

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE



**BIOLOGICKÉ APLIKACE KOMPOZITŮ NANOČÁSTIC  
STŘÍBRA S UHLIČITANEM VÁPENATÝM**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Lenka Hrabalová
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	1407T007-00/ Materiálová chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

Olomouc 2017

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Libora Kvítka, CSc. a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu použitých pramenů.

V Olomouci dne ..... Bc. Lenka Hrabalová .....

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a ochotu při zpracovávání diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, PhD., Mgr. Renatě Večerové, Katedře geologie, Ing. Petře Bazgerové a doc. RNDr. Robertu Pruckovi, PhD., za podporu a pomoc s řešením diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině za podporu při studiu.

## Bibliografická identifikace

<b>Jméno a příjmení autora:</b>	Bc. Lenka Hrabalová
<b>Název práce:</b>	Biologické aplikace kompozitů nanočástic stříbra s uhličitanem vápenatým
<b>Typ práce:</b>	Diplomová
<b>Pracoviště:</b>	UPOL, Katedra fyzikální chemie
<b>Vedoucí práce:</b>	doc. RNDr. Libor Kvítek, Csc.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2017
<b>Abstrakt:</b>	<p>Tato práce se zabývá přípravou a aplikacemi kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub> zejména v oblasti antibakteriální povrchové úpravy titanových povrchů v souvislosti s jejich použitím v ortopedii. Tvorba antibakteriálních povrchových úprav s kompozity nanoAg@CaCO<sub>3</sub> spočívala v přípravě, umístění a zafixování kompozitního materiálu na titanovou destičku, která byla modifikována buď polymerem PDMS nebo následným sintrováním přímo nanoseného kompozitu při teplotě 500 °C. Oba druhy fixace měly zajistit lepší přilnavost kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub>. Následně byla testována antibakteriální aktivita vrstev kompozitního materiálu nanoAg@CaCO<sub>3</sub> nanesených na těchto modelových površích. Výsledky prokázaly vysokou antibakteriální účinnost vůči bakteriím <i>E. coli</i> u titanových destiček, které byly modifikovány polymerem PDMS. Vedle této aplikace byl připravený kompozit testován jako substrát pro detekci biologicky významných molekul pomocí metody SERS, jelikož kompozity nanoAg@CaCO<sub>3</sub> by mohly řízeně zesilovat signál podle množství nanočástic stříbra nanesených na povrchu mikročástic CaCO<sub>3</sub>. Na základě vyhodnocení naměřených spekter se ukázalo, že s připraveným kompozitem lze detekovat i roztok adeninu o koncentraci 10<sup>-7</sup> mol.dm<sup>-3</sup>.</p>
<b>Klíčová slova:</b>	Uhličitan vápenatý, nanočástice stříbra, implantát, kompozit, SERS
<b>Počet stran:</b>	78
<b>Jazyk:</b>	Český

## Bibliographical identification

<b>Autor's first name and surname:</b>	Bc. Lenka Hrabalová
<b>Title:</b>	Bioapplication of composites of silver nanoparticles and calcium carbonate
<b>Type of thesis:</b>	Master
<b>Department:</b>	UPOL, Department of physical chemistry
<b>Supervisor:</b>	doc. RNDr. Libor Kvítek, Csc.
<b>The year of presentation:</b>	2017
<b>Abstract:</b>	<p>This work deals with preparation and application of nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite especially in the area of antibacterial surface treatment of titanium surfaces in connection with their use in orthopedics. The formation of antibacterial coatings with nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composites consisted in the preparation, positioning and fixing of the composite material on a titanium plate which was modified with either PDMS polymer or subsequent sintering of the directly applied composite at 500 ° C. Both types of fixation should ensure better adhesion of the nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite. Subsequently, antibacterial activity of nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite layers applied on these model surfaces was tested. The results demonstrated high antibacterial activity against E. coli in titanium platelets modified with PDMS polymer. In addition to this application, the composite was tested as a substrate for the detection of biologically important molecules by the SERS method since nanoAa@CaCO<sub>3</sub> composites could steadily amplify the signal by the amount of silver nanoparticles deposited on the surface of the CaCO<sub>3</sub> microparticles. Based on the evaluation of the measured spectra, it has been shown that a solution of adenine at a concentration of 10<sup>-7</sup> mol.dm<sup>-3</sup> can also be detected with the prepared composite.</p>
<b>Keywords:</b>	Calcium carbonate, silver nanoparticles, implant, composite, SERS
<b>Number of pages:</b>	78
<b>Language:</b>	Czech

Vysoká škola: Univerzita Palackého v Olomouci      Fakulta: přírodovědecká  
Katedra: Katedra fyzikální chemie      Školní rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno: **BC. LENKA HRABALOVÁ**

Studijní obor: **Materiálová chemie**

Název práce: **Biologické aplikace kompozitů nanočástic stříbra s uhličitanem vápenatým**  
česky:  
**Bioapplication of composites of silver nanoparticles and calcium carbonate**  
anglicky:

Cíl práce: **Cílem práce je realizovat studium metod přípravy biokompatibilních kompozitů nanočástic stříbra s uhličitanem vápenatým.**

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na téma přípravy mikročástic uhličitanu vápenatého včetně přípravy kompozitů uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra a jejich biologických aplikací.
2. Experimentální studium přípravy mikročástic uhličitanu vápenatého a přípravy jejich kompozitů s nanočásticemi stříbra s cílem přípravy biokompatibilního materiálu pro medicínské aplikace.
3. Vyhodnocení a interpretace výsledků experimentální práce se zaměřením na zhodnocení vlivu fyzikálně chemických charakteristik připravených kompozitů na jejich biokompatibilitu.
4. Vypracování diplomové práce.
5. Příprava a prezentace multimediální prezentace diplomové práce.

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah původní zprávy: 40-60 stran

- Seznam odborné literatury:
- G. E. Friedlaender, H. J. Mankin, V. M. Goldberg: Bone Grafts and Bone Graft Substitutes, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont 2006
  - R. J. Hunter: Foundations of Colloid Science, Oxford 2001
  - K. Holmberg: Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry, Wiley, New York 2001
  - D. H. Everret : Basic Principles of Colloid Science, RSC, 1992
  - L. M. Liz-Marzan, P. V. Kamat: Nanoscale Materials, Kluwer Academic Publisher, 2003
  - M. Takeo: Disperse Systems, Wiley-VCH, Weinheim, 1999
  - původní časopisecká sdělení dle vlastní literární rešerše

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

Datum zadání diplomové práce: 19. 10. 2015

Termín odevzdání diplomové práce: květen 2017



.....  
podpis studenta



.....  
podpis školitele



.....  
podpis vedoucího katedry

## Seznam zkratk názvů vzorků použitých v textu

<b>C1</b>	Mikročástice $\text{CaCO}_3$ připravené v prostředí etylenglykolu v poměru etylenglykol: voda 1: 5.
<b>C3</b>	Mikročástice $\text{CaCO}_3$ připravené v prostředí etylenglykolu v poměru etylenglykol: voda 1: 1.
<b>C5</b>	Mikročástice $\text{CaCO}_3$ připravené v prostředí etylenglykolu v poměru etylenglykol: voda 5: 1.
<b>S1</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený metodou sorpce $\text{nanoAg}$ na připravené mikročástice $\text{CaCO}_3$ , typu C1.
<b>S3</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený metodou sorpce $\text{nanoAg}$ na připravené mikročástice $\text{CaCO}_3$ , typu C3.
<b>S5</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený metodou sorpce $\text{nanoAg}$ na připravené mikročástice $\text{CaCO}_3$ , typu C5.
<b>RM1a</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byla využita maltóza. Vznikající $\text{nanoAg}$ se redukovaly přímo na mikročástice $\text{CaCO}_3$ typu C1, které byly přítomny ve vznikající disperzi $\text{nanoAg}$ . Obsah $\text{nanoAg}$ v kompozitu 1,44 hm. %.
<b>RM1b</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byla využita maltóza. Vznikající $\text{nanoAg}$ se redukovaly přímo na mikročástice $\text{CaCO}_3$ typu C1, které byly přítomny ve vznikající disperzi $\text{nanoAg}$ . Obsah $\text{nanoAg}$ v kompozitu 3 hm. %.
<b>RM1c</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byla využita maltóza. Vznikající $\text{nanoAg}$ se redukovaly přímo na mikročástice $\text{CaCO}_3$ typu C1, které byly přítomny ve vznikající disperzi $\text{nanoAg}$ . Obsah $\text{nanoAg}$ v kompozitu 0,65 hm. %.
<b>RM5a</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byla využita maltóza. Vznikající $\text{nanoAg}$ se redukovaly přímo na mikročástice $\text{CaCO}_3$ typu C5, které byly přítomny ve vznikající disperzi $\text{nanoAg}$ . Obsah $\text{nanoAg}$ v kompozitu 1,63 hm. %.
<b>RM5b</b>	Kompozit $\text{nanoAg@CaCO}_3$ připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byla využita maltóza. Vznikající $\text{nanoAg}$ se redukovaly přímo na mikročástice $\text{CaCO}_3$ typu C5, které byly přítomny ve vznikající disperzi $\text{nanoAg}$ . Obsah $\text{nanoAg}$ v kompozitu 3,29 hm. %.



- RM5c** Kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byla využita maltóza. Vznikající nanoAg se redukovaly přímo na mikročástice CaCO<sub>3</sub> typu C5, které byly přítomny ve vznikající disperzi nanoAg. Obsah nanoAg v kompozitu 0,77 hm. %.
- RB1a** Kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byl využit NaBH<sub>4</sub>. Mikročástice CaCO<sub>3</sub> typu C1 byly připravovány v prostředí amoniakálního komplexu stříbra, s následnou redukcí. Obsah nanoAg v kompozitu je snížený na polovinu oproti vzorkům označených b.
- RB3a** Kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byl využit NaBH<sub>4</sub>. Mikročástice CaCO<sub>3</sub> typu C3 byly připravovány v prostředí amoniakálního komplexu stříbra, s následnou redukcí. Obsah nanoAg v kompozitu je snížený na polovinu oproti vzorkům označených b.
- RB5a** Kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byl využit NaBH<sub>4</sub>. Mikročástice CaCO<sub>3</sub> typu C5 byly připravovány v prostředí amoniakálního komplexu stříbra, s následnou redukcí. Obsah nanoAg v kompozitu je snížený na polovinu oproti vzorkům označených b.
- RB1b** Kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byl využit NaBH<sub>4</sub>. Mikročástice CaCO<sub>3</sub> typu C1 byly připravovány v prostředí amoniakálního komplexu stříbra, s následnou redukcí.
- RB3b** Kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byl využit NaBH<sub>4</sub>. Mikročástice CaCO<sub>3</sub> typu C3 byly připravovány v prostředí amoniakálního komplexu stříbra, s následnou redukcí.
- RB5b** Kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravený redukční metodou, přičemž jako redukční činidlo byl využit NaBH<sub>4</sub>. Mikročástice CaCO<sub>3</sub> typu C5 byly připravovány v prostředí amoniakálního komplexu stříbra, s následnou redukcí.

## Obsah

Úvod.....	11
1 Nanotechnologie .....	13
2 Nanočástice .....	15
2.1 Nanočástice stříbra .....	17
3 Uhlíčan vápenatý .....	20
4 Titan .....	22
5 Kompozitní materiály .....	24
6 Biologické aplikace kompozitů s nanočásticemi stříbra.....	26
6.1 Kostní implantáty .....	26
6.2 Biokompatibilní vrstvy.....	29
7 SERS .....	32
8 Experimentální část.....	34
8.1 Materiály .....	34
8.2 Metody .....	34
8.3 Postupy a přípravy.....	35
8.3.1 Příprava mikročástic uhlíčitanu vápenatého .....	35
8.3.2 Příprava kompozitu nanoAg@CaCO <sub>3</sub> .....	36
8.3.3 Příprava titanových destiček s kompozitem nanoAg@CaCO <sub>3</sub> .....	40
9 Výsledky a diskuze .....	42
9.1 Mikročástice uhlíčitanu vápenatého .....	42
9.2 Kompozity nanoAg@CaCO <sub>3</sub> .....	45
9.2.1 Kompozit CaCO <sub>3</sub> s nanoAg adsorbovanými z maltózového koloidu a s nanoAg vyredukovanými maltózou .....	45
9.2.2 Kompozit s nanočásticemi stříbra připravenými redukcí NaBH <sub>4</sub> .....	49
9.3 Příprava vrstev s kompozitem nanoAg@CaCO <sub>3</sub> na povrchu Ti slitiny.....	55
9.3.1 Titanové destičky s kompozitem nanoAg@CaCO <sub>3</sub> sintrované na 500 °C.....	55
9.3.2 Titanové destičky s PDMS a kompozitem nanoAg@CaCO <sub>3</sub> .....	58
9.4 Antibakteriální aktivita.....	60
9.5 Ramanova spektroskopie .....	62
10 Závěr .....	69
11 Summary .....	71
12 REFERENCE.....	73

## Úvod

V současnosti ve spojení s biomedicínskými aplikacemi a využitím v biologii, je žádoucí vytvářet materiály, které jsou tzv. biokompatibilní neboli pro organismus „přátelské.“ Jedná se například o modifikaci materiálů využívaných pro kostní náhrady, typicky slitiny titanu, které sice odpovídají požadavkům na mechanickou pevnost, ale již méně na biokompatibilitu. Povrchová úprava u takových implantátů může nejen zvýšit jejich biokompatibilitu, ale může zároveň dodat povrchu odolnost proti kolonizaci patogenními mikroorganismy, které v nemalém procentu případů způsobují závažné pooperační komplikace.

