost deformace se použijí k odvození grafu napětí versus deformace, ze kterého lze určit modul v tlaku a pevnost v tlaku. Ke stanovení mechanických vlastností hydrogelů lze také použít omezený tlakový test. Liší se

od neomezených kompresních testů v tom, že je hydrogel uzavřen v komoře, což zabraňuje bočním deformacím vzorků při jejich stlačování. [31]

Pro stanovení viskoelastických vlastností materiálů se také využívá oscilačních testů. Vzorek se umístí mezi stacionární část reometru a horní senzor, který při testech osciluje. Během těchto testů je pozorována odezva ve formě napětí způsobeného mírou deformace při oscilaci rotoru. Sledováním časové odezvy napětí je pak určen charakter látky. Je-li míra deformace ve stejné fázi jako odezva materiálu, jedná se o dokonale pružná tělesa. U ideálních kapalin je tato odezva posunuta o $\pi/2$. Viskoelastický materiál má vlastnosti jak pružného tělesa, tak i kapaliny. Fázový posun se tedy pohybuje mezi hodnotou 0 a $\pi/2$ (Obrázek 8).[32, 33]



Obrázek 8: Napět'ová odezva pro různé materiály[33]

Chování viskoelastických materiálů lze popsat následujícími rovnicemi:

$$\sigma = \sigma_0 x \cos(\omega x t + \delta) \quad (8)$$

$$\varepsilon = \varepsilon_0 x \cos(\omega x t) \quad (9)$$

Kde:

σ = napětí, σ_0 = amplituda napětí, $\varepsilon(t)$ = poměrná deformace v čase, ε_0 = poměrná deformace, t = čas, ω = kruhová frekvence, δ = fázový posun

Měřením lze získat následující veličiny:

$$G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta \quad (10)$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta \quad (11)$$

$$G^* = G' + i \times G'' \quad (12)$$

Kde:

G' = elastický modul udávající schopnost materiálu vrátit se do původního stavu

G'' = ztrátový modul udávající schopnost látky k tečení a tlumící vlastnosti materiálů

G^* = komplexní modul pružnosti

Časovou závislost napětí během harmonického namáhání viskoelastických materiálů lze dále vyjádřit jako:

$$\sigma = G' \times \varepsilon_0 \times \cos(\omega t) + G'' \times \varepsilon_0 \times \cos(\omega t + \frac{\pi}{2}) \quad (13)$$

Dalším testem je oscilační test s malou amplitudou. Při tomto testu senzor osciluje s danou frekvencí, která se postupně zvyšuje od nejmenší po největší hodnotu za konstantní amplitudy deformace. Zaznamenává se závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilace.[32]

$$\text{tg} \delta = \frac{G''}{G'} \quad (14)$$

Kde:

$\text{tg} \delta$ = ztrátový úhel, činitel vnitřního tlumení

Pokud je výsledný ztrátový úhel větší než 1 ($G' < G''$), lze vzorek označit za viskózní s tendencí k tečení. Pokud však je podíl modulů menší než 1 ($G' > G''$), materiál vykazuje převážně elastické vlastnosti, jedná se tedy o tuhou, vysoce strukturovanou látku. Reologické vlastnosti lze odvodit z deformace sledovaného vzorku pomocí reometru.[32]

2.6.2 Morfologie

Morfologie hydrogelů popisuje jejich strukturu a povrchové charakteristiky, jako je přítomnost pórů, jejich tvar a velikost. Zobrazovací techniky se řadí mezi přímé metody strukturní analýzy, kdy přímo zobrazí u analyzovaného vzorku jeho vnitřní strukturu. Rozlišení závisí na zvolené technice. Patří sem například optická mikroskopie, BET analýza či skenovací elektronová mikroskopie (SEM).[34]

2.6.3 BET analýza

Model BET se zakládá na kinetickém modelu adsorpčního procesu. Poprvé byl popsán Irwingem Langmuirem v roce 1916. V roce 1938 rozšířili Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett a Edward Teller tuto teorii do vícevrstvé adsorpční teorie. Tato metoda je oproti Langmuirově izotermě reálnější a zároveň je také základem standardního způsobu vyhodnocování specifického povrchu látek. [34, 35]

Tato metoda je založena na absorpci plynu na povrchu pevného materiálu, který byl předem odplyněný, a sledováním absorbovaného množství plynu za různého tlaku. V průběhu času je zaznamenávána adsorpční izoterma popisující závislost adsorbovaného množství plynu na změně tlaku za konstantní teploty. Jako plyn se nejčastěji používá dusík.[35]

Principem BET analýzy je předpoklad, že přilnutí plynu na povrch uvolní adsorpční teplo. Každá následující vrstva molekul plynu, která dosedne na vrstvu předchozí, vyvolá interakci molekula-molekula a uvolní se tak kondenzační teplo. Brunauer, Emmett a Teller navrhli rovnici izotermy, která vypadá následovně:[34]

$$\frac{\rho}{a(\rho_0 - \rho)} = \frac{1}{a_{\max} \times c} + \frac{c-1}{a_{\max} \times c} \times \frac{\rho}{\rho_0} \quad (15)$$

Kde:

ρ = rovnovážný tlak (Pa), ρ_0 = saturační tlak (Pa), a = absorbované množství molekul za dané teploty a tlaku (mol/g), a_{\max} = absorbované množství plynu po vytvoření monovrstvy (mol/g), c = BET konstanta

2.6.4 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Elektronová mikroskopie narozdíl od mikroskopie optické využívá namísto světla paprsek urychlených elektronů. Tyto elektrony nesou velké množství kinetické energie. Ta je následně rozptýlena do různých forem vznikajících interakcí elektron-vzorek, jako jsou teplo, elektrony zpětného odrazu s vysokou energií, emise nízkoenergetických sekundárních elektronů, emise světla nebo rentgenové emise. Výsledný obraz elektronové mikroskopie zaznamenává měnící se intenzitu těchto signálů v poloze odpovídající poloze paprsku na vzorku. Sekundární elektrony a zpětně rozptýlené elektrony se pro zobrazování vzorků používají běžně. Sekundární elektrony zobrazují morfologii a topografii vzorků, zpětně rozptýlené elektrony ilustrují kontrast ve vícefázových vzorcích. [36]

Analýza SEM se řadí mezi "nedestruktivní", což znamená, že při rentgenovým zářením generované interakcemi elektronů nedochází ke ztrátě objemu vzorku. Tudíž je možné analyzovat stejné materiály opakovaně. Zvětšení v rámci této metody může být až 500 000krát. Před analýzou jsou vzorky obvykle lyofilizovány, upraveny kryofrací nebo fixovány v pryskyřici. V případě, že je vzorek elektricky nevodivý, je nejprve nutné jej pokovit. [36]

2.6.5 Uvolňování látek z hydrogelu

Jednou z hlavních výhod hydrogelů používaných při lokální léčbě kožních onemocnění je snadná aplikace a výrazná minimalizace nežádoucích účinků ve srovnání s perorálním nebo intravenózním použitím. Aplikace terapeutických sloučenin začleněných do hydrogelové struktury přímo na kůži také chrání tyto sloučeniny proti působení jaterních enzymů a first-pass efektu v játrech. Při transdermálním podání léčivo zpočátku proniká *stratum corneum*, poté hlubší epidermis, dokud nedosáhne dermis. Po dosažení dermální vrstvy může být absorbován do systémové cirkulace dermální mikrocirkulací. Je však třeba poznamenat, že lokální dodávání léčiva závisí na mnoha faktorech, včetně vlastností kožní bariéry a také fyzikálně-chemických vlastností zabudované terapeutické sloučeniny a jejího nosiče. [37]

Aktivní látky mohou pronikat kůží dvěma cestami: transepidermální a transappendageální. První se zaměřuje na průchod molekul *stratum corneum*, které se skládá z mnoha vrstev velkých, polyedrických a bezjaderných buněk. Intracelulární penetrace může probíhat cestou korneocytů, které umožňují především transport látek s hydrofilními nebo polárními vlastnostmi, nebo mezibuněčnými prostory, které umožňují difúzi lipofilních nebo nepolárních látek přes lipidovou matici. Druhá cesta, transappendageální, zahrnuje průchod látek přes vlasové folikuly a přes potní žlázy. Lokální aplikace tedy může vést k uvolnění léčiva do kůže a do systémového oběhu prostřednictvím perkutánní absorpce včetně průchodu topicky aplikovaných molekul na kůži, perkutánní penetrace, během níž se sloučeniny pohybují z povrchu *stratum corneum* z kůže do systémové cirkulace a pronikání chemických sloučenin kůží difúzí nebo póry. [37]

Uvolňování aktivních látek z hydrogelu lze sledovat pomocí analýzy rozpouštědla, do kterého byl hydrogel vložen. Tuto analýzu lze provést například pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Spektra ve viditelné (VIS) a ultrafialové (UV) oblasti jsou způsobena přechodem elektronů mezi různými elektronovými stavy molekul. Pokud molekula přijme takové množství energie, které odpovídá rozdílu mezi základním a excitovaným stavem,

přejde elektron z obsazeného orbitalu v základním stavu na některý neobsazený orbital. Potřebnou energii lze dodat elektromagnetickým zářením. Princip měření je podobný klasické IR spektroskopii. Zdrojem světla bývají obvykle dvě různé lampy. První deuteriová výbojka emituje záření o vlnové délce v rozsahu 200–330 nm, zatímco druhá produkuje bílé (viditelné) světlo v rozsahu 330–700 nm. Světelný paprsek následně prochází vhodným monochromátorem a poté je rozpůlen na paprsek referenční a měřicí. Měří se množství energie záření pohlcené při průchodu paprsku vzorkem. Nakonec je intenzita obou paprsků porovnávána v detektoru. Změny oproti plynule se měnící vlnové délce tvoří výsledný záznam UV-VIS spektra. Závislost absorbance na koncentraci a tloušťce kyvety lze popsat rovnicí odvozenou z Lambertova-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \times c \times d \quad (16)$$

Kde:

A = absorbance, ε = molární absorpční koeficient ($\text{dm}^3/(\text{mol} \times \text{cm})$), c = látková koncentrace (mol/dm^3), d = délka kyvety (cm).[38]

Příklady bioaktivních látek, které lze také z hydrogelů uvolnit a které jsou používány v kosmetice jsou shrnuty v další kapitole.

3 BIOAKTIVNÍ LÁTKY V KOSMETICE

3.1 Vitaminy

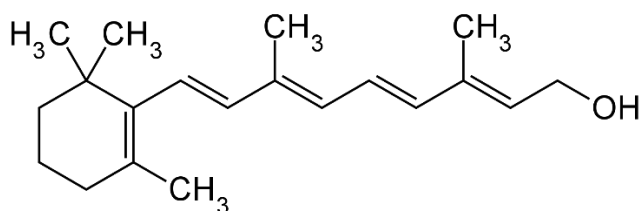
Vitaminy jsou skupinou heterogenních organických sloučenin, které jsou součástí velkého množství biochemických procesů uvnitř těla. Mnoho kosmetických značek do svých přípravků vitaminy přidává, aby zlepšily různé estetické vlastnosti, jako je úprava, bělení a ochrana pokožky. Aby bylo možné vitaminy do kosmetických přípravků přidat, měly by být ve vysoké čistotě. K jejímu dosažení je spíše než extrakce z rostlinných zdrojů výhodnější proces fermentace. Hlavní skupinou vitaminů používaných v kosmetice jsou vitamin A a jeho deriváty, vitamin C, vitamin E, vitamin B₂, vitamin B₃ a vitamin B₅. [3]

V lidském těle vitaminy působí jako antioxidanty, tedy lapače volných radikálů. Volné radikály jsou částice, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Jsou velmi nestálé, reaktivní a vyhledávají další elektron, se kterým tvoří nový pár. Jejich negativní účinek na lidský organismus spočívá ve schopnosti vázat se na elektrony tělesných buněk a tím zapříčinit jejich následné zničení.[39]

Antioxidanty jsou chemické látky, které napomáhají tvořit méně reaktivní radikály, případně významně snižují počet volných radikálů. Obě tyto akce účinně zpomalují nebo plně inhibují oxidační reakci. Působí i proti vzniku civilizačních onemocnění. Vědecké studie dokazují, že pravidelným a vyváženým příjmem antioxidantních látek lze oddálit vznik těchto onemocnění, jako jsou nemoci srdce, oběhové soustavy a rakovina.[40]

3.1.1 Vitamin A

Pojem vitamin A zahrnuje retinol, retinal a kyselinu retinovou. Vzniká z β -karotenu a některých jiných karotenoidů. Karoten se transportuje do jater, kde se metabolizuje na vitamin A.[41]



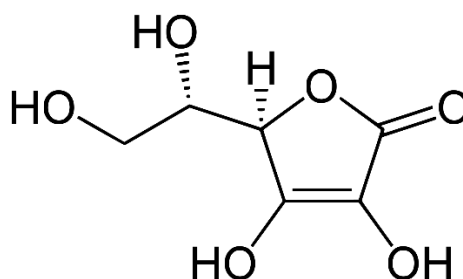
Obrázek 9: Chemická struktura vitamínu A

