



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

HYDRATACE BIOPOLYMERŮ

HYDRATION OF BIOPOLYMERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ester Šméralová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1177/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Ester Šméralová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Hydratace biopolymerů

Zadání bakalářské práce:

Seznámit se s problematikou hydratace biopolymerů, literární rešerše. Zvolit vhodný způsob studia, vybrat systémy vhodné pro studium a metody analýzy. Navrhnout a realizovat vlastní experimenty, zpracovat data a vyvodit závěry ze získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Ester Šméralová
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem hydratace vybraných biopolymerů – huminových kyselin, chitosanu, kyseliny hyaluronové (nízkomolekulární a vysokomolekulární) a dextranu. K určení obsahu původní vlhkosti ve vzorcích je použita termogravimetrická analýza TGA. K následnému pozorování změn jejich chemických a mechanických vlastností v přítomnosti vody jsou použity dvě kalorimetrické metody – diferenční kompenzační kalorimetrie DSC a perfuzní kalorimetrie.

ABSTRACT

Presented bachelor's thesis focuses on the study of hydration of selected biopolymers – humic acids, chitosan, hyaluronic acid (low molecular weight and high molecular weight) and dextran. Thermogravimetric analysis TGA is used to determine the original moisture content of the samples. Two calorimetric methods were used for subsequent observations of changes in their chemical and mechanical properties in the presence of water – differential scanning calorimetry DSC and perfusion calorimetry.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biopolymery, huminové kyseliny, chitosan, kyselina hyaluronová, dextran, hydratace

KEY WORDS

Biopolymers, humic acid, chitosan, hyaluronic acid, dextran, hydration

ŠMÉRALOVÁ, E. *Hydratace biopolymerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 47 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vykonala 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 použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za odborné rady. Velké díky patří Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za čas, který mi po celou dobu práce věnovala a za poskytnuté cenné rady a informace. Dále děkuji paní Leoně Kubíkové za pomoc a ochotu při měření vzorků.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Obecně o biopolymerech.....	8
2.2	Huminové kyseliny.....	8
2.2.1	Huminové látky.....	8
2.2.2	Využití huminových látek.....	8
2.2.3	Rozdělení huminových látek.....	9
2.2.4	Struktura huminových kyselin.....	9
2.3	Chitosan.....	10
2.3.1	Chitin.....	11
2.3.2	Deacetylace.....	12
2.3.3	Vlastnosti a formy chitosanu.....	12
2.3.4	Využití chitosanu.....	13
2.4	Hyaluronová kyselina.....	14
2.4.1	Struktura hyaluronové kyseliny.....	14
2.4.2	Základní biologické funkce hyaluronové kyseliny.....	16
2.4.3	Biosyntéza a degradace.....	16
2.4.4	Využití hyaluronové kyseliny.....	17
2.5	Dextran.....	17
2.5.1	Fyzikální a chemické vlastnosti dextranu.....	18
2.5.2	Využití dextranu.....	18
2.6	Voda a její hydratační vlastnosti.....	19
2.6.1	Biopolymery a jejich hydratace.....	20
2.7	Současný stav řešené problematiky.....	21
2.7.1	Huminové kyseliny.....	22
2.7.2	Chitosan.....	22
2.7.3	Hyaluronová kyselina.....	23
2.7.4	Dextran.....	23
3	Experimentální část.....	24
3.1	Použité biopolymery.....	24

3.2	Použité přístroje.....	24
3.3	Metody.....	24
3.3.1	Termogravimetrická analýza TGA.....	25
3.3.2	Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC	25
3.3.3	Perfuzní kalorimetrie.....	26
4	Výsledky a diskuze.....	27
4.1	Termogravimetrická analýza TGA	27
4.2	Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC	30
4.3	Perfuzní kalorimetrie	36
5	Závěr.....	41
6	Seznam použitých zdrojů	42
7	Seznam použitých zkratk.....	47

1 ÚVOD

Hydratace je jedním z nejdůležitějších faktorů hrající roli v biologické funkci molekul. Různé biopolymery s hydrofilními skupinami, jako jsou například hydroxylové, karboxylové a karbonylové skupiny, mají buď silné, nebo slabé interakce s vodou. V přítomnosti přebytku vody může polymer botnat a může vykazovat výrazné změny jeho mechanických a chemických vlastností. Voda může změkčit matrix polymeru nebo může tvořit stabilní můstky přes vodíkové vazby. Po absorpci vody, mohou být malé nebo méně dokonalé krystaly polymeru zničeny.

Huminové kyseliny, chitosan, hyaluronová kyselina a dextran jsou biopolymery, tedy látky syntetizované živými organismy, které díky svým výhodně využitelným chemickým a fyzikálním vlastnostem nacházejí široké uplatnění v mnoha oblastech. Huminové kyseliny a chitosan jsou biopolymery ve vodě nerozpustnými, tvoří s vodou proto suspenzi, zatímco hyaluronová kyselina a dextran se ve vodě okamžitě rozpouští. Vliv vody na jejich strukturu je v této bakalářské práci zkoumán kalorimetrickými metodami diferenční kompenzační kalorimetrií DSC a perfuzní kalorimetrií.

Hlavním cílem této práce bylo využití ne tak standardně používané metody perfuzní kalorimetrie při studiu hydratace dostupných biopolymerů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecně o biopolymerech

Biopolymery jsou rozmanité polymery, které jsou syntetizovány živými organismy. Vyskytují se v každém organismu, kde plní mnoho nezbytných různorodých funkcí. [1] Polymery jsou obecně látky, které jsou tvořeny velkým počtem molekul. Jejich relativní molekulová hmotnost se pohybuje od desítek tisíc do milionů. Základními stavebními částicemi polymerů jsou makromolekuly, které vznikají spojováním molekul nízkomolekulárních látek (monomerů) chemickými vazbami. [2]

Můžeme je rozdělit do čtyř hlavních tříd: nukleové kyseliny DNA a RNA složené z nukleotidů, které ukládají informace a jsou zodpovědné za jejich přenos z generace na generaci. Dále jsou to proteiny, které jsou složeny z aminokyselin, třetí skupinu tvoří polysacharidy složené z cukrů (monosacharidů) a poslední skupinou jsou kaučuk a latex, které se skládají z izoprenových jednotek. [2], [3]

2.2 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny tvoří část huminových látek, které nejsou rozpustné v kyselých a neutrálních vodných roztocích, ale jsou rozpustné při vyšších hodnotách pH. Mohou být proto získány alkalickým loužením vhodné matrice a následným okyselením výluhu. Jejich barva je hnědá až hnědočerná. [4]

2.2.1 Huminové látky

Jsou to přírodní organické sloučeniny, které vznikly rozkladem organické hmoty a syntetickou činností mikroorganismů (humifikací). Přirozeně se vyskytují zejména v sedimentech, zeminách, rašelině, hnědém uhlí, lignitu a v některých dalších materiálech. Huminové látky mohou být v přírodě obsaženy ve stopovém množství (písky, jíly), v jednotkách procent (běžné zeminy) nebo v desítkách procent (hnědé uhlí, lignit). Až 80 % je jich přítomno např. v rašelině. [5], [4] Podporují růst rostlin, stabilizují půdní strukturu a chrání životní prostředí proti znečištění. [6]

Huminové látky jsou složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí několika stovek až desítek tisíců. Strukturně se jedná o látky velmi složité. [5], [4]

2.2.2 Využití huminových látek

Huminové látky jsou několik desetiletí intenzivně zkoumány. Zájem o ně vychází z jejich výhodně využitelných chemických a fyzikálních vlastností. Mají rozsáhlé využití v zemědělství zejména jako hnojiva v podobě humátů, dále se využívají v průmyslovém a farmakologickém průmyslu. V oblasti ochrany životního prostředí jsou huminové látky

atraktivní, neboť se jedná o látky přirozeného původu s dostatečnými zásobami v přírodních matricích. Využívají se v sanačních technologiích, dále se jeví jako potenciálně vhodné pro detoxikaci kontaminujících látek přítomných v životním prostředí. Jejich struktura je vhodná pro sorpční, iontově výměnné a biodegradační procesy. [4]

2.2.3 Rozdělení huminových látek

Za hlavní složky huminových látek jsou obvykle považovány huminové kyseliny (HK), fulvokyseliny a humin. [4]

Fulvokyseliny jsou rozpustné ve vodě v celém rozmezí pH. V roztoku zůstávají po odstranění huminových kyselin okyselením. Zabarvení fulvokyselin se pohybuje od světle žlutého do žlutohnědého. [4]

Fulvokyseliny mají ve srovnání s huminovými kyselinami nižší molekulové hmotnosti, obsahují méně aromatických struktur, více alifatických postranních řetězců a mají více homogenní strukturu. Fulvokyseliny a huminové kyseliny se liší i elementárním složením. Nízkomolekulární fulvokyseliny vykazují vyšší obsah kyslíku, ale nižší obsah uhlíku než vysokomolekulární huminové kyseliny. Dále fulvokyseliny obsahují více kyselých funkčních skupin, zvláště $-COOH$. Jejich celková kyselost je tedy podstatně vyšší než kyselost HK. [4], [7]

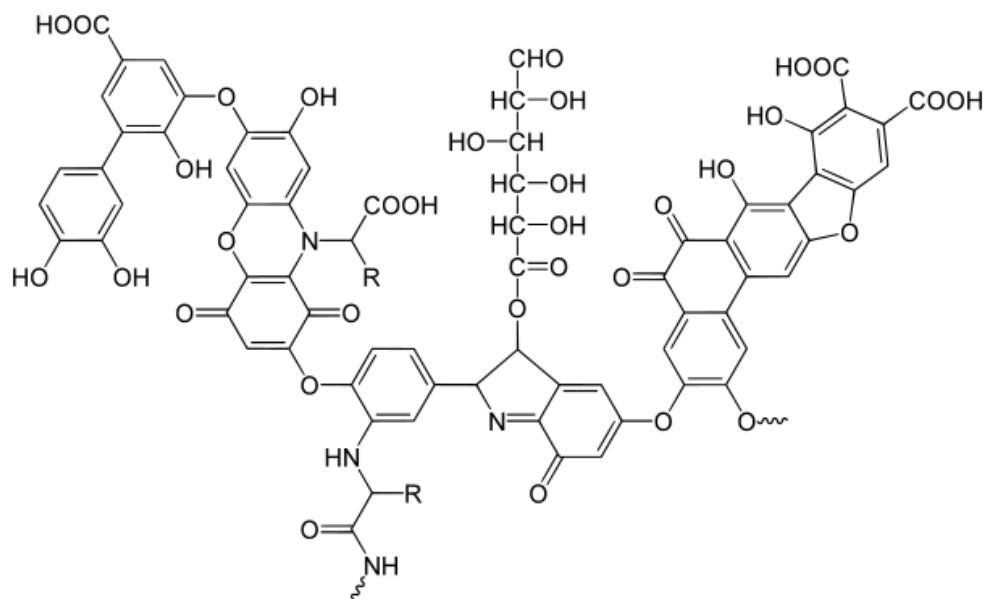
Humin je taková frakce huminových látek, která je ve vodě nerozpustná jak při kyselém, tak při alkalickém pH. Barva huminu je černá. [4]

Rozpustnost frakcí huminových látek úzce souvisí s molekulovou hmotností, s chemickou strukturou, s rozvětvením řetězce a s polaritou. [4]

2.2.4 Struktura huminových kyselin

Pravděpodobně první návrhy struktury huminových kyselin byly předloženy v roce 1972 Stevensonem a v roce 1973 Harworthem. Předpokládalo se, že huminové látky obsahují primárně v základní strukturální síti zabudované polyaromatické uhlovodíky. Dnes se však ví, že tomu tak není. V následujících 20 letech došlo k řadě objevů, které postupně objasnily, že ve struktuře huminových kyselin jsou zabudovány aromatické a hydroaromatické di-, tri- a tetrakyseliny. [4]

Huminové kyseliny jsou obecně aromatické makromolekuly, kde aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické sloučeniny zajišťují spojení mezi aromatickými skupinami. [4] Hypotetická struktura typické huminové kyseliny je uvedena na Obr. 1. [8]



Obr. 1: Příklad typické huminové kyseliny mající celou řadu komponent včetně chinonu, fenolu, katecholu a sacharidových skupin [8]

HK obsahují volné a vázané fenolické skupiny –OH, chinonové struktury, dusíkové a kyslíkové atomy ve funkci můstků a karboxylové kyseliny umístěné na aromatických kruzích. Huminové kyseliny mají tedy polyaniontový charakter a mohou vázat ionty různými chemickými i fyzikálními mechanismy. [4] Procentuální zastoupení funkčních skupin ve struktuře HK je uvedeno v Tab. 1. [9]

Tab. 1: Zastoupení funkčních skupin v huminových kyselinách

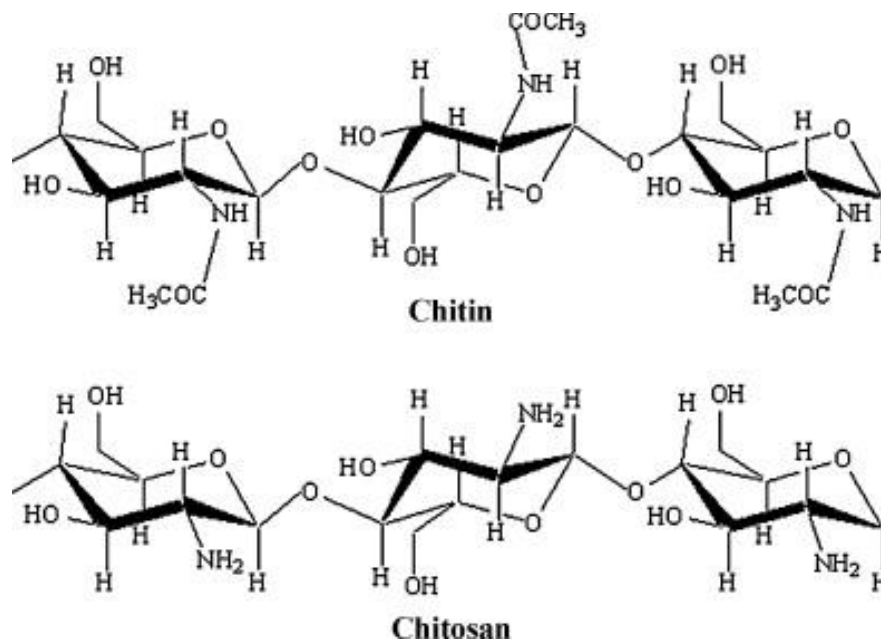
Zastoupení funkčních skupin v HK [hm.%]	
–COOH	4,4
–OH (alkohol)	3,3
–OH (fenol)	1,9
–C=O	1,2
–OCH ₃	0,3

Jak je již zmiňováno, HK obsahují chinonové struktury, přesněji přímo 2-methylnaftochinon. Koncentrace chinonů je velmi významná, protože jejich přítomnost je důležitá při přímém chemickém vytváření kovalentních vazeb humusu s cizorodými látkami bez enzymatické katalýzy. [4]

2.3 Chitosan

Chitosan je nejdůležitějším derivátem chitinu (Obr. 3), získaný (částečně) jeho deacetylací v pevném stavu za alkalických podmínek nebo enzymatickou hydrolýzou v přítomnosti chitin deacetylázy. [10]

Jedná se v podstatě o kopolymer složený z dvou základních podjednotek spojených β -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou. Podjednotky, ze kterých je složen, jsou 2-amido-2-deoxy-D-glukopyranóza a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranóza. [11]



Obr. 2: Struktura chitinu a chitosanu [15]

2.3.1 Chitin

Chitin, neboli poly-(β -(1 \rightarrow 4)-N-acetyl-D-glukosamin), zobrazený na Obr. 2, je přírodní polysacharid poprvé identifikován v roce 1884. Je to druhý nejrozšířenější polymer na světě po celulóze. V přírodě je obsažen ve vnějších kostrách mořských korýšů, krevet a krabů, dále se vyskytuje v buněčných stěnách hub a kvasinek. Je také produkován řadou dalších živých organismů, kterým dodává pevnost a slouží jim k vyztužení struktur. [12]

Chitin se vyskytuje ve dvou modifikacích, v modifikaci α a β . Byla popsána i třetí γ modifikace, ale z detailních analýz se zdá, že jde jen o variantu α modifikace. Nejvíce se vyskytující je α -chitin, β -chitin je vzácnější. [12] β -chitin vykazuje vyšší rozpustnost a větší reaktivitu. Nicméně, α -chitin se přednostně používá ve výzkumných laboratořích a v průmyslu protože právě α -modifikace chitinu je hlavní složkou skořápek korýšů. [13]

Chitin se jen vzácně vyskytuje v čisté formě. Kompletní eliminace látek, se kterými se chitin vyskytuje, není jednoduchý úkol a bývá velmi obtížné dosáhnout standardní čistoty, která je vyžadována u některých aplikací. [14]

V průmyslu se chitin extrahuje z korýšů působením kyseliny, která rozpustí uhličitán vápenatý. Následuje alkalická extrakce, která rozpustí proteiny. Pokud je vyžadován bezbarvý produkt, provádí se odbarvování k odstranění zbytků pigmentů. [12]

Chemická syntéza chitinu je složitá a drahý proces a jeho výroba pomocí biotechnologických postupů není zatím ekonomicky výhodná. [14]

