



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ NA
MAKRO- I MIKRO- ÚROVNI**

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF HYDROGELS AT MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC LEVEL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Šárka Kropáčková

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1147/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: Šárka Kropáčková
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Strukturní charakterizace hydrogelů na makro– i mikro– úrovni

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma využití různých metod strukturní analýzy při studiu hydrogelových materiálů.
2. Na základě literární rešerše na vybraném modelovém hydrogelu otestovat využitelnost instrumentálních technik v dispozici CMV při charakterizaci struktury tohoto gelu na mikroskopické i makroskopické úrovni.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2018

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

Šárka Kropáčková
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miroslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium využití různých metod strukturní analýzy při studiu hydrogelů. Cílem bylo otestovat vybranou metodu pro studium struktury těchto gelů. Jako modelové systémy byly vybrány agarózové hydrogely z důvodu jejich snadné přípravy a široké oblasti využití. V této práci byla ke studiu struktury využita metoda oscilační reologie. Byly provedeny tzv. *strain-sweep* a *time-sweep* testy. Tyto testy byly provedeny v lineární viskoelastické oblasti, v oblasti *cross-over* a za oblastí *cross-over*. Bylo zjištěno, že v oblasti lineární viskoelasticity dojde působením deformace k porušení nekovalentních vazeb a tím i struktury gelu, následně však dojde k relaxaci a zvýšení elasticity. V oblasti *cross-over* a za oblastí *cross-over* nedochází k relaxaci a gel vykazuje chování tekutiny.

ABSTRACT

This Bachelor's thesis deals with study of use several methods for structural analysis of hydrogels. The aim was testing selected method to study structure of these gels. Agarose hydrogels were selected as model systems for their easy preparation and wide use. In this work the oscillatory rheology method was used to study the structure. *Strain-sweep* and *time-sweep* tests were performed. These tests were performed in a linear viscoelastic region, in the *cross-over* area and beyond the *cross-over* area. It was found that in linear viscoelastic region, the deformation causes the non-covalent bonds and the structure of the gel to break through. Consequently there is relaxation of the polymeric site and increase in elasticity. In *cross-over* area and beyond *cross-over* gels does not relax. The gels behave like a fluid.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hydrogel, agaróza, struktura, reologie

KEYWORDS

Hydrogel, agarose, structure, rheology

KROPÁČKOVÁ, Š. *Strukturní charakterizace hydrogelů na makro- i mikro- úrovni*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 48 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. především za trpělivost, čas a cenné rady a pomoc při vypracování bakalářské práce. Poděkování patří také Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za ochotu a pomoc při osvojování metody reologie. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

1 Úvod	7
2 Teoretická část	8
2.1 Disperzní soustavy	8
2.1.1 Klasifikace koloidních soustav	8
2.1.1.1 Podle typu	8
2.1.1.2 Podle počtu molekul	8
2.1.1.3 Podle počtu fází	8
2.1.1.4 Podle velikosti částic	9
2.1.1.5 Podle struktury disperzního podílu	9
2.2 Gelové disperzní soustavy	9
2.2.1 Klasifikace gelů	10
2.2.1.1 Gely reverzibilní (elastické)	10
2.2.1.2 Ireverzibilní gely (neelastické)	10
2.2.2 Vlastnosti gelů	11
2.2.2.1 Mechanické vlastnosti	11
2.2.2.2 Stárnutí	11
2.2.3 Využití gelů	11
2.3 Agaróza	11
2.3.1 Využití agarózy	12
2.4 Metody charakterizace hydrogelů	13
2.4.1 Přímé metody	13
2.4.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	13
2.4.1.2 Mikroskopie atomárních sil	14
2.4.2 Nepřímé metody	15
2.4.2.1 UV-VIS spektrometrie	15
2.4.2.2 Turbidimetrie a nefelometrie	17
2.4.2.3 Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR)	17
2.4.2.4 FTIR spektroskopie	18
2.4.2.5 Rtuťová porozimetrie	19
2.4.2.6 Reologie	20
3 Současný stav řešené problematiky	22
4 Experimentální část	29

4.1	Použité chemikálie.....	29
4.2	Použité přístroje	29
4.3	Příprava vzorků.....	29
4.3.1	Agarózové hydrogely.....	29
4.4	Reologické testy.....	29
5	Výsledky a diskuze.....	31
5.1	Strain-sweep a time-sweep	31
5.1.1	Strain-sweep.....	31
5.1.2	Lineární viskoelastická oblast (LVO).....	33
5.1.3	Oblast cross-over	35
5.1.4	Oblast za cross-over.....	36
5.2	Sledování relaxace bez předchozího namáhání gelů	37
5.2.1	Lineární viskoelastická oblast (LVO).....	38
5.2.2	Oblast cross-over	39
5.2.3	Oblast za cross-over.....	40
6	Závěr.....	43
7	Použitá literatura.....	44

1 ÚVOD

Gely se vyskytují všude okolo nás. Mnoho částí lidského těla je tvořeno hydrogely, například rohovka, sklivec nebo pojivové tkáně a vnitřní povrchy trávicí a dýchací soustavy (žaludek a plíce). Díky vysokému podílu gelů může být asi 70 % lidského těla tvořenou vodou, díky které probíhá mnoho biochemických procesů.

Agaróza je polysacharid, který je spolu s agaropektinem součástí agaru. Ten je získáván z mořských řas. V současnosti agaróza nachází řadu praktických uplatnění v laboratorní praxi. Vytváří síťovitý materiál, v němž může být realizována například elektroforéza, gelová filtrace nebo afinitní chromatografie. Pro tuto práci byla agaróza zvolena kvůli jednoduché přípravě a široké oblasti využití.

Ke studiu struktury agarózových hydrogelů byla v této práci použita metoda oscilační reologie. Tato metoda umožňuje sledovat reologické vlastnosti širokého spektra materiálů, kromě viskozity lze měřit vlastnosti v oscilačním poli (viskoelastické moduly, komplexní viskozita).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Disperzní soustavy

Disperzní soustava (=disperze) je tvořena disperzním podílem, rozptýleným ve formě částic v disperzním prostředí. V micelárních koloidních soustavách, v lyosolech, nebo ve zředěných roztocích polymerů existují disperzní částice samostatně a jsou schopny nezávislého pohybu. Působením fyzikálních sil se za určitých specifických podmínek shlukují do agregátů, které se pohybují jako celky. Pokud je dostatečná koncentrace disperzního podílu, dochází k agregaci v takové míře, že vzniká souvislá síťovitá struktura prostupující celým disperzním prostředím. K agregaci a vzniku síťovité struktury může dojít i působením chemických vazeb. Na základě velikosti částic lze disperzní systémy rozdělit na tři typy: analyticky disperzní systémy, hrubě disperzní systémy. Mezi těmito dvěma skupinami jsou částice koloidně disperzních systémů. [1]

2.1.1 Klasifikace koloidních soustav

2.1.1.1 Podle typu

Lyofobní koloidní disperze jsou heterogenní systémy, kde disperzní podíl a disperzní prostředí zaujímají dvě různé fáze. Disperzní podíl a disperzní prostředí jsou odděleny fázovým rozhraním, což ovlivňuje vlastnosti koloidní disperze. Přípravují se buď z makrofází dispergací nebo z pravých roztoků kondenzací. Svou stavbou a vzhledem připomínají spíše hrubé disperze, ale velikostí částic jsou řazeny mezi koloidní disperze. Jsou nestálé a mohou samovolně zanikat.

Lyofilní koloidy (koloidní roztoky) jsou homogenní systémy – disperzní podíl i disperzní prostředí jsou tvořeny jednou fází.

Asociativní (micelární) koloidy vznikají samovolnou reverzibilní asociací látek nízkomolekulárních a látek s amfifilní strukturou. [1],[2]

2.1.1.2 Podle počtu molekul

Podle počtu molekul lze disperzní soustavy dělit na monomolekulární systémy, kam patří analytické disperze nebo roztoky makromolekul, a polymolekulární, mezi které lze zařadit lyofobní soly, asociativní koloidy a hrubé disperze.

2.1.1.3 Podle počtu fází

Podle počtu fází lze disperzní soustavy klasifikovat jako homogenní, které jsou typické tím, že disperzní podíl i disperzní prostředí je tvořeno pouze jednou fází. Druhým typem jsou heterogenní disperzní soustavy, jejichž disperzní podíl a disperzní prostředí jsou odděleny fázovým rozhraním. Heterogenní systémy jsou dále rozděleny podle skupenství disperzního podílu a prostředí:

Tabulka 1: Dělení disperzních heterogenních soustav [3]

Disperzní prostředí	Disperzní podíl	Disperze	
		Koloidní	Hrubé
plynné	plynný		
	kapalný	aerosoly (mlhy)	děšť, mlhy
	pevný	aerosoly (dýmy)	prach, dým
kapalné	plynný	pěny	bubliny, pěny
	kapalný	emulze	emulze
	pevný	lyosoly	suspenze
pevné	plynný	tuhé pěny	minerály s uzavřenými plyny
	kapalný	tuhé emulze	minerály s uzavřenými kapičkami
	pevný	tuhé soly	tuhé směsi (eutektika)

2.1.1.4 Podle velikosti částic

Podle velikosti částic disperzního podílu je možné disperzní soustavy dělit na hrubé disperze, jejichž částice mají velikost větší než 1 μm , tyto částice lze pozorovat okem. Druhým typem jsou koloidní disperze, dolní hranice jejich velikosti je 1 nm, horní hranice je 1 μm . Posledním typem jsou analytické disperze, které mají částice menší než 1 nm.

2.1.1.5 Podle struktury disperzního podílu

Do této skupiny patří systémy s disperzním podílem ve formě částic a takové systémy, jejichž částice vytváří souvislou prostorovou síť prostupující kapalným prostředím (gely). [3]

2.2 Gelové disperzní soustavy

Gely jsou disperzní systémy, kde disperzní částice tvoří trojrozměrnou síť prostupující disperzním prostředím. Spojité tedy není pouze disperzní prostředí, ale i disperzní podíl. Díky vzniku 3D struktury se disperzní částice nemohou volně pohybovat prostředím, mohou vykonávat pouze vibrační pohyby. Síly, díky kterým ke vzniku této trojrozměrné struktury dojde, mohou být fyzikální i chemické povahy. Rozlišujeme tedy gely fyzikální a chemické. Vysušením gelu, tzn. odstraněním disperzního prostředí, vznikne systém obsahující pouze disperzní pevný podíl, který se nazývá xerogel. Částice vytvářející síťovitou strukturu bývají koloidní velikosti.

Gely přírodních polymerů, zejména polysacharidů, bývají netoxické a biologicky odbouratelné. Syntetické hydrogely naopak mívají lepší mechanické vlastnosti a pevnější strukturu. Lze také připravit kompozitní gely složené z více různých polymerů, jak přírodních

tak syntetických. Různým procesem výroby, druhem polymerů nebo přidáním různých elektrolytů je možné ovlivňovat a kontrolovat vlastnosti takto připravených gelů. [4]

2.2.1 Klasifikace gelů

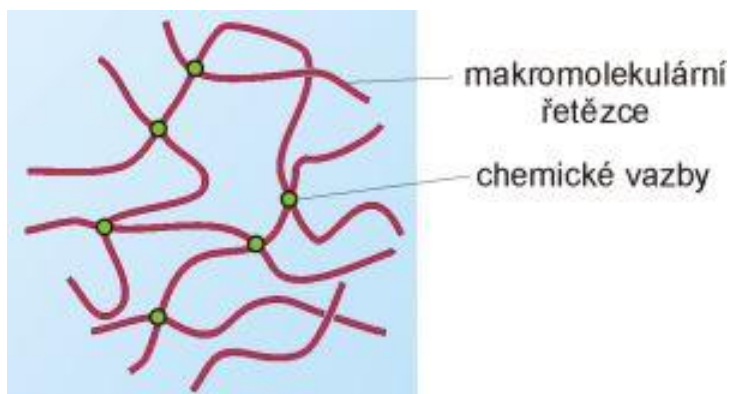
Podle chování ve vysušeném stavu lze gely rozdělit na dvě skupiny:

2.2.1.1 Gely reverzibilní (elastické)

Trojrozměrná struktura těchto gelů je tvořena sítí makromolekulárních řetězců. Ty jsou v určitých místech spojeny. Tato místa se nazývají uzly. Při vysoušení dojde ke zmenšení objemu. Tyto gely mohou vznikat buď z roztoků makromolekulárních látek procesem zvaným gelace, nebo při opětovném kontaktu xerogelu s rozpouštědlem. Vysoušení těchto gelů je tedy vratný proces. Reverzibilní gely lze dále dělit podle typu adhezních sil, které poutají disperzní částice na chemicky a fyzikálně síťované gely.

Chemicky síťované gely

Tyto gely mohou vznikat polymerací monomerů nebo zesíťováním lineárních polymerů za pomoci vhodného síťovacího činidla. Struktura těchto gelů je velmi pevná. Xerogely vzniklé z chemicky síťovaných gelů botnají pouze omezeně.



Obr. 1: Chemicky síťovaný gel [3]

Fyzikálně síťované gely

Vznik prostorové struktury tohoto typu gelu zajišťují fyzikálních síly. Působí zde velmi slabé nekovalentní interakce, například van der Waalsovy síly nebo vodíkové můstky, které zajišťují spojení polymerních vláken do uzlů. Tento jev je způsoben snížením afinity polymerního řetězce k rozpouštědлу, např. zvýšením koncentrace, snížením teploty.

2.2.1.2 Ireverzibilní gely (neelastické)

Gelace lyofobních solů dává vznik ireverzibilním gelům. Prostorová struktura je formována v důsledku porušení ochranné vrstvy disperzních částic. Na rychlost tvorby gelů má významný vliv teplota. Tyto gely po vysoušení vykazují porézní strukturu a po vysoušení si udržují téměř stejný objem jako původní gel. Při opětovném kontaktu s rozpouštědlem nejsou téměř schopny absorbovat kapalnou fázi, a proto nedojde k návratu do původního stavu, což znamená, že proces vysoušení je nevratný. [5]

Na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností lze gely dělit na amorfní (nekrytalické), semikrytalické (směs amorfní a krytalické fáze) a krytalické. Podle typu náboje jejich řetězců rozlišujeme gely neutrální (bez náboje), iontové, amfoterní (obojaký) a zwitterionové (obsahující aniontové i kationtové skupiny v každé opakující se jednotce).

2.2.2 Vlastnosti gelů

2.2.2.1 Mechanické vlastnosti

Do určitých hodnot tečného napětí gely vykazují elastické chování. Toto napětí závisí na množství a pevnosti uzlů polymerní sítě, tedy na stupni zesíťování. Reverzibilní gely, které mají uzly vázané kovalentními interakcemi, bývají elastické. S rostoucím počtem uzlů v síti roste pevnost gelu a klesá jeho elasticita. Některé fyzikálně síťované gely vykazují tzv. toxitropii, což je jev, kdy je možno působením mechanické síly převést gel zpět na sol, dojde k porušení slabých interakcí mezi částicemi. Může dojít k obnovení těchto vazeb a tím dojde k nové gelaci.

2.2.2.2 Stárnutí

Při procesu stárnutí gelu dochází ke změně jeho struktury. Polymerní síť se smršťuje a to způsobuje vytékání kapalné fáze z gelu. Tento děj je nazýván synereze. Může být podpořen zvýšením teploty nebo přidávkem elektrolytu. Stárnutí způsobuje změnu mechanických vlastností gelu. [1]

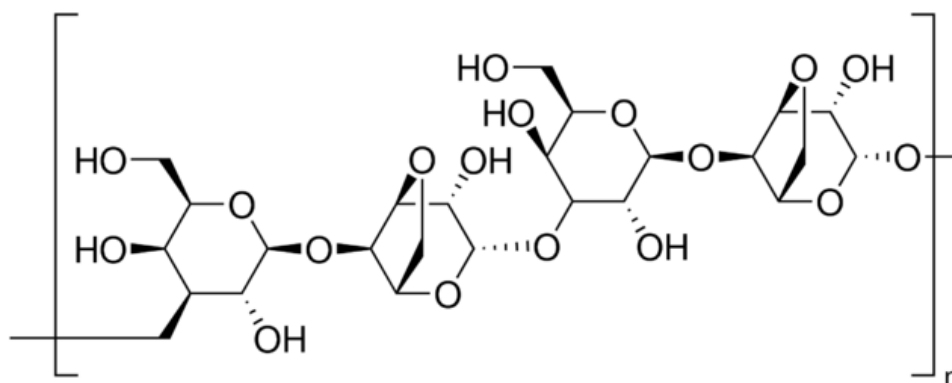
2.2.3 Využití gelů

Gely nacházejí široké spektrum využití napříč různými odvětvími. Lze je využít v potravinářství, kde zaujímají funkci zahušťovadel, stabilizátorů nebo želatinačních činidel. Neméně důležité je i jejich využití ve formě půdních sorbentů, jejichž funkcí je zadržovat vodu u kořenů rostlin. [6] Také se využívají při výrobě barev a lepidel.