Vitamin A a jeho deriváty jsou široce používaná činidla pro úpravu stavu pokožky. Mohou regulovat buněčný růst a diferenciaci v kůži, normalizovat keratinizaci, redukovat vrásky a pomáhají udržovat pokožku hladkou a pružnou. Využívají se jako prostředek v boji proti akné, protože zrychlují obměnu kožních buněk, snižují sekreci kožního mazu a zabraňují ucpávání pórů. Aktivní formy vitamínu A používané v kosmetice jsou alkohol (retinol), estery (retinylpalmitát, retinylacetát), a aldehyd (retinal). Při aplikaci na kůži se všechny tyto formy přemění enzymatickým štěpením na tretinoin. Tretinoin se váže na DNA, reguluje genovou expresi, a tím řídí různé buněčné procesy. [3, 41]

Další formou vitamínu A používanou v kosmetice je β -karoten, účinné fotoochranné činidlo používané v kosmetických produktech. β -karoten je velmi oblíbený ve sluneční kosmetice (opalovací krémy) nebo samoopalovacích prostředcích. Zabraňuje fotohemolýze pomocí vychytávání volných radikálů a přeměňováním energie záření izomerizací cis-karotenoidu do formy trans-karotenoidu. Analýza in vivo Ramanovou spektroskopií ukázala, že topikálně aplikovaný karotenoid proniká hluboko do epidermis a zvyšuje antioxidační potenciál pokožky. Zhruba 15 % průmyslového β -karotenu je produkováno mikroorganismy, především houbami *Blakeslea trispora* a mikrořasami *Dunaliella salina*. [3]

3.1.2 Vitamin C

Vitamin C, neboli kyselina askorbová, je bezbarvá krystalická, ve vodě rozpustná pevná látka kyselé chuti bez zápachu. Je to organická kyselina a její soli se nazývají askorbáty. Lidé a některé jiné živočišné druhy si jej nedokážou sami syntetizovat, proto je nutno tento vitamin přijímat v potravě. Jeho nedostatek se může u lidí projevit jako kurděže. [42]



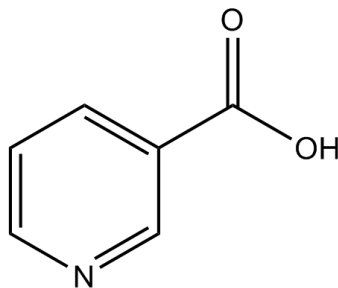
Obrázek 10: Chemická struktura vitamínu C

Důležitými funkcemi vitamínu C jsou jeho antioxidační účinky a fotoochranné působení vychytáváním volných radikálů indukovaných UV zářením. Má schopnost mírnit záněty, proto jej lze použít i na pokožku trpící přecitlivělostí na kosmetické výrobky. Dále je průmyslově využíván jako látka upravující pH a konzervant v pleťové kosmetice. Vitamin C hraje důležitou roli v biosyntéze kolagenu. Vnější aplikace vitamínu C udržují optimální hladinu kolagenu a posilují extracelulární matrix, jsou tedy účinnými složkami proti stárnutí v kosmetice. Vitamin C se běžně používá ve výrobcích pro bělení pokožky, a to kvůli jeho antimelanogenním vlastnostem, tedy schopnosti snižovat množství melaninu v kůži. [3]

Na průmyslové úrovni jsou nejčastější dva způsoby výroby vitamínu C. Prvním je Reichsteinův proces, kombinovaná chemická a mikrobiální metoda výroby kyseliny askorbové z D-glukózy, která využívá druhy *Gluconobacter*. Druhým je dvoustupňová fermentace s využitím vícera druhů *Gluconobacter*. Některé mikrořasy, například *Chlorella pyrenoidosa*, jsou schopny produkovat kyselinu L-askorbovou prostřednictvím jednostupňového procesu, zde je ale hlavní nevýhodou nízký výtěžek ve srovnání s obvykle používanými metodami. Alternativní metodou výroby jsou geneticky upravené mikroby, které využívají levné zdroje uhlíku a produkují vitamin C s vysokým výtěžkem. [3, 42]

3.1.3 Vitamin B₃

Vitamin B₃, jinak nazývaný niacin, zahrnuje kyselinu nikotinovou a její derivát nikotinamid (také známý jako niacinamid). Obě tyto formy se hojně vyskytují v přírodě, přičemž kyselina nikotinová je více rozšířená v rostlinách a nikotinamid u zvířat. Jako zdroj niacinu můžou být játra, drůbež, libové maso, ořechy a luštěniny. Mléko a listová zelenina jej obsahují v menším množství. Patří do skupiny vitaminů B, které jsou rozpustné ve vodě a v těle se neukládají. Niacin je nezbytně důležitý pro metabolismus buněk. Spolu s riboflavinem a thiaminem pomáhá udržovat zdravý nervový a trávicí systém. Ovlivňuje tělesný růst a podílí se na syntéze hormonů. [43]



Obrázek 11: Chemická struktura niacinu

Onemocnění způsobené nedostatkem niacinu a tryptofanu se nazývá pellagra. Mezi příznaky pellagry patří dermatóza, demence, průjem a nervové poruchy. Pellagra se ve vyspělých zemích vyskytuje jen zřídka a je spojována s příliš vysokým požíváním alkoholu. V jiných částech světa pellagra přetrvává.[43]

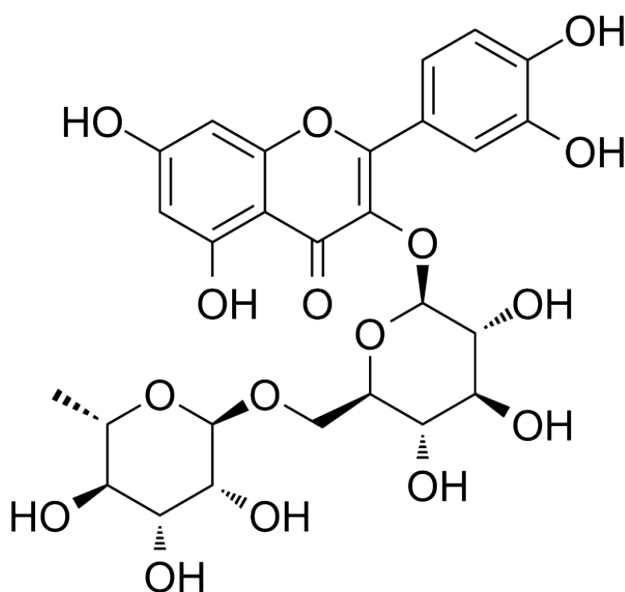
Mnohostranné uplatnění a účinky niacinamidu z něj dělají cennou ingredienci pro různé kosmetické produkty: niacinamid pomáhá normalizovat nerovnováhu koenzymů nikotinamidu ve zralé pleti. Zvyšuje biosyntézu ceramidů a také dalších lipidů ve *stratum corneum*, které jsou součástí kožní bariéry. Staré fibroblasty vylučují méně kolagenu než buňky mladé, proto má niacinamid, který urychluje buněčný metabolismus, taktéž vliv na lepší syntézu kolagenu. Další vlastnosti niacinamidu zahrnují urychlení diferenciac keratinocytů, pomáhá předcházet škodlivým molekulárním a imunologickým událostem vyvolaným UV zářením, snižuje hyperpigmentaci lidské kůže, reguluje množství kožního mazu a předchází tak vzniku akné a také chrání pokožku před photoagingem. [43]

3.2 Rostlinné složky

Biologicky aktivní látky obsažené v rostlinách se nazývají fytochemikálie. Většina fytochemikálií jsou látky s nízkou molekulovou hmotností, jinak také nazývané sekundární rostlinné metabolity. Nejsou sice pro přežití rostliny nezbytné, ale mají mnoho jiných funkcí, například ochranu před parazity nebo býložravci. Pojem „polyfenoly“ zahrnuje skupinu látek, které mají více než jednu fenolickou hydroxylovou skupinu vázanou na jeden nebo více benzenových jader. Mezi nejlepší zdroje fenolických antioxidantů lze označit čaj (*Camellia sinensis*), víno (*Vitis vinifera*), olivy, olejná semena (např. slunečnice, sezam), dub (*Quercus robur*), borovici (*Pinus maritime*) nebo skořici (*Cinnamomum zeylanicum*). V posledních desetiletích se mnoho bylin a přírodních sloučenin stále více těší veřejnému zájmu jako doplňky stravy a alternativní léky, v kosmetické oblasti mohou být výrobky obohacené o polyfenoly účinné v oblasti prevence a terapii předčasného stárnutí pleti vyvolaného oxidačním stresem. Prospěšnost polyfenolů spočívá především v antioxidační aktivitě, ochranou proti poškození kůže ultrafialovým (UV) zářením, inhibici dermálních proteináz, antimikrobiální aktivitě a antikarcinogenním účinku.[44, 45]

3.2.1 Rutin

Rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon-3-rhamnoglukosid, Obrázek 11) je flavonoid, známý taktéž jako vitamin P, který má původ v rostlinné říši. Hojně se vyskytuje v zelenině a ovoci, jako je cibule, rajčata nebo jablka. Rutin je syntetizován prostřednictvím metabolické dráhy fenyylpropanoidu, která zahrnuje transformaci aminokyseliny fenyllalaninu na 4-kumaroyl-CoA. Biosyntetická cesta pokračuje řadou enzymatických modifikací a nakonec se rutin v tlustém střevě pomocí glykosidáz střevních bakterií přeměňuje na kvercetin. [46, 47]



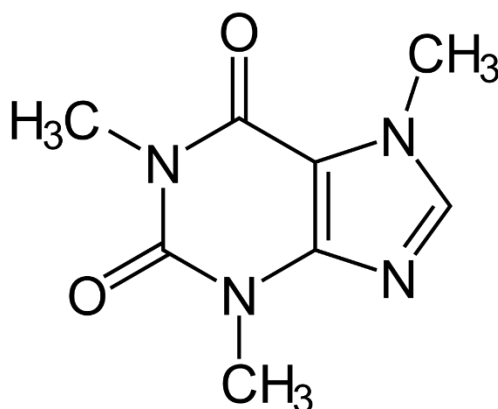
Obrázek 12: Chemická struktura rutinu

Rutin má širokou škálu farmakologických vlastností, například antioxidační aktivitu, která se využívá v humánní medicíně a výživě. Běžně se používá jako antimikrobiální, antifungální a antialergické činidlo. Současný výzkum však prokázal jeho multispektrální farmakologické přínosy pro léčbu různých chronických onemocnění, jako je rakovina, diabetes a vysoký tlak. Vyskytuje se v léčích na vysoký cholesterol, jelikož snižuje hodnoty LDL cholesterolu. Rutin dále příznivě ovlivňuje křehkost krevních kapilár, čímž brání jejich poškození, zvyšuje pružnost cév a zesiluje účinek vitamínu C. [46, 47]

3.2.2 Kofein

Kofein (1,3,7-Trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion, Obrázek 13) je jedním z alkaloidů, který lze nalézt v kávě, čaji a některých nealkoholických nápojích. Kofein je dobře známý jako mírný stimulant centrální nervové soustavy. Kofein je metabolizován na 3 deriváty

dimethylxanthinů: paraxanthin (urychluje lipolýzu), theobromin (rozšiřuje krevní cévy) a theofylin (uvolňuje hladké svaly průdušek). V mozku kofein dokáže ovlivnit uvolňování neurotransmiterů, jako je acetylcholin, dopamin, noradrenalin, kyselina gama-aminomáselná a serotonin, což zlepšuje náladu, stimuluje organismus, zlepšuje koncentraci a odstraňuje fyzickou únavu.[48]



Obrázek 13: Chemická struktura kofeinu

Kofein se stále více používá v kosmetice díky jeho vysoké biologické aktivitě a schopnosti pronikat přes kožní bariéru. Komerčně dostupné výrobky běžně obsahují 3 % kofeinu. Funguje jako účinná látka v přípravcích proti celulitidě, protože zabráňuje nadměrnému hromadění tuku v buňkách. Kofein má silné antioxidační vlastnosti. Pomáhá chránit buňky před UV zářením a zpomaluje proces fotostárnutí pokožky. Kofein obsažený v kosmetice navíc zvyšuje mikrocirkulaci krve v kůži a také stimuluje růst vlasů, přispívá k detoxikaci organismu, redukuje otoky a kruhy pod očima. Všechny tyto vlastnosti dělají z kofeinu důležitou biologicky aktivní sloučeninu, kterou lze použít v různých kosmetických produktech.[48] Kofein byl proto vybrán jako modelová biologicky aktivní látka, jejíž uvolňování bylo sledováno také v této práci.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla příprava hydrogelových filmů na bázi chitosanu zesíťovaných DAC v různých molárních poměrech složek, jinak řečeno po přidání různého množství síťovacího činidla. Byly zkoumány parametry sítě hydrogelů (procento bobtnání, procento gelové frakce), reologické vlastnosti, SEM, testována proliferace buněk a cytotoxicita a pozorována kinetika uvolňování biologicky aktivní látky (kofein).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité materiály

Chitosan ($M_w = 50 - 190\text{kD}$, stupeň deacetylace 75-85 %; Sigma Aldrich Co.), α -celulóza (Sigma Aldrich Co.), jodistan sodný (NaIO_4) (Penta, Česká republika), ethylenglykol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) (Penta, Česká republika), kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, Česká republika), hydroxylamin hydrochlorid (Penta, Česká republika), hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Česká republika). Zkoumané SCN-DAC hydrogely byly nasyceny kofeinem (Sigma Aldrich Co.).

