



# 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

# BIOSURFAKTANTY A JEJICH VYUŽITÍ PRO INKORPORACI HYDROFOBNÍCH DOMÉN DO MODERNÍCH NOSIČOVÝCH SYSTÉMŮ

UTILIZATION OF BIOSURFACTANTS FOR INCORPORATION OF HYDROPHOBIC DOMAINS INTO  
MODERN CONTROLLED-RELEASE SYSTEMS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Nešpor

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1511/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Bc. Tomáš Nešpor**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Biosurfaktanty a jejich využití pro inkorporaci hydrofobních domén do moderních nosičových systémů

### Zadání diplomové práce:

- 1) Zpracovat aktuální literární rešerši na téma moderních aplikací biosurfaktantů.
- 2) Na základě literární rešerše navrhnout kompozici materiálů obsahujících biosurfaktanty jako funkční komponentu ovlivňující jejich transportní vlastnosti.
- 3) Realizovat sérii experimentů pro ověření možnosti funkční inkorporace biosurfaktantových domén v navržené kompozici.
- 4) Na základě získaných experimentálních dat diskutovat potenciál využití biosurfaktantů v nosičových systémech.

### Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

-----  
Bc. Tomáš Nešpor  
student(ka)

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá aktuálním tématem nosičových systémů. Jelikož největším problémem je vstup hydrofobních léčivých látek krevním řečištěm, případně přes univerzální tělní bariéry (např. hematoencefalická) je nutné tyto nosiče chemicky modifikovat, aby bylo možné hydrofobní látky efektivně podávat. V práci je na základě literární rešerše navrženo a následně studováno hned několik systémů, u kterých je předpoklad možného použití pro nosičové systémy a zároveň v sobě mají zakomponované biosurfaktanty z důvodu jejich schopnosti solubilizovat hydrofobní molekuly. V teoretické části této práce budou popsány jednotlivé biosurfaktanty, postup jejich produkce, jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a možnost jejich využití v nosičových systémech. Zároveň jsou popsány jednotlivé nosičové systémy, postup jejich přípravy, možnosti jejich využití a jsou také srovnány jejich přednosti a nevýhody. V praktické části je poté proveden screening jak jednotlivých látek a jejich vzájemných interakcí, tak metod využitelných ke studiu vznikajících struktur. Studium molekulárních interakcí je primárně prováděno pomocí techniky dynamického rozptylu světla. V další části je popsána optimalizace tvorby hydrogelů se zakomponovanými biosurfaktanty v jejich struktuře a následně jsou vytvořené gely podrobeny reologickým a solubilizačním testům. Studium vnitřní struktury těchto gelů je provedeno pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.

## **Klíčová slova**

Biosurfaktant, Rhamnolipid, Sophorolipid, Nosičový systém, DEAE Dextran, Chitosan, Kritická micelární koncentrace, Hydrogel, Solubilizace, Dynamický rozptyl světla, Reologie, Skenovací elektronová mikroskopie

## **Abstract**

This work deals with the current topic of carrier systems. Since the biggest problem is the passage of hydrophobic drugs through the bloodstream, or through universal body barriers (eg blood-brain), it is necessary to chemically modify these carriers in order to be able to administer hydrophobic substances effectively. Based on a literature search, several systems are designed and subsequently studied, in which there is a presumption of possible use for carrier systems and at the same time they have biosurfactants incorporated in them due to their ability to solubilize hydrophobic molecules. The theoretical part of this work will describe the individual biosurfactants, the process of their production, their physicochemical properties, and the possibility of their use in carrier systems. At the same time, the individual carrier systems, the procedure of their preparation, the possibilities of their use are described, and their advantages and disadvantages are also compared. In the practical part, the screening of both individual substances and their mutual interactions, as well as methods used to study the emerging structures is then performed. The study of molecular interactions is primarily performed using the technique of dynamic light scattering. The next part describes the optimization of hydrogel formation with incorporated biosurfactants in their structure and then the formed gels are subjected to rheological and solubilization tests. The study of the internal structure of these gels is performed using a scanning electron microscope.

## **Keywords**

Biosurfactant, Rhamnolipid, Sophorolipid, Carrier system, DEAE Dextran, Chitosan, Critical micelle concentration, Hydrogel, Solubilization, Dynamic light scattering, Rheology, Scanning electron microscopy

NEŠPOR, Tomáš. *Biosurfaktanty a jejich využití pro inkorporaci hydrofobních domén do moderních nosičových systémů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131145>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Bc. Tomáš Nešpor

## **Poděkování:**

*Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu práce Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a především čas, který mi věnoval. Dále bych rád poděkoval Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D. za jeho pomoc při reologických měřeních, Ing. Adamu Juglovi Ph.D. za jeho pomoc při měření na vysokorozlišovacím ultrazvuku, Ing. Michalu Kalinovi Ph.D. za jeho rady při měření pomocí dynamického rozptylu světla a Ing. Monice Trudičové za pomoc při elektronové mikroskopii. Nakonec také všem přátelům a rodině, kteří do mých experimentů vnášeli nový nadhled a podporovali mě po celou dobu studia.*

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
2.1	Biosurfaktanty	9
2.1.1	Dělení biosurfaktantů z hlediska chemické struktury	9
2.1.2	Produkce a zisk biosurfaktantů	12
2.1.3	Micely	13
2.1.4	Kritická micelární koncentrace	14
2.1.5	Další využití micelárních systémů	14
2.2	Nanotechnologické nosičové systémy	14
2.2.1	Nanočásticové nosičové systémy	15
2.2.2	Lipozomy	15
2.2.3	Dendrimery	16
2.2.4	Nanogely	16
2.3	Nosičové systémy na bázi makrostruktur	17
2.3.1	Gely	17
2.3.2	Materiály používané pro tvorbu biokompatibilních gelů	20
2.4	Metody cílení léčiva	22
2.5	Základy metod použitých pro studium nosičových systémů	23
2.5.1	Dynamický rozptyl světla	23
2.5.2	Elektroforetický rozptyl světla	23
2.5.3	Skenovací elektronová mikroskopie	24
2.5.4	Vysokorozlišovací ultrazvuková spektroskopie	25
2.5.5	Reologie	25
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b>	<b>26</b>
3.1	Nosičové systémy v lékařství	26
3.2	Použití biosurfaktantů v medicíně	26
3.2.1	Prakticky používané systémy	27
3.3	Aktuální výzkum studované problematiky	28
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>29</b>
	Použité přístroje a chemikálie	30
4.1	Systém DEAE Dextran a Rhamnolipid	31
4.1.1	Studium interakcí na molekulární úrovni	31
4.1.2	Podrobnější studium interakcí pomocí kombinace ultrazvukové spektroskopie a rozptylových technik	33
4.2	Systém DEAE Dextran a Sophorolipid	33
4.2.1	Studium interakcí na molekulární úrovni	34
4.3	Systém Chitosan a Rhamnolipid	34
4.3.1	Studium interakcí na molekulární úrovni	34
4.3.2	Tvorba gelů	34

4.4	System Chitosan a Sophorolipid .....	35
4.4.1	Studium interakcí na molekulární úrovni.....	36
4.4.2	Tvorba gelů .....	36
4.5	Porovnání jednotlivých systémů .....	36
4.5.1	Studium interakcí na molekulární úrovni.....	36
4.5.2	Tvorba gelů ve větším objemu.....	36
4.5.3	Studium mechanických vlastností vzniklých gelů .....	37
4.5.4	Ověření solubilizačních schopností .....	37
4.5.5	Studium vnitřní struktury gelů pomocí elektronové mikroskopie .....	38
5	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	39
5.1	System DEAE Dextran a Rhamnolipid .....	39
5.1.1	Studium interakcí na molekulární úrovni.....	39
5.1.2	Podrobnější studium interakcí pomocí kombinace ultrazvukové spektroskopie a rozptylových technik .....	47
5.2	System DEAE Dextran a Sophorolipid .....	50
5.2.1	Studium interakcí na molekulární úrovni.....	50
5.3	System Chitosan a Rhamnolipid .....	51
5.3.1	Studium interakcí na molekulární úrovni.....	51
5.3.2	Tvorba gelů .....	52
5.4	System Chitosan a Sophorolipid .....	56
5.4.1	Studium interakcí na molekulární úrovni.....	56
5.4.2	Tvorba gelů .....	57
5.5	Porovnání jednotlivých systémů .....	57
5.5.1	Studium interakcí na molekulární úrovni.....	57
5.5.2	Tvorba gelů ve větším objemu.....	58
5.5.3	Studium mechanických vlastností vzniklých gelů .....	59
5.5.4	Ověření solubilizačních schopností .....	63
5.5.5	Studium vnitřní struktury gelů pomocí elektronové mikroskopie .....	68
6	ZÁVĚR.....	73
7	LITERATURA .....	75
8	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	83
	PŘÍLOHY .....	84

## 1 Úvod

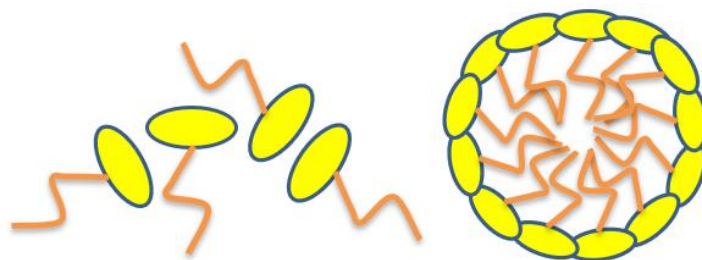
Značná řada léčiv je tvořena molekulami, které mají hydrofobní charakter. Ten se vyznačuje obecně špatnou rozpustností ve vodě, případně i špatnou přístupností do vodného prostředí. Jelikož lidské tělo je primárně tvořeno vodou, je toto prostředí vlastně v každé buňce. Aby tak mohlo toto léčivo efektivně fungovat, je nutné najít buď jeho hydrofilní analog (obdobně účinnou léčivou látku, která je však ve vodě dobře rozpustná) nebo vytvořit nosičový systém, který bude schopný hydrofobní léčivo do buňky dopravit, pomoci mu s jeho rozpuštěním, a případně ovlivní také jeho specifické účinky (například dobu působení, či uvolněnou koncentraci léčiva). U léčiv běžně dostupných je relativně časté, že existuje několik možných variant podání. Například jinou lékovou formou, s modifikovanou chemickou strukturou či právě pomocí náhrady léčivé látky za nějakou lépe biologicky dostupnou. Problém však nastává u léčiv, která jsou velmi specifická a může se tak jednat o aktuálně jedinou možnost jak potřebnému pacientovi pomoci. Jedním z možných řešení je již zmíněný nosičový systém, který je schopen látku dopravit k místu účinku.

Biosurfaktanty jsou ve vědecké společnosti hojně diskutovaným tématem. Jelikož se jedná o látky přírodního původu, je jejich potenciální využití v medicíně, kosmetice či jiných humánně aplikačních oborech relativně široké. Na jejich využití má hlavní vliv jejich amfifilní struktura a aplikačně zajímavé fyzikálně chemické vlastnosti. Tyto aplikační vlastnosti jsou velice dobře ovlivnitelné výběrem konkrétního biosurfaktantu, jelikož se jedná o velmi rozsáhlou a chemicky různorodou skupinu látek. Jedná o amfifilní molekuly, tím pádem jsou povrchově aktivní – ovlivňují povrchové napětí či solubilizaci určitých látek, jsou schopné tvořit bohatou pěnu a v neposlední řadě specificky interagovat s dalšími molekulami. Micely biosurfaktantů (až na výjimky) splňují kritérium nanorozměrů, potřebné pro možnost putování krevním řečiště a zároveň vyniká svým velkým objemovým povrchem a tím pádem i vysokou kapacitou pro případné přenášené molekuly. Jejich největší nevýhodou je jejich cena, v porovnání se syntetickými analogy. Dokážou však svými vlastnostmi těmto syntetickým látkám konkurovat a v případě optimalizace jejich produkce je právě díky svým výhodám v podobě dobré odbouratelnosti a nízké toxicity postupně z trhu vytlačit?

## 2 Teoretická část

### 2.1 Biosurfaktanty

Jedná se o povrchově aktivní biomolekuly, které jsou produkovány mikroorganismy – pro medicínské aplikace se nejčastěji vybírají nepatogenní mikroorganismy, aby se snížilo riziko možných kontraindikací pro použití těchto produktů. [1] Jejich amfifilní povaha (obsahují hydrofilní, nejčastěji cukernatou hlavičku a hydrofobní, nejčastěji alifatický uhlíkatý řetězec, viz *Obrázek 1*, jim dává schopnost rozpouštět se jak v organických (nepolárních), tak vodných (polárních) rozpouštědlech. Obecně se surfaktanty dělí na kationtové, aniontové, amfoterní a neionogenní. [2]



*Obrázek 1 - Obecná struktura amfifilní molekuly a formace micely*

Biosurfaktanty (BS) jako takové se již používají v různých odvětvích průmyslu (například odstraňování ropných nečistot z půdy). Jejich medicínské využití je však stále spíše ve fázi výzkumu. [1] Jejich hlavní nevýhodou oproti chemicky syntetizovaným analogům je jejich produkční cena – ta se odvíjí od náročnosti práce na kultivaci mikroorganismů a následné purifikaci samotných produktů. Naopak výhodou je jejich nízká toxicita, tepelná stabilita, biodegradabilita či biokompatibilita. [3]

Podle základní struktury se biosurfaktanty dělí do několika skupin. Mezi základní se řadí glykolipidy (rhamnolipid), fosfolipidy, neutrální lipidy, mastné kyseliny, případně polymerní biosurfaktanty (emulsan). [4]

Jejich zásadním problémem je fakt, že z hlediska finanční náročnosti stále nejsou schopné konkurovat svým syntetickým analogům. Bylo provedeno již relativně velké množství experimentů a studií se snahou snížit náklady na jejich výrobu. Od používání levnějších či odpadních kultivačních medií, které by měli být producenti schopni dostatečně dobře využít, právě díky jejich schopnosti produkce biosurfaktantů až přes různé modifikace standardních živných medií. Zatím žádný z těchto výzkumných projektů však neměl dostatečný úspěch k tomu, aby se cena substrátů používaných pro produkci biosurfaktantu nějak významně snížila, případně se na tolik zvýšila jeho (BS) produkce, že by to mohlo vést ke snížení ceny. [5]

#### 2.1.1 Dělení biosurfaktantů z hlediska chemické struktury

Biosurfaktanty se dělí do několika základních skupin. Tyto skupiny jsou nejčastěji tvořeny látkami, které mají obdobné strukturní uspořádání a většinou vykazují obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Často mají biosurfaktanty z jednotlivých skupin obdobné mikrobiální producenty, a tudíž se také shodují v postupu jejich produkce (extrakci a purifikaci).

### 2.1.1.1 Glykolipidy

Jedná se o nejrozšířenější skupinu biosurfaktantů. Strukturně obsahují zbytek mastné kyseliny a cukernatou složku. Podle této cukerné složky se poté dělí do podskupin, jako jsou například rhamnolipidy, sophorolipidy, cellobiolipidy, trehalolipidy a další. Glykolipidy se vyznačují svými zajímavými vlastnostmi, některé mají například schopnost vydržet extrémní podmínky pH, teploty či salinity – nejčastěji je tato schopnost ovlivněna produkčním mikroorganismem a původním smyslem produkce daného biosurfaktantu jeho producentem. [6]

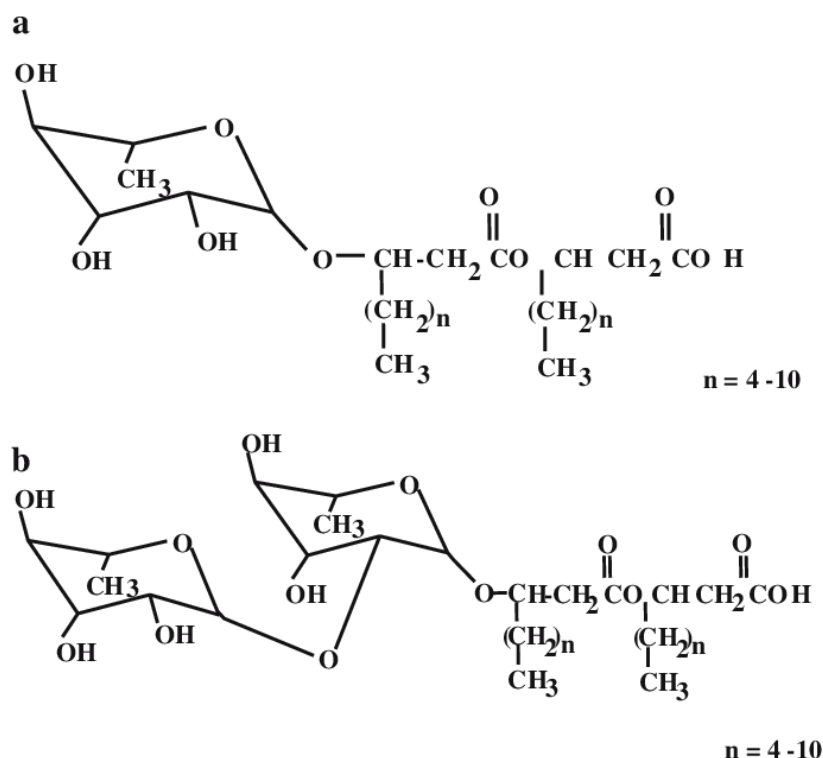
Glykolipidy nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích, a to především z důvodu jejich vysoké chemické variability – jedná se o nejobsáhlejší skupinu biosurfaktantů. V těžkém průmyslu je možné je využít při těžbě a zpracování ropy pro snížení ekologických dopadů (díky jejich schopnosti solubilizovat hydrofobní uhlovodíkové řetězce se dají využít například pro čištění půdy či vody v okolí ropných vrtů, a to s nižší toxicitou oproti syntetickým analogům). V posledních letech jsou často diskutovaným tématem na poli biomedicíny, jelikož byly prokázány jejich antimikrobiální (např. pro odstraňování různých patogenních biofilmů), ale také antitumorozní vlastnosti. [7] V neposlední řadě se dají využít v zemědělství jako pesticidy, případně v potravinářském průmyslu jako konzervanty. Zároveň, jelikož se jedná o rozsáhlou skupinu látek, bylo provedeno již značné množství studií a experimentů s možnými živnými médii a fermentačními podmínkami pro zvýšení produkce a snížení ceny produktu. [8]

Některé glykolipidy je možné získávat z poměrně levných, recyklovaných či odpadních materiálů. K těmto materiálům se řadí například vedlejší produkty získávané při výrobě olivového oleje či některé industriální odpady. Samozřejmě poté záleží na zamýšleném použití získaného biosurfaktantu – pro čištění ropou znečištěné půdy budou jiné bezpečnostní a toxikologické požadavky než pro biomedicínská použití. [9]

#### Rhamnolipidy

Rhamnolipidy (RL) jsou skupina biosurfaktantů, jejichž cukernou složku tvoří rhamnosa. Na tento strukturní základ jsou poté navázány  $\beta$ -hydroxylované řetězce mastných kyselin. Jedná se o skupinu biosurfaktantů s pravděpodobně nejširším spektrem použití (půdní průmysl, ropný průmysl, ale také zemědělství či potravinářství) a zároveň s největší produkcí. S množstvím produkovaného rhamnolipidu, však přichází také nutnost důkladnější extrakce z produkčních organismů. Hrozí totiž riziko větší kontaminace produkčními mikroorganismy (největším producentem je potenciálně patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*). [10] Byly objeveny tři základní enzymy (RhlA, RhlB, RhlC) zodpovědné za schopnost těchto bakterií produkce RL a následovaly snahy o jejich expresi i v ostatních, méně patogenních rodech bakterií, případně u některých kvasinek. Další možností vedoucí ke snížení patogenity je enzymatické odbourávání případných toxinů. V tomto případě se však jedná o finančně i časově náročný krok. [11]

Samotných rhamnolipidů existuje celá řada typů. Jednotlivé struktury se liší především délkou a rozvětveností řetězce mastné kyseliny. Z hlediska cukerné složky se dále dělí podle množství obsaženého cukru na mono- (jedna rhamnosa ve struktuře) a di- (dvě rhamnosy ve struktuře) rhamnolipidy (Obrázek 2). Jednotlivé cukry se váží pomocí glykosidické vazby a následně se glykosidickou vazbou připojuje také konec mastné kyseliny. Celkově bylo do konce roku 2017 charakterizováno 113 druhů rhamnolipidů. Jednotlivé druhy se lehce liší svými fyzikálně – chemickými vlastnostmi. [12]



Obrázek 2 - a) Struktura monorhamnolipidu, b) Struktura dirhamnolipidu [13]

### Sophorolipidy

Sophorolipidy (SL) jsou skupinou glykolipidů, jejichž základ tvoří sophorosa ( $\beta$ -1,2 vázaný dimer glukózy). Obdobně jako u ostatních glykolipidů se na tento cukerný základ váže zbytek mastné kyseliny pomocí glykosidické vazby. Na rozdíl od rhamnolipidů jsou sophorolipidy nejčastěji syntetizovány kvasinkami. Produkčními rody jsou například *Starmerella*, *Rhodotorula* či *Candida*. Nejčastěji jsou produkovány souběžně ve dvou strukturních konformacích – kyselé a laktonické. [14]

Vykazují velmi nízkou toxicitu, dobrou odbouratelnost a zároveň slibné fyzikálně-chemické vlastnosti (jako značný vliv na změnu povrchového napětí). Jejich použití je vázáno opět hned na několik oborů. Oproti rhamnolipidům je díky jejich nižší potenciální toxicitě větší odbyt v humánně aplikačních oborech a byly dokonce schváleny americkou FDA pro farmaceutické použití. Kromě použití v kosmetice (jako čistící roztoky, odličovadla apod.) je uvažováno jejich užití také v dermatologii, jelikož byl prokázán jejich vliv na tvorbu kolagenu, funkci dermálních fibroblastů a inhibici volných radikálů. Některé studie ukazují také spermicidní vlastnosti SL, případně jejich možné využití jako antibakteriálních a virucidních agens (včetně HIV). [15]

#### **2.1.1.2 Fosfolipidy a mastné kyseliny**

Fosfolipidy se běžně nacházejí v buněčných membránách, kde slouží jako strukturní a transportní složky. Některé druhy bakterií a kvasinek jsou však schopné je produkovat také extracelulárně. [16] Tyto látky mají díky své amfifilní povaze (buňky jsou svým způsobem lipozomální povahy) výrazný vliv na změny povrchového napětí a solubilizaci hydrofobních látek. Největší produkci tyto mikroorganismy vykazují při růstu na médiích s vysokým obsahem organicky vázaného uhlíku (typicky n-alkany). Výzkumy ukazují, že největší vliv na změnu povrchového napětí (a případné solubilizační vlastnosti) mají molekuly s 12 až 14 uhlíkatými řetězci zbytků mastných kyselin. [17]

### 2.1.1.3 Lipopeptidy

Jak již název napovídá, tyto molekuly mají ve své chemické struktuře obsaženou lipidickou část, která se skládá nejčastěji z uhlíkatých zbytků mastných kyselin (15–17 uhlíkaté řetězce) a peptickou část, která se může skládat z různých typů či počtu aminokyselin. Právě tato variabilita jim dává velký aplikační potenciál. [18] To se projevuje také na jejich způsobech využití. Obdobně jako u ostatních biosurfaktantů, je o lipopeptidy velký zájem v těžkém průmyslu (především ropném), ale prosazuje se i použití v zemědělství. Největším problémem při těchto plošných aplikacích je rozhodně produkční cena, která mnohonásobně převyšuje cenu syntetických analogů. [19] Z hlediska (bio)medicínských aplikací vykazují lipopeptidy antibakteriální schopnosti a jsou dokonce uvažovány jako alternativy pro podání průběhu onemocnění rezistentních na antibiotika. [20]

### 2.1.2 Produkce a zisk biosurfaktantů

Produkce biosurfaktantů probíhá primárně u mikroorganismů, které se nacházejí v prostředí se špatně dostupnou/nerozpustnou formou uhlíku. [16] Pomocí amfifilních molekul, u kterých využívají právě jejich schopnosti solubilizovat tyto jinak nedostupné látky, jsou schopné přijímat i formy uhlíku, které by za normálních okolností neprošly přes buněčnou stěnu. Producenty těchto látek jsou nejčastěji bakterie, ale tuto schopnost mají také kvasinky a houby. Konkrétními bakteriálními zástupci jsou například *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis* a jiné, z hub například *Candida Bombicola*. [21]

Různí producenti jsou schopni produkovat různé typy biosurfaktantů s rozdílnými vlastnostmi (Tabulka 1). Nejčastěji sledovaným kritériem je (kromě jejich ceny a možnosti extrakce požadovaných látek) tzv. kritická micelární koncentrace – CMC (z angl. *critical micellar concentration*). Tato veličina udává koncentraci potřebnou pro vytvoření prvních agregátů v roztoku a silně ovlivňuje chování látek v tomto roztoku – například mění schopnost solubilizace, povrchové napětí, případně vodivost. [22]

Tabulka 1 - Producenti biosurfaktantů [23]

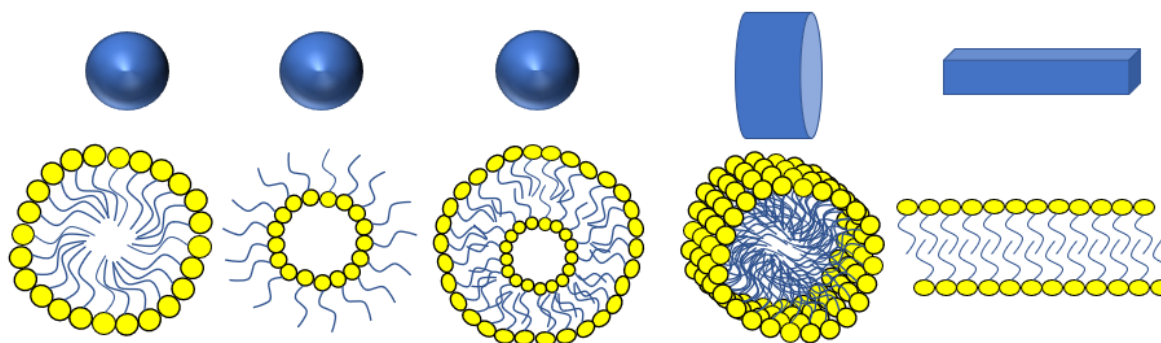
Typ biosurfaktantu		Mikroorganismus	CMC [mg/l]
Glykolipidy	Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i>	0,1–10
		<i>Pseudomonas sp.</i>	0,1–10
	Threhalolipid	<i>R.erythropolis</i>	5–20
		<i>N.erythropolis</i>	5–20
	Sophorolipid	<i>T. bombicola</i>	0,5–2
		<i>T. apicola</i>	0,5–2
Lipopeptidy	Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	150
	Surfactin	<i>B. subtilis</i>	25–160
	Subtilisin	<i>B. subtilis</i>	50
Fosfolipidy	Fosfolipid	<i>T. thiooxidans</i>	120
Polymerní surfaktanty	Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>	20
	Liposan	<i>C. lipolytica</i>	40

### 2.1.3 Micely

Jedná se o útvary vyskytující se u povrchově aktivních látek (tenzidů). Oproti samostatným molekulám těchto tenzidů se jedná o složitější supramolekulární agregáty, nejčastěji kulovitého tvaru. Typů micel však v různých roztocích může vznikat velké množství (Obrázek 3) – od kulovitých, přes válcovité, lamelární, elipsoidní až po dvojrstevné kulovité – tzv. vezikuly. Velikost samotné micely je nejvíce ovlivněna množstvím povrchově aktivních monomerů obsažených v jedné micelle, případně jejich molekulovou hmotností. Na ochotě tenzidu tvořit micely má vliv řada faktorů. Patří mezi ně například délka samotné molekuly tenzidu (biosurfaktantu), složení roztoku, ve kterém je tenzid rozpouštěn, teplota rozpouštění (vznik micel je možný až po překročení tzv. Krafftovy teploty) nebo přítomnost kosurfaktantu. Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole ke vzniku micel dochází u povrchově aktivních látek po překročení jisté hraniční koncentrace v roztoku. Tato hraniční koncentrace se nazývá kritická micelární koncentrace. [24]

Micelární systémy se studují mimo jiné jakožto potenciální nosiče hydrofobních léčiv. V závislosti na použitých materiálech pro jejich přípravu se jejich velikost pohybuje většinou v řádu nanometrů (od jednotek až do nižších stovek). Použité materiály však ovlivňují také vlastnosti vznikajících micel. Řada látek čistě přírodní povahy vykazuje povrchově aktivní vlastnosti (což předchází schopnosti tvořit micely) – v případě micel biosurfaktantů, je tak předpokládána lepší biologická dostupnost i následná odbouratelnost. Naopak při modifikacích micel pomocí syntetických látek, jako je například polykaprolakton (PCL) v kombinaci s hydrofilní složkou polyethylenglykolu (PEG) dochází ke zlepšení jejich farmaceutických vlastností. Například mají obecně vyšší stabilitu, ale také možnost dalších chemických úprav využitelných pro lepší cílení léčiva. [25]

Zvláštním druhem micel jsou tzv. reverzní, případně inverzní micely, které vznikají v nevodných roztocích. Právě díky použitému rozpouštědлу, dochází k natočení amfifilních molekul, jak již název napovídá, obráceně oproti klasickým micelám. Hydrofilní skupiny se otáčejí směrem dovnitř micely a hydrofobní konce poté tvoří obal. Tyto micely nejsou příliš rozšířené, jelikož rozpustnost většiny tenzidů v nevodných roztocích je značně omezená. [26]



Obrázek 3 - Různé typy micel

#### **2.1.4 Kritická micelární koncentrace**

Kritická micelární koncentrace (CMC) představuje klíčový parametr biosurfaktantu, který kvantitativně odráží míru jeho povrchové aktivity. Při jejím překročení nastává změna chování tenzidu v roztoku. U koncentrací nižších, než je CMC se v roztoku nacházejí volně rozptýlené molekuly povrchově aktivní látky – část se jich váže na povrchové rozhraní, další tvoří malé shluky. Se zvyšováním koncentrace se více těchto amfifilních molekul váže na mezifázové rozhraní a dochází tak ke snižování povrchového napětí roztoku. Po překročení CMC dochází ke vzniku složitějších útvarů – micel. Po tomto bodě každá další molekula v roztoku tvoří nebo je součástí nějakého z těchto útvarů a již nedochází ke snižování povrchové napětí. [27]

#### **2.1.5 Další využití micelárních systémů**

Micelární systémy nacházejí, kromě různých oblastí průmyslu, také vědecké využití. Standardně se pro HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) analýzu organických polutantů používají dvě metody extrakce analytu z prostředí. Jednou z možností je extrakční systém kapalina – kapalina, další poté extrakce pomocí pevné fáze. Obě tyto metody mají však jisté nedostatky. U obou metod se jedná například o poměrně velkou časovou náročnost. U rozpouštědel je nežádoucí jejich případná toxicita vůči životnímu prostředí. U extrakce pomocí pevné fáze poté jejich relativně malý povrch a tím pádem neodpovídající část odebraného vzorku. Alternativou a jistou kombinací těchto metod jsou právě micelární systémy, které jsou díky svým solubilizačním vlastnostem schopny extrahovat studované polutanty a zjednodušit tak jejich analýzu. [28]

### **2.2 Nanotechnologické nosičové systémy**

V posledních letech došlo ke značnému pokroku v oblasti nanomedicíny a s tím je spojený také vývoj (nano)nosičových systémů. Jejich hlavním úkolem je cílené vyhledávání a aplikace léčiva do poškozených či nemocných tkání. Tímto pokrokem došlo také k jisté reorganizaci na trhu s léčivy, kde se derou do popředí modernější léčiva, která mají lepší vlastnosti než jejich zastaralejší alternativy. Mezi nejvíce diskutované typy nosičových systémů patří nanočástice, dendrimery, lipozomy, polymerní konjugáty a micelární systémy. Zároveň se však počítá s dalším rozvojem nanomedicínského oboru a tím pádem i ke vzniku dalších nosičových systémů, které by mohly nahradit aktuální inovace. [29]

Použití jednotlivých typů nosičových systémů je silně ovlivněno zamýšlenou aplikační cestou. Jsou zkoumány systémy určené pro orální, nasální, parenterální, kožní, plicní a další podání. Každý z těchto systémů je pak specifický svým účinkem, schopností procházet různými tělními bariérami, ale také schopností uvolňovat dané léčivo na konkrétním místě. [30]

### 2.2.1 Nanočásticové nosičové systémy

Jedná se o koloidní struktury s rozměry v rozmezí 10 až 100 nm. Mohou se vyskytovat v různých strukturních formách, například kulatých, krychlových, případně jehlovitých. Mohou být tvořeny jak přírodními, tak syntetickými makromolekulami. Nejčastějšími typy jsou tzv. nanokapsle nebo nanosféry. Oba typy jsou kulovitého charakteru. U nanokapslí dochází k tvorbě polymerní membrány a uzavření léčiva uvnitř vzniklého vezikulárního systému. U druhých zmíněných je zamýšlené léčivo dispergováno po celé ploše matrice tvořené makromolekulami. [31]

Jejich největší výhodou je jejich velikost. Ta jim umožňuje efektivně putovat téměř celým krevním řečištěm včetně periferních kapilár, vstupovat do buněk, uvolňovat léčivo a následně z buněk zase vystoupit téměř bez omezení. Podle struktury a materiálu, ze kterého jsou nanočástice vyrobeny je možné do jisté míry kontrolovat rychlost uvolňování léčiva (většinou v řádu dnů, u výjimek až týdnů). [30]

### 2.2.2 Lipozomy

Lipozomy jsou velice často vyskytujícími se agregáty přírodní povahy. Bývají tedy biokompatibilní a v závislosti na různých faktorech (koncentrace, pH, teplota a další) reverzibilní vezikulární systémy. Jejich základem je dvojvrstva na bázi fosfolipidové membrány. Různé molekuly mohou vytvářet různě velké lipozomy – jejich velikost se pohybuje od řádu nižších nanometrů až do řádu nižších mikrometrů. V posledních několika letech se jedná o velmi studované systémy, a to zejména díky jejich výhodným biofarmaceutickým vlastnostem.

Tyto vezikulární systémy se vyznačují velice dobrou enkapsulační schopností, jak pro částice hydrofobní, tak pro částice hydrofilní. To je způsobeno právě jejich dvouvrstevnou strukturou. Ve většině případů standardně se vyskytujících lipozomů se jedná o systémy, u nichž je dvojvrstva tvořena pomocí k sobě nasměrovaných hydrofobních konců a hydrofilní hlavičky směřují do okolního vodního prostředí. Hydrofobní látky je pak možné navázat mezi hydrofobní konce, případně do vzniklé dutiny uprostřed útvaru. Hydrofilní látky se poté mohou vázat buďto do dutiny nebo mezi hydrofilní hlavičky látek. [30]

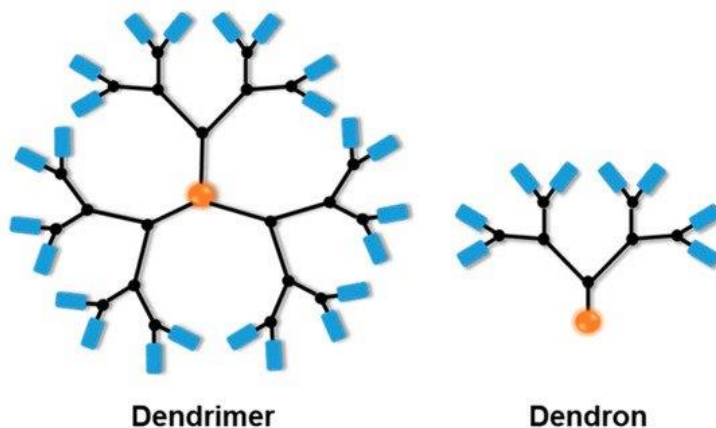
Mezi základní výhody se dozajista řadí také značné rozmezí možných velikostí vznikajících systémů, dobře ovlivnitelná cirkulace v krevním oběhu a s tím spojené cílené uvolňování konkrétních léčiv. Zároveň je možné pomocí lipozomálních systémů podávat léčiva jinak značně toxická či reaktivní, jež by klasickými cestami podání neměla šanci dosáhnout cílené tkáně či orgánu a zároveň by mohlo dojít k silnému poškození jinak zdravých struktur. [32]

Prvním lékem na lipozomální bázi byl americkou FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) schválen lék Doxil. Ten se používá jako cílené chemoterapeutikum k léčbě rakoviny prsu, močového měchýře či akutní lymfocytární leukémie. [33]

### 2.2.3 Dendrimery

Jak je již nastíněno výše, existuje mnoho druhů různých nosičů léčiv. Ať již z hlediska jednotlivých typů, tak z hlediska materiálů používaných pro jejich výrobu. Většina z nich se však potýká s nějakým nedostatkem. U modernějších typů cílených léčiv (nejčastěji proti rakovinám) je jedním z nejčastějších problémů jejich značná toxicita i pro okolní tkáň, vykoupená vysokou efektivitou při ničení nádorového bujení. Nosiče takovýchto léčiv musí vykazovat značnou stabilitu a zároveň velkou kapacitu k vazbě požadovaného léčiva. [34]

Dendrimery vykazují přesně tyto vlastnosti a zažívají díky těmto vlastnostem výrazný rozmach v biomedicínských oborech. Samotný název pochází z řeckého slova *dendron*, které v překladu znamená strom. Jak již tedy název může napovídat, jedná se o molekuly vytvářející poměrně rozsáhlou, velmi dobře organizovanou trojrozměrnou síť (Obrázek 4). Možností jejich vzniku je několik, ale finální struktura má většinou podobu jádra, z něž se postupně rozrůstají následující dělicí se generace. S postupným růstem samozřejmě dochází k postupnému rozšiřování povrchu molekuly a tím pádem i většímu počtu aktivních míst pro případnou vazbu léčiva či jiných interakcí. [35]



Obrázek 4 – Struktura dendrimerů [36]

### 2.2.4 Nanogely

Nanogely jsou jedním z nejnovějších typů nosičových systémů – tento termín byl zaveden a patentován pro strukturu polyethyleniminu zesíťovaného s polyethylenglykolem v roce 2008. Obdobně jako je tomu u (makro)gelů, jedná se o hustě zesíťované struktury, pouze s tím rozdílem, že jejich celková velikost se pohybuje v rozmezí 20–200 nm. Vzhledem k jejich nano rozměrům je možnost jejich podání téměř neomezená a zahrnuje často také klasické cesty podání léčiva jako orální, nasální či parenterální. Síť nanogelu může být efektivně modifikována pro zvýšení schopnosti vazby různých ligandů či lepší responzivitě na podmínky určené k uvolňování neseného léčiva. Těmito podmínky může být změna pH, teplotní změna, případně aplikace UV záření. [37]

Jejich výhodou je vzhledem k jejich velkému objemovému povrchu velmi dobrá kapacita k pojmutí léčiva, možnost tvorby těchto struktur z biokompatibilních materiálů a následná biodegradabilita a zároveň jejich schopnost projít většinu tělních bariér a prostupovat i velmi malými periferními kapilárami (vlásečnicemi).

