

Příprava a vlastnosti hydrogelů na bázi chitosanu a želatiny

Bc. Julie Dvořáčková

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Julie Dvořáčková
Osobní číslo:	T23241
Studijní program:	N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Příprava a vlastnosti hydrogelů na bázi chitosanu a želatiny

Zásady pro vypracování

Teoretická část bude pojednávat o přípravě, vlastnostech a využití hydrogelů připravených z chitosanu a želatiny. Cílem praktické části je připravit hydrogely na bázi chitosanu a želatiny a zhodnotit jejich vlastnosti. Dále popsat vliv složení a procesních podmínek na vybrané vlastnosti hydrogelů.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Pal, Kunal Banerjee, Indranil. (2018). Polymeric Gels – Characterization, Properties and Biomedical Applications. Elsevier.
- [2] Chen, Yu. (2020). Hydrogels Based on Natural Polymers. Elsevier.
- [3] HONG, Fandi; QIU, Peng; WANG, Yufan; REN, Peirou; LIU, Jiaxin et al. Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review. Online. *Food Chemistry: X*. 2024, roč. 21. ISSN 25901575.
- [4] Odborné publikace z WOS, ScienceDirect, Scopus, Knovel apod.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Ondřej Krejčí, Ph.D.**
Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání diplomové práce: **10. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- 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 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 na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....

podpis autora

ABSTRAKT

Využití biopolymerů k přípravě hydrogelů je v dnešní době velmi populární. Jsou biokompatibilní, mají výbornou biologickou rozložitelnost a také nízkou nákladovost ve srovnání se syntetickými polymery. Tato práce se věnuje přípravě hydrogelů na bázi chitosanu a želatiny zesíťovaných glutaraldehydem. Dvěma odlišnými postupy jsou připraveny dvě série hydrogelů – gely a filmy. Rozdílný způsob přípravy ovlivňuje vlastnosti připravených hydrogelů. Ty jsou hodnoceny vybranými metodami, jmenovitě stanovením sušiny a botnací schopností, viskozity, mechanických vlastností, mikroskopií a infračervenou spektroskopií. Závěrem je uvedeno statistické vyhodnocení dvou metod. Byl potvrzen nárůst viskozity s vyšším obsahem síťovacího činidla. Také bylo prokázáno, že způsob přípravy má vliv na botnací schopnost.

Klíčová slova: hydrogely, chitosan, želatina, glutaraldehyd

ABSTRACT

The use of biopolymers to make hydrogel is very popular today. They are biocompatible, have excellent biodegradability and low cost compared to synthetic polymers. This work is dedicated to the preparation of hydrogels based on chitosan and gelatine cross-linked with glutaraldehyde. Two series of hydrogels, in the form of gels and films, are prepared using two different methods. The different preparation methods influence the properties of the prepared hydrogels. These are evaluated by selected methods, namely determination of dry weight, swelling ratio, viscosity, mechanical properties, microscopy and infrared spectroscopy. Finally, the two methods are statistically evaluated. An increase in viscosity with a higher content of cross-linking agent was confirmed. It was demonstrated that preparation method affects the swelling capacity.

Keywords: hydrogels, chitosan, gelatine, glutaraldehyde

Touto cestou bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce Ing. Ondřeji Krejčímu, PhD. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále za ochotu, trpělivost a čas, kterou mi věnoval při zpracovávání této diplomové práce.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIOPOLYMERY	13
1.1 CHITOSAN	14
1.1.1 Chitin jako prekurzor chitosanu	14
1.1.2 Výroba chitosanu	16
1.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti	17
1.1.4 Biologické vlastnosti	19
1.2 ŽELATINA.....	21
1.2.1 Kolagen jako prekurzor želatiny	22
1.2.2 Výroba želatiny	23
1.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti	24
1.2.4 Biologické vlastnosti	25
2 HYDROGELY.....	26
2.1 KLASIFIKACE HYDROGELŮ	27
2.2 SYNTÉZA HYDROGELŮ	28
2.3 HYDROGELY NA BÁZI CHITOSANU A ŽELATINY	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
3 CÍL PRÁCE	33
4 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ NA BÁZI CHITOSANU A ŽELATINY	34
4.1 CHEMIKÁLIE.....	34
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	34
4.3 METODIKA	34
4.3.1 Příprava směsí chitosan/želatina	34
4.3.2 Příprava vzorků	35
4.3.3 Příprava filmů na bázi chitosan/želatina	35
4.3.4 Příprava gelů na bázi chitosan/želatina	36
4.3.5 Stanovení obsahu sušiny	37
4.3.6 Botnání	37
4.3.7 FTIR analýza	38
4.3.8 Viskozita	38
4.3.9 Tahová zkouška.....	39
4.3.10 Mikroskopie	40
4.3.11 Statistické vyhodnocení	40
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
5.1 PŘÍPRAVA FILMŮ A GELŮ	41
5.2 STANOVENÍ OBSAHU SUŠINY	42
5.3 BOTNÁNÍ	43

5.4	FTIR ANALÝZA	45
5.5	VISKOZITA.....	46
5.6	TAHOVÁ ZKOUŠKA	49
5.7	MIKROSKOPIE.....	52
6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	54
6.1	VYHODNOCENÍ JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ – DYNAMICKÁ VISKOZITA.....	54
6.2	VYHODNOCENÍ JEDNOTLIVÝCH FAKTORŮ – MEZ PEVNOSTI V TAHU	57
	ZÁVĚR.....	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
	SEZNAM TABULEK.....	69
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	70

ÚVOD

V posledních letech se stále více přiklání k využívání přírodních materiálů, podporuje se udržitelnost a dbá se na stav životního prostředí. To se promítá v různých oblastech, ať už se jedná o obalové materiály, biokosmetiku nebo zemědělství.

Syntetické polymery byly dříve velmi vyhledávané, ale postupem času se od nich stále více upouští. Jejich existence je spojována s mnoha enviromentálními i zdravotními riziky. Nyní se dostávají do popředí biopolymery. Biopolymery jsou látky přírodního původu, které jsou získávány ze živočichů, rostlin i mikroorganismů. Vyznačují se svojí vysoce organizovanou strukturou, která se pojí s existencí biologické aktivity. Tyto látky nacházejí uplatnění napříč různými průmyslovými sektory. Mimo jiné, hojně se uplatňují v biomedicině jako scaffolds, biosenzory anebo jako obvazové materiály. Výhodou biopolymerů je jejich biologická odbouratelnost, biokompatibilita, obnovitelnost a šetrnost k životnímu prostředí.

Hydrogely jsou neodmyslitelnou součástí života mnohých z nás. Můžou to být kontaktní čočky, hydrogelové masky nebo hydrogelové nosiče léčiv. Hydrogely se vyznačují svojí jedinečnou vlastností, a to absorbovat a zadržovat velká kvanta tekutin, aniž by se rozpustily. Toto chování je dáno existencí trojrozměrné sítě, která tvoří základní strukturu hydrogelu. Hydrogelová síť vzniká na základě fyzikálního nebo chemického zesíťování. I když je fyzikální síťování reverzibilní, v některých aplikacích je upřednostňováno před chemickým. Aby došlo k zesíťování chemickou cestou, je za potřebí síťovací činidlo. Ačkoli mají chemicky zesíťované gely pevnější ireverzibilní síť, jejich použití je omezeno na základě toxicity většiny síťovacích činidel.

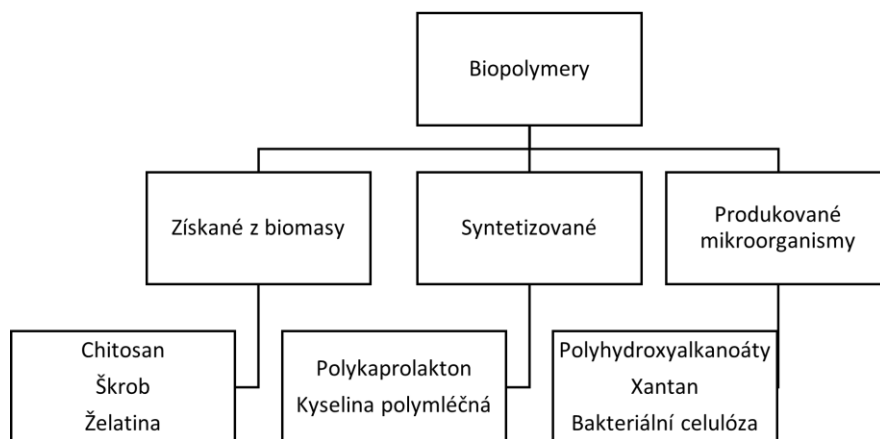
Hydrogely z přírodních polymerů mohou být dvojího typu, a to na bázi proteinů anebo polysacharidů. Také mohou být jejich kombinací. Ukázkovým příkladem jsou hydrogely na bázi chitosanu a želatiny, o kterých pojednává tato práce. Různý poměr chitosanu a želatiny ovlivňuje fyzikálně-chemické a mechanické vlastnosti hydrogelů. Důležitým parametrem je množství síťovacího činidla v systému, které má často vyšší vliv na vlastnosti hydrogelu než samotné zastoupení biopolymerů. Chování hydrogelu je také ovlivněno metodou přípravy. Hydrogely na bázi chitosanu a želatiny se dnes běžně využívají jako polymerní nosiče v systému dodávání léčiv, nacházejí uplatnění jako scaffolds v tkáňovém inženýrství a mají vysoký potenciál využití v širokém biomedicinském kontextu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOPOLYMERY

Biopolymery jsou nepostradatelnou součástí přírody. Stejně jako syntetické polymery, biopolymery jsou tvořeny monomerními, opakujícími se jednotkami. Nicméně, jsou mezi nimi významné odlišnosti. Biopolymery se vyznačují velmi dobře organizovanou strukturou a jsou schopny se formovat do vyšších charakteristických celků. Tyto atributy dávají biopolymerům biologické funkce. Syntetické polymery jsou triviálnější, a především nedisponují biologickými funkcemi. To omezuje možnosti jejich použití v určitých aplikacích a přijatelným materiálem jsou právě biopolymery. V některých případech je žádoucí, aby byl materiál biokompatibilní, biologicky rozložitelný, netoxický, modifikovatelný a udržitelný, což převážná část biopolymerů splňuje. Výchozími zdroji jsou živé organismy, zahrnující živočichy, rostliny a také mikroorganismy [1], [2], [3].

Biopolymery lze klasifikovat dle různých hledisek. V závislosti na původu mohou být rozděleny do tří základních skupin, a to 1) přírodní biopolymery získané z biomasy, 2) syntetické biopolymery získané konvenční/chemickou cestou z biomasy či ropných derivátů a 3) syntetické biopolymery získané mikrobiální syntézou anebo fermentací viz Obrázek 1 [1], [3]. Každý biopolymer je svými vlastnostmi specifický a výběr vhodného polymeru pro danou aplikaci je zásadní. Od počátku praktického využívání biopolymerů došlo k výraznému pokroku. Tato oblast je soustavně studována a stále jsou objevovány inovativní přístupy a řešení. Dnes nacházejí významné uplatnění v biomedicině, farmacii, potravinářství, zemědělství či chemickém průmyslu [1].

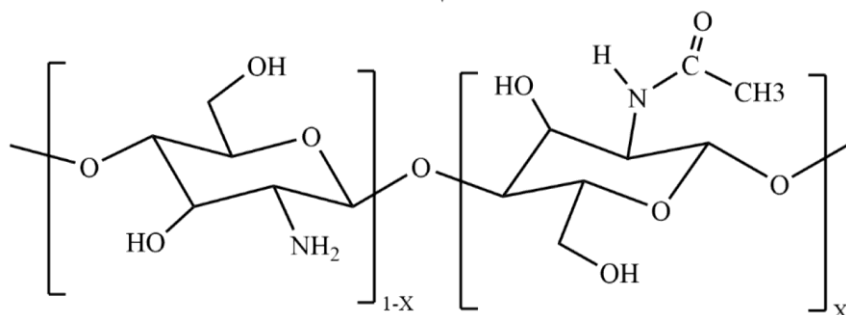


Obrázek 1 Klasifikace biopolymerů dle původu

(zdroj: [1], [3] – upraveno)

1.1 Chitosan

Chitosan je jediný kationický lineární polysacharid nacházející se v přírodě. Je složen ze dvou podjednotek, a to z N-acetylglukosaminu (acetylovaná podjednotka) a glukosaminu (deacetylovaná podjednotka) spojených $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidovou vazbou (Obrázek 2). Disponuje třemi reaktivními centry – primární a sekundární hydroxylové skupiny a aminové skupiny. Ovlivňují biologické, mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Funkční skupiny umožňují chemickou modifikaci chitosanu, čímž je chitosan využitelný v mnoha oblastech. Prostřednictvím těchto skupin dochází k chemickým změnám při protonaci. Hodnota pKa chitosanu se pohybuje okolo 6,3. Roztoky chitosanu mají obecně hodnotu pH nižší než 6,0. Při pH nižším, než je pKa mohou být aminové skupiny ($-\text{NH}_2$) na C-2 uhlíku protonovány, čímž dochází k získání polykationtového charakteru polymeru a chitosan se stává rozpustným. Nábojová hustota je závislá na počtu acetylovaných podjednotek a pH prostředí [4], [5], [6], [7]. Existují 4 krystalické polymorfy chitosanu – tři hydratované formy, schopné vytvářet ve vodě rozpustné soli s organickými a minerálními kyselinami. Čtvrtou, nehydratovanou formu je možné syntetizovat zahříváním hydratovaného chitosanu na 200 °C [8].



Obrázek 2 Struktura chitosanu

(zdroj: [9])

1.1.1 Chitin jako prekurzor chitosanu

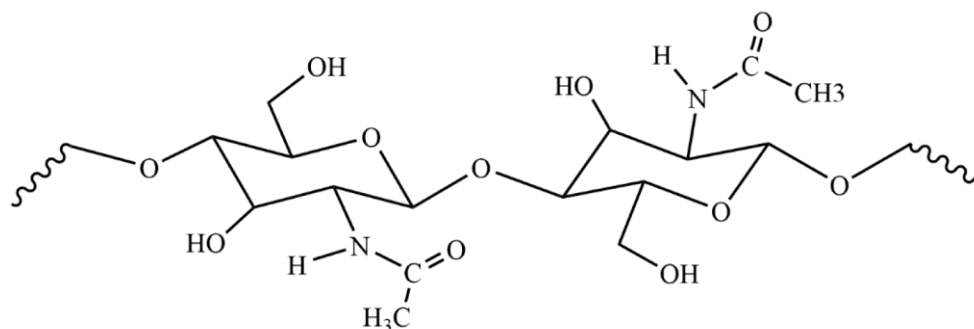
Chitin je jeden z nejrozšířenějších přírodních polysacharidů na světě [7]. Za majoritní zdroj lze považovat mořské organismy. Chitin je izolován z exoskeletu korýšů, měkkýšů a řas. Mezi suchozemské zdroje patří hmyz, u kterého je chitin přítomen v kutikule a křídlech hmyzu. Využívá se především ve farmaceutickém průmyslu, jelikož obsahuje nízké množství minerálních látek ve srovnání s mořským chitinem. Chitin je rovněž obsažen i v některých makroskopických houbách (*Mucoraceae*). V poslední době se populárním

zdrojem stal chitin mikrobiálního původu. Chitin se vyskytuje v buněčné stěně mikroskopických hub. Strukturní složky hub mohou poskytnout 22 až 44 % tohoto polysacharidu. Chitin mikrobiálního původu má mnoho výhod. Disponuje vysokou čistotou a uniformitou. Kromě toho, nepodléhá enviromentálním a sezónním výkyvům jako chitin získávaný z mořských organismů. Vhodným zdrojem jsou také kvasinky či některé sporulující bakterie (*Streptomyces sps.*), avšak za adekvátní zdroj jsou považovány pouze mikroskopické houby [10][4].

Chitin je extrahován chemickými i biologickými metodami. Zvolená metoda a její kroky závisí na zdrojovém materiálu, kterým mohou být výše zmíněné mořské organismy, hmyz anebo mikroorganismy. Za dosavadní majoritní zdroj chitinu jsou považováni mořští živočichové, zejména korýši. Exoskelet je tvořen minerálními látkami, chitin-proteinovým komplexem, barvivy, pigmenty a také lipidy. Korýši obecně obsahují 20–30 % chitinu v závislosti na jejich lokalitě výskytu. Vzhledem k tomu, že jejich schránky obsahují vyšší množství minerálních látek než jiné zdroje, proces demineralizace je nezbytným krokem při extrakci chitinu. Prvotní krok před samotnou extrakcí představují metody předběžné úpravy. Ty zahrnují odstranění měkkých tkání, a to konkrétně seškrabáváním, vařením či lisováním. Následuje mechanické rozdrcení a sušení upravené biomasy. Chemická extrakce sestává ze tří klíčových kroků – demineralizace, deproteinace, odbarvení a bělení. Nejprve je provedena demineralizace za použití silných a slabých kyselin. Nejpoužívanější silnou kyselinou je kyselina chlorovodíková, ze slabých kyselina octová a mravenčí. Tímto krokem jsou odstraněny minerály, především uhličitán vápenatý, který představuje až 50 % exoskeletu korýšů. Následuje deproteinace, při které je biomasa ošetřena alkalickými činidly, jako je hydroxid sodný anebo hydroxid draselný. Krok deproteinace je velmi důležitý, jelikož pro lidský organismus mohou být bílkoviny exoskeletu alergenní. Tento krok je přísně kontrolován při následném použití chitinu v lékařství či potravinářství. Posledním krokem při extrakci chitinu je odbarvení a bělení. Využívají se běžná organická rozpouštědla, jako je ethanol a chloroform. K bělení je vhodný peroxid vodíku a manganistan draselný. Součástí může být následná úprava zahrnující neutralizaci, sušení anebo mletí. Kromě chemické extrakce lze použít i extrakci biologickou. Ta lze provést enzymatickou nebo fermentační cestou. Obě biologické metody však mají značná úskalí při použití v průmyslovém měřítku, a proto je preferována chemická extrakce [10][5].