Vysoká antimikrobiální aktivita stříbra jej přímo předurčuje k poslední zmíněnému účelu, a proto se již v medicíně objevují implantáty povrchově upravené vrstvičkou kovového stříbra nanesenou obvykle galvanickou cestou. Oproti tomuto způsobu antimikrobiální povrchové úpravy využití nanočástic stříbra přináší benefity nejen díky úspoře drahého kovu, ale zejména díky výrazně vyšší antimikrobiální aktivitě nanočástic stříbra oproti makroskopickému kovovému stříbru. Na druhou stranu biokompatibilita vrstev s nanočásticemi stříbra není nijak vysoká vzhledem k poměrně vysoké cytotoxicitě těchto nanočástic. Zde se tedy nabízí řešení, spočívající ve spojení antimikrobiálních nanočástic stříbra s biokompatibilním substrátem, jakým je například v případě kostních náhrad fosforečnan vápenatý či uhličitan vápenatý. Takový nanokompozit, jež kombinuje vhodně zvolené materiály, může vykazovat synergický efekt, pod čímž si můžeme představit jakousi vzájemnou spolupráci dvou výchozích látek, která propůjčí nově vzniklému materiálu nové unikátní vlastnosti.

V této práci byla na základě předchozích úvah řešena povrchová úprava titanových implantátů, která by vykazovala jak antibakteriální aktivitu, tak vysokou biokompatibilitu. Za tímto účelem jako antibakteriální materiál byly využity nanočástice stříbra, které vykazují vysokou antibakteriální aktivitu, aniž by doposud byl pozorován vznik rezistence, tak jak tomu je u klasických antibiotik. Pro zvýšení biokompatibility vytvářené povrchové vrstvy pak byl zvolen uhličitan vápenatý, u kterého lze předpokládat, že bude mít dostatečnou přilnavost k povrchu titanu a zároveň je schopen pevně vázat nanočástice stříbra.

Protože nanokompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> umožňuje stabilizovat nanočástice stříbra na povrchu uhličitanu, dá se zároveň předpokládat, že takový materiál bude efektivní i v další oblasti – povrchem zesíleném Ramanově rozptylu (SERS). Proto byly připravené nanokompozity nanoAg@CaCO<sub>3</sub> rovněž testovány jako substráty pro SERS detekci biologicky významných molekul, přičemž jako modelová molekula byl použit adenin.

# 1 Nanotechnologie

V posledních letech se do popředí vědeckého zájmu dostaly nanotechnologie. Jedná se o vědní disciplínu, která zkoumá nanoobjekty, jejich přípravu, charakterizaci, manipulaci a v neposlední řadě jejich aplikace. Pod pojmem nanoobjekt rozumíme strukturu, která alespoň jedním rozměrem spadá do rozmezí 1-100 nm. Jedná se o materiály ať už na bázi přírodní, nebo uměle připravené. Nanotechnologie jako vědní disciplína spadá do mnoha vědních oborů, mezi které patří chemie, fyzika, ale i medicína či biologie. S tím souvisí i všestranné využití nanobjektů. V současnosti nacházejí mnohá uplatnění v rozmanitých sférách průmyslu. Z oblasti medicíny můžeme zmínit transport léčiv či hypertermii. Mezi další aplikace patří nanokatalyzátory, senzory, nanoelektronika, nebo zobrazovací techniky. [1]

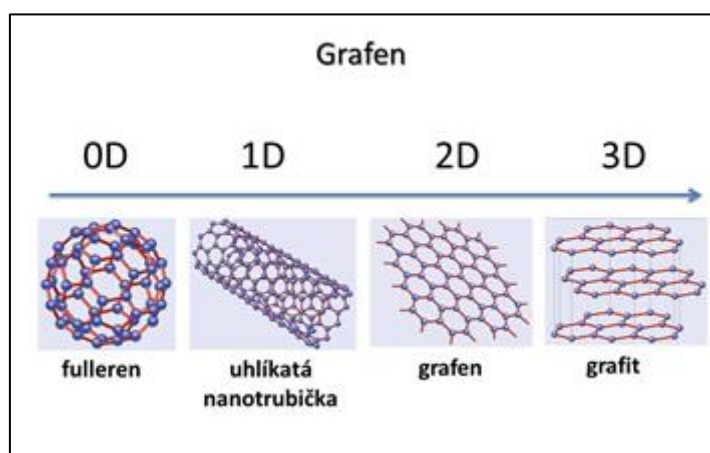
I když se může zdát, že nanotechnologie patří mezi nové disciplíny, opak je pravdou. Po celá staletí lidé nevědomky využívali nanomateriály při přípravě pigmentů, nebo je přidávali do keramiky či skla. Avšak za skutečného otce nanotechnologií je považován až americký fyzik R. P. Feynman, který v 60. letech minulého století položil základní stavební kámen této vědní disciplíny.

Pro rozvoj nanotechnologií se stal zásadním rychlý vývoj mikroskopických technik, které umožňovaly charakterizaci takto malých objektů. Obyčejný světelný mikroskop, kvůli vlnové délce světla není schopen takto malé struktury vyobrazit. Proto jsou využívána elektronová mikroskopie a rovněž mikroskopie se skenující sondou, o které se dá říci, že je vlastně dítětem počátku vývoje nanotechnologií.

Miniaturizace objektů a materiálů skýtá mnohá pozitiva. Zmenšením získáme nové zajímavé vlastnosti, nebo posílíme stávající vlastnosti makroskopického materiálu. Avšak existují i jistá omezení, překážky a rizika, která se zmenšováním souvisí. Zmenšovat materiály nemůžeme neomezeně, pod velikost jednoho atomu nelze žádný objekt zmenšit. S miniaturizací struktury souvisí například i riziko čistě biologické. Jedná se o prostupnost malých částic, o velikostech okolo 10 nm a menších, do buněk, kde mohou způsobit rozpad buňky a její smrt. Vedle již dříve objevených pozitivních biologických účinků nanomateriálů, jako je např. jejich antibakteriální aktivita, se tak s dalším vývojem nanotechnologií dostává do popředí i studium jejich toxických účinků na vyšší organismy a životní prostředí. Ovšem velikost nanostruktur nesouvisí pouze s prostupností do buněk,

ale i s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které se se změnou velikosti velmi často zásadně mění. Typickým příkladem mohou být vlastnosti magnetické, nebo antibakteriální které se právě se změnou velikosti mohou lišit. [2, 3]

Existuje nepřeberné množství typů nanostruktur, lišících se ať už fyzikálně-chemickými vlastnostmi, tvarem či složením. Obecně se jedná o nanotrubičky, nanovrstvy a nanočástice. Právě nanočástice se nejvýznamněji podílí na tvorbě nanomateriálů. [4–7]



**Obr. 1** Rozdělení nanomateriálů podle dimenzionality, typickým příkladem jsou uhlíkové nanostruktury. [8]

## 2 Nanočástice

Nanočástice na základě rozměrového hlediska řadíme mezi tzv. koloidní soustavy či disperze. Tedy mezi jeden ze tří základních typů disperzních soustav, které takto původně rozdělil britský chemik Thomas Graham. Jedná se o systémy složené z disperzního prostředí a disperzního podílu, který je rozptýlen do částic s rozměrem od 1  $\mu\text{m}$  až po 1 nm. Mezi částicemi a prostředím detekujeme určitou hranici, nazývanou fázové rozhraní, proto jsou tyto soustavy heterogenní, někteří autoři pak upřesňují, že se jedná o soustavy mikroheterogenní.

Koloidní soustavy jsou charakteristické svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, mezi které řadíme například kinetické, nebo optické vlastnosti. Jejich unikátní vlastnosti souvisí s tzv. povrchovými a kvantovými efekty. Nanočástice a obecně koloidní soustavy disponují obrovskou plochou povrchu v porovnání s vlastním objemem. Platí zde jednoduché pravidlo, že se zmenšující se částicí roste počet atomů v povrchových vrstvách. Kvantové efekty pak souvisí s hustotou elektronových stavů v delokalizovaných orbitalech.

Nevýhodou přílišného zmenšení nanočástic je jejich tendence k agregaci, tedy k vzájemnému seskupení nanočástic za tvorby agregátu. Agregace nanočástic souvisí s velkou plochou povrchu a následným nadbytkem povrchové energie, které se snaží zbavit agregací s ostatními částicemi. Abychom agregaci předešli, musíme nanočástice stabilizovat. Stabilizovat koloidní částice můžeme dvěma způsoby. Prvním z nich je stabilizace sférická, která spočívá v obalení částice například polymerní látkou. Druhou možností představuje stabilizace elektrostatická, která souvisí s elektrickou dvojvrstvou, tedy elektrickým nabitím koloidních částic.

Jak již bylo zmíněno, koloidní systémy disponují unikátními fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které se liší v závislosti na chemické povaze, ale i na velikosti nanočástice. V současné době existuje mnoho druhů nanočástic, které jsou tvořeny nejen prvky, ale i oxidy či jinými sloučeninami. V posledních letech se dostaly do povědomí především nanočástice ušlechtilých kovů, avšak z hlediska využití je velice zajímavé i železo a jeho oxidy, nebo uhlík v podobě grafenu, uhlíkových teček nebo nanotrubiček.

Každý typ nanočástice má své specifické vlastnosti. Velice významné jsou vlastnosti magnetické, které hojně pozorujeme u nanočástic kovů a jejich sloučenin (zejména oxidů). Zajímavé jsou především oxidy železa  $\text{FeO}_x$  v podobě magnetitu a maghemitu. S magnetickými vlastnostmi nanočástic souvisí především tzv. jednodoménovost. Zmenšením částice pod určitou hranici přestane být energeticky výhodná tvorba domén, a nanočástice začne vykazovat superspin, tedy ohromný magnetický moment. Použitím i slabého magnetického pole dojde překlopení superspinu. Zvýšením teploty začne superspin kmitat, až dojde k jeho překlopení. Toto je princip superparamagnetismu, kterého využívá hypertermie. Aplikaci magnetických nanočástic najdeme v medicíně při léčbě rakoviny, cíleném transportu léčiv, kontrastním zobrazování v MRI, nebo při čištění odpadních vod.

Dalšími významnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jsou vlastnosti elektrické. Elektrické vlastnosti souvisí především s existencí elektrického náboje na povrchu částice. Elektrický náboj vzniká různými způsoby a ovlivňuje především stabilitu koloidních disperzí. Pod vlivem tohoto náboje dochází k tvorbě tzv. elektrické dvojvrstvy v okolí povrchu částice. S tímto jevem souvisí i velice užitečná veličina umožňující charakterizovat koloidní disperze z hlediska stability, tzv. elektrokinetický potenciál.

Kinetické vlastnosti koloidních soustav souvisí především s Brownovým pohybem. Jedná se o tepelný pohyb částic, které se vzájemně srážejí a v důsledku srážek se pohybují. S Brownovým pohybem částečně souvisí i vlastnosti optické, a to především dynamický rozptyl světla a jeho aplikace v technikách umožňujících stanovit velikost nanočástic. Další zajímavou charakteristikou je barevné schéma objevující se u kovových nanočástic připravených ve vodném prostředí, například u nanočástic stříbra či zlata. Jedná se o tzv. povrchový plasmon, tedy kolektivní oscilaci elektronů ve vodivostním pásu. Na základě zbarvení disperzí můžeme usuzovat na velikost nanočástic – čím je nanočástice větší, tím více se posouvá absorpce povrchového plasmonu k vyšším vlnovým délkám. Příkladem slouží nanočástice stříbra, kdy se zbarvení jejich disperze s ohledem na velikost pohybuje od medově žluté, přes červenou, modrou, černou až po lehce šedivou. Díky tomu je možné hned na první pohled usuzovat na velikost vzniklých nanočástic stříbra. Například při vzniku medově-žluté disperze je velice pravděpodobný výskyt nanočástic stříbra okolo 25-30 nm. Velikost nanočástic výrazně ovlivňuje i luminiscenci (viz Obr. 2).





**Obr. 2** Příklad fotoluminiscence u kvantových teček. [9]

Velikost a tvar nanočástic ovlivňuje především způsob přípravy. Obecně je lze rozdělit na metody *Top-down* a *Bottom-up*. U *Top-down* metod dochází ke štěpení většího materiálu za vzniku menších částic. Využíváme technik jako je mletí, laserová ablace, nebo drcení vodním paprskem. Tyto metody se využívají především pro tvorbu prekurzorů, protože se pouze obtížně kontroluje morfologie výsledných částic. Naopak *Bottom-up* metody poskytují přesný tvar i velikost částic. V podstatě sestavujeme nanostrukturu atom, po atomu. Představitelem *bottom-up* metod je například chemická redukce či sonochemická syntéza.