2.3.2 Deacetylace

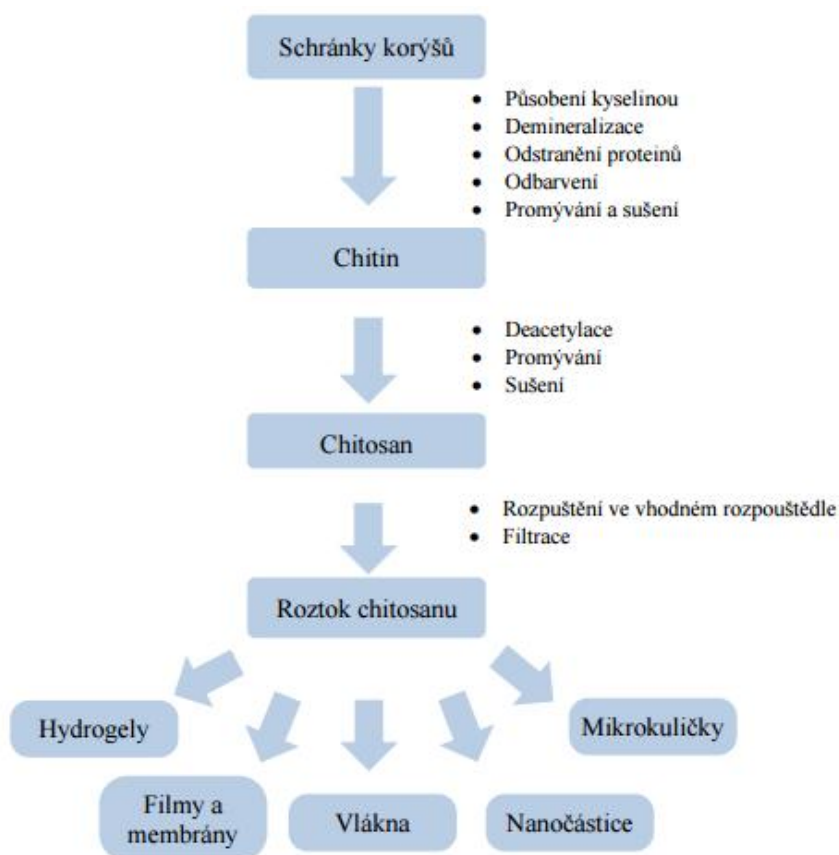
Molekulová hmotnost a stupeň deacetylce jsou nejdůležitější fyzikálně-chemické vlastnosti chitosanu, protože tyto parametry určují jeho kvalitu. [13] Princip deacetylce je odstranit acetylové skupiny chitosanu makromolekulárního řetězce a tím zvýšit počet volných amino skupin podél struktury biomolekuly. [14] Procento opakujících se jednotek s bočními acetylovými skupinami je specifikován jako stupeň acetylce, tzn. stupeň acetylce čistého chitosanu je 0%, čistého chitinu pak 100%. [15] Pokud deacetylce chitinu dosáhne asi 50 %, stane se rozpustný ve vodném kyselém prostředí a vzniká chitosan. Dochází k protonizaci NH_2 skupiny na C-2 pozici opakující se D-glukosaminové jednotky, přičemž je polysacharid převeden na polyelektrolyt v kyselém prostředí. [12]

2.3.3 Vlastnosti a formy chitosanu

Chitosan je nerozpustný ve vodě při neutrálním pH. Nemůže být roztaven a zpracován jako typické termoplasty kvůli vysokým počtům intermolekulárních a intramolekulárních vazeb, které jsou zodpovědné za jeho tuhou, semikrystalickou strukturu. Může být ale rozpuštěn ve slabě kyselých roztocích. [15]

Byly objeveny čtyři krystalické formy chitosanu. Tři formy hydratované (tedonová forma, forma II a L2), které ve vodných roztocích vytvářejí soli s minerálními nebo organickými kyselinami. Čtvrtá forma je anhydrát a vzniká zahřátím hydratovaného chitosanu na teplotu 200 °C. Při této teplotě dochází ke zkracování vzdáleností mezi jednotlivými vrcholy a zároveň k oddalování řetězců. Tato dehydratace je nevratná. Forma anhydritu je oproti ostatním nerozpustná v minerálních i v organických kyselinách. Také jako jediná není schopna tvořit komplexy s kovy. [16]

Chitosan může být za použití nejrůznějších technologických procesů připraven ve velmi širokém rozsahu fyzikálních forem. Tyto fyzikální formy se liší v mnoha vlastnostech, jako jsou hustota, rozpustnost, barva, stupeň deacetylce, mechanické vlastnosti atd. Nejčastěji se nachází ve formě prášku, dalšími formami chitosanu jsou hydrogely, filmy a membrány, vlákna, nanočástice a mikrokuličky. Jak již bylo řečeno, základní surovinou pro výrobu chitosanu, resp. některou z jeho forem je schránka koryšů. Na Obr. 3 je znázorněno schéma přípravy forem chitosanu. [16]



Obr. 3: Schéma přípravy forem chitosanu [16]

2.3.4 Využití chitosanu

Díky jeho rozpustnosti ve vodných roztocích, je hojně používán v různých aplikacích právě jako již zmíněné roztoky, gely nebo filmy a vlákna. Velice důležitá je jeho biomedicínská aplikace v tkáňovém inženýrství. Pomáhá při hojení ran a je používán jako pomocná látka pro dodávání léků. [12]

Mnoho uplatnění má v potravinářském průmyslu jako antimikrobiální balicí fólie, jako potravinové přípravky, slouží k zahušťování potravin a také jako stabilizační a antimikrobiální činidlo. [13]

Chitin a chitosan jsou využívány i v zemědělství. Díky svým antimikrobiálním vlastnostem jsou schopny chránit rostlinu před působením hub a plísní, inhibují jejich růst a vývoj. Jsou aktivní proti virům, bakteriím a dalším škůdcům. [17]

Nachází také uplatnění jako přípravek na hubnutí a ke snížení hladiny cholesterolu. Zlepšuje anémii, zvyšuje psychickou sílu a podporuje spánek. Chitosan má vliv na hladinu cholesterolu a na hmotnost kvůli tomu, že má kladně nabitě aminoskupiny při stejném pH jako je v trávicím traktu. Předpokládá se, že tyto aminoskupiny na sebe váží záporně nabitě molekuly lipidů a žluči, brání jejich vstřebávání a skladování v těle a dochází tak ke snížení tělesné hmotnosti. [18]

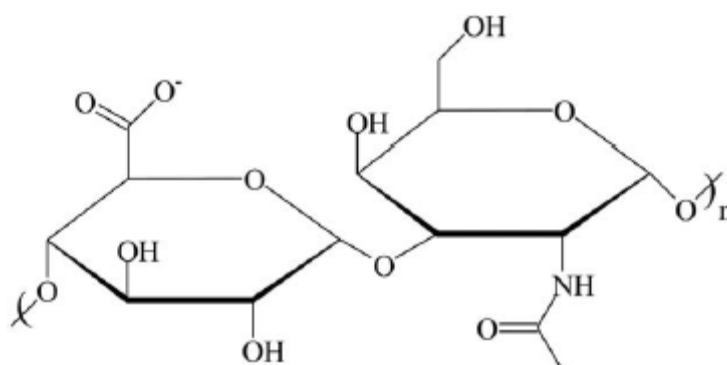
2.4 Hyaluronová kyselina

Hyaluronová kyselina (HA) je přírodní vysokomolekulární záporně nabitý lineární polysacharid, který je složen z opakujících se disacharidových jednotek β -(1 \rightarrow 4)-D-glukuronové kyseliny a β -(1 \rightarrow 3)-N-acetyl-D-glukoaminu spojených β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou (Obr. 4). Číslo opakujících se jednotek může dosáhnout 25 000, což odpovídá molekulové hmotnosti 10^7 Da. HA je přítomna u všech obratlovců, kde je především produkována fibroblasty a dalšími specializovanými tkáněmi. Je součástí pojivových, epitelových a nervových tkání. Tvoří jednu z hlavních složek mezibuněčné hmoty (ECM). Nachází se ve sklovině oka, v kůži, v synoviální tekutině kloubních spojů aj. V těle se vyskytuje ve formě sodné soli jako tzv. hyaluronan (HYA). [19], [20] Kromě obratlovců se vyskytuje také u některých bakterií (např. u streptokoků). Stručný výčet výskytu HA v různých živočišných tkáních a její obsah je zapsán v Tab. 2. [21]

Tab. 2: Výskyt HA v různých tkáních a její obsah

Tkáň nebo tělní tekutina	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)
Kohoutí hřebínek	7500
Lidská pupeční šňůra	4100
Lidská synoviální tekutina kloubních spojů	1400-3600
Hovězí nosní chrupavky	1200
Lidský sklivec	140-340
Lidská dermis (škára)	200-500
Lidská epidermis (pokožka)	100
Králičí mozek	65
Králičí srdce	27

2.4.1 Struktura hyaluronové kyseliny



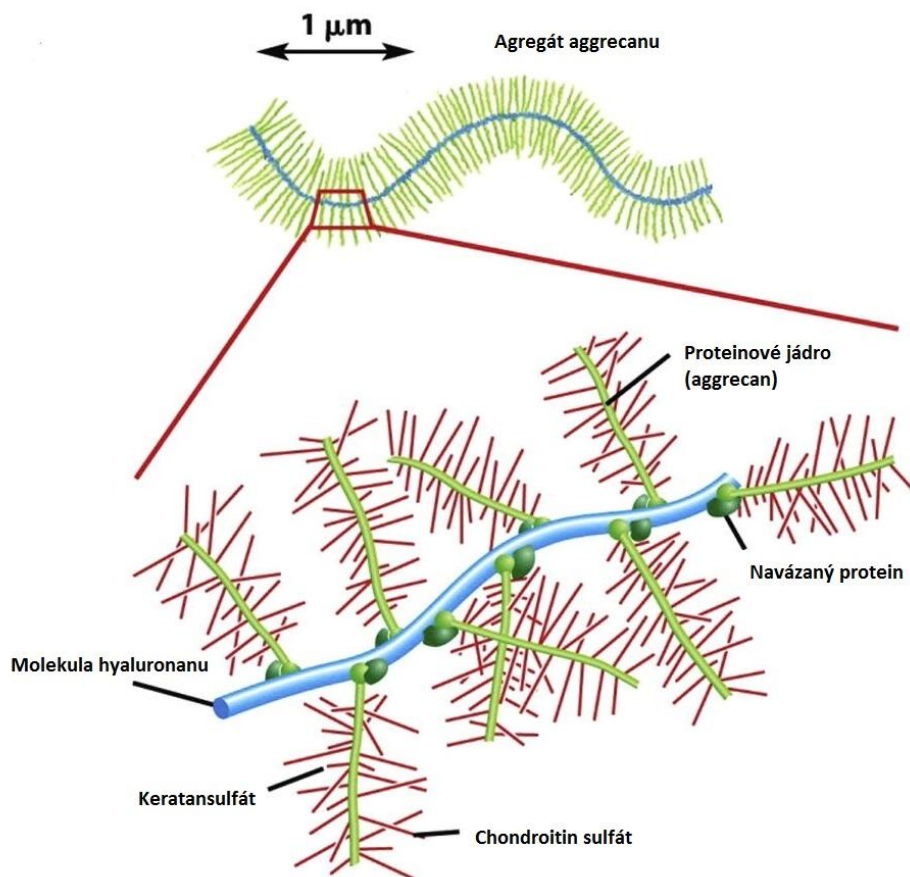
Obr. 4: Opakující se disacharidová jednotka hyaluronové kyseliny [20]

Obě sacharidové jednotky jsou prostorově příbuzné glukóze, což v β konfiguraci povoluje velkým skupinám (např. hydroxylové) držet sféricky výhodnou ekvatoriální konformaci.

Všechny malé atomy vodíku obsazují méně sféricky výhodnou axiální konformaci. V sekundární struktuře se disacharidové jednotky stáčí kolem osy do 180° šroubovice a tvoří řetězec. V roztoku je 4krát zahnutá jedno šroubovice. [22]

Hyaluronan se ve vodě spojuje pomocí specifických interakcí. Už při velice nízkých koncentracích vytváří síťovanou strukturu, která je stabilizována vodíkovými můstky zejména s molekulami vody. Hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti se ve vodě rozpouští za vzniku vysoce viskózního roztoku. [22] Konformace HYA v roztoku je dále stabilizována intramolekulárními vodíkovými můstky, což má za následek relativní pevnost a tvrdost polymeru. Vodíkové můstky mohou být porušeny přítomností NaOH nebo/a zvýšenou teplotou. Výsledkem toho je pružná konformace hyaluronanu. [20]

HA může být organizována do supramolekulárních struktur, což je zapříčiněno jejím slučováním s mnoha vazebnými proteiny. V mezibuněčné hmotě pojivových tkání na sebe HA váže určité proteoglykany, jako je například aggrecan (Obr. 5), kde tvoří velké komplexy, které poskytují strukturální ucelenost a mechanické funkce tkání. [23]



Obr. 5: Nákres agregátu aggrecan/HA, ukazující nekovalentní vazbu agregátu přes proteiny. [23]

2.4.2 Základní biologické funkce hyaluronové kyseliny

Kyselina hyaluronová vykazuje obrovské množství biologických funkcí. Díky svým viskoelastickým vlastnostem je obsažena v synoviální tekutině jako lubrikant a působí v ní i jako tlumič nárazů. Další důležitou funkcí je udržování viskoelasticity tekutiny očního sklivce. Díky zadržování vody na povrchu rohovky, HA zvyšuje smáčivost rohovky, což je užitečné při léčbě suchého oka. Dále kontroluje hydrataci tkání a transport vody. HA hraje roli v buněčných funkcích, jako je proliferace, diferenciaci a migrace. Kromě toho se předpokládá, že kyselina hyaluronová má ochranné účinky proti oxidačnímu poškození buněk volnými radikály. [19], [24]

HA splňuje několik odlišných molekulárních funkcí, které přispívají nejen ke strukturním a fyziologickým vlastnostem tkání, ale také zprostředkovává chování buněk během morfogeneze, přeměny tkání, zánětů a nemocí. Díky svým jedinečným biofyzikálním vlastnostem, HA přispívá přímo k udržení homeostázy. Reaguje s různými proteiny nebo proteoglykany a udržuje a organizuje tak celistvost extracelulární i pericelulární matrix. Jako signální molekula reaguje hyaluronan s různými receptory na povrchu buněk a s proteiny, čímž aktivuje intracelulární děje a zprostředkovává tím buněčné funkce. [23]

2.4.3 Biosyntéza a degradace

Kyselina hyaluronová patří do skupiny látek známé jako glykosaminoglykany, přičemž HA je strukturně nejjednodušší z nich a jako jediná z nich není syntetizována v Golgiho aparátu, ale v plazmatické membráně skupinou vysoce specializovaných membránových proteinů, HA syntetázami (HAS). U savců existují tři izoenzymy: HAS1, HAS2 a HAS3, z nichž každý má dvě odlišná místa pro navázání UDP-cukrů. K polymeraci HA dochází na vnitřní stěně plazmatické membrány, kde HAS přidává UDP-ClcA a UDP-ClcNAc monomery na redukující konec rostoucího polymeru. Když polymerace probíhá, neredukující konec řetězce je přes póry ve struktuře HA vytlačován do extracelulárního prostoru. [23]

Syntéza hyaluronanu syntetázou HA1 je pomalejší v porovnání s ostatními syntetázami. HA různých velikostí vykazuje odlišné, někdy i protichůdné biologické funkce. Zatímco HAS1 a HAS2 jsou schopny produkovat dlouhé řetězce HA (až 2000 kDa), HA3 produkuje hyaluronan s nižší molekulovou hmotností (100-1000 kDa). [23]

Syntéza a degradace HA je přísně regulována v průběhu embryonálního vývoje a homeostatických procesů. Poločas rozpadu HA se pohybuje od méně než jednoho dne (HA obsažená v pleti a v séru) až do 2-3 týdnů (v chrupavkách). HA je odstraněna z ECM v důsledku místního katabolismu a/nebo vypuštěním do lymfatického systému za účelem katabolismu v lymfatických uzlinách. [23]

HA může být rozkládána řadou enzymů zvaných hyaluronidázy (HAa). Hyal1 a Hyal2 jsou dvě nejběžnější hyaluronidázy. Oba enzymy se nacházejí téměř ve všech tkáních. Existují i enzymy Hyal 3 a PH-20, které jsou více specializované. Každá hyaluronidáza působí jen na určitou velikost fragmentu HA a je aktivní jen při určité hodnotě pH. Hyal1 je aktivní jen při velmi nízkých hodnotách pH (3,5 – 3,8). Enzym štěpí velké nebo malé řetězce

hyaluronanu na tetramery. Hyal2 vykazuje optimální aktivitu při pH 6 – 7, ale je aktivní v širokém rozsahu pH. Tento enzym štěpí vysoko molekulární HA na meziprodukty o velikosti 20 kDa. PH-20 je aktivní v rozsahu pH 3 – 9 a štěpí vysoko molekulární HA na malé fragmenty. [23]

Hyal1 a Hyal2 pracují společně s cílem degradovat HA v somatických buňkách. Hyal2 vázaná ke GPI váže extracelulárně HA a provádí předběžné štěpení celého polymeru v kyselých endocytických váčcích. Dále pak může Hyal1 ve váčcích zpracovávat HA oligomery s pomocí β -exoglykosidázy, která může sacharid štěpit z každého konce. [23]