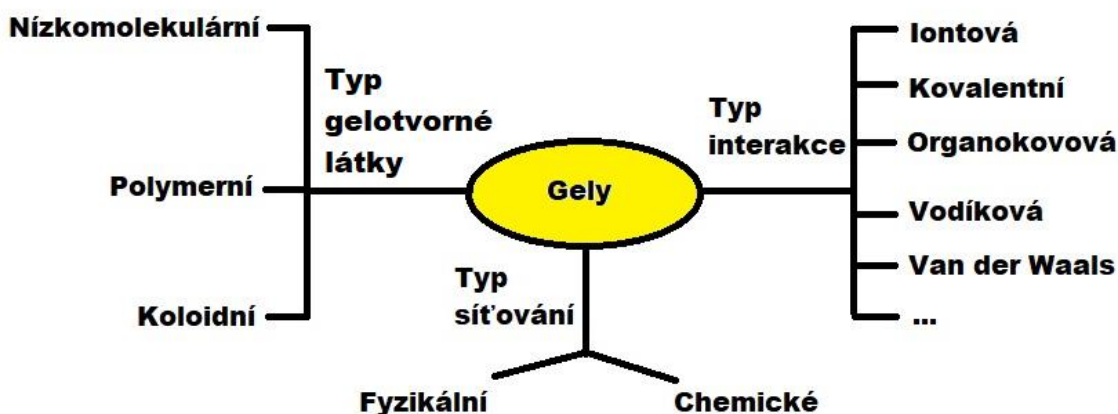
## 2.3 Nosičové systémy na bázi makrostruktur

### 2.3.1 Gely

Gel je měkký, pevný nebo pevně se chovající materiál, který je složený minimálně ze dvou různých složek. Jedna z těchto složek je kapalina (velmi často voda, ale mohou být i jiné), která zaujímá až 99% hmotnosti materiálu a druhou je gelotvorná látka, která vytváří trojrozměrnou síť prostupující celým disperzním prostředím a je zodpovědná za specifickou strukturu a výjimečné vlastnosti materiálu. Gelotvorná látka zadržuje vodu uvnitř vzniklé sítě a brání jí opustit vzniklou strukturu – stále však dochází k difuzi vody uvnitř gelu. Z reologického hlediska vykazují gely vlastnosti podobné pevným látkám – to je dáno tím, že vzniklá struktura je natolik zesíťovaná, že jednotlivé molekuly nejsou schopné se pohybovat nezávisle na celém objemu gelu. [38]

Gely je možné klasifikovat hned z několika hledisek (Obrázek 5). Jedním z nich je například složení disperzního prostředí. Základní dělení je poté na anorganické a organické gely.

Speciálním typem gelů, hojně studovaným v posledních letech z důvodu jejich možného intenzivního využití v lékařství, tkáňovém inženýrství, jako nosičů léčiv, ale také např. v molekulární elektronice, jsou takzvané supramolekulární gely. Tyto gely jsou schopné reagovat svými vlastnostmi na různé podněty, jako je například teplota, mechanické namáhání nebo ozáření světlem. [39]



Obrázek 5 - Rozdělení gelů [39]

#### 2.3.1.1 Gelační mechanismy

Gely jsou nejčastěji klasifikovány pomocí pevnosti svojí vazby. Ta může být kovalentní, vodíková nebo iontová. Gelům, které tvoří kovalentní vazby, se říká chemicky síťované gely, naopak gely, které tvoří iontové či vodíkové vazby se řadí mezi fyzikálně síťované gely. [40]

Gely bývají často klasifikovány také podle jejich vlastností ve vysušeném stavu. Základní dělení je na reverzibilní (vratné) a ireverzibilní (nevratné) gely. Při vysoušení reverzibilních gelů dochází ke zmenšování jejich objemu a tím pádem ke vzniku kompaktního xerogelu (jedná se o zesíťovaný gel, ze kterého je odstraněno disperzní prostředí). Po opětovném kontaktu s disperzním prostředím dochází k bobtnání a zisku původních vlastností. U ireverzibilních gelů naopak při sušení nedochází ke zmenšování objemu a síťovitá struktura zůstává téměř beze změny. Po opětovném přidání disperzního prostředí však již nedochází k tvorbě nabotnalé gelové fáze (tzv. lyogelu). [41]

Některé složitější gely mohou být tvořeny z dlouhých (polymerních) řetězců a zároveň tyto polymerní řetězce mohou být složeny z různých monomerních jednotek. Polymerní jednotky mohou být složeny buď z jednoho typu monomerních jednotek, tzv. homopolymery nebo z různých typů monomerů tzv. kopolymery. Kopolymery se poté dělí podle členění do několika skupin. [42] Skládání monomerů u jednotlivých typů ukazuje následující obrázek (*Obrázek 6*):



Obrázek 6 - Typy polymerů [42]

#### Chemicky síťované gely

Chemicky síťované gely jsou ty gely, které při své tvorbě podléhají jisté chemické reakci, která je zodpovědná za tvorbu nových vazeb tvořících gelovou síť. Existuje několik zaběhlých principů, pomocí kterých je možné chemicky síťované gely vytvořit. Řadí se sem například radikálová polymerizace, síťování pomocí vysoko energetického ozařování, síťování aldehydy nebo adičními či kondenzačními reakcemi. Speciálním typem tvorby chemicky síťovaných gelů je využití enzymatických reakcí. [43]

Dobrým příkladem chemicky síťovaného hydrogelu je polyHEMA, která je popsána o několik kapitol dále. Právě díky tomuto hydrogelu bylo také zjištěno, že přidávkem kyseliny metakrylové je možné efektivně tvořit pH sensitive gely. [44]

#### Fyzikálně síťované gely

Fyzikálně síťované hydrogely zažívají v posledních letech veliký rozmach, což souvisí právě s rozvojem jejich medicínských aplikací. Jejich největší výhodou oproti chemicky síťovaným gelům je absence různých potenciálně toxických rozpouštědel či síťovacích činidel. Tyto molekuly mohou totiž ohrozit integritu či správnou funkci uvažovaných léčivých přípravků (nejčastěji biomedicínských – tzn. různých proteinů, specifických enzymů či buněk). [45]

Obdobně jako u chemicky síťovaných gelů existuje několik možností, jak tyto struktury připravit. Může se jednat například o iontové interakce, fázovou separaci, reakci amfifilního bloku a roubovaných kopolymerů, síťování pomocí vodíkových vazeb. Speciálním typem reakcí jsou opět ty s biologickými základy. Jedná se například o specifické proteinové interakce či reakce antigen – protilátka. [43]

### Koncentrace počínajícího překryvu

Pojem je vázaný na roztoky polymerů. Ve zředěných roztocích polymerů dochází k tvorbě jednotlivých klubek polymerů, ta jsou od sebe oddělena spojitou fází rozpouštědla. To znamená, že v roztoku se nachází místa, ve kterých je koncentrace polymeru nulová a poté místa kde je koncentrace polymeru „absolutní“ – tyto místa se mění vlivem tepelného pohybu a stejně tak může dojít k jistým interakcím mezi jednotlivými klubky polymeru.

Pokud dojde ke zvýšení koncentrace polymeru, může dojít k překročení tzv. koncentrace počínajícího překryvu. V tu chvíli dochází k „zaplnění prostoru rozpouštědla“ klubky polymeru a každé další zvýšení koncentrace nutně vede k tomu, že se jednotlivá klubka začínají míchat a překrývat. Koncentrace polymeru je v tuto chvíli shodná v každém místě roztoku. Tento koncentrační zlom je důležitý případnou pro tvorbu gelů, jelikož jednotlivé molekuly polymeru snadněji reagují s okolními molekulami (z důvodu menších výrazně nižších vzdáleností) a nemusí překonávat „volné prostory“ tvořené rozpouštědlem. [46]

#### **2.3.1.2 Hydrogely**

Jedná se o další kritérium, podle kterého je možné dělit gely. Hydrogely jsou ty gely, které mají disperzní prostředí tvořené vodou a jejich alternativou jsou tzv. organogely (u kterých je disperzním prostředím organická kapalina). Speciálním typem gelů jsou poté izogely, u kterých tvoří disperzní prostředí monomer síťovaného polymeru (např. polystyren ve styrenu).

#### **2.3.1.3 Aerogely**

Jedná se o typ gelu, u jehož přípravy byla nahrazena kapalná složka složku plynnou. Narozdíl od xerogelů, je však zachována jeho původní porozita – příprava aerogelů využívá odlišné metody. Nejedná se o novinku posledních několika let – první aerogely byly připraveny již v roce 1931 ze silikagelu. Největším problémem při výzkumu aerogelů na bázi silikagelu byly značně náročné kroky při výměně kapalného média za plynné. Později však došlo k náhradě tohoto materiálu za nové, lépe interagující materiály a vývoj a výzkum aerogelů se značně urychlil a navázal tak na trend výzkumu sol-gel přechodů. Významný zlom ve vývoji aerogelů nastal také po aplikaci tzv. superkritického sušení. Jeho principem je sušení kapaliny v gelu za superkritických podmínek – teploty a tlaku. První pokusy byly prováděny v autoklávu, dnes již existují speciální superkritické sušárny. Opačným extrémem je poté lyofilizace – ta funguje na principu sublimace. Dochází k výraznému snížení teploty (například kapalným dusíkem) a následnému odpaření rozpouštědla. [47]

#### **2.3.1.4 Využití gelů**

Přechodu sol – gel je možno využít v mnoha odvětvích. Jedním z nich je také antimikrobiální úprava různých povrchů. Aplikací antimikrobiálního povrchu je možné docílit výrazného snížení růstu či úplného odstranění bakterií, virů, plísní a dalších mikroorganismů. Takovéto aplikace je možné využít jak v lékařství, například při ochraně proti různým antibiotikům rezistentním druhům patogenů, nebo jako ochrana před vznikem biofilmů, tak v potravinářství, kde by tyto povrchy měly být schopné bránit napadání ovoce a zeleniny plísněmi. Obdobně je tomu také v dřevozpracujícím průmyslu. [48]

Jedním z možných principů při tvorbě takovýchto ochranných povrchů je aplikace koloidní vrstvy na zamýšlený substrát (kterým mohou být právě potraviny, materiály nebo některé povrchy např. v nemocnicích) a následná tvorba trojrozměrné sítě gelu. Jako velmi efektivní pro toto použití se jeví gely z oxidů kovů, například oxidu křemičitého nebo titaničitého. Tyto molekuly tvoří velmi stabilní gely, avšak sami o sobě nemají požadované antimikrobiální vlastnosti. Je tedy nutné do nich přidat antimikrobiální přísady – používají se některé přírodní látky jako je chitosan, ale je také možné použití stříbrných nanočástic nebo kvartérních amoniových solí. Gel v tomto případě slouží jako matrice antimikrobiální vrstvy. [48]

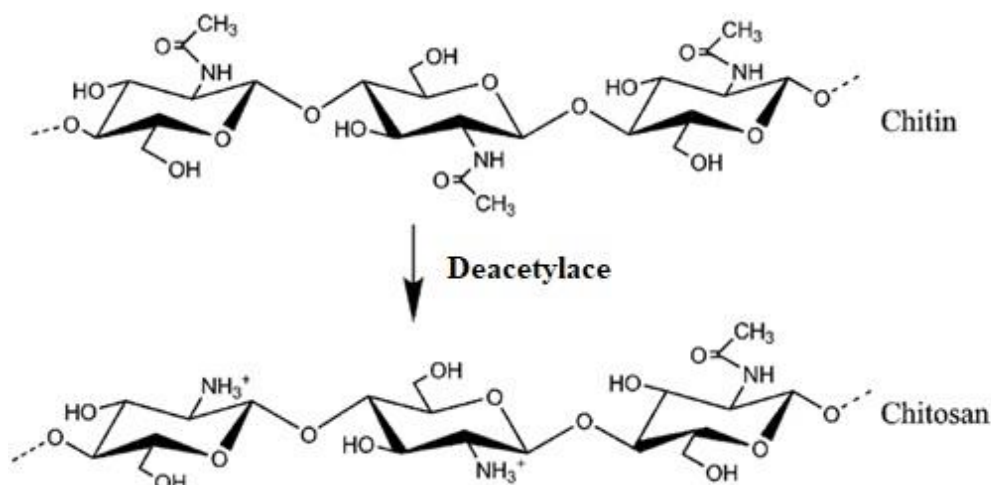
Další možností je využití gelů jako nosičů antimikrobiální látky na požadované místo, například přes některé membrány či překonávání hydrofilního/hydrofobního prostředí v závislosti na vlastnostech transportované látky. Vhodným impulsem (vlivem pH, teploty, okolního prostředí apod.) je poté látka z gelu postupně uvolněna. Nevýhodou těchto systémů je jejich postupně snižující se účinnost, spojená s uvolňováním účinné látky. Využívá se například nanočástic mědi společně s alkylsilany – tyto systémy slouží jednak antimikrobiálně, ale také jako vodní impregnace. [48]

### 2.3.2 Materiály používané pro tvorbu biokompatibilních gelů

Biokompatibilita je vlastnost definující schopnost materiálu existovat a případně vyvolávat nějakou reakci v biologickém prostředí. Studuje se především z hlediska cytotoxického, obecně toxikologického a alergologického. Zároveň se při požadavku biokompatibility nesmí jednat o materiál, který by způsoboval karcinogenní, teratogenní nebo mutagenní reakce.

#### 2.3.2.1 Chitosan

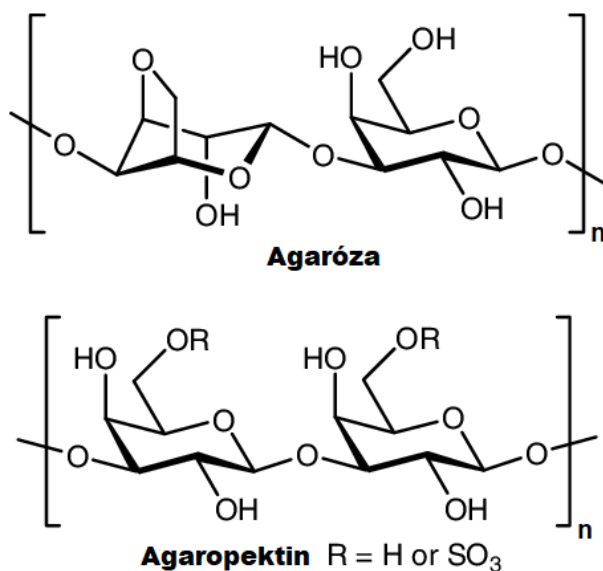
Jedná se o přírodní polysacharid, který je získáván N-deacetylací chitinu za alkalických podmínek (Obrázek 7). Chitin lze získávat buď z exoskeletů některých živočichů nebo z hub. Vlastnosti získaného chitosanu se mohou lehce lišit, a to především právě v závislosti na konkrétním zdroji chitinu (extrakce probíhá za odlišných podmínek). Je to látka dobře biologicky dostupná, biokompatibilní a vykazuje také hemostatické a bakteriostatické účinky. Některé výzkumy však naznačují, že by se dal efektivně využít také v buněčné regulaci či regeneraci tkání. [49]



Obrázek 7 - Tvorba chitosanu z chitinu [50]

### 2.3.2.2 Agar

Jedná se o jednu z nejznámějších gelotvorných látek, především díky jeho velmi častému využívání v mikrobiologii pro kultivaci organismů. Chemicky se jedná o směsnou strukturu lineárního polysacharidu agarózy a menší molekuly agaropektinu (Obrázek 8). Získává se primárně z určitých druhů mořských řas (agarofyta), u kterých je součástí buněčné stěny. Jeho běžné užívání sahá také do historie – jeho první využití se datuje do poloviny 17. století. [51]



Obrázek 8 - Struktura agarózy a agaropektinu [52]

### 2.3.2.3 Alginát

Obdobně jako u agaru (viz výše), se jedná o přírodní polysacharid, který se vyskytuje nejčastěji v buněčných stěnách hnědých mořských řas ve formě kyseliny alginové. Chemicky se jedná o lineární blokový kopolymer složený z mannuronátu (M – bloky) a guluronátu (G – bloky). Pro jeho využití ve formě gelů (**alginátů**) se nejčastěji míchá s vápenatými či sodnými ionty. Některé výzkumy ukazují, že může právě tento vznikající gel působit značné problémy pacientům s cystickou fibrózou, u kterých dochází k tvorbě tohoto gelu v plicích pomocí kvasinky *Pseudomonas aeruginosa*. Jeho hlavními klady pro využití v biomedicínských aplikacích jsou jeho relativně dobrá dostupnost, v kontrolovaných množstvích dobrá biodegradabilita a zároveň poměrně snadná příprava. Nejčastější využití je zamýšleno pro hojení ran, jako nosičové systémy léčiv a případně tkáňové inženýrství. [53]

### 2.3.2.4 Želatína

Želatína je opět jeden z nejznámějších gelů. Její nejdůležitější složkou je kolagen, který se po povaření mění na glutin. Ten je poté zodpovědný za gelotvorné vlastnosti želatiny. Získává se z tkání bohatých na kolagen – vyvářením šlach, kůží, kostí a chrupavek. Pro biomedicínské využití nemá ideální vlastnosti, především stabilitní a pevnostní (nejčastějším odbytem je potravinářství). Na druhou stranu má dobrou biologickou odbouratelnost, dostupnost a celkovou nezávadnost. Využívá se tedy ve směsných gelových systémech, společně například s chitosanem, polyvinylalkoholem, alginátem, kyselinou hyaluronovou anebo pro obalení uhlíkových nanotrubic. [54]

### 2.3.2.5 Fibrin

Fibrin je lidskému tělu vlastní látka, která je zodpovědná za srážení krve při zraněních. Jeho aktivaci předchází rozsáhlá reakční kaskáda, na jejímž konci dochází ke štěpení konců glykoproteinu fibrinogenu pomocí trombinu. Z takto naštěpených molekul následně vzniká poměrně kompaktní a rozsáhlá fibrinová síť, která ucpává ránu a zabraňuje dalšímu krvácení. Obdobně jako v lidském těle je možné připravovat tyto fibrinové sítě technologicky. Připravují se smícháním fibrinogenu s chlazeným roztokem pufru a trombinu a následným zahříváním na teplotu 37 °C. Vlastnosti výsledného gelu je možné podle uvažovaného použití upravit enzymaticky (inhibice degradace), chemickými modifikacemi (pro zvýšení pevnosti vazeb a tím stability gelu) nebo přidáním pomocných síťovadel (pro rychlejší a efektivnější tvorbu gelu). U posledního zmíněného postupu je ovšem problém s častou toxicitou těchto pomocných látek. Významnou výhodou fibrinových gelů je možnost studovat jeho přirozené hojivé vlastnosti *in-vitro* a zároveň pozorovat procesy, které během těchto reakcí probíhají. [55]

### 2.3.2.6 (Hydroxyethyl)metakrylát

Minimálně díky celosvětovému úspěchu vynálezu pocházejícího z Česka, je nutné zmínit také polyhydroxyethylmetakrylát – zkráceninou poté vznikne používanější název polyHEMA. Jak jeho název napovídá, vytváří se polymerizací hydroxyethylmetakrylátu za přítomnosti síťovacího činidla a katalyzátoru. Nejvíce se polyHEMA proslavila jakožto materiál pro výrobu kontaktních čoček. S tímto nápadem přišli dva čeští vědci v roce 1954 a s postupnou modifikací se jejich nápad využívá dodnes. V dnešní době se uvažuje o jejím použití jako efektivního nástroje tkáňového inženýrství měkkých tkání, například při plastických operacích. [56]

## 2.4 Metody cílení léčiva

Pro co nejefektivnější minimalizaci ztráty či degradace aktivní látky, zvýšení biodostupnosti, terapeutického efektu při nižší celkové koncentraci či zmírnění vedlejších účinků jsou aplikovány různé metody cílení léčiva. Nejjednodušší z nich je prostá aplikace aktivní látky na poškozenou tkáň (například překrytí rány hydrokoloidní náplastí).

### Pasivní cílení

Obecně lze říct, že se jedná o cílení léčiva přirozenými fyziologickými procesy, to znamená například prouděním krve krevním řečištěm. Výhodou tohoto cílení bývají fyziologické procesy v poškozených tkáních, například u nádorového bujení dochází k silnému prokrvení rostoucího nádoru. Tím pádem dochází ke vzniku rychlejší cesty vstupu léčivé látky, než by tomu bylo ve zdravé tkáni. [57] Problémem pasivního cílení je existence univerzálních systémů tělních bariér (nejčastěji zmiňovaná je hematoencefalická bariéra) a s tím související fyzikální (velikost částic) a fyzikálně chemické (povrchové napětí) vlastnosti aplikovaných látek, které mají těmito bariérami procházet. Vliv na pasivní cílení však mohou mít i specifické typy interakcí některých tělních prostředí či tekutin s léčivou látkou, příkladem může být pH závislost na funkci některých enzymů, které budou mít vyšší tendenci pohybovat se v oblastech s přijatelnou hodnotou pH. [58]

### Aktivní cílení

Aktivní cílení spočívá v (bio)chemické modifikaci nosičového systému pro zvýšení jeho interakcí s cílovými buňkami či orgány. Často se jedná o deriváty, které reagují pouze v přítomnosti specifických protějšků – nejčastěji receptorů vázaných na povrchu léčených buněk. Jednat se může o některé typy protilátek, specifických bílkovin či cukrů vyskytujících se na těchto buňkách. Aktivní cílení má největší podíl na snižování případných toxických vedlejších účinků podávaného léčiva. [59]

## **2.5 Základy metod použitých pro studium nosičových systémů**

### **2.5.1 Dynamický rozptyl světla**

Nejčastější metodou pro stanovení morfologie a velikosti micel (případně jiných agregátů) je měření pomocí dynamického rozptylu světla – DLS (z angl. *Dynamic light scattering*). Metoda funguje, jak již název vypovídá, na principu analýzy fluktuace intenzity rozptylu světla na jednotlivých molekulách v důsledku jejich Brownova pohybu. Velikost těchto molekul je poté dopočítávána matematicky. Pomocí korelačních funkcí je určen difúzní koeficient  $D$  a následným dosazením do Einsteinovi rovnice je možné dopočítat velikost částic. Problémem u této metody mohou být silně koncentrované roztoky, kdy může docházet k vícenásobnému rozptylu světla, ale také roztoky s širokým rozsahem koncentrací, kdy může vzniknout jeden široký pík, který svoji polydisperzitou pohltní případné menší píky ostatních molekul. [60] [61]

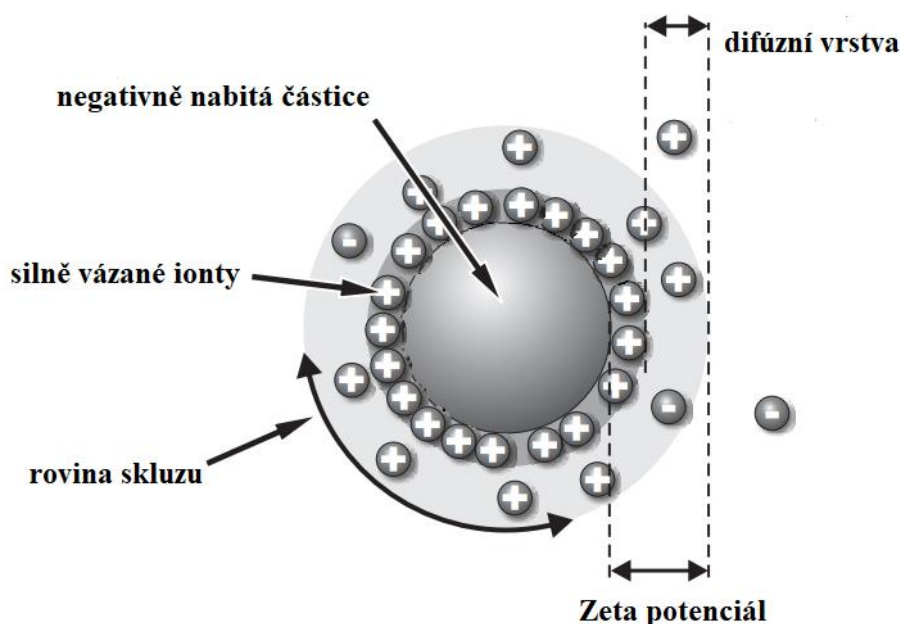
Princip výpočtu velikosti jednotlivých částic je závislý na změně translačního difúzního koeficientu, který je získáván během měření ze změny korelační funkce daných molekul. Pro výpočet velikosti částic se poté používá Stokes – Einsteinova rovnice, ve které je jedinou proměnnou právě difúzní koeficient  $D$ . Ostatní veličiny jsou buď konstanty –  $k$  (Boltzmannova konstanta),  $\pi$  (Ludolfovo číslo) nebo již známé hodnoty, které byly zadány do přístroje před měřením –  $\eta$  (jako viskozita rozpouštědla) a  $T$  (jako teplota měření). Po dosazení do rovnice (1) lze vypočítat tzv. hydrodynamický průměr  $d_h$ . [62]

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

### **2.5.2 Elektroforetický rozptyl světla**

Elektroforetický rozptyl světla je metoda používaná pro stanovení zeta potenciálu částic. Zeta potenciál (ZP) je ekvivalent elektrokinetického potenciálu u koloidních disperzí. Ovlivňuje elektrochemické jevy probíhající na rozhraní mezi povrchovou vrstvou molekuly a okolního roztoku. Určuje elektrický náboj vznikající na povrchu částice ve vodném roztoku, jako důsledek existence nosičů náboje v roztoku (elektrony, ionty). Tyto nosiče náboje mají tendenci lokalizovat se na povrch částice v důsledku specifických interakcí. Následně dochází na povrchu částice k ustanovení rovnováhy pomocí protiiontů a vzniku tzv. elektrické dvojvrstvy. Ionty, které se nacházejí v této vrstvě jsou nepohyblivé z důvodu silných elektrostatických interakcí, naopak ionty nacházející se v roztoku mimo tuto vrstvu se volně pohybují. Velikost zeta potenciálu je poté elektrostatický potenciál na pomezí těchto dvou vrstev (*Obrázek 9*). Je možné jej stanovit pomocí elektroforetického rozptylu světla. [63]

Jedná se o metodu vhodnou pro charakterizaci povrchu nabitých koloidních soustav (stanovení jejich náboje) a slouží také ke stanovení dlouhodobé stability vzniklých roztoků. Za stabilní se roztoky považují mimo rozmezí -30 až 30 mV. [62]



Obrázek 9 - Zeta potenciál [64]

### 2.5.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Standardní optický mikroskop je schopný studovaný vzorek zvětšit přibližně 1000×. Limitací pro větší zvětšení je vlnová délka použitého záření (u optického mikroskopu vlnová délka světla). U elektronového mikroskopu je možné zvýšit energii elektronů na hodnotu až 1000 kV. Při takovéto energii se vlnová délka záření pohybuje v rozmezí 0,027–0,0009 nm. Při těchto vlnových délkách je pak možné dosáhnout zvětšení vzorku až 1 000 000×. [65]

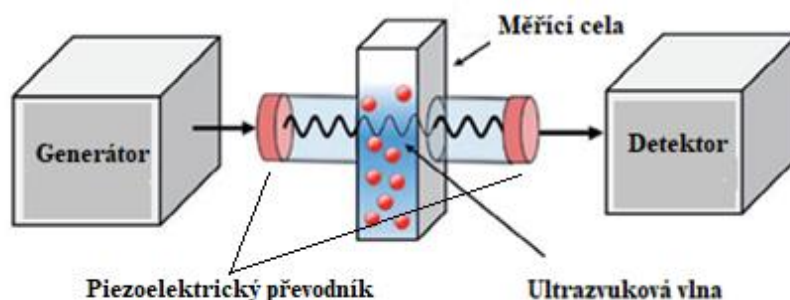
Skenovací elektronová mikroskopie (SEM), která pracuje na základě analýzy elektronů odražených od povrchu vzorku, nebo sekundárně uvolněných povrchem vzorku při interakci s paprskem primárních elektronů. Je schopná podat informaci o struktuře povrchu, krystalinitě, chemickém složení a elektrickém náboji přibližně prvního 1 μm vzorku. Pro hlubší analýzu je možné využít transmisní elektronovou mikroskopii, tzv. TEM, která se zaměřuje na analýzu elektronů prošlých studovaným vzorkem. [66]

#### 2.5.4 Vysokorozlišovací ultrazvuková spektroskopie

Jedná o spektroskopickou metodu založenou na analýze interakce vzorku s vysokofrekvenční zvukovou vlnou. Tato vlna má frekvenci řádově v rozmezí 20–100 kHz. Podle chování této vlny při průchodu vzorkem je možné stanovit různé parametry tohoto vzorku. Pomocí vysokorozlišovacího ultrazvukového spektrometru – HRUS (z angl. *High Resolution Ultrasonic Spectroscopy*), který je schopný studovat změny v rychlosti zvukové vlny až v řádu 0,0001 m/s je možné stanovit přítomnost probíhající chemické reakce, pokud známe chování jednotlivých molekul, tak lze stanovit i složení zkoumaného vzorku. Typickým využitím je poté oblast koloidní chemie, kde je možné HRUS použít pro studium agregace částic, gelace, krystalizace, tvorby micel či stanovení CMC roztoku. [67]

Technika je založena na studiu rychlosti a atenuace (zeslabení šíření) akustických vln šířících se ve vysokých frekvencích skrze studovaný materiál. Jedná se o přímou analytickou nedestruktivní metodu, která na rozdíl od klasicky používaných spektroskopických metod (např. UV–VIS), nemá problém s měřením, jakkoliv zabarveného či zakaleného vzorku. [68]

Typické uspořádání přístroje je poměrně jednoduché. Generátor produkuje elektrický signál, který rozkmitá piezoelektrický převodník. Produkované vlnění putuje skrz celou se vzorkem, respektive s referenčním materiálem směrem ke druhému převodníku, který mění signál zpět na elektrický a ten následně putuje do detektoru (*Obrázek 10*). Typický přístroj měří simultánně – komparativně, v jedné cele probíhá měření studovaného vzorku a ve druhé poté měření čistého rozpouštědla (blanku). [69]



Obrázek 10 - Schéma měřicí aparatury pro metodu HRUS [69]

#### 2.5.5 Reologie

Název této metody vychází z řeckého slova „rheos“, které ve volném překladu znamená „tekoucí“. To by mohlo evokovat, že se jedná o metodu studia pouze kapalin. Opak je však pravdou – název popisuje vliv střížného napětí na studovaný vzorek, čímž se také tato metoda zabývá. Vliv střížného napětí je možné popsat dvěma extrémy: tečením ideálně viskózních kapalin a deformací ideálně elastických pevných látek. Reálné materiály vykazují chování mezi těmito dvěma extrémy, tzv. viskoelastické vlastnosti. Po aplikaci napětí na ideální elastický materiál dochází k okamžité deformaci, která je po ukončení působení napětí naprosto anulována. Naopak u ideálně viskózních materiálů dochází k časově odložené deformaci, která je však trvalá. Viskoelastické materiály podléhají částečně okamžité deformaci a částečně odložené deformaci, které je možné do jisté míry „regenerovat“. [70]

Při studiu hydrogelů se používá reologie pro charakterizaci mechanických vlastností, a to především pomocí viskoelastických modulů. Zároveň je možné odhadnout hustotu zesítnění a pevnost vzniklých vazeb ve studovaném hydrogelu. [71]

### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Nosičové systémy v lékařství

Nejčastějšími cestami podání léčivé látky jsou orální formy (tablety, tobolky a jiné) případně inhalační systémy při plicním podání. Pokud je látka špatně vstřebatelná jednou z těchto cest, je další možností injekční podání. U obou forem může však být problémem postupné odbourávání léčivé látky a kolísání hladiny léčiva v těle pacienta do doby podání další dávky. Tomuto problému je možné předejít speciálně navrženým nosičovým systémem. Ten neslouží pouze jako inertní komponenta lékové formy, ale je schopný přímo ovlivňovat rychlost uvolňování aktivní látky případně její odbourávání chemickými reakcemi v těle. Jako takové nosiče se nejčastěji používají různé biologicky odbouratelné látky, u nichž není nutné zajistit jejich odstranění z organismu po uvolnění aktivní látky. Ke konkrétním příkladům patří různé termosensitivní hydrogely, biopolymery a lipozomy. Tyto látky však nemusí sloužit pouze jako částicový nosič léčivé látky, ale také jako makroskopická hmota, například pro modelaci nových tkání. [72]

V lékařství zažívají rozmach také nosičové systémy na bázi nanotechnologií. Podle studie *Jaynta a spol.* bylo, i přes nepřehledné množství dosud vyvinutých materiálů, a jejich navržených potenciálních aplikací, na trhu v roce 2018 celkem pouze 51 produktů schválených americkou FDA (ústav pro kontrolu léčiv) na bázi nanotechnologií zařazených do kategorie nosičů léčiv. Nejčastěji se jedná o nosiče specializovaných léčiv, které nemají ve většině případů jinou možnost aplikace. Například léčiv potenciálně toxických při standardních metodách podání nebo natolik nerozpustných, že není možná jejich aplikace přímo do krevního řečiště pacienta. [73]

#### 3.2 Použití biosurfaktantů v medicíně

Ačkoliv hlavním důvodem produkce biosurfaktantů mikroorganismy je nejčastěji umožnění utilizace obtížně ve vodě rozpustných látek v živných prostředích, některé mikroorganismy používají látky na bázi biosurfaktantů také jako ochranu před dalšími mikroorganismy. Hojně diskutované je tedy použití biosurfaktantů jako baktericidních či fungicidních prostředků. Zároveň jsou tyto látky schopné narušovat struktury tzv. biofilmů, největší potenciál k využití této schopnosti by poté mohl být v nemocnicích, kde se jako nejčastější patogen ve formě biofilmu vyskytuje *Staphylococcus aureus*, který je zároveň rezistentní k běžně používaným antibiotikům. [74]

Tým *Nguyen a spol.* provedl studii, ve které byl prokázán vliv sophorolipidu na redukcii biofilmů tvořených gram negativními bakteriemi. Zjistili také princip účinku, jelikož bylo zjištěno, že samotný sophorolipid není schopný ničit jednotlivé bakterie. Největším problémem u biofilmů je jejich kompaktnost a mechanická odolnost, kterou bakterie zajišťují produkcí extracelulárních polymerních substancí (EPS). Tyto látky slouží k vyplnění mezibuněčných prostor biofilmu. Sophorolipid je schopný solubilizovat právě tyto molekuly a tím pádem ubrat na kompaktnosti biofilmu a přispět k jeho snadnějšímu odstranění. Tým ve výzkumu poté pokračoval s kombinací sophorolipidu a dodecylsírany sodného (SDS). Vliv této kombinace byl pro studované biofilmy kritický – vzrostla účinnost solubilizace a zároveň úmrtnost bakterií tvořících biofilm. [75]

Dále lze využít biosurfaktanty jako antitumorozní agens. Ve studiích bylo prokázáno, že určité typy biosurfaktantů jsou schopné zpomalovat růst nádoru či dokonce navozovat apoptózu (čili buněčnou smrt) u nádorových buněk, při zachování normální funkce zdravých buněk. Jednalo se například o nádor prsu, prostaty či leukémii. Zároveň studie prokázala také to, že při použití biosurfaktantu došlo ke snížení rychlosti metastázování nádorů. [76]

V neposlední řadě se využití biosurfaktantů zvažuje také v případě nedostatečného množství plicního surfaktantu, které vede k plicnímu selhání u předčasně narozených dětí. Gen pro tvorbu plicního surfaktantu je však možné vložit do bakterií, které jej pak produkuje právě v podobě biosurfaktantu. Byly také prokázány například spermicidní účinky jistých typů těchto látek, ale například i vliv na snížení rychlosti projevu onemocnění AIDS či zmírnění nepříjemných projevů některých zánětů. [74]

### 3.2.1 Prakticky používané systémy

V moderní medicíně je snahou cílit léčbu co nejvíce specificky na konkrétní orgán, ideálně ve specifické koncentraci a specifickém čase, tak aby organismus pacienta musel odolávat co nejmenší zátěži způsobované danou léčbou. Trendem je tedy vytvářet speciální nosičové systémy, které umí léčbu zacílit a uvolnit přesnou dávku léčiva, bez zbytečných vedlejších účinků. Biosurfaktanty jsou díky své povrchové aktivitě ideálními kandidáty pro toto využití. Pro nosiče léčiv jsou důležité primárně dvě charakteristiky – nosná kapacita a schopnost cíleného uvolňování. Pro zlepšení těchto charakteristik se používají nejčastěji nosiče na koloidní bázi. Tyto látky pak zaujímají různá prostorová uspořádání – například nanočástice, lipidické částice, micely, případně vezikulární systémy typu lipozomů, noizomů a sfingozomů (Obrázek 11). U biosurfaktantů je uvažována také forma tzv. mikroemulze. [77]

Mikroemulze obsahují vodnou fázi, olejovou fázi, povrchově aktivní látku (a případně kosurfaktant). Právě složka surfaktantu ovlivňuje vznik a udává tvar různým samo vznikajícím agregátům (nejčastěji kulovitěho typu), které poté slouží jako matrice pro uchycení konkrétního léčiva. Problémem u tohoto typu nosiče, může být jeho teplotní, případně pH indukovaná změna konformace – to znamená, že je snaha o vytvoření takového systému, který by těmto vlivům odolával, případně jim vůbec nebyl vystaven – například při kožním podání léku. [77]

Dalším možným využitím biosurfaktantů v medicíně jsou nosičové systémy na bázi nanočástic typu *core-shell*. Tento typ nosičových systémů obsahuje minimálně dvě rozdílné látky, které tvoří v jednom případě nosnou strukturní komponentu (*core*) a ve druhém případě povrchové vlastnosti určující (případně modifikující) komponentu, která zajistí vznik obalové vrstvy částice (*shell*). Tým *Hazra a spol.* vytvořil takovéto nanočástice na bázi polymethylmethakrylátu (*core*) společně s rhamnolipidem (*shell*). Takto připravené nanočástice vykazovaly výrazně lepší fyzikálně – chemické vlastnosti než jejich syntetické analogy a zároveň bylo možné je vyrobit za nižší cenu. To bylo ovlivněno především lepší povrchovou aktivitou rhamnolipidu, který byl poté aplikován v mnohem menší koncentraci a zároveň nepůsobil toxicky na testované tkáně (na rozdíl o syntetického dodecylsírany sodného). Výhodou těchto nanočástic je také jejich antibakteriální aktivita – v případě zánětu v místě podání by měly pomáhat k jeho zpomalení. Tyto nanočástice vykazovaly také dobré vlastnosti pro cílené uvolňování například ibuprofenu. [78]

Biosurfaktanty ve formě tzv. nanostrukturálních lipidických nosičů (strukturně velmi podobné micelám) byly využity také při studiu léčby Alzheimerovy choroby. Pro léčbu, respektive zmírnění dopadů Alzheimerovy choroby se využívá složitá syntetická molekula, která slouží jako inhibitor cholinesterázy. Problémem s jejím dávkováním je její cílení, jelikož velice složitě prostupuje přes mozkovou bariéru. Právě díky strukturám tvořeným biosurfaktanty by mělo dojít k jejímu zabalení a snadnějšímu prostoupení k místu účinku v mozku. Zároveň lze tyto struktury vytvořit tak, aby cílily primárně právě na mozek a snížil se tím toxický vliv léčiva v jiných částech těla. [79]

Díky schopnosti biosurfaktantů (konkrétně rhamnolipidů) potlačovat zánět, zároveň indukovat sekreci prozánětlivých cytokinů, ale také ovlivňovat proliferaci kožních buněk, jsou tyto látky vhodnými kandidáty pro léčbu kožních onemocnění. Rhamnolipidy byly testovány s léčivými molekulami dexamethazonu a tacrolimu, které byly zabaleny v micelách těchto biosurfaktantů. Pro tato léčiva vykazovaly rhamnolipidy velmi dobrou nosnou kapacitu a zároveň bylo prokázáno, že jsou schopné toto léčivo transportovat přímo k místu žádaného účinku. [80]



Obrázek 11 - Různé formy agregátů [81]

### 3.3 Aktuální výzkum studované problematiky

Tým *Gonçalves a spol* provedl výzkum nanogelů určených pro použití jako nosičových systémů, ale také jako fluorescenčních značek pro studování buněčných struktur. Pro dlouhodobé uvolňování léčiva nejsou tyto struktury příliš vhodné, jelikož po aplikaci podnětu k indukci uvolnění léčiva (nejčastěji postupným odbouráváním nanogelové struktury) dochází k poměrně rychlému odbourání celého objemu disperzního prostředí gelu. V této studii tým provedl experimenty s „vytvrzením“ nanogelové struktury pomocí dendrimerů. Jedním z nejodolnějších gelů spadajícím do nanoměřítku byly alginátové gely síťované pomocí vápenatých iontů (obdobně jako v makro měřítku) – u těchto struktur byla průměrná velikost pórů přibližně 850 nm. Tato velikost již ovšem negativně ovlivňuje aplikační potenciál takových nanogelů – například z důvodu zhoršeného průchodu některými živočišnými strukturami (buněčnou stěnou, stěnami kapilár apod.). V případě použití dendrimerů jakožto matrice a pomocného síťovadla, došlo ke snížení velikosti pórovité struktury gelů na hodnotu přibližně 450 nm. [82]

## 4 Experimentální část

Důležitou součástí experimentální části předložené práce, byl výběr vhodných sloučenin pro konkrétní testované kompozice nosičových systému s obsahem biosurfaktantů. Z provedené literární rešerše lze získat hned několik možných variant, u kterých je předpoklad tvorby interakcí podmiňujících vznik mezimolekulových agregátů, případně hydrogelové sítě. V této práci jsme se zaměřili na kompozice získané z aniontových surfaktantů s nízkým CMC, u kterých je ve vodném roztoku předpokládána tvorba micelárních útvarů se záporným povrchovým potenciálem, v kombinaci s kationktivními polysacharidy, u nichž je očekávána elektrostatická interakce s micelami biosurfaktantu. Pro experimenty byly zvoleny dva typy biosurfaktantů a dva typy polysacharidů.