V posledních letech došlo k obrovskému vývoji technik a metod umožňujících stále nové přípravy nanočástic, tak aby odpovídaly nejrůznějším požadavkům na tvary a velikosti, s cílem snadné manipulace s jejich vlastnostmi. [2, 4, 7, 10]

## 2.1 Nanočástice stříbra

Stříbrné nanočástice a jejich unikátní vlastnosti se začaly zkoumat až v posledních desetiletích, avšak makroskopická forma stříbra byla využívána již od starověku. V minulosti lidé využívaly antibakteriální vlastnosti stříbra hlavně k dezinfekci vod, uchovávání čerstvosti potravin a následně i jako lék na popáleniny či infekce, kde na počátku 20. stol bylo koloidní stříbro hlavním prostředkem pro léčbu některých infekcí. Avšak s nástupem antibiotik došlo k výraznému útlumu využívání stříbra a jeho sloučenin. V současné době však kvůli stále častějšímu podávání antibiotik dochází k rezistenci bakterií a antibiotika už neúčinkují stejně dobře jako dříve. [11]

Nanočástice stříbra vykazují antibakteriální účinky, které jsou nesrovnatelně větší v porovnání s makroskopickým stříbrem. Antibakterialita však neoddělitelně souvisí

s toxicitou. Nanočástice stříbra vykazují v porovnání s iontovým stříbrem až 30x menší toxicitu, a proto je jejich využití daleko atraktivnější. Jejich aplikační potenciál je tedy obrovský. Dnes už se nanočástice stříbra objevují jako součást antiseptických textilií, obvazů k léčbě popálenin a kožních infekcí, nebo jsou složkou kompozitních materiálů. Mechanismus antibakteriálního účinku zatím není zcela znám. Předpokládá se však, že nanočástice stříbra uvolňují ze svého povrchu ionty  $\text{Ag}^+$ , které následně interagují s bakteriální stěnou a poté zabraňují replikaci DNA. Antiseptické účinky nanočástic stříbra je možné ovlivnit morfologií a velikostí nanočástic. Menší nanočástice vykazují vyšší antibakterialitu, avšak jsou toxičtější pro lidský organismus vzhledem k možnému proniknutí do buněk. [12] S ohledem na jejich antibakteriální potenciál se zkoumá možnost využití nanočástic stříbra jako potenciální náhrada za antibiotikum, nebo možnost jejich synergického působení s klasickými antibiotiky. [13–15]

Nanočástice stříbra disponují nejen antibakteriálními účinky, ale vykazují i katalytické a optické vlastnosti. Katalytické vlastnosti nanočástic stříbra souvisí s jejich velkou plochou povrchu a s vysokou hodnotou povrchové energie. Ve sféře katalýzy se nanočástice stříbra osvědčily například k oxidaci organických látek či k redukci nitrosloučenin. [16]

Optické vlastnosti stříbra úzce souvisí s jejich povrchovým plasmonem. V současné době se hojně využívají pro přípravu substrátů zesilujících Ramanův rozptyl. Jedná se o techniku nazvanou povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), která umožňuje nejen detekci, ale i kvantitativní analýzu, kde dokáže stanovit i zanedbatelné množství sloučenin. Další využití nanočástic stříbra skýtají nanobiosenzory, elektrické obvody, nebo materiály pro uchovávání dat. [6, 17]

Aplikační potenciál nanočástic stříbra závisí i na jejich přípravě. Pro mnohá uplatnění je důležitá kontrola velikostní distribuce, morfologie, nebo stability. Velice využívanými metodami v přípravě nanočástic stříbra jsou metody redukční. Jedná se o vyredukování nanočástic stříbra ze stříbrné soli, nejčastěji z  $\text{AgNO}_3$ , pomocí vhodného redukčního činidla. Z anorganických látek využíváme například  $\text{NaBH}_4$ , nebo peroxid vodíku. Častěji se používají organická redukční činidla, mezi která řadíme citrát sodný, kyselinu askorbovou, nebo cukry (maltóza, glukosa, fruktóza, atd.). Velice známá „wet“ metoda přípravy je tzv. modifikovaná Tollensova reakce. Jedná se o velmi dobře reprodukovatelnou techniku využívající vyredukování nanočástic z amoniakálního

komplexu stříbra pomocí redukujícího cukru. Na základě výběru cukru, komplexotvorného činidla a hodnot pH můžeme ovlivňovat velikost výsledných nanočástic. [18]

Mezi další možné metody přípravy patří tvorba nanočástic stříbra pomocí ultrazvuku. Vlivem ultrazvuku dochází v roztoku ke vzniku radikálů, které jsou následně využity jako redukční činidla. Nanočástice stříbra připravené pomocí ultrazvuku jsou však velice nestabilní a náchylné k agregaci. Proto je nutná okamžitá stabilizace pomocí surfaktantu.

Na přípravu nanočástic je možné využít i UV záření. Jedná se o obdobnou techniku jako u radiolytické metody. UV záření poskytuje radikály, které zajišťují vlastní redukci. Redukce probíhá z roztoku stříbrné soli, je možné využít například  $\text{AgClO}_4$  nebo  $\text{AgNO}_3$ , za přítomnosti stabilizátorů.

Představitelem *Top-down* metody je laserová ablace, která vychází z odpaření makroskopického stříbra pomocí laseru. Výhodou jsou chemicky čisté nanočástice stříbra. Velikost nanočástic je možné ovlivnit vlnovou délkou případně intenzitou laseru. [10]

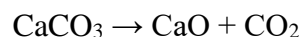
Výběrem vhodné metody můžeme připravit nanočástice stříbra lišící se tvarem, velikostí, nebo stabilitou. Právě stabilitu nanočástic je nutné zvyšovat pomocí surfaktantů, nebo polymerů, aby nedocházelo k jejich agregaci. Využíváme hlavně želatínu, kasein, nebo tenzidy. S ohledem na velikost a polydisperzitu, je možné připravit nanočástice stříbra poměrně monodisperzní s průměrnou velikostí částic pohybující se od jednotek nanometrů až po téměř stovky nm. [19, 20]

### 3 Uhličitan vápenatý

Uhličitan vápenatý je krystalická látka, vyskytující se jako bílý prášek, který po zahřátí na vysokou teplotu žloutne a rozkládá se na CO<sub>2</sub> a CaO. V přírodě můžeme nalézt dvě krystalické modifikace: kalcit a aragonit. Nejstabilnější a nejrozšířenější kalcit krystalizuje v klencové soustavě. Zbarvení minerálu závisí na defektech v krystalové mřížce, ale i na příměsích obsažených v minerálu. Z hlediska tvrdosti minerálu je daleko tvrdší aragonit, který se v přírodě vyskytuje nejčastěji v čisté podobě bez příměsí. Synteticky byla připravena i třetí modifikace uhličitanu vápenatého, kterou je vaterit. Tato modifikace krystalizuje v šesterečné soustavě a je nejméně stabilní.

Obecně se uhličitan vápenatý vyskytuje v podobě hornin a nerostů. Typicky se jedná o vápenec, mramor, křidu, nebo dolomit. Uhličitan vápenatý má biochemický původ. Mnozí živočichové uhličitan vápenatý syntetizují a ukládají v podobě tělních schráněk, kde zajišťuje především pevnost. Jedná se zvláště o vodní organismy, jakožto měkkýše, žahavce, členovce atd. Syntéza uhličitanu vápenatého však není doménou jen nižších živočichů. Pro lidský organismus je nezbytně důležitý vápník, který je ukládán v podobě solí. Nejčastěji se jedná právě o uhličity a fosforečnany, které tělo ukládá do kostních tkání a zubů. Odumřením organismů pak dochází k organogenetické sedimentaci. [21]

K rozpoznání jednotlivých modifikací je možné využít například test na dusičnan kobaltnatý. Obecně však uhličitan vápenatý dokazujeme pomocí testu s kyselinou chlorovodíkovou, která reaguje za uvolnění oxidu uhličitého. Ve slabě kyselém prostředí (například v kyselině citronové) tvoří uhličitan vápenatý rozpustnou sůl. Jedná se o hydrogenuhličitan vápenatý, který je příčinou tzv. krasových jevů. Termický rozklad uhličitanu vápenatého je proces, kterým vzniká pálené vápno. [22]



Laboratorně lze uhličitan vápenatý připravit jednoduchou srážecí reakcí uhličitanu sodného s chloridem vápenatým. Ovlivněním podmínek můžeme dosáhnout velké variability částic, zejména z pohledu jejich velikosti a morfologie.

Využití uhličitanu vápenatého je obrovské. Díky možnosti modifikace částic nachází uplatnění v medicíně, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, ale i ve stavebnictví, v životním prostředí, nebo v průmyslu papírenském.

V papírenském průmyslu se uplatňuje jako plnivo, které ovlivňuje výsledný vzhled i odolnost papíru. V oblasti životního prostředí a zemědělství našel uplatnění jako materiál vhodný pro odsiřování elektráren a spaloven, sanaci odpadních vod, či jako prostředek k odkyselení půd a lesů.

Aplikace uhličitanu vápenatého v medicíně souvisí především s pórovitostí, resorpcí a biokompatibilitou. Právě díky těmto vlastnostem se uhličitan vápenatý využívá na přípravu jak samotných implantátů, tak jako biokompatibilní vrstva pokrývající implantáty, která zajišťuje snadnější přichycení kostních buněk. [22]

## 4 Titan

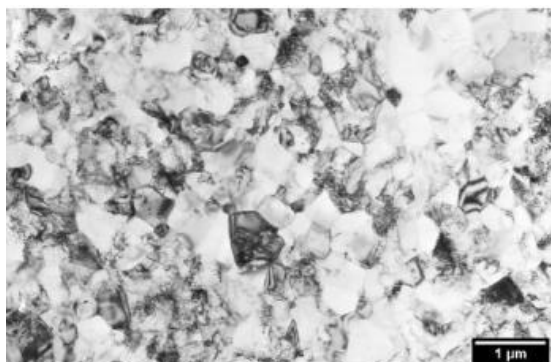
Titan je stříbrobílý, lehký kov, který byl objeven v 18. století. Jedná se o kov, který disponuje vysokou mechanickou odolností, korozivzdorností, dokonce i ve slané vodě, a tvrdostí. Z hlediska výskytu titan můžeme najít v zemské kůře, v mořské vodě, v řadě minerálů a rud. Mezi nejvýznamnější rudy patří bezesporu ilmenit a rutil. Jelikož se jedná o neušlechtilý kov, snadno vytěsňuje ušlechtilé kovy z jejich solí. Přesto je velice odolný díky povrchové pasivaci, a proto téměř ke všem reakcím ať už s kyselinami, plyny či jinými nekovy potřebuje zvýšenou teplotu. Příkladem můžeme uvést velice důležitou reakci s kyselinou dusičnou, při které se povrch titanu pokrývá vrstvou oxidů, která jej pasivuje, ale zajišťuje i velice významné biologicky uplatnitelné vlastnosti, jakožto biokompatibilitu a bioinertnost.

Protože čistý titan se vyskytuje vzácně, nalézá se hlavně ve sloučeninách, kde vykazuje mocenství III a IV. Bezesporu nejvýznamnější sloučeninou je oxid titaničitý  $\text{TiO}_2$ . Ten se v přírodě se vyskytuje ve třech krystalických modifikacích: rutil, anatas a brookit. S chlorem reaguje za tvorby  $\text{TiCl}_4$ , jeho redukcí pak získáme  $\text{TiCl}_3$ , který má hojné využití v katalýze. Spolu s dusíkem titan tvoří nitrily, které se pyšní vysokou tvrdostí. Velice hojné je využití titanu ve slitinách. Legujícími prvky vytváříme slitiny s tvarovou pamětí, nebo zvyšujeme ohebnost materiálu. [23]

Jak už bylo zmíněno dříve, titan se hojně vyskytuje v zemské kůře. Avšak jeho ochota reagovat s atmosférickými plyny za zvýšené teploty neumožňuje pro jeho výrobu využívat klasické hutní metody. V současnosti využíváme k výrobě titanu metodu zvanou Krollův proces. Jedná se o techniku, při které je vstupním materiálem ruda titanu, nejčastěji rutil, nebo ilmenit, která je upravena chlorací. Následně je titan vyredukován hořčíkem. Celá výroba probíhá za vysokých teplot v atmosféře inertního plynu. Výsledný produkt je poté přetaven a upravován.

S objevem nanosvěta nezůstal stranou ani titan. Jako velice perspektivní materiály se ukázaly nanočástice  $\text{TiO}_2$  a také nanostrukturní titan (Obr. 3), přezdívaný nanotitan. Nanostrukturní titan je v podstatě řešením pro titanové implantáty, které nedosahují dostatečné pevnosti. Nanotitan je výrazně pevnější, vykazuje zvýšenou biokompatibilitu, zachovává si chemické vlastnosti, a dokonce je perspektivnější i z hlediska adheze osteoblastů. Jeho výroba je však obtížná, a proto se zatím dostatečně nerozšířil. Vyrábí

se z titanu, který je podroben opakované plastické deformaci. V současnosti je využíván převážně pro tvorbu dentálních implantátů. [24, 25]



**Obr. 3** Struktura nanotitanu o rozlišení 1 μm. [25]

Na rozdíl od nanotitanu jsou nanočástice  $\text{TiO}_2$  využitelné v jiných oblastech průmyslu. Nanočástice  $\text{TiO}_2$  využíváme ve formě anatasu, které vykazují fotokatalytické vlastnosti – při absorpci UV záření dojde k aktivaci  $\text{TiO}_2$  nanočástic, které při reakci s kyslíkem vytvoří radikály. Vzniklé radikály následně mají schopnost degradace organických látek. Nanočástice anatasu, které jsou vystaveny UVA záření, mají schopnost rozkládat nejen viry, bakterie a jiné organické částice, ale také výfukové zplodiny na oxid uhličitý a vodu. Principem výše uvedeného procesu je fotokatalýza. Nanočástice  $\text{TiO}_2$  je proto možné využít například pro přípravu nátěrových hmot, které vykazují baktericidní vlastnosti a samočištění. [26–28]

Využití titanu, jeho sloučenin a slitin je obrovské. Za širokým spektrem využití titanu zpravidla stojí fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou upotřebitelné v určitém odvětví průmyslu. Lehkost materiálu a také jeho mechanická odolnost předurčuje využití jako konstrukční materiál například v letectví, na výrobu namáhaných součástek, či v kosmických technologiích. Na výrobu ponorek, nebo zařízení na odsolování mořské vody se využívá nejen lehkosti titanu a jeho slitin, ale také korozivzdornosti. Sloučeniny titanu s dusíkem našly uplatnění v brusných materiálech, rutil či anatas, přezdívaný jako titanová běloba slouží jako pigment při výrobě plastů i keramiky. Vzhledem k tomu že je zcela nezávadný, našel využití dokonce i při bělení mléka. Titan je rovněž velmi důležitý materiál pro medicínu. Jelikož titan a jeho slitiny vykazují bioinertnost, korozivzdornost, biokompatibilitu a mechanickou pevnost, staly se tyto materiály nejpoužívanějšími v oblasti titanových implantátů, protéz a chirurgických nástrojů. [29, 30]

## 5 Kompozitní materiály

Kompozitní materiál je kombinací dvou a více odlišných složek. Složky v kompozitu si zachovávají svou identitu, avšak v makroskopickém měřítku vykazují tzv. synergický efekt. Jedná se o typ spolupráce mezi jednotlivými složkami za vzniku nového materiálu, disponujícího vlastnostmi, které složky samy osobě nemohou dosáhnout. Kompozitní materiál obecně obsahuje spojitou část, tzv. matici (keramická, kovová, ...), jejímž úkolem je držet materiál pospolu. Další fází jsou disperze, které jsou rozptýleny v matici. Mezi nejtypičtější disperze zařazujeme vlákna, částice a destičky. Kombinací disperze a matrice získáme nový materiál s dokonalejšími vlastnostmi. Z toho důvodu si kompozitní materiály našly mnohá uplatnění v průmyslu i zdravotnictví. Typickým příkladem jsou zubní implantáty, dlahy, nitro-kostní šrouby, náhrady kloubů, chrupavek a šlach, ale také namáhané součástky v leteckém, stavebním, nebo automobilovém průmyslu.