Na otestování cytotoxicity byly použity buněčné kultury myších embryonálních fibroblastů (ECACC 93061524, Spojené království), které byly kultivovány na Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biosera, Francie) obsahující 10 % fetálního telecího séra (BioSera, Francie) a 100 U/ml Penicillin/Streptomycinu (Biosera, Francie).

Pro promývání buněk byl použit fyziologický roztok (PBS, Invitrogen, USA). Buňky byly kultivovány na plastiku Techno (TPP, Švýcarsko), životaschopnost buněk byla stanovena pomocí Tetrazolium kit, pro test proliferace buněk bylo použito MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemsko).

5.2 Přístroje a metody

5.2.1 Reologická měření

Z připravených zbobtnalých hydrogelových filmů byla vyseknuta kruhová tělíska o velikosti 15 mm. Ta poté byla v rovnovážném zbobtnalém stavu charakterizována na reometru Anton Paar MCR 502 (Anton Paar, Rakousko), který byl vybaveném zdrsňným hliníkovým plátem D-PP15 o průměru 15 mm. Proti prokluzování tělísek při měření byl na spodní podkladovou desku byl připevněn brusný papír. Měření probíhalo za laboratorní teploty v rozmezí úhlových mezi 1 a 10 Hz při konstantní deformaci 1 %. U každého poměru se měření opakovalo třikrát.

5.2.2 SEM analýza

Lyofilizované vzorky SCN/DAC_2% a SCN/DAC_5% byly analyzovány za pomoci mikroskopu Nova NanoSEM 450 (FEI, Česká republika) při 100 000 násobném přiblížení.

5.2.3 Nasycení hydrogelů biologicky aktivní látkou a průběh uvolňování

Z filmů SCN/DAC s 2% a 5% koncentrací síťovadla byla vysekána kolečka o průměru 9 mm. Ta byla ponechána bobtnat v roztoku kofeinu o koncentraci 20 mg/ml na třepačce při teplotě 40 °C po dobu 2 dní. Po uplynutí stanovené doby byly vzorky z roztoku vyjmuty, osušeny a zváženy, a následně ponořeny do 100 ml demineralizované vody a byla sledována kinetika uvolňování za mírného třepání při 37°C. V určených časech, tj. po 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h a 8 h bylo odebráno vždy 2,5 ml obsahu. Po každém odběru byl obsah lahve doplněn na původní objem přidáním 2,5 ml demineralizované vody.

Vzorky byly poté přeměřeny na UV-VIS spektrometru Perkin Elmer Lambda 1050 (Perkin Elmer 219 Inc., USA) v rozmezí 200 – 325 nm. Byla sledována intenzita absorbance kofeinu při 273 nm. Množství kofeinu bylo stanoveno za pomoci kalibrační křivky roztoků kofeinu o známé koncentraci ve vodě.

5.2.4 FTIR

Lyofilizované vzorky výchozích materiálů byly analyzovány na FT-IR spektrometru Nicolet 6700 v oblasti 400 – 4000 cm^{-1} .

5.2.5 Cytotoxicita

Nejdříve byly vzorky sterilizovány pomocí 70% ethanolu. Jako buněčná linie byla použita myší embryonální fibroblastová buněčná linie (ECACC 93061524, Anglie), jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biosera, Francie) formulované v ATCC, obsahující 10 % telecího séra (BioSera, Francie) a 100 U/ml Penicilin/Streptomycin (Biosera, Francie). Buňky byly inkubovány při 37 °C v 5% CO_2 ve zvlhčeném vzduchu.

Buňky byly nasazeny k předinkubaci na 24jamkové destičce (TPP, Švýcarsko) v koncentraci 1×10^5 buněk na ml. Kultivační médium bylo následně nahrazeno čerstvým a testované vzorky byly přeneseny k předkultivovaným buňkám. Následující den byla morfologie buněk pozorována pomocí inverzního mikroskopu Olympus s fázovým kontrastem (IX 81) a byl také proveden test buněčné proliferace za pomoci tetrazoliových solí (souprava pro stanovení proliferace buněk MTT, Duchefa Biochemie, Nizozemí). Absorbance byla měřena při 570 nm a referenční vlnová délka byla nastavena na 690 nm. Výsledky jsou prezentovány jako snížení životaschopnosti buněk v procentech ve srovnání s buňkami kultivovanými na kultivačním plastiku v médiu bez testovaných materiálů.

5.2.6 Růst buněk v přítomnosti vzorků

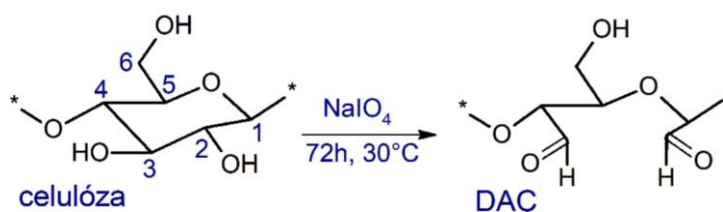
Nejdříve byly vzorky sterilizovány z obou stran UV světlem po dobu 30 minut. K pokusu byla použita myší embryonální fibroblastová buněčná linie (ECACC 93061524, Anglie) a jako kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biosera, Francie) formulované v ATCC, obsahující 10 % telecího séra (BioSera, Francie) a 100 U/ml Penicilin/Streptomycin (Biosera, Francie). Buňky byly inkubovány při 37 °C v 5% CO₂ ve zvlhčeném vzduchu.

Buňky byly nasazeny na testované vzorky na 24jankové destičce (TPP, Švýcarsko). Koncentrace 1x10⁵ buněk na ml. Po 72 h (3 dnech) proliferace byly buňky na vzorcích a také na plastiku pod nimi pozorovány laserovou skenovací konfokální mikroskopií s použitím barviva ActinGreen a Hoechst.

5.3 Příprava DAC, SCN a SCN-DAC hydrogelů

5.3.1 Příprava DAC

2,3-dialdehyd celulózy (DAC) byl připraven oxidací α -celulózy jodistanem za použití molárního poměru reaktantů 1:1,2 (DAC : NaIO₄). V prvním kroku byly 2 g celulózy rozpuštěny ve 100 ml destilované vody obsahující 3,3 g NaIO₄. Poté byla směs míchána na 500 ot/min při laboratorní teplotě po dobu 72 h. Pro správný průběh reakce bylo nutno zamezit přístupu světla. Po uplynutí této doby byla oxidace zastavena přidávkem 2 ml ethylenglykolu a důkladným promícháním. Směs byla 5x zcentrifugována při 15 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut, čímž došlo k odstranění nezreagovaného jodistanu. Po každé centrifugaci bylo nutné vzorek redispergovat mechanickým homogenizátorem. Vzorek byl dále převeden do 200ml baňky a solubilizován za refluxu při 80 °C po dobu 2 hodin. Poté proběhla dialýza trvající 48 hodin, filtrace přes filtr s propustností do 0,8 μ m a konečná lyofilizace.



Obrázek 14: Schéma přípravy DAC[16]

Dále bylo u DAC provedeno stanovení obsahu -COH skupin pomocí oximační reakce s hydroxylamin hydrochloridem, což je nejběžnější metoda pro stanovení stupně oxidace DAC. Při reakci se aldehydy přeměňují na oximy a následně se pro každou oxidovanou aldehydovou skupinu uvolňují dvě molekuly kyseliny chlorovodíkové. Nastavením pH roztoku hydroxylamin hydrochloridu před reakcí a následnou titrací hydroxidem sodným zpět na počáteční pH lze určit množství oxidovaných jednotek.[49]

Nejdříve byla provedena standardizace 0,1M NaOH do 2l odměrné baňky ($m_{Na} = 8$ g). Do 100ml odměrné baňky bylo naváženo 0,6303 g dihydrátu kyseliny šťavelové $((COOH)_2 * 2 H_2O)$, čímž vznikl roztok o koncentraci $c_{(COOH)_2 * 2 H_2O} = 6,303$ g/l, a pak bylo 22,3605 g chloridu vápenatého ($CaCl_2$) rozpouštěno v demineralizované vodě v baňce taktéž o objemu 100 ml.

Pro slepý pokus bylo použito 10 ml $(COOH)_2 * 2 H_2O$, do které byly přidány 3 kapky methyloranže. Následně byl roztok titrován 0,1M NaOH, dokud nebyla pozorována změna zbarvení z červené na žlutou. Po této změně bylo přidáno 10 ml $CaCl_2$ a dále titrováno NaOH až do další barevné změny. Tento pokus byl zopakován 3x. Průměrná spotřeba 0,1M NaOH k dosažení obou barevných přechodů byla 10,2 ml.

Pro samotné stanovení bylo 0,1 g DAC bylo rozpuštěno v 30 ml demineralizované vody a pH bylo upraveno na hodnotu 4. Dále bylo naváženo 5,3750 g hydroxylaminu hydrochloridu a rozpuštěno ve 250 ml demineralizované vody. Do roztoku DAC bylo přidáno 20 ml zásobního roztoku hydroxylaminu hydrochloridu a to poté ponecháno reagovat po dobu 24 hodin, po kterých hodnota pH klesla na průměrných 1,81. Při testování roztoku DAC nebyla sledována barevná změna, nýbrž spotřeba 1M NaOH pro získání roztoku o pH = 4. Na začátku pokusu, který se také opakoval 3x, bylo průměrné pH vzorku rovno 1,79. Průměrná spotřeba NaOH pro dosažení pH 4 byla 9,53 ml.

Pro stanovení aldehydických skupin byly použity následující rovnice:

$$t = \frac{m_{(COOH)_2 * 2 H_2O}}{V * Fi} \quad (17)$$

Kde:

t = hledaný titr, m = navážka $(COOH)_2 * 2 H_2O$ (mg), V = spotřeba odměrného roztoku 0,1M NaOH při standardizaci (ml), Fi = volumetrický faktor o hodnotě 6,3033 (mg/ml)

$$V_t = V \times t \quad (18)$$

Kde:

V_t = spotřeba odměrného roztoku (ml), V = objem NaOH potřebný při titraci DAC (ml), t = hledaný titr z předchozího výpočtu

$$m_{HCl} = F \times V_t \quad (19)$$

Kde:

m_{HCl} = hmotnost uvolněné kyseliny (mg), F = volumetrický faktor, V_t = koeficient z předchozího výpočtu

$$n_{HCl} = \frac{m_{HCl}}{M_{HCl}}$$

Kde:

m_{HCl} = hmotnost uvolněné kyseliny (mg), M_{HCl} = molární hmotnost kyseliny (36,46 g/mol)

Použité volumetrické faktory jsou tabulkové hodnoty.

Dosažením do vzorců bylo zjištěno, že koncentrace -COH skupin ve vzorku byla rovna 9,35 mmol/g. Při 100% oxidaci by byla rovna 12,49 mmol/g, z čehož se dá odvodit, že stupeň oxidace DAC je roven 74,8 %.

5.3.2 Příprava SCN

Zatímco chitin je nerozpustná látka, deacetylovaný chitosan lze rozpustit pouze v kyselém prostředí. To ovšem není vhodné pro přípravu biomateriálů, u jejichž použití se předpokládá neutrální/fyziologické pH. Pro přípravu biomateriálů bylo nutno chitosan upravit tak, aby byl rozpustný ve fyziologickém prostředí s $\text{pH} \pm 7,4$. Toho bylo dosaženo částečnou acetylací chitosanu a tedy syntézou SCN (z anglického Soluble ChitosaN), se stupněm deacetylace 50 % a který tedy obsahuje strukturní jednotky chitinu a chitosanu v poměru 1:1.[50]

K 2,2 g chitosanu bylo v uzavřené Erlenmeyerově baňce o objemu 250 ml přidáno 70 ml 10% kyseliny octové. Směs byla rozpouštěna nejdříve po dobu 2 hodin při teplotě $t = 75 \text{ }^\circ\text{C}$ na 600 ot/min, poté další 2 hodiny při laboratorní teplotě a 300 ot/min. Následně bylo pomalým nakapáním přidáno 50 ml etanolu a 0,519 ml anhydridu kyseliny octové, čímž se předešlo vzniku sraženiny. Za nepřístupu světla byla tato směs ponechána reagovat po dobu 18 hodin při laboratorní teplotě a 300 ot/min. Po uplynutí stanovené doby bylo přidáno

takové množství 5M NaOH, aby výsledné pH vzorku bylo rovno 8,5. Při přidávání NaOH bylo nutné dbát na to, aby nedocházelo ke gelaci, čemuž se dalo předejít pomalým přikapáváním hydroxidu. V případě vzniku gelu totiž dochází k obalení sondy pH metru gelem a ke zkreslení hodnot pH. Naměřené hodnoty byly poté překontrolovány ještě pH papírkem.