Rhamnolipidy a sophorolipidy, jakožto zástupci záporně nabitých biosurfaktantů, byly vybrány s ohledem na jejich poměrně dobrou cenovou dostupnost, obecnou biologickou a ekologickou nezávadnost a předpoklad případné dobré biodostupnosti a biodegradability při praktickém použití, ale také z důvodu zkušeností s jejich fyzikálně chemickou a strukturní analýzou získaných v rámci řešení mé bakalářské práce.

Diethylaminoethyl (DEAE) dextran a chitosan, zastupující kladně nabitě polysacharidy, byly vybrány obdobně jako biosurfaktanty z důvodu jejich dobré dostupnosti, poměrně snadné rozpustnosti ve vodných roztocích (u chitosanu v roztocích s kyselým pH), ale také jejich biodegradabilitě (kterou poslední studie naznačují i u DEAE dextranu [83]). Zároveň však byly vybírány takové sloučeniny, u kterých není popsán standardní postup přípravy gelu (jako je tomu například u želatiny či alginátu).

Uspořádání praktické části práce je poté seskupeno podle jednotlivých studovaných systémů. Chronologicky byly první experimenty prováděny s DEAE dextranem a rhamnolipidem, kde byla díky opačnému náboji těchto dvou částic očekávána silná iontová reakce a ve vyšších koncentracích byl z hlediska očekávaných interakcí předpoklad pro tvorbu gelů. S postupným zvyšováním koncentrace však k tvorbě gelů nedocházelo, proto byly agregáty vznikající v tomto systému studovány na molekulární úrovni. Dle očekávání, podobné vlastnosti vykazoval také systém se sophorolipidem. Jelikož však stanoveným cílem práce, bylo vytvořit gelovou strukturu, byla experimentální studie doplněna také o systémy, v nichž byl v roli kationktivní komponenty DEAE dextran nahrazen chitosanem, u kterého byl opět předpoklad vzniku iontově vázaných gelů. I přes úspěch ve tvorbě gelů, byly také v tomto systému ověřeny interakce na molekulární úrovni – primárně pro možnost porovnání s dextranovými systémy.

## **Použité přístroje a chemikálie**

- Analytické váhy
- ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- Nanophox (Sympatec GmbH)
- Vysokorozlišovací ultrazvuk (Ultrasonic Scientific)
- Reometr Discovery HR-2 (TA Instruments)
- Skenovací elektronový mikroskop EVO LS 10 (ZEISS) + vakuová napařovačka Polaron
- Lyofilizátor Benchtop K (VirTis)
- standardy biosurfaktantů (Rhamnolipid 90 % pure, AGAE Technologies; Sophorolipid lactonic, Carbosynth Ltd.; Sophorolipid acidic, Carbosynth Ltd.)
- DEAE Dextran Hydrochloride (Sigma Aldrich)
- Chitosan 168 kDa (Sigma Aldrich)
- Chitosan 250 kDa (Sigma Aldrich)
- Standardy hydrofobních barviv (Methylenová modř, Sigma Aldrich; Sudan black, Sigma Aldrich; Sudan Red, Sigma Aldrich)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

## 4.1 Systém DEAE Dextran a Rhamnolipid

Jako první byl v experimentální části práce připraven systém DEAE dextran v kombinaci s rhamnolipidem. Předpokladem bylo, že v koncentracích nižších, než je koncentrace počínajícího překryvu, se systém bude chovat jako micelární systém propojený pomocí jednotlivých dextranových řetězců, případně dextranem obalených micel rhamnolipidu. Při vyšších koncentracích poté byl předpoklad vzniku gelové struktury.

### 4.1.1 Studium interakcí na molekulární úrovni

Studium vznikajících agregátů tohoto systému bylo provedeno pomocí technik rozptylu světla – dynamického pro stanovení velikosti a elektroforetického pro stanovení zeta potenciálu (rhamnolipid nese záporný náboj, zatímco DEAE dextran kladný – právě iontové interakce těchto dvou molekul jsou předpokladem pro tvorbu zajímavých struktur). Následně byl pozorován vliv pH na velikost vznikajících molekul, ale také dlouhodobá stabilita vzniklých systémů. Nejzajímavější koncentrační poměry těchto látek byly podrobněji analyzovány z hlediska tvorby interakcí také pomocí vysokorozlišovací ultrazvukové spektroskopie.

#### 4.1.1.1 Měření pomocí technik rozptylu světla

Do 50 ml odměrných baněk byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých látek v maximálních koncentracích 10 g/l pro DEAE dextran a 1 g/l pro rhamnolipid. Následně byly pomocí desítkového ředění připraveny roztoky až do koncentrace 0,1 g/l pro dextran a 1 mg/l pro rhamnolipid. Úmyslem takto nízké koncentrace rhamnolipidu byla tendence o zjištění vlivu koncentrace vzhledem k CMC rhamnolipidu (která je přibližně na hodnotě 12 mg/l). Po prvotním měření byl připraven ještě roztok DEAE dextranu o koncentraci 0,5 g/l. Tyto roztoky byly řádně rozmíchány (protřepáváním při laboratorní teplotě) a po měření uchovávány v lednici.

Pro jednotlivá měření bylo napipetováno vždy konkrétní množství roztoku DEAE dextranu do roztoku rhamnolipidu o daných koncentracích se základním krokem 1 ml. Jednotlivé poměry ukazuje následující tabulka (*Tabulka 2*):

*Tabulka 2 – Poměry koncentrací pro pilotní screening*

CMC RL	0,012 g/l	jednotlivé poměry
c RL (g/l)	c DEAE dex (g/l)	
1	10	2:1; 1:1; 1:2
0,1	1	
0,01	0,5	
0,001	0,1	

Každý roztok byl proměřen technikou dynamického rozptylu světla přístrojem ZetaSizer Nano ZS pro určení velikosti vznikajících agregátů a následně tímtež přístrojem v režimu elektroforetického rozptylu světla pro stanovení zeta potenciálu (ZP). Zároveň byly proměřeny i čisté roztoky v jednotlivých koncentracích, aby byl stanoven vliv koncentrace na velikost a ZP vznikajících částic.

Pro měření velikosti částic byl přístroj nastaven následovně (*Tabulka 3*):

*Tabulka 3 - Nastavení přístroje ZetaSizer pro DLS*

typ měření	backscatter 173°
prostředí	voda při 25 °C
teplota měření	25 °C
doba ekvilibrace	180 s
kyveta	plastová 1 cm
počet měření	3
počet bodů měření	10
trvání měření	10 s
pozice měření	1 mm

Jednotlivé systémy byly proměřeny také v režimu elektroforetického rozptylu světla. Pomocí těchto experimentů byl stanoven Zeta potenciál a tím pádem i povrchový náboj jednotlivých molekul, případně vznikajících agregátů. Pro tato měření byly použity vzorky připravené pro studium pomocí dynamického rozptylu světla. Do stejné kyvety, ve které byla měřena velikost částic, byla vložena tzv. dip cela a přístroj byl nastaven dle následující tabulky (*Tabulka 4*):

*Tabulka 4 - Nastavení přístroje ZetaSizer pro měření Zeta potenciálu*

prostředí	voda při 25 °C
teplota měření	25 °C
doba ekvilibrace	180 s
kyveta	plastová 1 cm
měření ZP	„Dip cell“
počet měření	3
počet bodů měření	10

Nevýhodou přístroje ZetaSizer je nízká variabilita nastavení jak samotného měření, tak vyhodnocení naměřených dat. Zároveň se jedná o přístroj, který využívá tzv. autokorelačního měření. Jedná se o aparaturu, využívající jednoho laserového paprsku procházejícího středem kyvety a měření rozptýleného záření (u studovaných vzorků 173°). Některé z připravených vzorků proto byly proměřeny pomocí přístroje Nanophox, který nabízí tzv. kroskorelační měření. V této aparatuře prochází vzorkem dva laserové paprsky, jejichž rozptylová data jsou následně porovnávána. Další výhodou přístroje Nanophox je možnost detailnějšího nastavení vyhodnocení dat (výběr části naměřeného korelogramu pro vyhodnocení velikostní distribuce) a zároveň i samotného měření (*Obrázek 12*). Pro měření studovaných vzorků byla využita kroskorelační metoda a průchod vzorku v 90% osy X i Y, pro co největší snížení optické dráhy a tím eliminaci případného mnohonásobného rozptylu světla, který zvyšuje chybovost měření.

<b>product: PS pokus</b> refraction: 1.590 - 0.00000 i	<b>liquid: water</b> refraction: 1.330 viscosity: 0.890 mPas
<b>measuring cond.: TN - cross 90% XY</b> duration: 143.23 s temperature: 25.00 °C laser power: 100.00 %	<b>evaluation: WINDOX 5.7.0.0</b> rule: 1.10000nm:128(log) auto mode: NNLS
<b>measured correlation function:</b> amplitude: 14.30 % mean count rate ch.1: 1405.43 kcps mean count rate ch.2: 1087.01 kcps single scattering ratio: 68.74 %	<b>user parameters:</b> roztok: 2:1 1000mgRL:0.1gD mereni: 128.00 Parameter 3: Parameter 4:

Obrázek 12 - Příklad nastavení měřících parametrů přístroje Nanophox

#### 4.1.1.2 Studium vlivu pH

Jako další bylo provedeno měření vlivu pH na velikost a zeta potenciál vznikajících agregátů. Roztoky jednotlivých molekul byly připraveny jako při předchozích měřeních. Byly vybrány koncentrace s nejzajímavějšími výsledky měření jednotlivých látek z předchozích experimentů. Pro rhamnolipid se jednalo o koncentrace 500mg/l a 1000 mg/l. Pro DEAE dextran poté pro koncentraci 0,1 g/l. Následně však bylo pH těchto roztoků (jak roztoku rhamnolipidu, tak roztoku dextransu) upraveno pomocí 0,1M HCl a 0,1M NaOH na hodnoty přibližně 5, 6, 7, 8.

#### 4.1.1.3 Stabilitní studie vzniklých agregátů

Pro stabilitní studie byly využity připravené roztoky jednotlivých molekul. Roztoky byly smíchány do 10 ml vialek, uzavřeny pomocí plastových víček a následně utěsněny parafilmem. Roztoky byly skladovány v lednici. Tyto roztoky následně byly měřeny v časových intervalech po dobu jednoho měsíce.

#### 4.1.2 Podrobnější studium interakcí pomocí kombinace ultrazvukové spektroskopie a rozptylových technik

Interakce v systému DEAE dextran a rhamnolipid byly ověřeny také pomocí vysokorozlišovací ultrazvukové spektroskopie. Pro tato měření byly připraveny roztoky obdobně jako při měření velikosti částic. Byl vybrán poměr koncentrací 1 g/l rhamnolipid a k němu byl následně titrován roztok 2 g/l DEAE dextransu, aby bylo dosaženo výsledného poměru koncentrací 1:1 a byla tudíž možná korelace s měřením pomocí metody DLS.

Interakce zjištěné pomocí vysokorozlišovacího ultrazvuku byly následně ověřeny také pomocí rozptylových technik. Pro tento experiment byly stejným způsobem připraveny čerstvé roztoky vzorků použitých pro studium pomocí ultrazvuku (viz výše).

### 4.2 Systém DEAE Dextran a Sophorolipid

Obdobně jako u systému DEAE dextran a rhamnolipid byla předpokládána tvorba komplexnějších micelárních systémů v případě nižších koncentrací dextransu. Naopak u vyšších koncentrací, než je koncentrace počínajícího překryvu, byl předpoklad tvorby makromolekulárních struktur ve formě gelů.

#### **4.2.1 Studium interakcí na molekulární úrovni**

Pro pilotní analýzu byly vytvořeny roztoky dvou typů sophorolipidů – laktonické a kyselé formy. Tyto látky byly rozmíchány ve 25 ml odměrných baňkách v koncentracích 1000; 500 a 250 mg/l pro kyselý sophorolipid a 1000 a 500 mg/l pro laktonický. U kyselého sophorolipidu byl z podstaty jeho struktury větší předpoklad elektrostatických interakcí, a tudíž bylo zvoleno větší koncentrační rozmezí. Jelikož bylo předpokládáno obdobné chování jako u rhamnolipidu, pro laktonický sophorolipid byl zvolen koncentrační rozsah, který v případě rhamnolipidu vykazoval nejzajímavější agregační chování.

Následně byla provedena také detailní analýza v koncentračním rozmezí stanoveném pomocí HRUS pro systém rhamnolipid a DEAE dextran. Pro tyto experimenty byl do 25 ml odměrných baněk připraven roztok 2 g/l DEAE dextranu a 1 g/l kyselého sophorolipidu.

### **4.3 Systém Chitosan a Rhamnolipid**

Jelikož chitosan je znám svými vynikajícími gelotvornými vlastnostmi, byl u těchto systémů předpokládán vznik makromolekulárních gelů. Pro možnost porovnání s agregací rhamnolipidů s DEAE dextranem byly však vytvořeny i zředěné systémy, které byly studovány pomocí rozptylových technik. Gely byly následně tvořeny z koncentrovanějších roztoků chitosanu i rhamnolipidu. Pro podporu gelace bylo u některých experimentů využito také vlivu pH. Pro tyto experimenty byly využity dvě molekulové hmotnosti – vyšší molekulová hmotnost 250 kDa a nižší molekulová hmotnost 168 kDa.

#### **4.3.1 Studium interakcí na molekulární úrovni**

Pro studium interakcí na molekulární úrovni byly opět připraveny roztoky chitosanu i rhamnolipidu o nižších koncentracích. Do 50 ml odměrných baněk byly připraveny roztoky rhamnolipidu o finálních koncentracích 1000; 500 a 250 mg/l a roztoky jednotlivých molekulových hmotností chitosanu o koncentracích 1000; 600 a 200 mg/l.

#### **4.3.2 Tvorba gelů**

Pro tvorbu chitosanových gelů byly zvoleny dva různé přístupy. Rozpouštěním chitosanu v kyselině chlorovodíkové dochází ke vzniku poměrně nízkoviskózního roztoku, který nabízí snazší manipulaci se vzorkem. Jeho nevýhodou pro tvorbu gelů je však právě jeho tekutost – je značně obtížné vytvořit kompaktní kapku, která se v roztoku gelačního činidla (v tomto případě roztok rhamnolipidu s vlivem změny pH) ihned nerozptýlí v celém objemu. V případě rozptýlení přikápnuté kapky k tvorbě gelu nedochází.

Druhou možností je poté rozpouštění chitosanu v kyselině octové. Tyto roztoky naopak vytvářejí značně viskózní hmotu, která je na vzduchu při postupném vysoušení rozpouštědla schopná samovolně tvořit téměř gelové struktury. Jejich výhodou je poté samozřejmě kompaktnost přidávaných kapek. Nevýhodou je však vyšší obtížnost s jejich manipulací (například možnost přelít tyto roztoky do stříkačky, případně je nabrat do Pasteurovy pipety a následně je z nich opět dostat ve formě kapek).

#### ***4.3.2.1 Gely z chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové***

Pro tyto experimenty byly připraveny roztoky chitosanu v 0,1 M kyselině chlorovodíkové. Do odměrné baňky na 100 ml bylo naváženo potřebné množství chitosanu, který byl následně rozpouštěn ve 30 ml kyseliny chlorovodíkové na magnetické míchačce po dobu 24 hodin. Po rozpuštění chitosanového prášku bylo pH roztoku upraveno na hodnotu přibližně 5,5 pomocí 0,2 M hydroxidu sodného a následně byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou. Poté byl roztok opět přibližně 24 hodin promícháván na magnetické míchačce. Finální koncentrace připravených chitosanových roztoků byly 5; 6,5; 10; 30 g/l.

Byl proveden také experiment, kdy byl celý objem odměrné baňky naplněn pouze kyselinou chlorovodíkovou (po vzoru kyseliny octové, viz další kapitola). Tyto roztoky se však ukázaly jako nevhodné pro zamýšlené experimenty.

#### ***4.3.2.2 Gely z chitosanu rozpuštěného v kyselině octové***

Do 50 ml odměrných baněk bylo naváženo potřebné množství chitosanu. Ty byly následně doplněny do plného objemu různě koncentrovanou kyselinou octovou a chitosanový prášek byl rozpouštěn přibližně po dobu 48 hodin (do úplného rozpuštění, v závislosti na koncentraci chitosanu i použité kyseliny se čas nezbytný pro kompletní rozpuštění poměrně lišil) na magnetické míchačce. Finální koncentrace chitosanu v roztoku byla 20 a 30 g/l. Byly provedeny experimenty i s méně koncentrovanými roztoky, u těch však docházelo k rozpuštění po přikápnutí do většího objemu rhamnolipidu. Pro studované systémy byla použita 1; 3 a 5 % kyselina octová.

#### ***4.3.2.3 Vizuální studium sušení a bobtnání gelů***

Jelikož připravované gelové kapky mají relativně malý objem a značnou nasákavost, nebyly použity standardně prováděné gravimetrické studie z důvodu předpokladu vysoké chybovosti měření. Vliv sušení a bobtnání gelů byl pozorován vizuálně, na vzorcích připravených z roztoku chitosanu v kyselině chlorovodíkové (viz kapitola 4.3.2.1). Tyto gely byly na Petriho misce vloženy na 20 minut do sušárny nastavené na 50 °C. Po 20 minutách byla Petriho miska vyjmuta ze sušárny a po krátkém ochlazení gelů na laboratorní teplotu byly zality čerstvým vodným roztokem rhamnolipidu o koncentraci 10 g/l.

### **4.4 Systém Chitosan a Sophorolipid**

U tohoto systému bylo očekáváno obdobné chování jako v případě kombinace chitosanu s rhamnolipidem. V nižších koncentracích proto byly směsi měřeny pomocí rozptylových technik. Konkrétně se jednalo o koncentrace přejaté z měření pomocí HRUS u systému rhamnolipid a DEAE dextran. U vyšších koncentrací bylo využíváno stejných postupů jako ve výše zmíněném systému pro tvorbu gelů.

#### **4.4.1 Studium interakcí na molekulární úrovni**

Z předchozí studie bylo zjištěno, že laktonický sophorolipid nevykazuje vhodné chování pro detailnější studii v tomto směru. Proto byl pro studium interakcí na molekulární úrovni vytvořen pouze vzorek čistého kyselého sophorolipidu o koncentraci 1 g/l do 50 ml odměrné baňky. Ten byl následně napipetován v objemu 1 ml do 1 mm kyvety (1×1 mm šířka a hloubka) a byl do něj postupně přidáván roztok chitosanu o molekulové hmotnosti 250 kDa a koncentraci 2 g/l.

#### **4.4.2 Tvorba gelů**

Pro tvorbu gelů byly využity stejné roztoky chitosanu jak v případě systému chitosan a rhamnolipid. Roztoky sophorolipidů byly připraveny do 50 ml odměrných baněk ve finální koncentraci 10 g/l. Obdobně jako v předchozím systému byly připraveny dva roztoky, jeden v deionizované vodě a druhý v 0,5 M hydroxidu sodném.

#### **4.5 Porovnání jednotlivých systémů**

Po vyhodnocení chování jednotlivých směsí byly tyto systémy podrobeny také vzájemnému porovnání vlastností k možnosti stanovení jejich vhodnosti jako potenciálních nosičových systémů. Byly porovnávány jak interakce na molekulární úrovni (především u směsí s obsahem DEAE dextranu), tak vlastnosti připravených gelů (u směsí s chitosanem). Jednotlivé výsledky jsou přebrány z dříve provedených experimentů a pouze porovnány mezi sebou z hlediska jejich chování.

#### **4.5.1 Studium interakcí na molekulární úrovni**

Pro porovnání jednotlivých systémů byla použita data naměřená separátně pro jednotlivé systémy. Jednalo se vždy o 1 ml roztoku biosurfaktantu v kyvetě o koncentraci 1 g/l, do kterého byl přidáván roztok kationaktivního polysacharidu o koncentraci 2 g/l po 0,1 ml. U takovýchto roztoků byla měřena velikost vznikajících agregátů a následně také jejich zeta potenciál.

#### **4.5.2 Tvorba gelů ve větším objemu**

Tvorba gelů studovaných v této práci je ve větším objemu z hlediska jejich kompaktnosti poměrně obtížná. Často dochází k rozptýlení chitosanového roztoku do celého objemu síťovacího činidla a tím pádem velkému naředění, přičemž nedochází ke gelaci (případně velmi obtížně). Byly proto vybrány roztoky, které tvoří co nejvíce kompaktní gely. Pro porovnání vlastností a ověření možnosti tvorby těchto gelů ve větším objemu, byly do dvou 50 ml odměrných baněk připraveny dva rozdílné roztoky. Jeden roztok chitosanu o molekulové hmotnosti 250 kDa a koncentraci 10 g/l ve 3 % kyselině octové a druhý roztok stejného chitosanu rozpuštěného v objemu 15 ml 0,1 M kyselině chlorovodíkové, po rozpuštění následující částečnou neutralizací 0,1 M NaOH na pH 5,5 a následném doplnění do celého objemu deionizovanou vodou.

Vytvořené gely byly díky jejich většímu objemu oproti ostatním do tohoto bodu vytvářeným gelům, podrobeny základní gravimetrické analýze. Gely byly zlehka osušeny buničitou vatou a přeneseny na předem zváženou plastovou váženku. Poté byly na Petriho misce na hodinu vloženy do sušárny. Po této době byly opět zváženy a zalily čerstvými roztoky jejich síťovacích činidel. Po hodinové rehydrataci byl jejich povrch opět zlehka osušen a byly znovu zváženy. Orientačně tak byly stanoveny obsahy jejich sušin a schopnost rehydratace.

### 4.5.3 Studium mechanických vlastností vzniklých gelů

Pro reologická měření byla vytvořena poměrně rozsáhlá baterie vzorků pro možnost porovnání jejich mechanických vlastností. Všechny tyto gely byly vytvářeny podle předchozích postupů a jednalo se o různé kombinace gelotvorných komponent (detailní popis jednotlivých kompozic je uveden v tabulce níže (Tabulka 5) i s výsledky z reologických měření. Před samotným reologickým měřením byly vzorky vyjmuty z roztoku síťovacího činidla a lehce osušeny buničitou vatou. Přístroj byl pro měření nastaven následovně:

Tabulka 5 - Nastavení reometru Discovery HR-2

Použitá aparatura	
paralelní deska	Peltierova
průměr	8 mm
měřicí mezera	1 mm
Nastavení měření	
teplota měření	25 °C
frekvence	1 Hz
amplituda	0,01 – 1000 %
počet bodů na dekádu	6

Pro porovnání jednotlivých vlastností byly použity průměrné hodnoty ztrátového úhlu  $\gamma$  (vypočítaného z hodnot  $\tan \delta$ ) a komplexního viskoelastického modulu (vypočítaného z druhé odmocniny součtu druhých mocnin jednotlivých naměřených modulů  $G'$  a  $G''$ ) z oblasti lineární viskoelastivity a dále amplitudy deformace odpovídající bodu křížení těchto modulů (tzv *crossover*, při kterém  $G' = G''$ ) ve kterém se zkoumaný vzorek nachází přesně na pomezí chování elastické pevné látky a viskózní kapaliny.

### 4.5.4 Ověření solubilizačních schopností

Pro studium solubilizace byly použity tři různá barviva – methylenová modř, súdánská čern a súdánská červeň. Do Petriho misek připravených roztoků biosurfaktantů (vodných i zásaditých), čistých rozpouštědel (deionizovaná voda a 0,5 M NaOH) a pro porovnání také s etanolem bylo vždy nasypáno malé množství práškového barviva a byl pozorován vliv jednotlivých rozpouštědel na zbarvení roztoku.

Po této pilotní studii a ověření rozpouštěcích vlastností barviv, případně solubilizačních vlastností biosurfaktantů byly připraveny roztoky súdánské černi a červeně ve vodných a zásaditých roztocích biosurfaktantů. Následně byly do zásaditých roztoků přikápnuty roztoky chitosanu ve 3 % kyselině octové o koncentracích 20 a 30 g/l připravené na dřívější experimenty. Obdobně tomu bylo s vodnými roztoky BS, do kterých byly přikapávány roztoky chitosanu s upraveným pH na hodnotu 5,5 původně rozpuštěné v 0,1 M kyselině chlorovodíkové o koncentracích 6,5; 10 a 30 g/l.

Byla ověřena také schopnost čerstvého roztoku BS vymývat hydrofobní barviva z gelové struktury. Tento experiment měl simulovat schopnost uvolnění hydrofobních léčiv z případných nosičových systémů. Byly použity nabarvené gely vzniklé v předchozím kroku experimentu, které byly přeneseny do čisté Petriho misky a přelity čerstvým roztokem BS (podle postupu vytvoření – pro chitosany v kyselině chlorovodíkové vodným roztokem, v kyselině octové potom zásaditým roztokem).

#### **4.5.5 Studium vnitřní struktury gelů pomocí elektronové mikroskopie**

Pro studium vnitřní struktury pomocí elektronové mikroskopie byly připraveny gely obvyklými způsoby. Byly využity vzorky z chitosanu rozpuštěného v kyselině octové a následně zesíťované ve dvou roztocích rhamnolipidů (vodném a 0,5 M hydroxid sodný). Jelikož se jednalo o pilotní studii, nebyly pro tuto metodu připraveny sophorolipidem síťované gely ani gely vytvořené z chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové.

Připravené gely byly přeneseny do 40 ml plastových nádobek, ve kterých byly zality přibližně 10 ml deionizované vody a následně v tomto větším objemu zamraženy. Takto připravené vzorky byly následně lyofilizovány pro odstranění vody z celé struktury vzorku.

Před samotnou SEM analýzou byly vzorky připevněny na grafitový nosič a pozlaceny ve vakuové napařovačce z důvodu zvýšení vodivosti. Následně byly pozorovány pod elektronovým mikroskopem s nastaveným urychlovacím napětím 5 kV (z důvodu křehké studované struktury) a metodou sekundárních elektronů. Zvětšení pro jednotlivé snímky bylo pozorováno 100×; 500×; 1000× a 5000×.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Systém DEAE Dextran a Rhamnolipid

Na základě literární rešerše byla kombinace těchto roztoků zvolena jako vhodný modelový systém pro studium vzájemných iontových interakcí s primárním očekáváním tvorby gelů při vyšších koncentracích těchto látek. K systému bylo nejprve přistupováno tzv. kádinkovou metodou – jednotlivé roztoky byly v různých koncentracích postupně slévány. Takto však nebyl sledován vznik očekávané, makroskopicky pozorovatelné gelové struktury. Proto byly tyto systémy podrobeny detailnější analýze interakcí na molekulární úrovni.

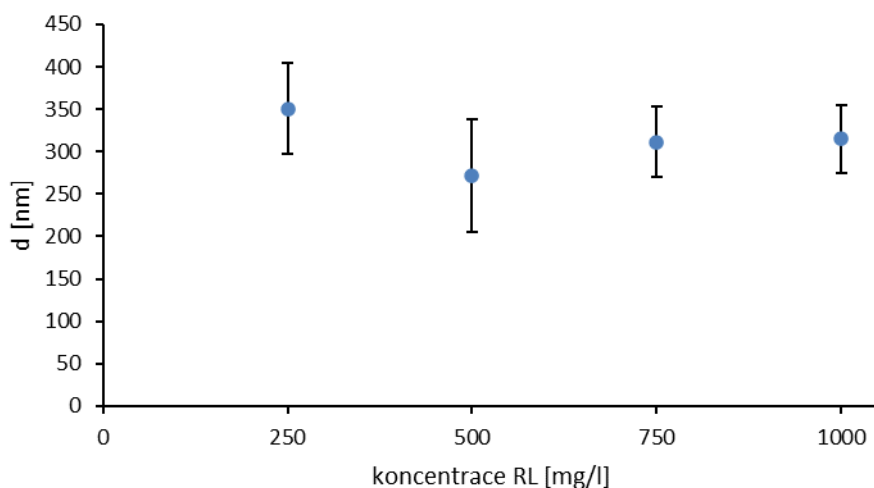
#### 5.1.1 Studium interakcí na molekulární úrovni

Pro toto studium byla využita primárně technika dynamického rozptylu světla pro stanovení velikosti částic a elektroforetický rozptyl světla pro stanovení povrchového náboje částic. Při zjištění specifického chování v určitých koncentračních poměrech bylo využito také ultrazvukové spektroskopie. Na základě tohoto specifického chování poté byly studovány také dále popsané systémy.

##### 5.1.1.1 Měření pomocí technik rozptylu světla

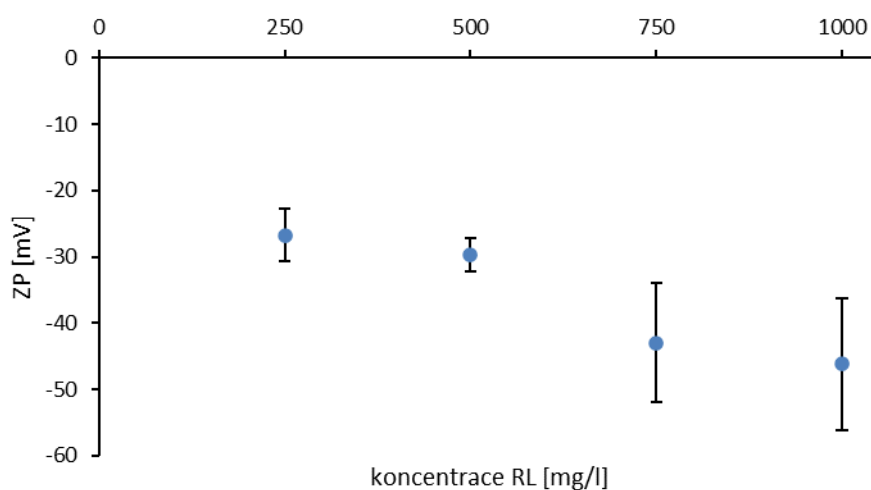
Pro možnost odhadu interakcí v jednotlivých systémech byla vždy proměřena velikost částic v roztocích samotných molekul. Při těchto měřeních bylo zjištěno, že pro velmi zředěné roztoky rhamnolipidu (přibližně pod 50 mg/l) dochází k vysoké chybovosti měření. Korelační křivky těchto měření začínají velmi nízko a tyto výsledky nelze považovat za příliš relevantní. Jedná se o poměrně překvapivý výsledek, jelikož jde o koncentraci poměrně vysoko nad CMC rhamnolipidu (ta je přibližně na hodnotě 12 mg/l). Tato chybovost může být způsobena relativně malým počtem vzniklých micel a jejich difuzi po celém objemu roztoku a tím pádem také nízkou koncentrací micel rhamnolipidu v analyzovaném roztoku.

Toto tvrzení potvrzuje také následující graf (*Obrázek 13*), na kterém je možné vidět velikost tvořících se agregátů v závislosti na koncentraci připraveného roztoku rhamnolipidu. Je možné pozorovat poměrně malé rozmezí velikosti částic s téměř řádovým posunem koncentrace roztoku – což odpovídá typickému chování micel. Každá další molekula přidaná do roztoku se stává součástí micely, dochází však k rovnoměrnému rozprostření těchto molekul, a tudíž jednotlivé micely obsahují přibližně stejné množství molekul povrchově aktivní látky, což odpovídá také přibližně stejné velikosti agregátů. Drobné rozdíly mohou být způsobeny například rozdílnou délkou zbytku mastné kyseliny či obsahem nečistot (používané rhamnolipidy mají výrobcem definovanou čistotu 90 %).



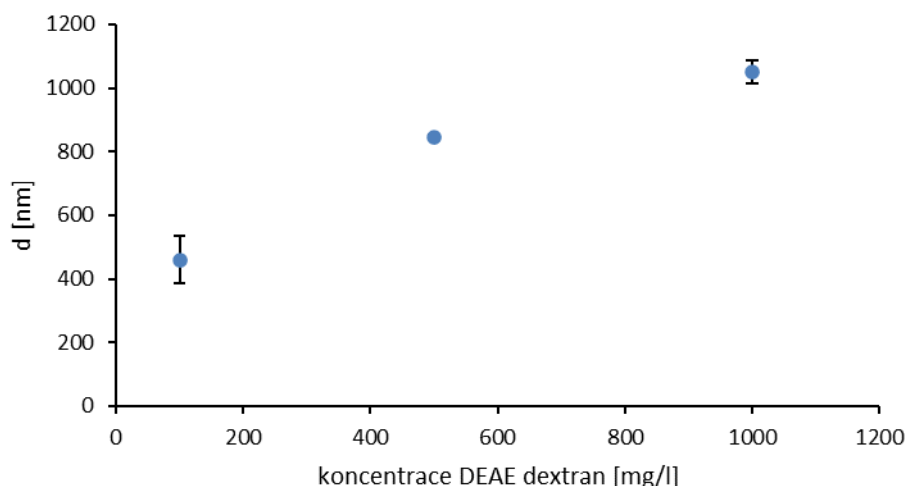
Obrázek 13 – Závislost velikosti částic na koncentraci rhamnolipidu

Na stejných vzorcích byl následně proměřen také zeta potenciál jednotlivých částic. S rostoucí koncentrací lehce klesá zeta potenciál vznikajících agregátů do stále zápornějších hodnot. Tento trend se dá teoreticky vysvětlit zvyšováním koncentrace RL v roztoku a s tím spojeným lehce rostoucím agregačním číslem pro jednotlivé micely. Nejedná se však o příliš výraznou změnu – ta by se projevila také rostoucí velikostí agregátů. Všechny agregáty v koncentraci nad 100 mg/l se nacházejí za hranicí stability a tvoří tedy poměrně stálé nanočástice (Obrázek 14).