Chitin je lineární kopolymer složený převážně z β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranózových jednotek a malého množství β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-

glukopyranózových zbytků [6]. Strukturálně je složen z jednotek N-acetylglukosaminu spojených $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidovou vazbou. Chitin je velmi podobný celulóze. Hydroxylová skupina je nahrazena N-acetylovou skupinou (viz Obrázek 3). V pevném stavu se vyskytuje ve třech různých krystalických polymorfních strukturách – α , β , γ . Pro α -chitin jsou typické antiparalelní řetězce N-acetyl-D-glukosaminu, pro β -chitin tytéž řetězce, avšak v paralelním uspořádání a γ -chitin je specifický dvěma paralelními řetězci střídající se s jedním antiparalelním. Výskyt prvních dvou forem je v přírodě nejčastější, s γ -strukturou se lze setkat ojediněle [5], [6].



Obrázek 3 Struktura chitinu

(zdroj: [9])

1.1.2 Výroba chitosanu

Chitosan se přirozeně vyskytuje jen ve velmi malé míře. Nachází se v totožných zdrojích jako chitin, jehož původ byl popsán v kapitole 1.1.1. Chitosan se primárně získává deacetylací chitinu. Při tomto procesu dochází k přeměně N-acetylové skupiny na aminovou. Deacetylaci je možné uskutečnit pomocí kyselin i zásad. Nicméně v praxi jsou využívány zejména zásadité roztoky, jelikož glykosidová vazba je velmi náchylná k rozkladu kyselinami. Existují dva typy chemické deacetylace – homogenní a heterogenní. Homogenní deacetylace je rozdělena do dvou kroků. V prvním kroku je chitin ponechán ve slabém roztoku hydroxidu sodného po dobu cca 70 hodin za pokojové teploty. Ve druhém kroku už probíhá samotná deacetylace, kdy je chitin za mírně alkalických podmínek vystaven vyšším teplotám po dobu 12–24 hodin. Heterogenní deacetylace spočívá v působení koncentrovaných alkalických roztoků na chitin při teplotách vyšších 100 °C. Běžně se využívá hydroxid sodný jako u deproteinace chitinu, avšak ve vyšších koncentracích. Koncentrace roztoku hydroxidu sodného se pohybuje od 50–70 hm. %. Doba deacetylační reakce se pohybuje mezi 30 minutami až 5 hodinami, některé procesy mohou trvat až

24 hodin. Heterogenní metoda je hojněji využívána zejména v průmyslu, vzhledem k snadnějšímu oddělení složek reakční směsi a produktu [10][7].

Deacetylaci lze uskutečnit i biologickou cestou. Je využíván tepelně stabilní enzym chitin deacetyláza, který je extrahován z hub. Významnými zdroji jsou *Aspergillus nidulans*, *Mucor rouxii* nebo *Absidia coerulea*. Vhodným zdrojem je rovněž hmyz [10][7].

1.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Vlastnosti chitosanu jsou silně ovlivněny původem výchozí suroviny, způsobem extrakce, pořadím extrakčních kroků a následnou deacetylací [11]. Jedním z majoritních parametrů pro charakterizaci chitosanu je stupeň deacetylce (DDA – Degree of Deacetylation). Definuje rozdíl mezi chitinem a z něj konvertovaným chitosanem. Označuje procentuální podíl N-acetyl-D-glukosaminových jednotek, které byly během deacetylce nahrazeny D-glukosaminovými jednotkami. Obecně lze za chitosan považovat chitin s 50% a vyšším DDA. Lze se setkat se třemi DDA. Nízký DDA se pohybuje mezi 50-70 %. Tento typ chitosanu je téměř nerozpustný ve vodě a nachází využití v agronomickém průmyslu. Střední DDA chitosanu představuje 70-85 % a jeho rozpustnost ve vodě je omezená. Často je aplikován v kosmetickém průmyslu a potravinářství. Vysoký DDA je stanoven na 85-95 % a vykazuje dobrou rozpustnost ve vodě s využitím ve farmaceutickém a biomedicinském průmyslu. Lze se setkat s DDA vyšším než 95 %, kterého je však velmi obtížné dosáhnout [12], [13][11].

Dominantní vliv na fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti má rovněž molekulová hmotnost. Molekulová hmotnost chitosanu závisí na mnoha aspektech. Nejen, že se odvíjí od počtu monomerních jednotek v biopolymeru a distribuci molekulové hmotnosti, ale také závisí na zdrojovém materiálu, způsobu jeho přípravy a extrakce. Molekulovou hmotnost obecně snižuje DDA. Molekulová hmotnost chitosanu se běžně pohybuje od 20–1 200 kDa. Dle velikosti molekulové hmotnosti lze rozlišit tři základní typy chitosanu, a to nízkomolekulární chitosan (<150 kDa), chitosan se střední molekulovou hmotností (150– 700 kDa) a vysokomolekulární chitosan (> 700 kDa) [5], [14], [15]. Od molekulové hmotnosti se odvíjí použití chitosanu. Každý typ vykazuje odlišné vlastnosti, které jsou prezentovány v Tabulka 1. S rostoucí molekulovou hmotností klesá rozpustnost a zvyšuje se viskozita, což může být nežádoucí v různých aplikacích. Pro lepší rozpustnost a stabilitu je pro biologické a průmyslové aplikace preferován spíše nízkomolekulární chitosan [13].

Tabulka 1 Základní odlišnosti chitosanu na základě molekulové hmotnosti

Nízkomolekulární chitosan (<150 kDa)	Chitosan se střední molekulovou hmotností (150–700 kDa)	Vysokomolekulární chitosan (> 700 kDa)
Vysoký obsah dusíku	Střední obsah dusíku	Nízký obsah dusíku
Nízká viskozita	Střední viskozita	Vysoká viskozita
Velmi dobrá rozpustnost	Omezená rozpustnost	Omezená rozpustnost
Vysoká ochota k síťování	Dobrá ochota k síťování	Nízká ochota k síťování

(zdroj: [14])

Chitosan, zejména nízkomolekulárního typu, vykazuje koagulační a flokulační vlastnosti. Díky vysokému obsahu aminových skupin je schopen interakce s molekulami anionového charakteru, jako jsou proteiny, polymery či barviva. Rovněž disponuje chelatačními a komplexotvornými vlastnostmi [14][11]. Schopnost vázat kovové ionty je založena na protonaci funkčních skupin. Reaktivita stoupá s počtem pozitivně nabitých aminových skupin, které je využíváno při úpravě vod a čištění vzduchu [5].

Zatímco chitin je téměř nerozpustný, chitosan se ochotně rozpouští ve zředěných kyselých roztocích. Jsou využívány organické kyseliny, jako kyselina octová, mravenčí anebo mléčná. Chitosan je také rozpustný v 1% kyselině chlorovodíkové, avšak jeho rozpustnost v jiných anorganických kyselinách je velmi omezená. Při rozpouštění chitosanu v kyselých rozpouštědlech dochází k protonaci aminoskupin, získávají kladný náboj, a tak se stává chitosan rozpustným. Pokud hodnota pH vzroste na 6 a více, aminoskupiny ztrácejí náboj. Příliš vysoké hodnoty pH mohou způsobovat gelaci. Velmi koncentrované roztoky kyselin způsobují depolymeraci chitosanu. Kromě pH je rozpustnost chitosanu ovlivněna molekulovou hmotností, DDA, teplotou a krystalinitou [4], 13, [15][13].

Viskozita je další z důležitých parametrů, který určuje použitelnost polymerů. Viskozita běžně roste se zvyšujícím se DDA a klesá se snižující se molekulovou hmotností. Obecně je závislá na iontové síle roztoku, koncentraci, pH a teplotě rozpouštědla. Také závisí na

způsobu extrakce chitinu [5], [11]. Je dobrým ukazatelem stability chitosanu v roztoku. Během skladování může docházet k poklesu viskozity v důsledku degradace biopolymeru. U běžného chitosanu může dojít k poklesu viskozity až o 10 % během 24 hodin [4], [13]. Chitosan se běžně rozpouští ve slabých organických kyselinách. V kyselém vodném roztoku jeho viskozita klesá se zvyšující se teplotou. Vlivem změny pH roztoku může dojít k navýšení viskozity. Například viskozita chitosanu rozpuštěného ve vodném roztoku kyseliny octové se zvyšuje se snižujícím se pH [11].

Chitosan také vykazuje určitou hygroskopičnost. Přítomnost funkčních skupin zajišťuje interakci s atomem vodíku a kyslíku v molekule vody. Obecně se snižujícím se DDA obsah vody zvyšuje [5].

1.1.4 Biologické vlastnosti

Chitosan a jeho deriváty lze uplatnit v široké škále aplikací. Patří mezi populární biopolymery, což dokazují stále narůstající způsoby jeho využití ve farmacii, medicíně, tkáňovém inženýrství, potravinářství anebo v environmentálním odvětví. Benefity chitosanu jsou spjaté s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, zejména s molekulovou hmotností a DDA, které byly podrobněji popsány v kapitole 1.1.3. Chitosan vyniká svými biologickými vlastnostmi, díky nimž je řazen mezi biomateriály. Je biokompatibilní, biologicky odbouratelný, netoxický a vykazuje antimikrobní vlastnosti. S oblibou je využíván v biomedicíně. Napomáhá urychlovat hojení ran, působí protizánětlivě a figuruje jako účinná složka terapie při civilizačních onemocněních. Vykazuje antikarcinogenní aktivitu a je podpůrným prostředkem při léčbě nádorových onemocnění v kombinaci s dosavadními léčivy [16], [17]. Molekulová hmotnost zásadně ovlivňuje biologické vlastnosti chitosanu. Nízkomolekulární chitosan vykazuje početnější biologické vlastnosti. Kromě výše zmíněných charakteristik disponuje mukoadhezivním, hypolipidemickým, antikoagulačním a hypocholesterolemickým účinkem [11].

Biokompatibilita

Biokompatibilita je klíčovou vlastností chitosanu. Je dána podobností chitosanu s glykosaminoglykany (GAGs), které tvoří složku buněčných membrán. Přítomnost glykosidových vazeb ve struktuře chitosanu umožňuje snadnou degradaci *in vivo*, které je využíváno při vývoji biologicky odbouratelných nosičů léčiv [16]. K degradaci dochází působením mnoha enzymů, především lysozymu. Chitosan je biodegradován začleněním do metabolických drah GAGs a glykoproteinů [11]. N-acetylglukosamin je jedním

z meziproductů degradace chitosanu. Uplatňuje se při procesu hojení ran a vykazuje toxický účinek na některé maligní nádory *in vivo*, čehož se využívá při léčbě rakoviny [18].

Mukoadheze

Mucin je vylučován sliznicemi organismu. Jeho gelová povaha je zapříčiněna přítomností aniontových složek, a to kyselinou sialovou a kyselinou sulfonovou. Na základě kationtové povahy chitosanu dochází k iontové interakci označované jako mukoadheze, která narůstá s vyšší molekulovou hmotností a DDA. Mukoadhezivní schopnost chitosanu lze podpořit jeho modifikací. Například trimethylací chitosanu lze dosáhnout velmi silného náboje a díky methylovým skupinám je chitosan rozpustný v zásaditém a neutrálním pH. Další možností může být modifikace na karboxymethylchitosan, který je schopný mukoadheze v kyselém i zásaditém pH, čehož se využívá v systémech dodávání léčiv [16].

Antimikrobní účinek

Vzrůstající rezistence bakterií vůči antibiotikům je závažným problémem a je nutné hledat nové alternativy, které by tento problém, alespoň částečně, vyřešily. Jednou z možností je využití chitosanu a jeho derivátů. Faktorů, které vykazují antimikrobní aktivitu je vícero, avšak nejdůležitější je polykationtový charakter chitosanu. Přesný mechanismus účinku není doposud zcela popsán, avšak byly stanoveny hypotézy, které se pokusily tuto skutečnost objasnit. Chitosan může disponovat extracelulárními anebo intracelulárními účinky v závislosti na jeho molekulové hmotnosti. Vysokomolekulární chitosan není schopen pronikat přes buněčnou stěnu bakterií. Nicméně, je schopen měnit propustnost buněčné membrány a zároveň zamezit příjmu živin z vnějšího prostředí. Nízkomolekulární chitosan působí extracelulárně i intracelulárně. Ovlivňuje funkci mitochondrií a syntézu proteinů, čímž bakteriální buňku zahubí. Antimikrobní aktivita chitosanu spočívá v interakci kladně nabitého řetězce s negativně nabitou buněčnou stěnou bakterií. Dochází k narušení buněčné stěny vlivem iontové interakce. To vede k narušení rovnováhy dynamiky buněčné stěny, což má za následek únik intracelulárního obsahu bakteriální buňky do okolí [13], [16]. Akumulace chitosanu v blízkosti bakteriální buňky může způsobit vznik stresových reakcí na základě změny pH [10]. Účinná antibakteriální aktivita byla pozorována u některých patogenních druhů. Citlivost na chitosan byla zaznamenána u gram pozitivních bakterií (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), stejně tak i gram negativních (*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Enterobacter aerogenes*). Bylo zjištěno, že po odstranění chitosanu z média jsou některé bakterie schopny růstu. Chitosan a jeho deriváty tedy vykazují spíše inhibiční účinek, nikoli bakteriocidní [4]. Rovněž byl u chitosanu a jeho

derivátů prokázán antivirový a antimykotický účinek. Existence antivirového účinku je založena na stimulaci imunitní odpovědi organismu [19].

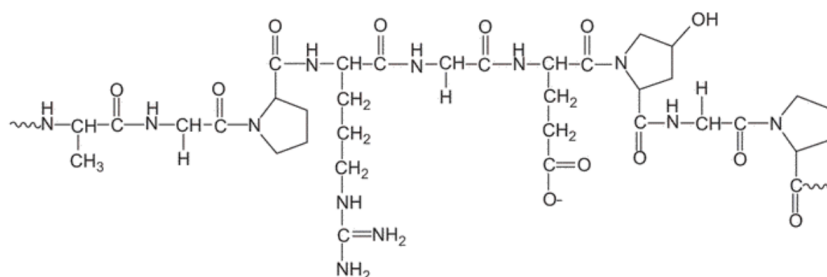
Antioxidační účinek

Chitosan je řazen mezi účinné antioxidanty. Experimentálně bylo prokázáno, že nízkomolekulární chitosan vykazuje silnější antioxidační účinek než chitosan s vyšší molekulovou hmotností [10]. Rovněž je schopen regulovat aktivitu antioxidačních enzymů a redukovat peroxidaci lipidů. Chitosan a jeho deriváty projevují svoji antioxidační aktivitu třemi způsoby. Mohou být donory protonů, elektronů anebo může docházet k chelataci železnatých iontů za vzniku komplexních sloučenin. Mezi DDA a antioxidační aktivitou není přímá souvislost. Předpokládá se, že vyšší počet aminoskupin a s tím spojený vyšší DDA zvyšuje antioxidační aktivitu chitosanu. Přítomnost volných radikálů v organismu je úzce spjata se zánětlivými procesy. Zánět je komplexní proces, který vzniká na základě poškození tkáně. I když se jedná o přirozenou imunitní odpověď, často je spíše komplikací, zejména když přechází do chronického stavu. Imunostimulační účinek je další zajímavou vlastností chitosanu. Nicméně, přesné mechanismy nejsou dosud zcela objasněny. Chitosan je schopný stimulovat buňky nespecifické imunity, které uvolňují řadu cytokinů, růstových faktorů, bioaktivních peptidů a chemokinů [10], [11].

1.2 Želatina

Želatina je získávána parciální hydrolyzou ze svého mateřského biopolymeru – kolagenu. Označení želatina pochází z latinského slova „gelata“, které popisuje její hlavní charakteristiku neboli schopnost tvořit ve vodě gel. Složení želatiny je téměř totožné jako složení kolagenu, avšak se podstatně liší svými fyzikálními vlastnostmi [20]. Hlavním rozdílem je rozpustnost. Zatímco kolagen je ve vodě nerozpustný, želatina je za vyšších teplot, než je denaturační teplota nativního kolagenu, snadno rozpustná. Při těchto teplotách, které se pohybují okolo 60 °C, se kolagen smršťuje a není schopen vázat vodu. Fyzikální a strukturální vlastnosti želatiny se odvíjí od distribuce molekulové hmotnosti a zastoupení aminokyselin. Želatina obecně obsahuje 18 aminokyselin, přičemž nejvíce je zastoupen glycin (26 %), dále prolin (16 %) a 4-hydroxyprolin (14 %). Charakteristická struktura želatiny je znázorněna níže (Obrázek 4). Na základě jejího složení disponuje amfoterním charakterem. Izoelektrický bod se pohybuje mezi 4,8–9,4. Závisí ovšem na použité surovině a metodě přípravy, o kterých pojednává kapitola 1.2.1. Želatina získaná kyselou hydrolyzou (typ A) vykazuje vyšší izoelektrický bod než alkalicky zpracovaná želatina (typ B). Je směsí

různých polypeptidových řetězců s různou molekulou hmotností v rozmezí 15–400 kDa. Může se jednat o α -řetězce (80–125 kDa), které jsou tvořeny pouze jedním polypeptidovým řetězcem, β -řetězce (160–250 kDa) sestávající ze dvou kovalentně zesíťovaných α -řetězců, anebo γ -řetězce (240–375 kDa), které jsou složeny ze tří kovalentně zesíťovaných α -řetězců [20], [21], [22].



Obrázek 4 Primární struktura želatiny

(zdroj: [23])

1.2.1 Kolagen jako prekurzor želatiny

Kolagen je nerozšířenější strukturální skleroprotein. Pod pojmem kolagen se skrývá celá rodina proteinů, přičemž doposud bylo identifikováno 28 typů kolagenu. Je hlavním extracelulárním proteinem pojivových tkání živočichů. Jeho početné zastoupení není jen v souvislosti s pojivem, ale i s celým organismem, kde každou třetí molekulu představuje kolagen [24]. Kolagen je dominantním prvkem kůže, šlach, kostí a chrupavek. Dále je stavební složkou tkání a orgánů. Nejrozšířenějším typem je kolagen I s výskytem v kůži, kostech a šlachách. Struktura kolagenu je velmi komplexní. Hlavními složkami, stejně jako u želatiny, jsou aminokyseliny glycin, prolin a hydroxyprolin, bez ohledu na typ kolagenu. Molekula kolagenu je složena ze tří polypeptidových řetězců, které společně tvoří trojitý helix (prokolagen). Prostřednictvím extracelulární modifikace jsou z prokolagenu odštěpeny aminoskupiny a karboxylové skupiny. Pomocí zkřížených vazeb dochází k formování fibril za vzniku tropokolagenu. Následně jsou molekuly tropokolagenu formovány do mikrofibril, které jsou nakonec uspořádány do fibril kolagenu. Je nutné zmínit, že kolagen podléhá velkému množství posttranslačních úprav. Zrání kolagenu má vícestupňový charakter, přičemž se částečně odehrává ve fibroblastu a částečně mimo něj. Molekulová hmotnost kolagenu je přibližně 300 kDa [25], [26], [27].