Nejvýznamnější oblastí aplikací gelů je farmacie a biomedicína. Zde mohou být využívány jako materiály pro krytí a hojení ran [7], lze do nich inkorporovat biologicky aktivní látky, například nanočástice nebo buňky, a díky tomu je lze použít jako nosiče těchto látek.

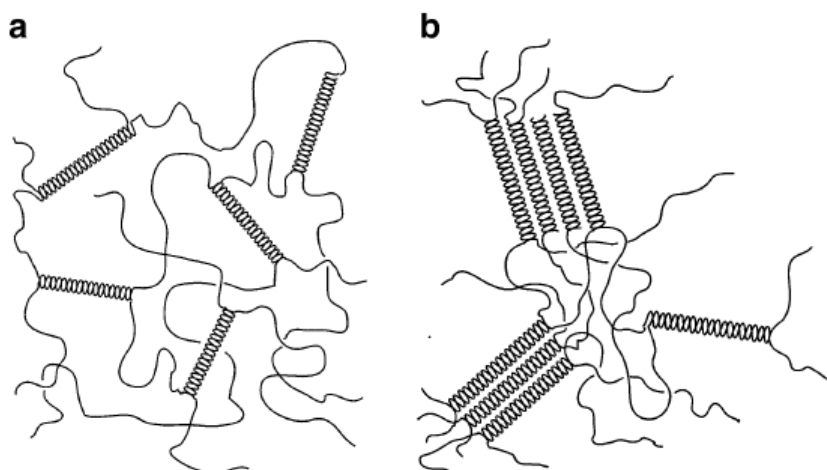
2.3 Agaróza

Agaróza je lineární polysacharid hojně využívaný v biotechnologiích. Je získávána z červených mořských řas izolací agaru z buněčné stěny a následným odstraněním agaropektinu. [8] Její struktura je tvořena střídajícími se galaktózovými a 3,6-anhydrogalaktózovými podjednotkami. Jedná se o prakticky nenabitý polysacharid, takže lze předpokládat nízké interakce s jinými látkami. Už při nízkých koncentracích agarózy dochází ke vzniku pevných gelů.



Obr. 2: Struktura agarózy [9]

Proces gelace je spjat se změnou struktury agarózy. Ve stavu solu je vnitřní struktura tvořena z náhodných a neuspořádaných spirál. Během procesu gelace dochází k formování těchto neuspořádaných vláken. Nejprve dojde ke vzniku uzlů, síla gelu je úměrná jejich počtu. Ve druhé fázi se začnou vytvářet spirály a struktura se formuje do podoby dvoušroubovic. [10],[11]



Obr. 3: Schéma trojrozměrné struktury agarózy během gelace [11]

2.3.1 Využití agarózy

Hojně využívány jsou agarózové hydrogely v medicíně a tkáňovém inženýrství. Používají se na výrobu scaffoldů pro cílený transport léčiv. Agaróza jako součást agaru je také využívána v potravinářství jako želatinační činidlo nebo zahušťovadlo a v mikrobiologii jako živná půda pro mikroorganismy. Vysoký potenciál využití agarózových gelů souvisí s jejich charakteristickými vlastnostmi, jako například termoreverzibilita a iontová nezávislost. [12]

Významnou roli zaujímá agaróza také v biotechnologii. V důsledku toho, že agarózové hydrogely vykazují nízkou afinitu k interakci s ostatními látkami je možné je využívat médium v gelové elektroforéze pro separaci nukleových kyselin. [13] V gelové permeační chromatografii jsou tyto hydrogely s definovanou velikostí pórů využívány jako médium pro dělení částic podle jejich molekulové hmotnosti. Další velkou výhodou při využívání agarózy je snadná příprava těchto gelů.

2.4 Metody charakterizace hydrogelů

Charakterizace struktury agarózových gelů je velmi důležitá zejména kvůli výše zmíněnému využití. V důsledku jejich využití v medicíně jako nosičů pro bioaktivní látky, je nutné zkoumat jejich mechanické vlastnosti kvůli biologické rozložitelnosti. Neméně důležitým kritériem je velikost pórů těchto gelů, a to zejména díky využití gelů v analytických a biochemických technikách (gelová elektroforéza DNA, gelová permeační chromatografie).

Metody, pomocí kterých můžeme stanovit strukturní vlastnosti hydrogelů lze rozdělit na přímé a nepřímé. Nepřímé jsou ty metody, u nichž je výstupem nějaká informace, na základě které dále odvozujeme strukturní vlastnosti dané látky. Lze sem zařadit měření pomocí reologie, rtuťové porozimetrie, optické metody, jako jsou například UV-VIS spektrometrie, infračervená spektrometrie (FTIR), NMR spektrometrie nebo turbidimetrie a nefelometrie.

U přímých metod je výstupem přímo vizualizace struktury daného gelu. Do této skupiny lze zařadit měření pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) nebo skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

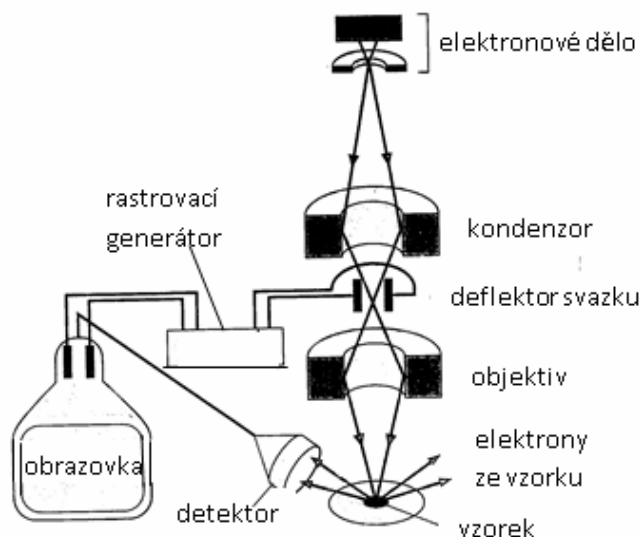
2.4.1 Přímé metody

2.4.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie je metoda umožňující studium mikrostruktury pozorovaných vzorků. Principem SEM je průchod svazku elektronů celým vzorkem. Odražený (emitovaný) paprsek je převeden na viditelný obraz. Vlnová délka elektronů je výrazně menší, než vlnová délka světla, díky tomu lze dosáhnout efektivního zvětšení až milionkrát.

Odražené elektrony lze rozdělit do čtyř skupin. Prvním typem jsou zpětně odražené elektrony, které dávají informace o povrchu vzorku a o materiálovém složení. Sekundární elektrony poskytují informace o povrchu. Pomocí augerových elektronů lze sledovat prvkovou (kvantitativní) složení. Primární elektrony interagují se vzorkem. Může docházet k pružnému a nepružnému rozptylu elektronů, některé elektrony mohou vzorkem projít, aniž by došlo k rozptylu. [14]

Vzorek musí být ve vakuu, aby nedocházelo k interakcím elektronů s molekulami vzduchu. Nevýhodou je složitá příprava vzorku. Nejprve dojde k fixaci preparátu, poté vymytí fixačních roztoků a odvodnění, nakonec je vzorek vysušen. Povrch vzorku se často pokrývá tenkou vrstvou kovu (zlato, palladium, platina). Poté se po něm přejíždí svazkem elektronů, zaostřeným pomocí elektromagnetického vinutí, které zde funguje jako čočka. Množství rozptýlených a vyražených elektronů ze vzorku je měřeno detektorem. Výstupem jsou trojrozměrné obrazy s vysokým rozlišením. [16]



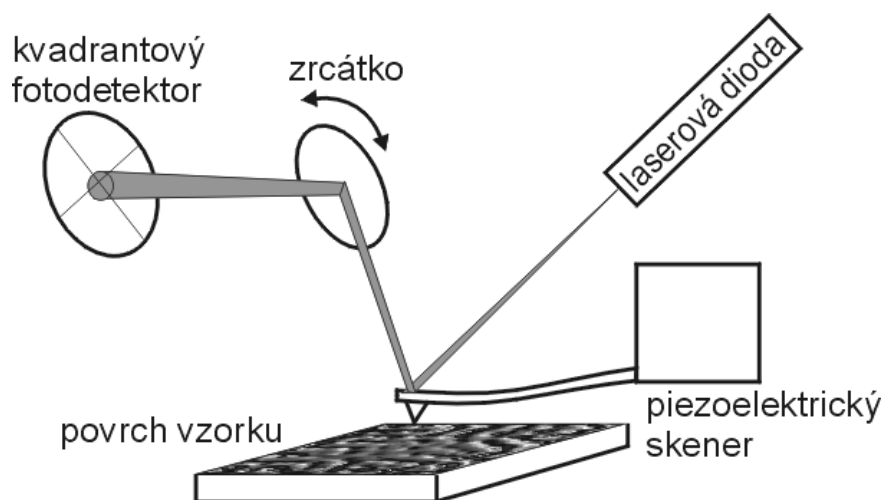
Obr. 4: Schéma skenovacího elektronového mikroskopu [16]

2.4.1.2 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je technika, která je využívána k trojrozměrnému zobrazování povrchů vodivých i nevodivých látek. Principem metody je detekce pohybu hrotu (vyrobený nejčastěji z křemíku) v blízkosti povrchu vzorku. Tento hrot je upevněn na pohyblivém raménku (tzv. cantileveru). Při přiblížení hrotu k povrchu vzorku dochází k působení přitažlivých nebo odpuzivých sil, které způsobí ohyb raménka s hrotem. Tento proces je detekován laserovou diodou a fotodetektorem. Pomocí tohoto mechanismu je možné určit vychýlení raménka ve vertikálním i horizontálním směru. Měření probíhá v kontaktním nebo bezkontaktním režimu. [17]

Interakce mezi hrotem a vzorkem jsou zprostředkovány nejčastěji van der Waalsovými silami, kapilárními a adhezními. Analýzu lze provádět v kontaktním a bezkontaktním režimu. V kontaktním režimu je vzdálenost hrotu a povrchu menší než několik angstromů. Projevují se odpuzující van der Waalsovy síly, které se snaží vychýlit raménko od povrchu vzorku. V bezkontaktním režimu je hrot několik desítek až stovek angstromů od povrchu vzorku, působí zde přitažlivé van der Waalsovy síly. Výhodou tohoto režimu je měření bez mechanického kontaktu, proto je možné měřit i měkké a elastické vzorky. Tyto přitažlivé a odpuzivé síly mezi raménkem s hrotem a povrchem vzorku generují elektrický signál, který vytváří obraz povrchu. [18]

Přímé metody tedy můžeme využít zejména pro získání informací o povrchové struktuře daného systému.



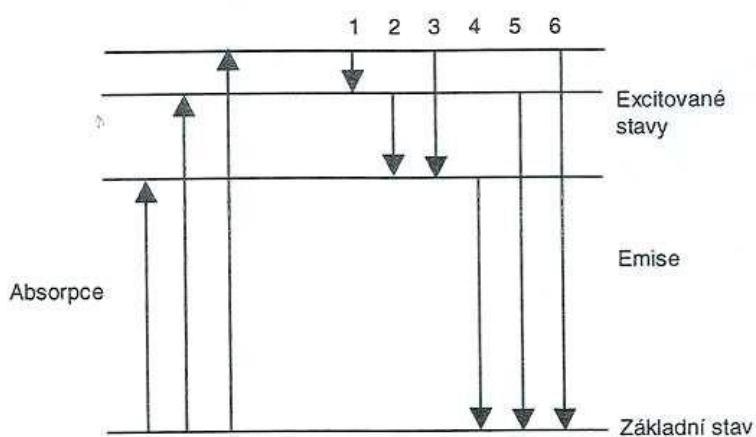
Obr. 5: Schéma mikroskopie atomárních sil [17]

2.4.2 Nepřímé metody

2.4.2.1 UV-VIS spektrometrie

Metoda spektrometrie je obor, který studuje interakce mezi zářením a vzorkem. V případě UV VIS spektroskopie jsou tyto interakce pozorovány v UV-VIS oblasti, tj. při vlnových délkách záření v rozmezí 200-800 nm.

Při absorpci záření dochází k interakci elektrické složky světla s elektrickým polem molekuly, toto pole je vytvářeno pohybujícími se elektrony jednotlivých atomů. Elektrony se pohybují v orbitalech, jejich energie jsou kvantovány. Elektrony v nižších energetických stavech jsou označovány jako elektrony v základním stavu. Mohou absorbovat určitá kvanta energie a tím se dostat do energeticky bohatších stavů, dojde k tzv. excitaci. Při absorpci dochází k přechodu molekuly do excitovaného stavu. Tento stav trvá velmi krátkou dobu, částice se vrací zpět do základního stavu. Dojde k uvolnění kvanta energie, které bylo přijato při přechodu do excitovaného stavu. [19],[20]



Obr. 6: Průběh absorpce a emise [19]

Část záření je pohlcena, část vzorkem pouze projde a je detekována přístrojem. Poměr intenzit dopadajícího a prošlého světla vzorkem se nazývá transmittance (propustnost) T , která je dána vztahem:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

kde I je intenzita světla dopadajícího na vzorek a I_0 intenzita světla, které vzorkem projde. Pokud je hodnota transmitance nulová, znamená to, že veškeré světlo je pohlceno. Pokud je hodnota rovna jedné, veškeré záření prošlo.

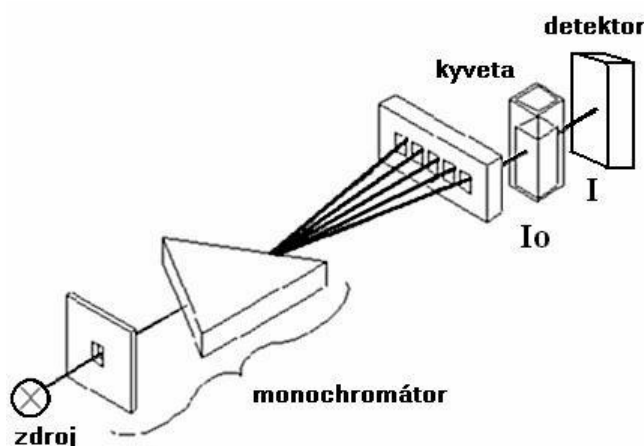
Absorbance A vyjadřuje schopnost molekul látky pohlcovat záření o určité vlnové délce a je definována vztahem:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Absorbance závisí na koncentraci a vlastnostech absorbujících částic, tato závislost je dána Lambert-Beerovým zákonem:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

kde ε je molární absorpční koeficient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), což je konstanta specifická pro danou vlnovou délku a látku, l je tloušťka absorbující vrstvy (cm) a c je látková koncentrace (mol/l). Z tohoto vztahu vyplývá, že při určité vlnové délce je absorbance přímo úměrná koncentraci stanovované látky. Toho lze využít při stanovování koncentrace vzorku o neznámém složení. Tu lze stanovit dvěma způsoby, buď metodou standardního přídavku, kdy se měří absorbance neznámého vzorku bez a s přidavky určitého množství standardu. Tato metoda se využívá například pro stanovení odpadních vod. Metoda kalibrační křivky je založena na změření absorbance několika vzorků o známých koncentracích při stejné vlnové délce, z těch je sestavena kalibrační křivka (lineární závislost absorbance na koncentraci) a pomocí Lambert-Beerova zákona lze stanovit koncentraci v neznámém vzorku. [19],[20],[21]



Obr. 7: Schéma UV-VIS spektrofotometru [20]

Zdrojem záření bývají nejčastěji wolframové žárovky. Paprsek ze zdroje prochází monochromátorem, jehož funkcí je odfiltrovat nežádoucí vlnové délky, poté paprsek prochází vzorkem a dopadá na detektor. Velkou výhodou této metody je rychlost a neinvazivnost.

2.4.2.2 Turbidimetrie a nefelometrie

Tato metoda je založená na měření stupně zákalu (turbidity). Při průchodu paprsku vzorkem dochází k rozptylu a částečné absorpci záření. Při turbidimetrii je sledován pokles intenzity světla procházejícího tímto vzorkem. Turbidimetrická měření jsou hůře reprodukovatelná z důvodu současného rozptylu a sedimentace částic, proto je nutné, aby vzorek byl dostatečně stálý. K tomuto účelu lze použít ochranné polymery, např. polyetylglykol.

Nefelometrie je metoda, při níž se měří intenzita sekundárního světla odraženého od částic v určitém úhlu ke směru, ve kterém do vzorku vniká záření. Rozptyl je založen na Tyndallově jevu, což znamená, že rozptýlené záření má stejnou vlnovou délku jako záření na částice dopadající. Pomocí nefelometrie lze měřit vzorky s nižší koncentrací rozptýlených částic. Pro nefelometrické měření se používají nástavce k fotometru nebo speciální přístroje, tzv. nefelometry, např. konvenční, kde je zdrojem záření žárovka s halogenovou atmosférou nebo xenonová výbojka, nebo laserové, u nichž je světelným zdrojem helium-neonový laser. [20],[22]

Tyto rozptylové metody lze využít například pro stanovení velikosti pórů hydrogelu. Například ve studii [35] byla stanovována velikost pórů agarózových hydrogelů pomocí vlnového exponentu, který lze získat ze závislosti turbidity na vlnové délce.