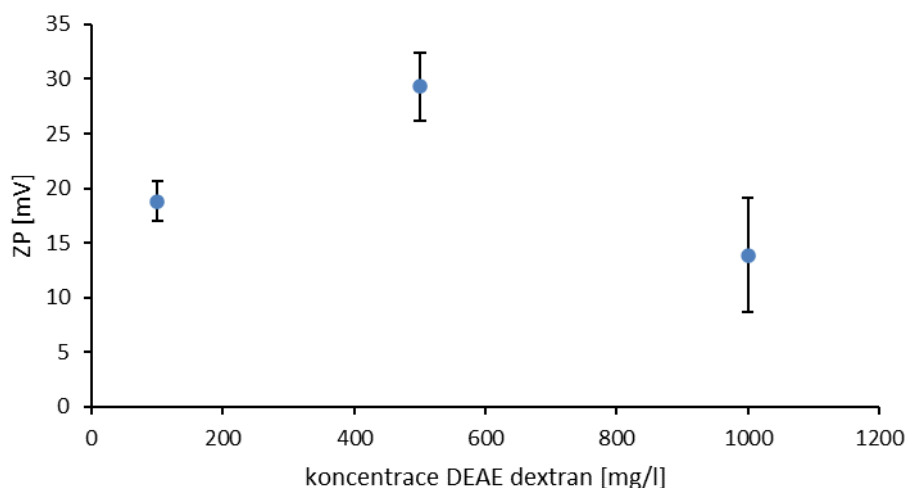
Obrázek 14 - Závislost zeta potenciálu na koncentraci rhamnolipidu

Naopak v případě DEAE dextranu dochází s rostoucí koncentrací ke zvětšování velikosti vznikajících polymerních klubek (Obrázek 15). Tento jev je dobře vysvětlitelný strukturou samotného dextranu. Jelikož se jedná o lineární polysacharid, s řetězcovou strukturou, je velice pravděpodobné, že v případě roztoku s vyšší koncentrací dochází k tvorbě různých překryvů a zaplétáním jednotlivých řetězců poté ke vzniku větších částic, které jsou pozorovatelné pomocí DLS. Dalším možným vysvětlením by bylo tvoření různých konformací (smršťování a natahování) jednotlivých řetězců na bázi odpuzivých sil souhlasně nabitých iontů – ostatních molekul DEAE dextranu. To by však bylo pravděpodobnější v případě snižující se koncentrace a zároveň rostoucí velikosti studovaných částic.



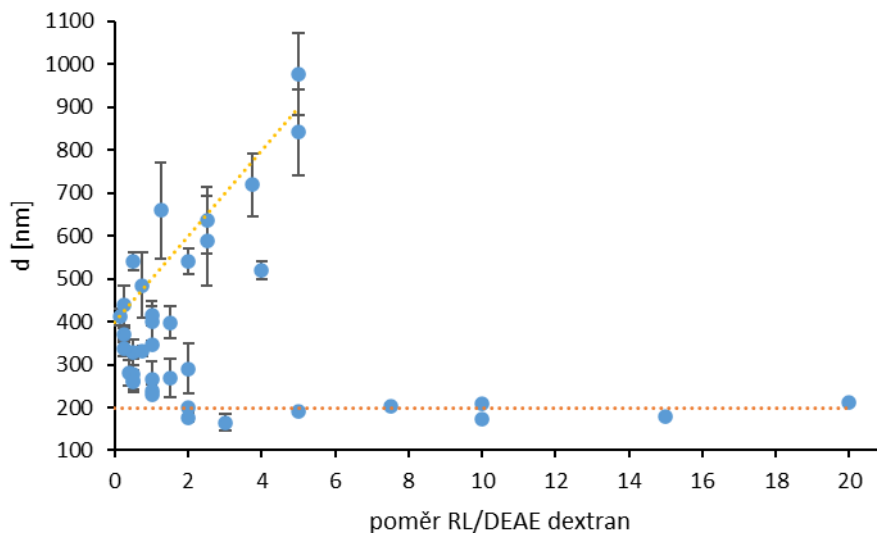
Obrázek 15 – Závislost velikosti částic na koncentraci DEAE dextranu

U roztoků dextransu nebyl pozorován žádný výrazný trend vlivu koncentrace na zeta potenciál jednotlivých koncentrací roztoku. To může být způsobeno například tím, že se jedná o méně uniformní systém, než je tomu v případě rhamnolipidu. Zároveň se zeta potenciál jednotlivých vzorků pohyboval spíše pod hranicí stability (pro koncentraci 500 mg/l na hranici stability, viz Obrázek 16).



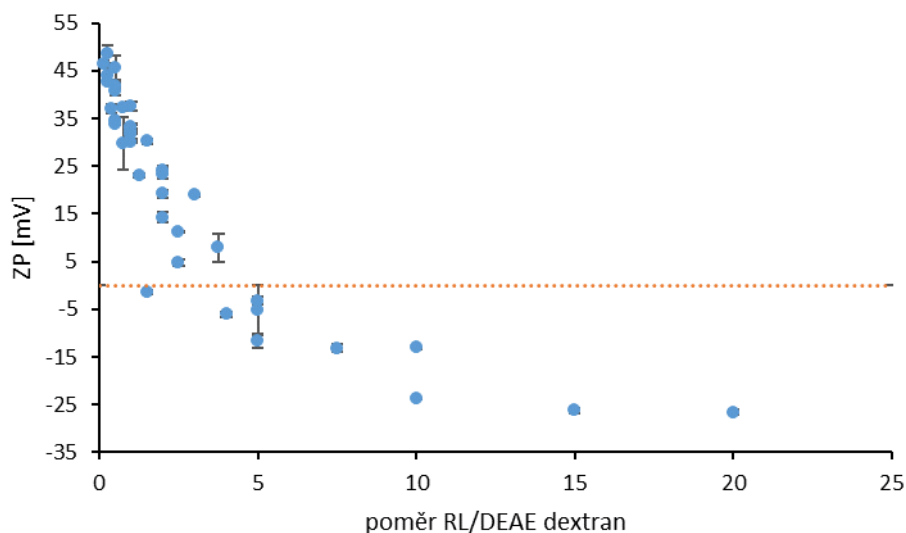
Obrázek 16 - Závislost zeta potenciálu na koncentraci DEAE dextranu

Obdobně jako samotné roztoky studovaných komponent byly následně proměřeny také jejich různé kombinace. Byl pozorován poměrně zajímavý trend, kdy u některých poměrů koncentrací docházelo k tvorbě značného (okem viditelného) zákalu vzorku. Dalším zajímavým trendem je poté fakt, že od hodnoty hmotnostního poměru RL/DEAE dextran 5 dochází ke vzniku přibližně stejně velkých částic, a to nezávisle na použité původní koncentraci jednotlivých roztoků (Obrázek 17). Do této hodnoty poměru se objevují dvě možnosti. U vyšších koncentrací rhamnolipidu smíchaných s nižší koncentrací dextransu dochází ke vzniku poměrně velkých agregátů (rozhodně větších, než jsou samotné micely rhamnolipidu). Při použití nižších koncentrací rhamnolipidu ve větším množství, a naopak vyšších koncentrací DEAE dextransu v menším množství dochází ke vzniku menších částic, velikostí srovnatelných s micelami samotného rhamnolipidu a s částicemi detekovanými u vyšších hmotnostních poměrů RL/DEAE dextran.



Obrázek 17 - Velikost vznikajících agregátů v závislosti na poměru koncentrací (přerušované čáry znázorňují dva pozorovatelné trendy)

S přihlédnutím k zeta potenciálu těchto částic (jedná se o stejné roztoky) se dá tento trend rostoucí velikosti v určitých hmotnostních poměrech vysvětlit jako vznik micel rhamnolipidu, přičemž jednotlivé micely jsou provázány dlouhými řetězci DEAE dextranu – pomocí dynamického rozptylu světla je tudíž možné pozorovat vznik větších agregátů v roztoku (Obrázek 18). Naopak u vyšších poměrů koncentrací ve prospěch rhamnolipidu, může velice pravděpodobně docházet k obdobnému obalování micel pomocí řetězců dextranu, který však díky rostoucímu hmotnostnímu poměru ve prospěch rhamnolipidu již není schopný provazovat jednotlivé micely mezi sebou. To způsobí klesající trend zeta potenciálu s rostoucími poměry jednotlivých roztoků a zároveň se jedná o vysvětlení vzniku obdobně velikých agregátů – micel.



Obrázek 18 - Závislost zeta potenciálu na poměru koncentrací (přerušovaná čára označuje nulovou hodnotu zeta potenciálu a s tím související převládající náboj v roztoku)

Ověření naměřených hodnot velikostí pomocí přístroje ZetaSizer bylo provedeno na jedné sérii vzorků pomocí přístroje Nanophox. Bylo zjištěno, že průměr vznikajících agregátů nejmenší velikosti, tedy pravděpodobně jednoduchých micel, je přibližně stejný a pohybuje se v okolí 150 nm. Překvapivé jsou ovšem výsledky u některých konkrétních koncentračních poměrů studovaných roztoků (*Tabulka 6*). Zatímco ZetaSizer naměřil největší částice u systému RL o koncentraci 250 mg/l s 0,1 g/l DEAE dextranem, u přístroje Nanophox to byl systém 500 mg/l RL s 0,1 g/l DEAE dextranem. Oba přístroje mají jiné nastavení vyhodnocení měření, ale také samotné nastavení měřicí pozice – to by však nemělo mít tak výrazný vliv na posun koncentrace, při které dochází ke vzniku velikých agregátů. Největší vliv na měřené hodnoty mělo tedy pravděpodobně samotné míchání roztoků a s tím související faktor jiných kyvet pro každý přístroj. Zatímco ZetaSizer používá klasické kyvety s optickou dráhou 1 cm, u přístroje Nanophox se používají tzv. UVette s výrazně nižším vnitřním objemem. Je tedy možné, že vlivem menšího celkového objemu vzorku došlo k většímu ulpívání vznikajících agregátů na stěnách kyvety a případně jejich koagulaci. S tím souvisí také zhoršená možnost promíchání vzorku a tím pádem dochází k posunutí hranice vzniku větších agregátů.

*Tabulka 6 - Velikost vznikajících agregátů – porovnání ZetaSizer a Nanophox (autokorelace; kroskorelace)*

	ZetaSizer	Nanophox
poměr složek 2:1	d [nm]	
1000 mg/l RL:0,1 g/l DEAE dex	188,7	134,1
500 mg/l RL:0,1 g/l DEAE dex	173,0	1480,3
250 mg/l RL:0,1 g/l DEAE dex	915,7	189,5

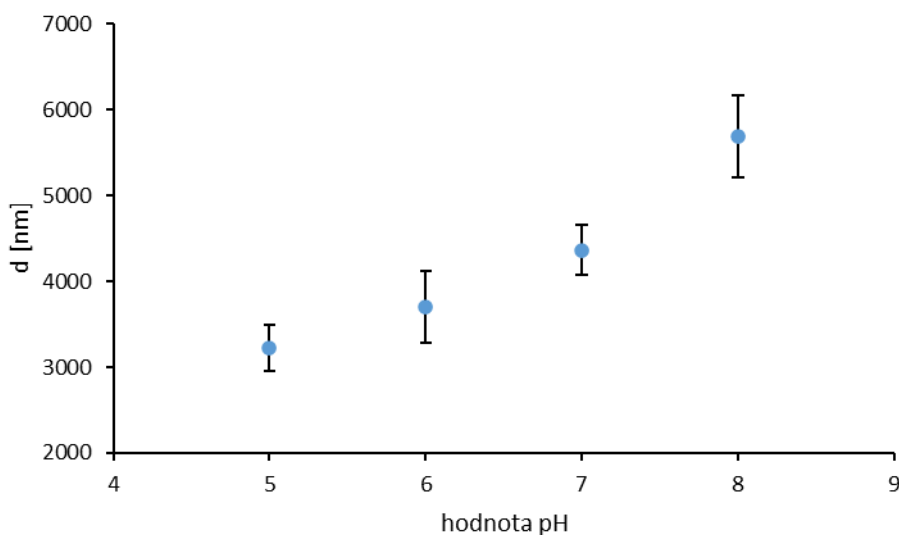
V následující tabulce (*Tabulka 7*) jsou uvedeny výsledky detailněji proměřených koncentračních poměrů pro jednotlivé koncentrace rhamnolipidu. Je patrné, že při určitém koncentračním poměru dochází ke vzniku větší agregátů, které při dalším zvýšení poměru ve prospěch RL opět ztrácí svou nabytou velikost. Tato informace následně vedla také k myšlence detailnějšího proměření interakcí v okolí těchto bodů pomocí ultrazvukové spektroskopie.

*Tabulka 7 - Porovnání velikostí změřených pomocí přístroje ZetaSizer*

ZetaSizer	poměr	d [nm]
1000 mg/l RL:0,1 g/l DEAE dex	1:2	191,6
	1:1	209,5
	2:1	210,9
500 mg/l RL:0,1 g/l DEAE dex	1:2	172,8
	1:1	976,8
	2:1	401,0
250 mg/l RL:0,1 g/l DEAE dex	1:2	841,3
	1:1	278,7
	2:1	231,8

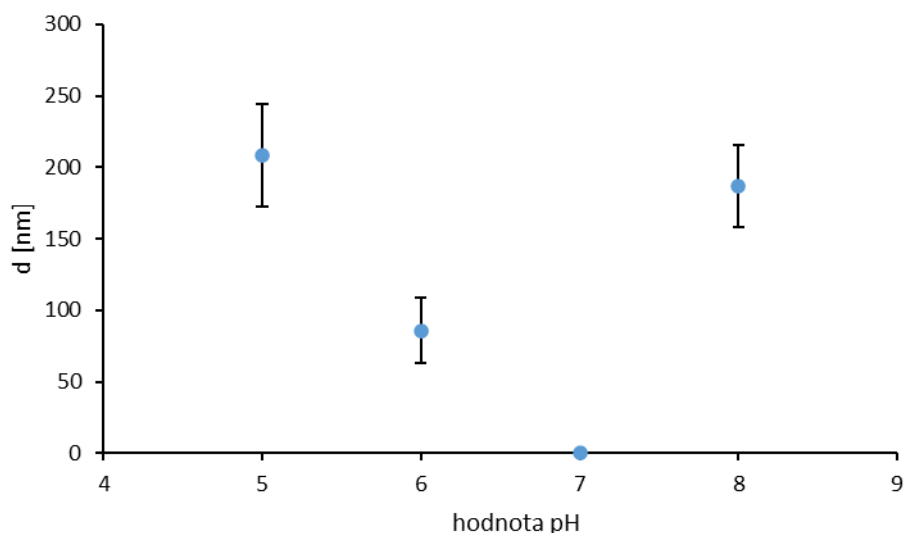
### 5.1.1.2 Studium vlivu pH

Vliv pH byl pozorován na dvou různých systémech tvořených různou koncentrací rhamnolipidu. Bylo také ověřeno, že při hodnotách pH nižších než 4 dochází k vysrážení rhamnolipidu z roztoku, proto bylo rozmezí studovaného pH stanoveno na rozsah hodnot 5–8. Při těchto hodnotách dochází k výraznému zvýšení velikosti vznikajících agregátů. Při měření těchto vzorků je patrný téměř lineární trend rostoucí velikosti částic s rostoucí hodnotou pH. To je pravděpodobně způsobeno vyšší hodnotou efektivního náboje v roztoku rhamnolipidu a tím pádem dochází k častějším interakcím a vzniku větších molekul. Další možností je vliv pH na jednotlivé molekuly, u kterých následně dochází ke vzniku rozdílných konformací. U RL by se mohlo jednat například o jiný typ micel (z kulovitého na oválný), u DEAE dextranu poté například o jiné prostorové konformace řetězce (například větší natažení celého řetězce). Při porovnání výsledků z těchto experimentů s výsledky z předchozích měření, je možné pozorovat velmi vysoký nárůst ve velikosti částic (řádově v jednotkách mikrometrů). Proto byly vzorky pro studium pH podrobeny ještě druhé analýze, u které byla použita filtrace (stříkačkovými filtry), aby byl vyloučen vliv nečistot.



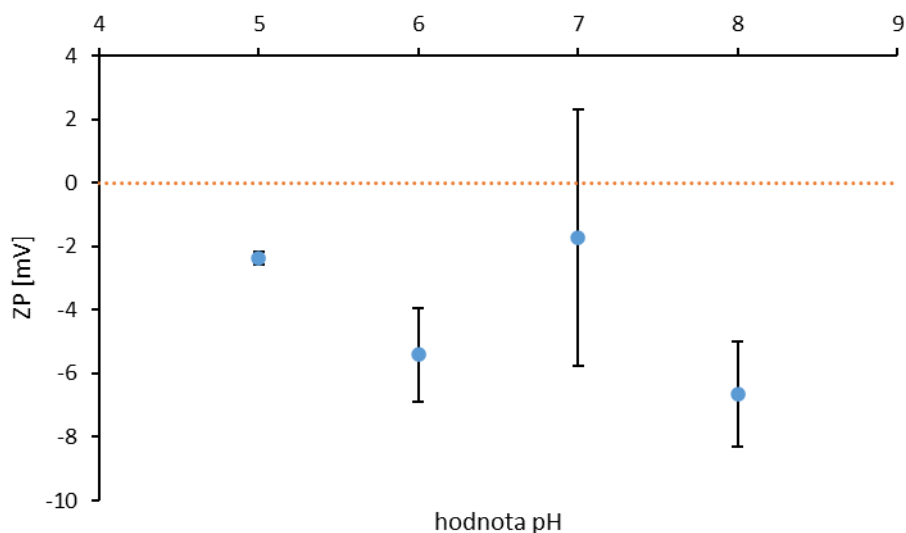
Obrázek 19 - Závislosti velikosti částic na pH roztoku bez filtrace (0,1 g/l DEAE dextran v poměru 1:1 s 0,5 g/l RL)

Pro měření stejných roztoků byla použita filtrace (pomocí stříkačkového filtru na 450 nm), po níž docházelo k vyšším výchozím hodnotám korelačních funkcí (známka kvality měření). Filtrací byly pravděpodobně odstraněny různé nečistoty a případně se jednalo také o další faktor, který přispíval k promíchání roztoků a tím pádem i zvýšení četnosti interakcí mezi jednotlivými roztoky. Po těchto měřeních bylo však od filtrace studovaných roztoků upuštěno, jelikož docházelo k souběžnému odfiltrování i téměř všech vznikajících agregátů. (bez filtrace Obrázek 19; s filtrací Obrázek 20)



Obrázek 20 - Závislost velikosti částic na pH roztoku s filtrací (0,1 g/l DEAE dextran v poměru 1:1 s 0,5 g/l RL)

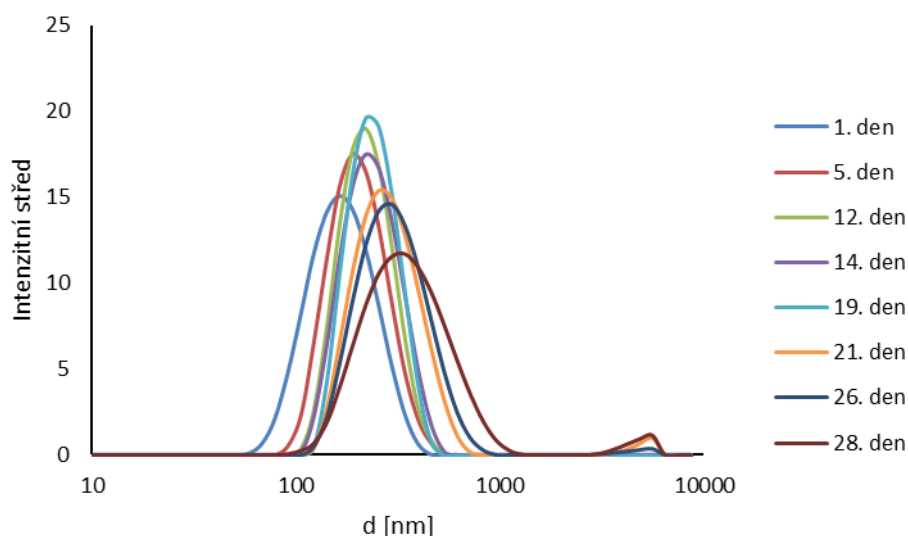
S přihlédnutím k naměřenému zeta potenciálu vzniklých částic je možné konstatovat, že se nejedná o příliš stabilní struktury. Oproti strukturám studovaných v původním pH roztoku došlo k mírnému snížení naměřeného zeta potenciálu (Obrázek 21). Měřené vzorky (0,1 g/l DEAE dextran s 0,5 g/l RL) odpovídají koncentračnímu poměru RL/DEAE dextran 5. V tomto bodě se nacházejí za původních podmínek dva trendy. Jeden stabilnější s přibližnou velikostí vznikajících agregátů v řádech nižších stovek nanometrů. Druhý, méně stabilní s hodnotami velikosti lehce přesahující tisíc nanometrů. Hodnoty zeta potenciálu u těchto roztoků vycházejí v rozmezí hodnot -5 až -10 tedy obdobně jako u vzorků se změněným pH roztoků.



Obrázek 21 - Závislost zeta potenciálu na pH roztoku bez filtrace (0,1 g/l DEAE dextran v poměru 1:1 s 0,5 g/l RL)

### 5.1.1.3 Stabilitní studie vzniklých agregátů

Poměrně dlouhodobou stabilitní studií bylo ověřeno, že při vzniku větších agregátů RL/DEAE dochází k prodloužení stability zkoumaných vzorků. Systém DEAE dextran a rhamnolipid byl studován po dobu 28 dní. Během této doby docházelo pouze k nepatrnému narůstání velikosti částic (způsobené především nečistotami nacházejícími se u velikých poloměrů částic a tím pádem i posunu průměrné velikosti částic). Starší roztoky vykazují také o něco vyšší polydisperzitu systému, která naznačuje že pravděpodobně dochází k jistému narušování kompaktních struktur a případné degradaci jejich částí. Na rozdíl od směsí dochází u čistých roztoků zkoumaných látek k poměrně rychlé koagulaci, která se projevuje výrazným nárůstem průměrů vznikajících částic (Obrázek 22).



Obrázek 22 – Průměrná velikost částic u systému 1:1; 1000 mg/l RL :0,1 g/l DEAE dextran

U roztoku rhamnolipidu dochází také k barevné změně – roztok mění svoji barvu z oranžové spíše na světle žlutou a lehce zakalenou. Naopak v roztoku DEAE dextranu dochází k tvorbě malých agregátů, které jsou následně velice pravděpodobně napadány plísní (tyto částice nebyly studovány, ale nacházel se na nich pro plíseň typický povlak – tyto vzorky byly vyřazeny z další analýzy). Velikosti vznikajících částic jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 8):

Tabulka 8 - Tabulka velikostí vznikajících částic při stabilitní studii

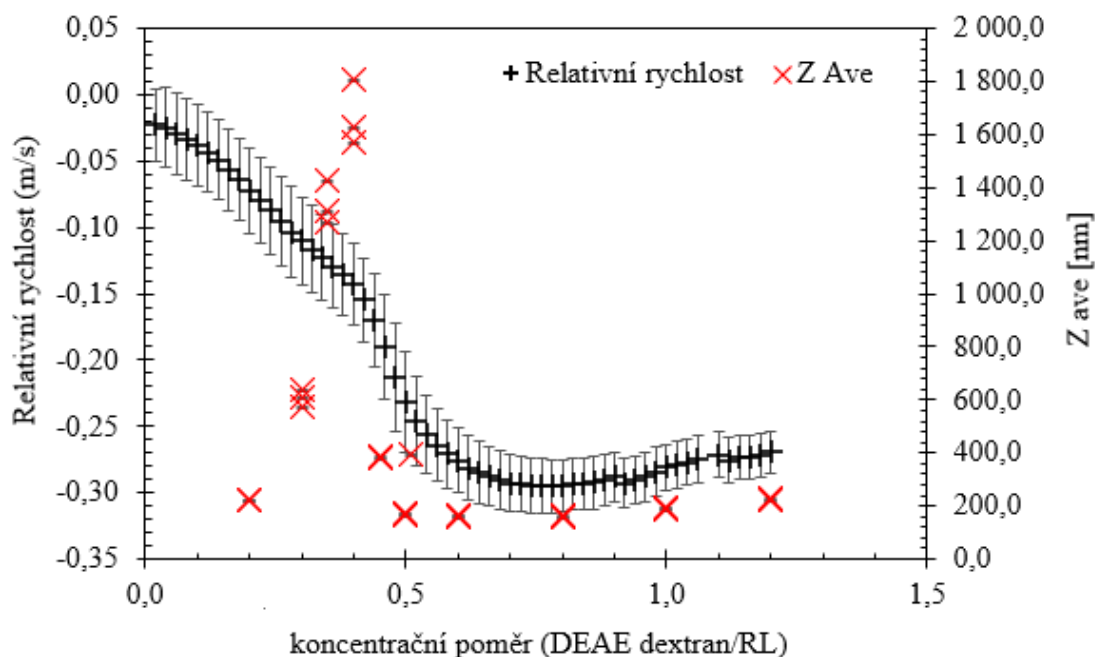
	vzorek		
	RL	DEAE Dex	1000:0,1
den	d [nm]		
1.	345,6	282,4	176,0
5.	785,6	1490,0	210,0
12.	1016,1	1527,0	228,7
14.			242,6
19.			244,2
21.			386,9
26.			360,4
28.			514,3

### 5.1.2 Podrobnější studium interakcí pomocí kombinace ultrazvukové spektroskopie a rozptylových technik

Pomocí vysokorozlišovací ultrazvukové spektroskopie byly ověřeny interakce v jednom konkrétním systému DEAE dextran + rhamnolipid. Z titrační podstaty měření a omezení možného objemu přídatku byl zvolen koncentrovanější roztok DEAE dextranu. Díky uzavřené konstrukci přístroje a nemožnosti vyjmutí měřící cely v průběhu měření bohužel nebylo možné vizuálně porovnat optické vlastnosti měřeného vzorku. Pomocí této metody byla ověřena molekulární interakce studovaného systému. Do koncentračního poměru (DEAE dextran/RL) přibližně 0,4 dochází ke snižování relativní rychlosti ultrazvuku, což značí rostoucí velikost částic (*Obrázek 23*). Nejpravděpodobnějším vysvětlením v tomto případě je výskyt rhamnolipidových micel, jelikož trend je lineární od nulového přídatku (v tuto chvíli v roztoku micely být jednoznačně musí, protože se jedná o koncentraci rhamnolipidu silně převyšujících jeho CMC). Tento trend byl následně ověřen a potvrzen pomocí měření dynamického rozptylu světla stejných vzorků ve stejných poměrech koncentrací.

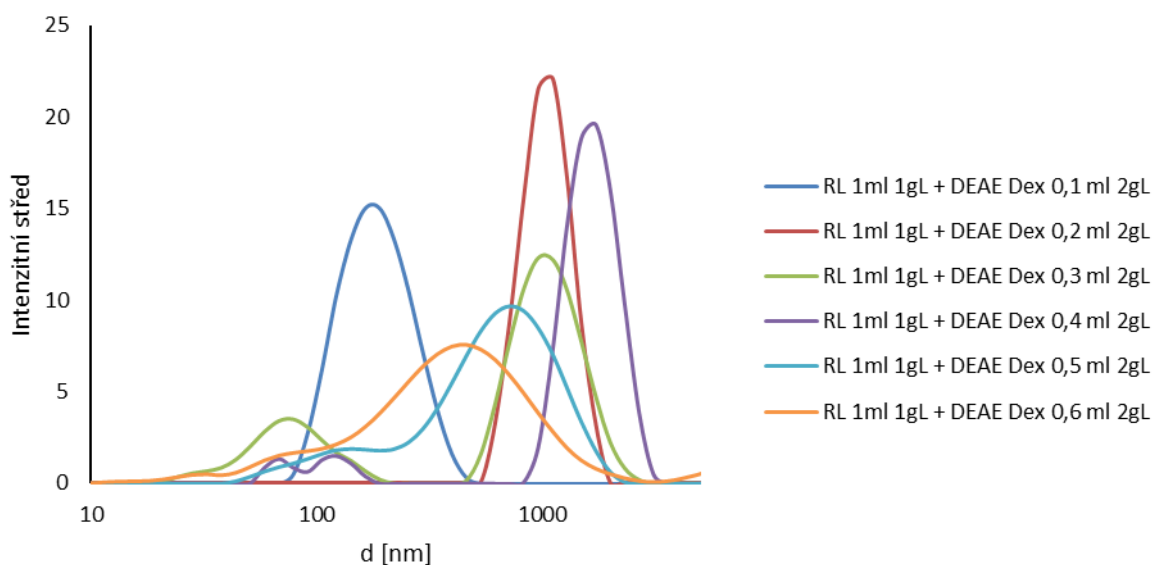
Po překonání koncentračního poměru 0,4 dochází k rychlejšímu poklesu relativní rychlosti a následně k její stagnaci a lehkému růstu. Z hlediska velikosti částic dochází od poměru 0,5 ke stagnaci a tvoří se přibližně stejně velké agregáty. Jak je již zmíněno výše, tento jev se dá vysvětlit postupným růstem velikosti vznikajících útvarů s rostoucí koncentrací DEAE dextranu v roztoku – dochází k provázání jednotlivých micel pomocí dextranových řetězců. Po překonání určité koncentrace dojde nejspíše k preferenci obalení povrchu micel celými řetězci DEAE dextranu (před provázáním jednotlivých micel) solubilizaci nově přidaných dextranových řetězců, a tím pádem již nedochází ke zvětšování vznikajících agregátů. To může souviset s umožněním hustějšího uložení dextranových řetězců a efektivnější neutralizaci jejich kladných nábojů na povrchu micely, což při rostoucí koncentraci DEAE snižuje míru odpuzivých sil mezi segmenty DEAE dextranu a tím pádem dochází také ke snížení volné energie systému.

Pro další práci by bylo vhodné analogicky proměřit také různé další roztoky. Jednak směsí stejných látek a o stejných finálních koncentračních poměrech, ale vytvořených jinou prvotní koncentrací. Dále také chování ve vyšších koncentračních poměrech (to se však na grafu jeví konstantně) a samozřejmě i rozdílných směsí (se sophorolipidy jakožto biosurfaktanty a chitosanem jakožto polysacharidem)



Obrázek 23 - Korelace velikosti částic k relativní rychlosti změřené pomocí HRUS

Pomocí přístroje ZetaSizer bylo zjištěno, že se jedná o vzorky z hlediska velikostní distribuce velmi heterogenní (Obrázek 24). U třetího vzorku (s přidavkem 0,3 ml DEAE dextranu) se však nachází poměrně velké množství částic s velikostí lehce pod 100 nm. Mohlo se jednat o některé volné polysacharidové řetězce (sbalená klubka z důvodu odpuzivých sil okolních agregátů), velikostí by sem mohly spadat také neprovázané micely nebo agregáty DEAE dextranu s případnými volnými molekulami RL (málo pravděpodobné s ohledem na koncentraci značně převyšující CMC). Trend je totiž jinak jednoznačně rostoucí, s maximem při přidavku 0,4 ml. Následuje poměrně strmý pokles velikosti vznikajících agregátů a jednotlivé křivky vykazují také značnou polydisperzitu. To může značit právě rozpad provázaných struktur na menší nestejněměrné složky.



Obrázek 24 - Velikost částic v systému DEAE Dextran + Rhamnolipid

V následující tabulce jsou uvedeny číselné hodnoty průměrné velikosti částic při „titračním“ (jednalo se vždy o manuální přidání 0,1 ml DEAE dextranu do již proměřeného objemu vzorku) měření. Je patrný rostoucí trend do celkového objemu přidaného DEAE dextranu 0,4 ml. Po překonání tohoto koncentračního poměru následuje jistý pokles (*Tabulka 9*). To by mohlo opět značit tvorbu dextranem provázaných micelárních struktur, či větších micel obalených dextranem. Po překonání jisté koncentrace (v tomto případě přídavek 0,5 ml) dochází již k přílišnému naředění roztoku a vznikající síť se postupně rozvolní. S přidavkem vodného roztoku DEAE dextranu dochází k poměrovému snížení počtu micel na daný objem a tím pádem může hrát roli i prostá difuze – polysacharidové řetězce nejsou dostatečně dlouhé (či natažené), aby byly schopny propojit dvě micel ve vzdálenostech větších, než tomu bylo u méně naředěného vzorku. Jistý vliv na naměřenou velikost částic může mít i vznikající zákal, který může narušovat optickou dráhu laserového paprsku nebo způsobovat mnohonásobný rozptyl, čímž dochází ke zkreslení naměřených dat.

*Tabulka 9 - Číselné hodnoty průměrné intenzitní velikosti částic v závislosti na poměru koncentrací – „titračně“ (přidávání objemu do již měřeného roztoku) (1 ml 1 g/l RL + přídavek 2 g/l DEAE dextran)*

$V_{\text{DEAE Dex}}$ [ml]	d [nm]
0,1	193,0
0,2	1061,3
0,3	850,5
0,4	1566,0
0,5	668,6
0,6	540,3

*Tabulka 10 - Číselné hodnoty průměrné intenzitní velikosti částic a zeta potenciálu v závislosti na poměru koncentrací – tvořeny nové roztoky (uvedeno v Obr. 23) (1 ml 1 g/l RL + přídavek 2 g/l DEAE dextran)*

$V_{\text{DEAE Dex}}$ [ml]	d [nm]	ZP [mV]
0,1	343,1	-6,0
0,2	1680,3	2,8
0,3	242,5	25,0
0,4	198,2	32,7
0,5	241,2	33,6
0,6	329,5	35,9

Hodnoty získané měřením „titračně“ byly ověřeny také proměřením vždy nově vytvořeného roztoku do suché kyvety. Největší velikost vykazovaly částice vytvořené přidavkem 0,2 ml DEAE dextranu (*Tabulka 10*) a tento roztok byl také viditelně nejvíce zakalený. Znatelný zákal se tvořil také u dalších dvou roztoků (přídavek 0,3 a 0,4 ml), u těchto vzorků již však velikost částic klesla na nižší hodnoty, které vykazuje i zbytek koncentrační řady. S přihlédnutím ke studiu interakcí pomocí HRUS je však nutné konstatovat, že přídavek 0,2 ml DEAE dextranu, odpovídá koncentračnímu poměru na počátku strmého lineárního klesání relativní rychlosti ultrazvukové vlny, což se dá vysvětlit právě vznikem rozměrově větších agregátů. Oproti předchozí tabulce je viditelný rozdíl především v krajních hodnotách. Zatímco u nově připravovaných roztoků se velikost pohybuje v přibližně stejných číslech, u „titračního“ měření je maximum posunuto k vyššímu koncentračnímu poměru a zároveň k opětovnému zmenšování částic (větším přidavkem – ředěním) dochází velmi pozvolna.

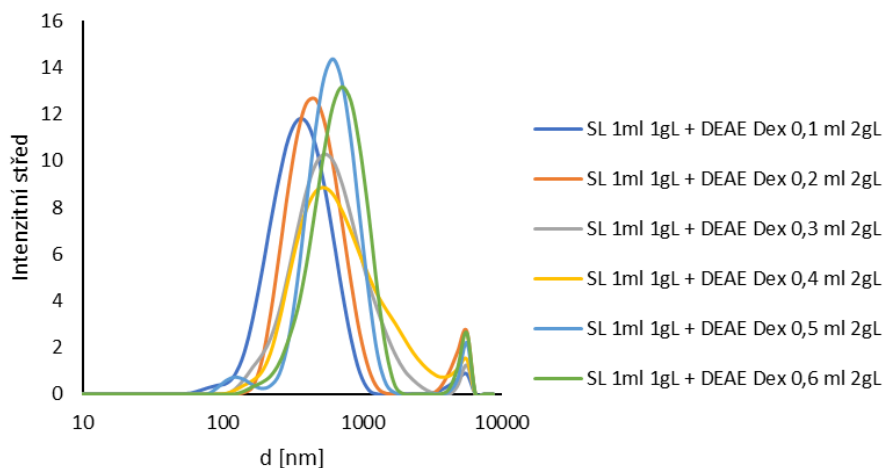
Za stabilní se dají považovat pouze molekuly vzniklé přidavkem minimálně 0,4 ml DEAE dextranu. Tyto systémy vykazují tvorbu obdobně velikých částic, z hlediska polydisperzity se však značně liší. Především přídavek 0,5 ml vykazuje zvýšenou polydisperzitu oproti ostatním studovaným koncentračním poměrům.

## 5.2 Systém DEAE Dextran a Sophorolipid

Jelikož u předchozího systému nebylo dosaženo stanoveného cíle, kterým byla tvorba makrostruktury v podobě gelu, byly provedeny experimenty na systému DEAE dextran a sophorolipid. Z důvodu jeho kyselé povahy (tím pádem vyššího efektivního náboje) je kyselý sophorolipid nadějnou volbou v případě nutnosti zvýšení interakcí ve studovaném systému.

### 5.2.1 Studium interakcí na molekulární úrovni

Pomocí rozptylových technik byla změřena velikost a ZP vzniklých částic. Po předchozích experimentech ověřených pomocí ultrazvukové spektroskopie, byla použita stejná koncentrační řada a také stejné poměry přídávku (do 1 ml 1 g/l SL byl postupně po 0,1 ml přidáván DEAE dextran o koncentraci 2 g/l). Oproti systému s rhamnolipidem došlo ke kumulaci velikostí měřených částic v okolí 800 nm (Obrázek 25). To znamená že dochází ke zvýšení velikosti studovaných agregátů, ale také vyrovnaní výraznějších rozdílů mezi jednotlivými koncentračními poměry. V okolí 10  $\mu\text{m}$  se však nachází různě intenzivní agregáty, které způsobují posun číselných hodnot k vyšším průměrům. Největší polydisperzitu (tudíž i největší obsah větších molekul) vykazuje vzorek s přídávkem 0,4 ml DEAE dextranu.