2.4.4 Využití hyaluronové kyseliny

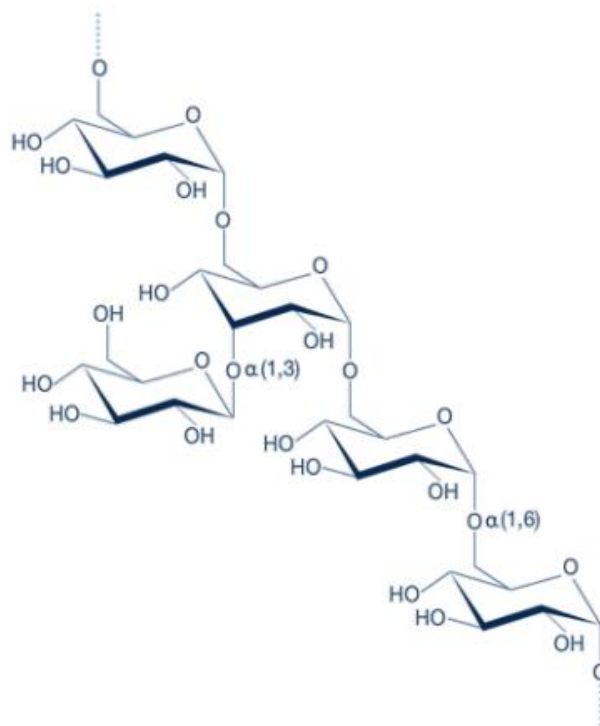
V lékařství se HA běžně používá pro své protizánětlivé vlastnosti na hojení ran a k operacím v očním lékařství. Působí jako přírodní lubrikant a výborně na sebe váže vodu. Díky tomu se přidává do kontaktních čoček, kde zvyšuje smáčivost a komfort při jejich nošení. Tento polymer má také potenciál při léčbě artritidy a pro zachování zbylého sluchu v průběhu kochleární implantace. Hyaluronové hydrogely také ukázaly potenciál jako systémy podávání léků, buďto samotné nebo v kombinaci s jiným polymerem. [25], [24]

Materiály na bázi HA můžou buňkám udělit biologickou aktivitu, o čemž svědčí změny v buněčném chování. Buňky jsou schopné reagovat s biomateriály na bázi hyaluronanu, kdežto se syntetickými polymeru k reakci nedochází. Příkladem může být schopnost HA udržet kmenové buňky v nediferencovaném stavu a účast HA-interagujících proteinů v nádorové metastáze. [23]

Díky svým hydratačním a elastickým vlastnostem má hyaluronan široké uplatnění v kosmetice a ve farmacii. Ve farmacii slouží zejména k přípravě léčiv pro kloubní onemocnění a některé druhy rakoviny. V kosmetice se využívá k přípravkům proti vráskám a stárnutí pleti. [22]

2.5 Dextran

Dextran je homopolysacharid složený z glukózové jednotky mající značný počet α -(1→6) vazeb v hlavním řetězci, obvykle 50% z celkového počtu vazeb. Tento α -D-glukan má také několik bočních řetězců přes α -(1→3) vazby (Obr. 6). Přesná struktura každého typu dextranu závisí na původu mikrobiálního kmene. Je produkován bakterií mléčného kvašení, zejména Streptokoky a Leuconostoc mesenteroides. Dextran ze streptokoka z dutiny ústní tvoří složku zubního plaku, která tvoří prostředí pro množení těchto bakterií. Fyziologická funkce dextranu produkovaného L. M. je zatím neznámá. [1]



Obr. 6: Struktura dextranu [26]

2.5.1 Fyzikální a chemické vlastnosti dextranu

Frakce dextranu jsou rozpustné ve vodě a v elektrolytických roztocích a vytvářejí čiré, stálé roztoky, přičemž hodnota pH na rozpustnost nemá významný vliv. Dextran je rozpustný i v dalších rozpouštědlech, zejména v metyl sulfidu, ethylen glykolu a glycerolu. Nerozpustný je v jednosytných alkoholech, například v metanolu, etanolu a isopropanolu, dále se nerozpouští ve většině ketonech. [27]

Dextranová opakující se jednotka obsahuje tři sekundární hydroxylové skupiny, které vykazují dostatečnou chemickou reaktivitu pro připojení funkčních skupin navázaných přes esterovou nebo etherovou vazbu. [28]

2.5.2 Využití dextranu

Využití dextranu je velice různorodé. V lékařství nachází velice široké uplatnění, tradičně se používá v infuzním roztoku a do objemových expandérů. Ty zajišťují parenterální výživu při ztrátách tekutin (například při ztrátách krve v naléhavých případech, kdy není možná transfuze krve) a v těle se tento roztok rozkládá na glukózu a volnou vodu. Dále se s ním můžeme setkat jako se suplementem, který snižuje viskozitu krve a předchází tak sraženinám krve. [29], [30]

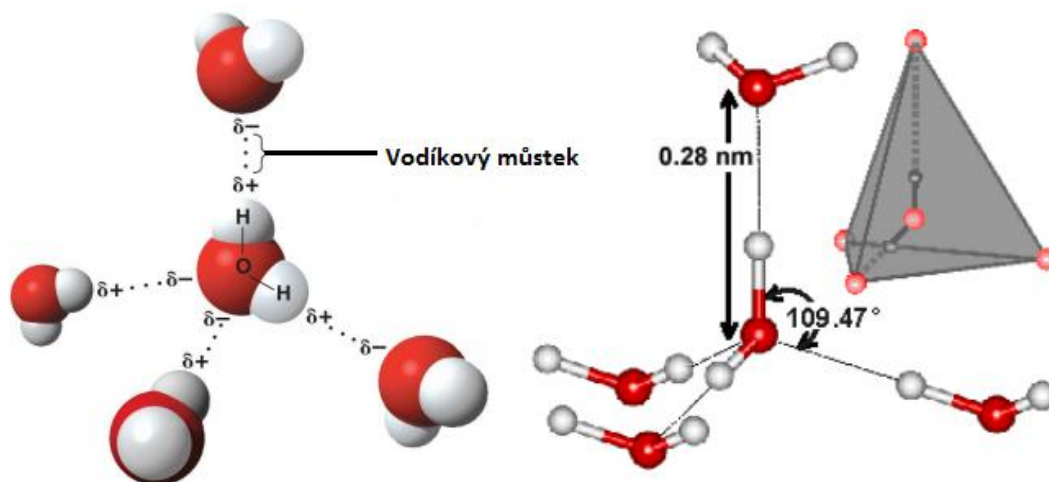
Díky svým lubrikačním vlastnostem se často také používá jako aktivní látka do očních kapek nebo v kapkách jako náhražka slz, kde zmírňuje suché a podrážděné oči. [29]

Množství různých orgánů a tkání určených k transplantaci je skladováno v roztoku dextransu pro zvýšení jejich životnosti. [29]

2.6 Voda a její hydratační vlastnosti

Voda je nezbytná pro život a nemůže být ničím jiným nahrazena. To je dáno jejími jedinečnými vlastnostmi, které nelze najít u žádné jiné látky. Tyto vlastnosti jsou zapříčiněny přítomností vodíkových vazeb (můstek). Vodíková vazba ve vodě je slabá vazba, která má sílu asi dvacetiny síly O–H kovalentní vazby. Přitažlivost O–H vazebných elektronů směrem k atomu kyslíku zanechává deficit na atomu vodíku vzhledem ke kyslíku. Výsledkem je přitažlivá síla mezi vodíkem O–H a atomem kyslíku sousední molekuly vody. [31]

Vodíkové vazby hrají zvláště významnou roli ve vodě, protože každý atom kyslíku se svými dvěma atomy vodíku se může podílet na čtyřech takovýchto vazbách s dalšími molekulami vody (dvě vazby zahrnují vlastní atomy vodíku v molekule a dvě zahrnují nesdílené elektrony s dalšími dvěma atomy vodíku). Tyto čtyři vodíkové vazby tvoří tetraedry kolem každé molekuly vody, což bylo zjištěno z obyčejného ledu. V tekuté vodě je tendence zachovávat tetraedrické uspořádání jako v ledu, ale struktura je neuspořádaná a labilní. Tetraedrické uspořádání molekul vody (znázorněno na Obr. 7) je jádrem jejich jedinečných vlastností mnohem více, než přítomnost vodíkových vazeb jako takových. [31]



Obr. 7: Pět molekul vody v tetraedrickém uspořádání [31]

Hydratace je jedním z nejdůležitějších faktorů hrající roli v biologické funkci molekul. Voda je důležité médium pro transport živit, pro membránové procesy, vyvolává biologicky aktivní konformace molekul atd. Vzhledem k jedinečným vlastnostem a silné afinitě molekul vody držet pohromadě pomocí vodíkových můstek tvoří různé struktury mající různé fyzikálně-chemické vlastnosti. [31]

Vodíkové vazby hrají zásadní roli při určování fázového chování polymerů a jejich mísitelnosti či nemísitelnosti. Pokud je vodíková vazba mezi polymerem a polymerem silnější než mezi vodou a polymerem, molekuly polymeru se shlukují a jsou nemísitelné. Když je

naopak vodíková vazba silnější mezi vodou a polymerem, polymer je obvykle ve vodě disperzní. [32]

Různé biopolymery s hydrofilními skupinami, jako jsou například hydroxylové, karboxylové a karbonylové skupiny, mají buď silné, nebo slabé interakce s vodou. V přítomnosti přebytku vody může docházet k tomu, že polymer začne bobtnat a může vykazovat výrazné změny v jeho mechanických a chemických vlastnostech. Voda může změkčit matrix polymeru nebo může tvořit stabilní můstky přes vodíkové vazby. [33] Po absorpci vody, mohou být malé nebo méně dokonalé krystaly polymeru zničeny. S obsahem vody v polymerních materiálech také dochází k tomu, že prudce klesá teplota skelného přechodu. [34]

2.6.1 Biopolymery a jejich hydratace

V posledních letech bylo zjištěno, že biologické funkce makromolekul nejsou výhradně určeny jejich strukturou a chemickým složením. Interakce s molekulami vody mohou být velice důležitou silou pro držení struktury biomolekul. Je proto zřejmé, že vodu jako rozpouštědlo nelze chápat jako kontinuum, ale že specifické interakce s polymerem hrají klíčovou roli makroskopických vlastností biopolymerů. Navíc voda zprostředkovává interakce mezi biomolekulami a je tedy zásadní pro molekulární rozpoznávání a pro biologické funkce. [35]

U hydratace huminových kyselin bylo prokázáno, že v přítomnosti vody, dochází k bobtnání struktury HA a k přerušení van der Waalsových sil, ale i k přerušení některých vodíkových vazeb, což má větší vliv na snížení teploty skelného přechodu. [36]

Chitosan může mít v simulovaných fyziologických podmínkách příjem vody ve výši až 160%. Voda silně ovlivňuje jeho mechanické vlastnosti. V biomedicínských aplikacích, může být chitosan vystaven různým úrovním hydratace, která se může pohybovat od mírné úrovně vlhkosti (využití např. při hojení ran), až do maximálních hodnot schopnosti absorpce vody (např. tkáňové inženýrství, vnitřní stehy). [37] Chitosanové hydrogely mohou absorbovat až 2000% své vlastní hmotnosti. Schopnost chitosanových hydrogelů vázat vodu záleží také na pH okolního prostředí. [15]

O kyselině hyaluronové je známo, že je schopná na sebe navázat velké množství vody. Díky její silné aniontové povaze, struktura HA řetězců působí tak, že váže vodu mezi svinuté řetězce, což způsobuje právě vysokou možnost zadržet vodu. Retence vody může být také připsána vysokým počtům hydroxylových skupin, které vedou k tvorbě vodíkových můstků. Kyselina hyaluronová může pojmout až tisícinásobek své vlastní váhy. Obsah vody se zvyšuje se zvyšující se relativní vlhkostí. [24] Je také zřejmé, že viskoelastické vlastnosti a kapacita hydratace HA záleží na její molekulové hmotnosti. [23] Kyselina hyaluronová má podstatně větší schopnost vázat vodu než ostatní polyelektrolytické polysacharidy. 2% roztok čisté hyaluronové kyseliny váže vodu tak pevně, že tvoří gel vykazující pružné vlastnosti. [38]

2.7 Současný stav řešené problematiky

Mikrokalorimetrickou techniku – perfuzní kalorimetrii využili I. Timmermann a kol. v práci [39], kde zkoumali tvorbu monohydrátu α -laktózy a β -laktózy během rekrystalizace, kdy přiváděli ke vzorku kontrolovaný tok vlhkého plynu. Zkoumanými látkami byly čistá amorfni laktóza a různé práškové směsi laktózy. Určením entalpie desorpce právě rekrystalizované laktózy pomocí RH perfuzní cely bylo rozlišeno, zda se produkoval monohydrát nebo bezvodá forma laktózy. Byly zjištěny rozdíly v rekrystalizačním chování laktózy při 25 °C a při relativní vlhkosti 58-100%. Při 60-80% čistá amorfni laktóza vykazuje vysoké teplo desorpce, které lze přičítat velmi vysokému obsahu vytvoření β -laktózy, zatímco při RH 90% je stanoveno vysoké množství α -laktózy monohydrátu. Oproti tomu, směsi obsahující β -laktózu jako nosič vykazují vyšší množství vytvořeného monohydrátu α -laktózy než směsi s α -laktózou jako nosičem. Z toho vyplývá, že relativní vlhkost, množství amorfni laktózy a přítomnost nadbytku α -laktózy nebo β -laktózy ovlivňují rekrystalizační chování amorfni laktózy. Rekrystalizace při RH vyšší než 90% by byla optimální pro dosažení pouze α -laktózy monohydrátu.

Isotermická mikrokalorimetrie byla shledána užitečnou ve vyhodnocování kritické relativní vlhkosti (cRH). D.F. Jakobsen a kol. popisují v práci [40] zkoumání kritické relativní vlhkosti tří látek vykazující odlišné hygroskopické vlastnosti, dvou extrémně ve vodě rozpustných látek (flupentixol, 2HCl a Lu 25-109) a jedné hydrofobní látky (sertindole). Byly měřeny tepelné změny vzorků. RH perfuzní cely byla použita k řízení relativní vlhkosti v nádobě se vzorkem. RH byla lineárně zvyšována od 30% do 100% po dobu 18 hodin pro 5 různých teplot. Změna tepelného toku nastávající, když vlhkost reagovala s pevným vzorkem, byla měřena jako funkce času. Plocha pod křivkou toku byla vypočítána jako teplo pomocí programu. cRH je definována jako RH, kde lineární část křivky tepelného toku zachycuje základní linii. Bylo prokázáno, že signál tepelného toku naměřený během zvyšující se vlhkosti je primárně způsoben kondenzací vodní páry na povrchu pevné látky. Mikrokalorimetrická odezva neprokázala žádný významný efekt na velikost vzorku, což naznačuje, že signál tepelného toku je ovlivněn interakcí vodní páry s horní vrstvou prášku. Doba expozice se také neprokázala jako ovlivňující aspekt pro stanovení cRH. Kritická relativní vlhkost získaná pro tři různé sloučeniny se shodovala s jinými způsoby měření.

Strukturu molekul vody sorbované v různých hydrofilních polymerech studovali Q.T.Nguyen a kol. v práci [34] pomocí DSC a FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy). Získaná data ukazují, že sorbované molekuly vody jsou přímo vázány na hydrofilní místa a tvoří nemrznoucí vodu. Dále nad určitou mezní hodnotu obsahu vody se molekula vody stává mrznoucí, ale teplota tání je nižší než 0 °C, vzhledem k umístění v druhé hydratační vrstvě. Voda, která mrzne při 0 °C, se objeví při vyšším obsahu vody a dva typy nemrznoucí vody se nakonec spojí při velmi vysokém obsahu vody. Průměrný počet nemrznoucích molekul vody na místo závisí na chemické povaze polárního místa: 1 pro hydroxyl a 4,2 pro amido skupinu.

2.7.1 Huminové kyseliny

Hydratací huminových kyselin se zabývala ve své závěrečné práci [36] Grebíková L. metodou teplotně modulované diferenční kompenzační kalorimetrie (TMDSC) za účelem odhalení změn ve struktuře HA pravidelným vlhčením a opakovaným sušením (celkem bylo provedeno 5 cyklů). Po extrakci volných lipidů se stala struktura HA více porézní v porovnání s původní HA, voda tak mohla snadněji pronikat do struktury. Voda periodicky stabilizovala a destabilizovala strukturu HA. Ve vzorku bez volných lipidů byl vliv vody krátkodobý a voda potřebovala méně času k vyvolání změn. V původním vzorku byly změny kontinuální. Opakovaným vlhčením došlo k poklesu teplot fázových přeměn v každém cyklu. Ovlhčení ovlivnilo kinetické procesy (krystalizaci). Opakované vlhčení způsobovalo dále redistribuci a vymytí hydrofilních molekul a tím postupnou hydrofobizaci celé struktury.

V práci [41] se zabývali Kučeřík a kol. termodynamickou stabilitou a molekulovými vlastnostmi agregátů huminových kyselin z hnědého uhlí metodou vysokorozlišovací ultrazvukové spektroskopie. Roztoky huminových kyselin různých koncentrací byly ohřívány a chlazeny v teplotním intervalu od 5 °C do 90 °C a byly monitorovány změny v ultrazvukové rychlosti. Změny v diferenciální ultrazvukové rychlosti (U12) vykazovaly silné rozdíly mezi jednotlivými roztoky o koncentracích od 0,005 do 10 g/l. Měření odhalila několik přestupů, které byly připisovány oslabení sekundární struktury huminové kyseliny. Koncentrace kolem 1 g/l se zdála být limitní pro změnu hydratace. Nad tuhle koncentraci se U12 zvyšovala a následně docházelo ke snížení teploty, což bylo vysvětleno jako dominance hydrofilní hydratace. Pod koncentrací 1 g/l se teplotní závislost na U12 snižovala, což bylo připsáno výskytu hydrofobní hydratace, tj. odkrytí nepolárních skupin směrem k okolní vodě.