2.4.2.3 Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR)

NMR spektroskopie je metoda, umožňující studium struktury sloučenin s využitím interakce elektromagnetických vln a atomových jader s nenulovým jaderným spinem (například ^1H , ^{13}C , ^{19}F) v silném magnetickém poli. Bez působení magnetického pole jsou spiny uspořádány náhodně a jejich energie je stejná. Pokud na spiny začne působit magnetické pole, dojde k rozdělení spinů na dvě hladiny s nižší energií (nadbytek spinů) a s vyšší energií. Pokud nyní začne působit radiofrekvenční záření, dojde k absorpci a excitaci spinů na vyšší hladinu. Po ukončení působení záření dojde k deexcitaci, která je následně měřena. Aby intenzita signálů byla co nejvyšší, je nutné použít co nejsilnější magnetické pole.

V blízkosti vzorku je umístěna cívka, kterou protéká střídavý proud s frekvencí v oblasti MHz. Tato cívka je vyrobena ze supravodivého materiálu a je ponořena v kapalném heliu (nízká teplota). Dewarova nádoba s cívkou je umístěna ve vnější dewarově nádobě s kapalným dusíkem. Cívka vytváří magnetické pole o síle 4-18 T. Mění se frekvence proudu v cívce nebo intenzita magnetického pole. Dochází k rezonanci (přijímání a vysílání kvant energie jádrem). Tyto energie jsou detekovány přijímačem. Velikost této energie je charakteristická pro dané jádro a jeho umístění v molekule.



Obr. 8: Bruker Avance 600 MHz NMR-spektrometr [23]

Výstupem jsou NMR spektra. Ty lze měřit dvěma způsoby. CW-NMR, tzv. postupné měření spektra bod po bodu, je časově náročné a lze využít pouze pro vzorky s vysokou koncentrací. Proto se používá metoda FT-NMR, kdy jsou jedním radiofrekvenčním pulzem, nebo sekvencí těchto pulzů, excitovány všechny jaderné spiny. Měřením následné deexcitace a pomocí použití Fourierovy transformace je získáno NMR spektrum.

Nevýhodou této metody je její citlivost, pro analýzu je nutno používat větší množství vzorku. Velkou výhodou je nedestruktivnost. [20],[24]

Pomocí NMR spektroskopie lze získat informaci o mobilitě molekul vody v gelu, lze tedy stanovit množství vody v gelu. [31] Podle studie [37] lze získat i informaci o velikosti pórů gelu.

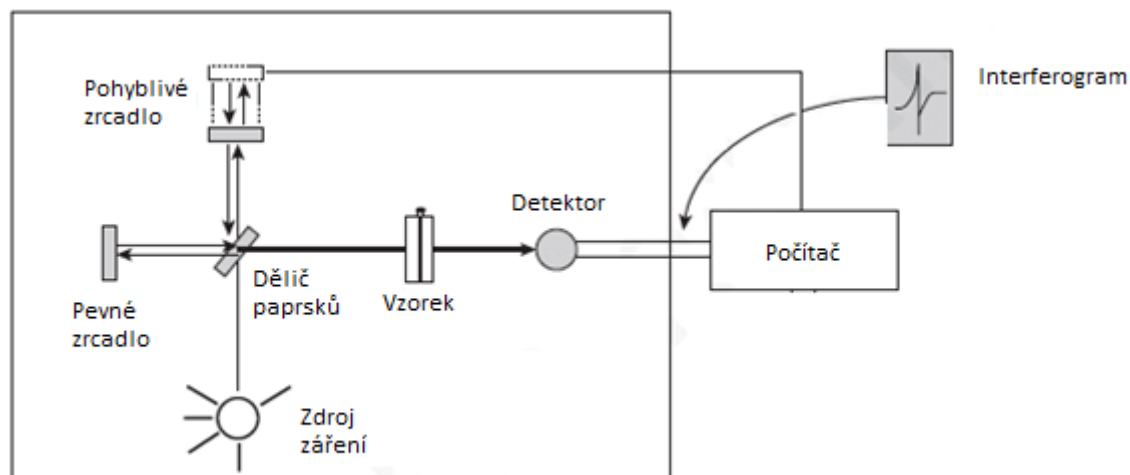
2.4.2.4 FTIR spektroskopie

Infračervená spektroskopie je technika používaná pro studium struktury látek. Měří se absorpce infračerveného záření o různých vlnových délkách při průchodu vzorkem. Za infračervené záření je považováno elektromagnetické záření o vlnových délkách v rozmezí od 760 nm do 1000 mm. Energie tohoto záření nestačí pro excitaci elektronů, ale dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekul. Výstupem je závislost intenzity (transmitance nebo absorbance) na vlnové délce záření. [26]

FTIR spektrometry pracují na principu interference spektra, které měří intenzitu záření po průchodu vzorkem. U těchto přístrojů je nezbytné využít metodu Fourierovy transformace, což je matematický nástroj pro zpracování a analýzu signálů. Je to zobrazení, kdy ke každému signálu je přiřazena funkce, z jejichž vlastností lze vyčíst informace o původním signálu.

Zdrojem záření bývá vysokotlaká rtuťová výbojka nebo wolframová žárovka. Součástí zdroje je zobrazovací optika, která zajišťuje vytvoření svazku rovnoběžných paprsků. Další součástí je dělič svazku paprsků ve formě tenkého filmu (nejčastěji oxidu železitého), který je nanesen na zbrošeném okénku (KBr, CaF₂). Dělič svazku paprsků musí mít vysokou propustnost. Další součástí jsou dvě zrcadla, která jsou k sobě vzájemně kolmá. Jedno zrcadlo je

nepohyblivé, druhé se pohybuje konstantní rychlostí. Intenzita záření je snímána detektorem. [25]



Obr. 9: Schéma FTIR spektrometru [27]

FTIR spektroskopii lze použít při kvalitativním i kvantitativním stanovení, pro tuhé vzorky (ve formě lisovaných tablet) i roztoky (nutno použít nepolární nebo málo polární rozpouštědla). [26]

Při studiu struktury gelů lze tuto metodu využít pro identifikaci chemické struktury gelů. Může sloužit pro identifikaci různých funkčních skupin (např. $-\text{OH}$, N-H , CH_3).

2.4.2.5 Rtuťová porozimetrie

Rtuťová porozimetrie je metoda založena na jevu kapilární deprese. Při ponoření tuhého porézního materiálu do tekutiny, která jej špatně smáčí nebo nesmáčí vůbec (úhel smáčení je větší než 90°), může dojít působením vnějšího tlaku ke vniknutí této kapaliny do pórů. Čím menší pory mají být zaplněny, tím musí být tlak větší. Při rtuťové porozimetrii je touto kapalinou rtuť. Tlak, potřebný k naplnění pórů rtutí a poloměr těchto pórů spolu souvisí podle Laplaceovy-Youngovy rovnice nepřímou úměrností:

$$p = h \cdot \rho \cdot g = -\frac{2 \cdot \gamma \cdot \cos \theta}{R} \quad (4)$$

kde p (Pa) je tlak, pod kterým rtuť vniká do pórů, h (m) je výška sloupce rtuti v póru, ρ (g/m^3) je hustota rtuti, g (m/s^2) je zrychlení, γ (N/m) je povrchové napětí rtuti, θ je úhel smáčení stěn pórů a R (m) je poloměr póru. Každé zvýšení tlaku způsobuje, že rtuť vnikne do pórů o menším poloměru, díky této metodě tedy lze zjistit rozdělení objemu pórů podle velikosti. [28]

Toto platí pouze za předpokladů, že pevná látka má póry s neelastickými stěnami a pravidelným tvarem (to je u reálných materiálů nepravděpodobné), je známa hodnota kontaktního úhlu a povrchové napětí rtuti není závislé na velikosti póru ani tlaku.

Měří se závislost aplikovaného tlaku na úbytku rtuti v nádobě, z níž je vtlačována do pórů analyzovaného materiálu. Ten nesmí reagovat se rtutí, je výhodné odstranit z materiálu

vzduch a další plyny. Tato metoda je poměrně rychlá a jednoduchá, její nevýhodou je kontaminace vzorku rtutí. [29]

2.4.2.6 Reologie

Obecně je reologie nauka o deformaci a tečení látek. Zkoumá vztah mezi napětím a deformací látek, nevytváří však ostrý přechod mezi látkami pevnými a kapalnými. Reologické chování materiálů je omezeno dvěma extrémy, ideální newtonovskou viskózní kapalinou, což je reologický model viskózní látky, který se řídí Newtonovým zákonem. Druhým extrémem je elastické (Hookovo) těleso. Většina reálných materiálů však vykazuje mechanické chování s elastickými i viskózními vlastnostmi. Tyto materiály jsou označovány jako viskoelastické.

Pro všechny newtonovské kapaliny platí Newtonův zákon:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (5)$$

kde σ je smykové napětí, η je dynamická viskozita a $\dot{\gamma}$ je smyková rychlost. Pro newtonovské kapaliny je hodnota dynamické viskozity konstantní. Platí, že viskozita newtonovské kapaliny nezávisí na smykové rychlosti. Typickými newtonovskými kapalinami jsou voda, glycerol a minerální oleje.

Pro elastická tělesa platí Hookův zákon elasticity:

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad (6)$$

kde γ je smyková deformace a G je smykový modul pružnosti, charakterizující tuhost materiálu. Smykový modul ideální elastické látky je nezávislý na smykovém napětí ani době namáhání.

Viskoelastické materiály vykazují chování viskózních i elastických látek. Lze mezi ně zařadit většinu reálných látek, například polymery, kovy a některé biologické materiály (tkáně). Charakteristickou vlastností těchto materiálů je to, že při působení síly na tyto látky dochází k deformaci, ale po ukončení působení síly se materiál částečně vrátí do původního stavu. Při dostatečně malém zatížení může dojít k úplnému návratu do původního stavu, pokud je působící síla dostatečně velká, dojde k trvalému poškození materiálu. U těchto materiálů je část vložené mechanické energie využita k odlehčení tohoto materiálu, zbytek se disipuje.

Gely patří mezi viskoelastické pevné látky. Vlastnosti těchto materiálů se vyjadřují pomocí smykových modulů pružnosti. Komplexní smykový modul pružnosti G^* je složen z elastického (paměťového) modulu G' (vyšší u pevných látek) a viskózního (ztrátového) modulu G'' . Elastický modul udává schopnost tělesa uchovat elastickou energii, viskózní modul je vztažen k nevratné změně deformační energie. Pokud je elastický modul vyšší než viskózní, převládá složka elastická. V opačné situaci převládá složka viskózní.

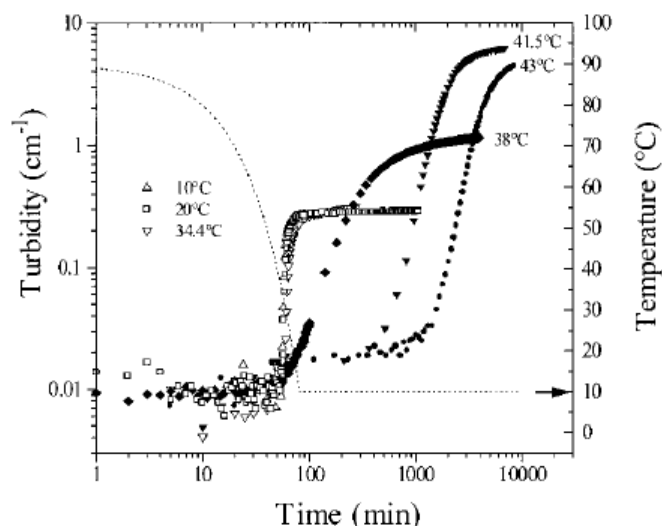
Poměr těchto modulů vyjadřuje ztrátový úhel:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (7)$$

Fázový úhel nabývá hodnot v rozmezí 0° a 90° . Pro ideální elastické materiály je velikost úhlu 0° , zatímco pro ideální viskózní kapaliny je fázový posun roven 90° . [30]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Autoři práce [31] studovali vliv tepelné historie na strukturu a mechanické vlastnosti agarózových gelů. Charakterizace byla provedena za pomoci turbidimetrie. Bylo zaznamenáno zákalové spektrum jako funkce času. Při vysokých teplotách jsou agarózové gely průhledné, hodnoty zákalu jsou proto nízké. Při ochlazení hydrogelu na teplotu gelace dojde k prudkému zvýšení zákalu díky agregaci helikálních struktur.



Obr. 10: Časový průběh zákalu při 800 nm 2% agarózy [31]

Obr. 10 znázorňuje časovou závislost turbidity na teplotě. Vzorky agarózy byly ochlazovány na teploty T_f (znázorněno v grafu). Bylo zjištěno, že se zvyšující se teplotou T_f dochází k pozdějšímu nástupu zákalu.

Dále byl měřen elastický modul pomocí reologie. Byla zjištěna nepřímá závislost turbidity a elastického modulu. Byly identifikovány dvě teplotní oblasti při gelaci agarózy. Pod teplotou 35°C gely vykazují vysoký modul pružnosti a nízké hodnoty zákalu. Struktura gelu je homogenní. Pro teploty vyšší než 35°C dochází ke zpomalení vzniku gelové sítě a postupný vznik makrostruktury. Důsledkem toho je nižší elasticita gelu a prudké zvýšení zákalu. Tyto výsledky byly ověřeny pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

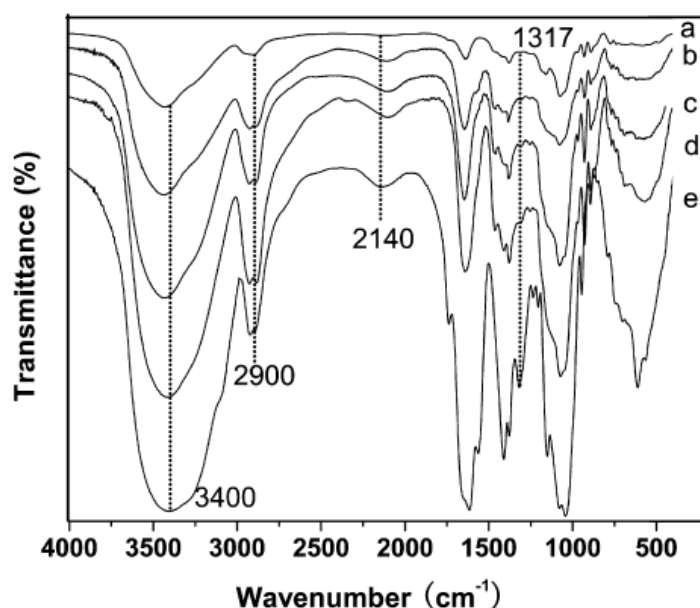
Ve studii [32] se autoři zabývali syntézou fluorescenčního agaróza-tryptofanového hydrogelu a zesíťováním tohoto hydrogelu genipinem. Systém agaróza-tryptofan byl charakterizován pomocí FTIR a NMR spektroskopie, gel zesíťovaný pomocí genipinu má výrazně modrou barvu a byl podroben měření pomocí UV-VIS spektroskopie. Oba hydrogely vykazovaly podobné gelující charakteristiky jako agarózový hydrogel, byly však stabilnější při vysokých a nízkých hodnotách pH. Díky těmto modifikacím měly gely lepší vlastnosti než samotná agaróza, například lepší pH stabilitu a schopnost fluorescence, proto tyto hydrogelové materiály mohou najít využití v biomedicínském a farmaceutickém průmyslu jako systémy odstraňující radikály a fluorescenční sondy.

Cílem práce [33] bylo pomocí UV-VIS a fluorescenční spektroskopie studovat termoreverzibilní fázové přechody agarózových gelů o různé molekulové hmotnosti a stanovit

teploty fázových přechodů sol-gel a gel-sol. Pomocí UV-VIS spektroskopie byla měřena absorbance při vlnové délce 400 nm, fluorescence byla měřena při 511 nm s přidavkem pyraninu, který excituje při 421 nm. Gelová struktura je složena z dvoušroubovic a vody. Tato struktura brání průchodu fotonů gelem a hodnoty intenzity průchodu paprsku jsou nízké. Totéž platí pro intenzitu fluorescence. Systém vykazuje heterogenitu. Při zvýšení teploty dochází k molekulárním vibracím, což vede k rozpadu struktury dvoušroubovic v důsledku rozpadu slabých vodíkových vazeb, a následnému fázovému přechodu gel-sol. Systém ve stavu solu se stává homogenním a dochází ke zvýšení hodnot intenzit fluorescence a průchodu světla. Při následném ochlazení dochází v důsledku opětovného vzniku vodíkových vazeb k vytvoření dvoušroubovic. Toto chování se nazývá hystereze a je typické pro polysacharidy, které jsou schopny termoreverzibilních fázových přechodů.