Obrázek 25 - Velikosti částic v systému DEAE Dextran + Sophorolipid

Zeta potenciál vytvořených molekul se nachází vždy nad kladnou hranicí stability a dosahuje v porovnání s předchozím systémem vyšších hodnot (Tabulka 11). To značí iontově převládající vliv DEAE dextranu nad sophorolipidem (hodnoty naměřené pro samostatný SL jsou uvedeny v přílohách). Jelikož však vznikající částice mají stále stejnou velikost může se jednat o specifické interakce, u kterých dochází k tvorbě DEAE dextranem obalených či provázaných struktur.

Tabulka 11 - Číselné hodnoty průměrné intenzitní velikosti částic a zeta potenciálu v závislosti na poměru koncentrací (1 ml 1 g/l SL + přídavek 2 g/l DEAE dextran)

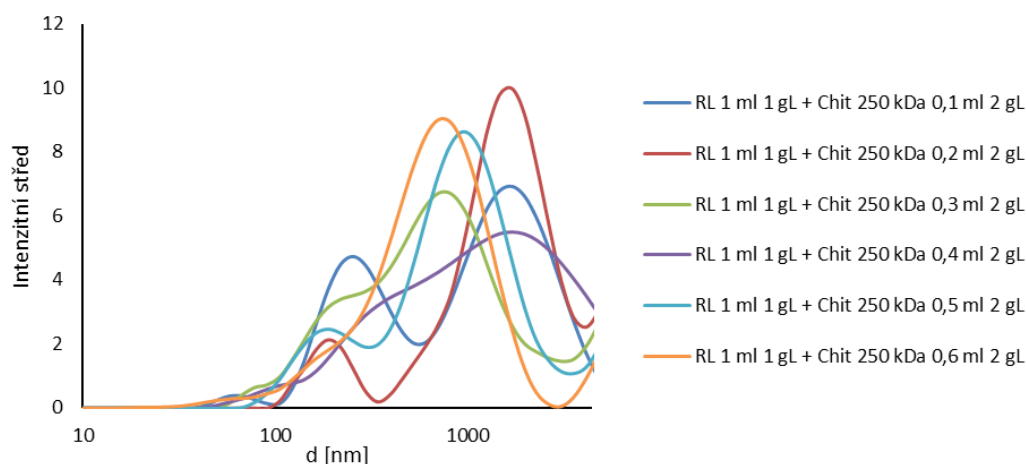
$V_{\text{DEAE Dex}}$ [ml]	d [nm]	ZP [mV]
0,1	479,8	30,9
0,2	741,7	41,2
0,3	743,9	40,2
0,4	959,3	42,9
0,5	769,0	46,4
0,6	902,0	45,9

### 5.3 Systém Chitosan a Rhamnolipid

Ani změna používaného roztoku biosurfaktantu nezajistila tvorbu makrogelových struktur. Proto bylo přistoupeno také k výměně polysacharidu, jakožto hlavní komponenty gelové struktury. Chitosan byl zvolen z důvodu jeho kladného náboje, prokazatelné a relativně jednoduše regulovatelné gelovací schopnosti a dobře dostupných rozdílných molekulových hmotností pro dosažení větší variability studovaných systémů a jejich vlastností.

#### 5.3.1 Studium interakcí na molekulární úrovni

Opět byly využity koncentrační poměry získané z měření ultrazvukovou spektroskopií (1 ml o koncentraci 1 g/l RL a k tomu postupně přidáváno 0,1 ml 2 g/l chitosanu). Vzniklé agregáty této směsi vykazují značnou polydisperzitu, a proto je poměrně složité odhadnout reálnou velikost vznikajících částic (Obrázek 26). Velice pravděpodobně nedochází k tak silným interakcím, aby byly všechny molekuly jednotlivých roztoků navázány do vznikajících útvarů, a to způsobuje také zvýšenou polydisperzitu částic (obdobný, avšak výraznější trend než u systému s DEAE dextranem). Druhou možností je naopak vznik natolik silných interakcí, které nejsou však natolik řízené jako u systému s DEAE dextranem. Jedná se tedy o neřízené potkávání molekul jednotlivých složek a vzniku agregátů, případně gelů (toto vysvětlení také lépe podporuje vznik gelové struktury). U těchto směsí byla opět pozorována poměrně vysoká chybovost způsobená velkými částicemi (okolo 10  $\mu\text{m}$ ), které však nejsou relevantní, jelikož se nacházejí na hranici rozlišovací schopnosti přístroje a jedná se pravděpodobně o nečistoty.



Obrázek 26 - Velikosti částic v systému Chitosan 250 kDa + Rhamnolipid

Oproti systémům obsahující DEAE dextran došlo opět ke zvýšení průměrné velikosti částic, jak je však popsáno výše, značný vliv může mít polydisperzita velikostí včetně úseků v okolí velikostí částic 10  $\mu\text{m}$ . Nedochází však k řádovému zvýšení velikosti částic v určitém koncentračním poměru, jak tomu bylo u roztoků s dextranem.

Zeta potenciál vznikajících molekul se nachází mimo hranici stability a s rostoucím přídatkem lze pozorovat výrazný růst ke kladným hodnotám (Tabulka 12). Z hlediska velikosti částic není patrná žádná korelace se změnou zeta potenciálu. Je však možné, že s dalším zvýšením objemu přídatkem chitosanu, by došlo k dalšímu zvýšení zeta potenciálu a podle posledních 2 hodnot (které se již začínají pomalu blížit hranici stability) možná i ke snížení velikosti vznikajících částic. Je ale velmi pravděpodobné, že po překonání této hranice by došlo k tvorbě gelových struktur, jelikož poměr koncentrací se začíná blížit hodnotám z další kapitoly popisující právě vznik chitosanových gelů.

Tabulka 12 - Číselné hodnoty průměrné intenzitní velikosti částic a zeta potenciálu v závislosti na poměru koncentrací (1 ml 1 g/l RL + přídavek 2 g/l chitosan)

V <sub>Chit</sub> [ml]	d [nm]	ZP [mV]
0,1	1323,7	-3,9
0,2	1842,3	1,9
0,3	1154,0	8,6
0,4	1592,0	13,5
0,5	1199,3	17,4
0,6	949,6	20,6

### 5.3.2 Tvorba gelů

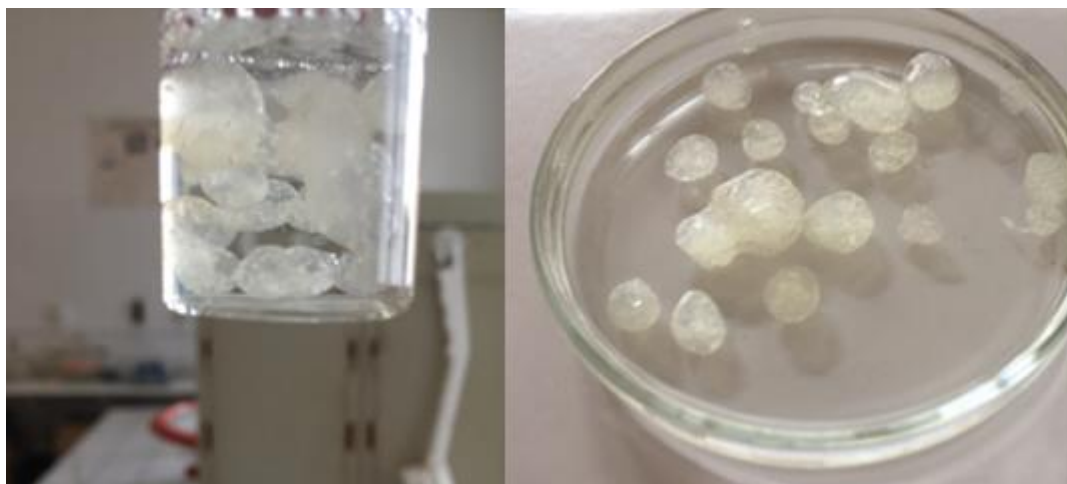
#### 5.3.2.1 Gely z chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové

První chitosanové gely byly vytvořeny během studia velikosti vznikajících agregátů v systému chitosan a rhamnolipid. Při zvyšování koncentrací docházelo k tvorbě vláknitých struktur, které však bylo možné mícháním rozrušit a provést klasická měření pomocí rozptylových technik. Při koncentraci 6,5 g/l chitosanu do roztoku rhamnolipidu také o koncentraci 1 g/l byl pozorován vznik prvotní gelové struktury. Následně tedy byla provedena série gelačních experimentů s touto koncentrací. Byl pozorován vliv přidávaného roztoku – zatímco při pomalém přikapávání roztoku chitosanu do RL docházelo ke vzniku poměrně kompaktních gelů ve tvaru přidávaných kapek, při přidávání RL do chitosanu docházelo ke vzniku vláknité houbovitě ne příliš kompaktní struktury (Obrázek 27).



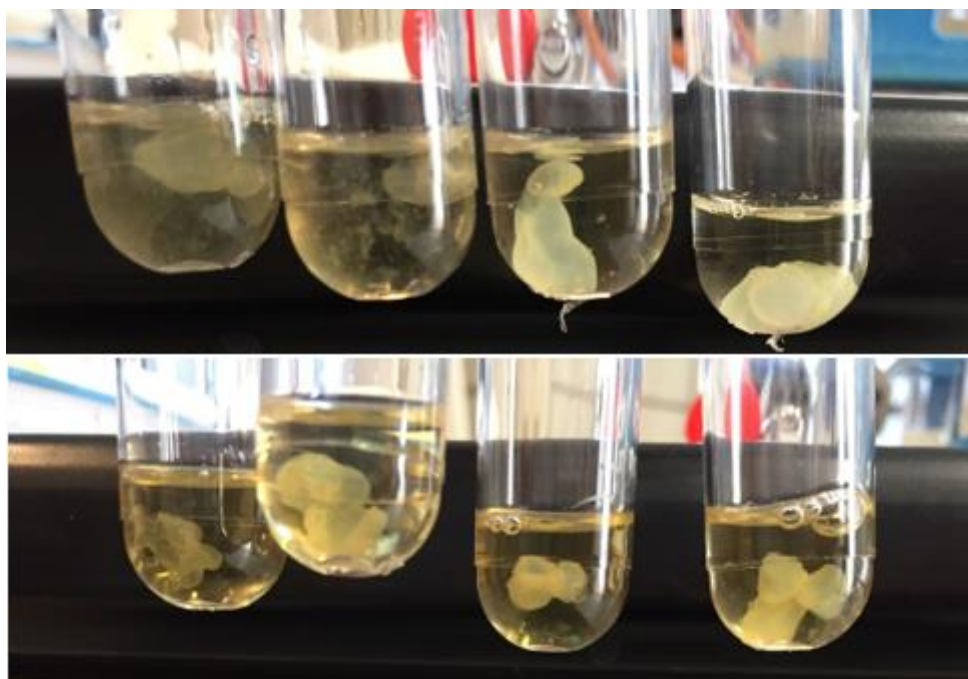
Obrázek 27 - První vytvořené gely (vlevo chitosan do rhamnolipidu, vpravo rhamnolipid do chitosanu)

S ohledem na kompaktnost a jednodušší kontrolu tvaru a formy vznikajících gelů byl nadále zvolen směr přikapávání roztoku chitosanu do roztoku rhamnolipidu (Obrázek 28). U těchto koncentrací docházelo často k porušení povrchové struktury kapky a vylití chitosanového roztoku obsaženého uvnitř kapky. I přes prodloužení doby máčení chitosanových kapek v roztoku RL nedošlo k výraznějšímu zpevnění vnitřní struktury vznikajícího útvaru. To může být způsobeno tím, že micely RL jako poměrně veliké útvary obtížně difundují gelovou vrstvou povrchu kapky a nejsou schopny efektivně dosíťovat chitosan obsažený ve vnitřní části. Touto metodou je tedy možné vytvořit poměrně křehké „core – shell“ systémy s vnitřním obsahem primárně chitosanu.



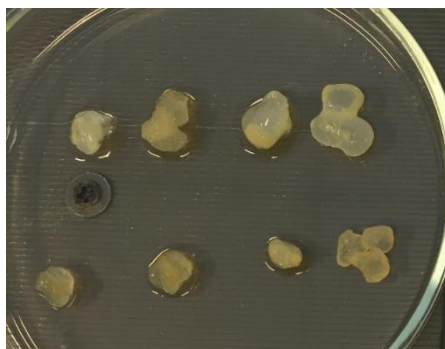
*Obrázek 28 - Testování vzniku gelů s nízkými koncentracemi roztoků*

Následně bylo provedeno několik experimentů s rostoucí koncentrací jako roztoku chitosanu, tak roztoku rhamnolipidu. U těchto gelů již docházelo k dobré difuzi po celém objemu přidávaných kapek a tvorbě kompaktních a relativně pevných struktur (*Obrázek 29*). Při jejich zmáčknutí nedochází k vylití vnitřního obsahu – struktura je pravděpodobně rovnoměrně zesíťovaná.



*Obrázek 29 - Chitosanové gely v různě koncentrovaném RL (10 g/l nahoře; 20 g/l dole)*

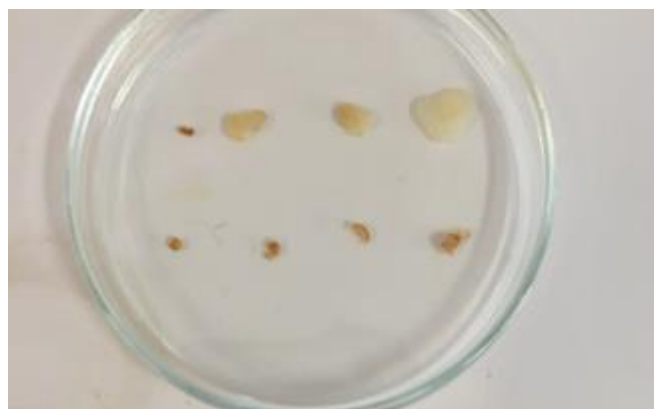
Na následujícím obrázku je možné vidět tyto gely mimo roztok rhamnolipidu. Jedná se o velmi podobné struktury – s poměrně dobře viditelným tvarem původních kapek. U gelů připravených v roztoku koncentrovanějšího rhamnolipidu, dochází k intenzivnějšímu zabarvení povrchu gelu (*Obrázek 30*). U obou koncentrací rhamnolipidu však dochází k efektivní difuzi do celého objemu gelu, oproti tvorbě gelu v čistém hydroxidu sodném dochází k jejich výraznému zabarvení do žluta (i na řezu). Naopak u chitosanových gelů vytvořených pouze pomocí reakce na vyšší hodnoty pH je typické bílé zabarvení.



Obrázek 30 – Petriho miska s chitosanovými gely připravenými v různě koncentrovaném RL (horní řádek v RL 10 g/l, spodní 20 g/l; zleva koncentrace chitosanu 5; 6,5; 10; 30 g/l)

### 5.3.2.2 Vizualní studium sušení a bobtnání gelů

Po 20minutovém sušení při 50 °C došlo k viditelnému smrštění jednotlivých struktur. Výrazněji se vliv sušení jeví pro gely vytvořené s pomocí koncentrovanějšího roztoku rhamnolipidu, u kterých došlo k poměrně výrazné strukturní deformaci (Obrázek 31). To může být způsobeno větší teplotní labilitou rhamnolipidu. V koncentračním poměru tak zauímají vyšší objem vzorku a tím pádem i samotné gely budou náchylnější na zvyšování teploty. Případně je možné, že příliš vysoké koncentrace rhamnolipidu (dost pravděpodobně ve formě micel), spíše, narušují vznikající síť gelu (oproti předpokladu lepšího síťování). U koncentrovanější roztoku RL tak dojde ke vzniku méně husté sítě uzlů ve struktuře gelu a ta je poté náchylnější na různé typy namáhání (včetně zvýšení teploty a s tím spojeným odstraňováním rozpouštědla ze struktury gelu).



Obrázek 31 - Chitosanové gely po 20minutovém sušení (horní řádek v RL 10 g/l, spodní 20 g/l; zleva koncentrace chitosanu 5; 6,5; 10; 30 g/l)

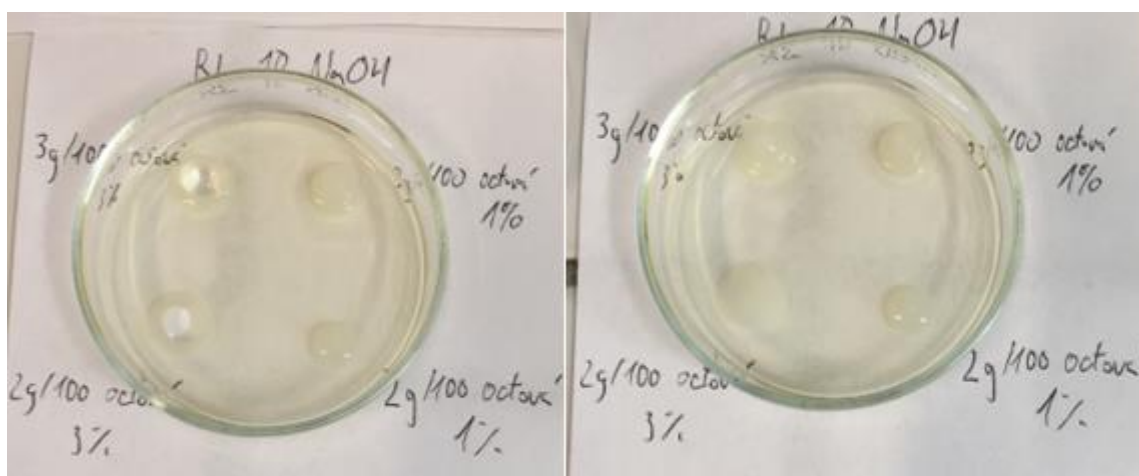
Přibližně po hodinové rehydrataci v čerstvém roztoku rhamnolipidu bylo pozorováno poměrně výrazné bobtnání gelů. Jak je již zmíněno výše, jako stabilnější se jeví struktura gelu vzniklého v méně koncentrovaném roztoku rhamnolipidu. Tento úkaz by mohl značit vyšší teplotní labilitu rhamnolipidu oproti chitosanu, případně, opět výše zmíněnou, nižší hustotu uzlů tvořící strukturu gelu. Z hlediska poměru koncentrací, vyšší teplotu snášely lépe gely tvořené z větší části chitosanem, u kterých došlo k téměř úplnému navrácení do původní podoby (Obrázek 32). U gelů tvořených pomocí více koncentrovaného rhamnolipidu došlo také k bobtnání gelů, ale nebylo natolik výrazné – byla patrná deformace struktury a snížení celkové objemu v nabobtnalém stavu.



Obrázek 32 - Chitosanové gely po rehydrataci – vlevo 1 hodina po rehydrataci, vpravo přibližně 24 hodin (horní řádek v RL 10 g/l, spodní 20 g/l; zleva koncentrace chitosanu 5; 6,5; 10; 30 g/l)

### 5.3.2.3 Gely z chitosanu rozpuštěného v kyselině octové

Gely z chitosanu rozpuštěného v kyselině octové jsou lépe ovlivnitelné, co se jejich tvaru a objemu týče. To je způsobeno vznikem viskóznějšího roztoku při rozpouštění a větší kompaktností přikápnutého objemu. S viskozitou roztoku chitosanu souvisí také čas, který je potřebný pro samotnou gelaci. Zatímco u roztoků tvořených kyselinou chlorovodíkovou, které vytváří relativně stabilní gely již po 10 minutách od přikápnutí (především na povrchu kapek), u roztoků v kyselině octové dochází k úplné gelaci a tvorbě kompaktních gelů přibližně po jedné hodině od přikápnutí (Obrázek 33).



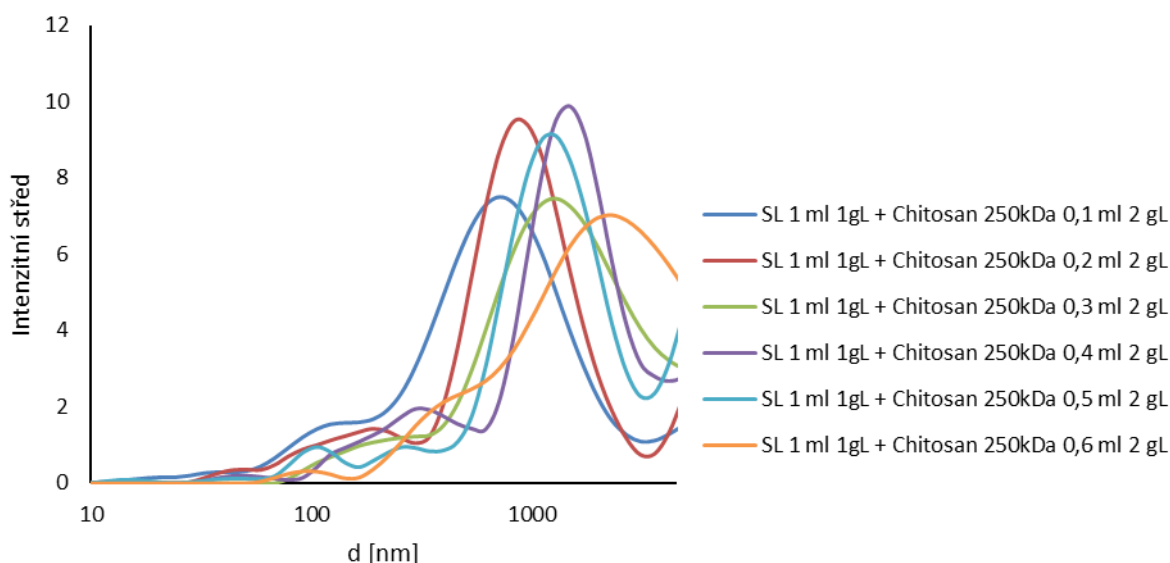
Obrázek 33 - Postupné gelování chitosanu v roztoku rhamnolipidu 10 g/l – vlevo 20 minut od kápnutí, vpravo 1 hodina od kápnutí (v jednotlivých miskách jsou nalevo roztoky chitosanu ve 3 % kyselině octové a vpravo v 1 %, nahoře o koncentraci 30 g/l a dole 20 g/l)

## 5.4 Systém Chitosan a Sophorolipid

Obdobně jako tomu bylo u směsi DEAE dextran a sophorolipid, byla i zde očekávána intenzivnější interakce z důvodu vyššího efektivního náboje způsobeného kyselou podstatou použitého sophorolipidu.

### 5.4.1 Studium interakcí na molekulární úrovni

Pomocí měření rozptylovými technikami byla změřena velikost a zeta potenciál vznikajících agregátů. U tohoto systému bylo poměrně výrazné zastoupení velikých průměrů částic, což značně ovlivňovalo přesnost výpočtu průměrné velikosti (Obrázek 34). Při pomnutí této frakce se však jednalo o poměrně kompaktní systémy s přibližně stejnou velikostí částic, nepříliš závislou na poměru koncentrací jednotlivých roztoků.



Obrázek 34 - Velikosti částic v systému Chitosan 250 kDa + Sophorolipid

V následující tabulce (Tabulka 13) jsou uvedeny číselné hodnoty průměrné intenzitní velikosti částic. S rostoucími přídávky roztoku chitosanu dochází ke vzniku větších agregátů u vyšších hodnot poloměrů částic. Tím je však ovlivněna i průměrná velikost částic. Intenzitní středy jsou však na přibližně stejné hodnotě okolo 1000 nm.

Pomocí elektroforetického rozptylu světla byl stanoven také Zeta potenciál vznikajících agregátů. Všechny vzniklé agregáty se nacházely nad hranicí stability s hodnotou zeta potenciálu okolo +40 mV. S přídávkem chitosanu docházelo k lehkému lineárnímu poklesu zeta potenciálu vznikajících molekul. Tento trend je poměrně zajímavý, jelikož s přídávkem kladně nabitého chitosanu by byl očekávatelný růst kladných hodnot zeta potenciálu. S přihlédnutím k velikosti částic stanovené pomocí dynamického rozptylu světla je možné konstatovat, že dochází ke vzniku micel sophorolipidu a následnému pevnému přilnutí přidávaných molekul chitosanu k jejich povrchu.

Tabulka 13 - Číselné hodnoty průměrné intenzitní velikosti částic a zeta potenciálu v závislosti na poměru koncentrací (1 ml 1 g/l SL + přídavek 2 g/l chitosan)

V <sub>Chit</sub> [ml]	d [nm]	ZP [mV]
0,1	996,9	45,5
0,2	1210,3	34,6
0,3	1692,7	46,0
0,4	1703,7	40,1
0,5	1782,7	39,1
0,6	2140,0	34,9

## 5.4.2 Tvorba gelů

Na rozdíl od roztoků rhamnolipidů, nedochází ve vodných roztocích sophorolipidů k tvorbě žádných makrostruktur (Obrázek 35). V hydroxidu sodném, pravděpodobně vlivem pH a vyšší viskozity roztoků chitosanu, dochází k pomalejší gelaci, avšak s velice podobným výsledkem jako v případě rhamnolipidů. Může tedy docházet ke gelaci prostou změnou pH a uzavírání micel biosurfaktantu do pórovité struktury vzniklého gelu – proto nedochází k síťování ve vodných roztocích biosurfaktantů. U roztoků v kyselině chlorovodíkové dochází k tvorbě ohraničených struktur s relativně pevným okrajem, avšak uprostřed struktury je patrný původní roztok chitosanu v tekuté formě.



Obrázek 35 - Chitosanové gely v roztoku sophorolipidu (1. Petriho miska nahoře chitosan 30 g/l ve 3 % kyselině octové, dole chitosan 20 g/l ve 3 % kyselině octové; 2. Petriho miska vlevo 30 g/l chitosan, vpravo 10 g/l chitosan)

## 5.5 Porovnání jednotlivých systémů

### 5.5.1 Studium interakcí na molekulární úrovni

Velikosti částic jednotlivých systémů se značně liší. Zatímco systémy s DEAE dextranem tvoří relativně kompaktní agregáty (u RL s jedním píkem v konkrétním koncentračním poměru), směsi s chitosanem vykazují tvorbu velikých částic. Pro tvorbu nosičových systémů na bázi nanostruktur se tak jeví jako zajímavější volba systémy s DEAE dextranem.

Vliv na rozdíl v chování jednotlivých systémů však může mít i studovaná koloidní stabilita vyjádřená hodnotou ZP vznikajících agregátů, kterou obecně vykazují vyšší roztoky s obsahem sophorolipidu. U těchto roztoků je však hodnota zeta potenciálu značně kladná, což značí převládající vliv polysacharidického řetězce. U obdobně velikých molekul v systému RL a DEAE dextran by se dalo uvažovat například o vzniku micel rhamnolipidu obalených polysacharidovým řetězcem dextranu (Tabulka 14).

Tabulka 14 - Velikost vznikajících částic u jednotlivých systémů

$V_{pr}$ [ml]	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6						
$V_{BS}=1$ ml	DEAE Dextran [nm]   [mV]											
RL	343,1	-6,0	1680,3	2,8	242,5	25,0	198,2	32,7	241,2	33,6	329,5	35,9
SL	479,8	30,9	741,7	41,2	743,9	40,2	959,3	42,9	769,0	46,4	901,9	45,9
$V_{BS}=1$ ml	Chitosan [nm]   [mV]											
RL	1323,7	-3,9	1842,3	1,9	1154,0	8,6	1592,0	13,5	1199,3	17,4	949,6	20,6
SL	996,9	45,5	1210,3	34,6	1692,7	46,0	1703,7	40,1	1782,7	39,1	2140,0	34,9

### 5.5.2 Tvorba gelů ve větším objemu

Obecně lze říct, že tyto chitosanové gely (nezávisle na používané molekulové hmotnosti nebo rozpouštědle) je poměrně obtížné vytvořit ve větším objemu. Při klasickém nalití, či prudším přikápnutí pomocí stříkačky či Pasteurovi pipety dojde k rozlití přidaného chitosanu a následnému vzniku vláknité struktury, která je však křehká. Pro tvorbu gelu je pravděpodobně jedinou možností opatrné a kontinuální přidávání roztoku (pomocí stříkačky, jelikož je možné lépe korigovat přidávané množství roztoku) s rovnoměrným posouváním aplikátoru například po obvodu Petriho misky (Obrázek 36). Na struktuře gelu je však následně vidět vzniklé rýhy a samotný gel nepůsobí kompaktně – dalo by se říct, že se vznikající gelové vlákno rozmotává.



Obrázek 36 - Chitosanové gely vytvořené ve větším objemu (vpravo chitosan v 0,1 M kyselině chlorovodíkové do vodného roztoku rhamnolipidu, vlevo chitosan v 3 % kyselině octové do rhamnolipidu rozpuštěného v 0,5 M hydroxidu sodném)

V následující tabulce (Tabulka 15) je možné vidět hmotnosti jednotlivých gelů ihned po vyjmutí z roztoku (a lehkém povrchovém osušení), po hodinovém sušení v sušárně při 50 °C a následné hodinové rehydrataci v čistém roztoku. Gely vytvořené z chitosanu rozpuštěného v kyselině octové mají pravděpodobně hustější chitosanovou síť, což zajišťuje jejich větší kompaktnost (lze cítit i pohmatem). Naznačuje to však také procentuální zastoupení sušiny stanovené gravimetricky. Vykazují také lepší schopnost rehydratace, než je tomu u gelů z chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové. Tyto gely jsou křehčí a mají tendenci se více trhat. Pevnější se u nich jeví především okraje, které jsou ihned po kápnutí v kontaktu se síťovacím činidlem, avšak střed zůstává spíše ve formě velmi viskózní kapaliny.

Tabulka 15 – Gravimetrická analýza gelů před vysušením, po vysušení a následné rehydrataci

	rozpouštědlo	
RL 10 g/l	H <sub>2</sub> O	0,5 M NaOH
Chitosan 250 kDa 10 g/l	0,1 M HCl	3 % CH <sub>3</sub> COOH
	m [g]	
původní	1,3413	0,6350
sušina	0,7533	0,4715
rehydratace	0,8885	0,6072
sušina [%]	56,1619	74,2520
rehydratace [%]	66,2417	95,6220

### 5.5.3 Studium mechanických vlastností vzniklých gelů

Jak je vidět na obrázku (Obrázek 37) i poměrně malá změna koncentrace jedné nebo druhé složky znamená relativně velký vliv na finální podobu gelu. Nejvíce čiré jsou gely, které byly síťovány pouze pomocí změny pH (přikapáváním roztoku chitosanu do 0,5 M NaOH). U chitosanu síťovaného roztoky rhamnolipidu dochází k lehkému zbarvení do žluta (samotný roztok RL je oranžový). Výraznější je toto zbarvení u chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové následně kapaného do vodného roztoku rhamnolipidu – zde dochází k intenzivnímu zbarvení na okraji vzniklé struktury, ale střed zůstává čirý. Kromě těchto vizuálních rozdílů se mezi jednotlivými gely vyskytují také rozdíly mechanické. Při prostém zmáčknutí jednotlivých gelů dochází k různým jevům – některé gely se zploští, další se rozdrobí a nejčastěji u chitosanových roztoků v HCl dojde k „vylití“ vnitřní části a zůstává pouze pevná okrajová část (tzv. shell).



Obrázek 37 – Některé z gelů připravených pro studium reologických vlastností – vizuální porovnání (v levém spodním rohu se nachází koncentrační řada chitosanu v kyselině octové, v pravém dolním rohu poté v kyselině chlorovodíkové – obojí síťováno roztokem rhamnolipidu; v horní části se nacházejí gely síťované pouze pomocí pH – 0,5 M NaOH)

V následující tabulce (*Tabulka 16*) jsou uvedena složení zkoumaných gelů a jejich základní mechanické charakteristiky získané pomocí reologických měření. Výsledky jsou komentovány na základě sloupcových grafů, původně naměřená data je možné nalézt v přílohách. Důležitou informací získanou pomocí reologie je fakt, že všechny připravené struktury vykazují gelové chování – podle typického chování v lineární viskoelastické oblasti (LVO).

Je nutné podotknout, že u reologických měření se jednalo spíše o screeningovou studii s primárním cílem potvrzení gelových vlastností vznikajících struktur. Od každého gelu byl tedy připraven (především z časových důvodů) pouze jeden vzorek, který byl podroben reologické analýze. Pro možnost statistického vyhodnocení a možnosti tvořit pevné závěry z těchto experimentů, by bylo nutné měření několikrát zopakovat, v ideálním případě i na větších vzorcích (ne pouze na malých gelových „kapičkách“).

*Tabulka 16 - Složení a naměřená data z reologických studií*

číslo vzorku	typ gelu		$\delta_{\text{prům}}^1$	$G^{*2}$	Amplituda deformace (LVO) <sup>3</sup>	Amplituda deformace ( $\gamma = 45^\circ$ )
	BS + rozpouštědlo	chitosan + rozpouštědlo	[°]	[kPa]	[%]	[%]
1	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 168 kDa v 0,1 M HCl	5,724	6,239	2,168	13,945
2	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 168 kDa v 5 % k. octové	5,075	3,685	1,474	10,273
3	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	20 g/l 168 kDa v 5 % k. octové	4,762	0,880	1,469	12,606
4	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 250 kDa v 3 % k. octové	5,642	18,423	1,481	10,928
5	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	20 g/l 250 kDa v 3 % k. octové	4,387	1,999	1,469	10,164
6	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	20 g/l 250 kDa v 1 % k. octové	2,864	0,961	2,156	22,624
7	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 250 kDa v 1 % k. octové	3,518	11,884	1,004	7,053
8	RL 10 g/l v H <sub>2</sub> O	10 g/l 250 kDa v 0,1 M HCl	3,472	1,407	3,168	13,982
9	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	6,5 g/l 250 kDa v 0,1 M HCl	4,079	0,165	3,163	41,465
10	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	10 g/l 250 kDa v 0,1 M HCl	4,497	1,216	0,682	3,201
11	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 250 kDa v 0,1 M HCl	8,607	2,844	1,009	3,054
12	SL 10 g/l v 0,5M NaOH	20 g/l 250 kDa v 3 % k. octové	4,934	5,304	1,004	3,664
13	SL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 250 kDa v 3 % k. octové	5,457	21,366	0,688	2,988
14	SL 10 g/l v H <sub>2</sub> O	30 g/l 250 kDa v 1 % k. octové	9,336	6,064	1,484	4,401
15	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 250 kDa v 5 % k. octové	6,037	2,033	2,194	11,834
16	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	20 g/l 250 kDa v 5 % k. octové	5,576	3,055	3,201	6,905
17	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 168 kDa v 3 % k. octové	5,560	7,049	1,497	2,909
18	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	20 g/l 168 kDa v 3 % k. octové	6,690	1,542	2,174	4,467
19	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	30 g/l 168 kDa v 1 % k. octové	6,486	7,005	0,471	2,898
20	RL 10 g/l v 0,5M NaOH	20 g/l 168 kDa v 1 % k. octové	5,724	1,424	1,476	3,161
21	bez BS – 0,5M NaOH	30 g/l 168 kDa v 3 % k. octové	5,513	6,157	4,727	13,397
22	bez BS – 0,5M NaOH	20 g/l 168 kDa v 3 % k. octové	5,231	1,159	6,839	40,571
23	bez BS – 0,5M NaOH	30 g/l 250 kDa v 3 % k. octové	5,773	20,340	1,016	4,892
24	bez BS – 0,5M NaOH	20 g/l 250 kDa v 3 % k. octové	5,092	15,569	1,495	4,005
25	bez BS – 0,5M NaOH	30 g/l 250 kDa v 5 % k. octové	5,607	28,645	2,187	7,136
26	bez BS – 0,5M NaOH	20 g/l 250 kDa v 5 % k. octové	5,583	9,222	3,191	10,842
27	bez BS – 0,5M NaOH	30 g/l 168 kDa v 5 % k. octové	5,898	6,287	4,710	24,944
28	bez BS – 0,5M NaOH	20 g/l 168 kDa v 5 % k. octové	5,729	1,954	6,858	18,978

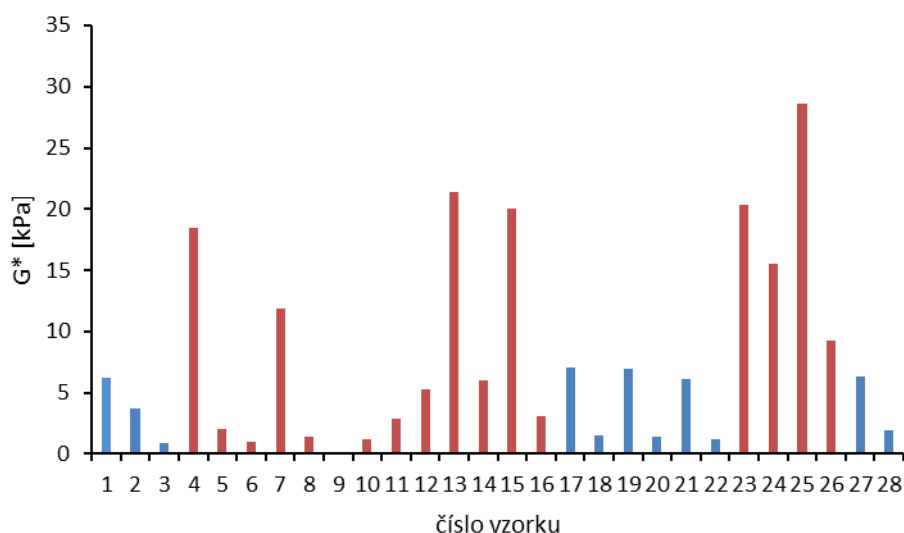
<sup>1</sup> Průměrná hodnota ztrátového úhlu vypočítaná z lineární viskoelastické oblasti

<sup>2</sup> Komplexní viskoelastický modul vypočítaný jako druhá odmocnina součtu druhých mocnin jednotlivých modulů

<sup>3</sup> Hodnota amplitudy deformace na konci lineární viskoelastické oblasti

Komplexní viskoelastický modul lze považovat za parametr, který udává hustotu jednotlivých chemických vazeb v síťovité struktuře gelu. Při oscilačním módu měření dochází k oscilačnímu působení napětí při stejné frekvenci (zjednodušeně – s každým dalším krokem dochází k většímu natočení měřící destičky a tím i části gelu k ní přilnuté, frekvence těchto vychýlení se však nemění). Tím dochází k různě silnému namáhání chemických vazeb ve struktuře studovaného systému.