S nástupem nanosvěta se začaly vyvíjet nanokompozitní materiály. Tedy kompozity s alespoň jednou nanofází, kterou ve většině případů tvoří aktivní látka. Nanokompozitní materiály jsou mnohdy odpovědí na nepříliš vhodné makrokompozity, které často vykazují fyzikálně-chemické vlastnosti, které je potřeba modifikovat. Ve zdravotnictví jsou nanokompozity velice často využívány, protože jsou schopny nabídnout řešení na bezpočet problémů s tuhostí, křehkostí, nebo s korozivzdorností materiálu. Jejich výhodou je pórovitost, velký měrný povrch, schopnost filtrace bakterií, sorpční schopnosti, ale často i rychlá degradace. V současnosti jsou například využívány jako náhrada měkkých a tvrdých tkání. [31, 32]

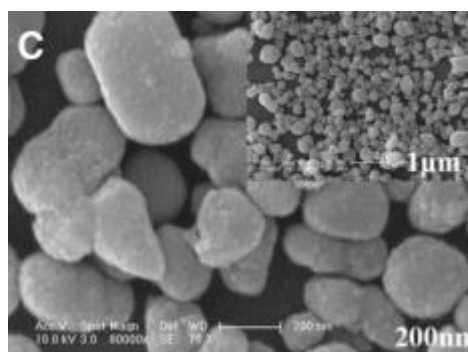
Velice rozšířeným typem nanokompozitního materiálu jsou materiály s přídavkem nanočástic stříbra, které jsou využívány především pro svoje antibakteriální a katalytické účinky. Přichycení nanočástic stříbra v matici umožňuje zabránit jejich agregaci a dovolí tak rozvoj antibakteriálních účinků v nejvyšší možné míře. Velice častými materiály pro tvorbu kompozitů s nanočásticemi stříbra jsou kovy, keramika, ale i polymery. Právě volbou matrice ovlivníme další využití nanokompozitu. Nanokompozitní materiál a jeho vlastnosti značně souvisí s jeho přípravou. V případě nanokompozitů s nanočásticemi stříbra je možné využít různé způsoby zachycení nanočástic v matici. Obvykle se jedná o sorpční a redukční metody, případně jejich modifikace. V případě sorpčních metod je



možné využít například volnou adsorpci nanočástic stříbra na již připravenou matici. Naopak u metod redukčních dochází často k redukci nanočástic stříbra přímo v prostředí matrice, která je obvykle v podobě částic. Vzniklé nanočástice stříbra rovnoměrněji obalí částice matrice. [16]

Obecně pro tvorbu kompozitů a nanokompozitů využíváme metod založených na adsorpci, impregnaci, lisování aj. Volba metody je podstatná, jelikož každý typ materiálu disponuje odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a vyžaduje jiné zacházení. [33]

Využití nanokompozitních materiálů je obrovské. Příkladem mohou být mnohé studie zabývající se titanovými kompozity s různými materiály. Ať už se jedná o kompozity s uhličitanem vápenatým, nebo s nanočásticemi stříbra. Výhledově se považují za velice atraktivní materiály vhodné k tvorbě implantátů. Titan a uhličitan vápenatý však našel uplatnění nejen v medicíně, ale také třeba v papírenském průmyslu. Příkladem mohou být *core-shell* částice tvořené uhličitanem vápenatým, jenž jsou pokryté nanočásticemi  $\text{TiO}_2$  (Obr. 4). Tato modifikace by mohla posloužit jako levnější náhrada  $\text{TiO}_2$  částic, využívaných jako pigmenty. [34, 35]



**Obr. 4** Příklad *core-shell* částice  $\text{nanoTiO}_2@CaCO_3$ . [34]

## 6 Biologické aplikace kompozitů s nanočásticemi stříbra

### 6.1 Kostní implantáty

Implantát je náhrada lidské tkáně, velice často se jedná o zuby či kost, kterou je zastoupena původní, nefunkční tkáň. Během operací jako jsou transplantace, či implantace dochází velice často k problémům, vzniklých z důvodu napadení povrchu implantátu či tkáně v okolí bakteriemi, vytvoření zánětu, a následného nepřijetí implantátu. Obvykle je nutná sekundární operace, při které je potřeba implantát vyjmout. Hrozí tedy nebezpečí, v mírnějším případě nepohodlí pro pacienta. Snaha o urychlení léčby vede k tvorbě stále kvalitnějších a perspektivnějších materiálů vhodných pro kostní, ale i zubní implantáty. K velkému progresu v oblasti implantologie dochází také proto, aby vedlejší léčba, v horším případě opakovaná operace nebyla nutná. V posledních letech došlo k objevení mnoha nadějných materiálů, které disponují lepšími vlastnostmi a jsou dokonce schopny kopírovat lidskou tkáň.

S postupem času dochází k výrazné změně používaných materiálů. Dříve byly na vrcholu implantací zejména kovy typu titanu a tantalu, případně polymery. Nespornou výhodou kovových materiálů byla korozivzdornost, možnost sterilizace, pevnost a odolnost. Naopak polymery disponují snadným zacházením a variabilitou tvaru. Nevýhodou je mimo jiné jejich slabá přilnavost k živým buňkám. V současné době se využívají převážně materiály na bázi keramiky, titanu a jeho slitin, kompozitů, polymerů a dalších modifikací předchozích, které jsou schopny poskytovat nejen pevnost a odolnost, ale také biokompatibilitu. [36]

Výběr vhodného materiálu souvisí především s místem a typem tkáně, kterou je třeba implantovat. Pozornost začínají získávat biomateriály, které jsou biokompatibilní s lidským organismem, vykazují korozivzdornost, jsou schopny resorpce, vynikají potřebnou pórovitostí a jsou srovnatelné s kostní tkání i pokud jde o pevnost a odolnost.

Různé typy materiálů je možné i povrchově upravit tak, aby byly antibakteriální, schopny doručení léku, nebo aby došlo k snadnější adhezi kostních buněk. Jednotlivé úpravy spočívají v zdrsňení povrchu materiálu (naleptání, broušení aj.), nebo v potažení vrstvou aktivní látky. Zdrsňení povrchu je typicky prováděno u titanu za účelem lepší adheze kostních buněk, nebo pro snadnější uchycení aktivní vrstvy. Aktivní vrstvou může

být jiný biokompatibilní materiál (uhličitan vápenatý, fosforečnan vápenatý, ...), který je schopen resorpce a snadnějšího prorůstání kostní tkáně. Další možností je nanést vrstvu v podobě léčiva, nebo nanočástic stříbra. V tomto případě je možné získat antibakteriální implantát schopný odolávat bakteriím a zamezit tak vzniku infekce. [30, 35, 37]

→ Polymery-polymerní materiály se skládají z molekul seskupených do řetězců.

Podle způsobu vzniku je rozdělujeme na přírodní, které vykazují lepší přilnavost k živým buňkám, avšak u nich dochází k metabolické přeměně v těle (kolagen, želatina, ...). Dalším typem jsou polymery syntetické, které našly větší uplatnění hlavně díky možnosti biodegradability a biokompatibility. Jedná se především o polymer kyseliny mléčné a jeho skupiny. Aplikační potenciál našly jako fixační pomůcky, nebo chirurgické nitě. Jejich obrovskou výhodou v oblasti implantátů je jejich snadná úprava, nízká cena a hustota, ale také přizpůsobivost. Tyto materiály je možné snadno přetvářet a upravovat jejich hydrofobní vlastnosti, tvar i velikost. Navzdory menší mechanické odolnosti se uplatňují jako součást kostních cementů, tmelů nebo při výrobě umělých chrupavek. [38–40]

→ Bioaktivní keramika-jedná se o syntetický, anorganický materiál.

Biokompatibilní keramika sestává především z krystalických materiálů jako je uhličitan vápenatý, fosforečnan vápenatý, bioaktivní skla, případně z jejich modifikací. Obecně se jedná o materiály, které jsou schopny tvořit pevnou vazbu s kostní tkání. Krystalické materiály vytvoří jakési lešení, které následně napomáhá prorůstání a regeneraci kostní tkáně. Implantáty mohou být ještě před operací osídleny kostními buňkami, které následně regeneraci ještě uspíší. Nespornou výhodou těchto materiálů je také schopnost resorpce, slouží tedy jako provizorní náhrady, které se časem vstřebají a zanechají pouze regenerovanou kostní tkáň. Proto je velice důležité, aby keramické materiály vykazovaly specifickou pórovitost. Další výhodou těchto materiálů je pevnost, a také podobnost s lidskou kostní tkání. Tyto látky v podstatě kopírují nejen pórovitost, ale také chemické složení kosti. Kost je zjednodušeně složena z vody, oseinu a anorganických látek, které kost ukládá po celý život pro zajištění pevnosti. Tyto anorganické látky tvoří až 70 % z celkové hmotnosti kosti a patří sem právě již zmiňovaný uhličitan vápenatý, nebo fosforečnan vápenatý. Jejich využití spočívá v přípravě kostních cementů, které je možno

vstříknout do postiženého místa, bez většího lékařského zásahu, nebo k vytvoření vlastního implantátu. Tyto implantáty jsou pak podle přesné specifikace, navrženy tak aby splňovaly určitou pórovitost, ale také resorpci, nebo pevnost. Můžeme se tedy setkat s implantáty tvořené pouze z uhlíčitanu vápenatého, nebo s kombinacemi s bioaktivními skly, která dodají implantátu větší pevnost a také delší životnost. V posledních letech se uhlíčitanu a fosforečnanu vápenaté zkoumají také jako povlaky na nevstřebatelné, kovové materiály, typu titan. Umožní tak titanovým implantátům lepší vlastnosti z hlediska adheze osteoblastů. [41–45]

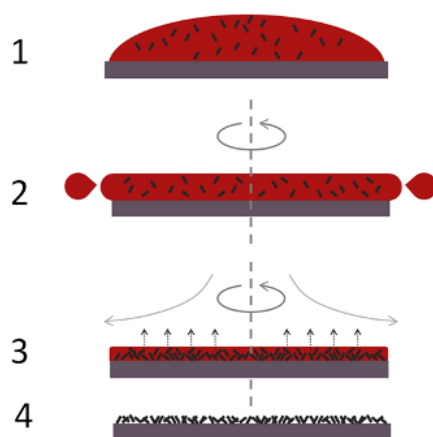
→ Titan a jeho slitiny-v současnosti se jedná o nejpoužívanější bioinertní materiál, používaný i oblasti implantologie. Ideálně čistý titan je při větším zatížení částečně plastický, proto se v implantátech používají především jeho slitiny, nebo technicky čistý titan s obsahem minimálně 99 %. Nejpoužívanější slitinou je Ti-6Al-4V, která je tvořena z 6% Al, 4% V a z 90 % Ti. Výhodou je pevnost, mechanická odolnost, chemická stabilita, lehkost, korozivzdornost a biokompatibilita. Korozivzdornost a také biokompatibilitu materiálu zajišťuje pasivační vrstva, která se vytváří na povrchu materiálu a je schopna se okamžitě obnovovat. Jedná se však o materiály, které nevykazují resorpci, proto zůstávají v lidském těle řadu let. Z pohledu kostních buněk a jejich prorůstání se Ti-implantáty chovají netečně. Kostní buňky jsou schopny adheze pouze na povrch implantátu. Je však možné implantát povrchově upravit, například zdrsněním, nebo poražením bioaktivní vrstvou a umožnit kostním buňkám lépe se přimknout k implantátu. [24]

→ Nanotitan-jedná se o biokompatibilní materiál s totožným chemickým složením jako technicky čistý titan. Navzdory tomu disponuje zdokonalenou pevností, korozivzdorností, zvýšenou biokompatibilitou, zdrsněným povrchem a umožňuje kostním buňkám snadnější přilnavost. Nanotitan spadá do skupiny objemových nanomateriálů. Kvůli jeho složité výrobě je jeho použití v současné době omezeno převážně na zubní implantáty. Výroba nanotitanu spočívá v opakované plastické deformaci, kde jako prekurzor slouží technicky čistý titan. [25, 29, 31, 46]

## 6.2 Biokompatibilní vrstvy

Vrstvy obecně rozdělujeme na tenké a silné, přičemž tenké vrstvy dosahují tloušťky maximálně 1  $\mu\text{m}$  a vrstvy silné dosahují rozměrů od 5  $\mu\text{m}$  výše. Vrstvou rozumíme tenký povlak či film, který je přichycený k pevnému substrátu. Vrstvy umožňují modifikovat pevný substrát ve snaze zlepšit fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu materiálu a zajistit tak lepší aplikační potenciál. Biokompatibilní filmy vynikají vlastnostmi, mezi které patří například korozivzdornost, zdravotní nezávadnost, aj. Uplatnění těchto vrstev je obrovské zejména v oblastech zdravotnictví.