V této studii bylo prokázáno, že lze sledovat výše popsané fázové přechody sol-gel a gel-sol pomocí UV-VIS a fluorescenční spektroskopie. Bylo zjištěno, že obě metody mohou být použity pro stanovení teploty fázového přechodu termoreverzibilních gelů a výsledky obou metod se shodují.

Cílem práce [34] bylo připravit kompozitní gely agarózy a kyseliny hyaluronové (HA) s kontrolovanou degradací a zkoumat vliv poměru obou složek na strukturu, tepelnou stabilitu a degradaci hydrogelů in vivo pomocí různých metod, jako je například termogravimetrická analýza, FTIR spektroskopie nebo SEM mikroskopie. Pomocí FTIR spektrometru Nicolet Avatar 360 byla stanovena FTIR spektra agarózy, kyseliny hyaluronové a jejich kompozitů.

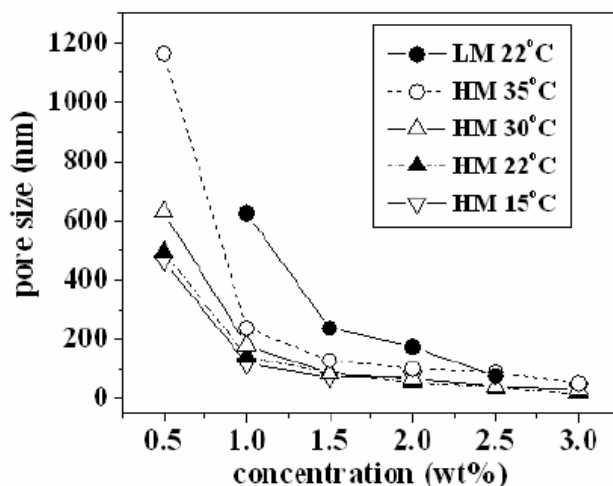


Obr. 11: FTIR spektra pro agarózu (a), kompozity agarózy a HA (b,c,d) a HA (e) [34]

Obr. 11 znázorňuje FTIR spektra pro jednotlivé hydrogely. Kompozitní gely agarózy a HA byly připraveny v poměrech 10:1, 8:3 a 5:5. Můžeme pozorovat, že píky pro kompozity agarózy a HA jsou intenzivnější než pro samotnou agarózu, což je způsobeno vyšším množstvím OH skupiny kyseliny hyaluronové. Bylo zjištěno, že přídatek HA zvyšuje velikost pórů a tepelnou stabilitu gelu. Kompozity s vyšším podílem HA vykazovaly vyšší

rychlost degradace. Těchto poznatků bylo využito při hodnocení využití těchto kompozitních hydrogelů v biomedicinském inženýrství, například při transportu léčiv nebo hojení ran.

V článku [35] je popisována metoda stanovení velikosti pórů agarózového hydrogelu za pomoci UV-VIS spektroskopie. Velikost pórů ovlivňuje mechanické vlastnosti gelů. Závisí například na typu a koncentraci agarózy. Pomocí měření absorpce a turbidity byly stanoveny tři oblasti gelace agarózy. První oblast odpovídá stavu solu, kdy je absorpce nejnižší a s postupným snižováním teploty a vzniku gelu absorpce roste díky tvorbě nukleí, která rostou a formují polymerní síť.



Obr. 12: Závislost velikosti pórů na koncentraci [35]

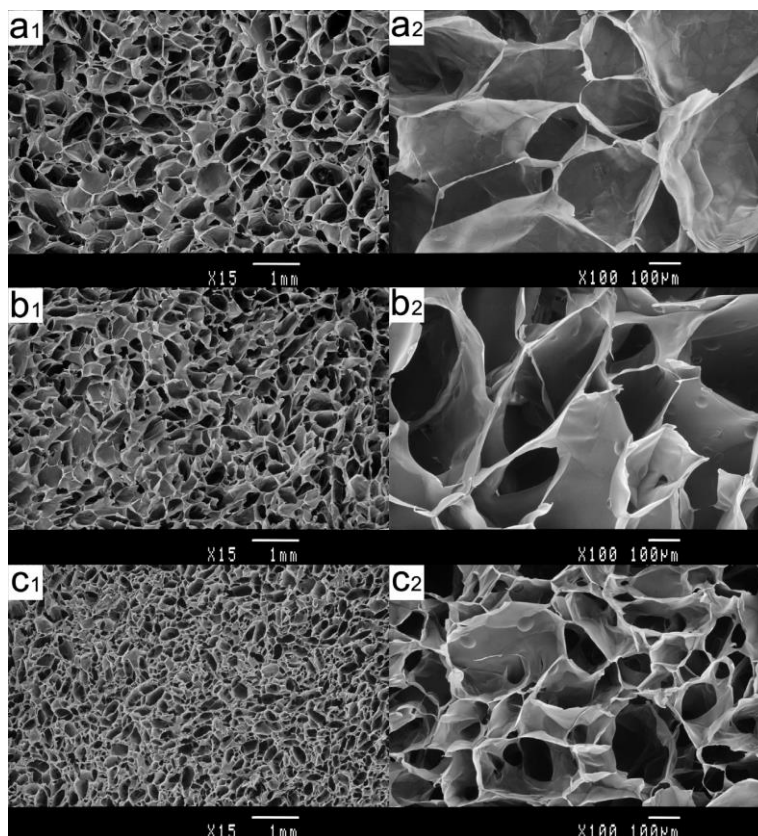
Obr. 12 ukazuje závislost velikosti pórů na koncentraci gelů. Lze pozorovat, že velikost pórů klesá s narůstající koncentrací agarózy. Největší výhodou této metody je její rychlost a neinvazivnost.

Autoři článku [36] studovali chitosanové hydrogely obsahující inkorporované polymerní nanokapsule v různých koncentracích. Zjistili, že díky regulaci množství nanokapsulí lze získat různé struktury gelu. Cílem této práce bylo zkoumat tyto struktury a vliv nanokapsulí na vlastnosti hydrogelu. K charakterizaci hydrogelů byly mimo jiné použity metody FTIR spektroskopie, oscilační reologie a SEM mikroskopie. Bylo zjištěno, že vyšší koncentrace nanočástic vedla k částečnému narušení vzniku polymerní sítě, při nejvyšších koncentracích pak docházelo ke vzniku aglomerátů nanočástic. Chitosan je biopolymer, který nachází uplatnění ve farmacii díky jeho biodegradabilitě, bioadhezi a bakteriostatickému efektu. Díky inkorporaci nanokapsulí lze lépe kontrolovat uvolňování léčiv.

V práci [37] se autoři zabývali stanovením distribuce velikosti pórů porézních polymerních mikrosfér s agarózovou strukturou pomocí nízkopólové nukleární magnetické rezonance (LF NMR). Velkou výhodou této metody je fakt, že je neinvazivní a rychlá oproti jiným metodám (například rtuťové porosimetrii nebo mikroskopii atomárních sil). Ve srovnání s hydrogely mají polymerní mikrosféry složitější strukturu, což činí jejich charakterizaci obtížnější. Metoda je založena na LF NMR měření relaxační doby molekul vody T_2 . Realizovatelnost této metody byla potvrzena vztahem mezi T_2 a střední velikostí pórů polymerní sítě agarózového hydrogelu. Charakterizace byla prováděna bez a s přidavkem hovězího

albuminu. Autoři prokázali účinnost této metody porovnáním výsledků s daty získanými pomocí inverzní vylučovací chromatografie (ISEC).

Cílem práce autorů z Univerzity v Qingdau [38] byla analýza struktury a vlastností agarových acetátů o různém stupni substituce (DS) v porovnání se samotným agarem. Gely byly zkoumány pomocí FTIR spektroskopie, termogravimetrické analýzy, kryo-SEM mikroskopie a reologických měření. Za použití těchto metod zde byla stanovována pevnost a tvrdost gelů, viskozita, velikost pórů a tepelná stabilita.

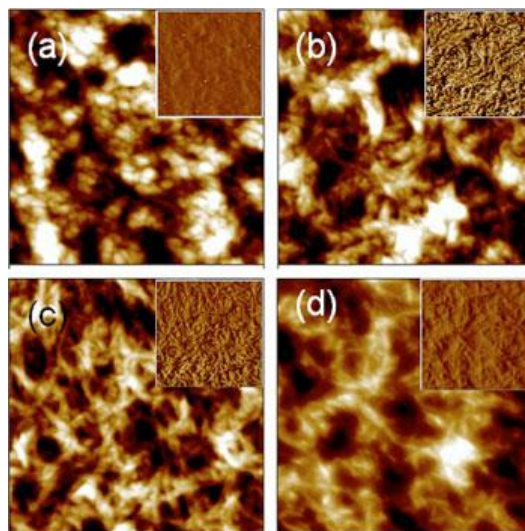


Obr. 13: Struktury gelu pozorované pomocí kryo-SEM mikroskopie [38]

Obr. 13 zachycuje struktury agaru (a₁, a₂) a agarových acetátů s různým stupněm substituce (b₁, b₂, c₁, c₂). Můžeme pozorovat, že velikost pórů acetátů agaru byla menší, než u agarového gelu. Se zvyšujícím se stupněm substituce došlo ke zmenšení velikosti pórů a zhuštění gelové struktury. Dále bylo dokázáno, že s nárůstem DS došlo ke snížení teploty gelace, síly a zdánlivé viskozity agar-acetátů.

Článek [39] se zabývá přípravou a charakterizací kompozitů agarózy a 3-aminopropyl-triethoxysilanu (APTS), které mohou nalézt využití jako scaffoldy pro adhezi a proliferaci lidských mezenchymálních kmenových buněk. Byly připraveny vzorky obsahující 5, 10 a 20 % APTS. Jejich povrchová struktura byla zkoumána za pomoci mikroskopie atomárních sil. Z výsledků bylo zjištěno, že přidavek APTS ovlivňuje morfologii a povrchovou strukturu gelů. Tyto gely vykazují oproti samotné agaróze vláknitou strukturu. Vláknina jsou úzká, což podle autorů zapříčiňuje nárůst hydrofobního charakteru hydrogelů. Tato skutečnost byla ověřena pomocí metody měření kontaktního úhlu vody na hydrogelovou vrstvu. Autoři došli

k závěru, že u vzorků obsahujících APTS je adheze lidských kmenových buněk nižší, naopak míra proliferace na těchto površích je vyšší.

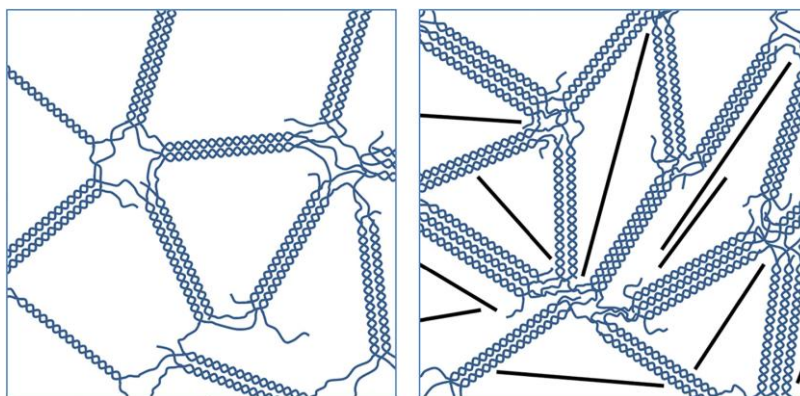


Obr. 14: Povrchová struktura agarózy a kompozitů s APTS pomocí AFM [39]

Obr. 14 znázorňuje snímky povrchové struktury samotné agarózy (a), agarózy s přídavkem APTS: 5% (b), 10 % (c) a 20 % (d).

Cílem práce [40] bylo studovat povrch a vnitřní strukturu biologicky rozložitelných hydrogelů na bázi dextranu a methakrylátu. Pro tuto analýzu byly použity metody elektronové mikroskopie SEM a rtuťové porozimetrie. Z výsledků vyplývá, že množství methakrylátu významně ovlivňuje povrch i vnitřní strukturu gelů. Hydrogely s nižším obsahem methakrylátu vykazovaly relativně otevřenou trojrozměrnou síťovou strukturu s větší velikostí pórů. Po zvýšení množství methakrylátu došlo ke zmenšení velikosti pórů a hydrogel vykazoval kompaktní a tuhou strukturu. Pomocí rtuťové porozimetrie bylo zjištěno, že se zvýšením množství methakrylátu došlo ke zmenšení plochy a průměru pórů.

V článku [41] autoři studovali vliv celulóзовých nanovláken na strukturní a reologické vlastnosti agarózových hydrogelů. Cílem bylo zaměřit se na posilující účinek těchto nanovláken a navrhnout nové materiály s lepšími mechanickými vlastnostmi. Celulóзовá nanovlákná jsou velmi důležitá a perspektivní díky jejich vlastnostem, jako jsou například biodegradabilita, obnovitelnost, vysoká pružnost a nejsou toxická [42]. Ke dvouprocentní agaróze byla přidána suspenze nanovláken o koncentracích v rozmezí 0,013 % do 0,2 %. Oscilační testy byly prováděny pomocí reometru s geometrií deska-deska. Bylo zjištěno, že přídavek celulóзовých nanovláken mají významný zesilovací efekt na strukturu gelu. Ilustrace struktur gelů s a bez celulóзовých nanovláken je znázorněna na Obr. 15.



Obr. 15: Ilustrační schéma struktury agaróзовého hydrogelu (vlevo) a struktury s přidávanými nanovláknami (vpravo) [41]

Ve studii [43] autoři zkoumali účinek přírodních polysacharidů, konkrétně xylanů z ovesné špaldy a bukového dřeva, na vlastnosti agarózových gelů. Zaměřili se zejména na reologické vlastnosti a morfologii. Byly připraveny gely o různém poměru agarózy a jednotlivých xylanů. Ty byly podrobeny reologickým experimentům. Viskozita při různých smykových rychlostech byla měřena pomocí geometrie kužel-deska, reologické chování přechodu sol-gel bylo studováno pomocí geometrie deska-deska. Z výsledků vyplývá, že inkorporace těchto polysacharidů zlepšuje některé vlastnosti gelů, například tuhost gelu a viskoelasticitu. Hydrogely s nejvyššími podíly xylanů vykazovaly vyšší schopnost zadržovat vodu. Výsledky tohoto experimentu mohou být důležité při přípravě nových potravinových produktů, nebo mohou sloužit jako kompozitní matrice pro dodávání bioaktivních látek.

V práci [44] je zkoumán časový vývoj viskoelastického chování hydrogelů na bázi dextrinu modifikovaných 2-hydroxyethyl methakrylátem (HEMA). Byly sledovány strukturní změny, ke kterým dochází během degradace. Reologické měření bylo provedeno pomocí geometrie deska-deska. Byly provedeny dvě sady experimentů. Tzv. stress sweep experimenty byly provedeny pro stanovení lineární viskoelastické oblasti a optimalizaci napětí, které bylo použito pro oscilační testy. Bylo potvrzeno, že v případě modifikace dextrinu postranními skupinami HEMA je fyzikální strukturace méně. Lze tedy konstatovat, že tato metoda může být účinným způsobem kontroly kinetiky rozkladu dextrinu tak, aby odpovídal účelu kontrolovaného dodávání bioaktivních látek.

Autoři práce [45] zkoumali strukturní vlastnosti dextran-akrylátových hydrogelů, které byly připraveny chemoenzymaticky. Porézní struktura a povrchová i vnitřní morfologie byly sledovány pomocí rtuťové porozimetrie, adsorpce dusíku a skenovací elektronové mikroskopie v závislosti na stupni substituce a počátečního obsahu vody při přípravě gelu. Výsledky těchto metod byly porovnány s výsledky získanými teorií Flory-Rehner, což je metoda používaná k odhadu velikosti pórů. Bylo zjištěno, že výsledky tří výše zmíněných metod a metody Flory-Rehner se značně lišily, pro objasnění tohoto jevu byly použity reologické testy. Výsledky této práce ukazují, že je možné kontrolovat průměrnou velikost pórů těchto gelů změnou stupně substituce. Toto zjištění má význam pro konečné uplatnění těchto gelů jako systémů s řízeným uvolňováním nebo jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství.

V článku [46] autoři popisují novou metodu magnetické rotační spektroskopie s použitím magnetických nanotyčinek k vyhodnocování reologických vlastností kapalin. Tato metoda může být použita pro *in situ* nebo *in vivo* reologické měření biologických tekutin a polymerních systémů, kdy viskozita s časem exponenciálně roste. Metoda byla ověřována pomocí časové závislosti reologie mikrokapek hydrogelu na bázi polyhydroxyethylmethakrylátu. Autoři se domnívají, že tato technika významně přispěje k analýze tekutin uvnitř živých buněk a mikroorganismů.