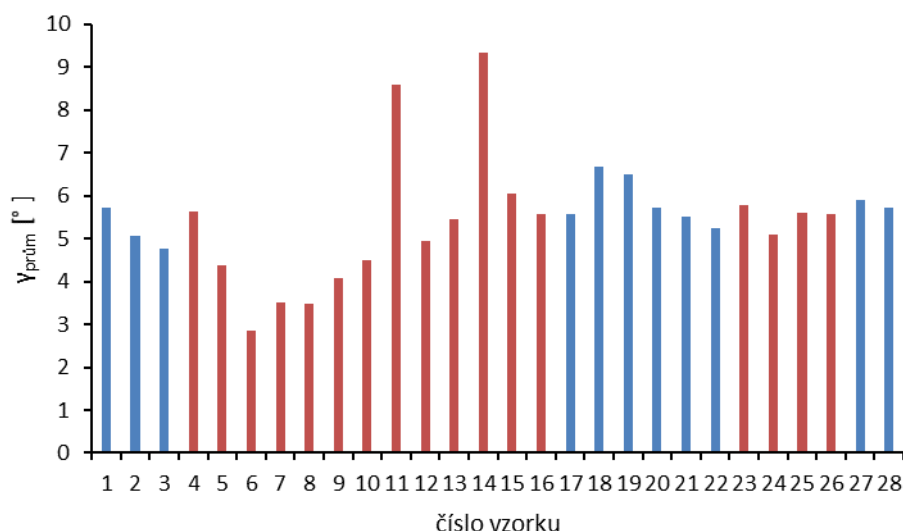
Do určité hranice dochází po ukončení působení napětí (ve chvíli průchodu měřící destičky přes nulovou pozici) k relaxaci namáhaných vazeb a jejich návratu do původního stavu (případně k lehké změně v pozici jejich ukotvení). Po překonání určité hodnoty amplitudy (pro každý vzorek specifické) dojde k nevratnému poškození vazeb a tím i částečnému zborcení sítě. Tato hranice se nachází na konci takzvané lineární viskoelastické oblasti. Základním parametrem pro stanovení gelové struktury je typická vyšší hodnota elastického modulu ( $G'$ ), oproti modulu viskóznímu ( $G''$ ). Nejvyšší hodnoty komplexního viskoelastického modulu vykazují vzorky 23–25. Jedná se o vzorky, které jsou síťovány pouze změnou pH (0,5 M roztokem NaOH) bez přídavku biosurfaktantu (Obrázek 38). To může značit narušování chitosanových sítí pomocí micel či volných molekul biosurfaktantu (které se iontově váží na chitosan) a zároveň to značí hustší provázání gelů v čistě chitosanové struktuře.



Obrázek 38 - Velikost komplexního viskoelastického modulu u jednotlivých vzorků (modrou barvou chitosan 168 kDa; červenou 250 kDa)

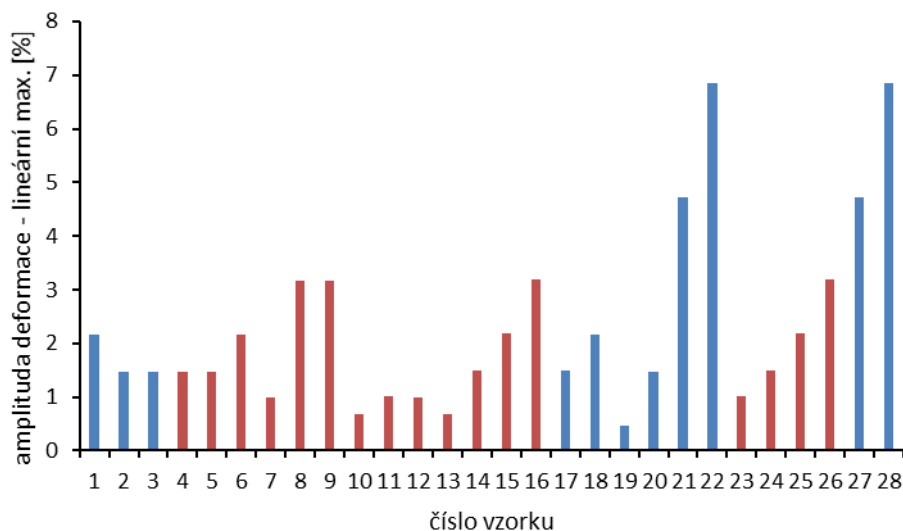
Průměrná hodnota ztrátového úhlu v LVO oblasti udává, jak moc se struktura ve své neporušené formě chová jako pevná látka, respektive kapalina. Čím nižší je hodnota ztrátového úhlu tím více se v počátečním stavu látka chová jako pevná, po přerušení vazeb zvyšováním amplitudy a deformaci struktury je u gelů typickým jevem chování kapalin.

U studovaných vzorků se tyto hodnoty příliš neliší (všechny jsou v rozmezí 5 °), typově se tedy jedná o velmi podobné struktury (Obrázek 39) s vysokou mírou elasticity. Drobné výchytky jsou velice pravděpodobně způsobeny spíše případným prokluzem destičky po vzorku (respektive vzorku po spodní desce), který souvisí také s množstvím obsažené kapaliny (síťovacího roztoku), jelikož gely vždy pouze lehce osušeny buničitou vatou. Jak je již zmíněno výše, statisticky nelze dělat pevné závěry, jelikož se jednalo pouze o jedno měření konkrétních vzorků určené primárně pro ověření gelové struktury.



Obrázek 39 - Průměrná hodnota ztrátového úhlu v lineární viskoelastické oblasti (modrou barvou chitosan 168 kDa; červenou 250 kDa)

Hodnota maximální amplitudy deformace odpovídá konci lineární viskoelastické oblasti, tudíž vypovídá o jisté kompaktnosti a pevnosti gelu. Studované vzorky mají tuto hodnotu přibližně podobnou a řadí se svými vlastnosti mezi gely méně kompaktní. Maximální hodnotu této amplitudy má vzorek číslo 22 a 28 a nacházejí se přibližně v okolí 8 %. Přitom některé aktuálně zkoumané hydrogely jsou schopné dosahovat hodnot až řádu nižší tisíců %. [84] Opět platí, že pro řádnou statistickou analýzu by bylo nutné provést další rozsáhlejší sérii experimentů, která by naměřená data ověřila. Zdá se však, že gely připravené v roztoku rhamnolipidu jsou méně pevné, a tudíž i náchylnější k deformaci jejich struktury (Obrázek 40).



Obrázek 40 - Maximální hodnoty amplitudy deformace v lineární viskoelastické oblasti (modrou barvou chitosan 168 kDa; červenou 250 kDa)

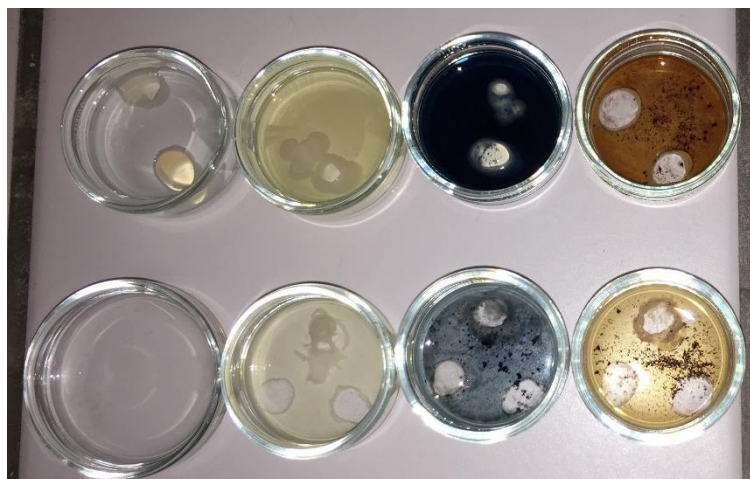
#### 5.5.4 Ověření solubilizačních schopností

Nejprve byla ověřena schopnost solubilizace jednotlivých roztoků. Výsledky je možné pozorovat na obrázku níže (Obrázek 41). Methylenová modř se ukázala jako neefektivní pro studium solubilizace, jelikož je relativně dobře rozpustná i ve vodných rozpouštědlech. (Pro experimenty byla zvolena z důvodu její rozpustnosti i v některých nevodných roztocích) Naopak súdánská černě i červeně jsou ve vodě naprosto nerozpustné – agregáty červeně se shlukují na dně, naopak u černi zůstávají na hladině. Ve vodném roztoku rhamnolipidu došlo u obou barviv k jejich částečnému rozpuštění – z důvodu jejich solubilizace micelami RL. Nejefektivnější se však jevil zásaditý roztok rhamnolipidu (RL rozpuštěný v 0,5 M NaOH), kde docházelo k téměř úplnému rozpuštění nasypného prášku. K úplnému rozpuštění zkoumaných barviv došlo z testovaných roztoků pouze v etanolu.



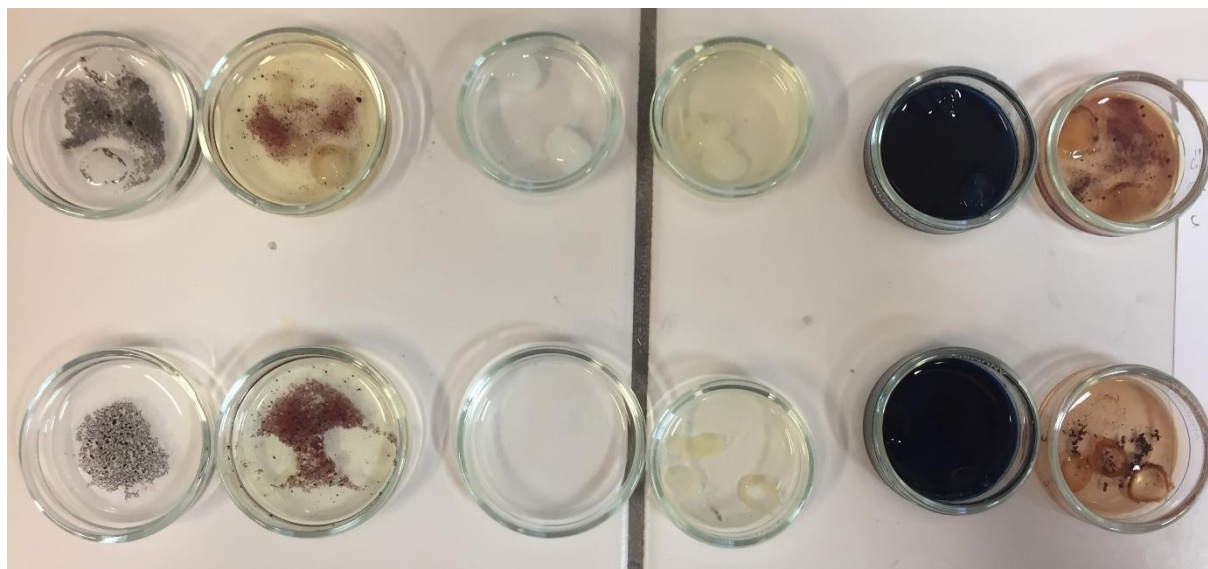
Obrázek 41 - Rozpustnost jednotlivých barviv v různých roztocích (vlevo súdánská černě, uprostřed methylenová modř, vpravo súdánská červeně; od shora dolů: voda, 10 g/l RL v 0,5 M NaOH, 10 g/l RL ve vodě, etanol, 0,5 M NaOH)

Studium solubilizace bylo následně sledováno i na vytvořených gelech. Ihned po přidání roztoků chitosanu, nebyla pozorována téměř žádná reakce a bylo vidět výrazné oddělení jednotlivých roztoků (Obrázek 42). Očekávaná gelace viditelně začala přibližně 20 minut od přikápnutí roztoku chitosanu.



Obrázek 42 - Studium solubilizace hydrofobních molekul – počáteční stav (nahore 10 g/l RL v 0,5 M NaOH, dole ve vodě; zprava: RL se súdánskou červení, RL se súdánskou černí, RL, NaOH) – do vodných roztoků byl přikapáván chitosan v kyselině chlorovodíkové (6,5; 10 a 30 g/l), do zásaditých roztoků chitosan v 3 % kyselině octové (20 a 30 g/l)

Následující obrázek ukazuje již hotové gely, přibližně po 24 hodinách od přikapnutí roztoku chitosanu (Obrázek 43). Lze pozorovat značné zbarvení vzniklých gelů v roztocích rhamnolipidu. Naopak v Petriho miskách, které rhamnolipid neobsahují, buď nedochází k rozpuštění barviva a tím pádem ke zbarvení gelu, nebo k samotné gelaci – v případě vody jako rozpouštědla.



Obrázek 43 - Studium solubilizace hydrofobních molekul – po gelaci (nahore 10 g/l RL v 0,5 M NaOH, dole ve vodě; zprava: RL se súdánskou červení, RL se súdánskou černí, RL, NaOH, NaOH se súdánskou červení, NaOH se súdánskou černí) – do vodných roztoků byl přikapáván chitosan v kyselině chlorovodíkové (6,5; 10 a 30 g/l), do zásaditých roztoků poté chitosan v 3 % kyselině octové (20 a 30 g/l)

Obdobně jako u roztoků rhamnolipidu, byly pozorovány solubilizační vlastnosti roztoku sophorolipidu. Ačkoliv se jednalo o stejnou koncentraci (řádově nad CMC používaného sophorolipidu), nedošlo k žádné reakci po přidání súdánské černi. V případně súdánské červení došlo k lehkému zbarvení roztoku s odstíny žluté (Obrázek 44).



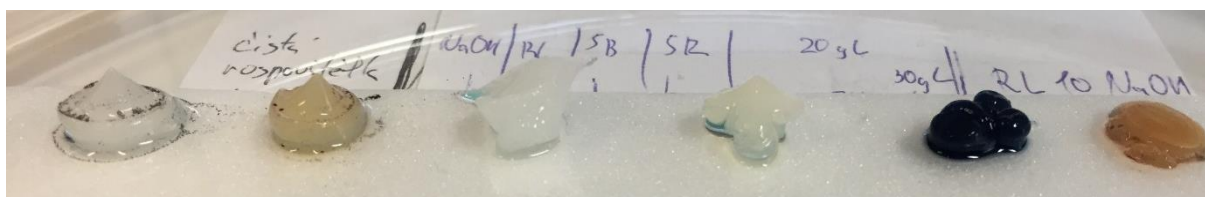
Obrázek 44 - Rozpustnost hydrofobních barviv v roztoku zásaditého sophorolipidu – SL rozpuštěný v 0,5 M NaOH (vlevo súdánská černá, vpravo súdánská červená)

Po přikápnutí roztoku chitosanu do Petriho misek s barvivem nebyl pozorován téměř žádný vliv. Gely, které vznikly přibližně po 20 minutách nevykazovaly změnu barvy – sražené molekuly barviva se držely buď na dně Petriho misky, nebo přisedly na přikápnutou kapku (přikápnutím došlo k promíchání roztoku. Po 24 hodinách však došlo k jistému zbarvení jak roztoku, tak samotné gelové struktury (Obrázek 45). Lze tedy říct, že sophorolipidy, stejně jako rhamnolipidy, vykazují solubilizaci pro tato hydrofobní barviva. Na rozdíl od rhamnolipidů však solubilizace trvá o hodně déle a není ani tak efektivní. Struktura gelu (včetně řezu) vykazovala rovnoměrné zbarvení – barvivo bylo solubilizováno a difundováno do celého objemu vzorku.



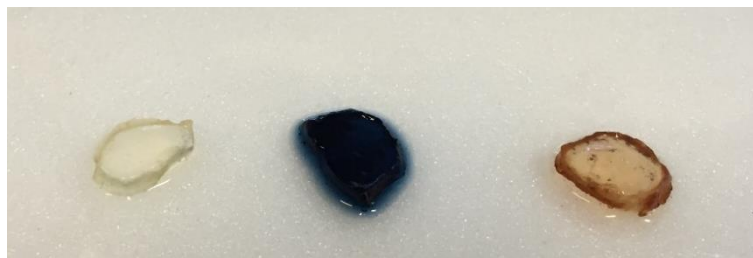
Obrázek 45 - Schopnost solubilizace hydrofobních barviv do struktury chitosanových gelů rozpuštěných v 3 % kyselině octové, zgelované zásaditým roztokem sophorolipidu 10 g/l (foceno po 24 hodinách)

Na obrázku níže je možné pozorovat finální podobu připravených gelů síťovaných roztokem rhamnolipidu s obsahem barviva (Obrázek 46). Jedná se o vzorky chitosanu rozpouštěné v kyselině octové. V roztocích, které neobsahovaly rhamnolipidy nedošlo k rozpuštění a tím pádem ani žádnému zbarvení vznikajícího gelu. Naopak vzorky, které rhamnolipid obsahovaly, byly zbarvené v celém objemu (ověřeno příčným řezem gelu).



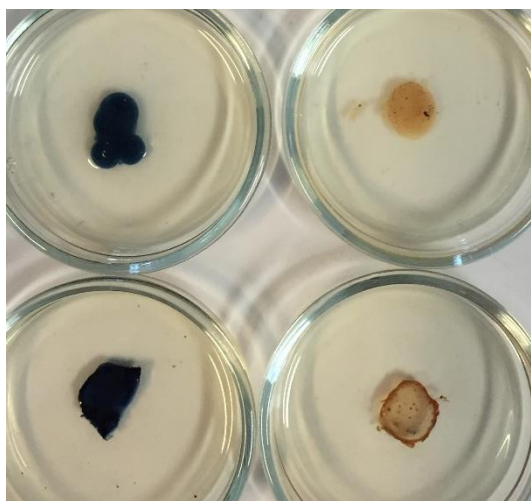
Obrázek 46 - Gely s inkorporovanými hydrofobními barvivy – chitosan rozpuštěný v kyselině octové (roztoky zleva: NaOH se súdánskou černí, NaOH se súdánskou červení, čistý NaOH, čistý RL, RL s černí, RL s červení)

Obdobně byly studovány také gely vzniklé z chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové. V případě súdánské černi došlo k úplnému prostupu barviva do celého objemu gelu, stejně jako tomu bylo u gelů z chitosanu rozpuštěného v kyselině octové. Naopak u súdánské červeně došlo k výraznějšímu nahromadění barviva na povrchu vzniklého gelu a menšímu prostupu do celého objemu vzorku (*Obrázek 47*) Tento jev by se dal opět považovat za primární tvorbu „core-shell“ systému a až následnou a pravděpodobně jen částečnou gelaci zbytku vzorku.



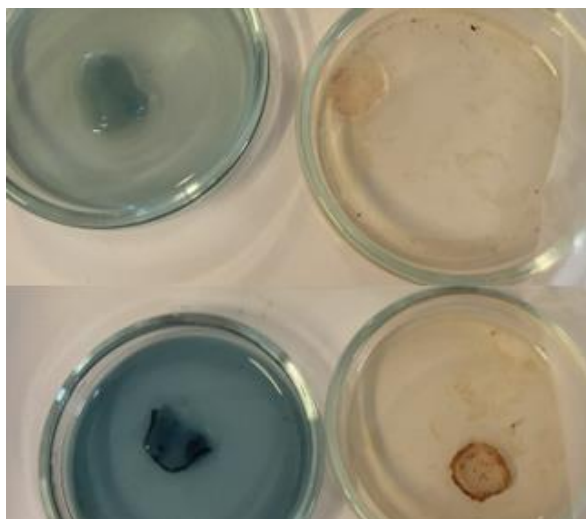
*Obrázek 47 - Gely s inkorporovanými hydrofobními barvivy – chitosan v kyselině chlorovodíkové (roztoky zleva: čistý RL, RL se súdánskou černí, RL se súdánskou červení)*

Prozkoumána byla také schopnost rhamnolipidu odstranit hydrofobní barvivo z gelové struktury. Stejně jako při difuzi barviva směrem do gelu docházelo i při jeho odstranění k poměrně pomalé reakci. Téměř hodinu po vložení do čistého roztoku rhamnolipidu nebyla pozorována žádná reakce (*Obrázek 48*). První náznak uvolnění jisté části barviva se projevil přibližně po 5 hodinách od výměny roztoku.



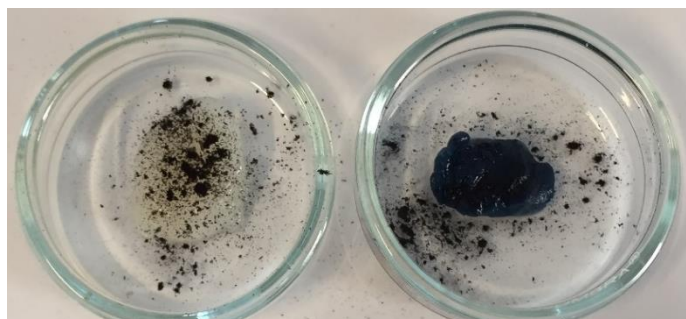
*Obrázek 48 - Schopnost odstranění hydrofobních barviv z gelové struktury (do čerstvých roztoků RL) – počáteční stav*

Po uběhnutí 4 dnů již byl patrný vliv čistého roztoku rhamnolipidu a téměř ve všech zkoumaných gelech došlo k výraznému uvolnění barviva z jejich struktury (*Obrázek 49*). Jedinou výjimku tvoří povrch gelu tvořené z chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové, následně kapaného do vodného roztoku rhamnolipidu se súdánskou černí či červení. Zde dochází k pravděpodobně k pevnější vazbě barviva do „shell“ vrstvy gelu a uvolňování je výrazně pomalejší, než je tomu v ostatních systémech – tento trend je patrnější u súdánské červeně, ale v jisté míře je pozorovatelný i u súdánské černi.



*Obrázek 49 - Schopnost odstranění hydrofobních barviv z gelové struktury (do čerstvých roztoků RL) – po 4 dnech v čistém roztoku*

Schopnost gelů solubilizovat hydrofobní barvivo byla ověřena také na dříve vytvořených gelech. Gely mimo roztok rhamnolipidu, ale ještě v mokřem stavu (nebyly nijak sušeny), byly posypány malým množstvím súdánské černi. Tyto vzorky byly vizuálně zkontrolovány přibližně po jedné hodině. Zatímco gel připravený do roztoku rhamnolipidu byl celý (včetně řezu) zabarvený do tmavě modré barvy u gelu vytvořeného pouze do zásaditého prostředí hydroxidu nedošlo k žádné reakci (*Obrázek 50*). Tímto experimentem bylo potvrzeno, že rhamnolipidy obsažené ve struktuře gelu, jsou schopné solubilizovat hydrofobní barvivo a napomáhat jeho difuzi do celého objemu bez nutnosti většího množství rozpouštědla.



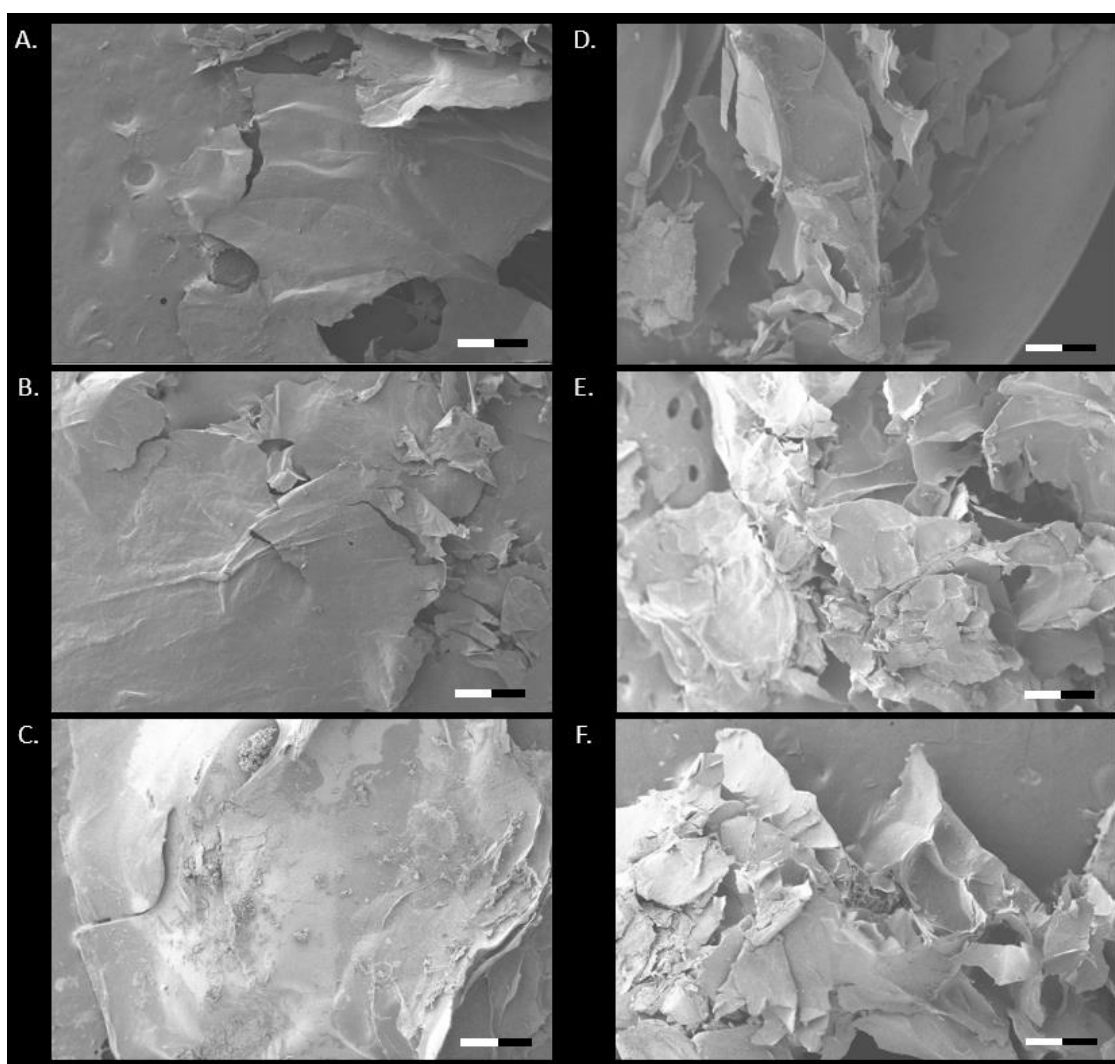
*Obrázek 50 - Schopnost solubilizace barviva do gelu bez okolního roztoku – 1 hodina od reakce (vlevo síťované pomocí NaOH, vpravo RL v roztoku NaOH)*

Zajímavé je také porovnání gelů tvořených z chitosanu v kyselině chlorovodíkové (a kapané do vodných roztoků RL) a v kyselině octové (a kapané do zásaditých roztoků RL). U prvních zmíněných dochází pravděpodobně k volné difuzi micel ve vnitřní struktuře (*core*), což dokazuje možnost vymýt barvivo ze vzniklé struktury prostým ponořením do vodného prostředí. V obalové struktuře (*shell*) jsou však barviva zakomponována pevněji, což značí také pevnější uchycení jednotlivých micel (velice pravděpodobně tvoří strukturální část sítě a pomáhají tvorbě uzlů v těchto místech). U chitosanu v kyselině octové dochází k přibližně rovnoměrnému (ale pouze částečnému – gely jsou stále zabarvené) uvolnění micel s barvivem z celého objemu. Tyto rozdílné vlastnosti v rychlosti uvolňování hydrofobních molekul by mohly najít dobré využití u nosičových systémů s řízeným uvolňováním.

### 5.5.5 Studium vnitřní struktury gelů pomocí elektronové mikroskopie

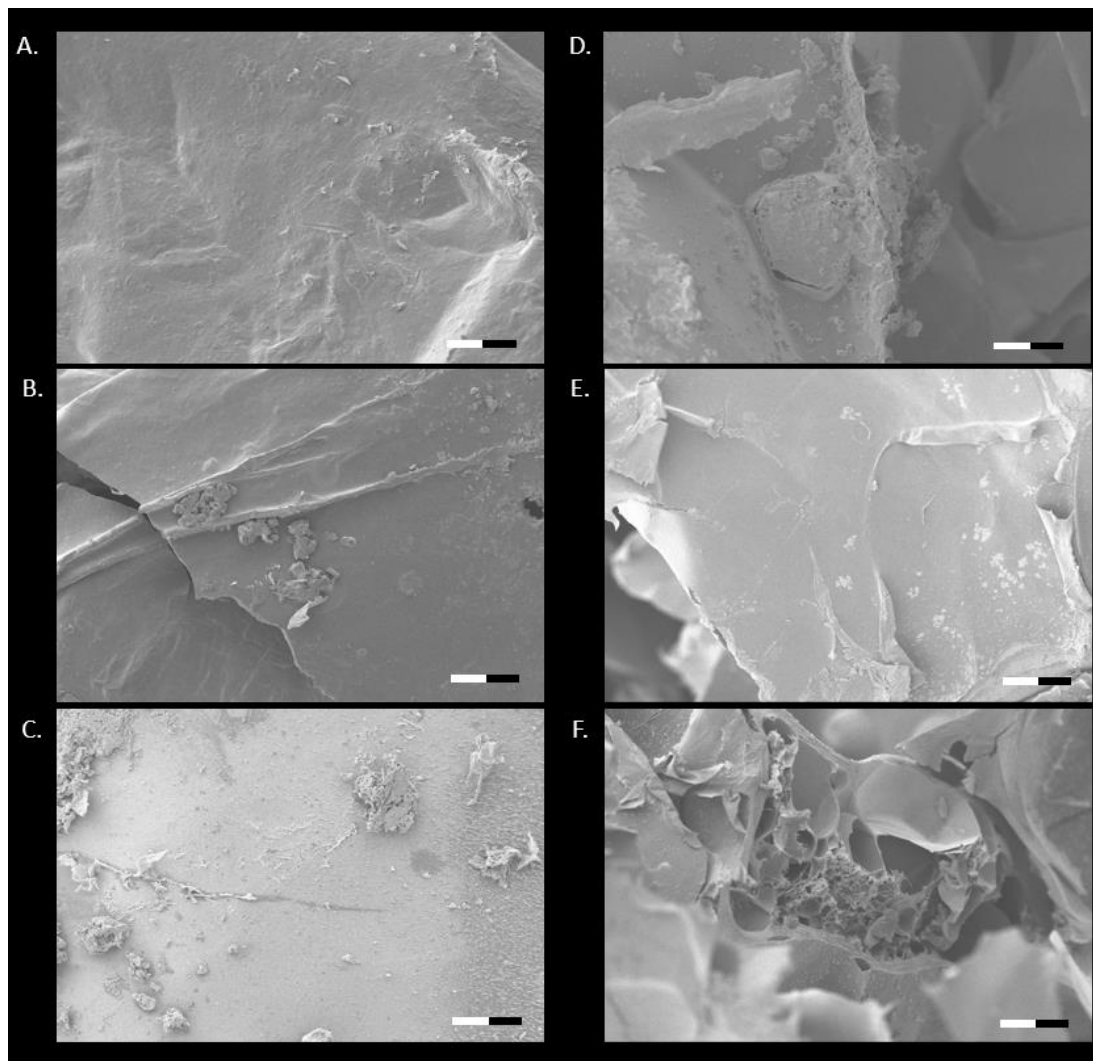
Vzorky připravené lyofilizací pro SEM analýzu se ukázaly být poměrně křehké. Pravděpodobně především vlivem mražení ve vodě došlo ve většině případů k deformaci vnitřní struktury. Na některých vzorcích je však tato pórovitá vnitřní část zachována.

Většina vzorků při 100násobném zvětšení vykazuje značně hladký povrch s viditelnými potrhanými vrstvami. Tyto vrstvy působí jako potrhaný arch papíru (Obrázek 51). Takovéto útvary vznikly pravděpodobně během mražení vzorků ve vodě a poté při následné lyofilizaci. Nejvíce deformované jsou vzorky A a B, které jsou tvořeny chitosanem rozpouštěným v kyselině chlorovodíkové a po ponoření do vody (ve které byly vzorky mraženy) bylo možné pozorovat postupné narušování obalové struktury a difuzi vnitřní části do celého objemu vody. U roztoků chitosanu v kyselině octové byly struktury zachovány o něco více. Tyto gely se jeví být více homogenní a kompaktní.



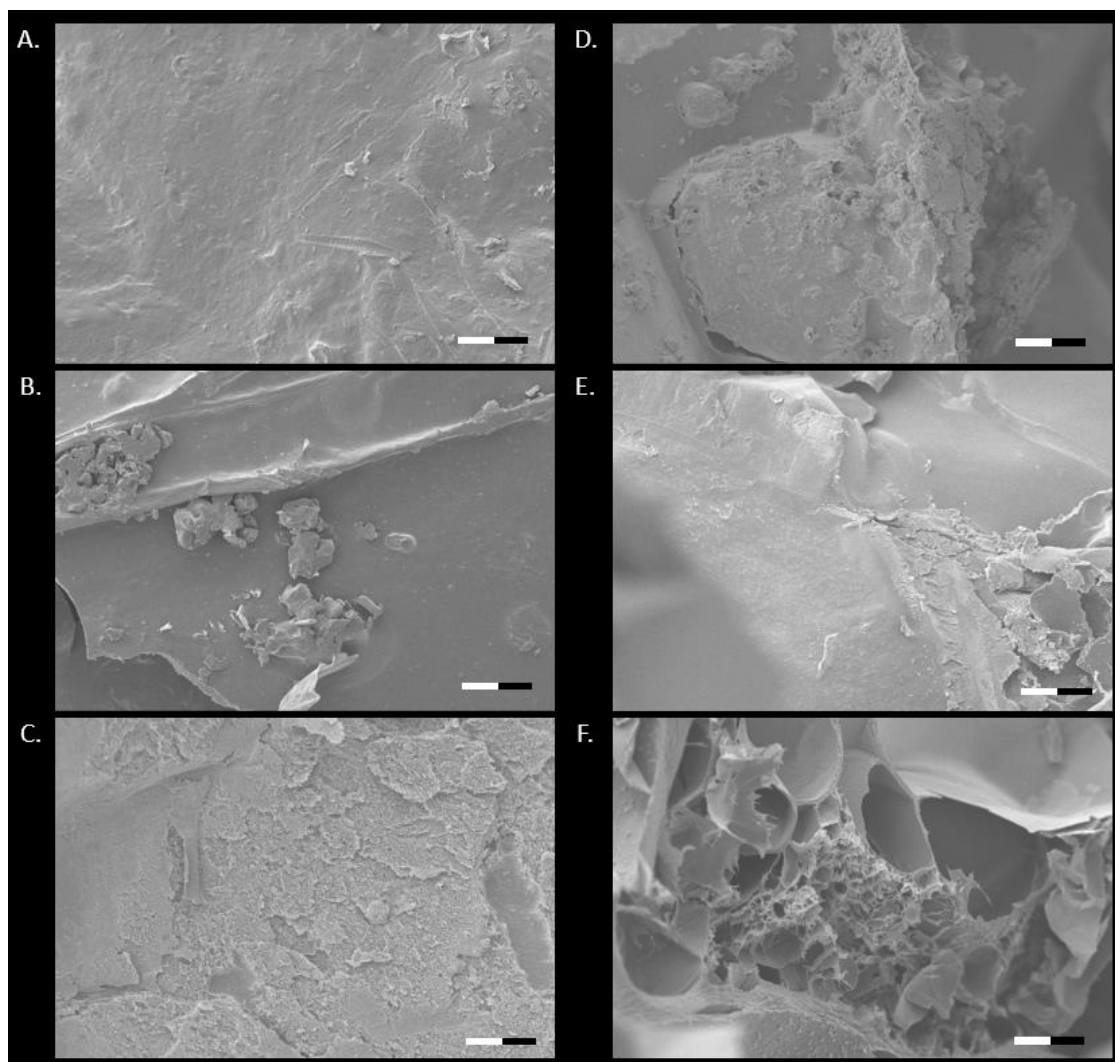
Obrázek 51 – Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu – zvětšení 100x (A – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě; B – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě se súdánskou červení; C – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH; D – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou černí; E – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou červení; F – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do 0,5 M NaOH) – měřítko 200 μm

Při 500násobném zvětšení je vidět lehké zvrásnění povrchu zkoumaných vzorků. To mohou být pozůstatky vnitřní pórovité struktury, která je poměrně dobře vidět na obrázku níže na snímku F (*Obrázek 52*). Tento gel byl velice pravděpodobně nejpevnější ze sady studovaných vzorků, jelikož byl připravován pouze reakcí na změnu pH (přikápnutím do 0,5 M roztoku NaOH), tudíž alespoň část jeho vnitřní struktury zůstala zachována. V okolí malých pórů jde však vidět velké trhliny, které jsou opět způsobeny nejpravděpodobněji tvorbou vodných krystalů při mražení vzorků. U snímku C by teoreticky bylo možné správným řezem odhalit obdobné struktury, jelikož povrch tohoto vzorku vypadá, že překrývá právě jistou síťovitou strukturu schovanou pod horní zdeformovanou (mražením a lyofilizací) vrstvou.