Biokompatibilní vrstvy a vrstvy obecně lze připravit několika způsoby. Jedná se o metody fyzikální, nebo chemické. Každý typ materiálu, který je potřeba nanést, vyžaduje specifické zacházení, a proto i jiný typ metody. Je tedy zřejmé, že materiály na bázi polymerů vyžadují jiné metody nanášení než například kovy. Mezi metody používané typicky pro kovy patří například naprašování, kdy dochází k vyrážení atomů z kovového terčiku ionizovaným plynem. Atomy kovu poté přilnou k substrátu a vytvoří se tenký film, jehož tloušťku je možné sledovat pomocí piezokrystalu. (sledujeme změnu piezoelektrických vlastností s ohledem na tloušťku vrstvy dopadajících částic) Obdobnou metodou je napařování, které však vykazuje větší náchylnost vrstev vůči oděru. Adhezní vlastnosti obecně ovlivňuje energie dopadajících částic na substrát. Čím větší mají částice energii, tím se zvyšuje jejich adheze k substrátu. Obdobnou metodou pro nanášení vrstev je CVD technika. Jedná se o chemickou depozici z plynné fáze. Na povrchu vzniká tenká vrstva v důsledku reakce složek, které jsou do prostoru substrátu přiváděny v plynné fázi. Vznikají stabilní vrstvy, které jsou zároveň odolné vůči opotřebení. Jedinou nevýhodou je nutnost využití vysokých teplot. A právě kvůli tomu, je nemožné nanášet látky, které při vysoké teplotě degradují. Pro látky, které jsou nerozpustné ve vodě, například lipidy nebo polymery, můžeme využít metodu Langmuir-Blodgettové (LB). Při této metodě můžeme vytvořit film o definovaném uspořádání. Tato technika je založena na ponoření destičky skrze Langmuirovu monovrstvu amfifilu plovoucí na rozhraní voda-vzduch a její přenesení na pevný substrát. Opětovným ponořením je možné získat více vrstev. Další metodou vhodnou pro nanášení polymerů, či těkavých suspenzí je metoda *spin-coating*. Jde o velice jednoduchou metodu, při které vznikají tenké filmy nanesením suspenze na rotující rovinné těleso. Vlivem centrifugace se deponovaná suspenze rovnoměrně rozloží na substrát (Obr. 5).



**Obr. 5** Ukázka metody *spin-coating*.

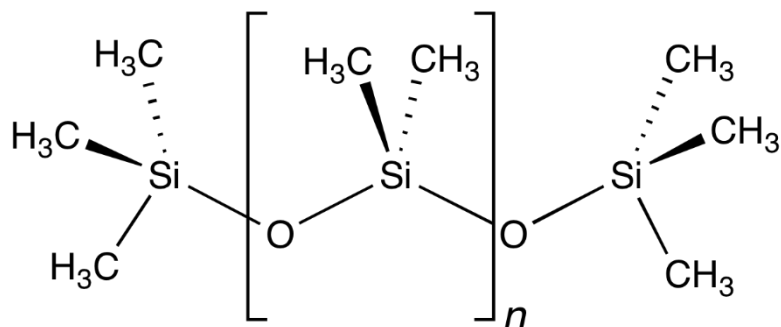
Další metodou, která patří mezi tzv. *coating* metody, je *dip-coating*. Založená na ponoření tělesa do roztoku deponované látky a následným vytahováním s konstantní rychlostí. Vynořováním tělesa se roztok dostává do kontaktu se vzduchem a odpařuje se přebytečné rozpouštědlo, se současnou adhezí deponované látky. Obě “*coating*“ metody se využívají k zušlechťování povrchů (nanášení ochranných vrstev, impregnace).

Další hojně využívanou metodou je samouspořádávání neboli samovolná organizace částic. Jedná se o velice jednoduchou metodu, při které dochází k adsorpci částic, nebo molekul na povrch substrátu. Výsledkem je tenký film pokrývající celý povrch materiálu. Materiál je ponořen do disperze, nebo roztoku vybrané látky, která vlivem adsorpce ulpí na povrchu substrátu. Samotný povrch substrátu je nutné pro přichycení látky modifikovat. Typicky se využívá modifikace chemická, nebo fyzikální. Chemickou modifikací rozumíme úpravu povrchu substrátu pomocí polymerů, nebo jiných sloučenin s funkčními skupinami, které mohou vytvořit chemickou vazbu s adsorbovanou molekulou. Vhodným příkladem je adsorpce nanočástic stříbra na povrchy upravené sloučeninami s funkčními skupinami obsahující atomy dusíku – aminoskupiny. Povrch substrátu však můžeme modifikovat i zdrsňením. [47]

Vrstvy keramických materiálů na bázi uhličitanu, nebo fosforečnanu vápenatého je možné připravit jak metodou samouspořádávání, případně metodou sprejovací. Tyto materiály obsahují velké částice, a proto je důležitá další modifikace. U nanášení vrstev uhličitanu vápenatého bez předchozí modifikace pomocí polymerů či jiných aktivních látek, byla zjištěna slabá mechanická odolnost. Proto je nutné nanesenou vrstvu upravit. Závěrečná úprava materiálu může spočívat například v zapečení na vysokou teplotu. Už

vliv teploty okolo 500 °C vykazuje zvýšenou odolnost materiálu vůči mechanickému poškození. Substrát je možné upravit i před nanášením vrstev. Jak již bylo zmíněno, úprava spočívá buď ve zdrsňení povrchu substrátu brusným papírem, nebo naleptáním, případně nanesením primární vrstvy aktivní látky, která usnadní adsorpci. [41, 48]

K modifikaci různých typů povrchů slouží nepřehledné množství biokompatibilních látek. Mezi nejvyužívanější polymerní materiály patří modifikace polylaktátem (PLA), případně polykaprolakton (PCL) či poly(dimethylsiloxan) (PDMS) (Obr. 6) aj. Velký hit v oblasti titanových implantátů je pokrývání nanotitanem, nebo kompozitními materiály na bázi uhličitanu vápenatého a fosforečnanu vápenatého. Každý typ vrstvy má za úkol upravit povrch substrátu tak, aby našel uplatnění ve specifické oblasti. V medicíně se jedná o povrchové úpravy implantátů, nebo stent. [49] Bez tenkých vrstev by se však neobešla ani spektroskopická metoda povrchově zesílená Ramanova spektroskopie, kde se využívá stříbrných nanočástic ať už v disperzi tak v podobě tenkých vrstev nanesených na destičkách. [50]



**Obr. 6** PDMS [51]

## 7 SERS

Ramanova spektroskopie, pracuje na principu neelastického rozptylu světla. Jedná se tedy o rozptyl, při kterém dojde ke změně vlnové délky fotonu. Ve zkratce, při interakci molekuly s monochromatickým zářením (laser) dojde k excitaci elektronů a po jejich zpětném přechodu na původní hladinu k vyzáření fotonů, buď s nezměněnou vlnovou délkou (Rayleighův rozptyl) a v několikanásobně menším měřítku dojde též k vyzáření fotonů se sníženou (anti-Stokesův posun), nebo naopak zvětšenou vlnovou délkou (Stokesův posun). Jedná se o Ramanův rozptyl, který je podstatou Ramanovy spektroskopie. Tato metoda je vhodná jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu. Důležité je, že je komplementární k infračervené spektroskopii díky odlišné podmínce pro aktivní vibraci-v infračervené spektroskopii, kde musí dojít ke změně dipólového momentu molekuly během vibrace. U Ramanovy spektroskopie je naopak nutná změna polarizovatelnosti molekuly během vibračního pohybu. Nevýhodou je však vyšší detekční limit, daný faktem, že neelastický rozptyl se týká jen méně než každého miliontého fotonu, který na vzorek dopadá. Citlivost metody zvýšil objev dceřiné metody, kterou známe jako povrchově zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS).

Metoda povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie byla objevena už ve druhé polovině 20. století, avšak její rozvoj nastal až v posledních 20 letech. Za pochopením a rozmachem metody stál především objev nanočástic a nanotechnologií, které umožnily mnohonásobně zvýšit detekční limit a stanovit tak i nepatrné množství analytu. Tato metoda využívá interakce kovových nanočástic s molekulami analytu. Je tedy nutné, aby se molekula nacházela v blízkosti nanočástice, nebo v lepším případě, aby byla na kovové nanočástici adsorbovaná. Mechanismus zesílení je dvojitý. Ve větším měřítku se uplatňuje elektromagnetický mechanismus, který spočívá ve vzniku silného elektromagnetického pole v okolí nanočástice (Au, Ag, ...) díky existenci povrchového plazmonu. Chemický mechanismus spočívá v přenosu náboje mezi molekulou a nanočásticí. K celkovému zesílení však přispívá nepatrně. [17]

Aby bylo možné úspěšně provést SERS experiment, je nezbytně nutné vybrat správný typ substrátu pro identifikovanou molekulu. Jak již bylo zmíněno dříve, jedná se o kovy, nejčastěji však o zlato a stříbro. Substrát může mít mnoho podob v závislosti na studované molekule. Využíváme například zdrsňených stříbrných elektrod, koloidních disperzí, tenkých filmů, případně definovaných nanostruktur. Jedná se tedy o nanočástice kovů,



které jsou buď zakotveny na nosiči, nebo se nachází volně v disperzi, aniž by ovlivňovaly chemickou strukturu studované látky. [52] Mezi typické nosiče patří například různé typy polymerů, uhlíkové materiály (grafen), keramika, případně i uhličitán vápenatý, který je biokompatibilní a bylo by možné ho využít mimo jiné i pro biomedicínské aplikace. [53]

Využití metody SERS se odvíjí hlavně od nízkého detekčního limitu, který se využívá například ve forenzní chemii, v medicíně, farmaceutickém průmyslu aj. S vývojem menších zařízení bylo umožněno rozšířit uplatnění i do terénu a detekovat například výbušniny. V minulosti byla studována hlavně detekce TNT, které bylo možné detekovat už při velice nízkých koncentrací pomocí zlatých nanočástic. [54] V potravinářství je metoda SERS schopna detekovat bílkoviny, alergeny, nebo antibiotika. Příkladem vysoké citlivosti a zároveň selektivity metody v potravinářství, je schopnost detekce určité bílkoviny, či odhalení nízké koncentrace antibiotik v mléce. [55] Budoucnost povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie je slibná, vše závisí od vývoje nových typů substrátů, které by poskytovaly stabilní a reprodukovatelné Ramanovo spektrum při vysokém faktoru zesílení.

## 8 Experimentální část

### 8.1 Materiály

Na přípravu mikročástic uhličitanu vápenatého byl použit  $\text{CaCl}_2$  (Lachema p.a.) a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Penta). Na úpravu viskozity byl použit etylenglykol (Sigma Aldrich).

K přípravě nanočástic stříbra modifikovanou Tollensovou metodou byl použit:  $\text{AgNO}_3$  (Sigma Aldrich),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Sigma Aldrich),  $\text{NaOH}$  (Lachner, p. a.) a redukční činidlo D+maltosa monohydrát (Sigma Aldrich),  $\text{NaBH}_4$  (Sigma Aldrich).

Na titanová kolečka byla nanášena vrstva poly(dimethylsiloxanu) (PDMS), který byl rozpouštěn v toluenu (Penta).

### 8.2 Metody

**UV-VIS spektroskopie.** K charakterizaci připravených nanočástic stříbra byl použit UV/Vis spektrometr (Specord S 600 firmy Analytic Jena (Germany)).

**Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).** Analýza disperzí mikročástic  $\text{CaCO}_3$  a kompozitů  $\text{nanoAg@CaCO}_3$  byla provedena pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEM 2010 (Jeol, Japan) s urychlovacím napětím 160 kV. Tato měření byla provedena v RCPTM (doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.).

**Dynamický rozptyl světla (DLS).** Velikost připravených nanočástic stříbra byla změřena na přístroji Zeta Potential Analyzer Zeta Plus od firmy Brookhaven Instruments Corporation (USA).

**Skenovací elektronová mikroskopie (SEM).** Morfologie připravených mikročástic  $\text{CaCO}_3$  i kompozitů  $\text{Ag@CaCO}_3$  v disperzích i ve vrstvách byla charakterizována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (Hitachi SU6600) s urychlovacím napětím 160 kV. Prvková analýza byla získána energiově-disperzním analyzátozem Thermo Scientific NORAN System 7. Tato měření byla provedena v RCPTM (Ing. Petra Bazgerová).