Polyakrylamidové gely jsou jedny z nejslibnějších materiálů pro biomedicínské aplikace (řízený transport léků, scaffoldů pro tkáňové inženýrství, senzory). Nevýhodou je jejich nedostatečná pevnost omezující jejich využití. Cílem studie [47] bylo připravit zesíťované gely pomocí mikrosfér na bázi polyakrylamidu s vysokou mechanickou pevností. Velikost částic a morfologie byly zjišťovány pomocí metody dynamického rozptylu světla, skenovací elektronové mikroskopie a turbidimetrie. Poté byly pomocí reologie měřeny mechanické vlastnosti. Připravené hydrogely mají vysokou mechanickou pevnost a rychlou odezvu na teplotu. Bylo prokázáno, že tyto gely mohou být stlačeny téměř na 99 %, aniž by se rozlomily a po odstranění napětí se zcela zotavily do svého původního tvaru.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Agaróza, Sigma aldrich
- Deionizovaná voda

4.2 Použité přístroje

- ARG2 Rheometer TA Instruments
- Ultrazvuková lázeň UCC 1 Ultrasonic Compaq Cleaner Powersonic
- Analytické váhy

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Agarózové hydrogely

Byly připraveny gely o koncentracích agarózy 0,5; 1; 2 a 4 hm. %. Potřebné množství agarózy bylo odváženo na analytických vahách a smícháno s 15 ml deionizované vody. Tento roztok byl na vařiči zahříván na 80°C za stálého míchání. Zahřívání probíhalo do té doby, dokud nedošlo k rozpuštění veškeré agarózy, což bylo signalizováno vyčeřením roztoku. Poté byl roztok umístěn do ultrazvukové lázně vyhřáté na teplotu 80°C. Takto připravený roztok byl uchováván v uzavřené nádobě nad hladinou vody (pro zachování 100% relativní vlhkosti okolní atmosféry) při pokojové teplotě. Gel byl přelitý vrstvou deionizované vody, aby se zabránilo vysychání.

Všechny gely byly připravovány 24 hodin před daným měřením a po celou dobu byly ponechány v nádobě při pokojové teplotě.

4.4 Reologické testy

Měření viskoelastických oscilačních testů probíhalo na přístroji ARG2 Rheometer TA Instruments. Byla použita geometrie typu deska-deska se senzorem o průměru 40 mm (40 mm steel plate). Jednotlivé vzorky gelů byly nadávkovány na stacionární desku reometru a poté stlačeny na požadovanou tloušťku 1000 μm . Všechna měření byla prováděna při teplotě 25°C.

Nejprve byly provedeny amplitudové testy (tzv. *strain-sweep*), v rozsahu deformace 0,01-1000 % při konstantní frekvenci oscilace 1 Hz. Poté byl tentýž vzorek podroben tzv. *time-sweep* testu po dobu 60 minut za použití vybraných hodnot deformace, charakteristických pro dané oblasti viskoelasticity a konstantní frekvenci 1 Hz. *Time-sweep* testy byly provedeny s další sadou vzorků, avšak bez předchozího namáhání za použití stejných hodnot deformace.



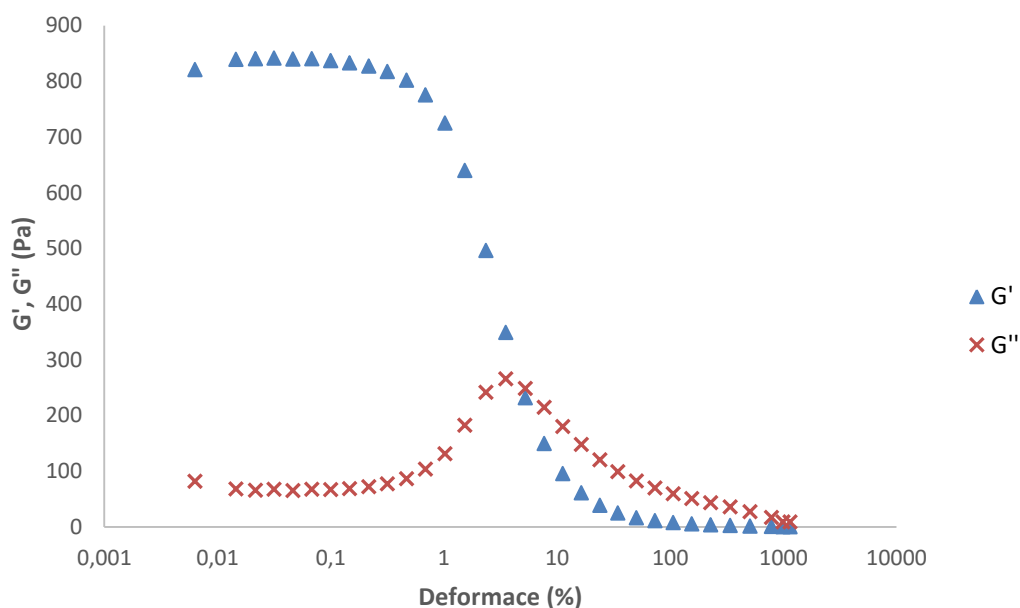
Obr. 16: ARG2 rheometer TA instruments

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

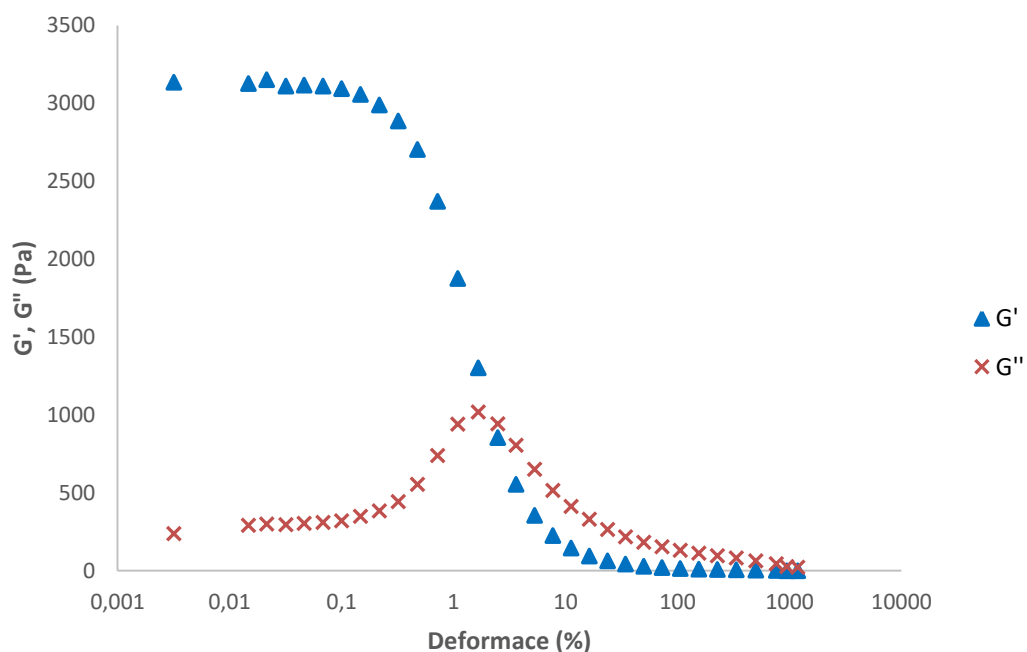
5.1 Strain-sweep a time-sweep

5.1.1 Strain-sweep

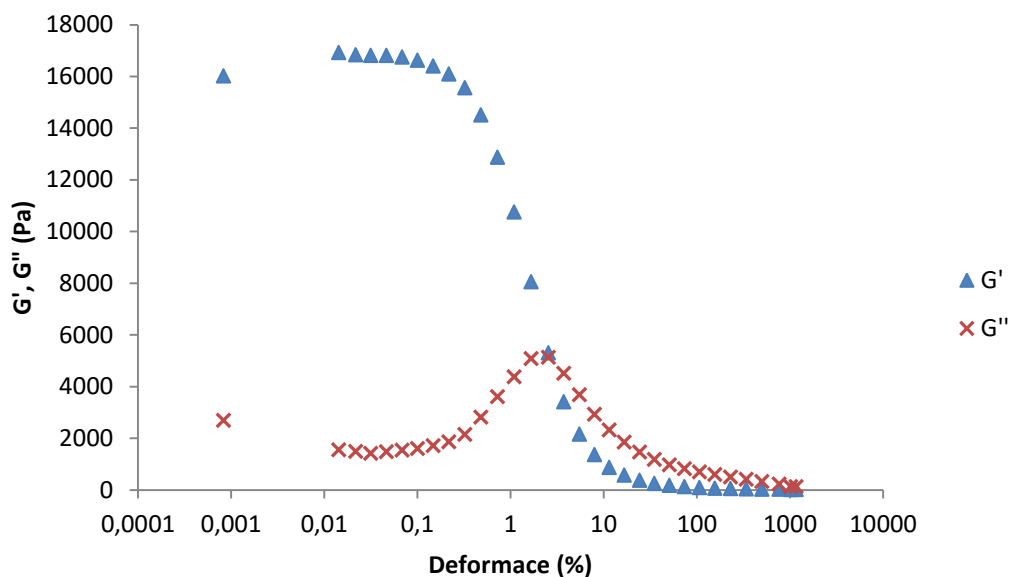
Jak je již popsáno výše, nejprve byly jednotlivé vzorky podrobeny *strain-sweep* testům, což je závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace při konstantní hodnotě frekvence. Pomocí této metody byla zjištěna lineární viskoelastická oblast (LVO), což je oblast nízkých deformací, ve které jsou viskoelastické moduly s měnící se amplitudou deformace konstantní.



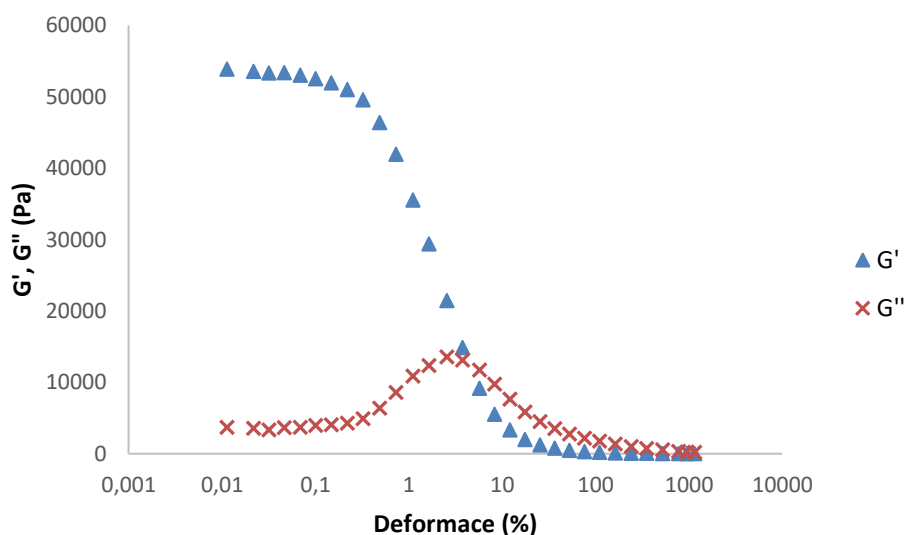
Obr. 17: Graf závislosti viskoelastických modulů na deformaci pro 0,5 hm. % agarózy



Obr. 18: Graf závislosti viskoelastických modulů na deformaci pro 1 hm. % agarózy



Obr. 19: Graf závislosti viskoelastických modulů na deformaci pro 2 hm. % agarózy



Obr. 20: Graf závislosti viskoelastických modulů na deformaci pro 4 hm. % agarózy

Pomocí těchto závislostí jsme určili, že lineární viskoelastická oblast odpovídá pro všechny koncentrace agarózy oblasti amplitud deformace maximálně cca 0,3 %. Tato hodnota deformace byla použita pro měření *time-sweep* testů (časová závislost modulů při konstantní amplitudě deformace) v lineární viskoelastické oblasti pro všechny koncentrace agarózy.

Dále byly z těchto závislostí stanoveny hodnoty deformace v oblasti tzv. *cross-over* (CO), což je bod, kde se oba moduly protínají. Tyto hodnoty byly charakteristické pro každou koncentraci agarózy. Při této hodnotě deformace byly následně pro každou testovanou koncentraci zopakovány *time-sweep* testy.

Za bodem *cross-over* byla zvolena hodnota deformace na 20 % (pro všechny testované gely odpovídá cca desetinásobku deformace v bodě CO), tato hodnota byla použita pro všechny

koncentrace agarózy. Následně byly opět sledovány časové závislosti modulů *time-sweep* testem. Přehled hodnot použitých deformací uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Přehled použitých hodnot deformace pro time sweep v lineární viskoelastické oblasti, v bodě cross-over a za bodem cross-over.

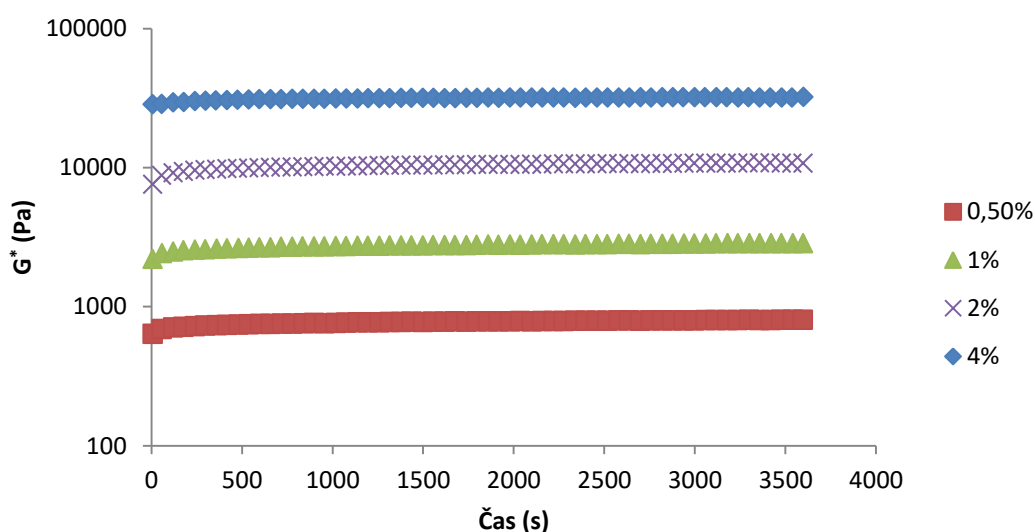
Koncentrace agarózy (hm %)	Deformace (%)		
	LVO	CO	Za CO
0,5	0,3	3,5375	20
1	0,3	1,6708	20
2	0,3	2,5511	20
4	0,3	2,5501	20

5.1.2 Lineární viskoelastická oblast (LVO)

V lineární viskoelastické oblasti byly *time-sweepy* měřeny pro deformaci 0,3 %. Z hodnot G' a G'' naměřených pomocí *strain-sweepu* byly spočteny hodnoty velikosti komplexního modulu G^* pomocí vztahu:

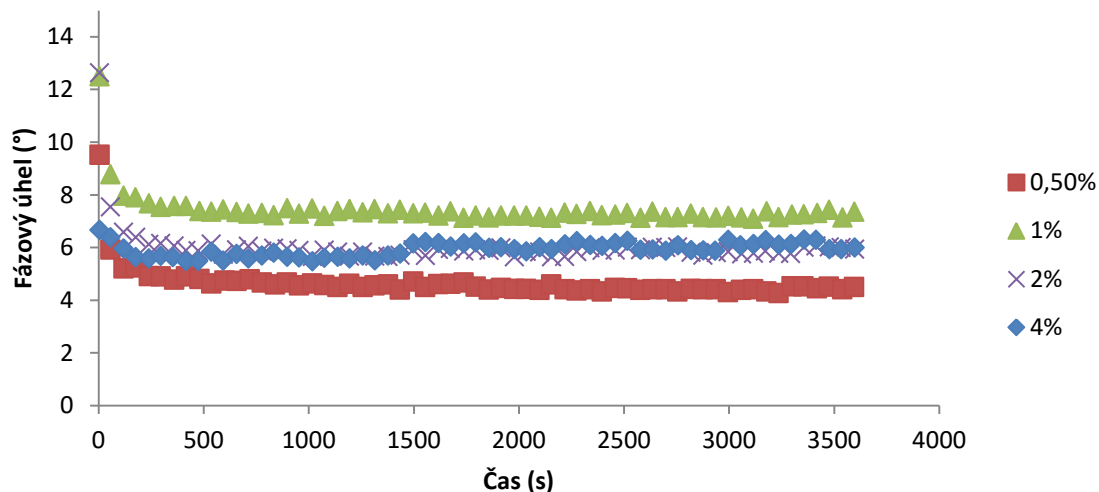
$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (8)$$

Komplexní modul udává celkovou tuhost gelu. Obr. 21 znázorňuje závislost tohoto modulu na čase. Můžeme vidět, že ve viskoelastické oblasti komplexní modul s časem mírně roste. Lze tedy předpokládat, že při aplikaci deformace 0,3 % dochází k roztažení polymerní sítě gelu, dojde k zániku nekovalentních interakcí, ty se při tak nízké deformaci přetvoří a vznikají nové vazby a tím roste tuhost gelu. Dochází k relaxaci fyzikální sítě tvořící základ vnitřní struktury gelu.