2.7.2 Chitosan

Vliv vody na chitosanové membrány zkoumali C.O. Correia, S.G. Caridade a J.F. Mano. Chitosanové membrány mohou hydratací při laboratorní teplotě podléhat skelnému přechodu. Vzorek chitosanu ponechali ve směsi vody a etanolu o různé koncentraci. Výsledek ukázal, že zvyšování obsahu vody má vliv na mechanické a fyzikální vlastnosti chitosanu. Youngův modul pružnosti a konzervativní modul se systematicky zvyšoval. Vzhledem k semikrystalické povaze chitosanu membrány tohoto materiálu představují schopnost s tvarovou pamětí, vyvolanou absorpcí vody. Fixací stálého tvaru kovalentním zesílením mohou mít membrány různé stálé tvary vhodné pro mnoho aplikací, včetně v biomedicínské oblasti. [42]

C.H. Murray a J.R. Dutcher se zabývali v práci [15] efektem, který vyvolají změny relativní vlhkosti na ultratenké chitosanové filmy. Připravili chitosanové filmy z roztoku chitosanu rozpuštěném ve zředěné octové kyselině. Po neutralizaci filmu, film okamžitě v přítomnosti vysoké vlhkosti absorboval vodu. Zahřátí způsobilo nevratné snížení tloušťky filmu, malý vzrůst indexu lomu a snížení absorpce vody. Infračervenou spektroskopií určili stav chitosanových filmů před a po zahřátí. Vykazují zvyšující se stupeň acetylace se zahříváním. Tato pozorování jsou v souladu s uvolněním vázané vody.

J.F. Mano se zabýval vlastnostmi chitosanu s různými stupni hydratace pomocí dynamické mechanické analýzy (DMA). Tato metoda je adekvátní pro charakterizaci mechanických vlastností biomateriálů. Prováděl různé testy na membránách chitosanu za použití nízké a střední hladiny hydratace, ale i ve zcela mokřích podmínkách. Teplotní skeny neodhalili žádné výkyvy viskoelastických vlastností v suchých ani v mokřích podmínkách. Sledoval absorpci vody v reálném čase ve zpočátku suché membráně. Nejdříve došlo k rychlému poklesu konzervativního modulu, což odpovídá výskytu skelného přechodu, který je výsledkem plastifikace působením vody. [37]

2.7.3 Hyaluronová kyselina

Autoři práce [43] se věnovali hydrataci hyaluronanu pomocí metody IR spektrometrie. Shrnutí dosažené výsledky, které se týkají struktury HA při pokojové teplotě a mechanismy její hydratace. Zahřátím HA dochází k rozbíjení vodíkových vazeb mezi skupinami N–H a CO–. Je pravděpodobné, že k takovému rozbíjení dochází v místech, kde jsou již vodíkové můstky rozbité. To umožňuje částečnou rotaci disacharidové jednotky. Když zvýšili vlhkost vzduchu, hydratace pokračovala následovně: Nejprve hydratovali 25 molekulami H₂O celou disacharidovou jednotku. Hydratace celé disacharidové jednotky byla možná, protože se voda může navázat na hodně místech podél HA řetězce. Kapka 25 molekul vody hydratovala všechny možné hygroskopické skupiny, které nebyly spojeny vodíkovými můstky mezi skupinami N–H a CO–.

Průšová A., Conte P., Kučeřík J. a Alonzo G. [44] použili metodu fast field cycling (FFC) NMR relaxometrii k prozkoumání konformačních vlastností vodného roztoku hyaluronanu ve třech koncentracích v rozmezí od 10 do 25 mg/ml. Výsledky ukázaly, že bez ohledu na koncentraci, existují tři různé hydratační vrstvy obklopující hyaluronan. Vnitřní vrstva se skládá z molekul vody v silné blízkosti povrchu HYA. Kvůli jejich silné interakci, molekuly vody v této vnitřní vrstvě podléhají velmi pomalé dynamice a mají největší korelační časy. Další dvě hydratační vrstvy jsou složeny z molekul vody, které se nacházejí postupně dále od HYA. Výsledkem je snížení korelačních časů, což je způsobeno rychlejším pohybem molekul. Došlo ke změnám intenzit a poloh naměřených píků. Proto navrhli, že se zvyšující se koncentrací se amino skupiny postupně podílí na vzniku slabé a přechodné intramolekulární vodíkové vazby sousedních hyaluronových řetězců.

2.7.4 Dextran

J. Hunger a spol. sledovali ve své práci [35] hydrataci hyaluronanu a dextransu. Tyto dva strukturně podobné polysacharidy dávaly pozoruhodně podobné výsledky. To naznačuje, že pozorované interakce s vodou jsou společným znakem pro hydrofilní polysacharidy.

V práci [45] R. A. Frazier a kol. zkoumali monovrstvu dextransu. Tahle monovrstva umožnila první aplikaci mikroskopie atomárních sil (AFM) pro vizualizaci makromolekulární hydratace při vysokém rozlišení *in situ*. AFM poskytla obrázky trojrozměrného zobrazení povrchu. Ve vzduchu se vrstva dextransu skládala z kulovitých jednotek nacházejících se blízko sebe.

Při zavádění vody bylo vidět botnání jednotlivých molekul dextransu, povrch se začal spojovat a splývat a tvořit rovnoměrný film. Měřením silových křivek (Force-distance) bylo zjištěno zvyšování elasticity s rostoucí hydratací.

F. Kawaizumi a kol. se v práci [46] zabývali interakcemi mezi vodou a dextransem o molekulové hmotnosti asi 10^4 . Měřili specifickou tepelnou kapacitu, adiabatickou stlačitelnost a viskozitu, s použitím kalorimetru a ultrazvukového interferometru. Data ukazují existenci vody hydratované na molekulách dextransu. Množství vody a parciální molární tepelná kapacita se zmenšují se vzrůstající molekulovou hmotností dextransu. Strukturní změny vody způsobené rozpuštěním jedné molekulové jednotky dextransu jsou menší, než u glukózy (monomeru dextransu) a stupeň strukturní změny vody ostře klesá se vzrůstající molekulovou hmotností polymeru. Stupeň polymerace má malý vliv na parciální specifický objem dextransu ve vodě. Množství vázané vody klesá s rostoucí molekulovou hmotností. Z toho usuzují, že hydratace se přisuzuje hydrofilním OH skupinám obsažených v molekule. Pokles vody je způsoben tedy poklesem počtu volných OH skupin, obsahujících okolní molekuly vody. Se zvětšující se molekulovou hmotností se řetězec polymeru více proplétá. To má za následek snížení počtu volných OH skupin, které jsou zodpovědné za hydrataci. Dále také oslabení interakcí mezi rozpouštědlem a rozpuštěnou látkou, což má za následek to, že stupeň strukturní změny po rozpuštění strukturní jednotky polymeru klesá.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité biopolymery

- Huminová kyselina: lignitická
- Chitosan: 168 kDa; č.š. MKBH 7256V; Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha
- Hyaluronan: 300 kDa; č.š. 230215-E1; Contipro a.s., Dolní Obrouč
- Hyaluronan: 1400-1600 kDa; č.š. 181214-4-D1; Contipro a.s., Dolní Obrouč
- Dextran: 425-575 kDa; č.š. 030M1742; Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha

3.2 Použité přístroje

- izotermický mikrokolorimetr TAM III (TA instruments)
- termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 (TA instruments)
- mikrokolorimetr DSC Q2000 (TA instruments)

3.3 Metody

K určení vlhkosti suchého vzorku byla využita termogravimetrická analýza (TGA). K experimentu byly použity dvě metody – diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC) a perfuzní kalorimetrie.

3.3.1 Termogravimetrická analýza TGA

Princip:

Jedná se o nejjednodušší metodu termické analýzy. Vzorek je vystaven tepelnému namáhání, a na citlivých mikrováhách je sledována změna jeho hmotnosti. Atmosféra, ve které měření probíhá, se volí buď inertní (dusík nebo argon) nebo oxidační (vzduch). Měřit lze od laboratorní teploty do vysokých teplot až 1200 °C. Termogravimetrie tedy snadno a rychle stanovuje tepelnou nebo tepelně-oxidační stabilitu vzorku, pomocí analýzy kroků degradace materiálu je pak možno usuzovat na jeho složení, obsah vlhkosti, obsah organické a anorganické hmoty. [47]

Vlastní měření:

Vzorek biopolymeru byl vložen do platinové pánvičky. Měření probíhalo v atmosféře dusíku od laboratorní teploty po teplotu 500 °C s krokem 10 °C za minutu. Naměřená data byla zaznamenávána v počítači, který byl propojen s použitým přístrojem TGA Q5000. Z úbytku hmotnosti pak byl stanoven počáteční obsah vlhkosti ve vzorku.

3.3.2 Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC

Princip:

DSC je jednou z nejrozšířenějších metod termické analýzy. Jsou při ní zkoumány tepelné vlastnosti vzorku vystaveného teplotnímu programu. Vzorek je ohříván nebo chlazen definovanou rychlostí spolu s kontrolním (referenčním) vzorkem. Signál související s fázovou změnou vzorku je způsoben momentální rozdílnou teplotou vzorku a referenčního vzorku, kterou se přístroj snaží okamžitě kompenzovat. [48] Fázová změna v materiálu je doprovázena buď uvolňováním (exotermická reakce) nebo spotřebováváním tepla (endotermická reakce). Tento typ procesu se v DSC experimentu detekuje jako pík. [49]

Touto metodou můžeme vyhodnotit teplotu tání, teplotu skelného přechodu, různé druhy krystalizací, tepelnou kapacitu a teplotu degradace. Konkrétně se DSC používá při studiu fázových přechodů a testování kvality polymerních a biopolymerních materiálů, skel, při stanovení stabilit emulzí a hydratace materiálu (množství volné a vázané vody). [48]

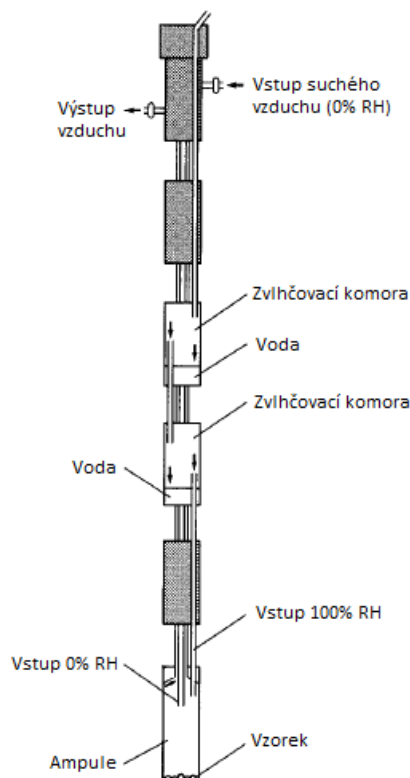
Vlastní měření:

Ke vzorkům biopolymerů byla přidána voda. Huminové kyseliny a chitosan tvořily suspenzi, hyaluronan a dextran vytvořily roztok. Suspenze nebo roztok byl aplikován do hliníkových pánviček. Měření probíhalo v cele, kam byl přiváděn dusík. Teplota měření probíhala od -50 °C do 25 °C s rychlostí ohřevu 3 °C za minutu. Vzorky byly měřeny za stejných podmínek i po 24 hodinách ponechání ve vodě přikryté víčkem (k měření byl vždy použit vzorek nový). Do počítače propojeného s přístrojem DSC Q2000 byl zaznamenáván signál tepelného toku vzorků.

3.3.3 Perfuzní kalorimetrie

Princip:

Perfuzní kalorimetrie (mikrokalorimetrie) je metoda, při které probíhá měření v perfuzní cele, pro studium hydratace vzorku díky nastavitelné relativní vlhkosti (RH) inertního plynu dusíku. Dusík je k vzorku přiváděn dvěma cestami, vlhkou (RH 100%) a suchou (RH 0%). Vlhká cesta prochází zvlhčovači, které obsahují čistou vodu. Tok se tak smísí v různých poměrech pro dosažení požadované hodnoty relativní vlhkosti. Schéma perfuzní cely je na Obr. 8. [39]



Obr. 8: Schéma RH perfuzní cely [39]

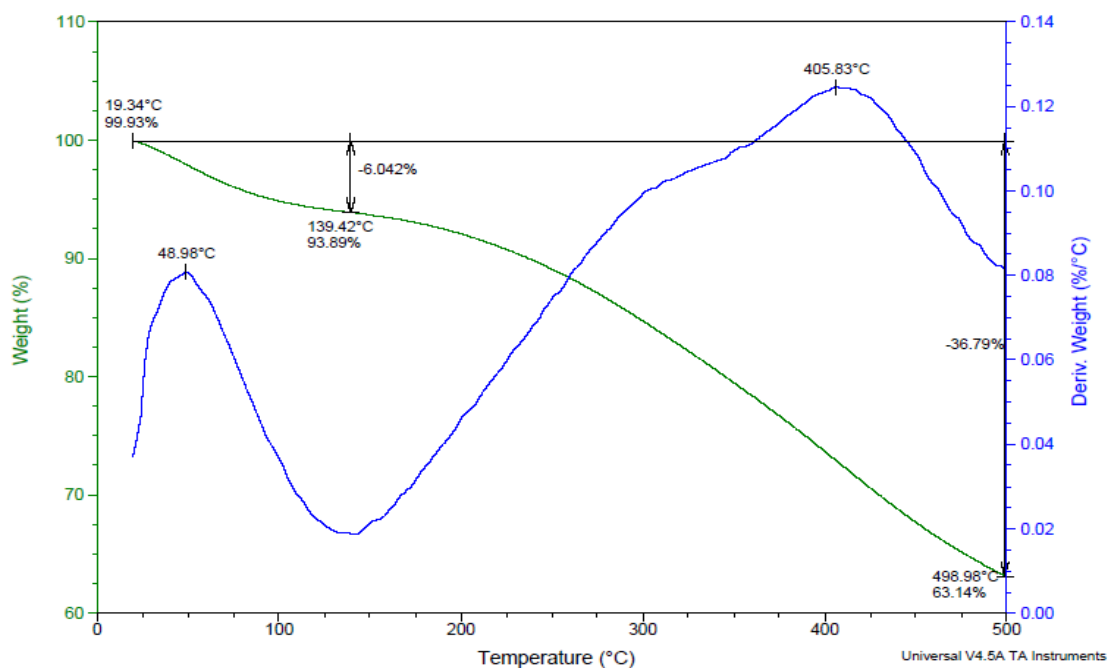
Vlastní měření:

Zvlhčovací komory byly naplněny pomocí injekční stříkačky vodou. Přibližně 10 mg vzorku bylo naváženo na analytických vahách do ampule a byl zasunut do perfuzní cely. Proud dusíku byl přiváděn ke vzorku rychlostí 100 ml/h. Měření probíhalo při laboratorní teplotě (22 °C) při počáteční nastavené relativní vlhkosti 10% po dobu 30 minut, aby došlo ke stabilizaci tepelného toku. Dále byla RH lineárně zvyšována následujících 48 hodin až po hodnotu 95%, a poté se relativní vlhkost udržovala na konstantní hodnotě 95% 2 hodiny a 30 minut. Byl naměřen signál tepelného toku při reakci vlhkosti se vzorkem.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

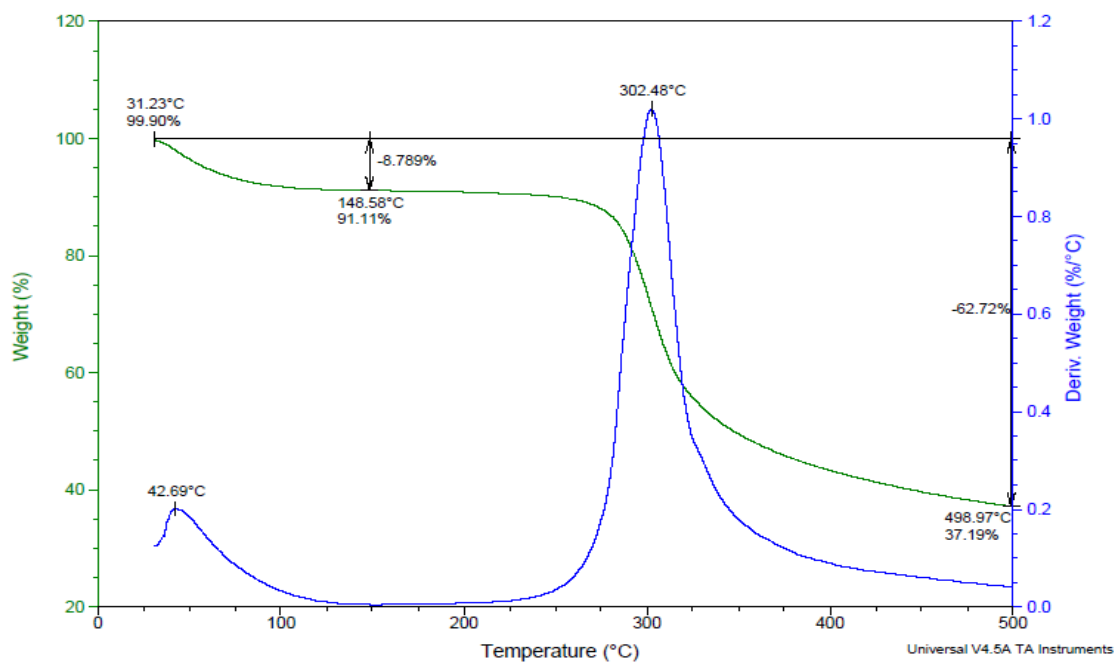
4.1 Termogravimetrická analýza TGA

Na Obr. 9 až Obr. 13 jsou graficky znázorněny průběhy termogravimetrie jednotlivých biopolymerů v atmosféře dusíku od laboratorní teploty po 500 °C.