Produkt byl dialyzován v destilované vodě, která byla po celou dobu procesu průběžně vyměňována. Po 72 hodinách byla pomocí kyseliny chlorovodíkové (HCl) provedena úprava pH na hodnotu 6,5, čímž došlo k rozpadu gelových částic a tím k projasnění vzorku. Po dalších 72 hodinách byla dialýza ukončena, vzorek převeden do 800ml kádinky a následně bylo provedeno odstranění přebytečné kapaliny v rotační vakuové odparce při teplotě $t = 50$ °C, čímž došlo ke zmenšení objemu vzorku z 600 na zhruba 200 ml. Při ještě větším snížení objemu by došlo ke zbytečným ztrátám materiálu způsobeným obtížným vyjmutím vysoce viskózního roztoku z destilační baňky. Opět bylo ověřeno, že pH vzorku zůstává na hodnotě 6,5. Vzorek byl následně centrifugován při 10 000 otáčkách po dobu 10 minut a poté přefiltrován přes filtrační papír. Následně byl roztok lyofilizován.

5.3.3 Příprava SCN/DAC hydrogelů

Bylo připraveno osm 20ml stříkaček naplněných destilovanou vodou o objemu 15 ml. Do prvních čtyř stříkaček bylo přidáno 200 mg lyofilizovaného SCN a směs byla ponechána rozpouštět za stálého třepání po dobu 24 hodin při teplotě 45 °C. Do zbylých stříkaček bylo naváženo takové množství DAC, aby molární poměr SCN:DAC činil 2; 5; 10 a 20 % (Tabulka 2), a taktéž rozpouštěno na třepačce. Po úplném rozpuštění obsahu byl obsah stříkačky s SCN a s DAC smíchán pomocí mísícího nástavce, převeden do teflonových forem a ponechán schnout v sušárně při teplotě 37 °, čímž vznikly SCN/DAC filmy o připravené pomoci různých molárních poměrů složek.

Tabulka 2: Značení a složení vzorků SCN/DAC

Značení	SCN (mg)	Mw SCN (g/mol)	DAC (n %)	DAC (mg)	Mw DAC (g/mol)
SCN/DAC_2%	200	182,18	2	3,52	160,12
SCN/DAC_5%	200	182,18	5	8,99	160,12
SCN/DAC_10%	200	182,18	10	17,97	160,12
SCN/DAC_20%	200	182,18	20	35,94	160,12

Po vysušení tak vznikly 4 vzorky, ale SCN/DAC_10% byl příliš křehký a při manipulaci praskal, zatímco vzorek SCN/DAC_20% se během sušení sraštil, a tudíž nevznikl film. U těchto vzorků proto bylo provedeno pouze stanovení parametrů sítě a některé biologické testy u kterých nebyl tvar materiálu rozhodující. Naopak filmy SCN/DAC s 2% a 5% DAC vykazovaly vlastnosti vhodné k dalším pokusům a proto na nich byla provedena úplná sada testů, tj. byly u těchto hydrogelů zkoumány parametry sítě, změřeny viskoelastické vlastnosti, provedena SEM analýza a poté také testy kinetiky uvolňování navázané látky a test cytotoxicity.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 FT-IR analýza

Vzorky DAC, chitosanu a SCN a byly charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie (FT-IR) na spektrometru Nicolet 6700.



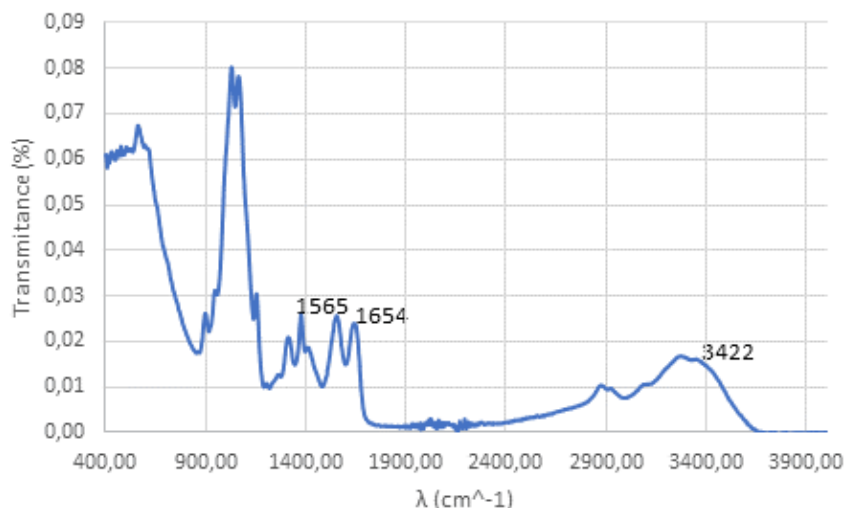
Obrázek 15: IR spektrum DAC

Na IR spektru DAC (Obrázek 15) lze vidět vibrační pásy hemiacetalů při 870 cm^{-1} (-C-O-C- vazba) a pás při 1737 cm^{-1} (-C=O karbonylová skupina), které dokládají přítomnost -COH skupin a úspěšnou modifikaci celulózy.



Obrázek 16: IR spektrum chitosanu

Na Obrázku 16 je IR spektrum zdrojového chitosanu. Pás kolem 3422 cm^{-1} lze přiřadit k vibračním vazeb mezi O-H a N-H. Absorpční pík při 1599 cm^{-1} odpovídá složené vazebné vibraci amidových skupin. Signál při 1654 cm^{-1} lze přisoudit zbytkovému acetylu. Pásky v rozsahu 896 cm^{-1} až 1157 cm^{-1} patří k vibračním β -1,4 glykosidové vazby uvnitř chitosanu.



Obrázek 17: IR spektrum SCN

V IR spektru SCN na Obrázku 17 lze vidět přítomnost jak amidových skupin (signál v oblasti 1654 cm^{-1}) tak vazeb mezi O-H a N-H (3422 cm^{-1}). Oproti chitosanu je zde však vyšší intenzita pásů amidických skupin při 1654 a 1565 cm^{-1} . Z tohoto lze odvodit vyšší množství N-acetylovaných skupin v SCN a že je v molekule méně zastoupena $-\text{NH}_2$ skupina, přičemž obojí je v souladu se zvýšeným stupněm acetylace.

6.2 Stanovení parametrů sítě

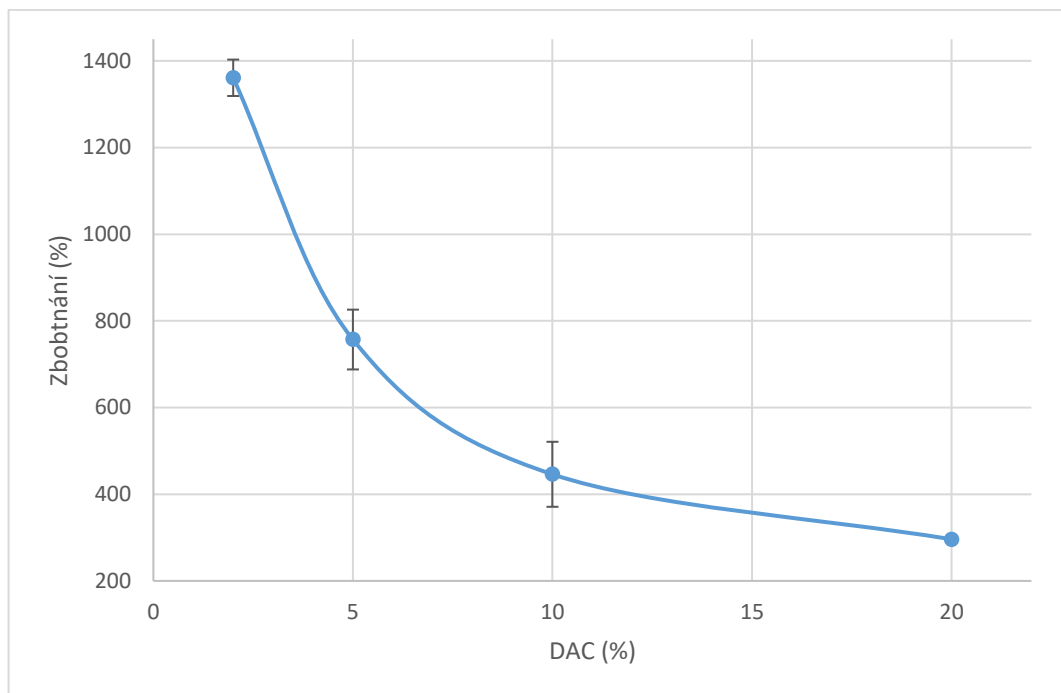
Z jednotlivých nevypraných filmů připravených v různých molárních poměrech SCN:DAC byla připravena tělíska s průměrem 15 mm. Nejdříve byla zaznamenána jejich váha v suchém stavu. Poté byla tato tělíska ponechána louhovat v demineralizované vodě po dobu jednoho týdne, aby u nich došlo k úplnému nabobtnání. Následně byla zjištěna váha tělísek v rovnovážném zbobtnalém stavu. Vzorky byly následně lyofilizovány a tím zjištěna hmotnost v suchém stavu. Za použití vzorců z kapitoly 2.5 byly vypočítány hodnoty zbobtnání (o kolik procent zvětšily svou hmotnost lyofilizované gely v demineralizované vodě), EWC (procentuální vyjádření rovnovážného množství vody absorbované

hydrogelem) a gelové frakce (procento hmotnosti hydrogelu, které z něj lze vyprat rozpouštědlem). Výsledné hodnoty jsou zapsány v Tabulce 3.

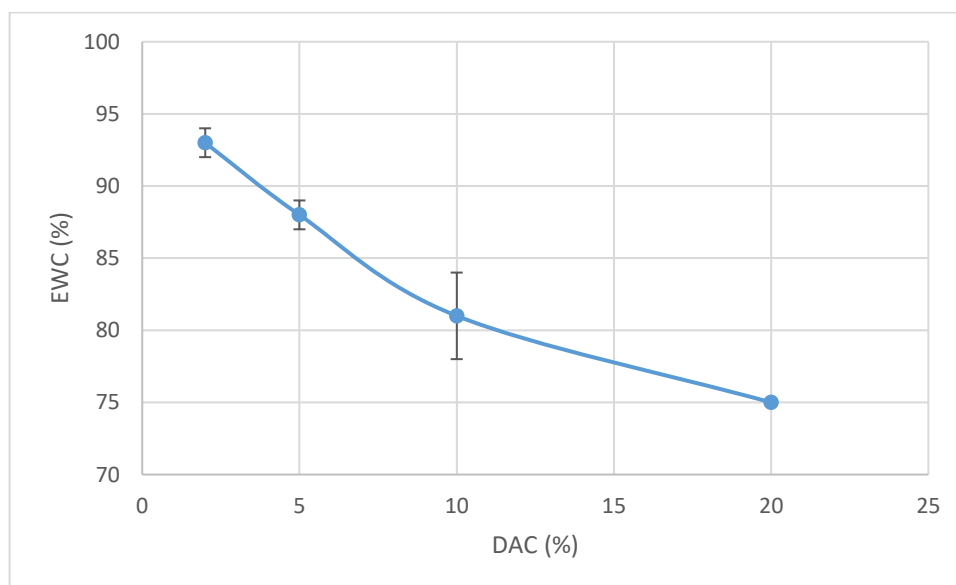
Tabulka 3: Vypočítané průměrné hodnoty parametru sítě

Vzorek	Zbobtnání [%]	EWC [%]	Gelová frakce [%]
SCN/DAC_2%	1361 ± 42	93 ± 1	75 ± 2
SCN/DAC_5%	757 ± 69	88 ± 1	84 ± 3
SCN/DAC_10%	446 ± 75	81 ± 3	85 ± 1
SCN/DAC_20%	296 ± 6	75 ± 0	86 ± 1

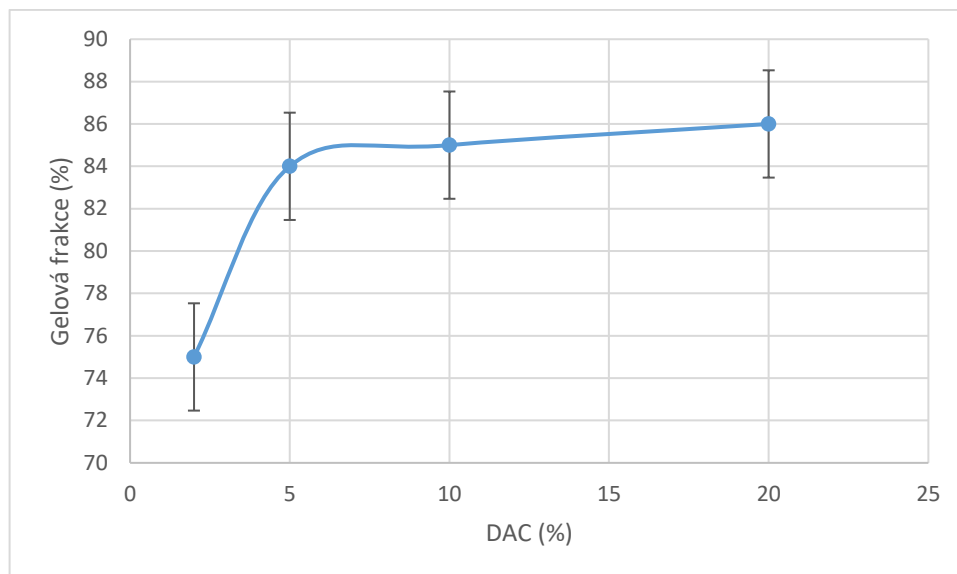
Ze získaných hodnot lze vyčíst, že SCN/DAC_2% je schopno na sebe navázat největší objem kapaliny, pro demineralizovanou vodu to činilo skoro čtrnáctinásobek jeho suché váhy. Se zvyšujícím se množstvím síťovadla procentuální zbobtnání výrazně klesalo, u 20% zastoupení DAC hydrogel zvýšil svou váhu pouze trojnásobně. Graficky je závislost zbobtnání na množství síťovadla vykreslena v Obrázku 18. Stejně tak s větším množstvím DAC v hydrogelu klesalo procento EWC (Obrázek 19), naopak se zvyšoval podíl gelové frakce (Obrázek 20). To je způsobeno hustější sítí hydrogelu, která se stává uspořádanější, více se tak projevuje vliv slabých interakcí mezi polymerními řetězci, což omezuje průnik a molekul rozpouštědla do matrice. Změna síťových parametrů tak není lineární, ale dochází prudké změně obzvláště mezi 2 a 5 % DAC, které byly dále testovány pomocí reometru.