1.2.2 Výroba želatiny

Při hydrolýze kolagenu dochází k destrukci křížových vazeb mezi polypeptidovými řetězci a částečnému štěpení polypeptidových vazeb. Zjednodušeně řečeno, dochází k rozkladu sekundárních a vyšších struktur polypeptidového řetězce. Tento proces je uskutečňován prostřednictvím kyselé, alkalické anebo enzymatické hydrolýzy. Želatinu je možné získat z jakéhokoli zdroje, který obsahuje kolagenovou tkáň. Mezi preferované zdroje kolagenu patří hovězí nebo vepřová kůže, kosti a šlachy. Dalšími zdroji jsou ryby a v menším množství je želatina získávána z drůbeže. Výrobní proces zahrnuje několik kroků a závisí na zvoleném vstupním materiálu. Nejprve je vstupní materiál zbaven nečistot. Po očištění, drcení a opakovaném opláchnutí následuje macerace. V případě kostí jde o vystavení odtučněných rozdrčených kostí 4–7% kyselině chlorovodíkové po minimální dobu dvou dnů. Tímto procesem jsou odstraněny minerální látky, jako je hydroxyapatit a uhličitán vápenatý. Na konci tohoto procesu je získána houbovitá kostní tkáň proteinového charakteru nazývaná ossein. Následně je surovina vystavena předběžnému kyselému nebo alkalickému ošetření [20], [26].

Želatina typu A je získána prostřednictvím kyselé předúpravy. Materiál je ponořen do zředěné minerální kyseliny, obvykle po dobu několika hodin až jednoho dne. Závisí na tloušťce a velikosti vstupní suroviny. Následně je materiál neutralizován. Želatinu je možné podrobit také alkalické předúpravě. Tímto procesem je získána želatina typu B. K této úpravě se využívají různá alkalická činidla. Nejběžněji se využívá nasycený roztok vápna. Směs je míchána při teplotě 24 °C po dobu 20 dní až 6 měsíců, kdy opět závisí na tloušťce a druhu suroviny. Po dokončení je materiál opět neutralizován a následně ošetřen zředěnou kyselinou chlorovodíkovou k dosažení požadovaného pH pro extrakci. Extrakce je prováděna ve více fázích. Upravený materiál je umístěn do extrakčních nádob a po třech až pěti cyklech je přidávána teplá voda se vzrůstající teplotou od 55–100 °C. Tímto krokem je získána směs polypeptidových řetězců s různým složením a molekulovou hmotností. Vodné roztoky jsou v několika cyklech koncentrovány odpařováním a následně sterilizovány. Sterilizace může být prováděna pomocí deskových výměníků tepla tzv. nepřímou sterilizací nebo přímou parní sterilizací. Poté následuje chlazení, při kterém koncentrovaný roztok geluje. Následuje sušení. Obsah vlhkosti želatiny se pohybuje od 2–12 % v závislosti na jejím následném použití. Finálním krokem je rozdrčení nebo mletí [20], [26].

Enzymatická hydrolýza kolagenu má oproti výše zmíněným způsobům několik výhod. Získaná želatina má vyšší nutriční hodnotu, enzymatický proces je méně časově náročný,

produkce odpadu je nižší, nicméně je finančně nákladnější. K enzymatické hydrolyze jsou uplatňovány enzymy jako jsou trypsin, alkaláza a flavorzym v přítomnosti kyseliny octové. Extrakce je zprostředkována filtrací a dialýzou. V kombinaci s chemickými a enzymatickými metodami je uplatňován ultrazvuk. Běžně je aplikována frekvence o velikosti 20–40 kHz. Integrací ultrazvuku je zvýšena výtěžnost a zkrácena doba zpracování [1].

1.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Nejdůležitější charakteristikou želatiny je pevnost a viskozita gelu. Závisí na koncentraci, pH, teplotě a přítomnosti aditiv. Také se odvíjí od vlastní pevnosti želatiny, která je dána distribucí molekulové hmotnosti a strukturou. Želatina je také známá pro svůj hygroskopický charakter. Pro želatinu je specifické její botnání ve studené vodě. K rozpuštění ve vodě je nutné teplotu zvýšit na více než 60 °C. Ochotně se rozpouští ve vysoce polárních organických rozpouštědlech, jako je kyselina octová či amid kyseliny mravenčí. Glycerol nebo propylenglykol mohou být rovněž vhodnými rozpouštědly [21]. Želatina tvoří v teplé vodě náhodně rozmístěná klubka, což vede k tvorbě viskózního roztoku. Při ochlazování dochází k přechodu na trojitý helix a k formování struktury podobné kolagenu. Vzniká fyzikální termoreverzibilní gel, který sestává ze sítě molekul želatiny. I když lze opětovně přecházet mezi stavem sol-gel, opětovné zahřívání a ochlazování může vést k zhoršení vlastností želatiny. Na rozdíl od jiných hydrokoloidů, tvorba gelu není závislá na pH ani na přídavku látek iniciujících gelaci [28]. Pevnost želatinového gelu je vyjádřena tzv. Bloomovou hodnotou. Dle této hodnoty lze želatinu kategorizovat na nízký Bloom (<150 g), střední Bloom (150–220 g) a vysoký Bloom (> 220 g). Pro komerční želatiny je obecně nejvhodnější Bloomova hodnota v rozmezí 250–260 g [2].

Vliv distribuce molekulové hmotnosti na viskozitu je podstatně větší než na pevnost gelu. Želatiny, které vykazují vyšší pevnost gelu mohou mít nižší viskozitu než želatiny s nižší pevností gelu. Roztoky želatiny vykazují vyšší viskozitu se snižující se koncentrací a teplotou, přičemž nejnižší viskozitu vykazují roztoky v tzv. izoionickém bodě. V této oblasti pH, kdy roztok želatiny neobsahuje jiné nekoloidní ionty než H^+ a OH^- , je tento roztok nazýván jako izoionická želatina [21][2].

Želatina je také schopna tvořit film. Tato vlastnost je uplatňována například při výrobě želatinových kapslí nebo mikroenkapsulaci. Želatinové filmy se rovněž uplatňují při výrobě biosenzorů [21].

1.2.4 Biologické vlastnosti

Želatina vyniká svojí výbornou biokompatibilitou, biologickou rozložitelností a nízkou antigenní aktivitou. Na základě těchto vlastností je hojně využívaným materiálem v tkáňovém inženýrství, zejména také pro schopnost podporovat adhezi a proliferaci buněk [29]. Mnohé proteiny, včetně kolagenu a jeho derivátu, želatiny, obsahují specifickou sekvenci arginin-glycin-aspartát, která napomáhá buněčné adhezi. Hydrofilní povahy želatiny je také využíváno v kombinaci s hydrofobními materiály k optimalizaci jejich fyzikálně-chemických vlastností [30].

2 HYDROGELY

Hydrogely jsou unikátní materiály, často sestávající z hydrofilních polymerů. Jejich jedinečnou vlastností je schopnost absorbovat a nadále zadržovat vysoké množství kapalin či biologických tekutin, aniž by ztratily svoji fyzikální strukturu [25][12]. Struktura představuje třídímenzionální síť vzájemně propojených polymerních řetězců. Hydrogely jsou rovněž významné z hlediska elasticity a tvarovatelnosti, což rozšiřuje možnosti jejich využití [31]. Přítomnost hydrofilních skupin v hlavním polymerním řetězci umožňuje absorpci velkého množství vody, zatímco polymerní síť udržuje strukturu stabilní. Hydrogely lze obecně připravit z jakéhokoliv polymeru, který disponuje různými hydrofilními skupinami. Může se jednat o hydroxylové, karboxylové, sulfonové, amidové nebo imidové skupiny, které jsou součástí polymeru nebo do něj mohou být naroubovány [25]. V roce 1960 byl Otto Wichterlem a Drahoslavem Límem poprvé syntetizován první síťovaný hydrogel, pHEMA poly(2-hydroxyethylmethakrylát). Tento objev vyvolal velkou pozornost z hlediska své biokompatibility, hydrofility a průhlednosti. Položil základy pro výrobu kontaktních čoček, které jsou dodnes neodmyslitelnou součástí života velké části populace. V průběhu let byly zkoumány další aplikace hydrogelů. Významným průlomem byla úspěšná enkapsulace buněk do alginátových mikrokapslí nebo použití kolagenového hydrogelu jako popáleninového krytí. Hydrogely se staly intenzivně zkoumanou oblastí a s rozvojem tkáňového inženýrství našly uplatnění jako matrice pro kultivaci buněk anebo nosiče růstových faktorů k regeneraci tkání [12].

Hydrogely v nabobtnalém stavu se v určité míře podobají biologickým tkáním. Jsou měkké, pružné, biokompatibilní a vykazují dobré mechanické vlastnosti. Hojně jsou využívány v lékařských a farmaceutických aplikacích. Rovněž našly uplatnění v kosmetice, potravinářství i zemědělství [25].

V posledních letech jsou hydrogely populární v problematice obvazového krytí ran. V místě poranění vytvářejí vlhké prostředí, napomáhají odvádět exsudát z rány, zabraňují infekci a poskytují ideální prostředí pro regeneraci tkáně. Během fyziologického hojení dochází k tvorbě jizvy, která s sebou v některých případech může nést negativní důsledky, a to nejen estetické. Hydrogelové krytí napomáhá adhezi a proliferaci fibroblastů, díky čemuž lze tyto problémy zmírnit. V současnosti jsou na trhu různé formulace, jako amorfní gely, hydrogelové filmy nebo fólie či hydrogely impregnované gázy. V kosmetických aplikacích jsou hydrogely zastoupeny v široké škále výrobků. Nejčastěji v podobě pleťových masek, masek na rty či oči a poté zejména v léčebné kosmetice. Jak bylo zmíněno výše, kontaktní

čochy si od svého prvopočátku prošly značným vývojem. Nejen že slouží ke korekci zraku, ale uplatňují se i jako nosiče léčiv. Kromě pHEMA, byly zkoumány hydrofilní polymery jako poly(vinyl alkohol) nebo polyakrylonitril, pro potenciální využití v oftalmologii. Mezi nejdominantnější materiály pro výrobu kontaktních čoček patří hydrogel na bázi silikonu. Disponuje významným faktorem, a to propustností plynů. Přítomnost kyslíku je nebytná pro správnou funkci rohovky. Vlastností hydrogelů je rovněž využíváno v systémech pro distribuci léčiv. Vysoké množství vody napomáhá enkapsulaci hydrofilních léčiv, pórovitost zprostředkovává trvalé uvolňování léčiva. Dodání léčiva je komplexní. Je řízeno zejména difúzí, botnáním a také chemicky. Hydrogely mají nezastupitelnou roli v tkáňovém inženýrství, kvůli své podobnosti s nativní extracelulární matrix. Hydrogelové scaffoldy se využívají především při regeneraci srdeční tkáně, chrupavek a kostí. Pro jejich přípravu se často využívají přírodní polymery jako želatina, alginát či hyaluronan, které vykazují výbornou biokompatibilitu s lidskou tkání [32].

Na základě intenzivního výzkumu a neustálého objevování nových poznatků v problematice hydrogelů lze tyto materiály rozčlenit do tří generací. Hydrogely první generace jsou síťovány chemickou cestou za změny jejich chemických a fyzikálních vlastností. Vyznačují se velmi vysokou botnací schopností a mechanickou pevností. Syntéza hydrogelů první generace byla zprostředkována radikálovou polymerací hydrofilních monomerů a zesíťováním syntetických polymerů za použití různých iniciátorů a síťovacích činidel. Koncem 70. let minulého století vznikly hydrogely druhé generace. Hlavními způsoby zasíťování byly hydrofobní a iontové interakce. Tyto hydrogely se vyznačují reakcí na specifické podněty, jako je prostředí nebo charakteristické materiály. Konkrétně se jedná např. o změnu teploty, pH nebo koncentrace iontů v roztoku. Tato generace se ukázala jako velmi užitečná v biomedicínských aplikacích, zejména v problematice systémů pro distribuci léčiv. Existence druhé generace iniciovala vznik pokročilejší, třetí generace hydrogelů na základě jejich schopnosti reagovat na podněty. S těmito hydrogely se lze setkat pod pojmem tzv. chytré hydrogely. Mohou být připravovány různými metodami, například tvorbou stereokomplexů. Vyznačují se vyšší citlivostí na vnější podněty a je možné optimalizovat jejich fyzikálně-chemické a mechanické vlastnosti [33], [34].

2.1 Klasifikace hydrogelů

Hydrogely lze obecně rozdělit do dvou základních skupin. První skupinou jsou hydrogely vyrobené ze syntetických polymerů a druhou skupinu představují biohydrogely neboli

hydrogely získané z přírodních polymerů. Lze se také setkat s hybridními hydrogely, které jsou kombinací přírodních a syntetických látek. Syntetické hydrogely vynikají svojí delší životností, vyšší schopností absorpce vody anebo vyšší pevností gelu. Oproti tomu, přírodní hydrogely se vyznačují svojí výbornou biokompatibilitou a biodegradabilitou [12]. Přírodní hydrogely lze klasifikovat na základě různých hledisek, které shrnuje Tabulka 2.

Tabulka 2 Klasifikace přírodních hydrogelů

Dle původu	Dle způsobu síťování	Dle náboje
- Hydrogely na bázi proteinů - Hydrogely na bázi polysacharidů	- Fyzikální - Chemické	- Neutrální - Anionický - Kationický - Amfoterní - Zwitterionický
Dle skupenství	Dle struktury	Dle složení
- Tuhé - Polotuhé - Kapalné	- Krystalická - Amorfní - Semi-krystalická	- Homopolymer - Kopolymer - Semi-IPN - IPN (interpenetrující polymerní sítě)

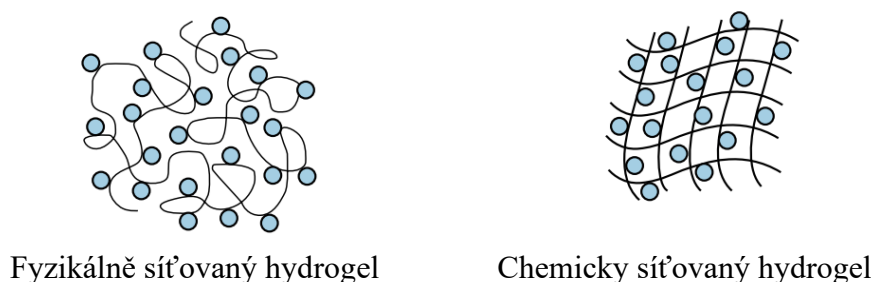
(Zdroj: [12] – upraveno)

2.2 Syntéza hydrogelů

Hydrogely jsou známy pro svoji schopnost absorbovat tekutiny, aniž by ztratily svoji fyzikální strukturu. To je dáno procesem síťování, který je možný uskutečnit fyzikální nebo chemickou cestou viz Obrázek 5. Chemicky zesíťované hydrogely se od těch fyzikálních liší zejména svojí ireverzibilitou, jelikož mezi polymerními řetězci dochází ke vzniku kovalentních vazeb. Zatímco hydrogely zesíťované fyzikálně jsou spojeny pouze dočasnými spoji, a proto jsou označovány jako reverzibilní. I když chemické síťování vytváří stabilnější systémy, ve většině aplikací je preferováno fyzikální síťování, a to s ohledem na použití síťovacích činidel, která jsou v mnohých případech toxická [12]. Nicméně, u chemicky zesíťovaných hydrogelů je možno snadněji modifikovat fyzikálně-chemické vlastnosti. Také vykazují vyšší mechanickou pevnost z důvodu vyšší hustoty sítě, a proto mohou být upřednostňovány před těmi fyzikálními [33].

Fyzikálně síťované hydrogely lze připravit různými metodami. Syntéza může být uskutečněna prostřednictvím hydrofobních interakcí, tvorbou stereokomplexů, krystalizací, pomocí vodíkových vazeb, iontovou interakcí, zráním apod. Tyto hydrogely jsou široce využívány ve farmaceutickém a biomedicínském odvětví díky absenci toxických síťovacích činidel, která s sebou však nese některé negativní důsledky. U hydrogelů s fyzikální sítí je velmi obtížné ovlivňovat jejich vlastnosti. Jedná se zejména o dobu gelace, rozměry pórů, chemickou funkčnost a dobu degradace [12], [31], [33].

Syntézu chemicky síťovaných hydrogelů je rovněž možné provést různými metodami. Pokud polymer disponuje funkčními skupinami, jako je amidová ($-\text{NH}_2$) a karboxylová skupina ($-\text{COOH}$), je možné síťování uskutečnit reakcemi na bázi „click chemistry“, např. metodu Schiffovýchází nebo Michaelovu adici [33]. Dalšími vhodnými metodami je radikálová polymerace, síťování UV zářením, síťování vysokoenergetickým zářením (gama paprsky, elektronový paprsek) nebo enzymatickou reakcí [12].