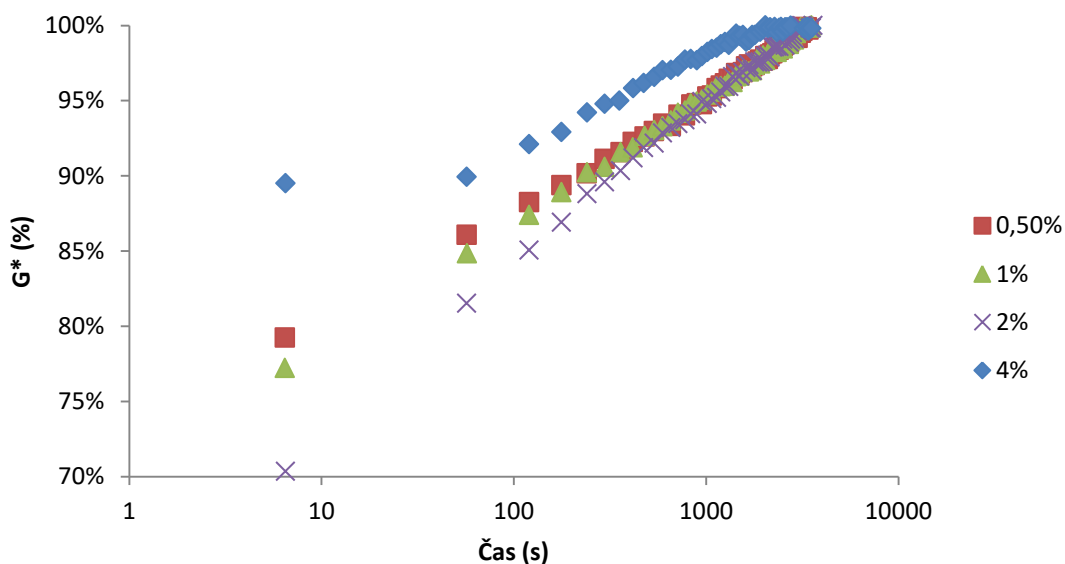
Obr. 21: Graf závislosti komplexního modulu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v LVO

Obr. 22 znázorňuje závislost fázového úhlu na čase. V průběhu času dochází k poklesu hodnot fázového úhlu, čím nižší je jeho hodnota, tím je materiál elastičtější, z čehož lze usoudit, že dochází k obnovení polymerního řetězce a tím k opětovnému zvýšení rigidity struktury.



Obr. 22: Graf závislosti fázového úhlu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v LVO

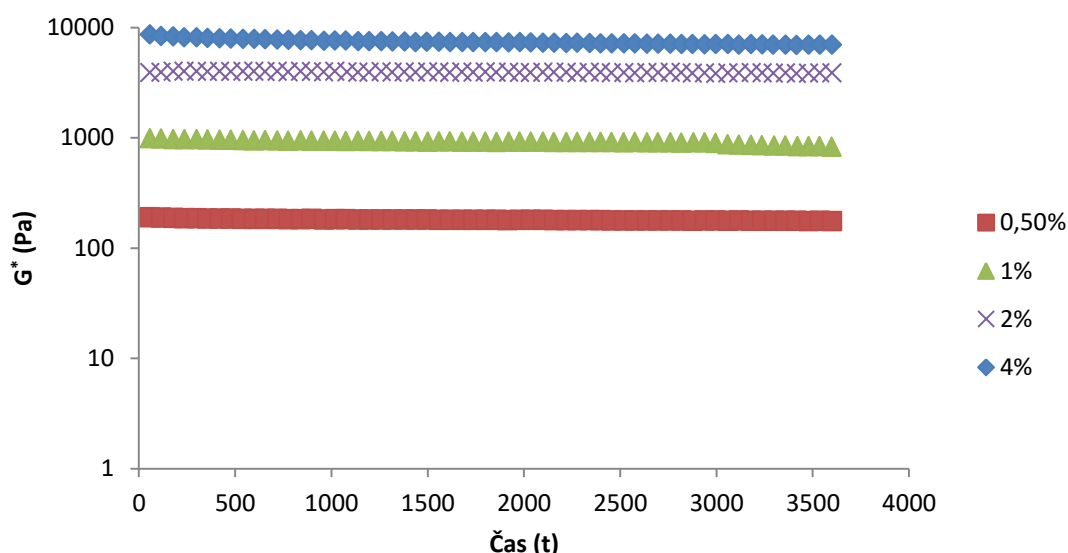
Na Obr. 23 můžeme pozorovat závislost relativní hodnoty komplexního modulu, vyjádřené jako poměr dané hodnoty a hodnoty komplexního modulu ve finálním čase měření. Tato závislost je prakticky lineární. Relativní hodnoty jsou vyneseny pro porovnání jednotlivých gelů, které se v absolutní hodnotě velikosti komplexního modulu řádově liší, což ztěžuje jejich grafické porovnání. Jak je patrné z grafu na Obr. 23, je tato závislost v logaritmické časové škále prakticky lineárně rostoucí.



Obr. 23: Graf logaritmické závislosti komplexního modulu v % na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v LVO

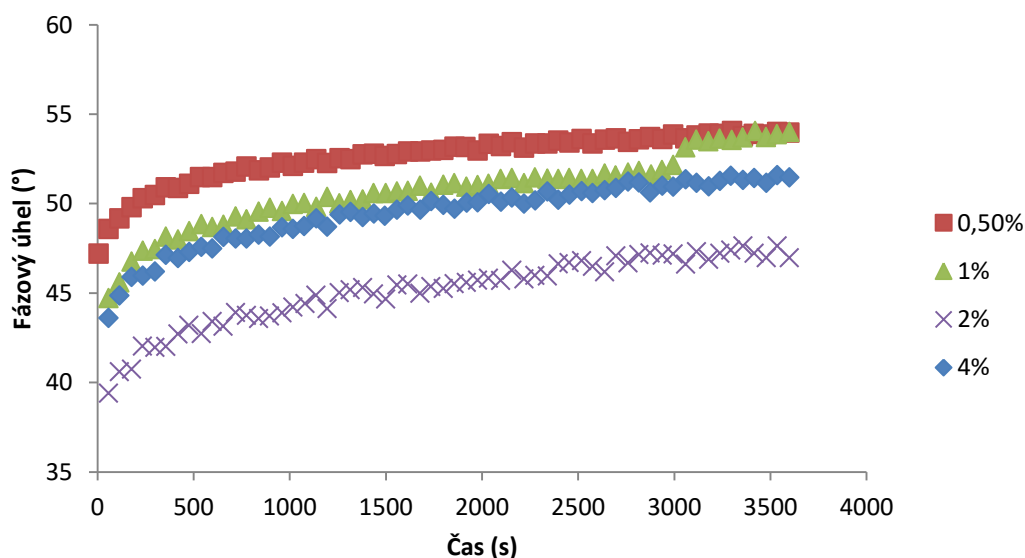
5.1.3 Oblast cross-over

Na Obr. 24 je závislost komplexního modulu na čase pro bod *cross-over*. V tomto bodě je materiál ve stavu hraničního chování mezi kapalinou a elastickou pevnou látkou. Oproti předchozímu případu dochází k poklesu komplexního modulu s časem, z čehož lze usoudit, že při aplikaci vyšší deformace je polymerní síť porušena natolik, že nedojde k relaxaci a obnovení vazeb, naopak, postupně dochází pravděpodobně k porušování vazeb s rostoucí pevností, vazby zůstávají porušené a v důsledku toho se gel chová spíš jako tekutina.



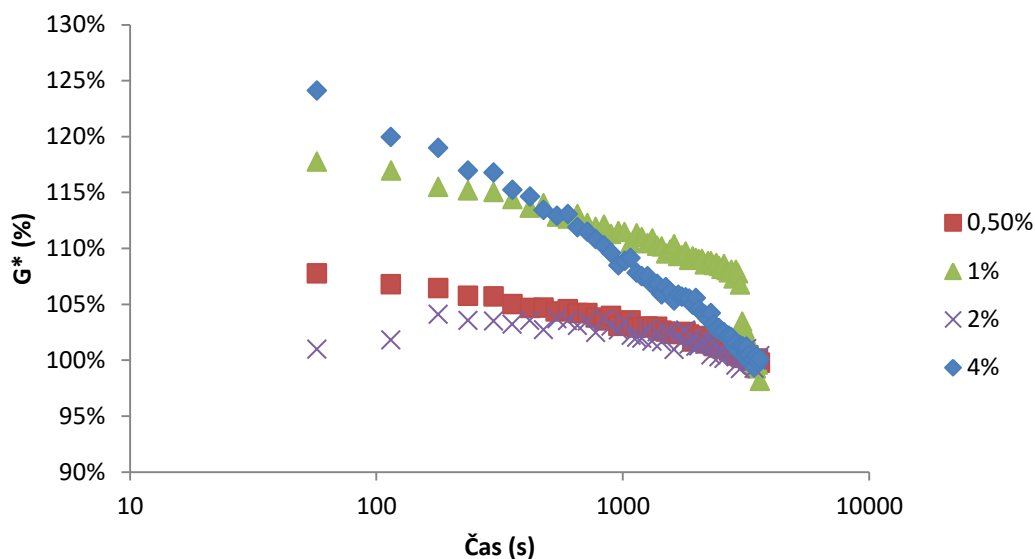
Obr. 24: Graf závislosti komplexního modulu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v CO

Totéž potvrzuje i Obr. 25, můžeme pozorovat, že fázový úhel s časem roste, což dokazuje stále viskóznější chování gelu v průběhu namáhání.



Obr. 25: Graf závislosti fázového úhlu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v CO

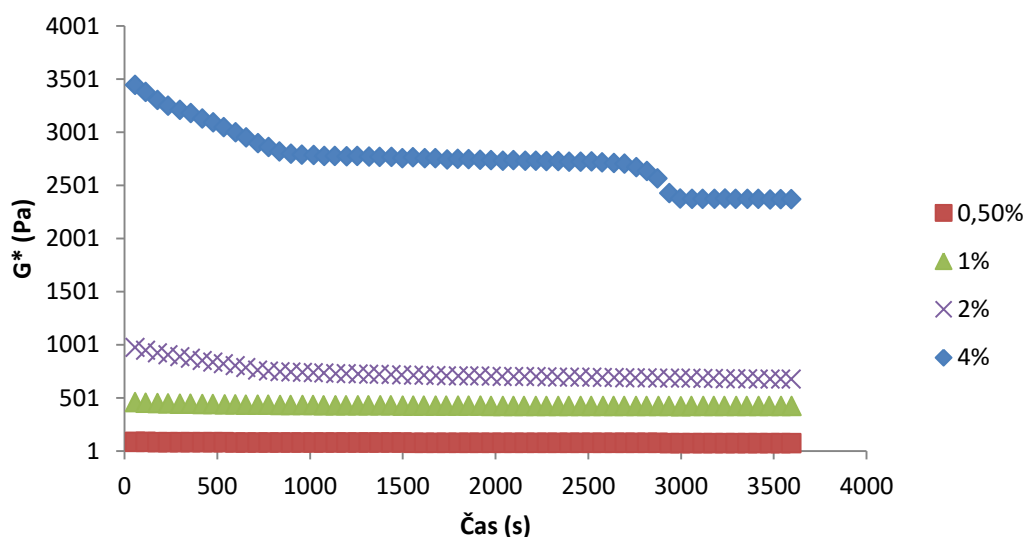
Na Obr. 26 je závislost relativního komplexního modulu (viz kap. 5.1.2) v procentech na čase v logaritmickém měřítku. Tato závislost má klesající charakter a je prakticky lineární.



Obr. 26: Graf logaritmické závislosti komplexního modulu v % na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v CO

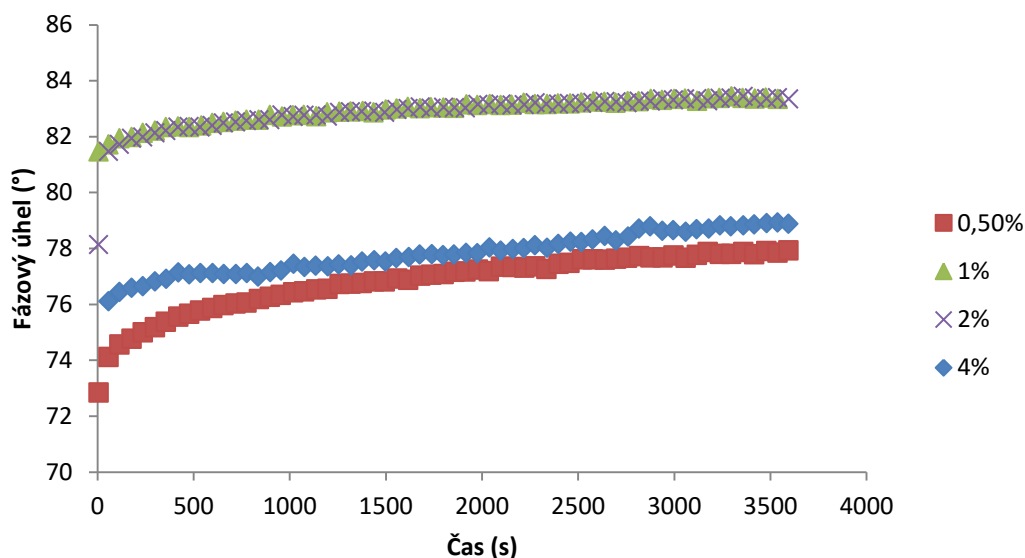
5.1.4 Oblast za cross-over

Na Obr. 27 je závislost komplexního modulu na čase pro všechny použité koncentrace agarózy za bodem *cross-over*. Charakter křivek je klesající, což znamená, že při aplikaci vysoké deformace z oblasti za *cross-over* dochází k trvalému porušení vazeb polymerní sítě gelu a stejně jako v předchozím případě gel vykazuje spíše chování tekutiny. Na křivkách pro koncentrace 2 a 4 hm. % agarózy můžeme pozorovat zlomy, které by mohly naznačovat, že při vysokých hodnotách deformace nejprve dochází k porušení nekovalentních interakcí a poté také k porušení pevnějších uzlů polymerní sítě gelu.



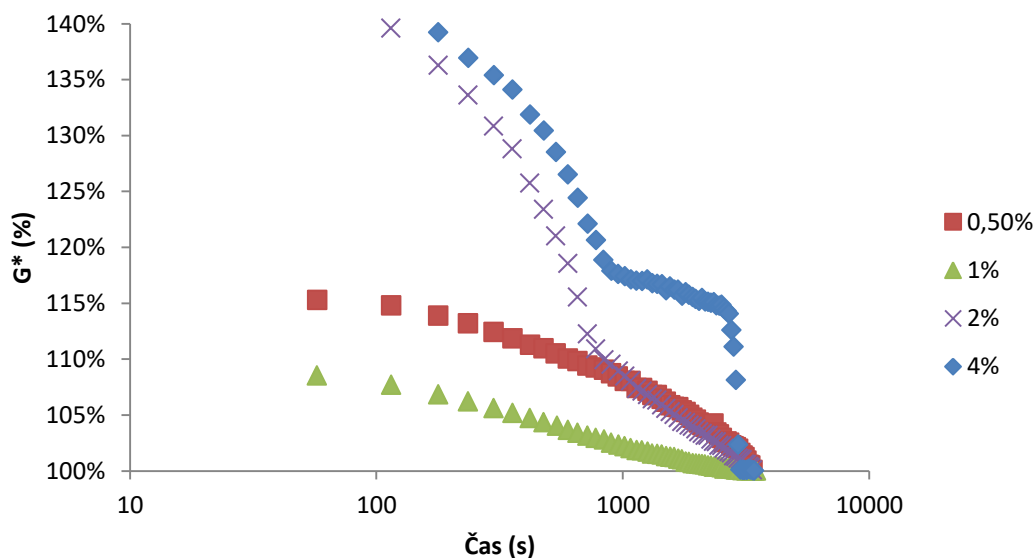
Obr. 27: Graf závislosti komplexního modulu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu za CO

Hodnoty fázového úhlu pro všechny koncentrace agarózy mají v závislosti na čase rostoucí charakter, což znamená, že nedochází k obnovení porušených vazeb a gel vykazuje viskózní chování. Tuto závislost můžeme vidět na Obr. 28.



Obr. 28: Graf závislosti fázového úhlu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu za CO

Na Obr. 29 je znázorněna závislost relativního komplexního modulu na čase v logaritmickém měřítku. Křivky pro koncentraci 2 a 4 hm. % agarózy mají schodovitý tvar, jako v případě závislosti komplexního modulu na čase.