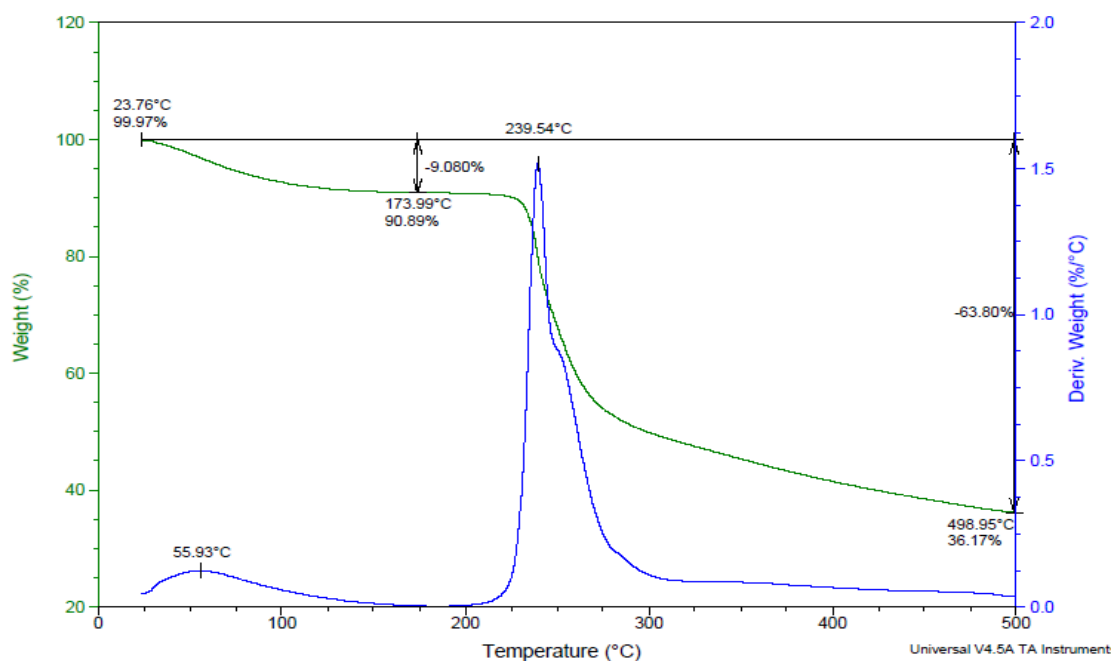
Obr. 9: TGA křivka huminových kyselin

Hodnota 100% znázorňuje původní hmotnost vzorku, která postupným zahříváním klesá. Nejdříve vlivem teploty dochází k vypařování vody, poté je křivka o něco stabilnější a posléze dochází k většímu klesání křivky, které se připisuje degradaci látky. K vypaření vody došlo asi při 139 °C a původní vlhkost vzorku huminových kyselin byla stanovena asi na 6,0%.



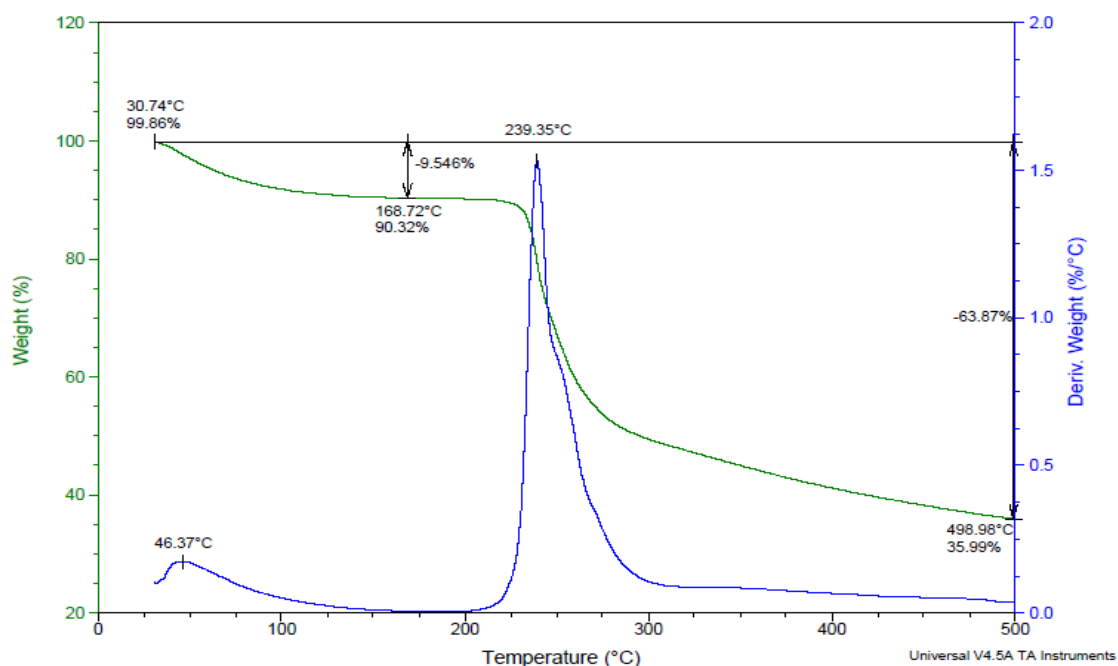
Obr. 10: TGA křivka chitosanu

Ve vzorku chitosanu byla stanovena původní vlhkost na 8,8 %. Všechna voda se z chitosanu odpařila asi při 120 °C, což znázorňuje konstantní hodnota úbytku hmotnosti po celou dobu až do asi 270 °C, kdy začalo docházet k degradaci vzorku.



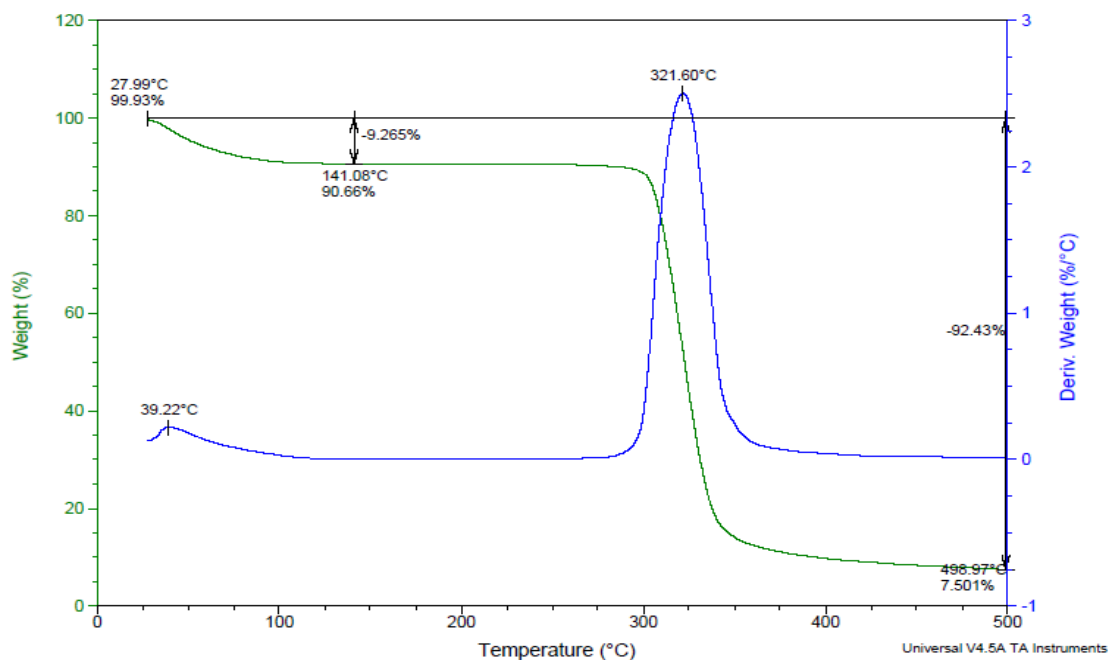
Obr. 11: TGA křivka hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa

V nízkomolekulárním hyaluronanu byla původní vlhkost 9,1%, kdy se voda odpařila asi při 160 °C. K degradaci pak začalo docházet asi při 220 °C.



Obr. 12: TGA křivka hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 400 kDa – 1600 kDa

Křivka vysokomolekulárního hyaluronanu vypadá velice podobně jako hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa. Hyaluronan o molekulové hmotnosti 1400 kDa – 1600 kDa měl původní vlhkost 9,5%. K degradaci začalo docházet při stejné teplotě, tj. při teplotě 220 °C.

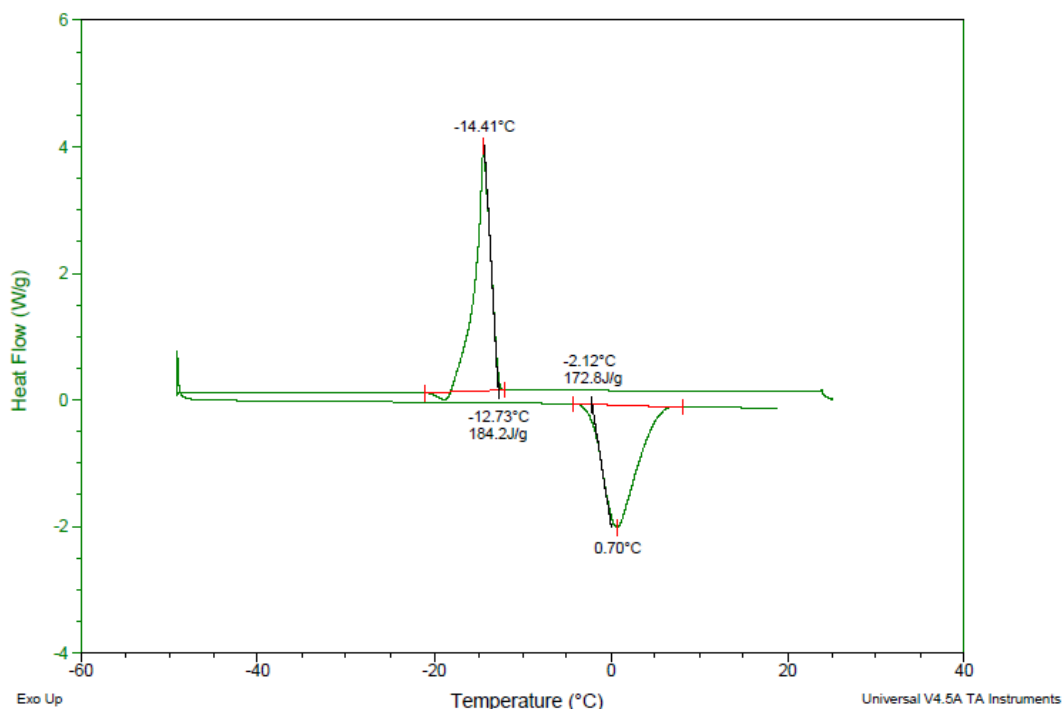


Obr. 13: TGA křivka dextransu

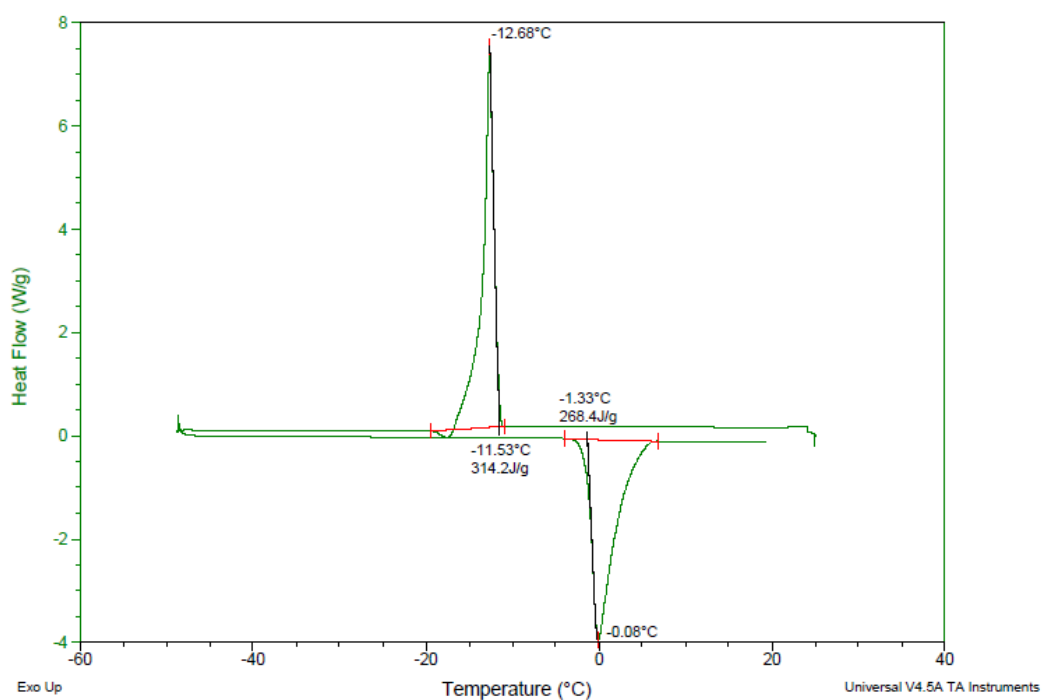
Vlhkost dextransu byla stanovena na 9,3%. K vypaření veškeré vody došlo asi při 110 °C. Průběh degradace dextransu je velice rychlý. Nastává k němu asi při 300 °C a při konečné teplotě 500 °C je hodnota úbytku hmotnosti téměř konstantní, přičemž se jedná o největší úbytek ze všech sledovaných biopolymerů.

4.2 Diferenční kompenzační kalorimetrie DSC

Na Obr. 14 až Obr. 23 jsou graficky znázorněny získané výsledky DSC křivek v rozmezí teplot $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ měřených suspenzí nebo roztoků biopolymerů ihned po jejich smíchání s vodou a po 24 hodinách ponechání ve vodě.



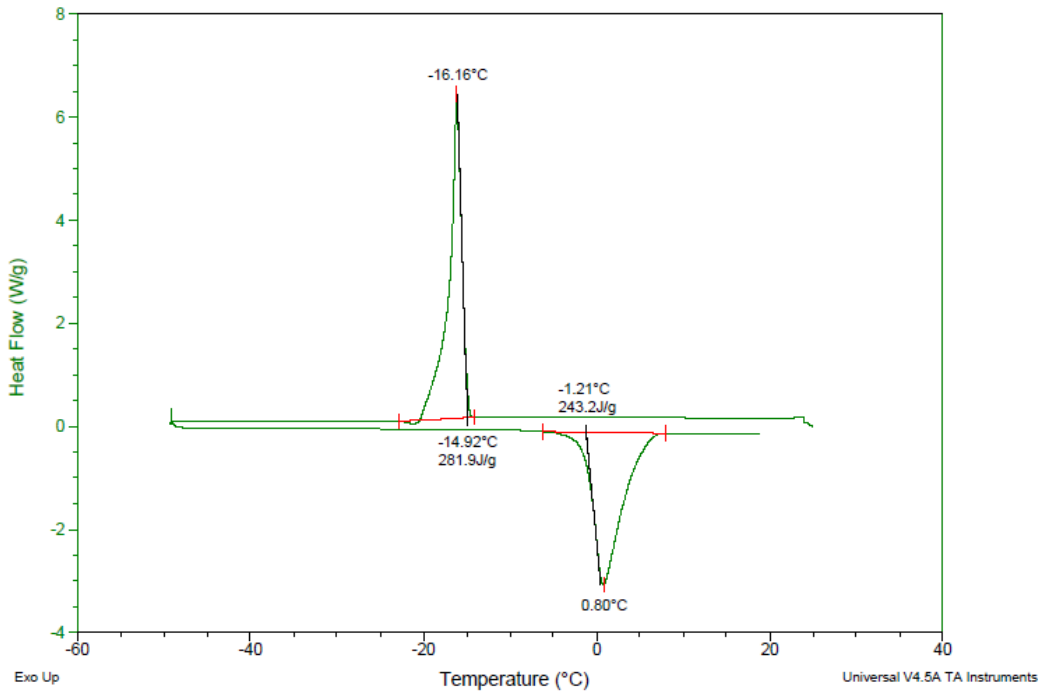
Obr. 14: Křivka DSC HK ihned po smíchání s vodou



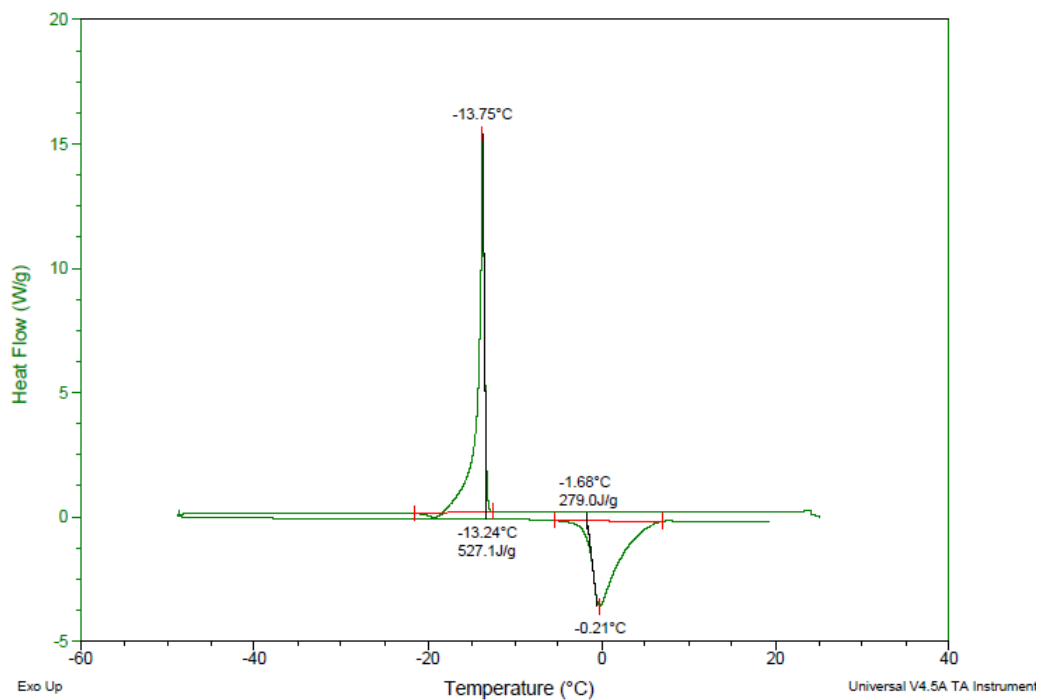
Obr. 15: Křivka DSC HK po 24 hodinách

Všechny DSC záznamy mají dva píky, exotermní směrem nad základní linii a endotermní směrem pod základní linii. Exotermní pík odpovídá tuhnutí, u amorfních částí krystalizaci a endotermní pík se připisuje tání vzorku. Plocha píků je přímo úměrná teplu uvolněnému nebo spotřebovanému při reakci a výška píků je přímo úměrná rychlosti změny teploty reakce. Pro účely této práce se vyhodnocuje pouze pík tání, tedy endotermní pík. Podle teploty onsetu, což je teplota, kdy začíná docházet k tání vzorku, a podle teploty vrcholu endotermního píku (teploty tání), se stanovuje míra hydratace. Čím nižší je teplota, tím vyšší je stupeň hydratace látky, tzn. pokud je do vzorku sorbováno více vody, k tání polymeru dochází při nižší teplotě.