Obrázek 5 Fyzikální a chemická struktura hydrogelu

(zdroj: [25])

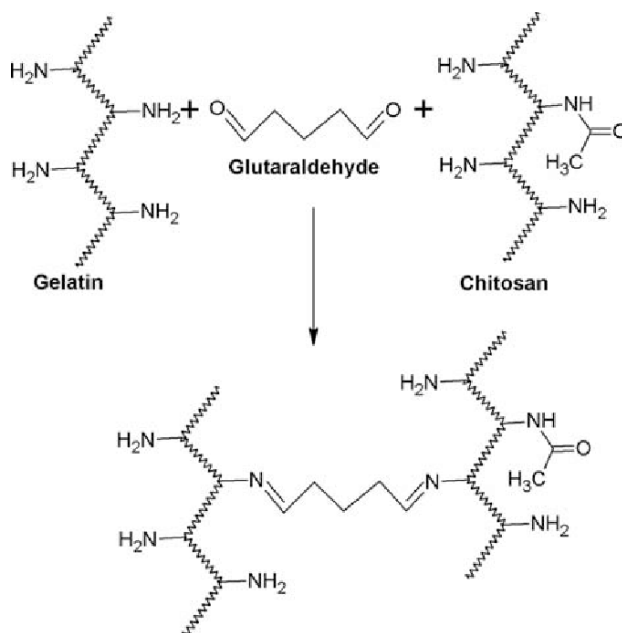
2.3 Hydrogely na bázi chitosanu a želatiny

V posledních letech došlo k výraznému pokroku ve vývoji biomateriálů. Existuje mnoho přírodních polymerů, které by mohly být využity při návrhu hydrogelů. Mezi nejvíce zkoumané biopolymery pro inovaci hydrogelů patří chitosan a želatina. Chitosan je v dnešní době velmi oblíbenou složkou hydrogelů a biofilmů. Na základě svých specifických vlastností představuje ideální materiál s vysokým potenciálem pro využití v budoucích inovativních aplikacích. Stále je předmětem výzkumu pro své unikátní fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti. Dále zejména pro svoji kompatibilitu s jinými molekulami. Uplatnění čistého chitosanu v praxi je však nulové. Vykazuje nízký specifický povrch,

slabou mechanickou pevnost, a především není rozpustný ve vodě. Z tohoto důvodu jsou vhodné modifikace chitosanu anebo jeho zesíťování s jinými biopolymery, čímž dojde k výraznému zlepšení jeho vlastností. Stejně jako chitosan, tak i želatina disponuje vysokou afinitou k jiným molekulám a ochotně tvoří filmy [35].

Oba biopolymery jsou dobře zpracovatelné. Mohou být formulovány do nanokompozitů, nanočatic, konjugátů, filmů a především hydrogelů [36].

Chitosan a želatinu lze zesíťovat různými metodami. V případě chemického síťování jsou využívána síťovací činidla. Nejčastěji se uplatňuje glutaraldehyd (GDA) viz Obrázek 6, kyselina třísllová nebo přírodní genipin. Nevýhodou je, že většina síťovacích činidel je toxická a snižuje celkovou biokompatibilitu systému, což může zabránit využití takto připravených kompozitů v biomedicínských aplikacích [37], [38].



Obrázek 6 Síťování chitosanu a želatiny GDA

(zdroj: [37])

Hydrogely se obecně využívají v problematice systémů dodávání léčiv. Podání může být subkutánní, transdermální, perorální či oční. Běžně využívanými polymerními nosiči jsou kyselina polyakrylová, pHEMA nebo polyvinylacetát. Z nosného systému je léčivo uvolňováno nejčastěji difuzí, degradací nebo dezorganizací struktury polymeru. Dnes jsou vyhledávány přírodní polymery v návaznosti na lepší biodegradabilitu [39]. Chitosan i želatina se dnes běžně využívají jako polymerní nosiče. V souvislosti se schopností

chitosanu pronikat přes hematoencefalickou bariéru byly chitosan a jeho deriváty studovány v souvislosti s léčbou neurologických onemocnění [36].

Od roku 1980 byl studován vliv chitosanu a jeho derivátu na hojení ran. Dnes se běžně využívají ve formě hydrogelů, folií, filmů nebo prášků [39].

Chitosan je hojně využíván v tkáňovém inženýrství jako polymerní scaffold. Kromě biodegradability a biokompatibility disponuje vysokou pórovitostí a strukturální integritou, což jsou ideální podmínky pro adhezi buněk. Kromě toho pozitivně ovlivňuje buněčné funkce. U scaffoldů s obsahem chitosanu byl pozorován pozitivní vliv na regeneraci chrupavek, kostí a nervů [40]. Čistý chitosan má však omezenou schopnost podporovat proliferaci buněk. V kombinaci se želatinou by mohla být indukována vyšší efektivita. Jak bylo zmíněno v kapitole 1.2.4, želatina obsahuje specifickou sekvenci aminokyselin, která podporuje adhezi a migraci buněk [38].

Chitosan a želatina nejsou využívány pouze v biomedicínských aplikacích. Schopnosti tvorby filmů a antibakteriální účinek chitosanu, který byl popsán v kapitole 1.1.4, lze využít i při navrhování potravinových obalů. Filmy na bázi chitosanu vykazují velmi dobré vlastnosti. Disponují dobrými antiseptickými vlastnostmi, regulují vlhkost a uchovávají potraviny déle čerstvé [40].

Dle studie [40], by mohly hydrogely na bázi chitosanu a želatiny najít uplatnění ve stomatologii. Byla zkoumána interakce a proliferace kmenových buněk z apikální papily (SCAPs), antibakteriální účinek proti *Streptococcus mutans*, způsob degradace a botnací schopnost. Rovněž byla provedena jednoosá tahová zkouška. Bylo zjištěno, že hydrogely vykazovaly optimální degradaci, vyznačovaly se vysokou botnací schopností a dobrými mechanickými vlastnostmi. Byla pozorována mírná cytotoxicita. Hydrogely také pozitivně ovlivnily proliferaci buněk SCAPs a vykazovaly velmi dobré antimikrobní vlastnosti. Na základě těchto výsledků lze hydrogely na bázi chitosanu a želatiny považovat za materiály s potenciálním využitím v kontextu pooperační péče a poukazují na univerzální a účinné použití v širokém kontextu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla příprava hydrogelových filmů a gelů na bázi chitosanu a želatiny v různých poměrech. Sítování bylo realizováno chemicky prostřednictvím GDA. Druhým cílem byla charakterizace hydrogelů pomocí analytických, mechanických a instrumentálních metod. Třetím cílem bylo zhodnotit vybrané vlastnosti, a to na základě odlišných metod přípravy hydrogelů.

4 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ NA BÁZI CHITOSANU A ŽELATINY

4.1 Chemikálie

Vysokomolekulární chitosan se stupněm deacetylace $\geq 75\%$ (419419, $M_w=310-375$ KDa, Sigma-Aldrich, USA) [41], želatina vepřová D526 200 Bloom, glycerol (CAS 56-81-5), glutaraldehyd (GDA), hydroxid sodný (NaOH), kyselina octová (CH_3COOH), destilovaná voda.

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy KERN, předvážky VWR, třepačka IKA HS 501 digital, infračervený (FTIR) spektrometr Alpha II (Bruker), rotační reometr Kinexus Pro+ (Malvern), zkušební přístroj Galdabini Quasar 25, mixér BOSH, pH metr 526 WTW s kombinovanou skleněnou pH elektrodou SenTix WTW, sušárny (Memmert ULP 400; WTB binder), elektrická teplovzdušná trouba MORA, magnetické míchačky (Heidolph; LED IDL), digitální posuvné měřítko, analogový mikrometr, vodováha, uzavíratelné ZIP sáčky, filtrační papíry, silikonové formy, exsikátor, laboratorní sklo.

4.3 Metodika

4.3.1 Příprava směsí chitosan/želatina

Směsi chitosan/želatina byly připraveny v různých poměrech. Nejprve bylo připraveno pět 1% roztoků vysokomolekulárního chitosanu, a to navážením příslušného množství chitosanu do Erlenmeyerových baněk, které byly doplněny 1% roztokem CH_3COOH . Tyto roztoky byly následně umístěny na třepačku za laboratorní teploty po dobu 24 hodin, respektive dokud nebyl chitosan rozpuštěn. Dále byl připraven 1% roztok želatiny navážením příslušného množství a doplněním destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl umístěn přes noc do lednice. Po rozpuštění obou roztoků, byl 1% roztok želatiny za stálého míchání zahříván na teplotu cca 60°C na magnetické míchačce, a to po dobu zhruba 5 minut. Do jednotlivých Erlenmeyerových baněk s rozpuštěným 1% roztokem chitosanu bylo odlito dané množství 1% roztoku želatiny. Dále byl přidán glycerol, a to v množství 20 wt% na navážku chitosanu. Roztoky s přidaným glycerolem byly umístěny na magnetickou míchačku a míchány cca 5 minut. K jednotlivým roztokům bylo následně přidáno síťovací činidlo, konkrétně 25% glutaraldehyd, a to v množství 1–5 wt% na chitosan. Roztoky byly

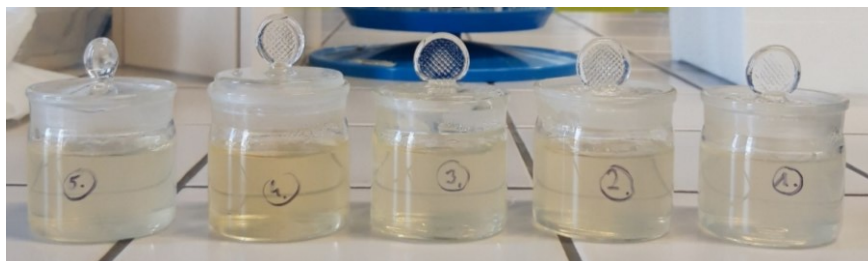
opět umístěny na magnetickou míchačku a míchány po dobu 10 minut. Jednotlivé přídavky složek shrnuje Tabulka 3.

Tabulka 3 Zastoupení složek směsí chitosan/želatina

Směs	Poměr chitosan:želatina	GDA [%]	Glycerol [%]
1	1:2	1	20
2	2:1	1	20
3	1:2	5	20
4	2:1	5	20
5	1:1	3	20

4.3.2 Příprava vzorků

Před samotným zhotovením hydrogelových filmů a gelů byl z roztoků připravených v bodě 4.3.1 odebrán vzorek pro pozdější charakterizaci. Na předvážkách bylo od každého poměru odváženo 45 g vzorku do váženek (viz Obrázek 7) a umístěno do lednice.



Obrázek 7 Roztoky chitosan/želatina

4.3.3 Příprava filmů na bázi chitosan/želatina

Z roztoků chitosanu a želatiny připravených v bodě 4.3.1 byla zhotovena první série v podobě filmů. Do silikonových forem o rozměrech 7 x 12,5 cm bylo odlito dané množství roztoku. Od každého poměru s různým množstvím síťovacího činidla byly odlity dvě formy, které byly umístěny do sušárny viz Obrázek 8. Při teplotě 30 °C probíhalo sušení po dobu 7 dnů. Vzniklé filmy byly následně umístěny do uzavíratelných ZIP sáčků a ponechány v exikátoru při laboratorní teplotě.



Obrázek 8 Sušení filmů

4.3.4 Příprava gelů na bázi chitosan/želatina

Ze zbylého množství roztoků z bodu 4.3.1 byla získána druhá série ve formě gelů, a to srážením směsi 1% roztokem NaOH. Roztok byl odlit do kádinky, do které byla následně umístěna kombinovaná elektroda. Pomocí pH metru bylo sledováno pH, a to do hodnot 8–9 za přidavků 1% roztoku NaOH viz Obrázek 9.



Obrázek 9 Příprava gelu

Vzniklé gely byly následně přefiltrovány přes Büchnerovu nálevku a pečlivě promyty destilovanou vodou viz Obrázek 10. Pro další použití byly přeneseny do Petriho misek a uloženy rovněž do lednice.



Obrázek 10 Vzniklý gel

4.3.5 Stanovení obsahu sušiny

Stanovení sušiny bylo provedeno pro filmy i gely. Byly připraveny vzorky o přibližné hmotnosti 0,2 g. Vzorek byl navážen na analytických vahách do koželužské misky a následně umístěn do sušárny, která byla nastavena na teplotu 103 °C. Sušení probíhalo po dobu 3 hodin. Následně byly misky ze sušárny vyjmuty a umístěny do exsikátoru k vytemperování na laboratorní teplotu. Poté byly misky opět zváženy na analytických vahách. Vzorky byly opět umístěny do sušárny po dobu 10 minut pro dosažení konstantní hmotnosti, vytemperovány a opětovně zváženy.

Obsah sušiny se vypočítá dle vzorce:

$$S = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100$$

m_1 – hmotnost vzorku po sušení [g]

m_0 – hmotnost vzorku před sušením [g]

S – obsah sušiny [%]

4.3.6 Botnání

Schopnost botnání byla stanovena rovněž pro filmy i gely. V případě filmů byly připraveny vzorky o velikosti 1x1 cm a následně zváženy na analytických vahách. Vzorky byly ponořeny do destilované vody, přičemž schopnost botnání byla stanovována v pěti časových intervalech, a to 1 s, 10 s, 30 s, 1 minuta a 5 minut. Po uplynutí doby botnání byl vzorek z destilované vody vyjmut, osušen papírovým ubrouskem a znovu zvážen na analytických vahách. Stanovení bylo provedeno vždy třikrát u každého filmu a zprůměrováno. V případě gelů bylo postupováno následovně. Vzhledem k tomu, že u připravených gelů docházelo ke ztrátě soudržnosti, nebylo možné připravit kompaktní vzorek. Primárně připravené gely sestávaly z gelových agregátů, a proto je bylo nutné pomocí stolního mixéru zhomogenizovat. Po homogenizaci bylo odebráno přibližně 0,5 g vzorku do váženky a následně zváženo na analytických vahách. Dále byla váženka se vzorkem zalita asi 20 ml destilované vody. Botnání gelů bylo sledováno ve třech časových intervalech, a to po 10, 30 a 60 minutách. Po uplynutí dané doby byla destilovaná voda z váženky pečlivě dekantována, zbytková voda na skle váženky byla osušena ubrouskem a následně byla váženka se vzorkem zvážena na analytických vahách. Na základě různého obsahu vody ve vstupních vzorcích bylo nezbytné provést dodatečné sušení. Vzorky ve váženkách byly umístěny do sušárny při

teplotě 103 °C po dobu 24 hodin. Po vysušení byly opět zváženy. Stanovení botnací schopnosti bylo stanoveno u každého gelu dvakrát a zprůměrováno.

Množství absorbované vody se vypočítá dle vzorce:

$$w(\%) = 100 \cdot \frac{(m_1 - m_0)}{m_0}$$

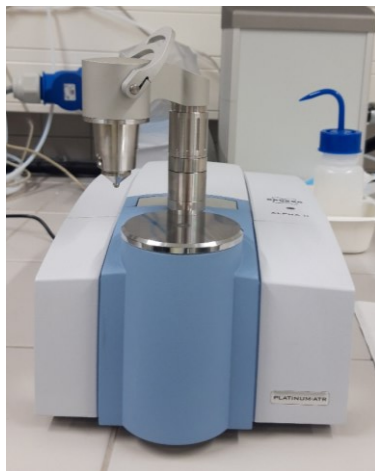
m_1 – hmotnost vzorku po hydrataci [g]

m_0 – hmotnost suchého vzorku [g]

w (%) – obsah vody [%]

4.3.7 FTIR analýza

Spektra FTIR byla měřena na infračerveném spektrometru Alpha II FT-IR (Bruker) metodou ATR na diamantovém krystalu (viz Obrázek 11). Měření probíhalo v rozsahu vlnočtů 4000 cm^{-1} až 400 cm^{-1} s 32 skeny a rozlišením 4 cm^{-1} . Byly analyzovány obě série hydrogelů, filmy i gely.



Obrázek 11 Spektrometr Alpha II

4.3.8 Viskozita

Viskozita byla charakterizována na vzorcích připravených v bodě 4.3.2. Měření bylo realizováno pomocí rotačního reometru Kinexus Pro+ (Malvern) viz Obrázek 12. Vzhledem k nízké viskozitě vzorků byla zvolena geometrie válec-válec. Měření bylo realizováno při třech teplotách, a to při 25, 40 a 55 °C. Smyková rychlost byla nastavena na 0,1 – 100 s^{-1} . Byla zvolena logaritmická škála s 5 vzorky na dekádu. Aplikace vzorku byla provedena na základě instrukcí softwaru.



Obrázek 12 Reometr Kinexus Pro+

4.3.9 Tahová zkouška

Tahová zkouška byla provedena na zkušebním přístroji Galdabini Quasar 25 viz Obrázek 13. Měření bylo provedeno pouze pro filmy. Gely nebylo možné pomocí této metody charakterizovat, neboť se jednalo o nespojitý systém tvořený pouze směsí agregátů. Vzorky filmů byly připraveny o rozměrech 1x7 cm, v počtu 6-8 vzorků od každé varianty filmu připravené v bodě 4.3.3. Před měřením bylo nutné do softwaru zadat tloušťku a šířku daného vzorku. Šířka vzorku byla stanovena pomocí digitálního posuvného měřítka. Tloušťka filmů byla stanovena pomocí analogového mikrometru a pohybovala se v rozmezí 0,02 – 0,05 mm. Vzdálenost čelistí byla nastavena na 30 mm, rychlost posuvu na 20 mm/min. Vzhledem k obtížnému uchycení vzorku do čelistí, bylo nastaveno přepětí o velikosti 0,5 N.



Obrázek 13 Zkušební přístroj Galdabini Quasar 25

4.3.10 Mikroskopie

Povrchová morfologie připravených filmů a gelů byla zkoumána prostřednictvím digitálního 3D mikroskopu VHX 7000 Keyence viz Obrázek 14.



Obrázek 14 Digitální 3D mikroskop VHX 7000 Keyence

4.3.11 Statistické vyhodnocení

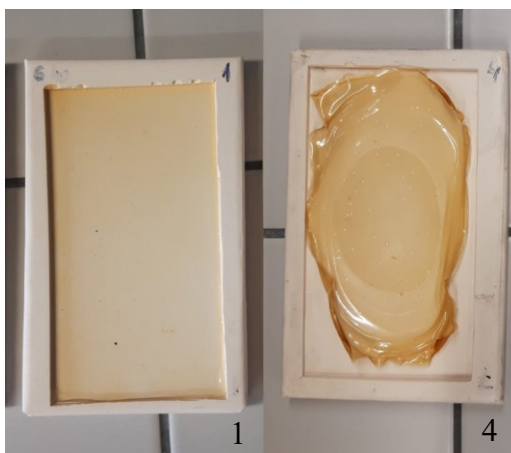
Statistické vyhodnocení bylo realizováno pomocí softwaru Minitab 18. Výsledky byly vyhodnoceny metodou faktorových pokusů 2^2 s jedním středovým pokusem. Zvolenými faktory byl chitosan (faktor A), GDA (faktor B) a jejich kombinace (AB). Vyhodnocení bylo provedeno pro: botnění filmů po dobu 1 s, botnění filmů po dobu 5 min, dynamickou viskozitu při teplotě 25, 40 a 55 °C, mez pevnosti a prodloužení filmů při přetržení.