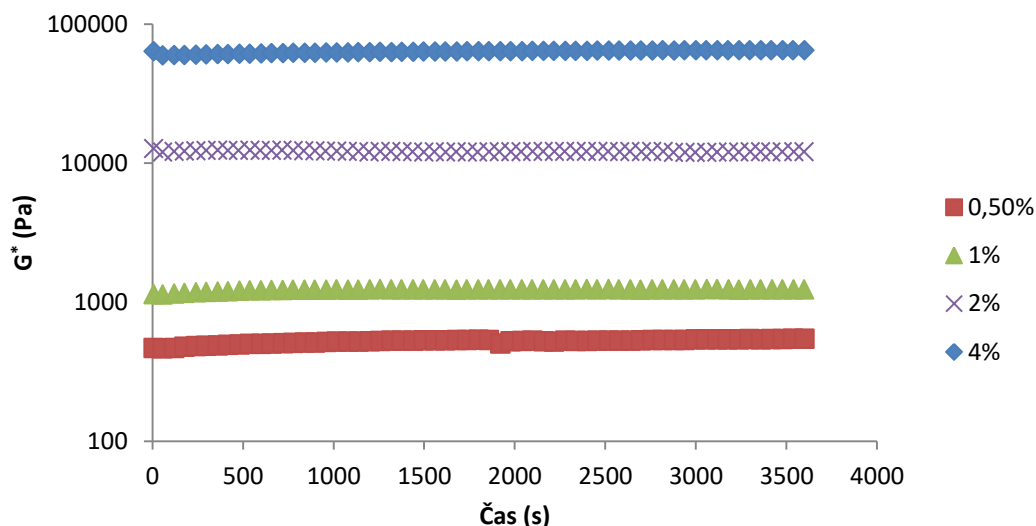
Obr. 29: Graf logaritmické závislosti komplexního modulu v % na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu za CO

5.2 Sledování relaxace bez předchozího namáhání gelů

Druhá sada vzorků byla podrobena pouze *time-sweep* testům při konstantních hodnotách deformace bez předchozích amplitudových testů. Byly použity stejné hodnoty deformace jako pro první sadu (viz Tabulka 2).

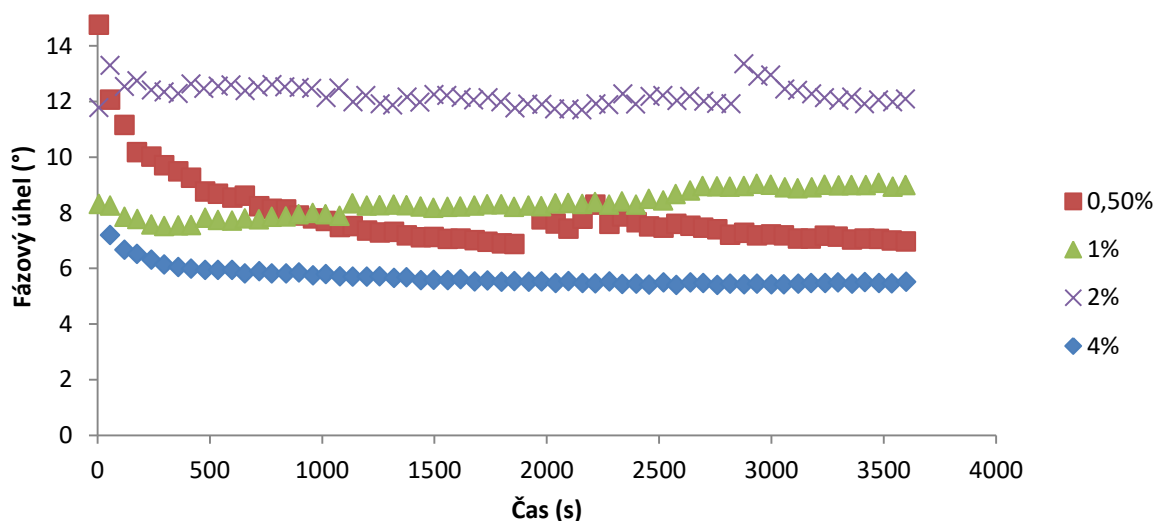
5.2.1 Lineární viskoelastická oblast (LVO)

Na Obr. 30 je znázorněna závislost komplexního modulu na čase všech koncentrací agarózy pro lineární viskoelastickou oblast. Hodnoty komplexního modulu v závislosti na čase mírně rostou, což dokazuje, že v průběhu času dochází k opětovnému vytvoření porušených vazeb a dojde k relaxaci polymerní sítě.



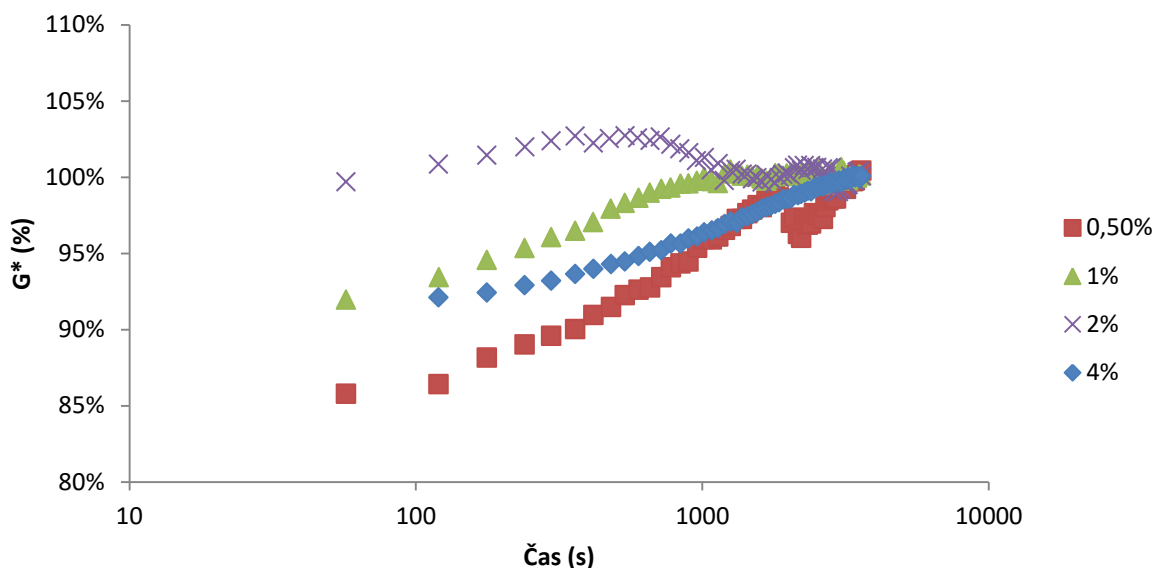
Obr. 30: Graf závislosti komplexního modulu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v LVO

Obr. 31 znázorňuje závislost fázového úhlu na čase. Tyto křivky mají pro všechny koncentrace agarózy klesající charakter. Což potvrzuje předchozí závěr, že dochází k obnovení porušených vazeb gelu a tím ke zvýšení tuhosti.



Obr. 31: Graf závislosti fázového úhlu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v LVO

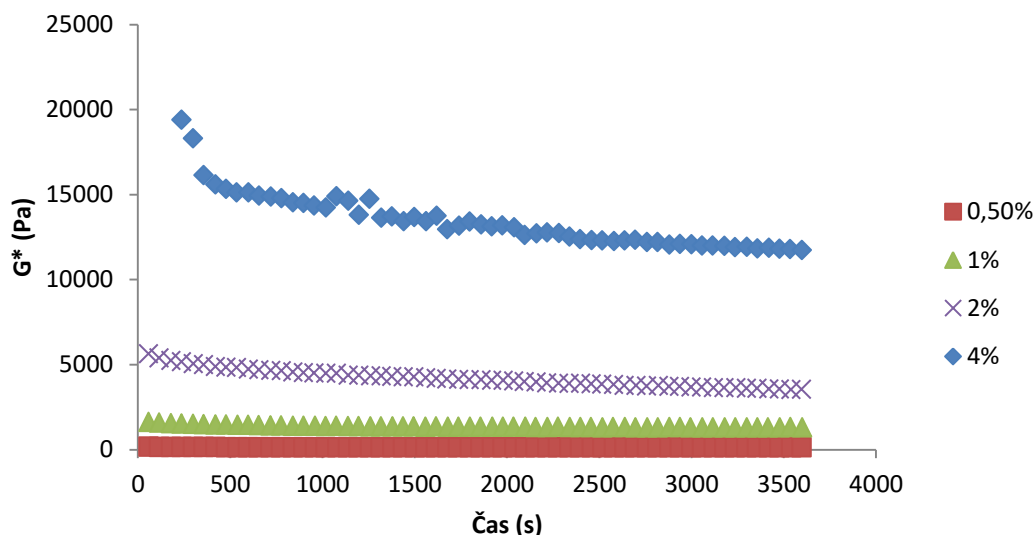
Na Obr. 32 je závislost komplexního modulu v procentech na čase v logaritmickém měřítku. Tato závislost by měla být pro lineární viskoelastickou oblast lineární, ale křivky pro koncentrace 0,5 a 2 hm. % agarózy lineárnost nevykazují, což může být způsobeno chybným měřením, bohužel z nedostatku času nebylo možné tyto experimenty zopakovat.



Obr. 32: Graf logaritmické závislosti komplexního modulu v % na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v LVO

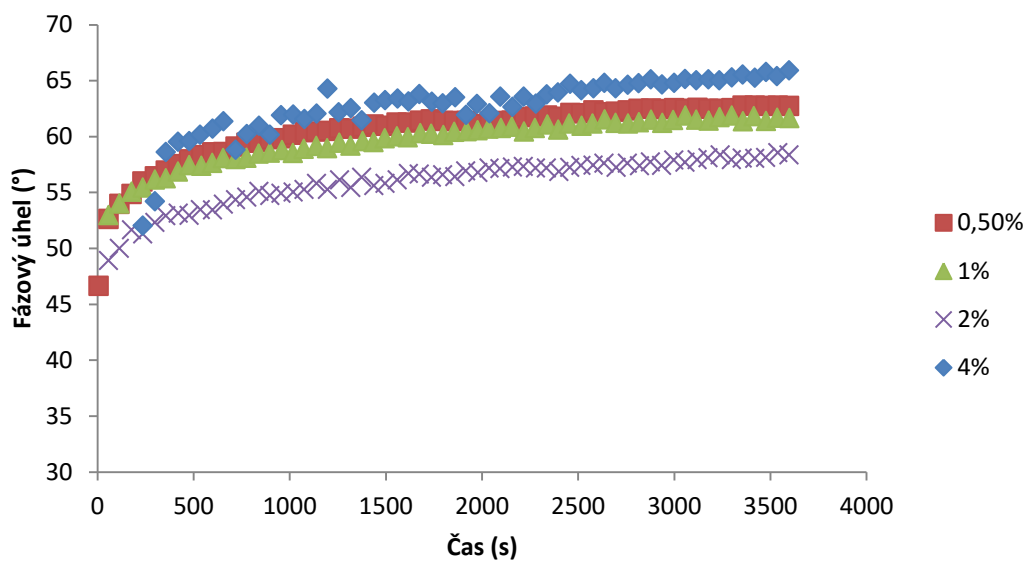
5.2.2 Oblast cross-over

Na Obr. 33 můžeme pozorovat závislost komplexního modulu na čase pro oblast *cross-over*. Komplexní modul s časem klesá výrazněji, oproti sadě vzorků, které byly podrobeny i *strain-sweep* testům. Z tohoto poklesu lze usuzovat, že došlo k poškození polymerní sítě, nedochází k relaxaci a vazby se neobnoví. V důsledku toho gel ztrácí elastické vlastnosti a vykazuje chování tekutiny.

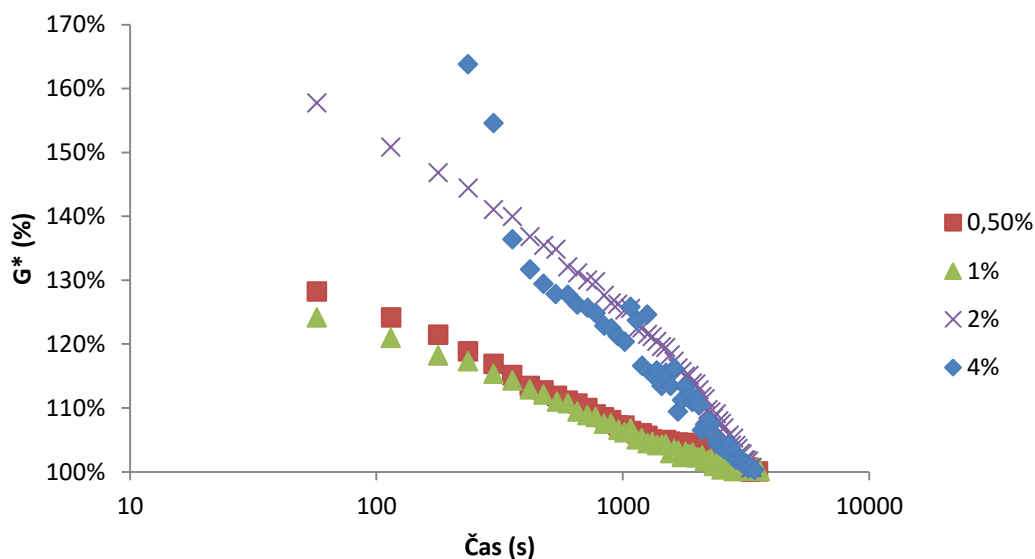


Obr. 33: Graf závislosti komplexního modulu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v CO

Závislost fázového úhlu na čase má rostoucí charakter, což dokazuje předchozí předpoklad a gel se chová v důsledku porušení polymerní sítě viskózněji. Tuto závislost můžeme vidět na Obr. 34. Na Obr. 35 je závislost relativního komplexního modulu na čase v logaritmickém měřítku. Tato závislost má klesající charakter a je prakticky lineární.



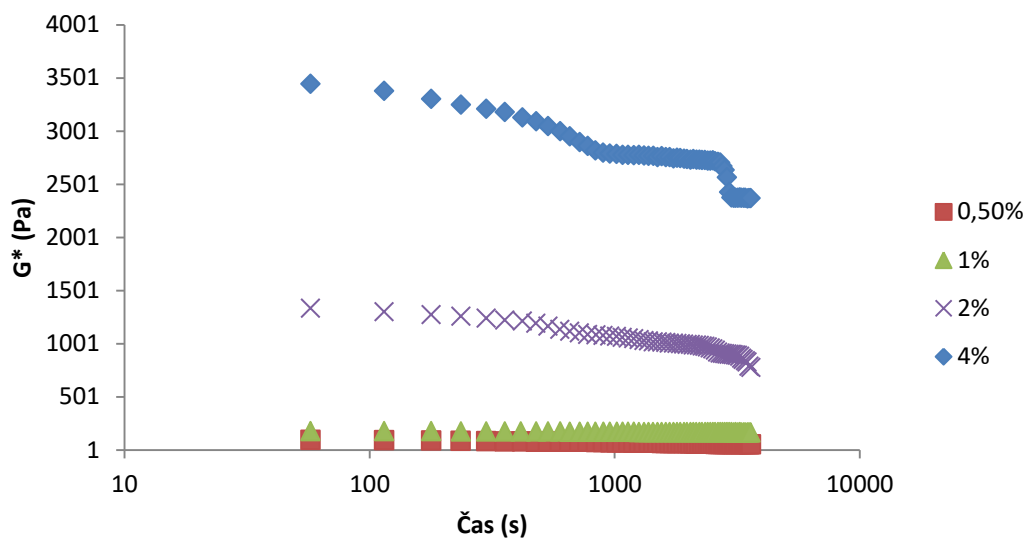
Obr. 34: Graf závislosti fázového úhlu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v CO



Obr. 35: Graf logaritmické závislosti komplexního modulu v % na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu v CO

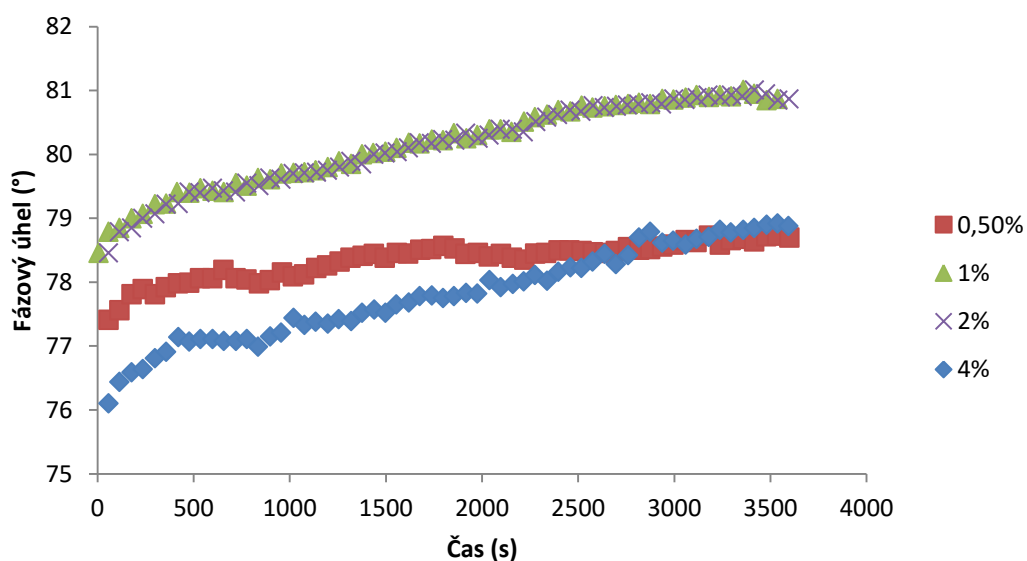
5.2.3 Oblast za cross-over

V oblasti za bodem *cross-over* dochází k poklesu komplexního modulu v čase. Lze tedy předpokládat, že při tak vysoké deformaci v gelu opět dojde k porušení polymerní sítě, vazby se neobnovují a systém vykazuje chování tekutiny. Pro 2 a 4 hm. % agarózy můžeme pozorovat zlomy, stejně jako v případě, kdy byly provedeny i *strain-sweep* testy.