Huminové kyseliny měřené hned po vytvoření suspenze začínaly tát při teplotě $-2,12\text{ }^{\circ}\text{C}$ a minimum píku tání odpovídá teplotě $0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$. U huminových kyselin, které byly ponechány 24 hodin ve vodě je stanovena teplota onsetu na $-1,33\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota tání na $-0,08\text{ }^{\circ}\text{C}$. Protože je hodnota teploty tání po 24 hodinách měření menší, je zřejmé, že došlo k sorpci vody do struktury huminových kyselin.

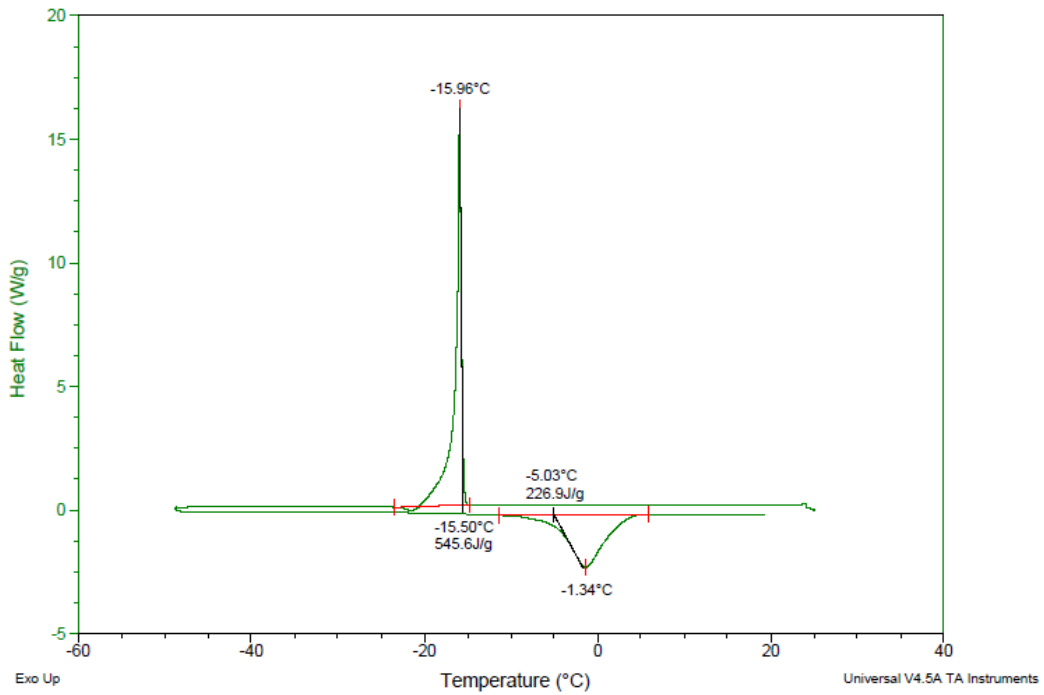


Obr. 16: Křivka DSC chitosanu ihned po smíchání s vodou

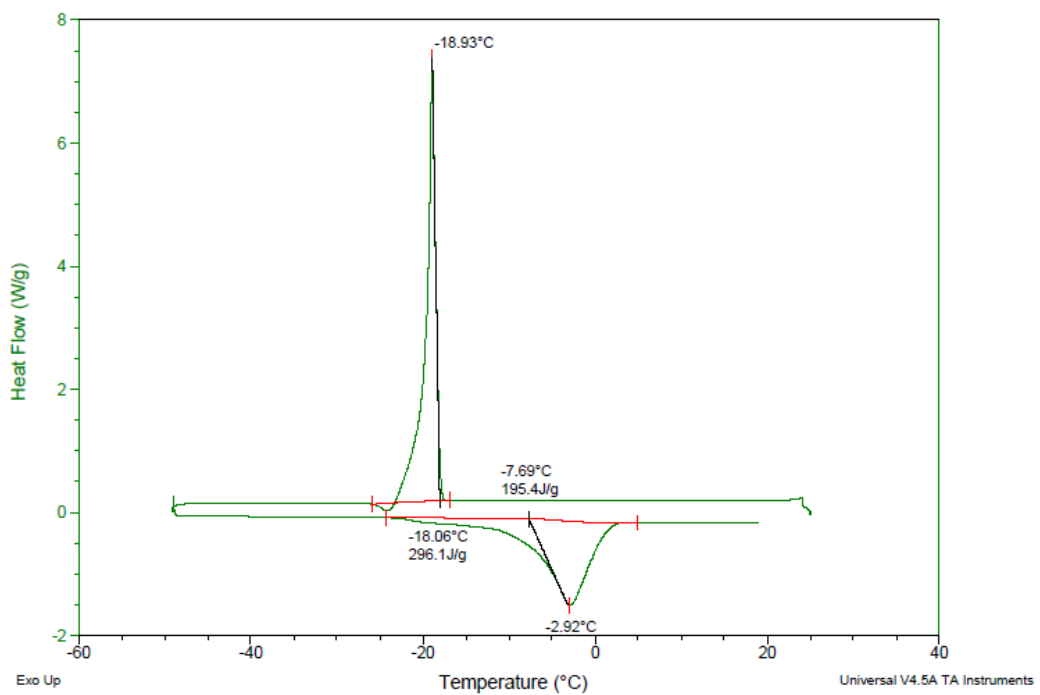


Obr. 17: Křivka DSC chitosanu po 24 hodinách

Začátek teploty tání chitosanu měřeném hned po vytvoření suspenze byl stanoven na $-1,21\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota tání na $0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 24 hodiném působení vlhkosti na chitosan se teplota onsetu změnila na $-1,68\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota tání na $-0,21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obě hodnoty teplot jsou tedy opět nižší.

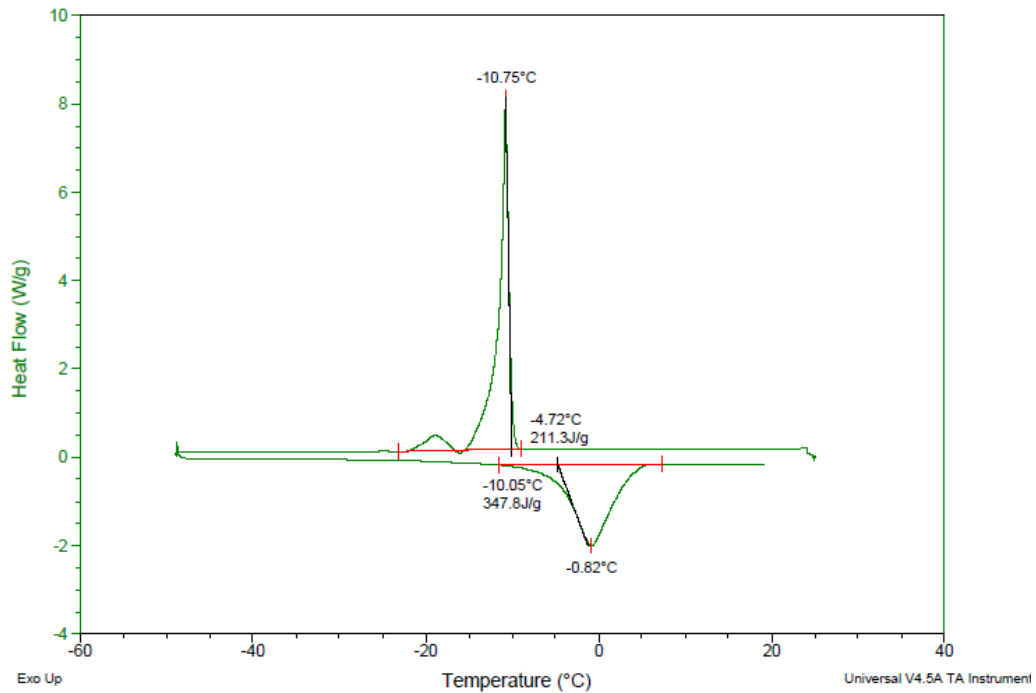


Obr. 18: Křivka DSC hyaluronanu 300 kDa ihned po smíchání s vodou

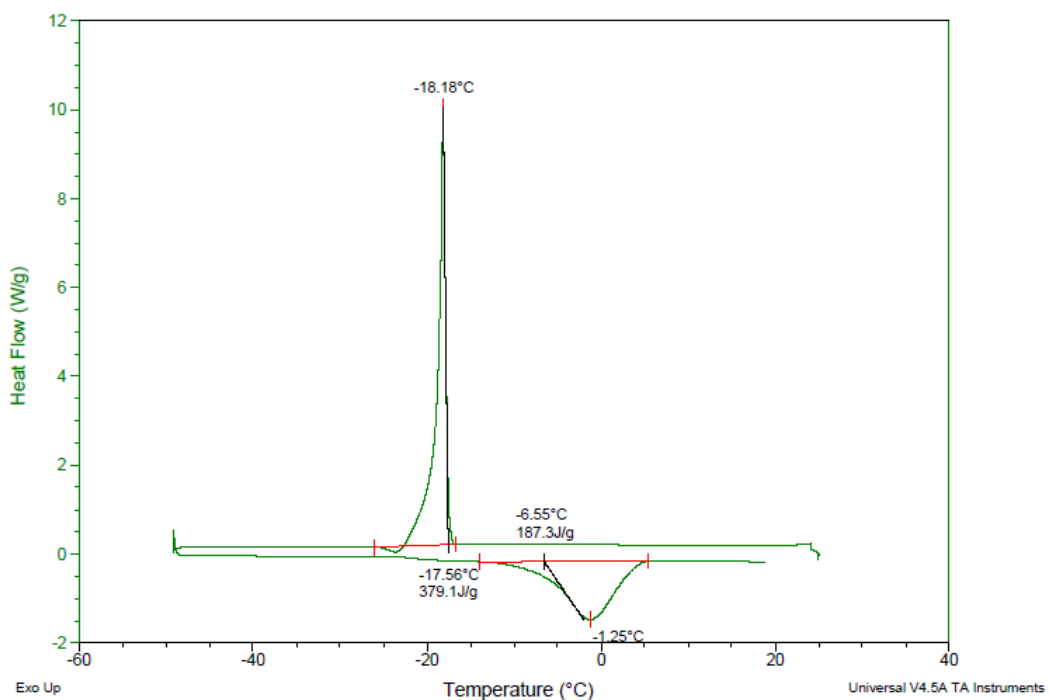


Obr. 19: Křivka DSC hyaluronanu 300 kDa po 24 hodinách

Teplota onsetu hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa odpovídá teplotě $-5,03\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota tání je potom stanovena na $-1,34\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplota onsetu vzorku, na který působila voda, odpovídá teplotě $-7,69\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota tání $-2,92\text{ }^{\circ}\text{C}$.

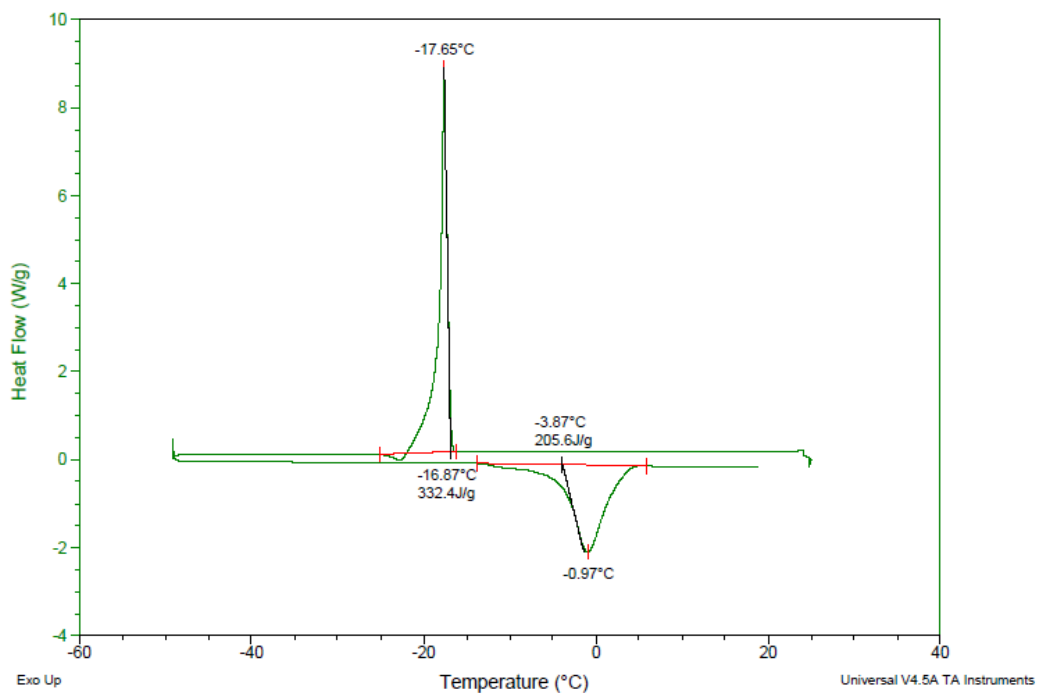


Obr. 20: Křivka DSC hyaluronanu 1400 kDa – 1600 kDa ihned po smíchání s vodou

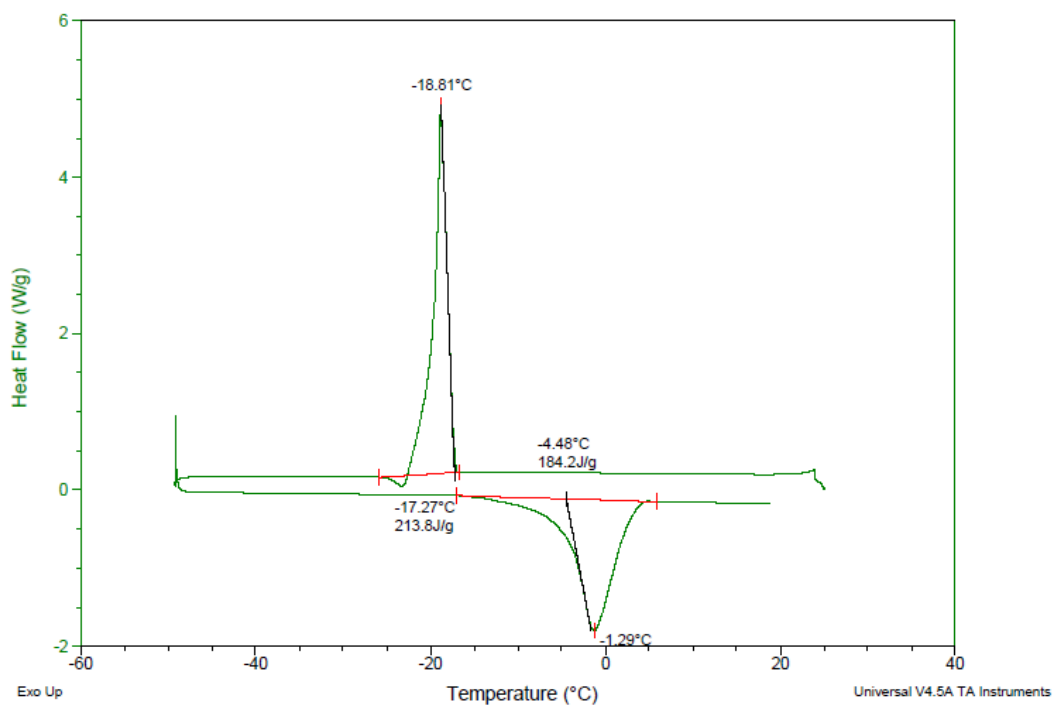


Obr. 21: Křivka DSC hyaluronanu 1400 kDa – 1600 kDa po 24 hodinách

Hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 400 kDa – 1 600 kDa který byl měřen hned po jeho rozpuštění ve vodě měl hodnotu onsetu $-4,72\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotu tání $-0,82\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 24 hodinovém měření roztoku hyaluronanu se hodnota počátku teploty tání změnila na $-6,55\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota tání na $-1,25\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 22: Křivka DSC dextransu ihned po smíchání s vodou



Obr. 23: Křivka DSC dextransu po 24 hodinách

Vzorek dextransu měřený hned po vytvoření roztoku začínal tát při teplotě $-3,87\text{ °C}$ a minimum píku tání odpovídá teplotě $-0,97\text{ °C}$. U dextransu, který byl měřen po 24 hodinách ve vodě je stanovena teplota onsetu na $-4,48\text{ °C}$ a teplota tání na $-1,29\text{ °C}$.