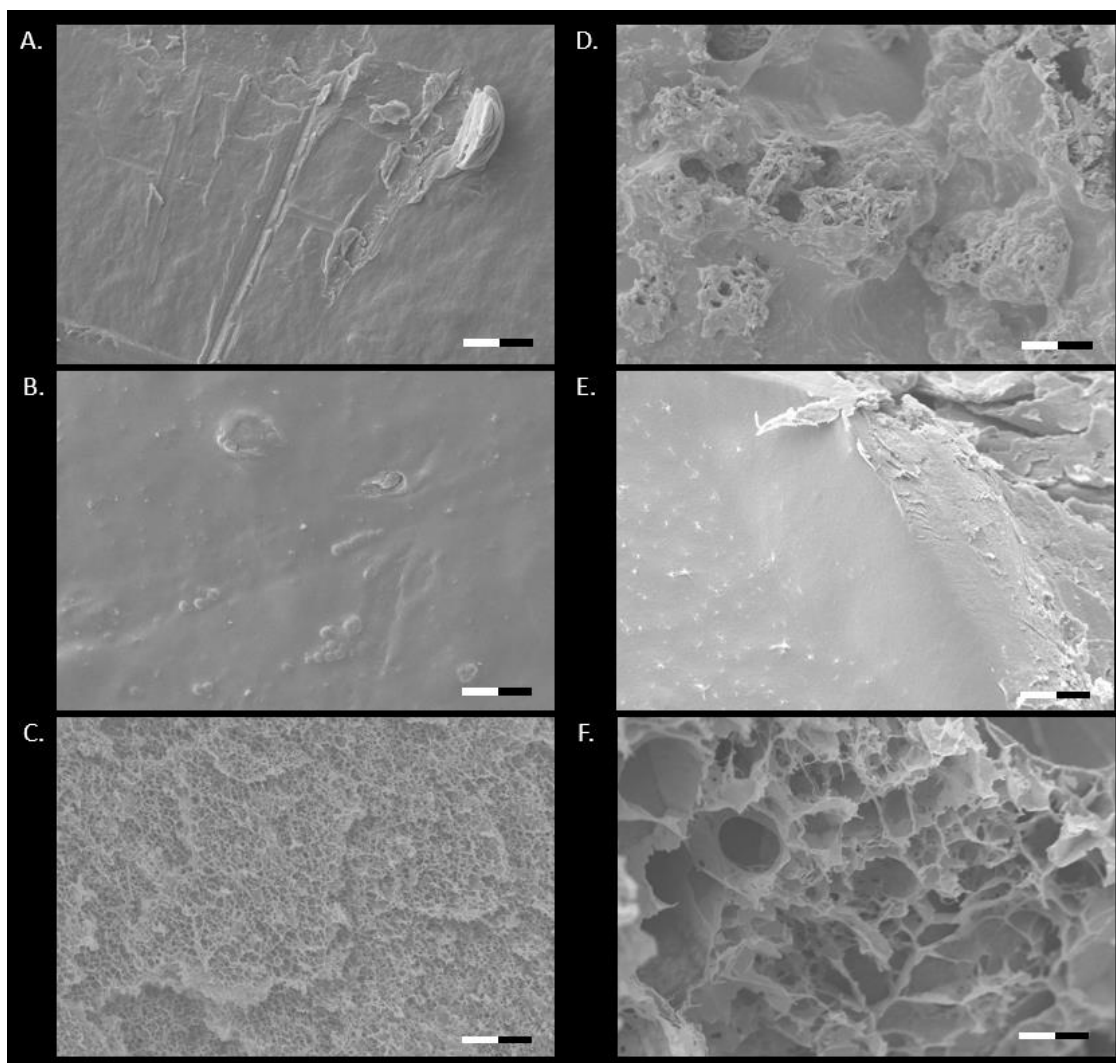
*Obrázek 52 - Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu – zvětšení 500x (A – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě; B – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě se súdánskou červení; C – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH; D – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou černí; E – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou červení; F – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do 0,5 M NaOH) – měřítko 40 µm*

Při 1000násobném zvětšení došlo k odhalení dalších mikrostruktur (*Obrázek 53*). U vzorku B by se mohlo jednat o vysrážené molekuly barviva v chitosanové síti – je však možné, že se jedná o nějaký druh nečistoty (vysrážená sůl). U vzorku D je pod povrchem patrné jisté zvrásnění a u vzorku C je v povrchovém zvrásnění vidět pórovitou strukturu.



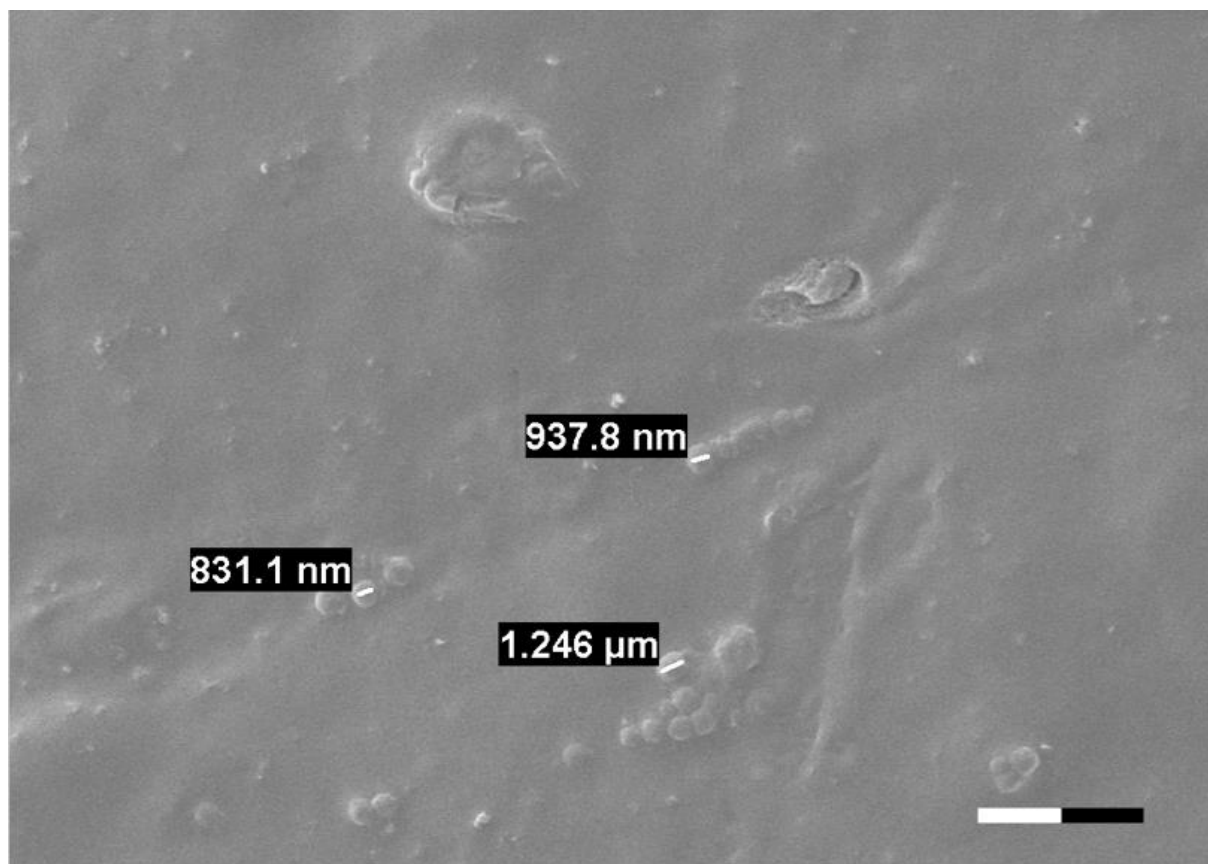
*Obrázek 53 – Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu – zvětšení 1000x (A – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě; B – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě se súdánskou červení; C – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH; D – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou červení; E – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou červení; F – chitosan 10 g/l v 3 % CH<sub>3</sub>COOH do 0,5 M NaOH) – měřítko 20 µm*

Při 5000násobném je vidět jistá (pod)povrchová síťovitá struktura u všech vzorků (Obrázek 54). U vzorku A se však pravděpodobně jedná o nahrnutí povrchové vrstvy skalpelem (způsobeným přípravou vzorku) či jiným mechanickým poškozením. Na vzorku B můžeme pozorovat vznik drobných vypouklin ve tvaru polokoule, dalo by se předpokládat, že se jedná o póry překryté zdeformovanou povrchovou vrstvou – tento vzorek byl podroben také velikostní analýze a je diskutován samostatně dále v práci. Jak již bylo zmíněno u předchozího obrázku, na vzorku C je patrná pórovitá struktura. Oproti pórům na obrázku F se jedná o velmi malé póry, je však možné, že jedny z nich jsou více zdeformované. Dalo by se však uvažovat i o vlivu přídavku rhamnolipidu do struktury gelu a tím i zjemnění chitosanové sítě – z reologických měření již víme, že gely bez přídavku BS jsou kompaktnější a dal by se tedy předpokládat vznik mohutnější chitosanové sítě oproti gelům s obsahem RL, které jsou křehčí.



Obrázek 54 – Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu – zvětšení 5000x (A – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě; B – chitosan 10 g/l v HCl do RL 10 g/l ve vodě se súdánskou červení; C – chitosan 10 g/l v 3 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH; D – chitosan 10 g/l v 3 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou červení; E – chitosan 10 g/l v 3 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do RL 10 g/l v 0,5 M NaOH se súdánskou červení; F – chitosan 10 g/l v 3 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do 0,5 M NaOH) – měřítko 4  $\mu\text{m}$

Jak je již zmíněno výše, tento obrázek lze považovat vedle snímků s pórovitou strukturou za jeden z nejzajímavějších. Po proměření velikosti pozorovaných útvarů je možné spekulovat, že se jedná o micely biosurfaktantu s obsahem hydrofobního barviva (*Obrázek 55*). S přihlédnutím k velikosti agregátů vznikajících v tomto systému, změřených pomocí metod rozptylu světla, velikosti přibližně odpovídají. Přístroj ZetaSizer změřil průměrnou velikost vznikajících částic řádově okolo 1  $\mu\text{m}$ . Bohužel pomocí tohoto přístroje není možné změřit reálné velikosti u systémů s vyšší koncentrací, jelikož při smíchání vyšších koncentrací roztoků dochází k tvorbě gelů. Teoreticky možnou metodou k alespoň částečnému stanovení velikosti pórů vznikajících ve vnitřní struktuře gelu by mohla být porozimetrie či tzv. BET analýza. Obě tyto metody jsou schopné měřit právě velikost vzniklých pórů, respektive měrný povrch vnitřní struktury studovaného systému.



*Obrázek 55 - Velikost útvarů měřená na snímku skenovacího elektronového mikroskopu u chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové a následně kapeného do vodného roztoku rhamnolipidu s obsahem súdánské červeně – měřítko 4  $\mu\text{m}$*

## 6 Závěr

V této diplomové práci bylo cílem provést screening možných metod vhodných pro inkorporaci micel vybraných biosurfaktantů do nosičových systémů a s jejich pomocí otestovat možnost solubilizace hydrofobních molekul do vnitřní struktury těchto systémů. V teoretické části byla provedena rešerše nejčastěji používaných komponent nosičových systémů, vhodných pro biomedicínské aplikace.

Na základě této literární rešerše byla vybrána sada molekul, potenciálně vhodných především pro vzájemné iontové interakce a zároveň poměrně inovativních, co se postupu přípravy týče. Jako modelové biosurfaktanty byly zvoleny rhamnolipidy a sophorolipidy, z důvodu jejich výhodných fyzikálně chemických vlastností, které byly zkoumány v předchozí práci. Tyto látky jsou v dostatečné kvalitě poměrně dobře dostupné, zároveň vykazují značný vliv na povrchové napětí již při nízkých koncentracích, což je tvoří ideálními kandidáty pro solubilizaci hydrofobních molekul, a v neposlední řadě jsou dobře rozpustné ve vodě. K těmto látkám byly vybrány opačně nabitě polyelektrolyty ze skupiny polysacharidů. Jako zástupci byly zvoleny DEAE dextran a chitosan. DEAE dextran je snadno dostupný, dobře rozpustný ve vodě a na svém řetězci nese poměrně vysokou hustotu kladného náboje. Naopak chitosan má nižší tendenci k iontovým interakcím, je špatně rozpustný ve vodě (klasickými rozpouštědly jsou kyselina chlorovodíková a octová), ale jsou potvrzeny jeho výrazné gelovací schopnosti (i bez síťovacího činidla, na bázi změny pH).

V praktické části práce byly ověřeny interakce mezi jednotlivými látkami. Původní předpoklad byl vznik gelů s různými mechanickými vlastnostmi na základě právě zvoleného biosurfaktantu a jeho polysacharidického protiiontu.

Prvotní experimenty byly prováděny jednoduchým sléváním roztoků DEAE dextranu a rhamnolipidu a vizuálním pozorováním vzniku makroskopické gelové fáze. Při neúspěchu v tvorbě gelů z této kombinace, byly interakce ověřeny také se sophorolipidy. Po opětovném neúspěchu se práce zaměřila na studium vznikajících struktur na molekulární úrovni pomocí rozptylů světla (dynamického a elektroforetického). S objevem zajímavých hodnot velikostí vznikajících agregátů v různých koncentračních poměrech byly tyto systémy podrobeny také vysokorozlišovací ultrazvukové spektroskopii. Tato metoda potvrdila předpoklad získaný pomocí rozptylových technik. V systému DEAE dextran a rhamnolipid dochází k tvorbě stabilních agregátů, které po překonání jisté koncentrační hranice vykazují přibližně stejnou velikost. To pravděpodobně značí vznik micelárních systémů biosurfaktantu, v němž jsou jednotlivé micely obaleny a některé také provázány pomocí polysacharidového řetězce. Ostatní kombinace látek byly poté ověřeny v úzkém okruhu této koncentrační hranice, vykazovaly však odlišné chování – projevující se především vznikem výrazně větších molekul. Zatímco ani zvýšením koncentrací jednotlivých složek nedošlo u systémů obsahujících DEAE dextran k tvorbě gelů, chitosan potvrdil své dobré gelovací schopnosti a následující část práce byla věnována právě studiu vznikajících makrostruktur.

Jako první byl proveden poměrně rozsáhlý screening možností přípravy chitosanových gelů. Byl ověřován především vliv různých koncentrací jak chitosanových roztoků, tak koncentrací obou biosurfaktantů, které kromě inkorporace hydrofobních molekul do struktury gelu, měly sloužit také jako pomocné síťovací činidlo (za pomoci iontových interakcí). Dále byl ověřován také vliv rozpouštědel jednotlivých složek vznikající struktury. U chitosanu byla pro tvorbu

roztoků používána kyselina chlorovodíková a octová. Biosurfaktanty byly rozpuštěny ve vodě či hydroxidu sodném (z důvodů ověřeného sítování chitosanu při zásaditých hodnotách pH). Různými kombinacemi rozpouštědel a koncentrací jednotlivých složek byly připraveny různé varianty gelů. Zatímco chitosan rozpuštěný v kyselině chlorovodíkové vykazoval lepší interakce s vodným roztokem rhamnolipidu, chitosan rozpuštěný v kyselině octové tvořil zajímavé gely v zásaditém roztoku rhamnolipidu. U sophorolipidů vůbec nedocházelo k tvorbě gelů ve vodném prostředí.

Následně byly ověřeny mechanické vlastnosti vzniklých gelů a jejich schopnost inkorporovat hydrofobních domény do svých struktur. Pomocí reologických experimentů bylo ověřeno, že vodné roztoky rhamnolipidů tvoří struktury na bázi „core – shell“ a při intenzivnějším namáhání dojde k poškození jejich vnitřní struktury. Naopak zásadité roztoky biosurfaktantů tvoří relativně homogenní a kompaktní gely. Z hlediska mechanických vlastností jsou si tyto systémy velmi podobné – vykazují pravděpodobně obdobnou hustotu zesílení. Vnitřní struktura jednotlivých gelů byla následně ověřena pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. U některých vzorků byla pozorována zajímavá pórovitá struktura, u většiny však došlo ke zborcení jemné struktury během přípravy vzorku pro analýzu.

Jednoduché testy pro ověření schopnosti solubilizace hydrofobních domén do vnitřních struktur gelů byly provedeny pomocí hydrofobních barviv. Roztoky rhamnolipidů zkoumané vzorky barviva nejen dobře rozpouštěly (oproti ostatním rozpouštědlům), ale také efektivně pomáhaly difuzi studovaných barviv do gelových struktur. Byl pozorován také vliv rozdílných struktur, v závislosti na počátečních roztocích, na rychlost a efektivitu uvolňování barviva ze vzniklých struktur. U chitosanu rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové a kapaného do vodných roztoků rhamnolipidu docházelo k poměrně rychlé difuzi barviva ze středové části (*core*) zatímco v obalové části (*shell*) micely s barvivem zůstávaly déle. Naopak u chitosanu rozpuštěného v kyselině octové a sítovaného v zásaditém roztoku rhamnolipidu docházelo k rovnoměrnému vymývání barviva z celého objemu gelové kapky. Tento fakt je velice užitečný pro případné využití těchto struktur jako nosičů léčiv s řízeným uvolňováním.

Závěrem se hodí říct, že biosurfaktanty jsou velmi zajímavé látky s velkým aplikačním potenciálem. Jejich hlavní nevýhodou nadále zůstává jejich cena, a tak minimálně v rozsáhlých průmyslových odvětvích zatím nemají šanci konkurovat syntetickým analogům. Na poli humánně zaměřených věd (biomedicíny, farmacie apod.) jsou schopny pomáhat s celou řadou aktuálních problémů – ať už se jedná o některé antibiotické rezistence, podání potenciálně toxických látek či dopravování hydrofobních molekul krevním řečištěm. Biosurfaktanty v poslední době byly, aktuálně jsou a v blízké budoucnosti jistě stále budou zájmem výzkumných projektů po celém světě.

## 7 Literatura

- [1] DRAKONTIS, Constantina a Samiul AMIN. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2020, **48**, 77-90 [cit. 2021-07-27]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2020.03.013
- [2] ABDEL-MAWGOUD, Ahmad, François LÉPINE a Eric DÉZIEL. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, **86**(5), 1323-1336. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-010-2498-2
- [3] VIJAYAKUMA, S. a V. SARAVANAN. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*. 2015, **10**(5), 181-192. ISSN 18164935. Dostupné z: doi:10.3923/jm.2015.181.192
- [4] SHARMA, Deepansh. Classification and Properties of Biosurfactants. SHARMA, Deepansh. *Biosurfactants in Food* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, s. 21-42 [cit. 2021-07-27]. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. ISBN 978-3-319-39413-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-39415-2\_2
- [5] JEŽDÍK, R. a J. MASÁK. *Kvasná chemie a bioinženýrství - Sborník souhrnů a plných textů: Potenciální možnosti snížení nákladů na produkci biosurfaktantů*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016, 80 s. ISBN 978-80-7080-966-2.
- [6] ASHBY, Richard a Daniel SOLAIMAN. Biosynthesis and Applications of Microbial Glycolipid Biosurfactants. TUNICK, Michael H. a LinShu LIU, ed., Michael TUNICK, LinShu LIU. *Innovative Uses of Agricultural Products and Byproducts* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2020, s. 63-82 [cit. 2021-07-06]. ACS Symposium Series. ISBN 9780841237155. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2020-1347.ch004
- [7] SHU, Qin, Hanghang LOU, Tianyu WEI, Xiayu LIU a Qihe CHEN. Contributions of Glycolipid Biosurfactants and Glycolipid-Modified Materials to Antimicrobial Strategy: A Review. *Pharmaceutics* [online]. 2021, **13**(2) [cit. 2021-07-27]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13020227
- [8] INÈS, Mnif a Ghribi DHOUHA. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydrate Research* [online]. 2015, **416**, 59-69 [cit. 2021-07-06]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2015.07.016
- [9] MNIF, Inès, Semia ELLOUZ-CHAABOUNI a Dhouha GHRIBI. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2018, **26**(5), 2192-2206 [cit. 2021-07-06]. ISSN 1566-2543. Dostupné z: doi:10.1007/s10924-017-1076-4
- [10] ESLAMI, Parisa, Hamidreza HAJFARAJOLLAH a Shayesteh BAZSEFIDPAR. Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances* [online]. 2020, **10**(56), 34014-34032 [cit. 2021-07-27]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D0RA04953K

- [11] CHONG, Huiqing a Qingxin LI. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories* [online]. 2017, **16**(1) [cit. 2021-07-05]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-017-0753-2
- [12] CHEN, Jianwei, Qihao WU, Yi HUA, Jun CHEN, Huawei ZHANG a Hong WANG. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2017, **101**(23-24), 8309-8319 [cit. 2021-07-05]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8554-4
- [13] GUNTHER, Nereus, Alberto NUÑEZ, Laurie FORTIS a Daniel SOLAIMAN. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **33**(11), 914-920 [cit. 2021-07-05]. ISSN 1367-5435. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-006-0169-1
- [14] KURTZMAN, Cletus, Neil PRICE, Karen RAY a Tsung-Min KUO. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2010, **311**(2), 140-146 [cit. 2021-07-28]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02082.x
- [15] SEN, Suparna, Siddhartha BORAH, Raghuram KANDIMALLA, Arijit BORA a Suresh DEKA. Sophorolipid Biosurfactant Can Control Cutaneous Dermatophytosis Caused by *Trichophyton mentagrophytes*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, **11** [cit. 2021-07-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.00329
- [16] ROY, Arpita. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications* [online]. 2018, **08**(01) [cit. 2021-07-18]. ISSN 20904541. Dostupné z: doi:10.4172/2090-4541.1000248
- [17] KOSARIC, Naim a Fazilet VARDAR-SUKAN. *Biosurfactants: production and utilization--processes, technologies, and economics*. Boca Raton: CRC Press, 2015. ISBN 978-1-4665-9669-6.
- [18] RAMKRISHNA, Sen, ed. *Biosurfactants*. Volume 672. New York: Springer-Verlag New York, 2010. ISBN 978-1-4419-5978-2.
- [19] CAROLIN C, Femina, P. KUMAR a P. NGUEAGNI. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2021, **407** [cit. 2021-07-18]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124827
- [20] CHEN, Yulin, Shiliang LIU, Haijin MOU, Yunxiao MA, Meng LI a Xiaoke HU. Characterization of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from Marine Sediments. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [cit. 2021-07-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00871
- [21] DESAI, J, I BANAT a Eric DÉZIEL. Microbial production of surfactants and their commercial potential: diversity of structures, microbial origins and roles. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 1997, **61**(1), 47-64. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/.61.1.47-64.1997

- [22] DESAI, J a IBANAT. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 1997, **61**(1), 47-64. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/.61.1.47-64.1997
- [23] REIS, R.S., G.J. PACHECO, A.G. PEREIRA a D.M.G. FREIRE. Biosurfactants: Production and Applications. CHAMY, Rolando, ed., Rolando CHAMY. *Biodegradation - Life of Science* [online]. InTech, 2013 [cit. 2021-07-28]. ISBN 978-953-51-1154-2. Dostupné z: doi:10.5772/56144
- [24] KULKARNI, Vitthal a Charles SHAW. *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages*. 1. San Diego, CA: Elsevier Science, 2015, 256 s. ISBN 978-0-12-801024-2.
- [25] ZHANG, Yifei, Yixian HUANG a Song LI. Polymeric Micelles: Nanocarriers for Cancer-Targeted Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2014, **15**(4), 862-871 [cit. 2021-06-27]. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-014-0113-z
- [26] AZAM, Mohd, Nor ZULKAPLI, Zulhilmi NAWI a Nik AZREN. Systematic review of catalyst nanoparticles synthesized by solution process: towards efficient carbon nanotube growth. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* [online]. 2015, **73**(2), 484-500 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0928-0707. Dostupné z: doi:10.1007/s10971-014-3600-5
- [27] NIČ, Miloslav, Jiří JIRÁT, Bedřich KOŠATA, Aubrey JENKINS a Alan MCNAUGHT, ed. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* [online]. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009 [cit. 2021-04-12]. ISBN 0-9678550-9-8.
- [28] SOSA FERRERA, Zoraida, Carolina PADRÓN SANZ, Cristina MAHUGO SANTANA a José SANTANA RODRÍGUEZ. The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2004, **23**(7), 469-479 [cit. 2021-04-13]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(04)00732-0
- [29] VASIR, Jaspreet a Vinod LABHASETWAR. Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment* [online]. 2005, **4**(4), 363-374 [cit. 2021-06-20]. ISSN 1533-0346. Dostupné z: doi:10.1177/153303460500400405
- [30] YEREBASAN ULKU, a GUL BAYKALIR BURCU. The importance of nanotechnology and drug carrier systems in pharmacology. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2020, **10**(2), 014-023. ISSN 25813250. Dostupné z: doi:10.30574/gscbps.2020.10.2.0018
- [31] *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery* [online]. 1st ed. Cambridge: Elsevier, 2020 [cit. 2021-06-20]. ISBN 9780081029855. Dostupné z: doi:10.1016/C2018-0-02205-7
- [32] ZHANG, Yue, Meifang ZHAI, Zhijiang CHEN et al. Dual-modified liposome codelivery of doxorubicin and vincristine improve targeting and therapeutic efficacy of glioma. *Drug Delivery* [online]. 2017, **24**(1), 1045-1055 [cit. 2021-06-27]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2017.1344334
- [33] BARENHOLZ, Yechezkel (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **160**(2), 117-134 [cit. 2021-06-27]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.03.020

- [34] DAS, Ram, Vishwa GANDHI, Beena SINGH a Amit KUNWAR. Passive and Active Drug Targeting: Role of Nanocarriers in Rational Design of Anticancer Formulations. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2019, **25**(28), 3034-3056 [cit. 2021-07-28]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612825666190830155319
- [35] PANDITA, Deepti, Neelam POONIA, Sandeep KUMAR, Viney LATHER a Kanika MADAAN. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. 2014, **6**(3) [cit. 2021-06-27]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.130965
- [36] LE, Ngoc, Thi NGUYEN, Van CAO, Duc HOANG, Van NGO a Thai HOANG THI. Recent Progress and Advances of Multi-Stimuli-Responsive Dendrimers in Drug Delivery for Cancer Treatment. *Pharmaceutics* [online]. 2019, **11**(11) [cit. 2021-06-27]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11110591
- [37] SUHAIL, Muhammad, Jessica ROSENHOLM, Muhammad MINHAS, Syed BADSHAH, Abid NAEEM, Kifayat KHAN a Muhammad FAHAD. Nanogels as drug-delivery systems: a comprehensive overview. *Therapeutic Delivery* [online]. 2019, **10**(11), 697-717 [cit. 2021-07-12]. ISSN 2041-5990. Dostupné z: doi:10.4155/tde-2019-0010
- [38] ROGOVINA, L., V. VASIL'EV a E. BRAUDO. Definition of the concept of polymer gel. *Polymer Science Series C* [online]. 2008, **50**(1), 85-92 [cit. 2021-05-13]. ISSN 1811-2382. Dostupné z: doi:10.1134/S1811238208010050
- [39] ZHANG, Jianyong, Ya HU a Yongguang LI. *Gel Chemistry: Interactions, Structures and Properties*. 1st ed. Singapore: Springer, 2018. ISBN 978-981-10-6881-2.
- [40] PEKCAN, ÖNDER a SELIM KARA. GELATION MECHANISMS. *Modern Physics Letters B* [online]. 2012, **26**(27) [cit. 2021-06-18]. ISSN 0217-9849. Dostupné z: doi:10.1142/S0217984912300190
- [41] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [42] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-617-6.
- [43] HENNINK, W.E. a C.F. VAN NOSTRUM. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**, 223-236 [cit. 2021-07-13]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.09.009
- [44] BUKHARI, Syed, Samiullah KHAN, Muhammad REHANULLAH a Nazar RANJHA. Synthesis and Characterization of Chemically Cross-Linked Acrylic Acid/Gelatin Hydrogels: Effect of pH and Composition on Swelling and Drug Release. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2015, **2015**, 1-15 [cit. 2021-07-13]. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2015/187961
- [45] HU, Weikang, Zijian WANG, Yu XIAO, Shengmin ZHANG a Jianglin WANG. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials Science*

- [online]. 2019, **7**(3), 843-855 [cit. 2021-07-13]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C8BM01246F
- [46] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [47] AEGERTER, Michel A., ed. *Aerogels handbook*. 1st ed. New York: Springer, 2011. Advances in sol-gel derived materials and technologies. ISBN 9781441974778.
- [48] MAHLTIG, Boris, Thomas GRETHE a Hajo HAASE. Antimicrobial Coatings Obtained by Sol-Gel Method. KLEIN, Lisa, Mario APARICIO a Andrei JITIANU, ed., Lisa KLEIN, Mario APARICIO, Andrei JITIANU. *Handbook of Sol-Gel Science and Technology* [online]. Second edition. Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 3461-3487 [cit. 2021-05-13]. ISBN 978-3-319-32099-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-32101-1\_102
- [49] MONTEBAULT, Alexandra, Christophe VITON a Alain DOMARD. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(8), 933-943 [cit. 2021-05-18]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.033
- [50] NILSEN-NYGAARD, Julie, Sabina STRAND, Kjell VÅRUM, Kurt DRAGET a Catherine NORDGÅRD. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers* [online]. 2015, **7**(3), 552-579 [cit. 2021-05-18]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym7030552
- [51] ARMISÉN, R. a F. GAIATAS. Agar. *Handbook of Hydrocolloids* [online]. Second edition. Cambridge: Elsevier, 2009, s. 82-107 [cit. 2021-06-18]. ISBN 9781845694142. Dostupné z: doi:10.1533/9781845695873.82
- [52] KOHAJDOVÁ, Zlatica a Jolana KAROVIČOVÁ. Application of hydrocolloids as baking improvers. *Chemical Papers* [online]. 2009, **63**(1) [cit. 2021-07-26]. ISSN 1336-9075. Dostupné z: doi:10.2478/s11696-008-0085-0
- [53] LEE, Kuen a David MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, **37**(1), 106-126 [cit. 2021-06-18]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- [54] SALAHUDDIN, Bidita, Shuo WANG, Danial SANGIAN, Shazed AZIZ a Qi GU. Hybrid Gelatin Hydrogels in Nanomedicine Applications. *ACS Applied Bio Materials* [online]. 2021, **4**(4), 2886-2906 [cit. 2021-06-19]. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.0c01630
- [55] DEVOLDER, Ross a Hyun-Joon KONG. Hydrogels for in vivo -like three-dimensional cellular studies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* [online]. 2012, **4**(4), 351-365 [cit. 2021-06-19]. ISSN 19395094. Dostupné z: doi:10.1002/wsbm.1174
- [56] KIM, Sujin, Byung SHIN, Chungmo YANG et al. Development of Poly(HEMA-Am) Polymer Hydrogel Filler for Soft Tissue Reconstruction by Facile Polymerization. *Polymers* [online]. 2018, **10**(7) [cit. 2021-06-19]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10070772

- [57] MAEDA, Hiroshi. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation* [online]. 2001, **41**(1), 189-207 [cit. 2021-07-14]. ISSN 00652571. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2571(00)00013-3
- [58] ATTIA, Mohamed, Nicolas ANTON, Justine WALLYN, Ziad OMRAN a Thierry VANDAMME. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2019, **71**(8), 1185-1198 [cit. 2021-07-28]. ISSN 2042-7158. Dostupné z: doi:10.1111/jphp.13098
- [59] DANHIER, Fabienne, Olivier FERON a Véronique PRÉAT. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **148**(2), 135-146 [cit. 2021-07-14]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027
- [60] SONG, Dandan, Yiming LI, Shengkang LIANG a Jiangtao WANG. Micelle behaviors of sophorolipid/rhamnolipid binary mixed biosurfactant systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, **436**, 201-206. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2013.06.011
- [61] HOO, Christopher, Natasha STAROSTIN, Paul WEST a Martha MECARTNEY. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008, **10**(1), 89-96. ISSN 1388-0764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-008-9435-7
- [62] Malvern Panalytical: Dynamic light scattering. *Malvern Panalytical* [online]. Malvern: Malvern Panalytical Ltd, 2021 [cit. 2021-01-12]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- [63] LYKLEMA, J. *Fundamentals of interface and colloid science*. Vol. 2. Amsterdam: Elsevier, 1995. ISBN 0-12-460529-X.
- [64] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zeta Sizer Nanoseries User Manual*. Issue 1.1. Worcestershire, United Kingdom, 2013.
- [65] ABD MUTALIB, M., M.A. RAHMAN, M.H.D. OTHMAN, A.F. ISMAIL a J. JAAFAR. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy. *Membrane Characterization* [online]. Elsevier, 2017, s. 161-179 [cit. 2021-07-26]. ISBN 9780444637765. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00009-7
- [66] VERNON-PARRY, K.D. Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review* [online]. 2000, **13**(4), 40-44 [cit. 2021-07-14]. ISSN 09611290. Dostupné z: doi:10.1016/S0961-1290(00)80006-X
- [67] TIAN, Zhen, Nai BING a Hong XIE. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy for Crystallization Process. *Advanced Materials Research* [online]. 2012, **508**, 146-150 [cit.

2021-07-14]. ISSN 1662-8985. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.508.146

- [68] SARVAZYAN, A P. Ultrasonic Velocimetry of Biological Compounds. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* [online]. 1991, **20**(1), 321-342 [cit. 2021-07-14]. ISSN 0883-9182. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bb.20.060191.001541
- [69] BUCKIN, V. a M. CARAS ALTAS. C1.1 - High-resolution ultrasonic spectroscopy. In: *Proceedings Sensor 2017* [online]. AMA Service GmbH, Von-Münchhausen-Str. 49, 31515 Wunstorf, Germany, 2017, s. 298-303 [cit. 2021-07-14]. ISBN 978-3-9816876-4-4. Dostupné z: doi:10.5162/sensor2017/C1.1
- [70] BABY, Deepa K. Rheology of hydrogels. *Rheology of Polymer Blends and Nanocomposites* [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, s. 193-204 [cit. 2021-07-14]. ISBN 9780128169575. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816957-5.00009-4
- [71] YAN, Congqi a Darrin Pochan. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chemical Society Reviews* [online]. 2010, **39**(9) [cit. 2021-07-14]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b919449p
- [72] OPARA, Emanuel. *Controlled Drug Delivery Systems*. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2020. ISBN 978-0-367-18717-0.
- [73] PATRA, Jayanta, Gitishree DAS, Leonardo FRACETO et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2018, **16**(1) [cit. 2021-05-13]. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-018-0392-8
- [74] SANTOS, Danyelle, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, **17**(3), 401-. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17030401
- [75] NGUYEN, Bac, Toshiki NAGAKUBO, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA a Andrew UTADA. Synergy between Sophorolipid Biosurfactant and SDS Increases the Efficiency of *P. aeruginosa* Biofilm Disruption. *Langmuir* [online]. 2020, **36**(23), 6411-6420 [cit. 2021-07-06]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.0c00643
- [76] SAIMMAI, Atipan, Wiboon RIANSA-NGAWONG, Suppasil MANEERAT a Paweena DIKIT. Application of Biosurfactants in the Medical Field. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2019, **17**(2), 154-166. ISSN 2228-835X. Dostupné z: doi:10.48048/wjst.2020.4748
- [77] GUDIÑA, Eduardo, Vivek RANGARAJAN, Ramkrishna SEN a Lúgia RODRIGUES. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013, **34**(12), 667-675. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2013.10.002
- [78] HAZRA, Chinmay, Debasree KUNDU, Aniruddha CHATTERJEE, Ambalal CHAUDHARI a Satyendra MISHRA. Poly(methyl methacrylate) (core)–biosurfactant (shell) nanoparticles: Size controlled sub-100nm synthesis, characterization, antibacterial activity, cytotoxicity and sustained drug release behavior. *Colloids and Surfaces A:*

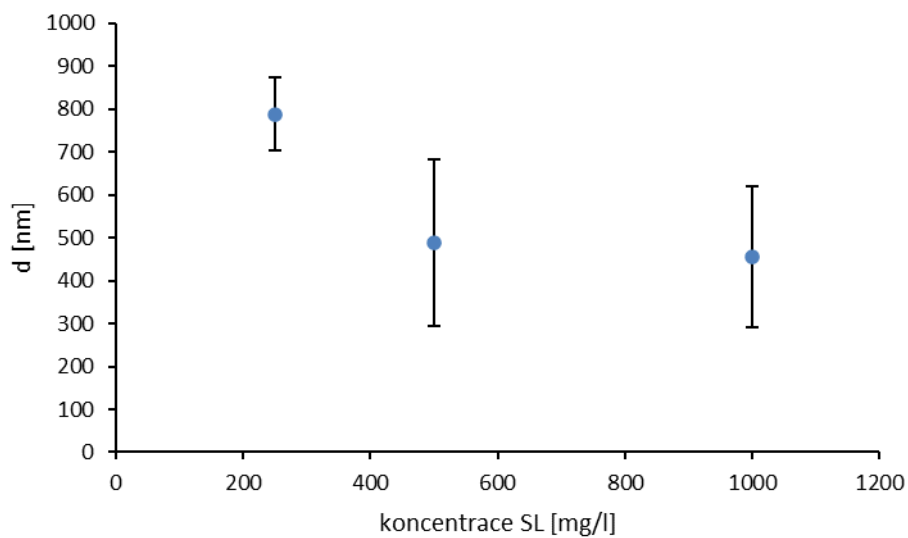
- Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, **449**, 96-113. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2014.02.051
- [79] ANAND, Anubhav, Malti ARYA, Gaurav KAITHWAS, Gyanendra SINGH a Shubhini SARAF. Sucrose stearate as a biosurfactant for development of rivastigmine containing nanostructured lipid carriers and assessment of its activity against dementia in *C. elegans* model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019, **49**, 219-226. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2018.11.021
- [80] MÜLLER, Felix, Stefan HÖNZKE, Wulf-Ole LUTHARDT et al. Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017, **116**, 31-37. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2016.12.013
- [81] RODRIGUES, Ligia R. Microbial surfactants: Fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015, **449**, 304-316. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2015.01.022
- [82] GONÇALVES, Mara, Dina MACIEL, Débora CAPELO et al. Dendrimer-Assisted Formation of Fluorescent Nanogels for Drug Delivery and Intracellular Imaging. *Biomacromolecules* [online]. 2014, **15**(2), 492-499 [cit. 2021-07-12]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm401400r
- [83] MENON, Premanarayani, Teo YIN YIN a Misni MISRAN. Preparation and characterization of liposomes coated with DEAE-Dextran. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, **481**, 345-350 [cit. 2021-07-26]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2015.05.036
- [84] HUA, Mutian, Shuwang WU, Yanfei MA et al. Strong tough hydrogels via the synergy of freeze-casting and salting out. *Nature* [online]. 2021, **590**(7847), 594-599 [cit. 2021-07-17]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03212-z