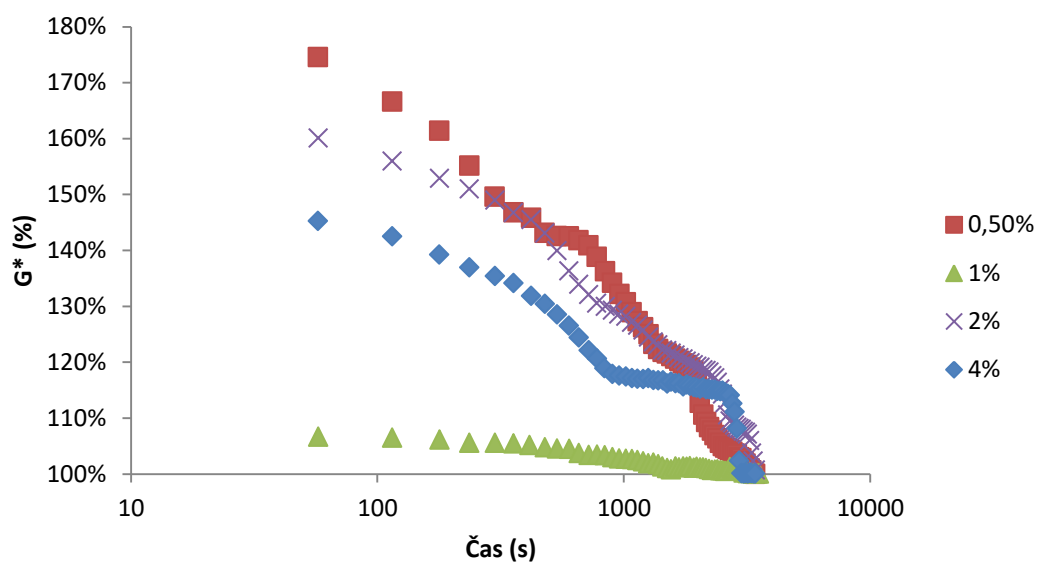
Obr. 36: Graf závislosti komplexního modulu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu za CO

Tuto hypotézu potvrzuje i závislost fázového úhlu na čase (Obr. 37). Pro všechny koncentrace je tato závislost rostoucí, tudíž lze předpokládat, že gel má viskóznější charakter a chová se tedy jako tekutina.



Obr. 37: Graf závislosti fázového úhlu na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu za CO

Na Obr. 38 je závislost komplexního modulu v procentech na čase v logaritmickeém měřítku. Na této závislosti můžeme pozorovat zlomy křivek zřetelněji.



Obr. 38: Graf logaritmické závislosti komplexního modulu v % na čase pro 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózu za CO

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést literární rešerši na zadané téma a poté otestovat vybranou techniku pro strukturní analýzu hydrogelu. Z literární rešerše vyplývá, že je možné využít velké množství instrumentálních technik pro studium struktury hydrogelu. Jako modelový systém byl zvolen agarózový hydrogel z důvodu jeho snadné přípravy a širokého rozsahu využití v různých oblastech.

Pro strukturní analýzu byla zvolena technika oscilační reologie. Struktura hydrogelu byla charakterizována pro dvě sady vzorků o stejných koncentracích. S první sadou vzorků byly provedeny *strain-sweep* testy, za kterými ihned následovaly *time-sweep*. Druhá sada byla podrobena pouze testům *time-sweep*. Byly použity vzorky o koncentracích 0,5; 1; 2 a 4 hm. % agarózy. Testy byly provedeny v lineární viskoelastické oblasti, kdy je závislost viskoelastických modulů na amplitudě použité deformace lineární, v bodě *cross-over*, kdy dojde k protnutí viskoelastických modulů a za bodem *cross-over*. Obě sady vzorků vykazovaly ve všech oblastech podobné chování, takže lze předpokládat, že předchozí deformace aplikovaná na gely prakticky nemá na jejich strukturu vliv.

Bylo zjištěno, že v oblasti lineární viskoelasticity dochází k roztažení polymerní sítě gelu. Jsou porušeny nekovalentní interakce, které zajišťují strukturu šroubovice. Při nízkých deformacích pravděpodobně dojde k přetvoření těchto interakcí a vzniku nových vazeb. Polymerní síť relaxuje a roste tuhost a elasticita gelu. V oblasti *cross-over* je aplikována vyšší amplituda deformace, a proto dochází k porušení vazeb polymerní sítě, tyto vazby ale zůstávají porušeny a v průběhu času nedochází k jejich opětovnému zformování. Chování systému je na rozhraní gelu a tekutiny. Za oblastí *cross-over* aplikujeme téměř desetinásobnou hodnotu deformace než v předchozím případě. To způsobí porušení nekovalentních interakcí a pravděpodobně dochází i k porušování silnějších vazeb polymerní sítě. Tyto vazby nejsou obnoveny, takže gel vykazuje chování kapaliny a stává se viskóznějším. V závislosti komplexního modulu na čase můžeme pozorovat zlomy, které jsou pravděpodobně způsobeny zánikem silnějších vazeb.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3
- [2] POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [3] Vydavatelství VŠCHT [online]. [cit. 2016-12-07]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/disperzni_system.html
- [4] AHMED, Enas M., 2015. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 6(2), 105-121. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [5] NOVÁK, Josef, 2008. Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [6] Hydrogel [online], 2018. Praha [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: <http://hydrogel.cz/>
- [7] Hydrogely s vysokým obsahem vody, In: Léčba rány [online]. [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: <https://www.lecbarany.cz/o-lecbe-ran/kryci-materialy/hydrogely>
- [8] MEENA, Ramavatar, A.K. SIDDHANTA, Kamalesh PRASAD, et al., 2007. Preparation, characterization and benchmarking of agarose from Gracilaria dura of Indian waters. *Carbohydrate Polymers*. 69(1), 179-188. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.09.020. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861706004681>
- [9] Agarose. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2016-12-05]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/agarose12345901236611?lang=en&ion=CZ>
- [10] CHEN, Chao, Xiunan LI, Dawei ZHAO, Yaqiong LI, Hong SHI, Guanghui MA a Zhiguo SU, 2017. Precise control of agarose media pore structure by regulating cooling rate. *Journal of Separation Science*. 40(22), 4467-4474. DOI: 10.1002/jssc.201700546. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201700546>
- [11] NORDQVIST, David a Thomas A. VILGIS, Rheological Study of the Gelation Process of Agarose-Based Solutions. DOI: 10.1007/s11483-011-9225-0. ISBN 10.1007/s11483-011-9225-0. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11483-011-9225-0>
- [12] RENN, Donald W., 1984. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *American chemical society*. 23(1), 17-21. DOI: 10.1021/i300013a004. ISSN 0196-4321. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i300013a004>
- [13] VARDAR, E., Michel VERT, Jean COUDANE, V. HASIRCI a N. HASIRCI, 2012. Porous Agarose-Based Semi-IPN Hydrogels: Characterization and Cell Affinity Studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. ahead-of-print(ahead-of-print), 1-14. DOI: 10.1163/156856211X614770. ISSN 0920-5063. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com//doi/abs/10.1163/156856211X614770>

- [14] Elektronová mikroskopie, In: Jointlab.upol.cz [online]. Olomouc: Společná laboratoř optiky [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: http://jointlab.upol.cz/~soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html
- [15] Biologie a genetika pro bakaláře, 2014. VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie [online]. [cit. 2018-04-14]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-nebunecne_formy_zivota&lang=cz
- [16] ROMAN, Kubínek, Šafářová KLÁRA a Vůjtek MILAN, 2011. Elektronová mikroskopie. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2739-3.
- [17] KUBÍNEK, Roman, Milan VŮJTEK a Renata HOLUBOVÁ, Mikroskopie atomárních sil. Olomouc: Katedra experimentální fyziky přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.
- [18] CHATTERJEE, Snehajyoti, Shrikanth S. GADAD a Tapas K. KUNDU, 2010. Atomic force microscopy. Resonance. 15(7), 622-642. DOI: 10.1007/s12045-010-0047-z. ISSN 0971-8044. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12045-010-0047-z>
- [19] KŘÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK, 2014. Základy analytické chemie. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí. ISBN 978-80-7414-804-0.
- [20] BARTŮŠEK, Milan a Jiří PAZOUREK, 1997. Základy metod analytické chemie pro bakalářské studijní programy. 1. Brno: Masarykova univerzita.
- [21] Spektrofotometrie, 2017. Wikiskripta [online]. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_\(2._LF_UK\)](https://www.wikiskripta.eu/w/Spektrofotometrie_(2._LF_UK))
- [22] ŠTERN, Petr, 2006. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. Klinická biochemie a metabolismus. 14(3), 146-151
- [23] Anwendungsbeispiel 1 NMR-Spektroskopie, 2018. In: University of Freiburg [online]. Freiburg: University of Freiburg [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: https://portal.uni-freiburg.de/magres/anwendungen/anwendung_nmr1.html
- [24] Basics of NMR [online], 1997. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>
- [25] KLÍČ, Alois, Miroslava DUBCOVÁ a Karel VOLKA, 1999. Fourierova transformace: s příklady z infračervené spektroskopie. Vyd. 2. přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 80-708-0345-2.
- [26] Infračervená spektroskopie a její techniky [online], [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>
- [27] JALVANDI, Javid, 2016. Novel chemical and physical approaches for sustainable drug release from biodegradable electrospun nanofibres. Australia. Dizertační práce. RMIT university.
- [28] SCHNEIDER, Petr, 2007. Textura porézních látek. 1. Praha: Ústav chemických procesů.
- [29] Rtut'ová porozimetrie [online], Praha: Ústav anorganické technologie VŠCHT [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0ah>

[UKEwjoyLLUxr_aAhUQmbQKHZVuAQ4QFgg0MAI&url=https%3A%2F%2Fvsch.t.cz%2Fkat%2Fdownload%2Ftab_porozimetrie.pdf&usg=AOvVaw0SGKnizl5Eh2nci8w7D7Zj](http://www.ukewjoyLLUxr_aAhUQmbQKHZVuAQ4QFgg0MAI&url=https%3A%2F%2Fvsch.t.cz%2Fkat%2Fdownload%2Ftab_porozimetrie.pdf&usg=AOvVaw0SGKnizl5Eh2nci8w7D7Zj)

- [30] WILLENBACHER, Norbert a Kristina GEORGIEVA, 2013. Rheology of Disperse Systems. *Product Design and Engineering*. Weinheim, Germany, 2013-08-09, 7-49. DOI: 10.1002/9783527654741.ch1. ISBN 9783527654741. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527654741.ch1>
- [31] AYMARD, Pierre, David R. MARTIN, Kevin PLUCKNETT, Tim J. FOSTER, Allan H. CLARK a Ian T. NORTON, 2001. Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels. *Biopolymers*. 2001(59), 131–144. DOI: 10.1002/1097-0282. ISSN 0006-3525.
- [32] KONDAVEETI, Stalin, Kamalesh PRASAD a A.K. SIDDHANTA, 2013. Functional modification of agarose: A facile synthesis of a fluorescent agarose-tryptophan based hydrogel. *Carbohydrate Polymers*. 97(1), 165-171. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.04.034. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713003871>
- [33] ARDA, Ertan, Selim KARA, Ömer Bahadır MERGEN a Önder PEKCAN, 2015. A comparison of fluorescence and UV–visible spectrometry techniques for thermal phase transitions of agarose gels. *Polymer Bulletin*. 72(2), 157-175. DOI: 10.1007/s00289-014-1265-4. ISSN 0170-0839. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00289-014-1265-4>
- [34] ZHANG, Ling-Min, Chao-Xi WU, Jian-Yan HUANG, Xiao-Hui PENG, Peng CHEN a Shun-Qing TANG, 2012. Synthesis and characterization of a degradable composite agarose/HA hydrogel. *Carbohydrate Polymers*. 88(4), 1445-1452. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.02.050. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712001774>
- [35] NARAYANAN, Jaaky, Jun-Ying XIONG a Xiang-Yang LIU, 2006. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics: Conference Series*. 28, 83-86. DOI: 10.1088/1742-6596/28/1/017. ISSN 1742-6588. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1742-6596/28/i=1/a=017?key=crossref.e43ad292c5e6d3b06e4be889d01ddc90>
- [36] CONTRI, Renata V., Rosane M.D. SOARES, Adriana R. POHLMANN a Silvia S. GUTERRES, 2014. Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*. 42, 234-242. DOI: 10.1016/j.msec.2014.05.001. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114002616>
- [37] LI, Xiunan, Yaqiong LI, Chao CHEN, et al., 2015. Pore size analysis from low field NMR spin–spin relaxation measurements of porous microspheres. *Journal of Porous Materials*. 22(1), 11-20. DOI: 10.1007/s10934-014-9864-x. ISSN 1380-2224. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10934-014-9864-x>
- [38] XIA, Kai, Xin LIU, Jingkun ZHAO a Xiaodong ZHANG, 2014. The physicochemical property characterization of agar acetate. *Carbohydrate Polymers*.

- 110, 32-37. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.03.036. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714002689>
- [39] SÁNCHEZ-VAQUERO, V., C. SATRIANO, N. TEJERA-SÁNCHEZ, L. GONZÁLEZ MÉNDEZ, J. P. GARCÍA RUIZ a M. MANSO SILVÁNA, 2010. Characterization and cytocompatibility of hybrid aminosilane-agarose hydrogel scaffolds. *Biointerphases*. 5(2), 23-29. DOI: 10.1116/1.3388182. ISSN 1934-8630. Dostupné také z: <http://avs.scitation.org/doi/10.1116/1.3388182>
- [40] Pore structure analysis of swollen dextran-methacrylate hydrogels by SEM and mercury intrusion porosimetry, 2000. *Journal of Biomedical Materials Research*. 53(3), 258–266. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(2000)53. ISSN 0021-9304.
- [41] LE GOFF, Kevin J., Cedric GAILLARD, William HELBERT, Catherine GARNIER a Thierry AUBRY, 2015. Rheological study of reinforcement of agarose hydrogels by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*. 116, 117-123. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.085. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714004421>
- [42] ARAKI, Jun, Masahisa WADA, Shigenori KUGA a Takeshi OKANO, 1998. Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 142(1), 75-82. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00404-X. ISSN 09277757. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777579800404X>
- [43] MEENA, Ramavatar, Ralph LEHNEN, Uwe SCHMITT a Bodo SAAKE, 2013. Physicochemical and rheological properties of agarose/xylans composite hydrogel materials. *Polymer Composites*. 34(6), 978-988. DOI: 10.1002/pc.22504. ISSN 02728397. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pc.22504>
- [44] CARVALHO, Joana, Susana MOREIRA, João MAIA a Francisco M. GAMA, 2009. Characterization of dextrin-based hydrogels: Rheology, biocompatibility, and degradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 9999A, NA-NA. DOI: 10.1002/jbm.a.32553. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.32553>
- [45] FERREIRA, L., M. M. FIGUEIREDO, M. H. GIL a M. A. RAMOS, 2006. Structural analysis of dextran-based hydrogels obtained chemoenzymatically. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 77B(1), 55-64. DOI: 10.1002/jbm.b.30394. ISSN 1552-4973. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.30394>
- [46] TOKAREV, Alexander, Igor LUZINOV, Jeffery R. OWENS a Konstantin G. KORNEV, 2012. Magnetic Rotational Spectroscopy with Nanorods to Probe Time-Dependent Rheology of Microdroplets. *Langmuir*. 28(26), 10064-10071. DOI: 10.1021/la3019474. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/la3019474>
- [47] LI, Pengchong, Kun XU, Ying TAN, Cuige LU, Yangling LI a Pixin WANG, 2013. A novel fabrication method of temperature-responsive poly(acrylamide) composite hydrogel with high mechanical strength. *Polymer*. 54(21), 5830-5838. DOI:

10.1016/j.polymer.2013.08.019. ISSN 00323861. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386113007891>