**Laserová difrakce.** Velikost mikročástic  $\text{CaCO}_3$  byla měřena na laserovém granulometru Analysette 22 MicroTec plus (Fritsch) s rozsahem měření 0,08–2000  $\mu\text{m}$ .

**Antibakteriální aktivita.** Antibakteriální aktivita byla otestována vůči standardní sadě patogenních bakterií na Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc (Mgr. Renata Večeřová).

**Atomová absorpční spektroskopie (AAS).** Obsah stříbra v kompozitech byl stanoven na atomovém absorpčním spektrometru ContrAA 300 (Analytik Jena, Germany).

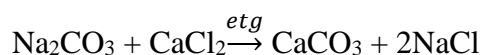
**Ramanova spektroskopie.** Využitelnost kompozitních materiálů jako substrátů pro Povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii, byla otestována na přístroji iRaman Plus s vlnovou délkou laseru 785 nm (BW Tek Inc., USA). Doba záznamu 60 sekund, počet akumulací 6.

### 8.3 Postupy a přípravy

Pro dosažení uspokojivých výsledků propojení mikročástic  $\text{CaCO}_3$  do kompozitu s nanočásticemi stříbra byla v první fázi hledána nejvhodnější varianta přípravy mikročástic uhličitanu a jejich kompozitu s nanoAg. V další fázi byl optimalizován způsob ukotvení kompozitu na pevný substrát (titanovou destičku), přičemž byly použity 2 způsoby ukotvení. Prvním z nich byla modifikace titanové destičky polymerem s následnou depozicí kompozitního materiálu z vodné disperze. Ve druhém případě byl kompozit po nanesení nakápnutím disperze po vysušení sintrován na titanové destičce při vysoké teplotě v laboratorní píce.

#### 8.3.1 Příprava mikročástic uhličitanu vápenatého

Mikročástice uhličitanu vápenatého byly připraveny modifikovanou srážecí reakcí chloridu vápenatého s uhličitanem sodným, kde jako činidlo ovlivňující viskozitu prostředí vystupuje etylenglykol. Cílenou změnou viskozity byla dosažena změna morfologie a velikosti částic v oblasti mikrometrů.



Na základě změny obsahu etylenglykolu byly připraveny 3 disperze mikročástic uhličitanu vápenatého, které se lišily tvarem a velikostí. Jednotlivé disperze byly připraveny smícháním roztoku  $\text{CaCl}_2$  o koncentraci  $0,33 \text{ mol/dm}^3$  s etylenglykolem

v různém poměru (5:1, 1:1, 1:5). Obdobným způsobem byl připraven roztok  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o koncentraci  $0,33 \text{ mol/dm}^3$  s etylenglykolem v poměrech (5:1, 1:1, 1:5). Nakonec byly míchány vždy dva roztoky se stejnými poměry voda-ethylenglykol na elektromagnetické míchače (500 rpm) po dobu 15 min. Výsledné disperze mikročástic uhličitanu vápenatého byly přečištěny několikanásobnou dekantací a odstředěním. Následně byly vysušeny při teplotě  $100^\circ\text{C}$ . V dalším textu nesou takto připravené typy mikročástic uhličitanu vápenatého označení C1 (5:1), C3 (1:1) a C5 (1:5). [56]

### 8.3.2 Příprava kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub>

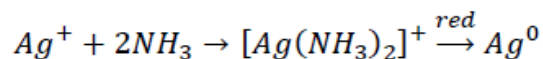
Připravené mikročástice  $\text{CaCO}_3$  byly kombinovány s nanoAg s cílem vytvoření kompozitu Ag@CaCO<sub>3</sub>. Za tímto účelem byly mikročástice  $\text{CaCO}_3$  buď smíchány s disperzí nanoAg připravené předem redukcí maltózou a kompozit vznikl prostou adsorcí nanočástic stříbra na povrch mikročástic  $\text{CaCO}_3$ . Ve druhém případě byl částice vyredukovány v disperzi mikročástic  $\text{CaCO}_3$  přímo. V druhé fázi byla použita obměna původního postupu s cílem lepšího zabudování nanočástic stříbra do struktury mikročástic  $\text{CaCO}_3$ . Jednalo se o přípravu mikročástic  $\text{CaCO}_3$  v prostředí amoniakálního komplexu stříbra s následnou redukcí. Navíc bylo použito i jiné redukční činidlo,  $\text{NaBH}_4$ , kvůli vyšší efektivitě postupu.

#### 8.3.2.1 Kompozit CaCO<sub>3</sub> s nanoAg adsorbovanými z disperze

Sorpční metodou byly připraveny 3 kompozitní materiály, lišící se tvarem mikročástic  $\text{CaCO}_3$ . Všechny 3 kompozity byly připraveny smísením disperze nanoAg o koncentraci mg/l (maltózový koloid) s vodnou disperzí  $\text{CaCO}_3$  (1 g/100 ml) v poměru 1:1. Výsledné disperze se liší použitým typem  $\text{CaCO}_3$  (C1, C3, C5). Vznikly tak 3 disperze kompozitního materiálu, které byly po sedimentaci (24 hod) několikanásobně promyty vodou a dekantovány, poté odstředěny a vysušeny při teplotě  $100^\circ\text{C}$ .

- Kompozit **S1** ( $\text{CaCO}_3\text{C1}$ )
- Kompozit **S3** ( $\text{CaCO}_3\text{C3}$ )
- Kompozit **S5** ( $\text{CaCO}_3\text{C5}$ )

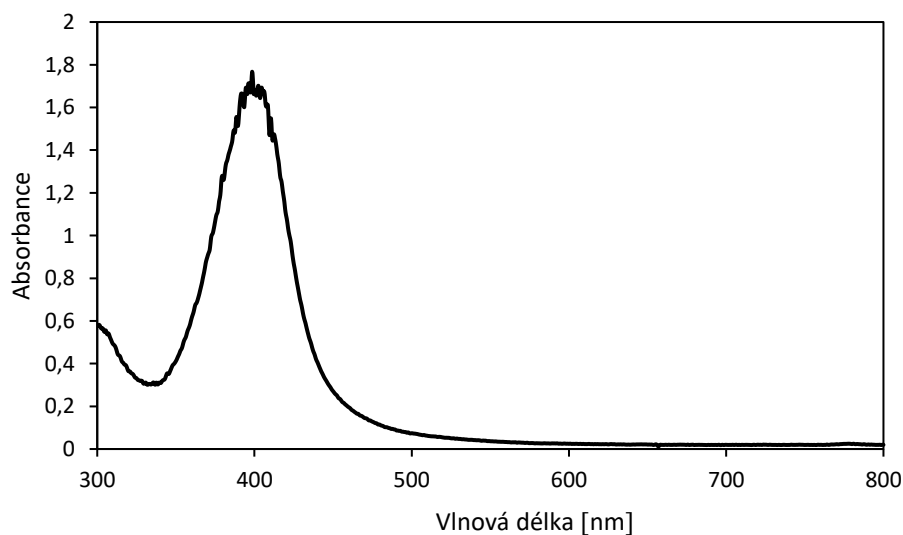
Na přípravu koloidní disperze nanočástic stříbra byla použita modifikovaná Tollensova metoda, při které dochází k redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů maltózou (případně jiným cukrem). [10]



Výsledná disperze byla připravena smícháním těchto roztoků v následujícím pořadí na elektromagnetické míchače:

- 5 ml AgNO<sub>3</sub> roztoku o koncentraci 5·10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup>
- 1,25 ml NH<sub>3</sub> roztoku o koncentraci 0,1 mol/dm<sup>3</sup>
- 12,75 ml destilované vody
- 1 ml NaOH roztoku o koncentraci 0,25 mol/dm<sup>3</sup>
- 5 ml maltosy roztoku o koncentraci 0,05 mol/dm<sup>3</sup>

Tímto postupem vznikla charakteristicky medově-žlutá disperze nanočástic stříbra a následně byla stanovena velikost částic (cca 28 nm) pomocí metody DLS. Rovněž bylo změřeno UV/Vis spektrum, které potvrdilo přítomnost nanočástic stříbra. Disperze byla pro toto měření 10x naředěna (Obr. 7).



**Obr. 7** UV/Vis spektrum vodné disperze nanočástic stříbra o velikosti 28 nm, připravené redukcí maltózou pomocí modifikované Tollensovy metody.

### 8.3.2.2 Kompozit s nanoAg vyredukovanými přímo na mikročástice CaCO<sub>3</sub>

Redukční metodou bylo připraveno 6 kompozitů, které se lišily nejen použitým CaCO<sub>3</sub>, ale i výsledným obsahem nanočástic stříbra. Všechny kompozity byly připraveny smícháním roztoků a disperzí na elektromagnetické míchačce v totožném pořadí následujícím způsobem, přičemž výsledný objem disperze kompozitu byl 20 ml (Tab. 1):

- 4 ml roztoku AgNO<sub>3</sub>
- 1 ml roztoku NH<sub>3</sub>
- 10,2 ml H<sub>2</sub>O+CaCO<sub>3</sub> (1 g/100 ml)
- 0,8 ml roztoku NaOH
- 4 ml roztoku maltózy

Vzniklo tak 6 disperzí kompozitního materiálu, které byly po sedimentaci (24 hod) několikanásobně promyty vodou a dekantovány, poté odstředěny a vysušeny při teplotě 100° C.

**Tab. 1** Postup přípravy kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> redukční metodou

Kompozit	Typ CaCO <sub>3</sub>	AgNO <sub>3</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]	NH <sub>3</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]	NaOH [mol/dm <sup>3</sup> ]	Maltóza [mol/dm <sup>3</sup> ]
RM1a	C1	0,005	0,1	0,25	0,05
RM1b	C1	0,01	0,2	0,5	0,1
RM1c	C1	0,0025	0,05	0,125	0,025
RM5a	C5	0,005	0,1	0,25	0,05
RM5b	C5	0,01	0,2	0,5	0,1
RM5c	C5	0,0025	0,05	0,125	0,025

### 8.3.2.3 Kompozit CaCO<sub>3</sub> s nanoAg vyredukovanými NaBH<sub>4</sub>

V rámci účinnějšího zabudování nanočástic stříbra do struktury uhličitanových mikročástic byl modifikován původní postup přípravy kompozitu. Navíc kvůli vyšší efektivitě redukce nanočástic stříbra bylo změněno redukční činidlo z maltózy na NaBH<sub>4</sub>. V této části byla využívána již jen redukční metoda přípravy kompozitu, jelikož sorpční metoda se ukázala méně účinná.

Jako v případě přípravy mikročástic uhličitanu vápenatého byly využity dva roztoky - CaCl<sub>2</sub> a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Přičemž první roztok CaCl<sub>2</sub> zůstal nezměněn, nicméně u druhého roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> byla část vody nahrazena amoniakálním komplexem stříbra. Oba takto připravené roztoky byly následně smíchány, a nakonec k nim byla přidána redukční látka NaBH<sub>4</sub>. Touto metodou bylo připraveno 6 kompozitů lišících se tvarem uhličitanových částic, ale i obsahem nanočástic stříbra. U výsledných disperzí byl předpokládán obsah nanočástic stříbra 0,5 % a 1 % na základě výpočtu. Na přípravu 500 ml kompozitu (CaCO<sub>3</sub> C1 tj. roztok o poměru vody a etylenglykolu 5:1; 0,5 % Ag) bylo použito následujících disperzí a roztoků v totožném pořadí:

- Příprava roztoku CaCl<sub>2</sub> o koncentraci 0,33 mol/dm<sup>3</sup> v 208,3 ml H<sub>2</sub>O, smíchaný s 41,6 ml etylenglykolu.
- Stejným způsobem proběhla příprava roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o koncentraci 0,635 mol/dm<sup>3</sup> v 108,3 ml H<sub>2</sub>O, smíchaný s 41,6 ml etylenglykolu. K připravenému roztoku byla přidána disperze amoniakálního komplexu stříbra připravená následujícím způsobem: 20 ml AgNO<sub>3</sub> (c= 0,0625 mol/dm<sup>3</sup>), 5 ml NH<sub>3</sub> (c=0,3 mol/l), 55 ml H<sub>2</sub>O.
- Předchozím způsobem byly získány 2 roztoky, které byly míchány na elektromagnetické míchačce po dobu 15 min.
- Po 15 minutách vznikl uhličitan vápenatý v prostředí amoniakálního komplexu stříbra. Poté bylo přidáno 20 ml NaBH<sub>4</sub> (c = 0,0625 mol/dm<sup>3</sup>). Po přidání NaBH<sub>4</sub> dojde k vyredukování nanočástic stříbra.

Poté byl připravený kompozit důkladně promyt vodou a dekantován, poté odstředěn a vysušen při teplotě 100° C.

Ostatní kompozitní materiály byly připraveny obdobně, liší se pouze výsledným obsahem nanočástic stříbra a typem použitého CaCO<sub>3</sub>. Výsledné pojmenování

kompozitů a předpokládaný obsah nanočástic stříbra, který vzešel z výpočtu je shrnut v Tab. 2.