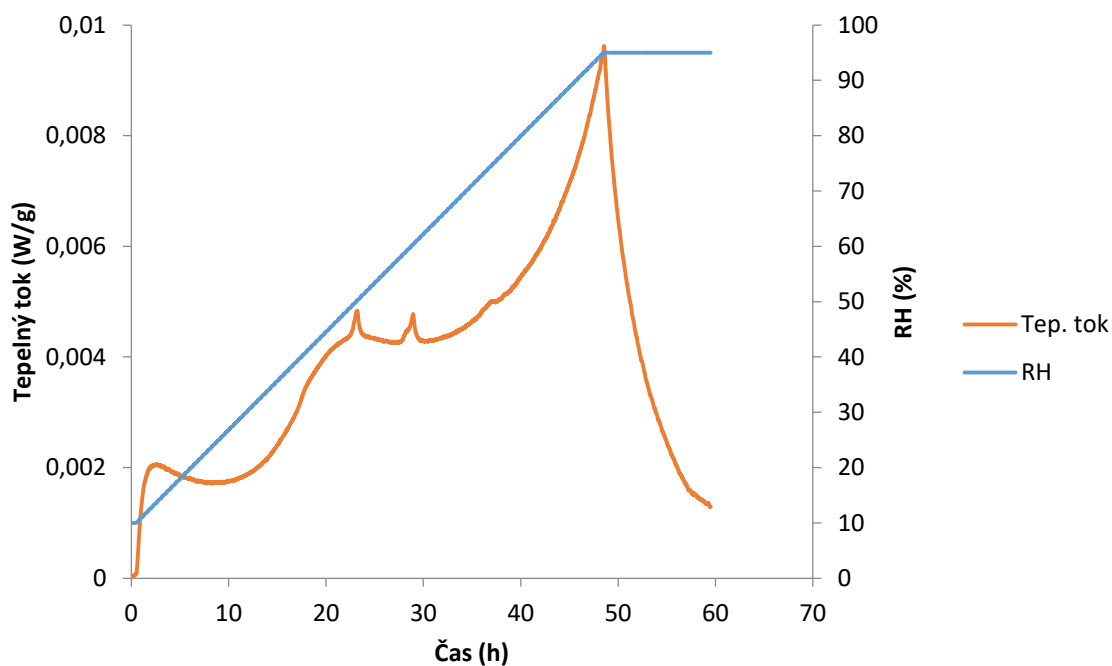
V Tab. 3 jsou uvedena tepla reakce odpovídající tání vzorku, která odpovídají ploše jednotlivých píků, které byly získány jejich integrací. Dále jsou zde uvedeny teploty počátku tání vzorků – onset a teploty tání. Protože jsou hodnoty počátku tání a teploty tání po 24 hodinách měření menší, potvrzuje se, že u všech biopolymerů po 24 hodinovém působení vody došlo k sorpci vody do jejich struktur. Zároveň můžeme pozorovat, že tepla tání HK a chitosanu, které s vodou tvoří suspenze, mají po 24 hodinách působení vody vyšší hodnoty. V případě dextransu a hyaluronanu, které se ve vodě dobře rozpouští, tzn. netvoří suspenze jako HK a chitosan, byla po 24 hodinách stanovena menší tepla tání.

Tab. 3: Tepla endotermních píků, teploty počátku tání (T_{onset}) a teploty tání (T_t)

Biopolymer	Ihned po smíchání s vodou			Po 24 hodinách		
	Teplo tání (J/g)	T_{onset} (°C)	T_t (°C)	Teplo tání (J/g)	T_{onset} (°C)	T_t (°C)
HK	172,8	-2,12	0,70	268,4	-1,33	-0,08
Chitosan	243,2	-1,21	0,80	279,0	-1,68	-0,21
HYA 300 kDa	226,9	-5,03	-1,34	195,4	-7,69	-2,92
HYA 1400-1600kDa	211,3	-4,72	-0,82	187,3	-6,55	-1,25
Dextran	205,6	-3,87	-0,97	184,2	-4,48	-1,29

4.3 Perfuzní kalorimetrie

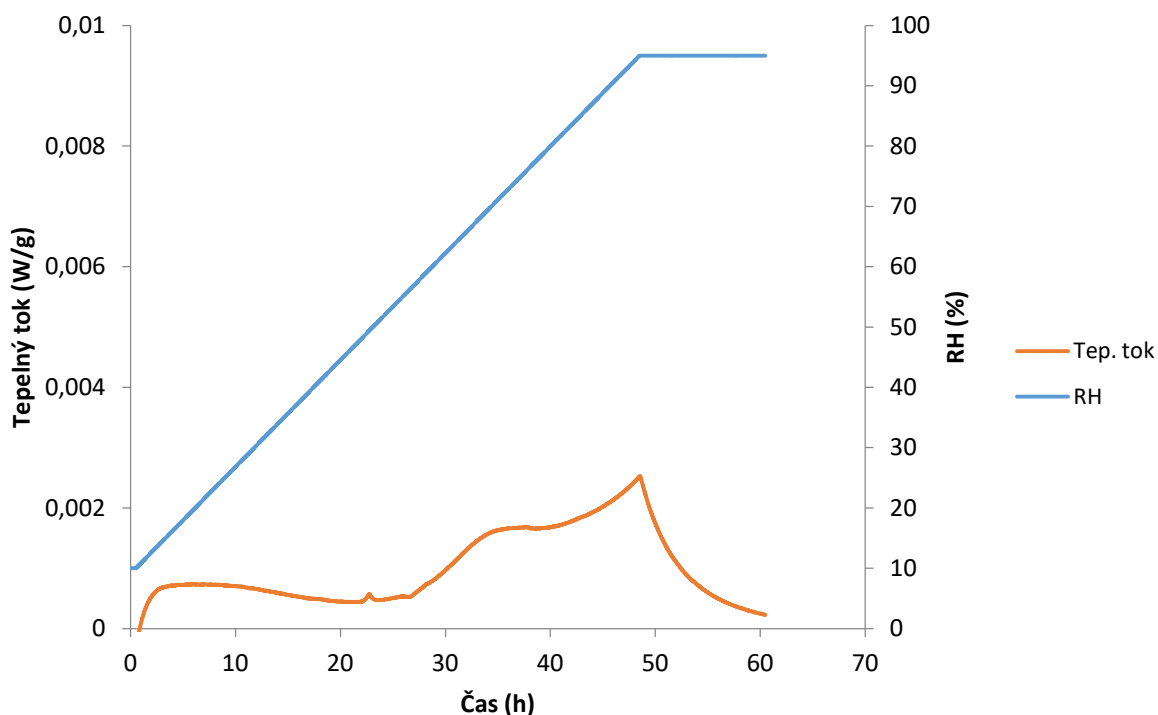
Na Obr. 24 až Obr. 28 jsou znázorněny získané křivky perfuzní kalorimetrie jednotlivých biopolymerů při lineárním zvyšování relativní vlhkosti od 10% do 95% po dobu 48 hodin při laboratorní teplotě.



Obr. 24: Křivka tepelného toku HK

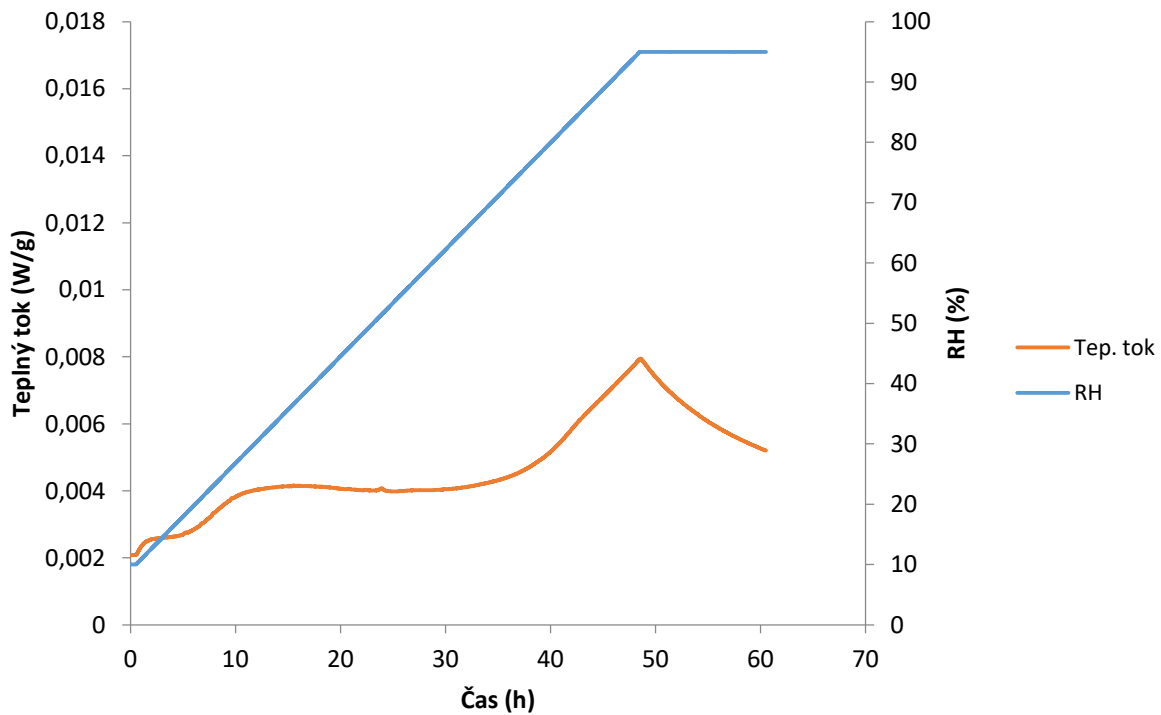
Všechny studované vzorky biopolymerů vykazují stejný trend chování při interakci s přiváděným vlhčeným plynem. V závislosti na typu vzorku (podle toho, jaké obsahuje funkční skupiny, podle jeho molekulové hmotnosti atd.) pozorujeme několik dílčích píků, kdy dochází k postupné sorpci vlhkosti daným materiálem. Jak bylo již publikováno např. v práci [50], která se zabývá aplikacemi perfuzní mikrokolorimetrie a konkrétně je zde popsáno zkoumání rekrystalizace mikronizovaných léčiv, křivka tepelného toku se zde dá rozdělit do tří částí, kdy první odpovídá adsorpci nebo absorpci vlhkosti, následuje oblast krystalizace amorfních oblastí a poslední část křivky zde odpovídá vypařování přebytku vlhkosti následované strukturním kolapsem.

Absorpce vlhkosti do materiálu, se tedy projeví růstem křivky. Následné snížení signálu je připisované současně absorpci a odpařování. Další pík především u amorfních materiálů odpovídá krystalizaci. Po ustálení relativní vlhkosti na hodnotě 95% dochází k rychlému snížení křivky tepelného toku. Závěrečná fáze experimentu, tedy přivádění konstantní vlhkosti 95% by měla být pro další experimenty nastavena ještě na delší čas, protože se předpokládá ustálení signálu opět v blízkosti základní linie. V této části křivky by se pak mohl objevit ještě pík zpětného vypařování přebytku vlhkosti ze vzorku.

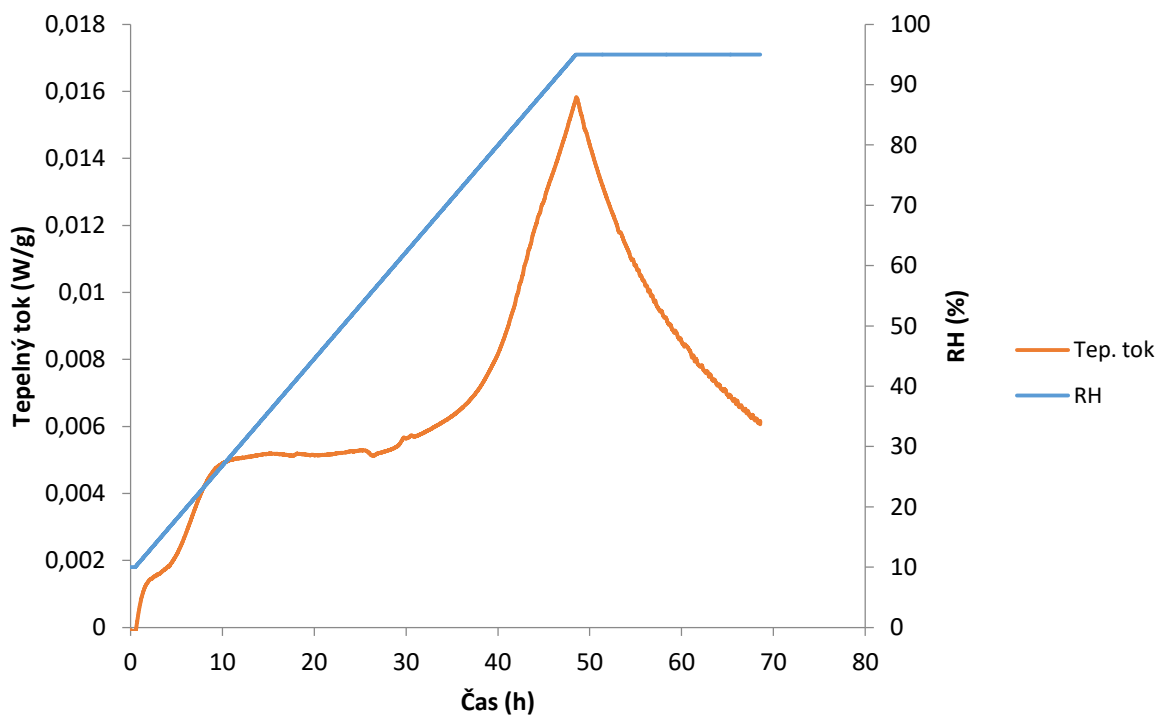


Obr. 25: Křivka tepelného toku chitosanu

Maximum tepelného toku vzorku chitosanu dosahuje hodnoty asi 0,0025 W/g, což je nejméně ze všech studovaných biopolymerů, došlo tedy k nejmenší sorpci vlhkosti.