Obrázek 18: Rovnovážné zbobjnání v závislosti na množství DAC



Obrázek 19: EWC (%) v závislosti na množství DAC



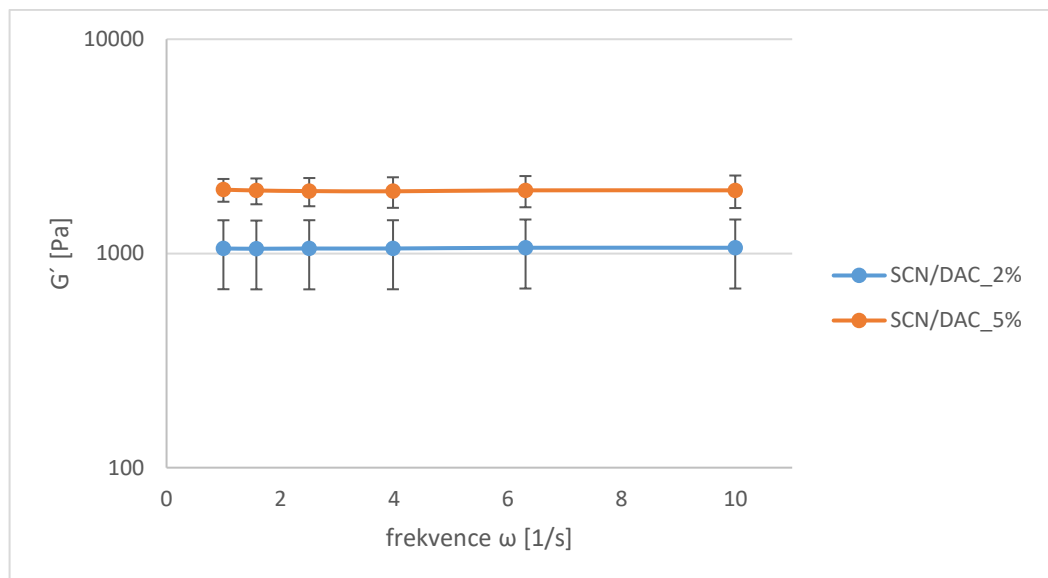
Obrázek 20: Gelová frakce (%) v závislosti na množství DAC

6.3 Viskoelastické vlastnosti

Vzorky SCN/DAC_2% a SCN/DAC_5% byly analyzovány za pomoci reometru při frekvenci 1 až 10 Hz za konstantní deformace 1 %. Na Obrázku 21 a Obrázku 22 je znázorněna závislost dynamického a ztrátového modulu na úhlové frekvenci. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty dynamického modulu

frekvence ω [1/s]	SCN/DAC_2%		SCN/DAC_5%	
	G' [Pa]	chyba [Pa]	G' [Pa]	chyba [Pa]
1	1055	374	1985	242
1,58	1052	372	1968	271
2,51	1055	375	1955	294
3,98	1055	374	1950	317
6,31	1063	377	1970	327
10	1063	377	1970	341



Obrázek 21: Závislost dynamického modulu na úhlové frekvenci

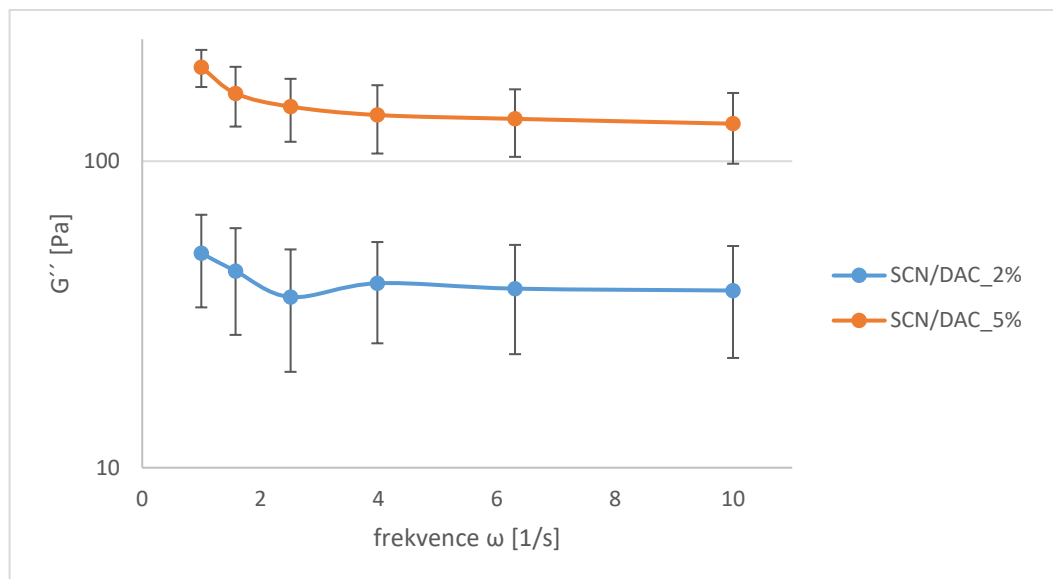
Z naměřených hodnot lze vyčíst, že vyšší elastický modul G' je u vzorku s 5% zastoupením síťovadla, který má tím pádem vyšší hustotu sítě. Mezní hodnoty dynamického modulu G' se u SCN/DAC hydrogelů pohybují v závislosti na frekvenci od 1052 ± 372 Pa (vzorek SCN/DAC_2% při frekvenci $1,58 \text{ s}^{-1}$) až po 1985 ± 242 Pa (SCN/DAC_5% při frekvenci 1 s^{-1}). U vzorků přitom nedochází ke statisticky významné změně G' v závislosti na frekvenci.

Stejný jev lze pozorovat u ztrátového modulu G'' (Obrázek 22), kde se mezní hodnoty pohybují v závislosti na frekvenci od 36 ± 16 Pa (vzorek SCN/DAC_2% při frekvenci $2,51 \text{ s}^{-1}$) až po (203 ± 28) Pa (SCN/DAC_5% při frekvenci 1 s^{-1}). Hodnoty ztrátového modulu jsou tedy přibližně o řád nižší, než tomu bylo u elastického modulu. Veškeré číselné hodnoty pro oba vzorky a všechny frekvence jsou zapsány v tabulce 5.

Výsledky naměřené na vzorcích SCN/DAC hydrogelů tedy odpovídají očekávání, že hodnoty pro dynamický modul G' a ztrátový modul G'' budou vyšší u toho hydrogelu, který obsahuje větší množství síťovadla (vzorek SCN/DAC_5%) protože hustější síť bude vykazovat vyšší elasticitu než síť řidší, která bude mít naopak viskóznější charakter.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty ztrátového modulu G''

frekvence ω [1/s]	SCN/DAC_2%		SCN/DAC_5%	
	G'' [Pa]	chyba [Pa]	G'' [Pa]	chyba [Pa]
1	50	17	203	28
1,58	44	17	167	37
2,51	36	16	151	35
3,98	40	15	142	36
6,31	38	15	138	34
10	38	15	133	34

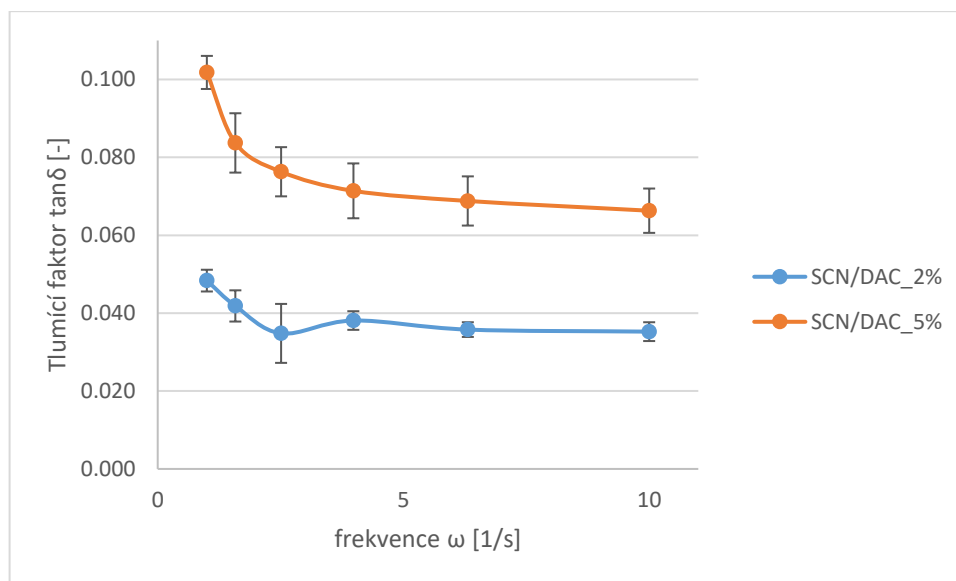


Obrázek 22: Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci

Na Obrázku 23 lze vidět závislost tlumícího (dumping) faktoru na úhlové frekvenci. Tlumící faktor je vypočítán jakožto poměr mezi ztrátovým (G'') a dynamickým (G') modulem. Udává, jaká je míra tlumení mechanických vibrací materiálem. Hodnoty tlumícího faktoru se zde pohybují v rozmezí od $0,035 \pm 0,002$ u vzorku SCN/DAC_2% při frekvenci $2,51 \text{ s}^{-1}$ až po $0,102 \pm 0,004$ pro vzorek SCN/DAC_5% při frekvenci 1 s^{-1} . Jelikož jsou obě hodnoty výrazně nižší než 1, lze konstatovat, že u obou vzorků výrazně převládá elastický charakter nad viskózním. Všechny hodnoty tlumícího faktoru je možno najít v Tabulce 6.

Tabulka 6: Dopočítané hodnoty damping faktoru (tlumící faktor)

frekvence ω [1/s]	SCN/DAC_2%		SCN/DAC_5%	
	průměr $\tan\delta$ [-]	chyba [-]	průměr $\tan\delta$ [-]	chyba [-]
1	0,048	0,003	0,102	0,004
1,58	0,042	0,004	0,084	0,008
2,51	0,035	0,008	0,076	0,006
3,98	0,038	0,002	0,071	0,007
6,31	0,036	0,002	0,069	0,006
10	0,035	0,002	0,066	0,006



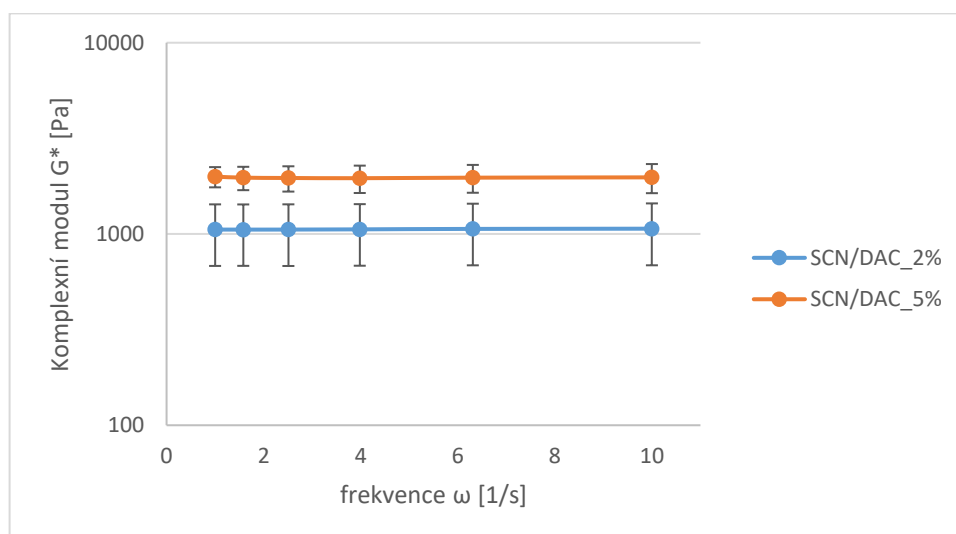
Obrázek 23: Závislost damping faktoru na úhlové frekvenci

Závislost komplexního modulu G^* na úhlové frekvenci ilustruje Obrázek 24. Komplexní modul je vypočítán jako čtverec odmocniny součtu ztrátového a dynamického modulu. Lze pozorovat, že výsledky jsou podobné výsledkům získaným pro elastický modul G' , který je zobrazený na Obrázku 21. Rozsah hodnot komplexního modulu G^* se pohybuje v rozmezí

od 1054 ± 373 Pa (SCN/DAC_2% při frekvenci $1,58 \text{ s}^{-1}$) až po 1995 ± 242 Pa (SCN/DAC_5% při frekvenci 1 s^{-1}), jak popisuje Tabulka 7.