**Tab. 2 Postup přípravy kompozitů v prostředí amoniakálního komplexu stříbra**

Kompozit	CaCl <sub>2</sub> / Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]	Objem nanoAg [ml]	AgNO <sub>3</sub> /NaBH <sub>4</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]	NH <sub>3</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]	CaCO <sub>3</sub> [mol/dm <sup>3</sup> ]	Předpokládaný obsah stříbra [%]
<b>RB1a</b>	0,33/0,635	100	0,0625	0,3	1	0,5
<b>RB3a</b>	0,33/0,55	50	0,035	0,35	3	0,5
<b>RB5a</b>	0,33/0,82	25	0,0125	0,063	5	0,5
<b>RB1b</b>	0,33/0,63	100	0,125	0,62	1	1
<b>RB3b</b>	0,33/55	50	0,07	0,7	3	1
<b>RB5b</b>	0,33/0,82	25	0,025	0,125	5	1

### 8.3.3 Příprava titanových destiček s kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub>

Otestováním biologické aktivity kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> se ukázalo, že nejvýhodnější kompozity pro následné ukotvení na titanovou podložku z hlediska jejich biologické aktivity jsou RB1b, RB3b a RB5b, které na rozdíl od kompozitů RB1a, RB3a a RB5a vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu. Tyto 3 kompozity byly následně využity pro ukotvení na titanovou podložku, a to dvěma způsoby. Prvním způsobem bylo nanesení na titanovou podložku adsorpcí z disperze s následným zapečením na vysokou teplotu. Druhou cestou byla prvotní modifikace titanové destičky polymerním materiálem PDMS, který byl testován jako látka schopná poutat nanoAg na kovovém povrchu. Na vrstvu PDMS byl metodou adsorpce z disperze ukotven předem připravený kompozitní materiál.



### **8.3.3.1 Příprava titanové destičky s vrstvou kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub> sintrací na 500 °C**

Na titanovou destičku byla nanесena vrstva kompozitu metodou sorpce z disperze, která obsahovala 1 mg kompozitu/1 ml H<sub>2</sub>O. K tomuto účelu byly použity kompozity RB1b, RB3b a RB5b, které vykazovaly antibakteriální aktivitu. Titanová destička byla v disperzi kompozitu ponořena po dobu 30 minut, poté byl roztok částečně odpařen, a destička vysušena.

Následně byly titanové destičky vystaveny teplotě 500 °C po dobu 60 minut. Během tohoto procesu došlo k zapečení kompozitu do titanové destičky, čímž se měla zvýšit mechanická odolnost kompozitního materiálu vůči oděru.

### **8.3.3.2 Příprava titanové destičky s vrstvou PDMS a kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub>**

Dalším použitým způsobem, jak ukotvit připravený kompozitní materiál na titanové destičce je použití kotvící mezivrstvy polymerního materiálu. V našem případě se jedná o poly(dimethylsiloxan) (PDMS). K pokrývání titanových destiček byl použit roztok PDMS v toluenu o koncentraci 20 mg/ml. Titanové destičky byly ponořeny do roztoku PDMS a umístěny do vakuové sušárny (250 mBar, 35 °C), kde došlo k postupnému odpaření rozpouštědla. Výsledkem byly titanové destičky pokryté vrstvou PDMS.

Následně byly titanové destičky s vrstvou PDMS umístěny do disperze kompozitního materiálu o koncentraci 2 mg Ag/1 ml H<sub>2</sub>O. K tomuto účelu byly použity kompozity RB1b, RB3b a RB5b. Po adsorpci kompozitního materiálu na povrch destičky došlo k odpaření přebytečné H<sub>2</sub>O ve vakuové sušárně (250 mBar, 35 °C). Současně s kompozitními materiály byly otestovány i titanové destičky s PDMS pokryté vrstvou nanoAg. Jednalo se o maltózový koloid, připravený modifikovanou Tollensovou metodou. [51]

## 9 Výsledky a diskuze

Hlavním cílem této práce byla příprava antibakteriálně aktivního kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub> a jeho zakotvení do vrstvy na povrchu Ti destičky, tedy materiálu používaném v biomedicínských aplikacích. Za tímto účelem byl v první fázi optimalizován způsob přípravy mikročástic CaCO<sub>3</sub> a jejich následná kombinace s nanoAg. Takto připravené kompozity byly uchyceny k povrchu titanové destičky. Na testování byly použity tři kompozitní materiály.

Současně byla testována aktivita připravených vrstev kompozitního materiálu jako substrátu pro SERS. Na toto testování bylo použito devět kompozitních materiálů, které byly připraveny sorpční a redukční metodou.

### 9.1 Mikročástice uhličitanu vápenatého

Připravené mikročástice uhličitanu vápenatého byly charakterizovány pomocí transmisního (TEM) a skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Tímto způsobem byla popsána jejich velikost a morfologie. Snímky CaCO<sub>3</sub> z TEM pro vzorek C1 bohužel nejsou uvedeny, jelikož nadměrná velikost částic neumožňovala pořízení kvalitního záznamu (Obr. 11, 12). Na základě vyhodnocení snímků ze SEM, byl zjištěn vztah mezi obsahem etylenglykolu v reakční směsi a velikostí a tvarem připravených mikročástic. Větší objem etylenglykolu ve směsi má vliv na zakulacení částic. Disperze uhličitanu vápenatého připraveného v systému s největším obsahem etylenglykolu, tedy CaCO<sub>3</sub> C5, obsahoval kulovité, dobře definované, porézní částice (Obr. 10). Naopak CaCO<sub>3</sub> C1 obsahoval částice ve formě souměrných krychlí s hladším povrchem (Obr. 8). CaCO<sub>3</sub> s poměrem etylenglykolu 1:1 (typ C3) obsahoval nespécifikované částice s částečně krychlovým tvarem a pórovitostí srovnatelnou spíše s CaCO<sub>3</sub> C1 (Obr. 9). Jednotlivé typy uhličitanů vápenatých se tedy liší nejen tvarem a velikostí částic, ale také strukturou povrchu. Jak již bylo zmíněno dříve, uhličitan vápenatý 5 obsahoval porézní částice, avšak zbylé dva vzorky byly tvořeny spíše hladkými částicemi s nepórovitým povrchem.

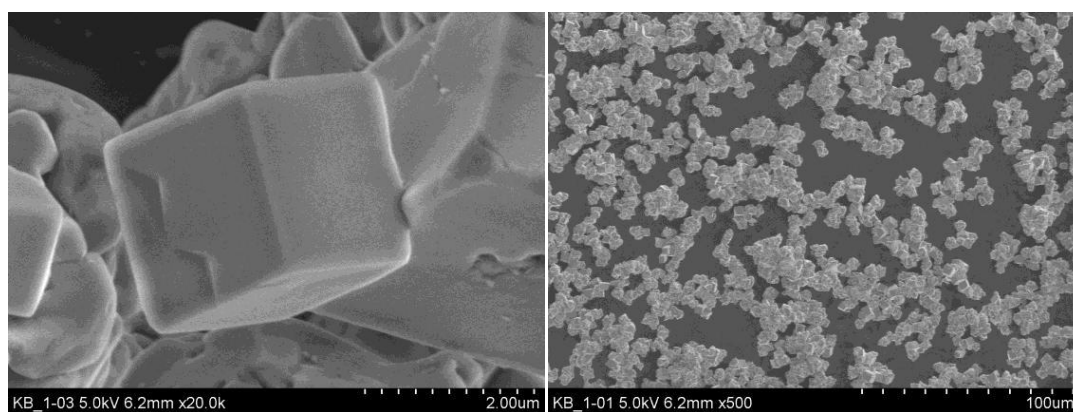
Na základě vyhodnocení snímků ze SEM je možné odhadnout velikost částic, která se pohybovala v jednotkách mikrometrů. Tento výsledek potvrdilo měření velikosti částic v disperzi na laserovém granulometru, s jehož pomocí byla upřesněna hodnota průměrné velikosti pro jednotlivé vzorky. Největší mikročástice obsahoval CaCO<sub>3</sub> C1, a naopak

nejmenší mikročástice tvořil  $\text{CaCO}_3$  C5. Výsledky měření z laserového granulometru jsou shrnuty v Tab. 3. Je tedy patrná souvislost mezi obsahem etylenglykolu v reakční směsi, a tedy viskozitou, a velikostí vznikajících mikročástic. V podstatě dochází s růstem obsahu etylenglykolu v reakční směsi ke zpomalení difúze materiálu k vznikajícímu nukleu a prioritně tedy vznikají malé krystalky.

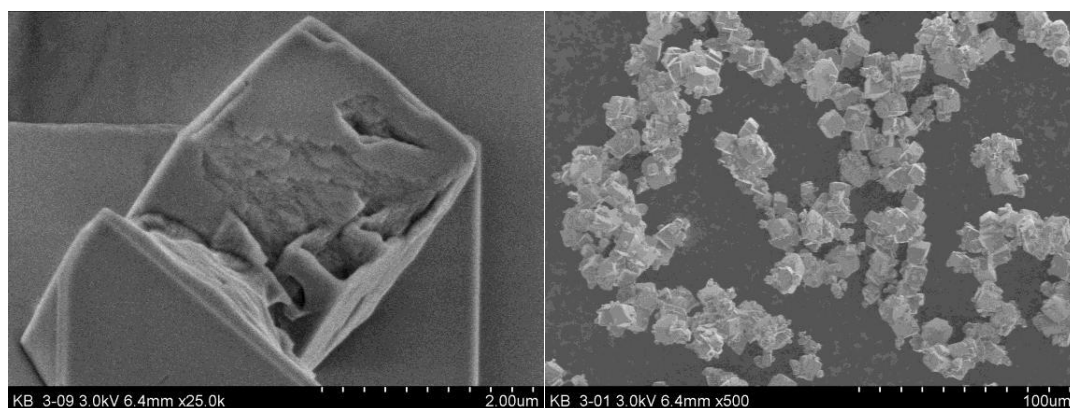
Spolu s morfologií částic, která byla popsána pomocí SEM, byla realizována i kvalitativní prvková analýza připravených mikročástic pomocí energiově-disperzní spektrometrie (EDS), která jednoznačně prokázala existenci mikročástic  $\text{CaCO}_3$ .

**Tab. 3 Velikost mikročástic pro jednotlivé typy  $\text{CaCO}_3$**

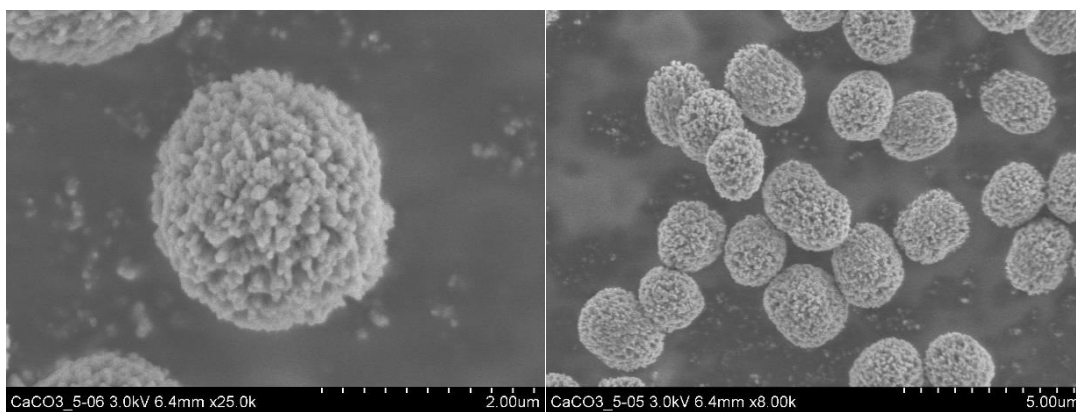
Typ $\text{CaCO}_3$	Velikost mikročástic [ $\mu\text{m}$ ]
C1	14,4
C3	3,80
C5	1,25



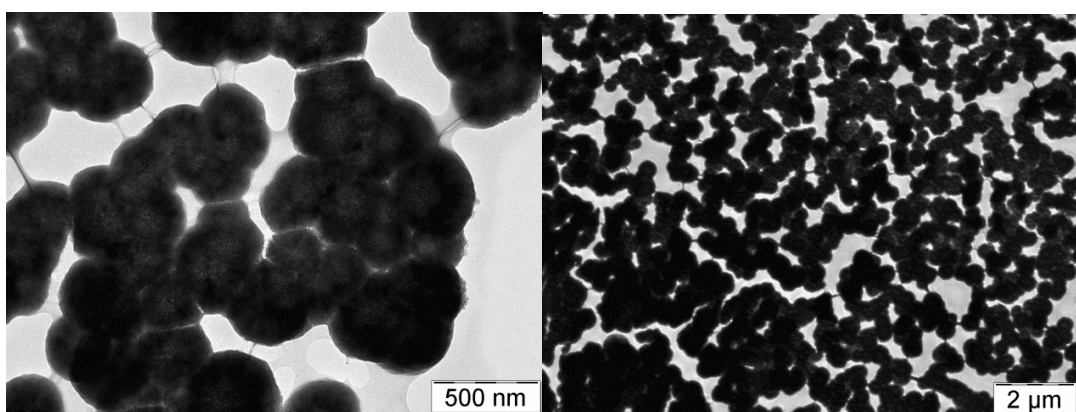
**Obr.8** Snímky ze SEM pro vzorek  $\text{CaCO}_3$  C1 s obsahem etylenglykolu 1:5. Rozlišení snímku vlevo je 2  $\mu\text{m}$  a snímku vpravo je 100  $\mu\text{m}$ .