Pro vyhodnocení byly zvoleny minimální a maximální hodnoty množství jednotlivých faktorů. U chitosanu bylo zvoleno rozmezí 0,5 až 2 %, u GDA 1 až 5 %. Vliv každého faktorů byl interpretován Paretovým diagramem, vrstevnicovým diagramem a regresní rovnicí.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

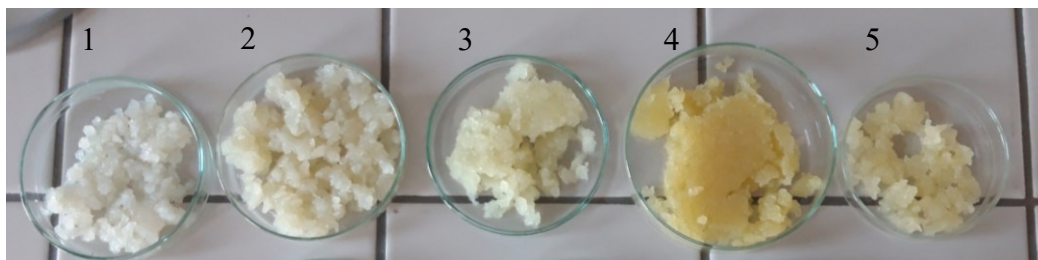
5.1 Příprava filmů a gelů

Byly připraveny dvě série hydrogelů na bázi chitosanu a želatiny. Ukázka první série ve formátu filmu je zachycena na Obrázek 15. Připravené filmy se lišily zejména odstínem, který je ovlivněn různým množstvím glutaraldehydu, glycerolu a poměrem chitosanu ku želatině. Na obrázku níže je reprezentován konkrétně film č. 1 a film č. 4, mezi nimiž byly zaznamenány nejvýraznější odchylky. Zbylé filmy byly po vizuální stránce téměř totožné jako první film. Film č. 1, u kterého byl přídavek glutaraldehydu 1 wt% na chitosan, vykazoval určitou tvárnost. Oproti tomu, u filmu č. 4, kde přídavek glutaraldehydu činil 5 wt% na navážku chitosanu, se projevila jistá náchylnost k prasknutí, i když jeho pevnost byla vyšší než u filmu č. 1. Také si lze povšimnout vyššího vysušení, i když všechny filmy měly stejné podmínky.



Obrázek 15 Reprezentativní ukázka filmů – film č. 1, film č. 4

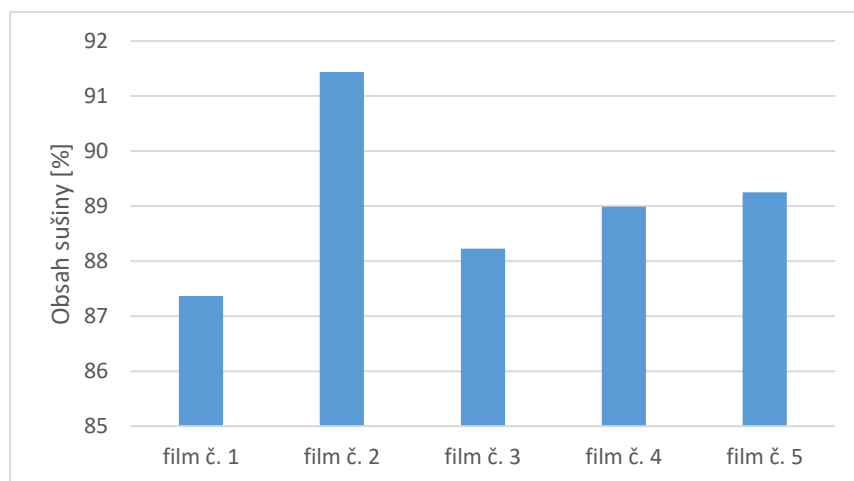
Druhou sérii představovaly gely, které jsou znázorněny na Obrázek 16. Obdobně jako u filmů je na první pohled patrná rozdílnost odstínů, ovlivněná stejnými faktory, tedy množstvím glutaraldehydu, glycerolu a chitosanu.



Obrázek 16 Připravené gely

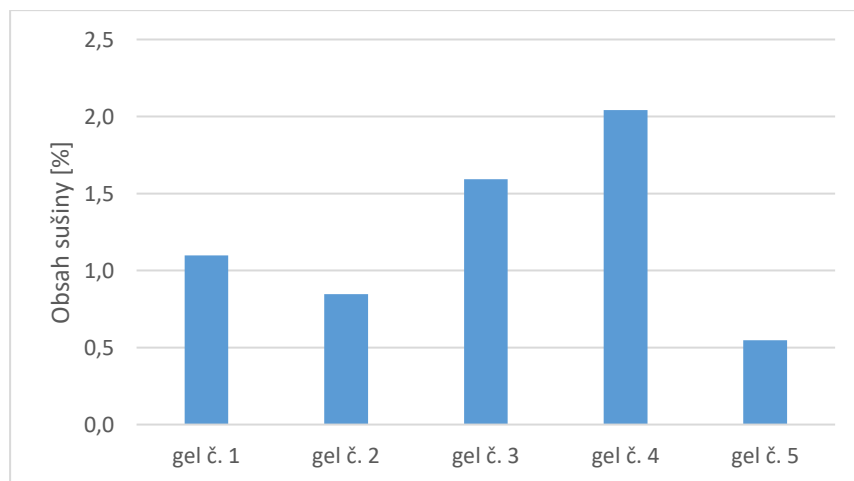
5.2 Stanovení obsahu sušiny

Stanovení obsahu sušiny bylo provedeno u obou sérií vzorků dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.5.



Obrázek 17 Procentuální obsah sušiny – filmy

Stanovení pevného podílu hydrogelových filmů je vyjádřeno jako procentuální obsah sušiny viz Obrázek 17. Lze pozorovat, že nejvyšší procentuální obsah sušiny vykazuje film č. 2, přičemž u filmu č. 1 je obsah sušiny nejnižší. Příčinou je rozdílné zastoupení želatiny, které je ve filmu č. 2 poloviční množství. Specifickou vlastností želatiny je schopnost vázat velké množství vody. Z toho vyplývá, že filmy s vyšším obsahem želatiny, tedy film č. 1 a film č. 3 budou tvořeny větším podílem vody a obsah sušiny bude tedy nižší, což potvrzuje graf výše. Opačně je tomu u filmů č. 2 a filmu č. 4, které mají vyšší zastoupení chitosanu, a tudíž mají i vyšší obsah sušiny. Poměr chitosanu a želatiny je u středového vzorku (filmu č. 5) totožný a obsah sušiny by se měl pohybovat okolo průměru ostatních hodnot.



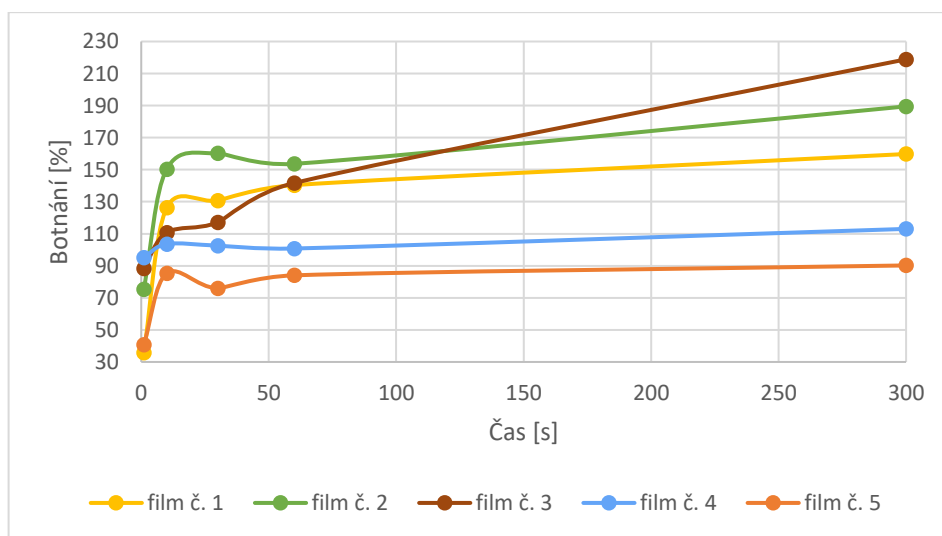
Obrázek 18 Procentuální obsah sušiny – gely

Pevný podíl jednotlivých gelů je znázorněn na Obrázek 18. Nejvyšší procentuální obsah sušiny vykazuje gel č. 4 a následně gel č. 3. Oproti obsahu sušiny ve filmech jsou hodnoty gelů podstatně odlišné. U gelů č. 2 a č. 4 byla předpokládána vyšší hodnota vzhledem k nižšímu obsahu želatiny. Gely č. 1 a č. 3 s vyšším obsahem želatiny by měly být tvořeny menším pevným podílem. Lze předpokládat, že u gelů č. 3 a č. 4, může být vyšší obsah sušiny způsoben vyšším přídatkem síťovacího činidla. Na základě toho došlo ke vzniku hustšího zesíťování a obsah sušiny byl tedy vyšší. Nicméně, rozdílnost hodnot je spíše přisuzována metodě přípravy a skladování gelů.

S ohledem na získané výsledky lze konstatovat, že filmy jsou převážně tvořeny pevným podílem. Oproti tomu, přítomnost sušiny v gelech je minimální a pohybuje se zhruba od 0,5 – 2 %. To značí, že struktura gelů se vyznačuje velmi vysokou schopností vázat vodu.

5.3 Botnání

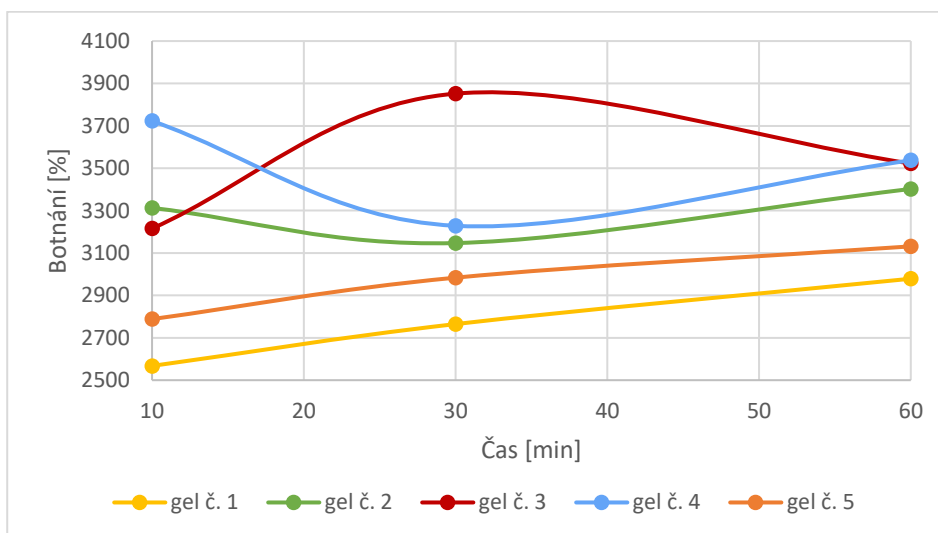
Botnací schopnost je u hydrogelů významným parametrem. Botnání bylo sledováno u obou sérií vzorků dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.6.



Obrázek 19 Botnání – filmy

Botnací schopnost filmů byla sledována v pěti časových intervalech, a to 1 s, 10 s, 30 s, 1 min a 5 min viz Obrázek 19. Jak lze vidět, v čase 1 s dochází ke znatelnému nabotnutí u všech filmů. Hmotnost filmu č. 1 vzrostla o pouhých 36 %, zatímco u filmu č. 2 došlo k nabotnutí až o 75 %. V čase 10 s se hmotnost těchto filmů rapidně zvyšuje v důsledku nižšího obsahu GDA a tím řidšího zesíťování, což umožňuje absorpci většího množství vody. Rovněž lze pozorovat, že u filmu č. 1 s vyšším obsahem želatiny došlo ke skokovému zvýšení hmotnosti a to o 126 % z původních 30 %. Film č. 2 v čase 10 s nabotnal o 150 %

z původních 75 % získaných v 1 s. Velký nárůst hmotnosti v čase 1 s lze pozorovat u filmů č. 3 a č. 4, jejichž hmotnost se zvýšila o téměř 100 %. U filmu č. 4 se hmotnost v čase 10 s mírně zvýšila, avšak při delších časech byla téměř konstantní. Toto chování plyne z poměru chitosanu a želatiny (2:1). Vzhledem k nižšímu obsahu želatiny nedošlo k dalšímu nárůstu hmotnosti, také je zde pozorován vliv GDA, který je přítomen v 5 wt% na chitosan a zapříčiňuje vznik hustšího zesíťování. U filmu č. 3 si lze povšimnout, že jeho botnací schopnost je v čase 5 min nejvyšší. To je nejspíše ovlivněno vyšším obsahem želatiny v porovnání s filmem č. 4 a také množstvím GDA, jehož množství je ve filmu č. 3 poloviční. Středový vzorek (film č. 5) nabotnal v čase 1 s téměř o 41 %. Je zde patrné podobné schování jako u filmů č. 1 a č. 2, u kterých v čase 10 s skokově narostla hmotnost. V čase 30 s je pozorován pokles hmotnosti, což mohlo být způsobeno chybným měřením. V dalších časech je chování filmu č. 5 velmi podobné filmu č. 4, což je nejspíše následkem 3 wt% GDA a stejného poměru chitosanu a želatiny.

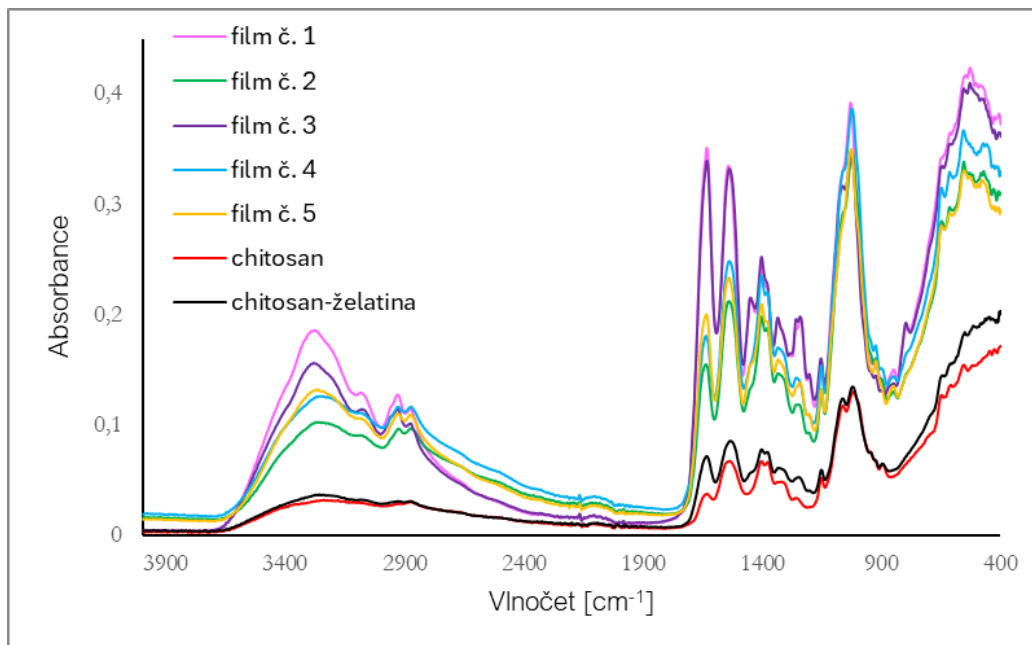


Obrázek 20 Botnění – gely

Schopnost botnění gelů byla sledována ve třech časových intervalech viz Obrázek 20. Oproti filmům byly zvolené časové intervaly delší, a to 10 min, 30 min a 60 min. V čase 10 minut lze u všech gelů pozorovat mnohonásobné zvětšení hmotnosti, přičemž největší nárůst je u gelu č. 4 a nejmenší u gelu č. 1, stejně jako v případě filmů. U gelů č. 1 a č. 5 je viditelný téměř lineární nárůst hmotnosti. Oproti tomu, zbylé gely vykazují netypické chování. Je nutné zmínit, že zvolená metoda zahrnovala více mezikroků než v případě stanovení botnění filmů. Vzhledem k povaze gelů bylo před samotným stanovením nutné vzorky zhomogenizovat, součástí bylo také sušení a samotné provedení metody bez vzniku chyb bylo velmi obtížné. Na základě toho nelze přesně definovat botnací schopnost jednotlivých

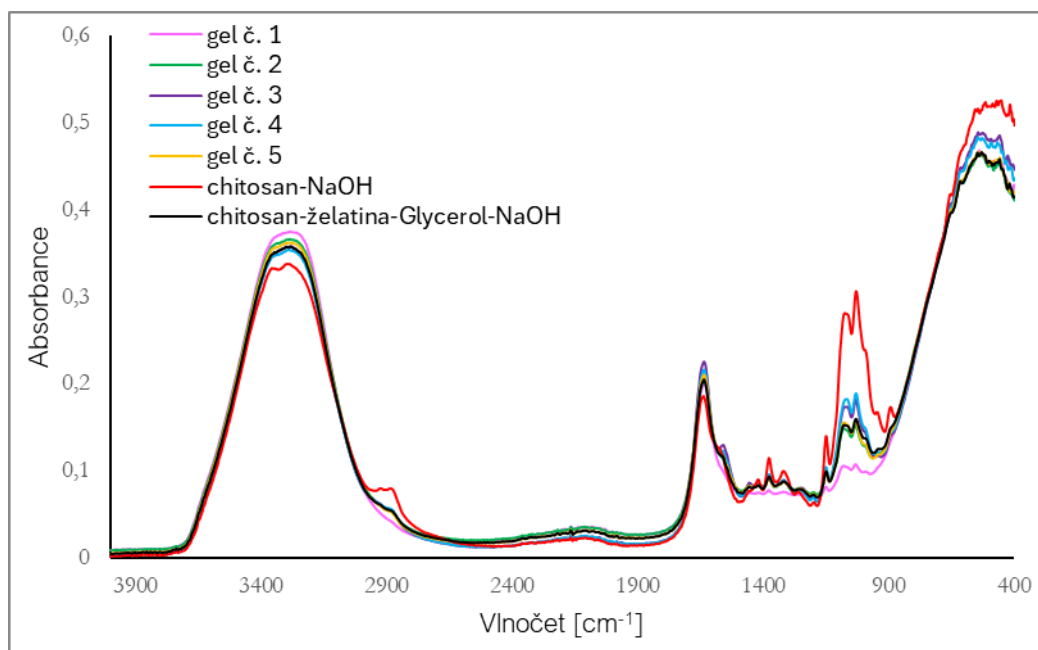
gelů. Nicméně, ve srovnání s filmy lze konstatovat, že nabotnutí gelů je mnohonásobně větší než nabotnutí filmů. Zatímco filmy nabotnaly v řádech desítek až stovek procent, gely byly schopné nabotnat v řádu tisíců procent.