Tabulka 7: Dopočítané hodnoty komplexního modulu

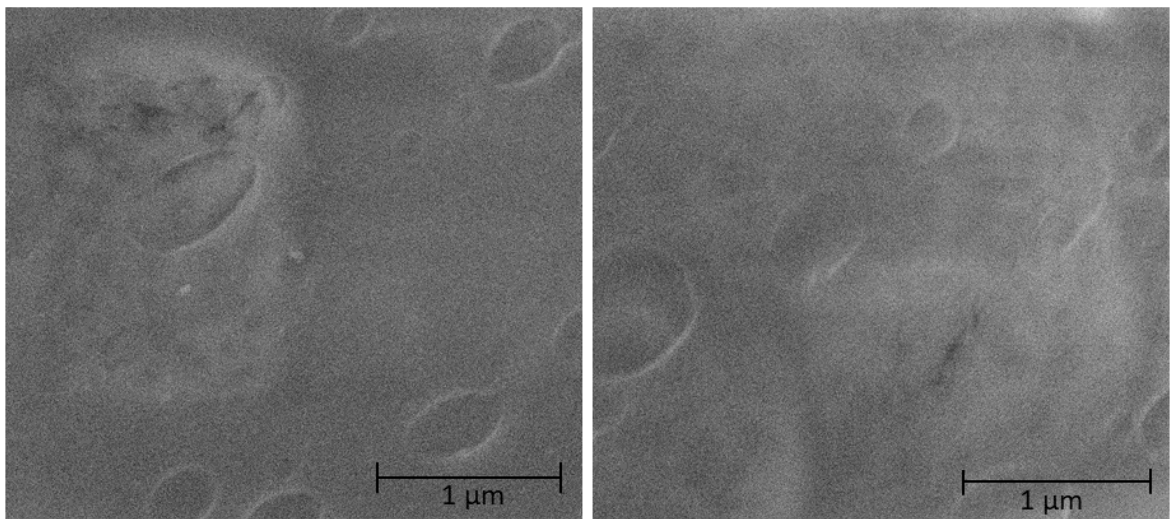
frekvence ω [1/s]	SCN/DAC_2%		SCN/DAC_5%	
	průměr G^* [Pa]	chyba [Pa]	průměr G^* [Pa]	chyba [Pa]
1	1055	374	1995	242
1,58	1054	373	1970	275
2,51	1055	374	1963	296
3,98	1058	375	1958	320
6,31	1063	377	1970	327
10	1066	380	1978	343



Obrázek 24: Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci

Reologickým měřením bylo zjištěno, že vzorek s 5% obsahem DAC, tudíž více zesítný, je elasticitější než hydrogel, který DAC obsahuje pouze 2 % a má také vyšší tlumicí faktor. Řidší síť u 2% vzorku způsobuje, že tento hydrogel má viskóznější vlastnosti. Vlastnosti obou vzorků ovšem dovolují pohodlnou manipulaci a materiály a ty jsou přitom dostatečně flexibilní, aby se dokázaly přizpůsobit nerovnému povrchu těla.

6.4 SEM analýza



Obrázek 25: Mikrofotografie 2% a 5% vzorku pořízené pomocí SEM při zvětšení 100 000x

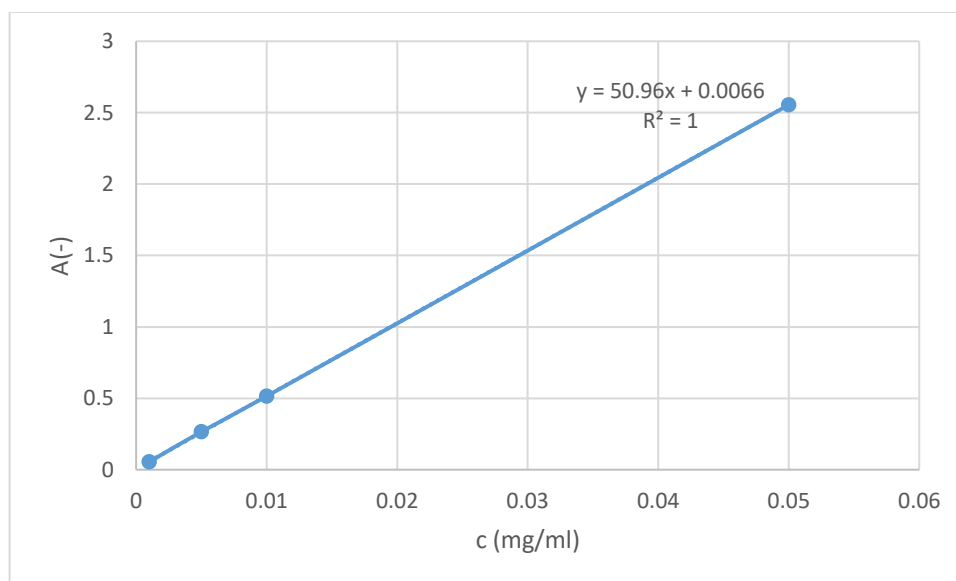
Vyprané vzorky SCN/DAC_2% a SCN/DAC_5% filmů byly lyofilizovány a následně byly pořízeny snímky jejich povrchu pomocí SEM. Na snímcích (Obrázek 25) lze vidět, že obě procentuální zastoupení síťovadla vytváří hladký povrch bez jakýchkoliv vystouplých útvarů, mimo pórů zřejmě způsobených únikem plynů a vodních par během procesu lyofilizace. Nelze tedy pozorovat žádný rozdíl mezi různými poměry použitého síťovadla.

6.5 Nasycení hydrogelů biologicky aktivní látkou a průběh uvolňování

Nejdříve byla na UV-VIS spektrometru Perkin Elmer Lambda 1050 (Perkin Elmer 219 Inc., USA) naměřena při vlnové délce 273 nm kalibrační křivka pro roztok kofeinu při různých koncentracích a z ní zjištěna rovnice přímky (Obrázek 26).

Tabulka 8: Hodnoty kalibrační křivky kofeinu

c (mg/ml)	Absorbance
0,05	2,5545
0,01	0,5148
0,005	0,2659
0,001	0,0546

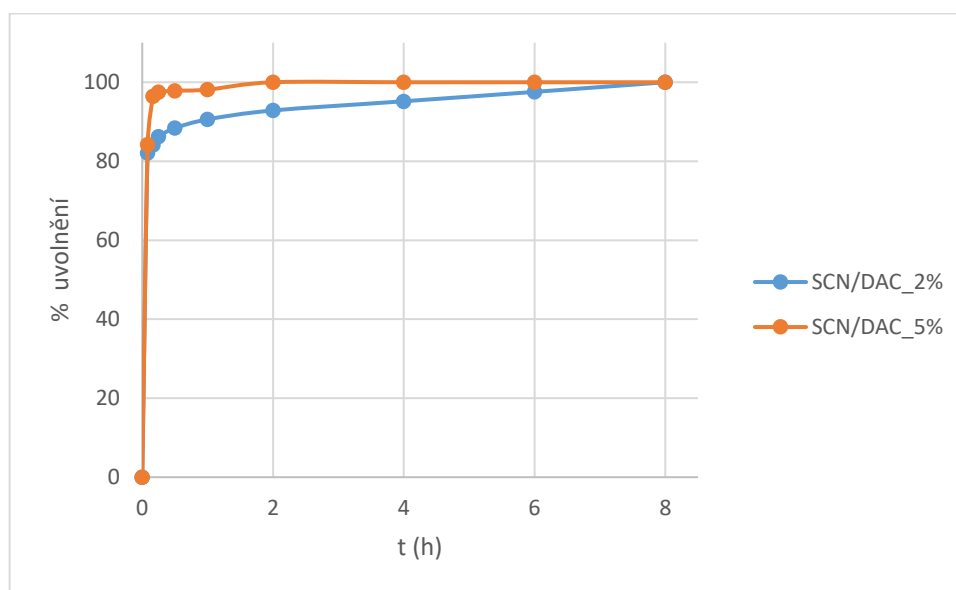


Obrázek 26: Kalibrační křivka kofeinu

Z 2% a 5% filmu SCN/DAC byla vysekána kolečka o průměru 9 mm. Ta byla ponechána louhovat v roztoku kofeinu o koncentraci 20 mg/ml na třepačce při teplotě 40 °C po dobu 2 dní. Po uplynutí stanovené doby byla kolečka z roztoku vyjmuta, osušena a následně byla osušená kolečka vhozena do lahve obsahující 100 ml demineralizované vody a ponechána na třepačce. Z této lahve byly odebrány 2,5 ml obsahu po 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1

h, 2 h, 4 h, 6 h a 8 h. Po každém odběru byl obsah lahve doplněn na původní objem přidáním 2,5 ml demineralizované vody.

Vzorky byly poté měřeny na UV-VIS spektrometru Perkin Elmer Lambda 1050 (Perkin Elmer 219 Inc., USA) v rozsahu 200–325 nm. Ze získaných dat absorbance, rovnice kalibrační přímky a zředovacího koeficientu byl stanoven průběh kumulativního uvolňování látky z hydrogelu (Obr. 27)



Obrázek 27: Procento uvolňování aktivní látky v čase

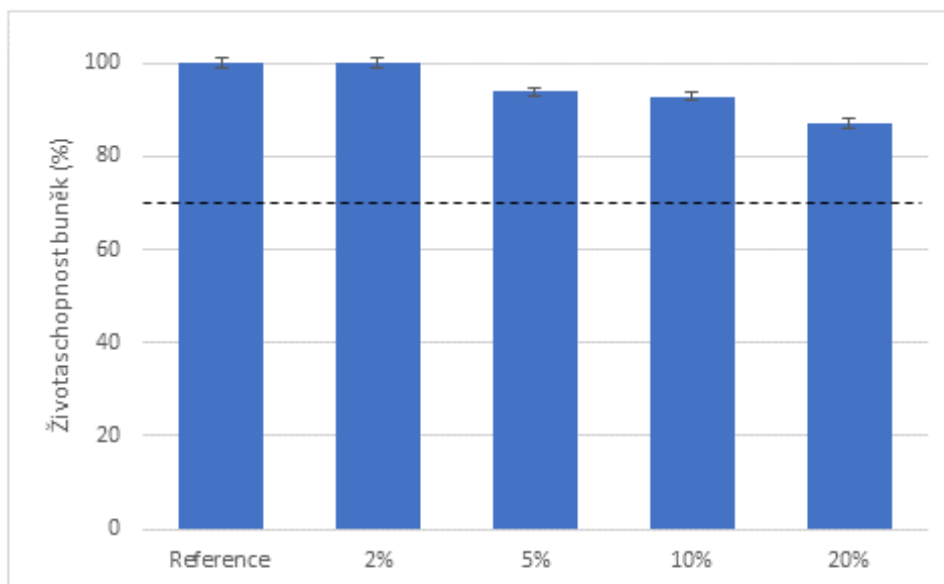
Z grafu (Obrázek 27) lze vyčíst, že absorbovaná aktivní látka (kofein) se u obou vzorků uvolnila velice rychle, a to v řádu několika minut. Nejsou zřetelně viditelné chyby měření, jelikož se pohybovaly v setinách procent. U 2% SCN/DAC došlo už po 5 minutách k uvolnění 82 % a po 1 hodině 91 % navázané látky. U vzorku s 5 % DAC bylo uvolňování zpočátku mírně rychlejší, po 5 minutách bylo uvolněno 85 % celkového množství absorbovaného kofeinu a k úplnému uvolnění došlo už po 2 hodinách. SCN/DAC_2% vykazoval 100% uvolnění až po 8 hodinách, nicméně procento uvolněného kofeinu ve měřených vzorcích se po uplynutí 2 hodin zvyšovalo pouze o necelá 2 %.

Aktivní látka se z hydrogelů uvolňovala rychle pravděpodobně z důvodu jejich tenkosti (<1 mm), tudíž většina látky zůstávala adsorbována pouze na jeho povrchu či v jeho blízkosti. Tento jev proběhl rychleji u SCN/DAC_5%, jelikož jeho hustější síť brzdila difúzi kofeinu z gelu.

Pozorovaný jev lze u biomateriálů určených pro topikální aplikace považovat za žádoucí. Výrobci komerčně dostupných pleťových masek většinou doporučují dobu aplikace 15 až 30 minut. Navíc při aplikaci na nepoškozenou kůži bude rychlost určujícím krokem spíše než uvolnění látky z hydrogelu její průchodnost přes kožní bariéru.