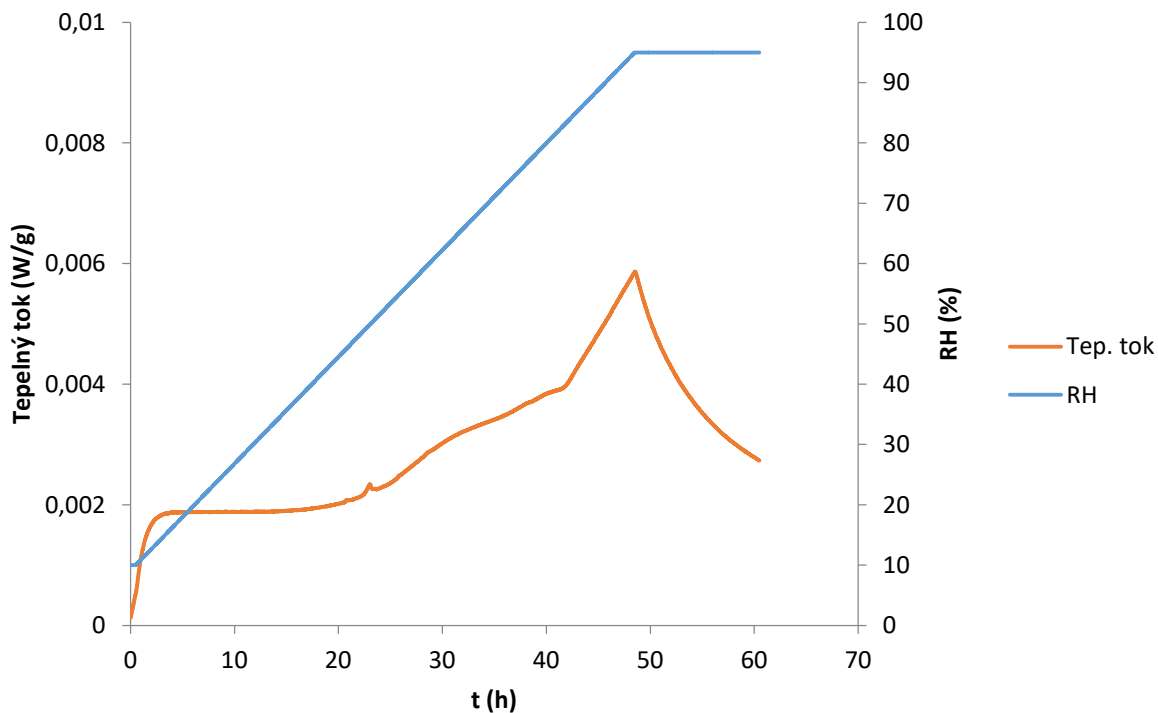


Obr. 26: Křivka tepelného toku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa



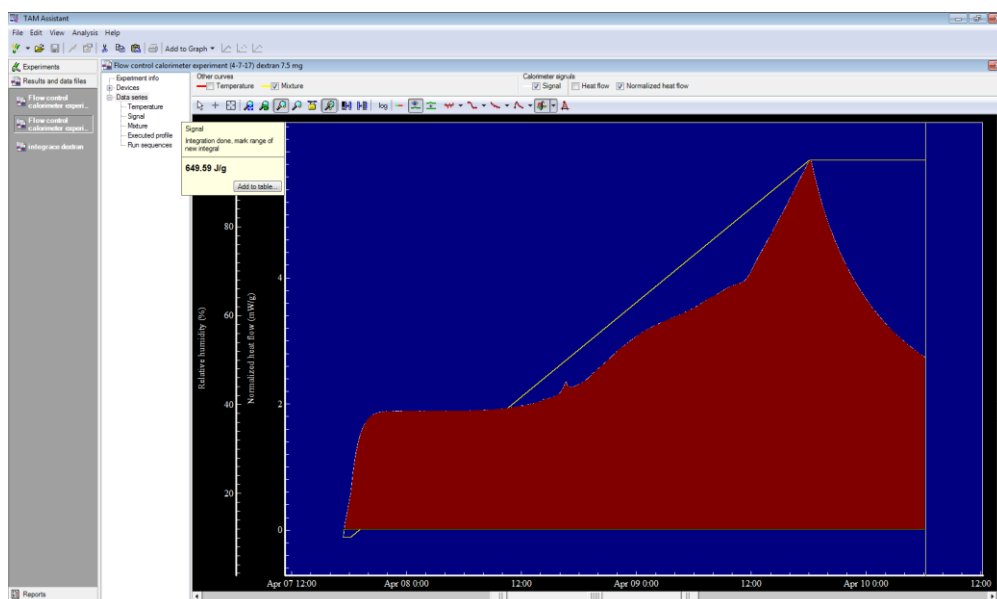
Obr. 27: Křivka tepelného toku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1400 kDa – 1600 kDa

Křivka tepelného toku nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu vypadá velice podobně. Tepelný tok vysokomolekulárního hyaluronanu má ale větší intenzitu signálu, maximum křivky dosahuje asi 2 krát vyšší hodnoty. Z toho vyplývá, že obsah vody, který je schopná hyaluronová kyselina navázat, závisí na její molekulové hmotnosti, čím větší je molekulová hmotnost, tím více vlhkosti je schopné se do hyaluronanu absorbovat. Dále nedochází ke snížení signálu jako u huminových kyselin a chitosanu, který se připisuje současné absorpci a odpařování.



Obr. 28: Křivka tepelného toku dextranu

Křivka tepelného toku dextranu je velice podobná křivce hyaluronanu, také není viditelné žádné snižování signálu, které by značilo odpařování vlhkosti.



Obr. 29: Integrace plochy

Tab. 4 ukazuje tepla dílčích píků křivek a dále také celkové teplo reakce. Celkové teplo bylo získáno jako integrace plochy, která byla zespoda ohraničená základní linií (baseline), což je znázorněno na Obr. 29. Ze získaných tepel vidíme, že k největšímu uvolnění tepla došlo při reakci vody s vysokomolekulárním hyaluronanem, nejméně pak s chitosanem.

Tab. 4: Tepla perfuzní kalorimetrie

	Tepla dílčích píků (J/g)	Celkové uvolněné teplo (J/g)
HK	295,4	839,2
Chitosan	156,2	215,3
HYA 300 kDa	196,0	572,8
HYA 1400 - 1600 kDa	630,5	1576,9
Dextran	235,5	649,5

5 ZÁVĚR

V experimentální části byly nejdříve stanoveny původní vlhkosti vzorků biopolymerů metodou TGA. Původní vlhkosti všech vzorků se pohybovaly v rozmezí 6% – 9,5%.

Biopolymery smíchané s vodou byly podrobeny měření tepelného toku pomocí metody DSC. Integrací endotermních píků křivky byla získána tepla reakcí. Bylo pozorováno, že přítomnost vody značně ovlivňuje rychlosti fázových přeměn vzorků a množství spotřebovaného tepla vzorkem. Po 24 hodinovém působení vody na vzorek došlo u huminových kyselin a u chitosanu k většímu množství absorbování tepla, které bylo potřebné k tání, než při měření hned po vytvoření suspenze. Vzorky hyaluronanu a dextransu naopak vykazují po 24 hodinovém působení vody na jejich strukturu nižší hodnoty tepel. Narozdíl od HK a chitosanu totiž HYA a dextran netvoří s vodou suspenze, ale rozpouští se v ní. Z toho vyplývá, že u ve vodě nerozpustných látek dochází ke zvyšování tepel potřebných k tání vzorku a u rozpustných látek ve vodě dochází k jejich snižování. Sorbovaná voda má za následek snížení teplot, kdy začíná docházet k tání vzorků a také snížení samotné hodnoty tání. U všech vzorků biopolymerů byla takle skutečnost potvrzena, po 24 hodinách měření byla tepla nižší, takže došlo k větší sorpci vlhkosti. K největší změně těchto teplot došlo u vzorku HYA s nižší molekulovou hmotností, k nejmenší změně u vzorku dextransu.

Dalším prováděným měřením bylo měření tepelného toku pomocí mikrokolorimetrické metody perfuzní kalorimetrie, kdy byla ke vzorku přiváděna kontrolovaná vlhkost od 10% do 95%. Všechny vzorky biopolymerů začaly reagovat s přiváděnou vlhkostí, což se projevilo jako postupné uvolňování tepla. Množství tepla bylo opět získáno integrací plochy. K největšímu uvolnění tepla došlo u vzorku hyaluronanu s vyšší molekulovou hmotností, následovaly HK, poté dextran, hyaluronan o nižší molekulové hmotnosti a nejméně tepla se při reakci s vlhkostí uvolnilo ze vzorku chitosanu.

Perfuzní kalorimetrie se jeví jako dobrá metoda při zkoumání hydratace biopolymerů. Pro další experimenty by byla vhodná optimalizace metody, kdy by byl nastaven delší čas přiváděné vlhkosti, protože se předpokládá zvýšení maxima píku odpovídajícímu krystalizaci vzorku a dále také ustálení křivky v oblasti základní linie. Dále by bylo možné pozorovat změny i při nastavení počáteční relativní vlhkosti na hodnotu 0% až do hodnoty RH 100%.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] STEINBÜCHEL, A a S MATSUMURA. *Biopolymers: Miscellaneous biopolymers and biodegradation of polymers*. Volume 9. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, 598 s. ISBN 352730228X.
- [2] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 278 s. : il. ; 28 cm. ISBN 8070806176.
- [3] SEEBERGER, Peter H a Thomas CARELL. Biopolymers. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. Elsevier Ltd, 2003, **7**(6), 715-716. ISSN 13675931.
- [4] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Josef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, **99**(10), 711-717.
- [5] POSPÍŠILOVÁ, Lubica, Markéta KOMÍNKOVÁ, Ondřej ZÍTKA et al. Fate of humic acids isolated from natural humic substances. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*. Taylor, 2015, **65**(6), 517-528. DOI: 10.1080/09064710.2015.1030442. ISSN 09064710.
- [6] CIHLÁŘ, Zdeněk. *Retence vody v huminových kyselinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2009. Vedoucí práce Ing. JIŘÍ KUČERÍK, Ph.D.
- [7] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. 2010, **104**(11), 1015-1022.
- [8] STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. Second edition. New York: John Wiley & Sons, 1994. ISBN 9780471594741.
- [9] ONDRUCH, Pavel. *Příprava směsných koloidů huminových kyselin s biopolymery*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2009. Vedoucí práce Prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [10] JAYAKUMAR, R., Deepthy MENON, K. MANZOOR, S.V. NAIR a H. TAMURA. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2010, **82**(2), 227-232. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.074. ISSN 01448617.
- [11] JARÁBKOVÁ, Sabína. *Hydrogely na bázi kladně nabitých polyelektrolytů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2016, 91 stran : ilustrace. Vedoucí práce Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

- [12] RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. Elsevier Ltd, 2006, **31**(7), 603-632. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001. ISSN 00796700.
- [13] GAMALA, Rawia F., Tarek S. EL-TAYEBA, E.I. RAFFATB, H.M.M. IBRAHIMB a A.S. BASHANDY. Optimization of chitin yield from shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* and impact of gamma irradiation on production of low molecular weight chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, **91**(10), 598-608.
- [14] BOARIN-ALCALDE, Ligia a Gustavo GRACIANO-FONSECA. Alkali process for chitin extraction and chitosan production from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales. *Latin American Journal of Aquatic Research*. Valparaiso: Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso, 2016, **44**(4), 683-688. DOI: 10.3856/vol44-issue4-fulltext-3. ISSN 0718560X.
- [15] MURRAY, Christopher A a John R DUTCHER. Effect of changes in relative humidity and temperature on ultrathin chitosan films. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(12), 3460. ISSN 15257797.
- [16] KOLESA, Pavel. *Studium interakcí barviv s biopolymerem chitosanem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2016, 78 listů : ilustrace. Vedoucí práce Prof. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ, Ph.D.
- [17] HADRAMI, Abdelbasset, Lorne ADAM, Ismail HADRAMI a Fouad DAAYF. Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*. Basel: MDPI AG, 2010, **8**(4), 968-987. DOI: 10.3390/md8040968
- [18] SHIELDS, M., E. SMOCK, J. MCQUEEN a J. BRYANT. Chitosan for weight loss and cholesterol management. *American Journal of Health-System Pharmacy*. Copyright © 2003 American Society of Health-System Pharmacists, Inc. All rights reserved, 2003, **60**(13), 131013121315-1316. ISSN 10792082.
- [19] OELSCHLAEGER, C, F BOSSLER a N WILLENBACHER. Synthesis, Structural and Micromechanical Properties of 3D Hyaluronic Acid-Based Cryogel Scaffolds. *Biomacromolecules*. 2016, **17**(2), 580. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01529.
- [20] STRÖM, Anna, Anette LARSSON a Oguz OKAY. Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, **132**(29). DOI: 10.1002/app.42194. ISSN 00218995.
- [21] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTĚS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2007, **29**(1), 17-25.

- [22] FLIMEL, Karol. Známý neznámý hyaluronan. In: *ChemPoint* [online]. Brno, 2011. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/znamy-neznamy-hyaluronan>
- [23] DICKER, Kevin T., Lisa A. GURSKI, Swati PRADHAN-BHATT, Robert L. WITT, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd, 2014, **10**(4), 1558-1570. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.12.019. ISSN 17427061.
- [24] RAH, Marjorie J. A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry - Journal of the American Optometric Association*. Elsevier Inc, 2011, **82**(1), 38-43. DOI: 10.1016/j.optm.2010.08.003. ISSN 15291839.
- [25] EL KECHAI, Naila, Amélie BOCHOT, Nicolas HUANG, Yann NGUYEN, Evelyne FERRARY a Florence AGNELY. Effect of liposomes on rheological and syringeability properties of hyaluronic acid hydrogels intended for local injection of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V, 2015, **487**(1-2), 187-196. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.019. ISSN 03785173.
- [26] Dextran structure. In: *Pharmacosmos* [online]. b.r. [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.dextran.net/about-dextran/dextran-chemistry/dextran-structure.aspx>
- [27] *Physical Properties of Dextran* [online]. b.r. [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: <http://www.dextran.net/about-dextran/dextran-chemistry/physical-properties.aspx>
- [28] COVIS, Rudy, Catherine LADAVIERE, Jacques DESBRIERES, Emmanuelle MARIE a Alain DURAND. Synthesis of water-soluble and water-insoluble amphiphilic derivatives of dextran in organic medium. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2013, **95**(1), 360-365. ISSN 01448617.
- [29] Dextran application area. In: *Pharmacosmos* [online]. b.r. [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.dextran.net/application-areas.aspx>
- [30] WASIAK, Iga, Aleksandra KULIKOWSKA, Magdalena JANCZEWSKA et al. Dextran Nanoparticle Synthesis and Properties. *PLoS One*. San Francisco: Public Library of Science, 2016, **11**(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0146237.
- [31] BURSÁKOVÁ, Petra. *Hydration of Humic Substances = hydratace huminových látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 98 l. : il.
- [32] DE VITO, Francesca, Boris VEYTSMAN, Paul PAINTER a Jozef L. KOKINI. Simulation of the effect of hydrogen bonds on water activity of glucose and dextran

- using the Veytsman model. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 2015, **117**, 236-246. ISSN 01448617.
- [33] HATAKEYAMA, Hyoe a Tatsuko HATAKEYAMA. Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochimica Acta*. Elsevier B.V, 1998, **308**(1), 3-22. ISSN 00406031.
- [34] PING, Z.H, Q.T NGUYEN, S.M CHEN, J.Q ZHOU a Y.D DING. States of water in different hydrophilic polymers — DSC and FTIR studies. *Polymer*. Elsevier Ltd, 2001, **42**(20), 8461-8467. ISSN 00323861.
- [35] HUNGER, Johannes, Anja BERNECKER, Huib j. BAKKER, Mischa BONN a Ralf p. RICHTER. Hydration Dynamics of Hyaluronan and Dextran. *Biophysical Journal*. Elsevier Inc, 2012, **103**(1), 10-12. ISSN 00063495.
- [36] GREBÍKOVÁ, Lucie. *Hydration and structure of humic acids studied by thermal analysis: Hydratace a struktura huminových kyselin studovaná metodami termické analýzy*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 80 l. : il. Vedoucí práce Doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
- [37] MANO, JF. Viscoelastic properties of chitosan with different hydration degrees as studied by dynamic mechanical analysis. *MACROMOLECULAR BIOSCIENCE*. 2008, **8**(1), 69-76. DOI: 10.1002/mabi.200700139
- [38] HATAKEYAMA, Hyoe a Tatsuko HATAKEYAMA. Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochimica Acta*. Elsevier B.V, 1998, **308**(1), 3-22. ISSN 00406031.
- [39] TIMMERMANN, Inga-Lis, Hartwig STECKEL a Michael TRUNK. Assessing the re-crystallization behaviour of amorphous lactose using the RH-perfusion cell. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V, 2006, **64**(1), 107-114. ISSN 09396411.
- [40] JAKOBSEN, D.F, S FROKJAER, C LARSEN, H NIEMANN a A BUUR. Application of isothermal microcalorimetry in preformulation. I. Hygroscopicity of drug substances. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V, 1997, **156**(1), 67-77. ISSN 03785173.
- [41] KUČERÍK, J., H. ČECHLOVSKÁ, P. BURSÁKOVÁ a M. PEKAŘ. Lignite humic acids aggregates studied by high resolution ultrasonic spectroscopy: Thermodynamic stability and molecular feature. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2009, **96**(2), 637-643. ISSN 13886150.

- [42] CRISTINA O. CORREIA, SOFIA G. CARIDADE a JOÃO F. MANO. Chitosan Membranes Exhibiting Shape Memory Capability by the Action of Controlled Hydration. *Polymers*. 2014, **6**(4), 1178-1186. DOI: 10.3390/polym6041178.
- [43] MARÉCHAL, Y., M. MILAS a M. RINAUDO. Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. III. Structure and mechanism of hydration. *Biopolymers*. New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2003, **72**(3), 162-173. ISSN 00063525.
- [44] PRŮŠOVÁ, Alena, Pellegrino CONTE, Jiří KUČERÍK a Giuseppe ALONZO. Dynamics of hyaluronan aqueous solutions as assessed by fast field cycling NMR relaxometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, **397**(7), 3023-3028. ISSN 16182642.
- [45] FRAZIER, R.A., M.C. DAVIES, G. MATTHIJS, C.J. ROBERTS, E. SCHACHT, S.J.B. TENDLER a P.M. WILLIAMS. High-resolution atomic force microscopy of dextran monolayer hydration. *Langmuir*. 1997, **13**(18), 4795-4798. ISSN 07437463.
- [46] FUMIO KAWAIZUMI, NORIYUKI NISHIO HIROYASU NOMURA a YUTAKA MIYAHARA. Calorimetric and Compressibility Study of Aqueous Solutions of Dextran with Special Reference to Hydration and Structural Change of Water. *Polymer Journal* [online]. Nature Publishing Group, 1981, **13**(3), 209. ISSN 00323896.
- [47] KUČERÍK, Jiří. Termická analýza – termogravimetrie (TGA). In: *Chempoint* [online]. Brno, 2011 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-1>
- [48] KUČERÍK, Jiří. Termická analýza – Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC). In: *Chempoint* [online]. Brno, 2011 [cit. 2016-12-25]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-2>
- [49] Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). *Katedra fyziky materiálů MFF UK* [online]. Praha, 2009 [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <https://material.karlov.mff.cuni.cz/cs/pristroje/dsc>
- [50] PHIPPS, Mark A. a Lesley A. MACKIN. Application of isothermal microcalorimetry in solid state drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. Elsevier B.V, 2000, **3**(1), 9-17. ISSN 14615347.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DSC – diferenciální kompenzační kalorimetrie

TGA – termogravimetrická analýza

RH – relativní vlhkost

HK – huminové kyseliny

HA – hyaluronová kyselina

HYA – hyaluronan

ECM – mezibuněčná hmota