5.4 FTIR analýza



Obrázek 21 IR spektra – filmy

Na Obrázek 21 jsou zaznamenána IR spektra jednotlivých hydrogelových filmů. Bylo přidáno spektrum chitosanu a směsi chitosan/želatina jako reference. U spekter filmů lze pozorovat velice výrazný signál v oblasti 1720 cm⁻¹, který potvrzuje přítomnost karbonylové funkční skupiny C=O. To značí přítomnost esterové vazby, která vzniká interakcí chitosanu a GDA. Dále lze vidět, že všechna spektra filmů vykazují vyšší absorbanci než reference. To dokazuje, že v připravených filmech došlo k zesíťování. Bylo předpokládáno, že s rostoucí koncentrací GDA se bude zvyšovat počet esterových vazeb. Nicméně, jak lze vidět, absorbance je u jednotlivých filmů náhodná a na množství GDA tedy nezávisí.



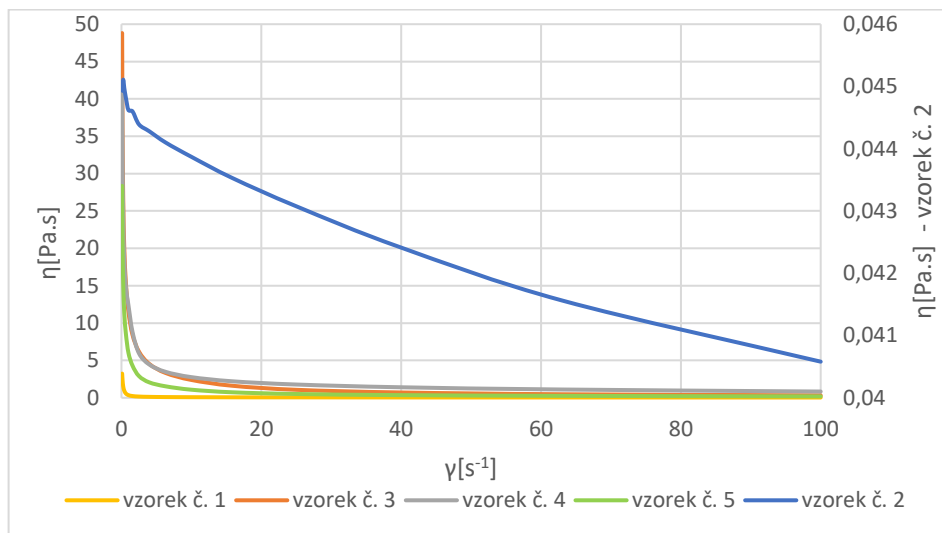
Obrázek 22 IR spektra – gely

Spektra gelů jsou zaznamenána na Obrázek 22. Byla přidána referenční spektra chitosanu a směsi chitosan/želatina/glycerol vysrážených v NaOH. Stejně jako u spekter filmů je signál v oblasti 1720 cm^{-1} , což potvrzuje přítomnost esterové vazby. Absorbance karbonylové skupiny $\text{C}=\text{O}$ u čistého chitosanu je o něco nižší než u gelů. To naznačuje nárůst karbonylových vazeb a s tím spojené zesíťování. Vyskytuje se zde široký a intenzivní pás v oblasti 3000 cm^{-1} až 3600 cm^{-1} potvrzující výskyt O-H skupiny připadající vodě, která tvoří převážnou část gelů.

5.5 Viskozita

Reologická charakterizace vzorků byla provedena dle postupu uvedeného v bodě 4.3.8. Byla sledována závislost dynamické viskozity η na rychlosti smykové deformace $\dot{\gamma}$ ve třech zvolených teplotách. U všech vzorků bylo pozorováno pseudoplastické chování.

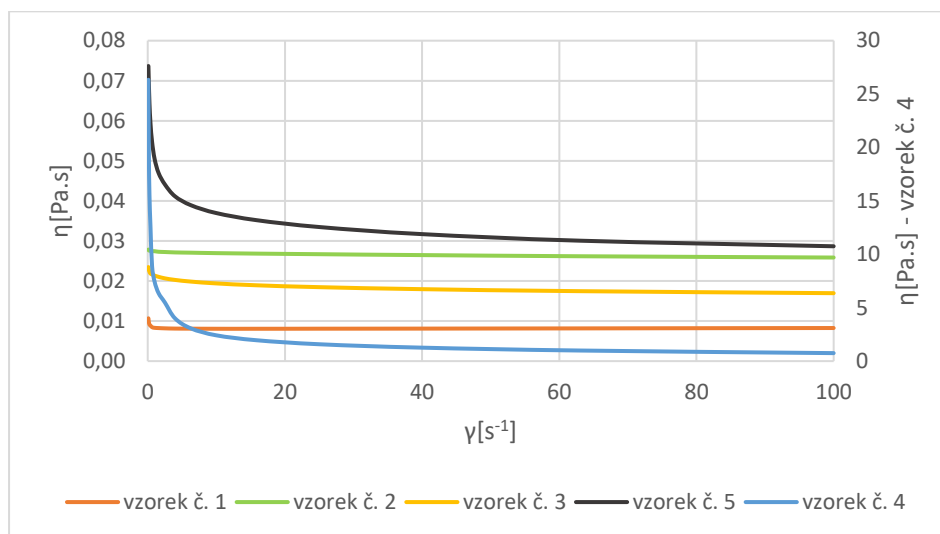
Chování vzorků při smykovém namáhání za teploty 25 °C je zobrazeno níže, viz Obrázek 23, přičemž sekundární svislá osa (vpravo) byla přidána z důvodu odlišného rozsahu hodnot vzorku č. 2.



Obrázek 23 Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti při 25 °C

Z Obrázku 23 je patrné, že nejvyšší hodnota dynamické viskozity vzorku č. 1 činí 3,2 Pa.s při smykové rychlosti $0,1 \text{ s}^{-1}$. Poté dochází k velmi strmému poklesu a to až do hodnoty 0,2 Pa.s při smykové rychlosti $1,6 \text{ s}^{-1}$. V tomto okamžiku dochází k výrazné změně chování a viskozita se téměř nemění. Počáteční viskozita vzorku č. 3 je nejvyšší, a to 48,8 Pa.s. Vykazuje podobné chování, přičemž, ke zlomu dochází při necelých 4 s^{-1} a dále se viskozita snižuje jen minimálně. Počáteční hodnota viskozity vzorku č. 4 je 42,3 Pa.s, přičemž k ustálení viskozity dochází opět při necelých 4 s^{-1} . Viskozitní křivka vzorku č. 4 je téměř totožná s křivkou vzorku č. 3, což je následkem 5 wt% GDA. Vlivem síťovacího činidla jsou vzorky hustě zesíťovány, a tedy vykazují i vyšší viskozitu než ostatní vzorky s nižším obsahem GDA. Vyšší viskozita vzorku č. 3 může být zapříčiněna poměrem chitosanu a želatiny (1:2), kde želatina mohla přispět k vyšší viskozitě svou želírovací schopností. U středového vzorku č. 5 nastalo ustálení viskozity rovněž při necelých 4 s^{-1} . Rovněž zde hraje roli množství síťovacího činidla, které v je v tomto vzorku v množství 3 wt%. Jak lze vidět, viskozitní křivka vzorku č. 2 se podstatně liší. Nejspíše došlo k chybě měření, kdy se mohly ve vzorku vytvořit vzduchové bubliny. Na reologické schování vzorků má velmi výrazný vliv síťovací činidlo. U vzorku č. 1 došlo k ustálení viskozity až při $1,6 \text{ s}^{-1}$, přičemž u vzorků s vyšším množstvím GDA se viskozita ustálila už při 4 s^{-1} .

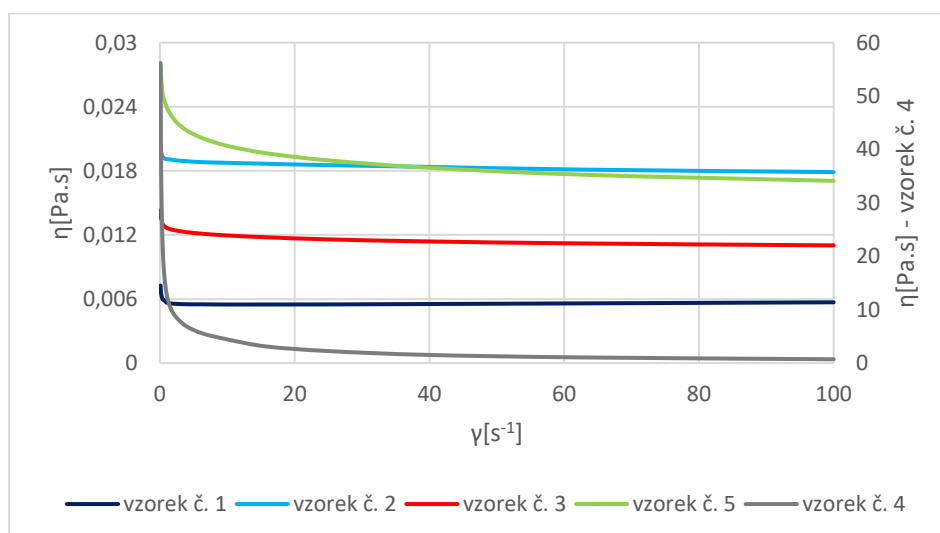
Reologické chování vzorků bylo dále sledováno při teplotě 40 °C viz Obrázek 24. Byla přidána sekundární svislá osa (vpravo) náležící vzorku č. 4.



Obrázek 24 Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti při 40 °C

Z Obrázek 24 je patrné, že vzorek č. 4 se podstatně odlišuje. Hodnota počáteční dynamické viskozity je 26,3 Pa.s. Při smykové rychlosti 6,3 s⁻¹ dochází ke zlomu a viskozitní křivka je téměř lineární. Vzorek č. 1 vykazuje nejnižší počáteční viskozitu, a to 0,01 Pa.s, u kterého dochází k ustálení viskozity při smykové rychlosti 3,9 s⁻¹. Vzorky č. 2, č. 3 a č. 5 se chovají stejně, k ustálení viskozity dochází opět při 3,9 s⁻¹. Lze zde pozorovat vliv teploty, se kterou se výrazně snížila počáteční viskozita všech vzorků.

Reologické chování vzorků bylo zkoumáno také při teplotě 55 °C viz Obrázek 25.



Obrázek 25 Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti při 55 °C

Z Obrázek 25 je zřejmé, že vzorek č. 1 je nejméně viskózní. Při smykové rychlosti $3,9 \text{ s}^{-1}$ dochází ke zlomu a viskozita se stává lineární. Dvojnásobnou hodnotu viskozity vykazuje vzorek č. 3 a viskozita vzorku č. 2 je trojnásobná oproti vzorku č. 1, přičemž jejich viskozita je ustálena opět při $3,9 \text{ s}^{-1}$. U vzorku č. 5 lze pozorovat pozvolnější ustálení viskozity, přičemž ke kritickému bodu došlo při vyšší hodnotě smykové rychlosti, a to 10 s^{-1} . Viskozita vzorku č. 4 je opět výrazně vyšší. Při smykové rychlosti $0,1 \text{ s}^{-1}$ dosahuje $56,2 \text{ Pa.s}$. Ovšem s rostoucí rychlostí smykové deformace dochází k prudkému poklesu až do hodnoty $3,9 \text{ s}^{-1}$ a poté se viskozita postupně ustálí. Při teplotě $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ došlo ke zlomovému bodu při smykové rychlosti $3,9 \text{ s}^{-1}$ u vzorků č. 1 až č. 4. U vzorku č. 5 je tato hodnota vyšší. Lze zde předpokládat vliv různého poměru chitosanu a želatiny. U vzorku č. 5 je poměr vyvážený, což může být důvod mírné odchylky v chování tohoto vzorku. Vyšší množství GDA u vzorku č. 3, č. 4 a č. 5 může způsobit pozvolnější klesání viskozity vlivem hustšího zesíťování.

Je vhodné zmínit vliv teploty na viskozitu jednotlivých vzorků. Viskozita vzorků č. 1, č. 2, č. 3 a č. 5 se snižovala se zvyšující se teplotou. Odlišné chování lze pozorovat u vzorku č. 4, jehož viskozita při teplotě $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ činí $42,3 \text{ Pa.s}$, při $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $26,3 \text{ Pa.s}$ a při teplotě $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dosahuje nejvyšší hodnoty, a to $56,2 \text{ Pa.s}$. Dle [42], je rychlost gelace chitosan/GDA ovlivněna zvyšující se koncentrací chitosanu nebo GDA, vzrůstající teplotou anebo přidáním neutrálních elektrolytů. Bylo zjištěno, že teplota $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ vedla k nejrychlejšímu nástupu gelace systému.

5.6 Tahová zkouška

Tahová zkouška byla provedena dle bodu 4.3.9. Měření bylo provedeno pro každou variantu filmu alespoň 4x. V případě, že došlo k předčasnému přetržení vzorku, nebyla data považována za relevantní a ze statistického hodnocení byla vyřazena. Mechanické vlastnosti byly měřeny i na mokřích vzorcích. Nicméně, kvůli jejich nízké pevnosti a přetržení již při upínání do čelistí měřicího přístroje, nebylo možné tato data použít. Naměřená data suchých filmů shrnuje

Tabulka 4. Bylo sledováno tahové napětí v okamžiku přetržení vzorku, prodloužení při přetržení a dále mez pevnosti v tahu.

Tabulka 4 Tahová zkouška – průměrné hodnoty

Veličina	Film č. 1	Film č. 2	Film č. 3	Film č. 4	Film č. 5
Napětí při přetržení [MPa]	48 ± 12	48 ± 6	88 ± 19	18 ± 3	28 ± 15
Prodloužení při přetržení [%]	9 ± 6	23 ± 4	4 ± 2	2 ± 1	19 ± 13
Mez pevnosti [MPa]	48 ± 12	48 ± 6	88 ± 19	18 ± 3	33 ± 13

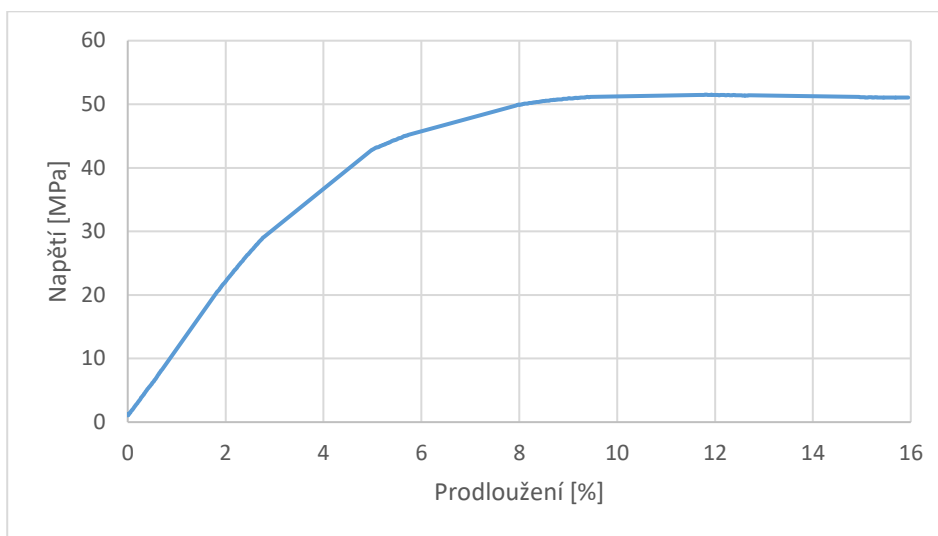
Z

Tabulka 4 je patrné, že koncentrace glutaraldehydu znatelně ovlivňuje mechanické vlastnosti filmů. Dle studie [43], která zkoumala vliv GDA na mechanické vlastnosti želatinových filmů, je zvyšující se koncentrace GDA zodpovědná za snížení schopnosti deformace neboli prodloužení při přetržení. Současně se však zvyšuje mez pevnosti a Youngův modul, tedy tuhost materiálu.

U filmů č. 1 a č. 2, které obsahují 1 wt% glutaraldehydu na navážku chitosanu, jsou hodnoty velmi podobné. Procentuální prodloužení filmu č. 1 je však podstatně nižší, než u filmu č. 2. Dle výše uvedené studie, by měla být hodnota prodloužení vyšší u filmu č. 1. Lze předpokládat, že příčinou může být rozdílný poměr chitosanu a želatiny. Filmy č. 3 a č. 4 obsahující 5 wt% na chitosan, se hodnotami podstatně liší. Nicméně, hodnoty filmu č. 3 rezonují se zjištěními ve výše zmíněné studii. Zatímco film č. 3 vykazuje velmi vysokou mez pevnosti a hodnotu tahového napětí, hodnoty filmu č. 4 jsou téměř čtyřnásobně menší. Hodnoty středového vzorku (filmu č. 5) přibližně zapadají do předpokládaného rozmezí, nicméně dalo by se očekávat, že hodnota prodloužení bude nižší než u filmu č. 2. Je viditelné, že zjištěné hodnoty vykazují značnou variabilitu. Při pouhé vizuální kontrole bylo zjevné,

že vzorky obsahují určité nehomogenity, místy se vyskytovaly vzduchové bubliny a konkrétně u filmu č. 4 bylo pozorováno nadměrné vysušení, i když byly všechny filmy vystaveny stejným podmínkám.