6.6 Cytotoxicita

Nejdříve byly vzorky sterilizovány pomocí 70% ethanolu. Následně byla jejich cytotoxicita testována na myši embryonální fibroblastové buněčné linie. Výsledky jsou na Obrázku 28.

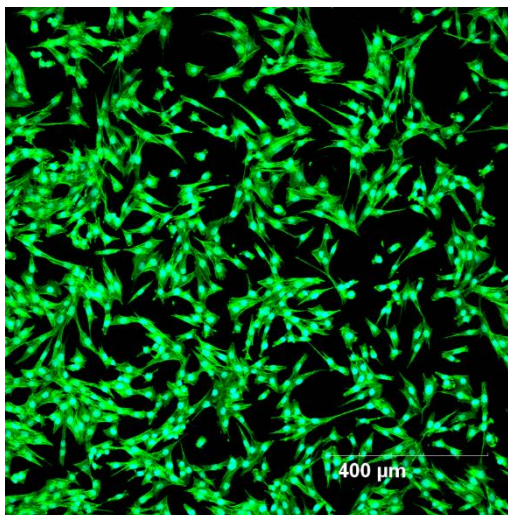


Obrázek 28: Cytotoxicita filmů SCN-DAC s různými koncentracemi DAC (2 %; 5 %; 10 %; 20 %) v přímém kontaktu s NIH/3T3 buňkami. Přerušovaná čára zvýrazňuje hranici životaschopnosti.

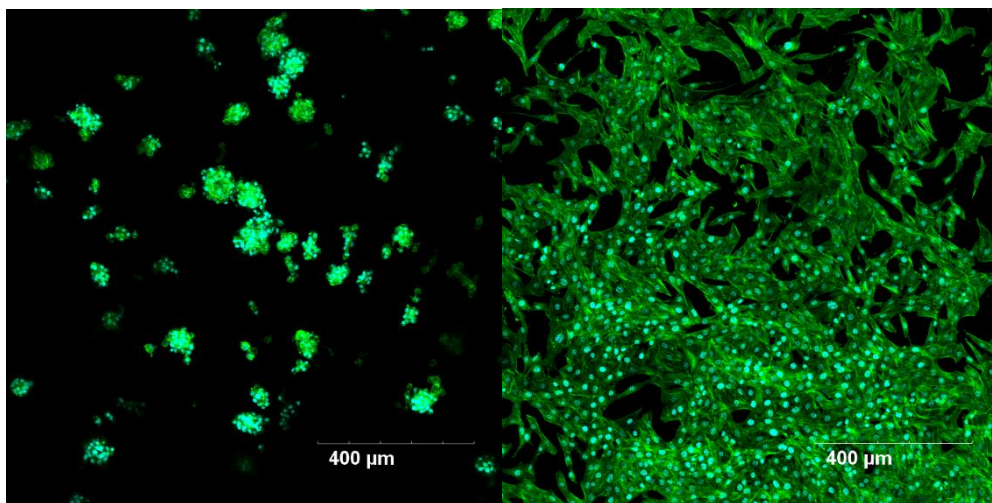
Jak lze vyčíst z Obrázku 28, i když buněčná životaschopnost se zvyšující se koncentrací DAC poněkud klesala, žádný ze vzorků nevykazuje dle normy ISO 10993-5 cytotoxicitu, jelikož životaschopnost buněk byla vždy vyšší než 70 %.

6.7 Buněčná proliferace

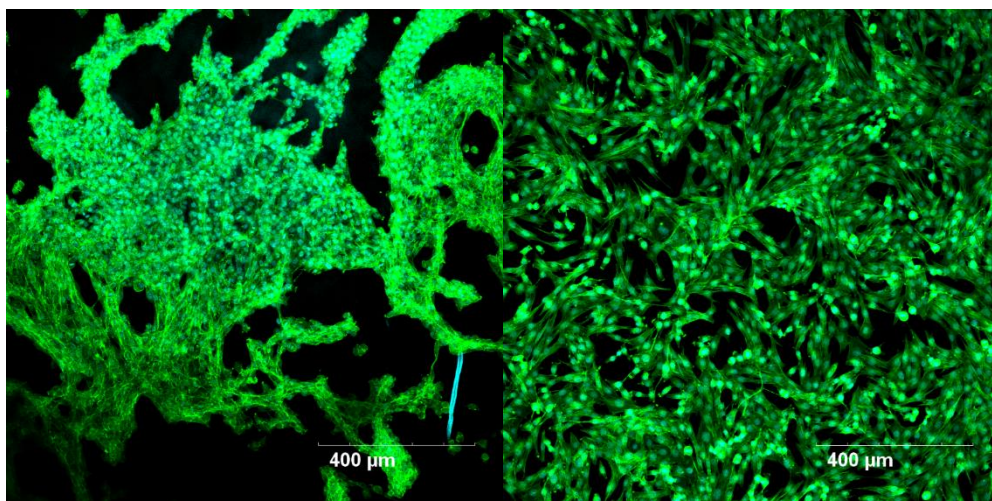
Kromě cytotoxicity byl sledován také vliv přítomnosti SCN/DAC hydrogelů na buněčnou proliferaci, Obrázek 29 – 31.



Obrázek 29: Reference



Obrázek 30: SCN/DAC_2%, vlevo: růst buněk přímo na filmu, vpravo: růst buněk v přítomnosti filmu



Obrázek 31: SCN/DAC_5%

Po dvou dnech inkubace byla obarvena jaderná DNA a rovněž také vlákna buněčného cytoskeletu. Následně byly pořízeny fotografie pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie.

V porovnání s referencí, tedy buňkami kultivovanými na tkáňovém plastiku bez vzorků, bylo buněk na povrchu vzorku SCN_2% výrazně méně a vytvářely shluky, ale na plastiku v přítomnosti vzorku byl růst buněk srovnatelný s referencí. Buňky na vzorku SCN_5% měly tendence růst o něco více než u SCN_2%, ale opět se shlukovaly a nevykazovaly klasickou morfologii. Naopak v přítomnosti vzorku pak rostly srovnatelně s referencí. Limitovaný růst buněk na povrchu vzorků a naopak žádný pozorovatelný vliv přítomnosti materiálů na růst buněk na tkáňovém plastiku může být výhodou při přípravě obvazových materiálů a prostředků pro hojení ran, kde je zarůstání obvazu do rány krajně nežádoucí.

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly připraveny čtyři SCN/DAC hydrogelové filmy v různých molárních poměrech. Cílem bylo zjistit, jaký má množství síťovadla vliv na chování a vlastnosti hydrogelu a jestli je takovýto hydrogel vhodný pro použití v kosmetickém či biomedicínském odvětví.

Byly připraveny hydrogelové filmy s 2%, 5%, 10% a 20% zastoupením DAC. I přes vznik filmu byl 10% SCN/DAC příliš tvrdý a křehký a u 20% SCN/DAC došlo ke smrštění, v důsledku čehož nebylo možné tyto dva materiály experimentálně zkoumat mimo určení síťových parametrů a cytotoxicity.

Výsledky studia parametrů sítě potvrzují, že množství použitého síťovadla má na vlastnosti hydrogelu zásadní vliv. Největší zlobtnání a EWC vykazoval vzorek SCN/DAC_2%. Gelová frakce byla nejvyšší u SCN/DAC_20%. Rozdílné parametry sítě hydrogelů byly zřetelné také v jejich viskoelastických vlastnostech. Dynamický (G') i ztrátový modul (G'') byly nejvyšší u hydrogelu připraveného s větším měřeným množstvím síťovadla (SCN/DAC_5%). Hustší síť vedla k vyšší elasticitě, zatímco řidší síť se chovala viskózněji. Komplexní modul G^* byl hodně podobný dynamickému modulu, což znamená, že pružnost hydrogelů závisí na množství síťovadla.

Při porovnání mikrofotografií pořízených pomocí SEM nevykazovaly vzorky hydrogelů s 2%, 5% DAC žádné rozdíly v porositě, obě koncentrace vedly k hladkému povrchu bez výraznějších morfologických útvarů, byly na nich viditelné pouze prohlubeniny vzniklé zřejmě odpařováním plynů a vodních par během lyofilizace.

Průběh uvolňování biologicky aktivní látky (kofein) z hydrogelů byl pro obě koncentrace podobný a rozdíly mezi materiály pouze minimální. Rychlost uvolňování byla v obou případech velmi vysoká. Již během prvních 10 minut došlo k uvolnění více než 80 % kofeinu a po osmi hodinách došlo k úplnému uvolnění navázaného kofeinu. Vysoká počáteční rychlost uvolňování pozorovaná u obou materiálů je vhodná pro některé kosmetické přípravky, jako jsou například pleťové masky.

Ve zkouškách cytotoxicity byly testované vzorky všech 4 koncentrací DAC, jelikož pro ně nebylo nutno mít formu filmů. Cytotoxicita byla stanovována podle normy ISO EN 10993. Ve všech případech se hydrogely jeví jako netoxické, jsou tedy vhodné i pro kosmetické aplikace.

Závěrem lze konstatovat, že syntéza SCN/DAC hydrogelů je možná, výsledné produkty nejsou cytotoxické a velmi rychle uvolňují absorbovanou aktivní látku, což je činí vhodnými kandidáty pro využití v kosmetice.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SAHOO, Prasanta, Suman Kalyan DAS a J. PAULO DAVIM. Tribology of materials for biomedical applications. In: *Mechanical Behaviour of Biomaterials* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2021-11-28], s. 1–45. ISBN 978-0-08-102174-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102174-3.00001-2
- [2] WASUPALLI, Geeta K. a Devendra VERMA. Polysaccharides as biomaterials. In: *Fundamental Biomaterials: Polymers* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2021-11-28], s. 37–70. ISBN 978-0-08-102194-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102194-1.00003-7
- [3] PANDEY, Ashok, Rainer HÖFER a Mohammad TAHERZADEH. *Industrial biorefineries and white biotechnology*. Amsterdam Boston Heidelberg: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-444-63453-5.
- [4] LI, Zhihan, Fei YANG a Rendang YANG. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **75**, 378–387 [vid. 2021-11-29]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.01.056
- [5] RYAN, Catherine, Emma ALCOCK, Finbarr BUTTIMER, Michael SCHMIDT, David CLARKE, Martyn PEMBLE a Maria BARDOSOVA. Synthesis and characterisation of cross-linked chitosan composites functionalised with silver and gold nanoparticles for antimicrobial applications. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2017, **18**(1), 528–540 [vid. 2021-11-29]. ISSN 1468-6996, 1878-5514. Dostupné z: doi:10.1080/14686996.2017.1344929
- [6] MITURA, Stanisław, Alina SIONKOWSKA a Amit JAISWAL. Biopolymers for hydrogels in cosmetics: review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2020, **31**(6), 50 [vid. 2022-04-14]. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-020-06390-w
- [7] NURUNNABI, Md, Vishnu REVURI, Kang Moo HUH a Yong-kyu LEE. Polysaccharide based nano/microformulation: an effective and versatile oral drug delivery system. In: *Nanostructures for Oral Medicine* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2022-05-11], s. 409–433. ISBN 978-0-323-47720-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-47720-8.00015-8
- [8] THOMAS, Linda V., Julian W.T. WIMPENNY a John G.DAVIS. Effect of three preservatives on the growth of *Bacillus cereus*, Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, on plates with gradients of pH and sodium chloride concentration. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1993, **17**(4), 289–301 [vid. 2021-11-29]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(93)90199-Q
- [9] GREENER, B., A.A. HUGHES, N.P. BANNISTER a J. DOUGLASS. Proteases and pH in chronic wounds. *Journal of Wound Care* [online]. 2005, **14**(2), 59–61 [vid. 2021-11-29]. ISSN 0969-0700, 2052-2916. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2005.14.2.26739
- [10] SHU, X. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, **212**(1), 19–28 [vid. 2022-04-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(00)00582-2
- [11] BROEK, Lambertus A.M. a Carmen G. BOERIU, ed. *Chitin and Chitosan: Properties and Applications* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2019 [vid. 2021-11-29]. ISBN 978-1-119-45043-6. Dostupné z: doi:10.1002/9781119450467
- [12] ARANAZ, Inmaculada, Niuris ACOSTA, Concepción CIVERA, Begoña ELORZA, Javier MINGO, Carolina CASTRO, María GANDÍA a Angeles HERAS CABALLERO. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives.