## 8 Seznam symbolů a zkratek

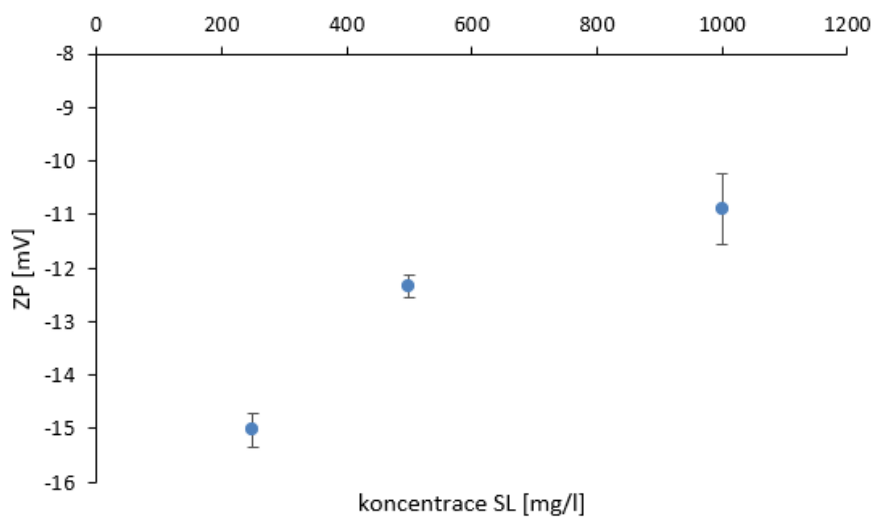
<b>D</b>	Difuzní koeficient
<b>k</b>	Boltzmannova konstanta
<b><math>\pi</math></b>	Ludolfovo číslo
<b><math>\eta</math></b>	Viskozita rozpouštědla
<b>T</b>	Teplota měření
<b><math>d_h</math></b>	Hydrodynamický poloměr
<b><math>\gamma</math></b>	Ztrátový úhel
<b><math>G^*</math></b>	Komplexní viskoelastický modul
<b>BS</b>	Biosurfaktant
<b>RL</b>	Rhamnolipid
<b>SL</b>	Sophorolipid
<b>DLS</b>	Dynamic light scattering (Dynamický rozptyl světla)
<b>SEM</b>	Scanning electron microscope (Skenovací elektronový mikroskop)
<b>TEM</b>	Transmission electron microscope (Transmisní elektronový mikroskop)
<b>CMC</b>	Kritická micelární koncentrace
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PCL</b>	Polykaprolakton
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Americký ústav pro kontrolu potravin a léčiv)
<b>ZP</b>	Zeta potenciál
<b>HRUS</b>	High Resolution Ultrasound Spectroscopy (vysokorozlišovací ultrazvuková spektroskopie)
<b>LVO</b>	Lineární viskoelastická oblast

## Přílohy

Grafy hodnot naměřených pro samostatné roztoky sophorolipidů pomocí rozptylových technik



Obrázek 56 - Velikost částic sophorolipidu v závislosti na koncentraci



Obrázek 57 - Závislost zeta potenciálu na koncentraci sophorolipidu

## Výsledky získané pomocí přístroje Nanophox



Sympatec GmbH  
System-Partikel-Technik



**NANOPHOX (NX0080), Cross correlation**

**PS pokus**

2021-05-07, 13:58:17,006

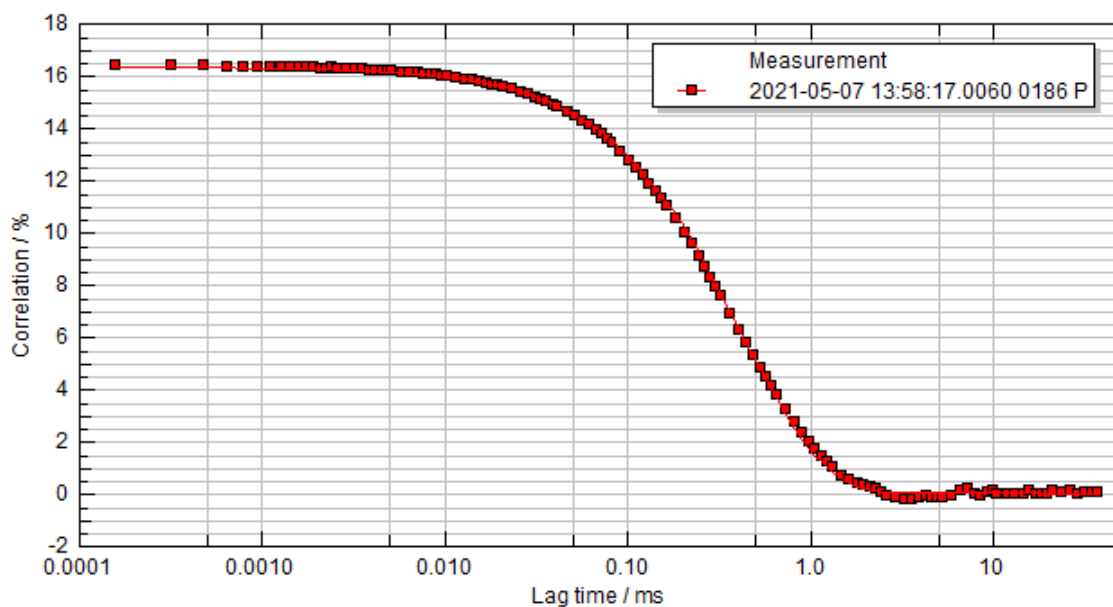
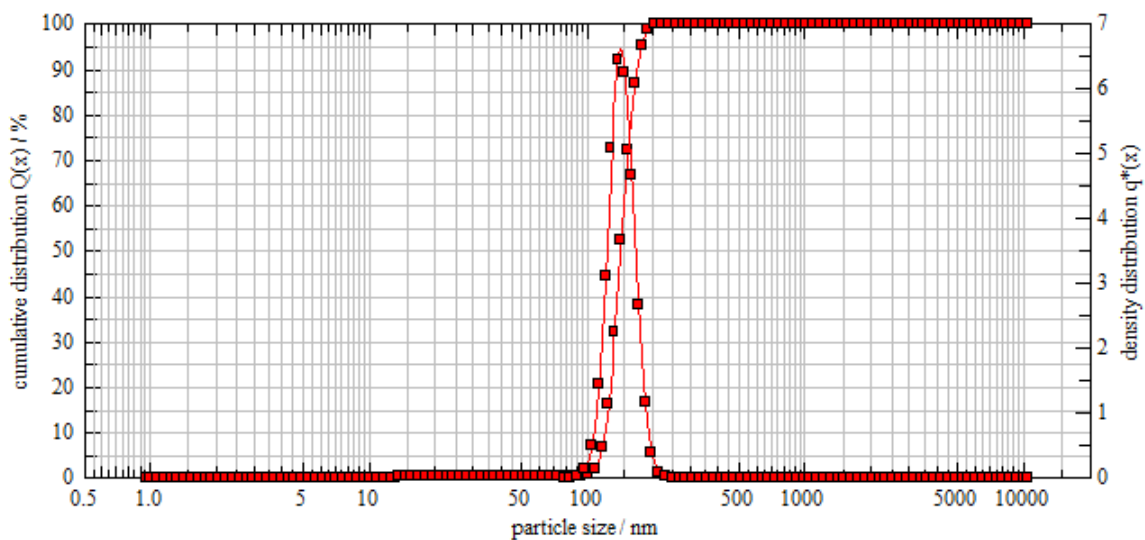
$x_{50} = 142.54 \text{ nm}$       $x_{90} = 171.19 \text{ nm}$

SMD= 141.26 nm

VMD = 144.00 nm

$x_{99} = 197.25 \text{ nm}$

$S_v = 42.48 \text{ m}^2/\text{cm}^3$



Obrázek 58 - Výsledky z přístroje Nanophox pro 2:1 – 1000 mg/l RL:0,1 g/l



Sympatec GmbH  
System-Partikel-Technik



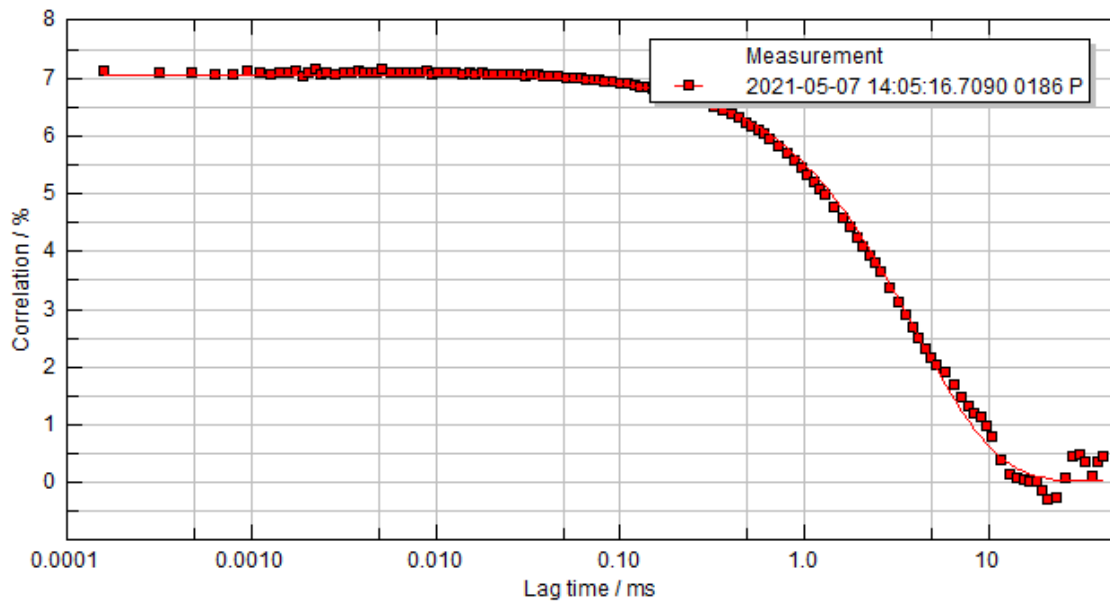
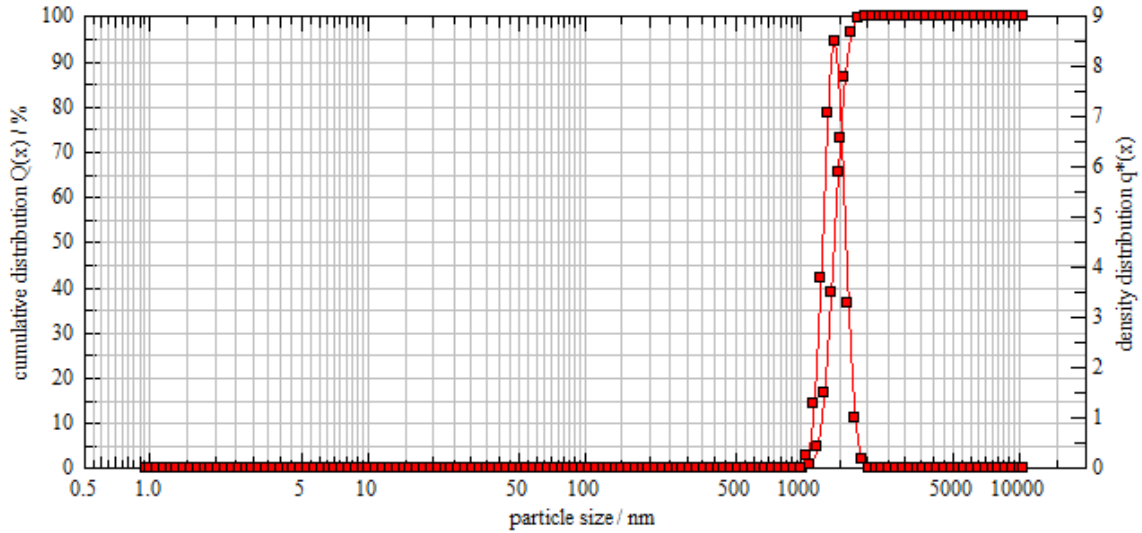
**NANOPHOX (NX0080), Cross correlation**

**PS pokus**

2021-05-07, 14:05:16,709

$x_{50} = 1404.06 \text{ nm}$      $x_{90} = 1617.87 \text{ nm}$   
 $x_{99} = 1796.99 \text{ nm}$

$SMD = 1396.00 \text{ nm}$      $VMD = 1411.71 \text{ nm}$   
 $S_V = 4.30 \text{ m}^2/\text{cm}^3$



Obrázek 59 - Výsledky z přístroje Nanophox pro 2:1 – 500 mg/l RL:0,1 g/l



Sympatec GmbH  
System-Partikel-Technik



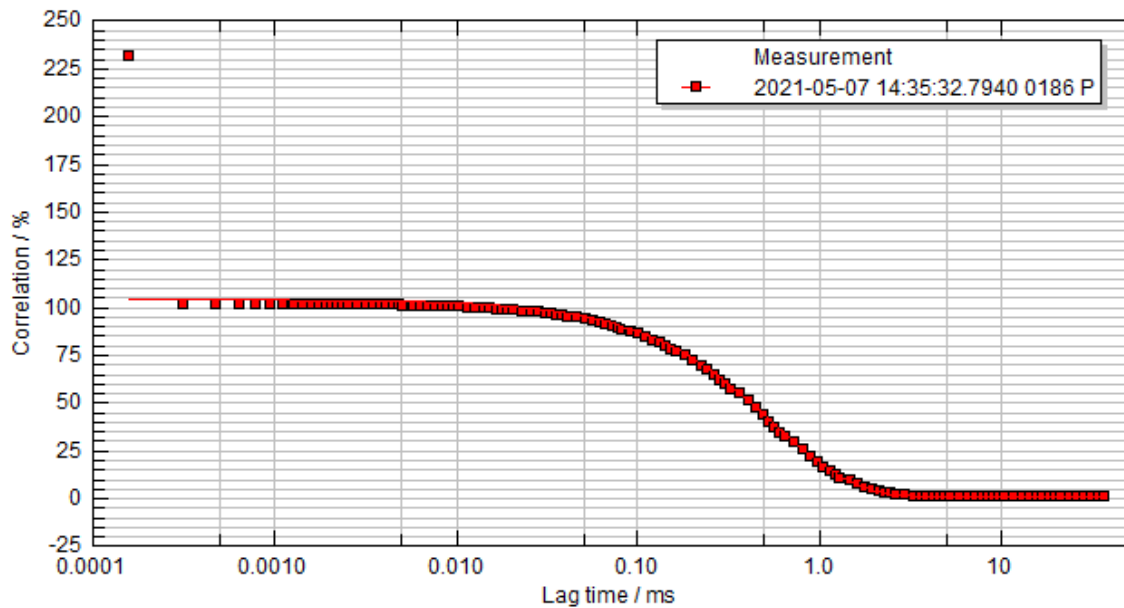
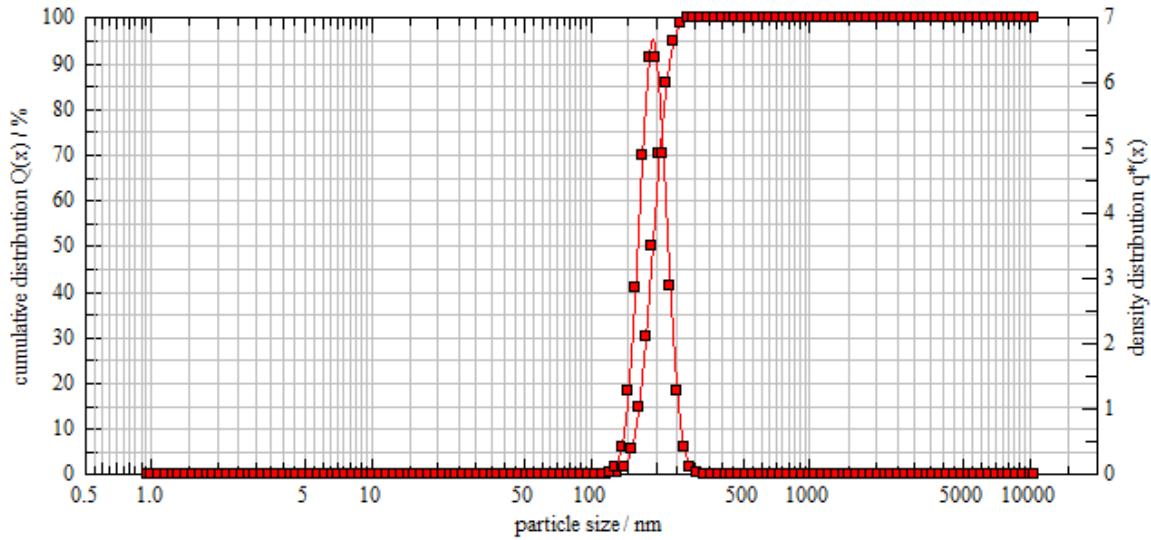
### NANOPHOX (NX0080), Auto correlation

#### PS pokus

2021-05-07, 14:35:32,794

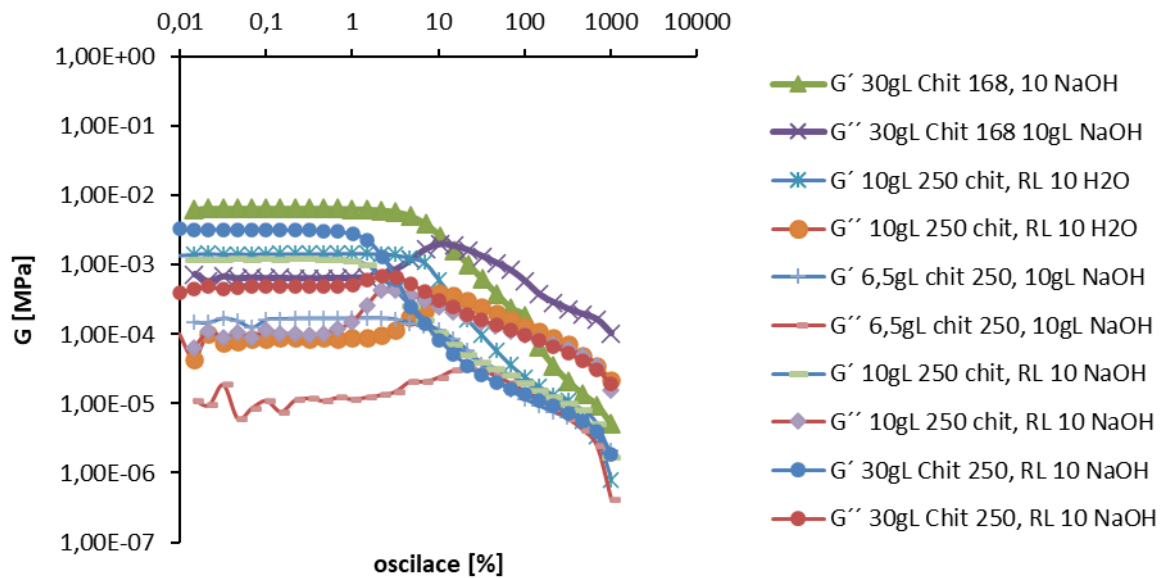
$x_{50} = 192.15 \text{ nm}$      $x_{90} = 230.53 \text{ nm}$   
 $x_{99} = 265.32 \text{ nm}$

SMD = 190.47 nm    VMD = 194.09 nm  
 $S_v = 31.50 \text{ m}^2/\text{cm}^3$

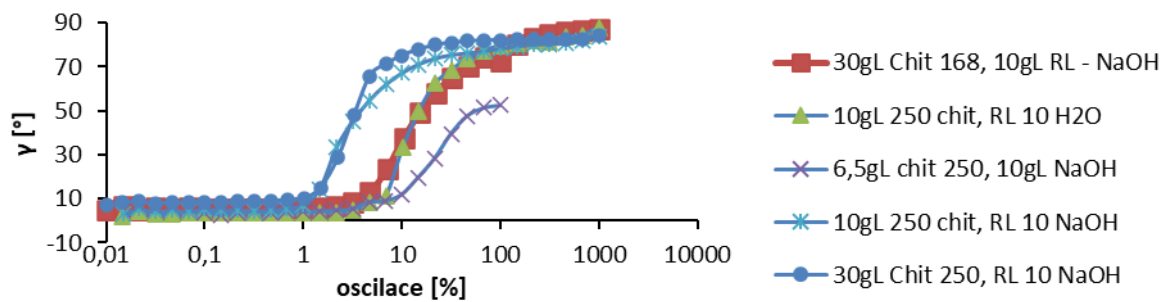


Obrázek 60 - Výsledky z přístroje Nanophox pro 2:1 – 250 mg/l RL:0,1 g/l

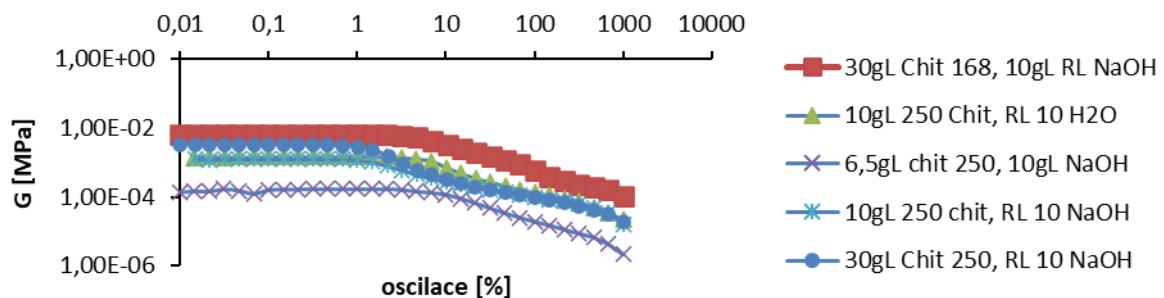
**Výsledky získané pomocí reologických měření pro chitosan rozpuštěný v 0,1 M kyselině chlorovodíkové a kapány do roztoků rhamnolipidu o koncentraci 10 g/l**



Obrázek 61 - Velikost jednotlivých modulů pro chitosan v 0,1 M HCl

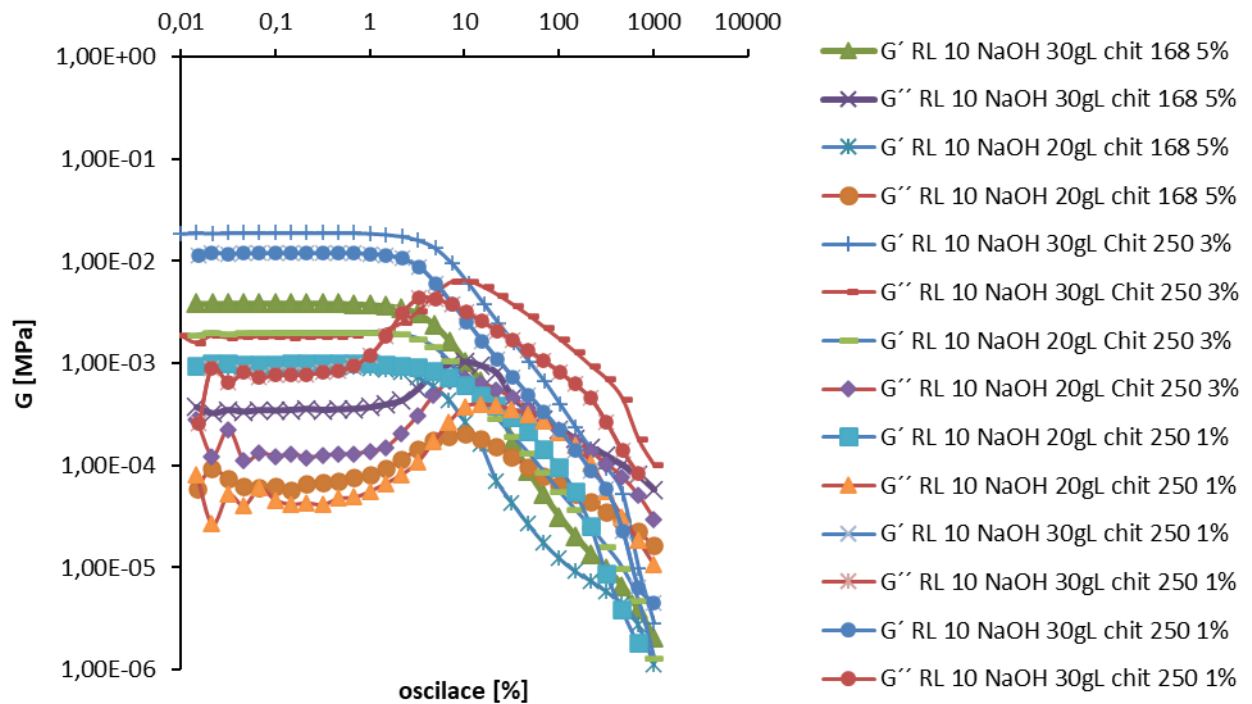


Obrázek 62 - Hodnoty ztrátového úhlu pro chitosan rozpuštěný v 0,1 M HCl

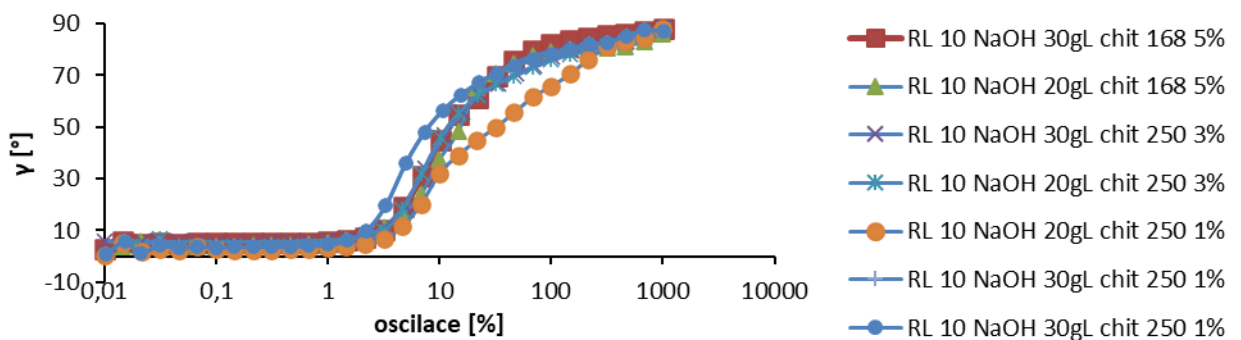


Obrázek 63 - Hodnoty komplexního modulu pro chitosan v 0,1 M HCl

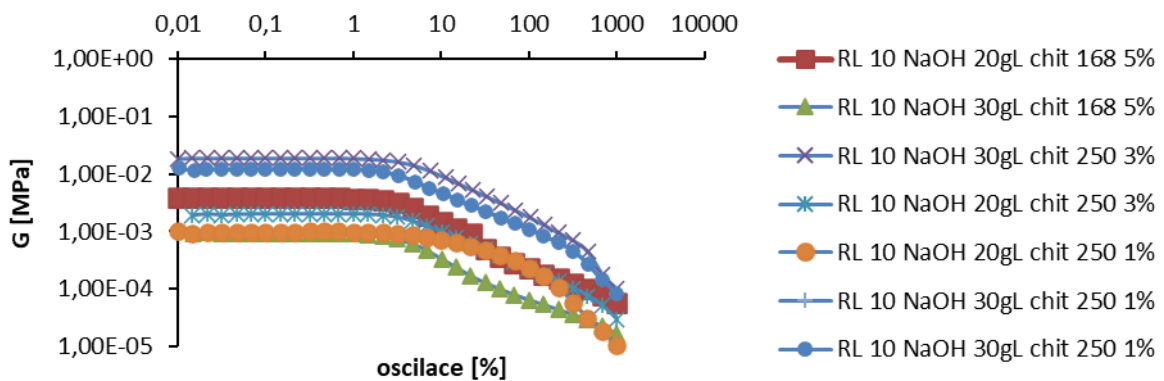
**Výsledky získané pomocí reologických měření pro chitosan rozpuštěný v 3 % kyselině octové a kapáný do roztoků rhamnolipidu o koncentraci 10 g/l**



Obrázek 64 - Velikost jednotlivých modulů pro chitosan ve 3 % kyselině octové

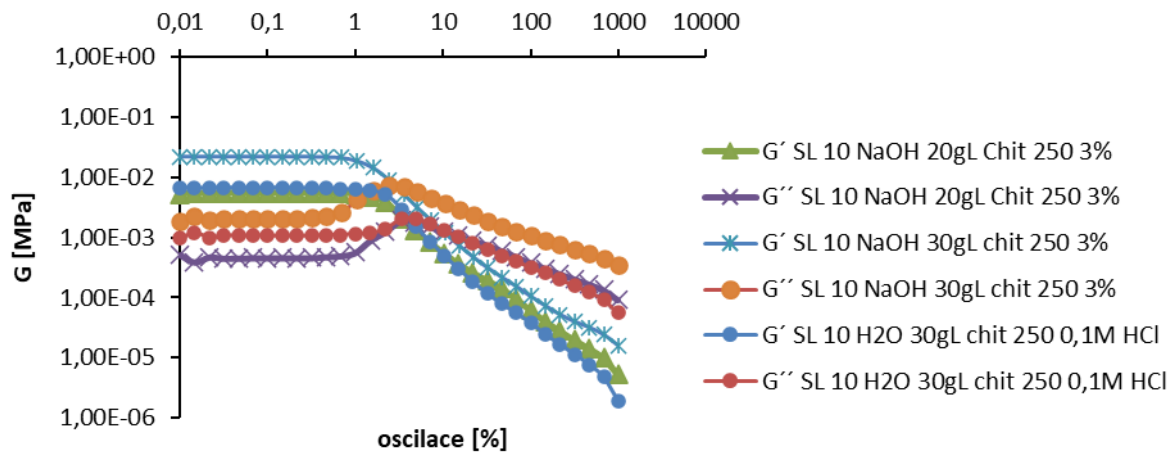


Obrázek 65 - Hodnoty ztrátového úhlu pro chitosan rozpuštěný ve 3 % kyselině octové

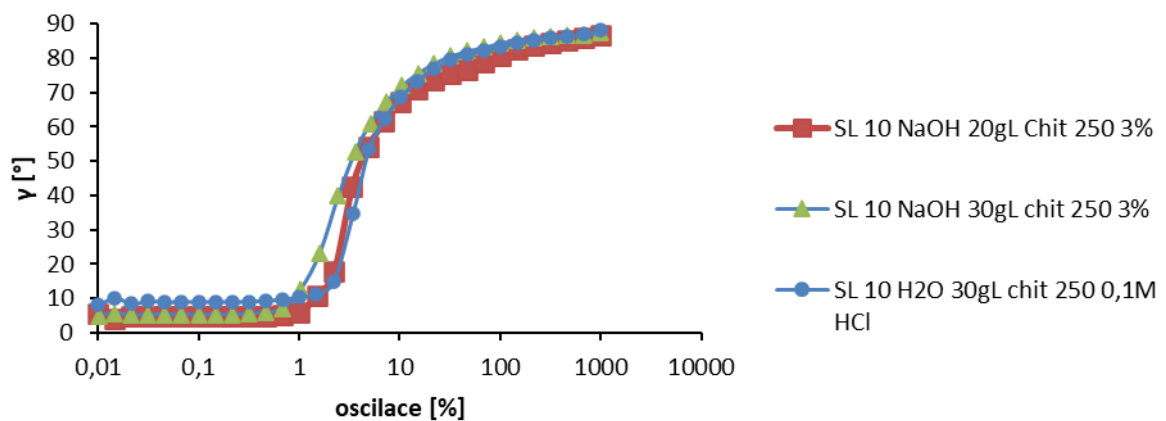


Obrázek 66 - Hodnoty komplexního modulu pro chitosan ve 3 % kyselině octové

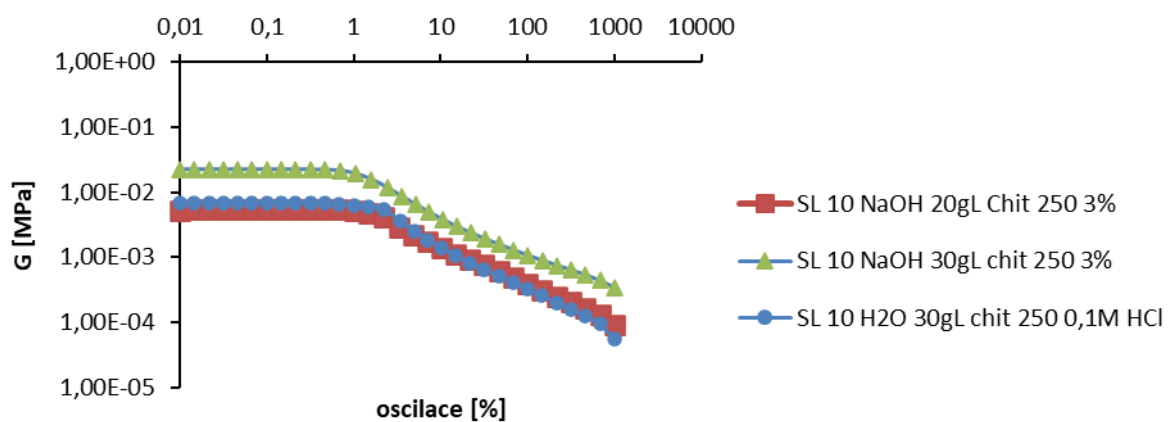
**Výsledky získané pomocí reologických měření pro chitosan rozpuštěný v různých kyselinách a kapány do roztoků sophorolipidu**



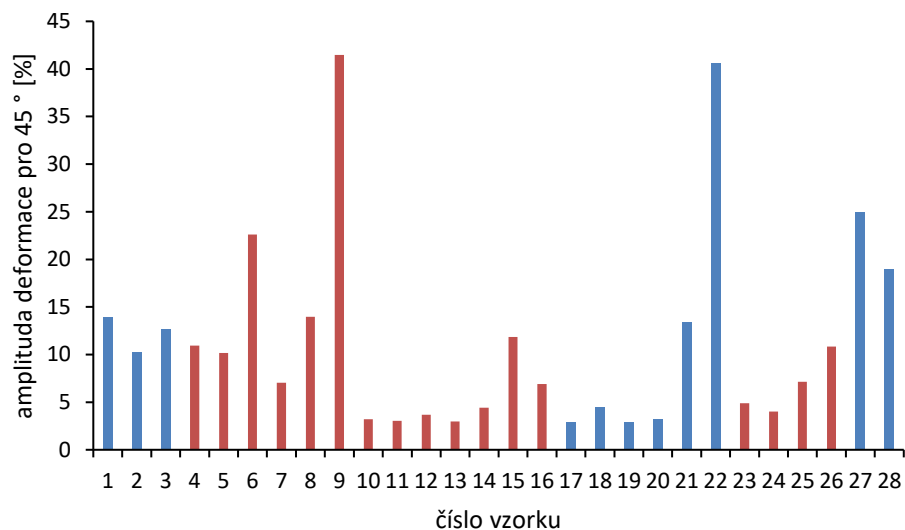
Obrázek 67 - Velikost jednotlivých modulů pro chitosan v různých kyselinách – kapaných do roztoků SL



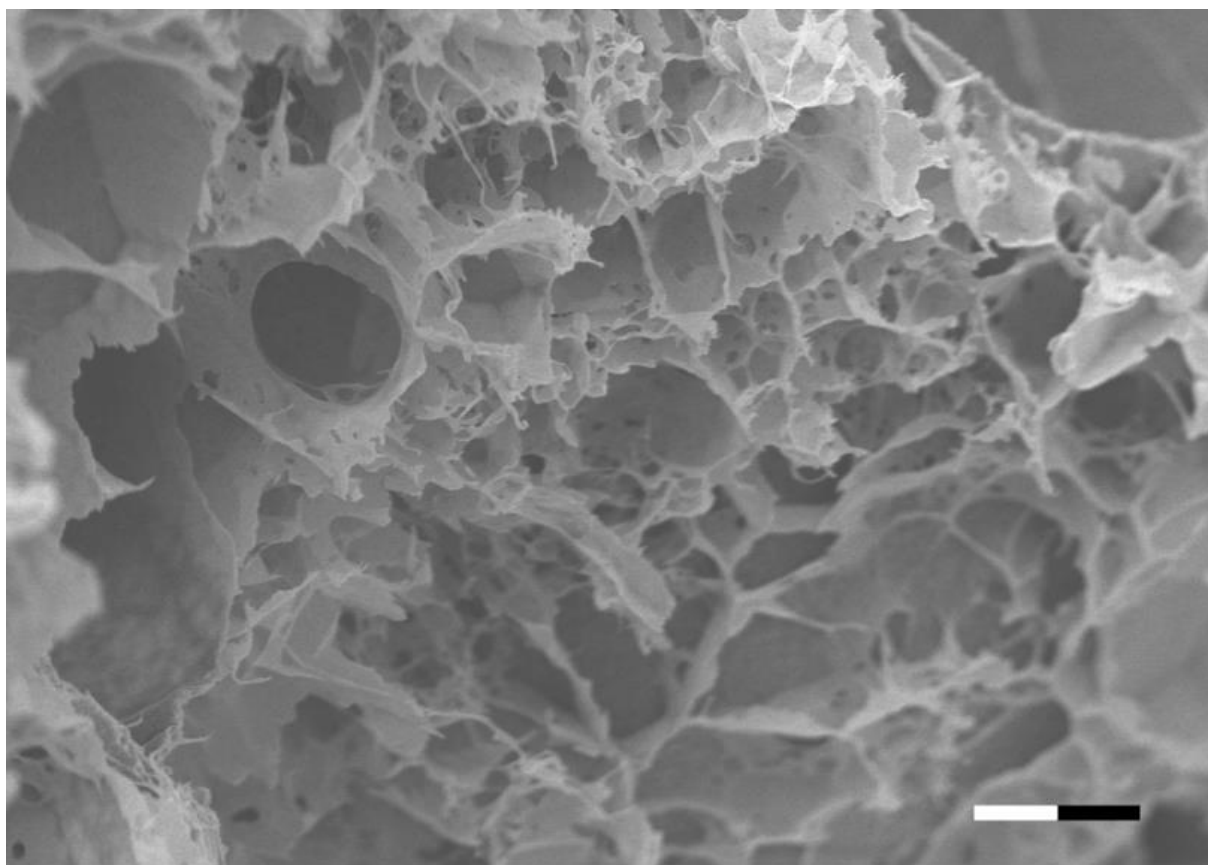
Obrázek 68 – Hodnoty ztrátového úhlu pro roztoky chitosanů v různých kyselinách – kapaných do roztoků SL



Obrázek 69 – Hodnoty komplexního modulu pro roztoky chitosanů v různých kyselinách – kapaných do roztoků SL



Obrázek 70 - Amplituda deformace pro ztrátový úhel 45 ° (modrou barvou chitosan 168 kDa; červenou 250 kDa)



Obrázek 71 - Detailní zobrazení pórovité struktury chitosanového gelu – měřítko 4  $\mu$ m