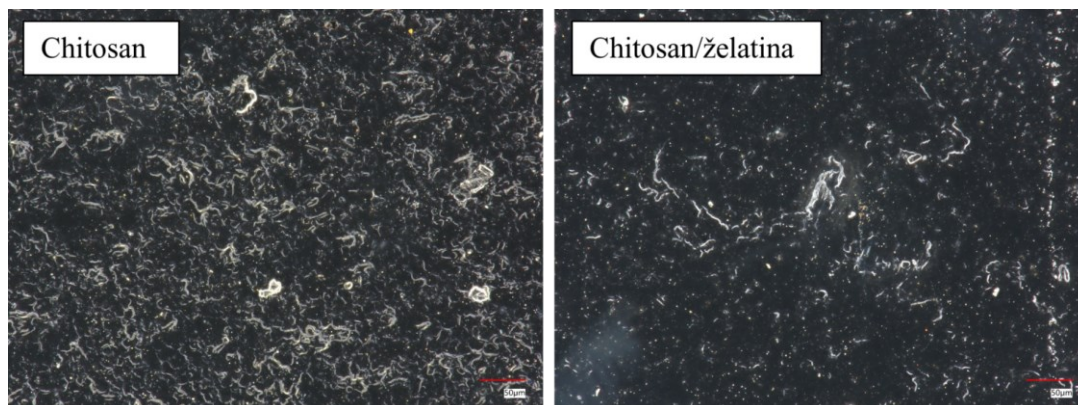
Na Obrázek 26 je znázorněna tahová křivka filmu č. 1. Jedná se o typický průběh závislosti napětí na prodloužení u charakterizovaných filmů.



Obrázek 26 Tahová křivka filmu č. 1– závislost napětí na prodloužení

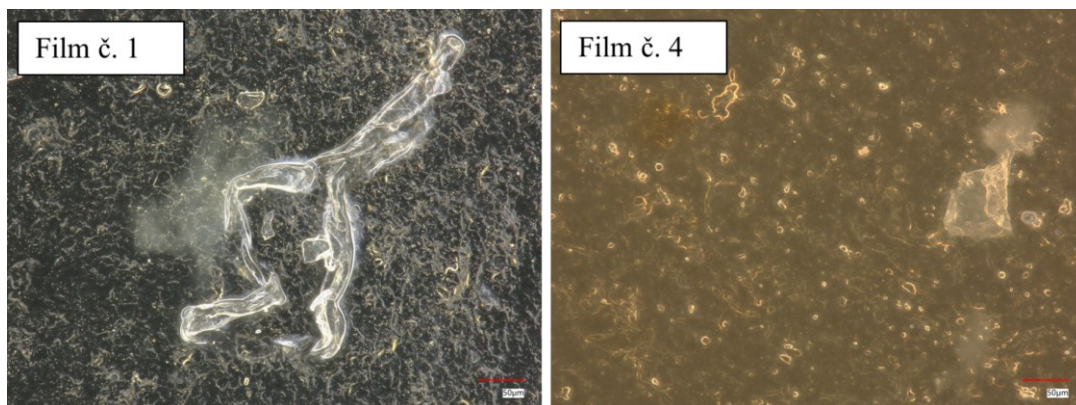
5.7 Mikroskopie

Povrchová morfologie hydrogelových filmů a gelů byla studována pomocí digitálního 3D mikroskopu. Na snímcích níže je zobrazen film připravený z čistého chitosanu a film připravený ze směsi chitosanu a želatiny.



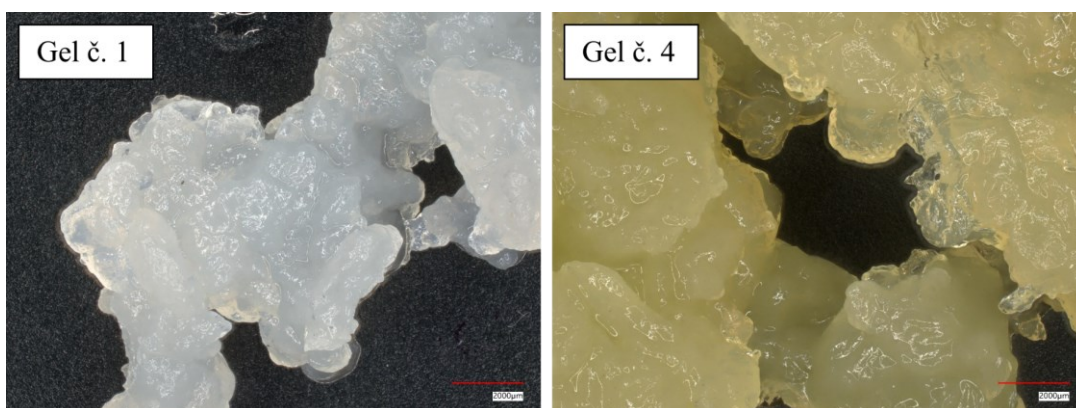
Obrázek 27 Morfologie chitosanového filmu a filmu chitosan/želatina (zvětšení 500x)

Na Obrázku 28 je viditelný rozdíl v povrchové struktuře filmů. Struktura chitosanového filmu je méně homogenní a drsnější. Pozorovaná přítomnost nehomogenit může souviset s neúplným rozpuštěním chitosanu v roztoku kyseliny octové. Na snímku vpravo lze pozorovat nižší míru drsnosti povrchu, která je důsledkem přítomnosti želatiny. Želatina zde působí jako stabilizátor, který vede k hladšímu povrchu filmu.



Obrázek 28 Morfologie filmu č. 1 a filmu č. 4 (zvětšení 500x)

Byly vybrány dva reprezentativní vzorky, a to film č. 1 a film č. 4 viz Obrázek 28. Na snímku (film č. 1) je viditelná výrazná nehomogenita, což je s největší pravděpodobností částice chitosanu. Ve srovnání se snímky výše (Obrázek 28) je struktura filmu odlišná, a to na základě proběhlého zesíťování složek filmu. Také lze zaznamenat nažloutlé zbarvení, které rovněž souvisí s přítomností GDA. Na snímku (film č. 4) je viditelné intenzivní zbarvení, rovněž způsobené GDA, jehož množství je ve srovnání s filmem č. 1 desetinásobné. Přítomnost žlutého zbarvení byla natolik intenzivní, že negativně ovlivnila viditelnost struktury materiálu i při mikroskopickém pozorování.



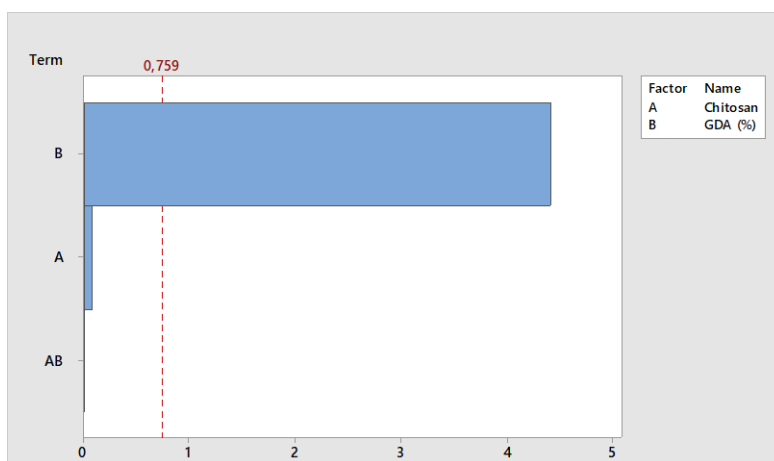
Obrázek 29 Morfologie gelu č. 1 a gelu č. 4 (zvětšení 20x)

Na Obrázek 29 jsou uvedeny dva reprezentativní vzorky identického složení jako hydrogelové filmy na Obrázek 28. Struktura gelů je převážně homogenní, povrch je hladký. U vzorků nebyla zaznamenána přítomnost pórů ani při větších zvětšeních.

6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

6.1 Vyhodnocení jednotlivých faktorů – dynamická viskozita

Na základě Paretova diagramu byl posuzován vliv jednotlivých faktorů A – chitosan, B – GDA a jejich kombinace AB na dynamickou viskozitu při teplotě 25 °C.



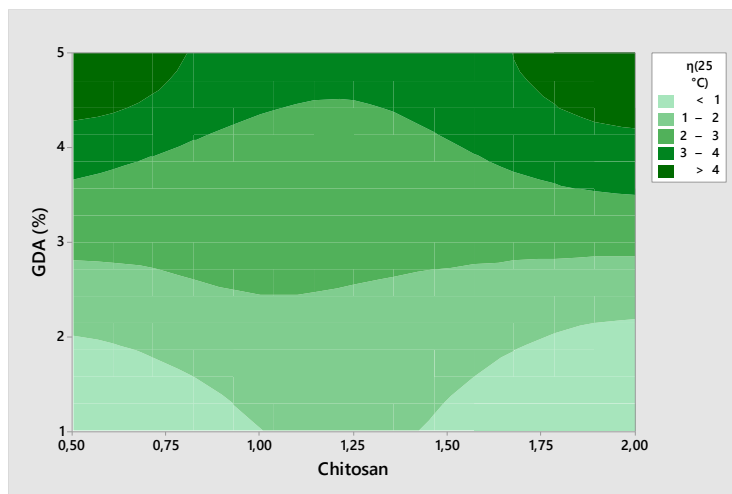
Obrázek 30 Pareto diagram – dynamická viskozita při 25 °C

Na základě Paretova diagramu výše lze bez pochyb konstatovat, že vliv faktoru B – GDA má velmi významný vliv na dynamickou viskozitu při teplotě 25 °C na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Statisticky významná hodnota je vypočtena na 0,759 Pa.s, přičemž hodnota faktoru B dosahuje téměř hodnoty 5 Pa.s. Faktor A – chitosan se jako statisticky významný neprojevil. Zajímavostí je, že kombinace obou faktorů má na viskozitu nulový dopad.

Regresní rovnice dynamické viskozity při teplotě 25 °C

$$-0,9516 - 0,05352 \text{ Chitosan} + 1,102 \text{ GDA} + 0,000437 \text{ Chitosan} \cdot \text{G} - 0,2383 \text{ Ct Pt}$$

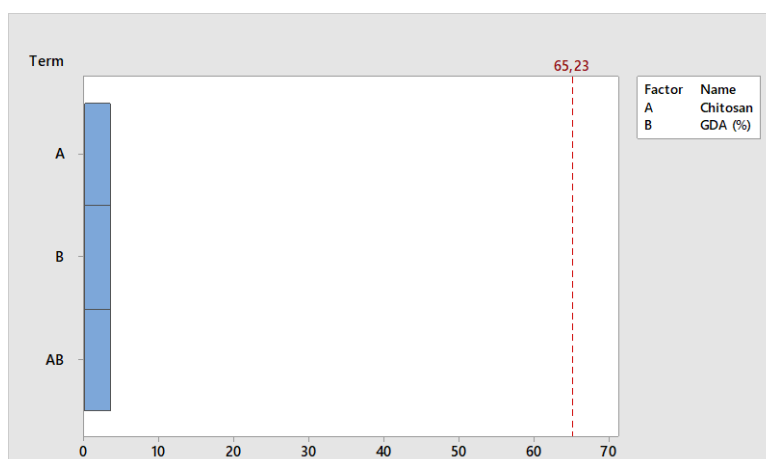
Statistická analýza vlivu jednotlivých faktorů na dynamickou viskozitu při 25 °C byla vyhodnocena prostřednictvím vrstevnicového diagramu viz Obrázek 31.



Obrázek 31 Vrstevnicový diagram – dynamická viskozita při 25 °C

Výše zobrazený vrstevnicový diagram popisuje vliv minimálního a maximálního množství chitosanu na viskozitu. Pokud by byl obsah chitosanu okolo 0,5 % a dále přibližně 2 %, za přídavku GDA zhruba 4,5–5 %, poté by viskozita dosahovala hodnoty 4 Pa.s a vyšší. V opačném případě, kdy by bylo množství GDA od 1–2 %, viskozita by se pohybovala okolo 1 Pa.s a méně. Rovněž lze pozorovat, že při množství GDA 3 % a celém rozsahu množství chitosanu, by hodnota činila 2–3 Pa.s.

Prostřednictvím Paretova diagramu je znázorněna statistická významnost jednotlivých faktorů na dynamickou viskozitu při 55 °C viz Obrázek 32.



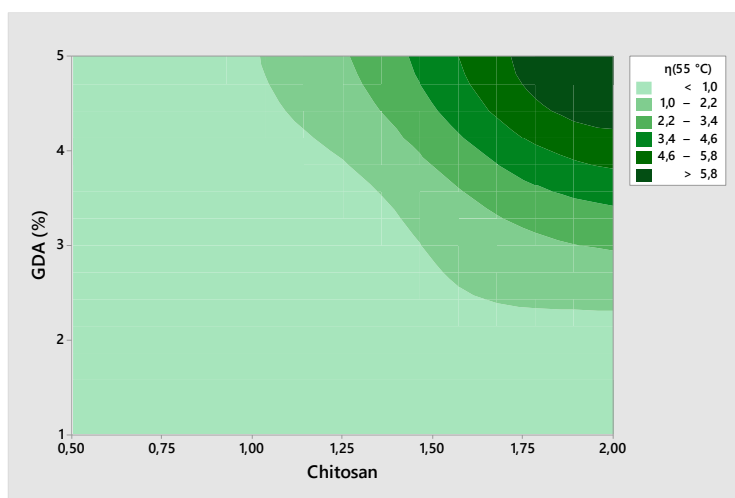
Obrázek 32 Paretův diagram – dynamická viskozita při 55 °C

Z výše uvedeného Paretova diagramu lze konstatovat, že žádný z uvedených faktorů nedosahuje hodnoty kritické významnosti, která je stanovena na 65,23 Pa.s. Oproti Paretově diagramu viskozity při 25 °C, zde je vliv obou faktorů, i jejich kombinace na stejné úrovni.

Regresní rovnice dynamické viskozity při 55 °C

$$0,5686 - 1,130 \text{ Chitosan} - 0,5676 \text{ GDA} + 1,139 \text{ Chitosan} \cdot \text{GDA} - 1,130 \text{ Ct Pt}$$

Vrstevnicový diagram viz Obrázek 33 vyjadřuje vliv jednotlivých faktorů na dynamickou viskozitu při teplotě 55 °C.

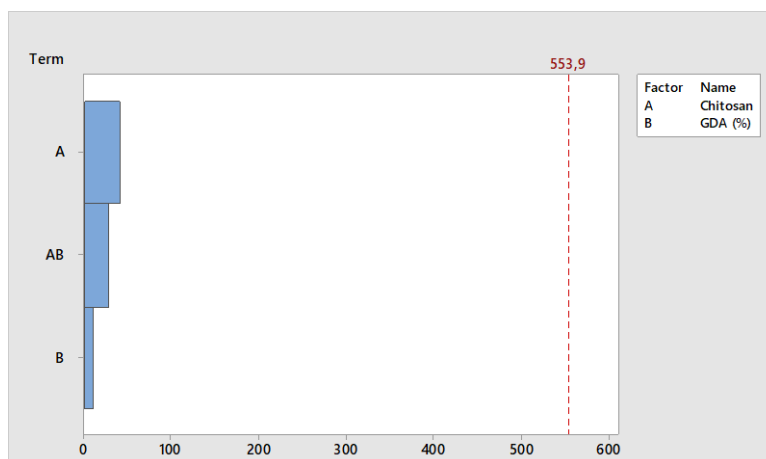


Obrázek 33 Vrstevnicový diagram – dynamická viskozita při 55 °C

Vrstevnicový diagram výše (Obrázek 33) zobrazuje, že množství GDA do přibližně 2,5 % má vliv na viskozitu, bez ohledu na množství chitosanu. Na rozdíl od vrstevnicového diagramu viskozity při teplotě 25 °C (viz Obrázek 31) se zde vyskytuje specifická oblast, ve které je množství chitosanu i GDA maximální. V této oblasti je dosaženo hodnoty viskozity 5,8 Pa.s a více.

6.2 Vyhodnocení jednotlivých faktorů – mez pevnosti v tahu

Na základě Paretova diagramu je vyhodnocena statistická významnost jednotlivých faktorů na mez pevnosti v tahu suchých filmů viz Obrázek 34.



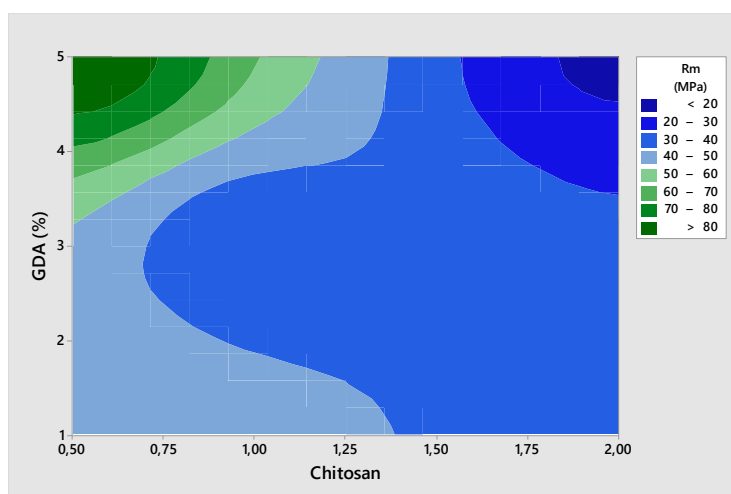
Obrázek 34 Paretův diagram – mez pevnosti

Paretův diagram výše nezachytil žádný faktor nebo jejich kombinaci, která by přesahovala kritickou hodnotu. Vliv na mez pevnosti filmů vykazuje chitosan a následně kombinace obou faktorů.

Regresní rovnice meze pevnosti suchých filmů

$$37,32 + 2,220 \text{ Chitosan} + 14,68 \text{ GDA} - 9,688 \text{ Chitosan} \cdot \text{GDA} - 21,75 \text{ Ct Pt}$$

Prostřednictvím vrstevnicového diagramu je vyjádřena závislost meze pevnosti na chitosanu a GDA viz Obrázek 35.