- Polymers* [online]. 2018, **10**(2), 213 [vid. 2022-04-21]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10020213
- [13] JIMTAISONG, A. a N. SAEWAN. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2014, **36**(1), 12–21 [vid. 2022-04-27]. ISSN 01425463. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12102
- [14] WANG, Shurong a Zhongyang LUO. *Pyrolysis of Biomass* [online]. B.m.: De Gruyter, 2016 [vid. 2021-12-06]. ISBN 978-3-11-036963-2. Dostupné z: doi:10.1515/9783110369632
- [15] YANG, Yushan, Huajie SHEN a Jian QIU. Bio-inspired self-bonding nanofibrillated cellulose composite: A response surface methodology for optimization of processing variables in binderless biomass materials produced from wheat-straw-lignocelluloses. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **149**, 112335 [vid. 2022-05-11]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2020.112335
- [16] MÜNSTER, Lukáš, Michaela FOJTŮ, Zdenka CAPÁKOVÁ, Tomáš VACULOVÍČ, Michaela TVRDOŇOVÁ, Ivo KUŘITKA, Michal MASÁŘÍK a Jan VÍCHA. Selectively Oxidized Cellulose with Adjustable Molecular Weight for Controlled Release of Platinum Anticancer Drugs. *Biomacromolecules* [online]. 2019, **20**(4), 1623–1634 [vid. 2022-02-11]. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b01807
- [17] DVOŘÁČKOVÁ, Svatava. *Chemie pro každého, aneb, Rychlokurz chemie*. Olomouc: Rubico, 2011. ISBN 978-80-7346-098-3.
- [18] NAYAK, Amit Kumar, Md Saquib HASNAIN, Kunal PAL, Indranil BANERJEE a Dilipkumar PAL. Gum-based hydrogels in drug delivery. In: *Biopolymer-Based Formulations* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-04-07], s. 605–645. ISBN 978-0-12-816897-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816897-4.00025-4
- [19] *Hydrogels Based on Natural Polymers* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2021-12-01]. ISBN 978-0-12-816421-1. Dostupné z: doi:10.1016/C2018-0-00171-1
- [20] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105–121 [vid. 2021-12-02]. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [21] SHAO, Pengyu, Bochu WANG, Yazhou WANG, Jun LI a Yiqiong ZHANG. The Application of Thermosensitive Nanocarriers in Controlled Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2011, **2011**, 1–12 [vid. 2022-02-15]. ISSN 1687-4110, 1687-4129. Dostupné z: doi:10.1155/2011/389640
- [22] RATNER, B. D., ed. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 978-0-12-582463-7.
- [23] MAHINROOSTA, Mostafa, Zohreh JOMEH FARSANGI, Ali ALLAHVERDI a Zahra SHAKOORI. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry* [online]. 2018, **8**, 42–55 [vid. 2022-04-08]. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2018.02.004
- [24] HENNINK, W.E a C.F VAN NOSTRUM. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2002, **54**(1), 13–36 [vid. 2022-04-08]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00240-X
- [25] REDAELLI, F., M. SORBONA a F. ROSSI. Synthesis and processing of hydrogels for medical applications. In: *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2022-04-08], s. 205–228. ISBN 978-0-08-100262-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100262-9.00010-0
- [26] GAO, Cong, Shuo WANG, Baojie LIU, Shuangquan YAO, Yi DAI, Long ZHOU, Chengrong QIN a Pedram FATEHI. Sustainable Chitosan-Dialdehyde Cellulose

- Nanocrystal Film. *Materials* [online]. 2021, **14**(19), 5851 [vid. 2022-04-08]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14195851
- [27] MI, Yingqi, Yuan CHEN, Wenqiang TAN, Jingjing ZHANG, Qing LI a Zhanyong GUO. The influence of bioactive glyoxylate bearing Schiff base on antifungal and antioxidant activities to chitosan quaternary ammonium salts. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **278**, 118970 [vid. 2022-04-08]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118970
- [28] ARGENTA, Débora F., Talitha C. DOS SANTOS, Angela M. CAMPOS a Thiago CAON. Hydrogel Nanocomposite Systems. In: *Nanocarriers for Drug Delivery* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2022-04-10], s. 81–131. ISBN 978-0-12-814033-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814033-8.00003-5
- [29] MÜNSTER, Lukáš, Jan VÍCHA, Jiří KLOFÁČ, Milan MASAŘ, Pavel KUCHARCZYK a Ivo KURITKA. Stability and aging of solubilized dialdehyde cellulose. *Cellulose* [online]. 2017, **24**(7), 2753–2766 [vid. 2022-04-10]. ISSN 0969-0239, 1572-882X. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-017-1314-x
- [30] YANG, Ting. *Mechanical and swelling properties of hydrogels* [online]. Stockholm: Chemical Science and Engineering, KTH Royal Institute of Technology, 2012 [vid. 2022-05-04]. ISBN 978-91-7501-471-5. Dostupné z: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:kth:diva-105539> urn:nbn:se:kth:diva-105539
- [31] AHEARNE, Mark, Ying YANG, Alicia J EL HAJ, Kong Y THEN a Kuo-Kang LIU. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2005, **2**(5), 455–463 [vid. 2022-04-23]. ISSN 1742-5689, 1742-5662. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2005.0065
- [32] MEZGER, Thomas G. *The rheology handbook: for users of rotational and oscillation rheometers*. Hannover: Vincentz, 2002. Coatings compendia. ISBN 978-3-87870-745-5.
- [33] WEITZ, D. *Oscillatory Rheology Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials*. B.m.: GIT laboratory journal Europe. 2007
- [34] MERKUS, Henk G. Measurement of Particle Size, Shape, Porosity and Zeta-potential. In: Henk G. MERKUS a Gabriel M.H. MEESTERS, ed. *Particulate Products* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2014 [vid. 2022-04-29], Particle Technology Series, s. 59–96. ISBN 978-3-319-00713-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-00714-4_3
- [35] ROUQUEROL, Françoise, Jean ROUQUEROL a Kenneth SING. Introduction. In: *Adsorption by Powders and Porous Solids* [online]. B.m.: Elsevier, 1999 [vid. 2022-04-29], s. 1–26. ISBN 978-0-12-598920-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012598920-6/50002-6
- [36] REICHEL, Rudolf. Scanning Electron Microscopy. In: Peter W. HAWKES a John C. H. SPENCE, ed. *Science of Microscopy* [online]. New York, NY: Springer New York, 2007 [vid. 2022-04-29], s. 133–272. ISBN 978-0-387-25296-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-49762-4_3
- [37] ZAGÓRSKA-DZIOK, Martyna a Marcin SOBCZAK. Hydrogel-Based Active Substance Release Systems for Cosmetology and Dermatology Application: A Review. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(5), 396 [vid. 2022-04-26]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12050396
- [38] B??HM, Stanislav a Svatava SMRCKOV??-VOLTROV?? *Struktur?? anal??za organick??ch sloučenin*. Praha: Vysok?? skola chemicko-technologick??, 1995. ISBN 978-80-7080-235-9.

- [39] ALLEN, V. G., K. R. POND, K. E. SAKER, J. P. FONTENOT, C. P. BAGLEY, R. L. IVY, R. R. EVANS, R. E. SCHMIDT, J. H. FIKE, X. ZHANG, J. Y. AYAD, C. P. BROWN, M. F. MILLER, J. L. MONTGOMERY, J. MAHAN, D. B. WESTER a C. MELTON. Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock— A review. *Journal of Animal Science* [online]. 2001, **79**(E-Suppl), E21 [vid. 2021-11-30]. ISSN 0021-8812. Dostupné z: doi:10.2527/jas2001.79E-SupplE21x
- [40] SHAHIDI, Fereidoon, ed. *Handbook of antioxidants for food preservation*. Sawston, Cambridge, UK ; Waltham, MA, USA: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, 2015. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition, number 276. ISBN 978-1-78242-089-7.
- [41] INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.) a PANEL ON MICRONUTRIENTS. *DRI: dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients ... and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine*. [online]. Washington, D.C.: National Academy Press, 2002 [vid. 2022-02-15]. ISBN 978-0-309-51199-5. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/id/10032471>
- [42] DAYAN, Nava, ed. *Skin aging handbook: an integrated approach to biochemistry and product development*. Norwich, NY: William Andrew, 2008. Personal care and cosmetic technology. ISBN 978-0-8155-1584-5.
- [43] TOTALBOOX a TBX. *Analysis of Cosmetic Products*. [online]. B.m.: Elsevier Science, 2011 [vid. 2022-02-15]. ISBN 978-0-08-047531-8. Dostupné z: <http://www.totalboox.com/book/id-7978280814405586474>
- [44] GALANAKIS, Charis M., ed. *Polyphenols: properties, recovery, and applications*. Duxford, United Kingdom: Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier, 2018. ISBN 978-0-12-813572-3.
- [45] CHUA, Lee Suan. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2013, **150**(3), 805–817 [vid. 2022-03-08]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2013.10.036
- [46] HYUN, Hanbit, Heajin PARK, Jaehoon JEONG, Jihye KIM, Haesung KIM, Hyun Il OH, Hye Seong HWANG a Ha Hyung KIM. Effects of Watercress Containing Rutin and Rutin Alone on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Osteoblast-like MG-63 Cells. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* [online]. 2014, **18**(4), 347 [vid. 2022-03-17]. ISSN 1226-4512, 2093-3827. Dostupné z: doi:10.4196/kjpp.2014.18.4.347
- [47] AL-DHABI, Naif Abdullah, Mariadhas VALAN ARASU, Chang Ha PARK a Sang Un PARK. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal; 14:Doc59; ISSN 1611-2156* [online]. 2015 [vid. 2022-03-17]. Dostupné z: doi:10.17179/EXCLI2014-663
- [48] HERMAN, A. a A. P. HERMAN. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. *Skin Pharmacol Physiol* [online]. nedatováno, **2013**. Dostupné z: doi:10.1159/000343174
- [49] MUCHOVÁ, Monika, Lukáš MÜNSTER, Alžběta VÁVROVÁ, Zdenka CAPÁKOVÁ, Ivo KUŘITKA a Jan VÍCHA. Comparison of dialdehyde polysaccharides as crosslinkers for hydrogels: The case of poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **279**, 119022 [vid. 2022-05-06]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.119022
- [50] QIN, C, H LI, Q XIAO, Y LIU, J ZHU a Y DU. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2006, **63**(3), 367–374 [vid. 2022-05-06]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2005.09.023

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BET	adsorpční izoterma (Brauer, Emmett, Teller)
CMCS	karboxymethylchitosan
DAC	dialdehyd celulózy
DCC	dikarboxycelulóza
EWC	obsah vody při rovnovážném stavu zbobtnání
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
M _w	střední molekulová hmotnost
MTT	thiazolová sůl (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)
SCN	soluble chitosan, chitosan rozpustný ve fyziologickém roztoku
SEM	řádková elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEWL	transepidermální ztráta vody

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura chitinu	13
Obrázek 2: Chemická struktura chitosanu[7]	13
Obrázek 3: Závislost bobtnacího poměru na pH prostředí[10].....	14
Obrázek 4: Chemický vzorec celulózy [15]	16
Obrázek 5: Schéma přípravy DCC [16].....	17
Obrázek 6: Schématické znázornění vzniku Schiffovy báze	23
Obrázek 7: Znázornění vzniku Schiffovy báze u reakce chitosanu a DAC [26].....	24
Obrázek 8: Napěťová odezva pro různé materiály[33].....	26
Obrázek 9: Chemická struktura vitamínu A	31
Obrázek 10: Chemická struktura vitamínu C	32
Obrázek 11: Chemická struktura niacinu.....	33
Obrázek 12: Chemická struktura rutinu.....	35
Obrázek 13: Chemická struktura kofeinu	36
Obrázek 14: Schéma přípravy DAC[16]	41
Obrázek 15: IR spektrum DAC	46
Obrázek 16: IR spektrum chitosanu.....	46
Obrázek 17: IR spektrum SCN	47
Obrázek 18: Rovnovážné zbobtnání v závislosti na množství DAC	49
Obrázek 19: EWC (%) v závislosti na množství DAC	49
Obrázek 20: Gelová frakce (%) v závislosti na množství DAC	50
Obrázek 21: Závislost dynamického modulu na úhlové frekvenci.....	51
Obrázek 22: Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci	52
Obrázek 23: Závislost damping faktoru na úhlové frekvenci.....	53
Obrázek 24: Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci	54
Obrázek 25: Mikrofotografie 2% a 5% vzorku pořízené pomocí SEM při zvětšení 100 000x	55
Obrázek 26: Kalibrační křivka kofeinu	56
Obrázek 27: Procento uvolňování aktivní látky v čase.....	57
Obrázek 28: Cytotoxicita filmů SCN-DAC s různými koncentracemi DAC (2 %; 5 %; 10 %; 20 %) v přímém kontaktu s NIH/3T3 buňkami. Přerušovaná čára zvýrazňuje hranici životaschopnosti.....	58
Obrázek 29: Reference.....	59
Obrázek 30: SCN/DAC_2%, vlevo: růst buněk přímo na filmu, vpravo: růst buněk v přítomnosti filmu	59
Obrázek 31: SCN/DAC_5%	60

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání chitinu a chitosanu.....	14
Tabulka 2: Značení a složení vzorků SCN/DAC.....	45
Tabulka 3: Vypočítané průměrné hodnoty parametru sítě.....	48
Tabulka 4: Naměřené hodnoty dynamického modulu.....	50
Tabulka 5: Naměřené hodnoty ztrátového modulu G''	52
Tabulka 6: Dopočítané hodnoty damping faktoru (tlumící faktor).....	53
Tabulka 7: Dopočítané hodnoty komplexního modulu.....	54
Tabulka 8: Hodnoty kalibrační křivky kofeinu.....	56