Obrázek 35 Vrstevnicový diagram – mez pevnosti

Z vrstevnicového diagramu výše je patrné, že mez pevnosti v tahu filmů je ovlivněna množstvím GDA. V případě, že by množství GDA dosahovalo maximálních hodnot a množství chitosanu bylo minimální, poté by byla mez pevnosti vyšší než 80 MPa. V opačném případě, kdy by bylo množství chitosanu rovněž maximální, mez pevnosti filmu by se pohybovala pod hodnotou 20 MPa. Z diagramu rovněž vyplývá, že s narůstajícím množstvím chitosanu se mez pevnosti snižuje.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyhotovit hydrogely na bázi chitosanu a želatiny ve dvou formách – ve formě filmů a gelů. Podstatná část práce je věnována charakterizaci připravených materiálů a zhodnocení vlivu metody přípravy na jejich vlastnosti.

Hydrogely byly připraveny v pěti různých variantách. Síťování bylo provedeno chemicky za použití glutaraldehydu. Díky různému poměru chitosanu a želatiny bylo možné sledovat jejich chování za stanovených podmínek a zhodnotit tak vliv zastoupení složek v systému.

Stanovení obsahu sušiny ukázalo, že převážná část hydrogelových filmů je tvořena pevným podílem, zatímco gelová struktura je z 98 % a více formována pouze vodou. Filmy s vyšším podílem želatiny jsou schopné absorbovat více vody, což se promítá na nižším obsahu sušiny. Filmy s vyšším podílem glutaraldehydu nebyly schopné pojmout takové množství vody jako filmy s nižším obsahem síťovacího činidla. Botnací schopnost může být ovlivněna také vyšším podílem želatiny. Výsledky botnání ukazují, že gely jsou schopné nabotnat o více než tisíc procent, zatímco filmy o řád méně.

Výsledky reologického měření potvrzují, že s vyšším obsahem síťovacího činidla roste i viskozita. To potvrzuje i Paretův diagram viskozity při teplotě 25 °C, kde byl zjištěn statisticky významný vliv chitosanu. S rostoucí teplotou klesá viskozita u téměř všech vzorků. Opačný jev nastal u vzorku č. 4, který vykazoval při teplotě 55 °C vyšší viskozitu než při teplotě 25 °C. Ve vrstevnicovém diagramu viskozity při teplotě 55 °C je zjištěn vliv na viskozitu při maximálním obsahu obou faktorů.

Tahová zkouška byla realizována pouze na filmech. Výsledky prokázaly vliv glutaraldehydu na mechanické vlastnosti, s jehož vyšším množstvím dochází ke snížení hodnoty prodloužení při přetržení. Nejlepších mechanických vlastností dosáhl film č. 3 s 5 wt% glutaraldehydu, ovšem hodnota prodloužení při přetržení byla velmi nízká. Z Paretova diagramu meze pevnosti nebyl zjištěn statisticky významný vliv žádného z faktorů. Na základě vrstevnicového diagramu lze potvrdit, že glutaraldehyd vykazuje vliv na mez pevnosti v tahu.

Mikroskopie povrchu filmů ukázala výskyt nehomogenit a nerozpuštěných částic chitosanu. Také byla pozorována změna struktury povrchu filmu následkem zesíťování a nažloutlé zbarvení, jehož intenzita se zvyšuje s množstvím glutaraldehydu. Povrchová struktura gelů byla hodnocena jako homogenní s absencí povrchových pórů.

Závěrem lze konstatovat, že se povedlo připravit chemicky zesíťované hydrogely ve formě filmů a gelů. Bylo prokázáno, že síťovací činidlo silně ovlivňuje jejich chování. Slabší vliv poté vykazuje poměr chitosanu a želatiny. Při charakterizaci gelů se vyskytla menší obtíž, konkrétně při stanovení botnací schopnosti. Vzhledem ke konzistenci gelů je vhodné tuto metodu upravit, aby bylo dosaženo validních výsledků.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] THOMAS, Sabu; GOPI, Sreeraj a AMALRAJ, Augustine (ed.). *Biopolymers and their Industrial Applications*. Online. Elsevier, 2020. ISBN 978-0-12-819240-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-05189-0>. [cit. 2025-04-14].
- [2] KUNAL, Pal et al. *Biopolymer-Based Formulations - Biomedical and Food Applications*. Online. Elsevier, 2020. ISBN 978-0-12-816898-1. Dostupné z: <https://app-knovel-com.proxy.k.utb.cz/kn/resources/kpBBFBFA01/toc?cid=kpBBFBFA01>. [cit. 2025-04-14].
- [3] M.M. ELNASHAR, Magdy a KARAKUŞ, Selcan. Introductory Chapter: Introduction to Biocomposites – New Insights. Online. In: *Biocomposites - Recent Advances*. IntechOpen, May 2023. ISBN 978-1-83768-249-2. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/86036>. [cit. 2025-04-14].
- [4] ARANAZ, Inmaculada et al. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. Online. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 19, article 3256. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym13193256>. [cit. 2025-01-19].
- [5] SHAKEEL AHMED, Annu; AHMED, Shakeel a IKRAM, Saiqa. Chitin and Chitosan: History, Composition and Properties. Online. In: *Chitosan: Derivatives, Composites and Applications*. Scrivener, August 2017, s. 3-24. ISBN 9781119364849. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119364849.ch1>. [cit. 2025-01-19].
- [6] E. TEIXEIRA-COSTA, Barbara a T. ANDRADE, Cristina. Chitosan as a Valuable Biomolecule from Seafood Industry Waste in the Design of Green Food Packaging. Online. *Biomolecules*. 2021, roč. 11, č. 11, article 1599. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom11111599>. [cit. 2025-01-19].
- [7] KOZMA, Michael; ACHARYA, Bishnu a BISSESSUR, Rabin. Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 19, article 3989. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym14193989>. [cit. 2025-01-19].

- [8] VAVŘÍKOVÁ, EVA a VINŠOVÁ, JARMILA. CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE. Online. *Chemické Listy*. 2009, roč. 103, s. 56-65. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf. [cit. 2025-01-19].
- [9] CHANDRASEKARAN, Murugesan et al. Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles: A Review. Online. *Processes*. 2020, roč. 8, č. 9, article 1173. ISSN 2227-9717. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pr8091173>. [cit. 2025-04-09].
- [10] DESAI, Nimeet et al. Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications. Online. *Pharmaceutics*. April 2023, roč. 15, č. 4, article 1313. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041313>. [cit. 2025-01-18].
- [11] KOŁODZIEJSKA, Marta et al. Chitosan as an Underrated Polymer in Modern Tissue Engineering. Online. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 11, 3019. ISSN 2079-4991. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nano11113019>. [cit. 2025-04-09].
- [12] CHEN, Yu. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Online. Elsevier, 2020. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2018-0-00171-1>. [cit. 2025-01-15].
- [13] ALEMU, Digafe; GETACHEW, Efrata a KANTI MONDAL, Ajoy. Study on the Physicochemical Properties of Chitosan and their Applications in the Biomedical Sector. Online. *International Journal of Polymer Science*. 2023, roč. 2023, č. 1, article 025341. ISSN 1687-9430. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2023/5025341>. [cit. 2025-01-19].
- [14] ROMÁN-DOVAL, Ramón et al. Chitosan: Properties and Its Application in Agriculture in Context of Molecular Weight. Online. *Polymers*. 2023, roč. 15, č. 13, article 2867. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym15132867>. [cit. 2025-01-19].
- [15] A. KORMA, Sameh. Production, Classification, Properties and Application of Chitosan. Online. *International Journal of Research in Agricultural Sciences*. 2016, roč. 3, č. 3, s. 171-179. ISSN 2348-3997. Dostupné

- z: https://ijras.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJRA_S_416_Final.pdf. [cit. 2025-01-19].
- [16] HARUGADE, Anuja; P. SHERJE, Atul a PETHE, Anil. Chitosan: A review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications. Online. *Reactive and Functional Polymers*. October 2023, roč. 191, č. 2023, article 105634. ISSN 1381-5148. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105634>. [cit. 2025-01-19].
- [17] AHN, Sung-II; CHO, Sangbuem a CHOI, Nag-Jin. Effectiveness of Chitosan as a Dietary Supplement in Lowering Cholesterol in Murine Models: A Meta-Analysis. Online. *Marine Drugs*. 2021, roč. 19, č. 1, article 26. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md19010026>. [cit. 2025-04-11].
- [18] LI, Bailei; ELANGO, Jeevithan a WU, Wenhui. Recent Advancement of Molecular Structure and Biomaterial Function of Chitosan from Marine Organisms for Pharmaceutical and Nutraceutical Application. Online. *Applied Sciences*. 2020, roč. 10, č. 14, article 4719. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app10144719>. [cit. 2025-04-12].
- [19] REZAEI, Mohammad a HAMARASHID HAMA, Nabaz. Antibacterial, antifungal, antiviral, and anticancer activities of chitosan and its derivatives: Basic mechanisms. Online. *Micro Nano Bio Aspects*. March 2024, roč. 3, č. 1, s. 23-28. ISSN 2980-8081. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.22034/mnba.2024.440881.1055>. [cit. 2025-01-20].
- [20] J. HAUG, I. a I. DRAGET, K. Gelatin. Online. In: *Handbook of Hydrocolloids*. Second edition. Woodhead, 2009, s. 142-163. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845694142500060>. [cit. 2025-01-20].
- [21] R. BAGAL-KESTWAL, D.; H. PAN, M. a CHIANG, B.H. Properties and Applications of Gelatin, Pectin, and Carrageenan Gels. Online. In: *Bio Monomers for Green Polymeric Composite Materials*. Wiley, 2019, s. 117-140. [cit. 2025-01-21].
- [22] A. RATHER, J. et al. A comprehensive review on gelatin: Understanding impact of the sources, extraction methods, and modifications on potential packaging

- applications. Online. *Food Packaging and Shelf Life*. December 2022, roč. 34, article 100945. ISSN 2214-2894. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100945>. [cit. 2025-01-22].
- [23] UMOREN, Saviour A.; SOLOMON, Moses M. a SAJI, Viswanathan S. *Polymeric Materials in Corrosion Inhibition - Fundamentals and Applications*. Online. Elsevier, 2022. ISBN 978-0-12-823870-7. Dostupné z: <https://app-knovel-com.proxy.k.utb.cz/kn/resources/kpPMCIFA03/toc>. [cit. 2025-04-16].
- [24] LEDVINA, Miroslav; STOKLASOVÁ, Alena a CERMAN, Jaroslav. *BIOCHEMIE PRO STUDUJÍCÍ MEDICÍNY II. DÍL*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1415-1.
- [25] PAL, Kunal a BANERJEE, Indranil. *Polymeric Gels – Characterization, Properties and Biomedical Applications*. Online. Elsevier, 2018. ISBN 978-0-08-102180-4. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102179-8.00001-6>. [cit. 2025-01-15].
- [26] MUSHTAQ, Farwa et al. Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. October 2022, roč. 218, s. 601-633. ISSN 1879-0003. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168>. [cit. 2025-01-20].
- [27] RÖCKEN, Martin et al. In: *Kapesní atlas dermatologie*. Praha: Grada, 2018, s. 8-9. ISBN 978-80-271-0106-1.
- [28] VISAKH, P. M. Bayraktar a OGUZ MENON, Gopalakrishnan. *Bio Monomers for Green Polymeric Composite Materials*. Online. John Wiley, 2019. ISBN 978-1-5231-3282-9. Dostupné z: <https://app-knovel-com.proxy.k.utb.cz/kn/resources/kpBMGPCM0U/toc?cid=kpBMGPCM0U>. [cit. 2025-04-17].
- [29] GASPAR-PINTILIESCU, Alexandra et al. Physicochemical and Biological Properties of Gelatin Extracted from Marine Snail *Rapana venosa*. Online. *Mar. Drugs*. 2019, roč. 17, č. 10, article 589. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md17100589>. [cit. 2025-05-04].

- [30] WANG, K.; NUNE, K.C. a MISRA, R.D.K. The functional response of alginate-gelatin-nanocrystalline cellulose injectable hydrogels toward delivery of cells and bioactive molecules. Online. *Acta Biomaterialia*. May 2016, roč. 36, s. 143-151. ISSN 1878-7568. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.016>. [cit. 2025-05-05].
- [31] HONG, Fandi, et al. Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review. Online. *Food Chemistry: X*. 30 March 2024, roč. 21. ISSN 2590-1575. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101095>. [cit. 2025-01-15].
- [32] H. ASWATHY, S; NARENDRAKUMAR, U a MANJUBALA, I. Commercial hydrogels for biomedical applications. Online. *HELIYON*. April 2020, roč. 6, č. 4, s. e03719. ISSN 2405-8440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03719>. [cit. 2025-01-16].
- [33] TAACA, Kathrina Lois M; PRIETO, Eloise I a VASQUEZ JR, Magdaleno R. Current Trends in Biomedical Hydrogels: From Traditional Crosslinking to Plasma-Assisted Synthesis. Online. *Polymers*. 2023, roč. 14, č. 13, article 2560. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14132560>. [cit. 2025-05-02].
- [34] MEHTA, Preeti; SHARMA, Monika a DEVI, Meena. Hydrogels: An overview of its classifications, properties, and applications. Online. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. November 2023, roč. 147, article 106145. ISSN 1878-0180. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.106145>. [cit. 2025-05-02].
- [35] RAMÍREZ-CAMPAS, Uriel. Physical and Structural Properties of Chitosan–Squid Gelatin Hydrogels. Online. *Gels*. 2025, roč. 11, č. 2, article 109. ISSN 23102861. Dostupné z: <https://doi.org/109.D0I:10.3390/gels11020109>. [cit. 2025-05-09].
- [36] MATHEW, Sheril Ann a ARUMAINATHAN, Stephen. Crosslinked Chitosan–Gelatin Biocompatible Nanocomposite as a Neuro Drug Carrier. Online. *ACS Omega*. May 2022, roč. 7, č. 22. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c01443>. [cit. 2025-05-09].

- [37] SUBRAMANIAN, K. a VEDIAPPAN, V. Hydrogels: Classification, Synthesis, Characterization, and Applications. Online. In: MISHRA, Munmaya K. (ed.). *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. Taylor & Francis, April 2016, s. 3879-3892. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/301300943_Hydrogels_Classification_Synthesis_Characterization_and_Applications. [cit. 2025-05-09].
- [38] FERREIRA DE SOUZA, Matheus. Chitosan/Gelatin Scaffolds Loaded with Jatropha mollissima Extract as Potential Skin Tissue Engineering Materials. Online. *Polymers*. 2023, roč. 15, č. 3, article 603. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polym15030603>. [cit. 2025-05-09].
- [39] GONÇALVES, J. O.; CRINI, Grégorio a LICHTFOUSE, Eric. Chitosan-Based Hydrogels. Online. In: *Sustainable Agriculture Reviews 36*. Springer Cham, 2019, Chapter 5. ISBN 978-3-030-16581-9. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-16581-9_5. [cit. 2025-05-09].
- [40] BLEBEA, Nicoleta-Mirela et al. Chitosan-Based Gel Development: Extraction, Gelation Mechanisms, and Biomedical Applications. Online. *Gels*. 2025, roč. 11, č. 4, article 275. ISSN 2310-2861. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/gels11040275>. [cit. 2025-05-09].
- [41] SIGMA-ALDRICH. *Chitosan*. Online. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/419419>. [cit. 2025-04-15].
- [42] RAMÍREZ-CAMPAS, Uriel. Physical and Structural Properties of Chitosan–Squid Gelatin Hydrogels. Online. *Gels*. 2025, roč. 11, č. 2, article 109. ISSN 23102861. Dostupné z: <https://doi.org/109.DOI:10.3390/gels11020109>. [cit. 2025-05-09].
- [43] BIGI, A. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Online. *Biomaterials*. 2001, roč. 22, s. 763-8. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00236-2). [cit. 2025-05-05].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Klasifikace biopolymerů dle původu	13
Obrázek 2 Struktura chitosanu.....	14
Obrázek 3 Struktura chitinu	16
Obrázek 5 Primární struktura želatiny	22
Obrázek 6 Fyzikální a chemická struktura hydrogelu	29
Obrázek 7 Síťování chitosanu a želatiny GDA.....	30
Obrázek 8 Roztoky chitosan/želatina	35
Obrázek 9 Sušení filmů.....	36
Obrázek 10 Příprava gelu	36
Obrázek 11 Vzniklý gel	36
Obrázek 12 Spektrometr Alpha II.....	38
Obrázek 13 Reometr Kinexus Pro+	39
Obrázek 14 Zkušební přístroj Galdabini Quasar 25	39
Obrázek 15 Digitální 3D mikroskop VHX 7000 Keyence	40
Obrázek 16 Reprezentativní ukázka filmů – film č. 1, film č. 4.....	41
Obrázek 17 Připravené gely.....	41
Obrázek 18 Procentuální obsah sušiny – filmy	42
Obrázek 19 Procentuální obsah sušiny – gely	42
Obrázek 20 Botnání – filmy.....	43
Obrázek 21 Botnání – gely	44
Obrázek 22 IR spektra – filmy.....	45
Obrázek 23 IR spektra – gely	46
Obrázek 24 Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti při 25 °C	47
Obrázek 25 Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti při 40 °C	48
Obrázek 26 Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti při 55 °C	48
Obrázek 27 Tahová křivka filmu č. 1– závislost napětí na prodloužení.....	52
Obrázek 28 Morfologie chitosanového filmu a filmu chitosan/želatina (zvětšení 500x)....	52
Obrázek 29 Morfologie filmu č. 1 a filmu č. 4 (zvětšení 500x)	53
Obrázek 30 Morfologie gelu č. 1 a gelu č. 4 (zvětšení 20x).....	53
Obrázek 31 Paretův diagram – dynamická viskozita při 25 °C	54
Obrázek 32 Vrstevnicový diagram – dynamická viskozita při 25 °C.....	55
Obrázek 33 Paretův diagram – dynamická viskozita při 55 °C	55
Obrázek 34 Vrstevnicový diagram – dynamická viskozita při 55 °C.....	56
Obrázek 35 Paretův diagram – mez pevnosti	57

Obrázek 36 Vrstevnicový diagram – mez pevnosti	57
--	----

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Základní odlišnosti chitosanu na základě molekulové hmotnosti	18
Tabulka 2 Klasifikace přírodních hydrogelů	28
Tabulka 3 Zastoupení složek směsí chitosan/želatina	35
Tabulka 4 Tahová zkouška – průměrné hodnoty	50

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DDA	Degree of Deacetylation (stupeň deacetylace)
GAGs	Glykosaminoglykany
GDA	glutaraldehyd
pHEMA	poly(2-hydroxyethylmethakrylát)
SCAPs	apikální papila