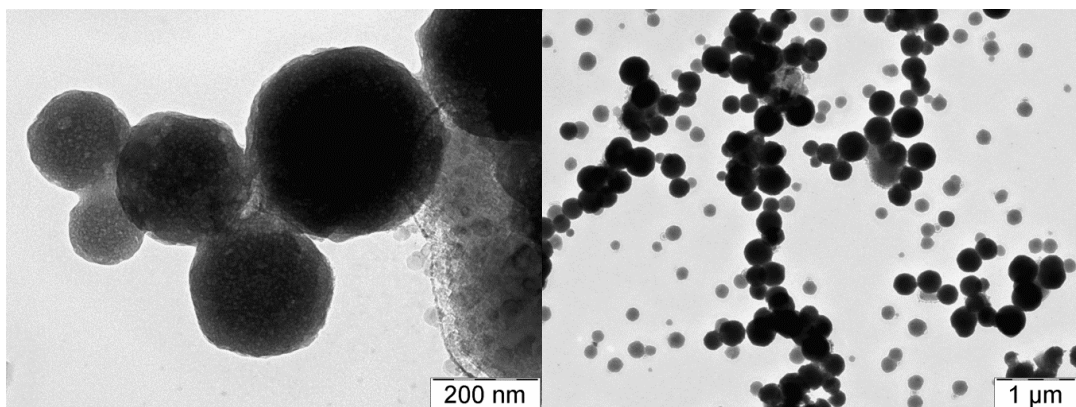
**Obr. 9** Snímky ze SEM pro vzorek  $\text{CaCO}_3$  C3 s obsahem etylenglykolu 1:1. Rozlišení snímku vlevo je 2  $\mu\text{m}$  a snímku vpravo je 100  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 10** Snímky ze SEM pro vzorek  $\text{CaCO}_3$  C5 s obsahem etylenglykolu 5:1. Rozlišení snímku vlevo je  $2\ \mu\text{m}$  a snímku vpravo je  $5\ \mu\text{m}$ .



**Obr. 11** Snímky  $\text{CaCO}_3$  z TEM pro vzorek C3 s obsahem etylenglykolu ku vodě 1:1. Rozlišení snímku vlevo je  $500\ \text{nm}$  a snímku vpravo je  $2\ \mu\text{m}$ .



**Obr. 12** Snímky  $\text{CaCO}_3$  z TEM pro vzorek C5 s obsahem etylenglykolu ku vodě 5:1. rozlišení snímku vlevo je  $200\ \text{nm}$  a snímku vpravo je  $1\ \mu\text{m}$ .

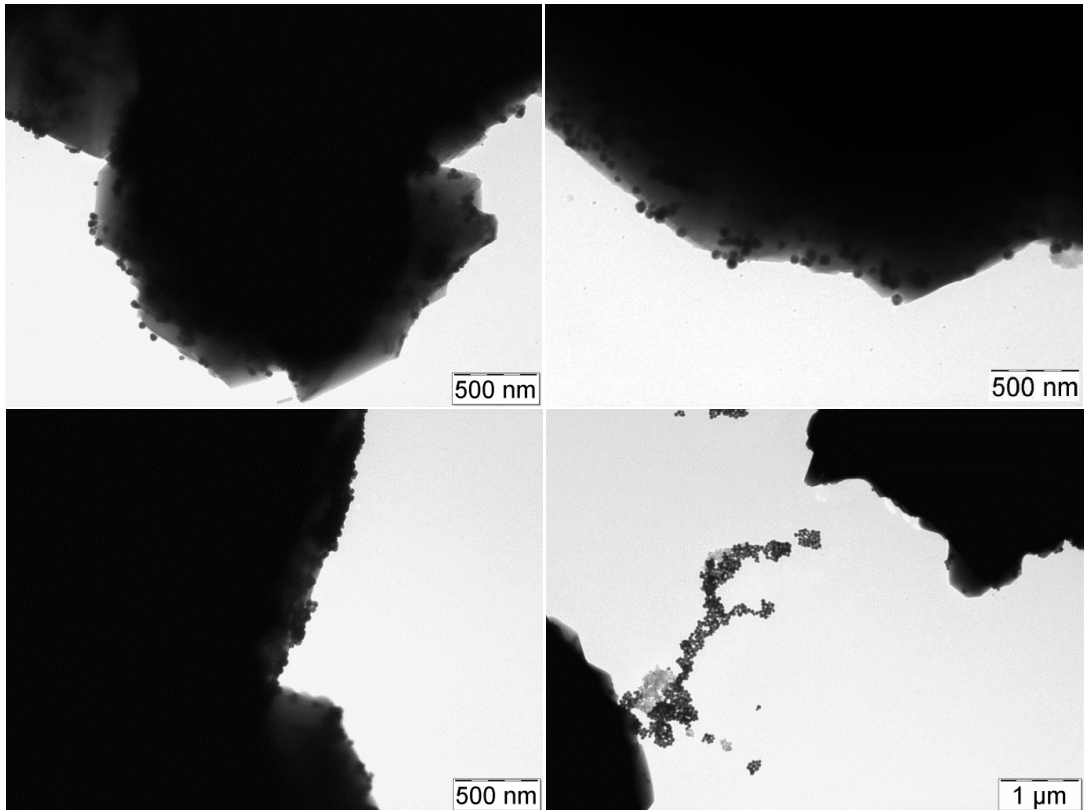
## 9.2 Kompozity nanoAg@CaCO<sub>3</sub>

### 9.2.1 Kompozit CaCO<sub>3</sub> s nanoAg adsorbovanými z maltóзовého koloidu a s nanoAg vyredukovanými maltózou

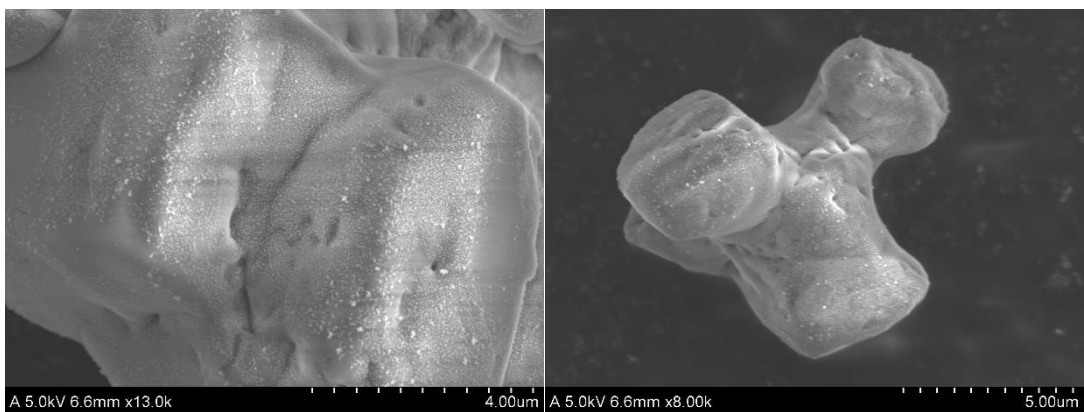
*SEM, EDS, TEM.* Celkem bylo připraveno 9 kompozitních materiálů pomocí metod sorpce a redukce. Vyhodnocením snímků z elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že částice CaCO<sub>3</sub> si zachovaly svůj charakteristický tvar, typický pro určitý typ CaCO<sub>3</sub> (C1, C3, C5). Sorpční metodou byly připraveny 3 vzorky, které se lišily tvarem a velikostí mikročástic CaCO<sub>3</sub>. Vyhodnocením snímků je patrné, že povrch kompozitních materiálů připravených sorpční metodou nebyl homogenně pokrytý nanočásticemi stříbra s částečnou agregací nanoAg na povrchu mikročástic CaCO<sub>3</sub> (Obr. 13) Výsledky ze SEM poukázaly na modifikaci mikročástic CaCO<sub>3</sub> a to v případě vzorků S1, S3 které ztratily svůj původní tvar (Obr. 14, 15). Kompozit S5 si udržel svůj charakteristický tvar koule (Obr. 16) Na rozdíl od kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravených redukční metodou, tvořily nanočástice stříbra na povrchu agregáty. Kompozitní materiály připravené redukční metodou se lišily nejen morfologií a velikostí, ale také množstvím nanočástic stříbra na povrchu mikročástic CaCO<sub>3</sub>. Na základě proměnných parametrů využitých v této práci bylo připraveno 6 kompozitních materiálů, které vycházely z původních typů CaCO<sub>3</sub> (C1, C5), (Obr. 17, 18).

V případě redukční metody byly mikročástice CaCO<sub>3</sub> homogenně pokryté bez větších agregátů nanoAg a už i na snímcích z TEM je vidět větší obsazenost nanočásticemi stříbra, které pronikly hlouběji do struktury mikročástic CaCO<sub>3</sub> (Obr. 17). Obsah stříbra byl dále upřesněn pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS).

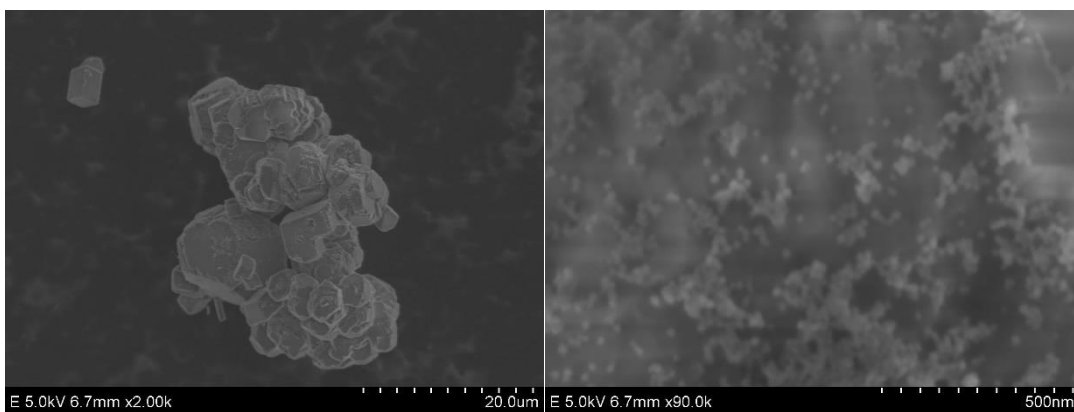
U kompozitů, které byly připraveny se sníženým či zvýšeným obsahem nanočástic stříbra nebyla prokázána změna morfologie, která by se lišila od výchozího tvaru mikročástic kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub>. Tedy od RM5a a RM1a.



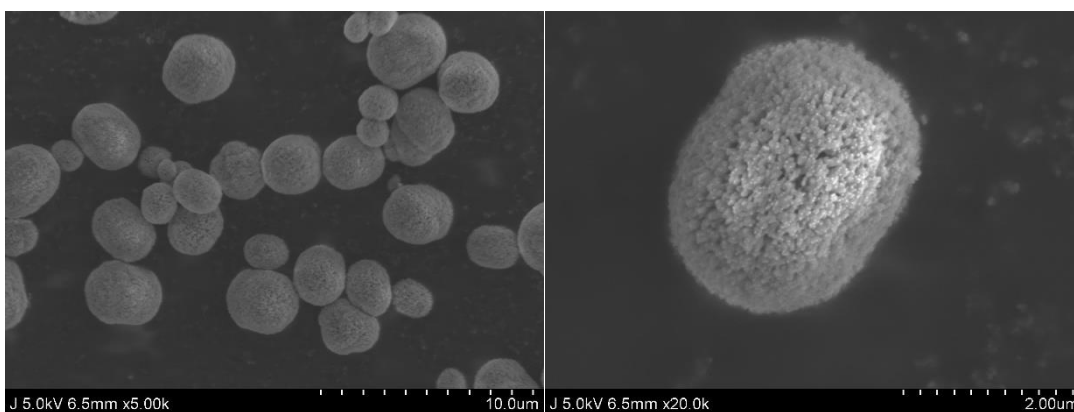
**Obr. 13** Snímky z TEM pro kompozitní materiály připravené sorpční metodou. Vlevo nahoře kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> S1 s rozlišením 500 nm, vpravo nahoře kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> S3 s rozlišením 500 nm, vlevo dole kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> S5 s rozlišením 500 nm. Vpravo dole typický příklad agregace nanoAg na povrchu mikročástic CaCO<sub>3</sub> s rozlišením 1 μm pro kompozit S1.



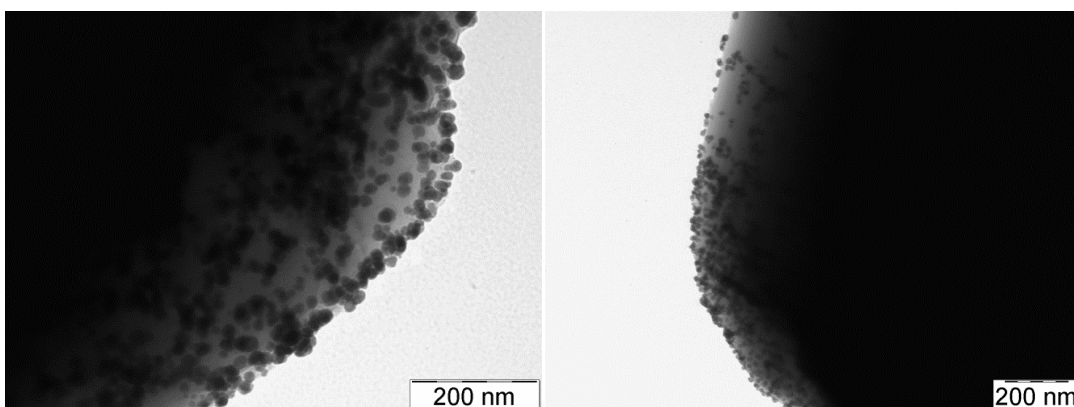
**Obr. 14** Snímky ze SEM pro vzorek S1 připravený sorpční metodou. Snímek vlevo s rozlišením 4 μm a snímek vpravo s rozlišením 5 μm.



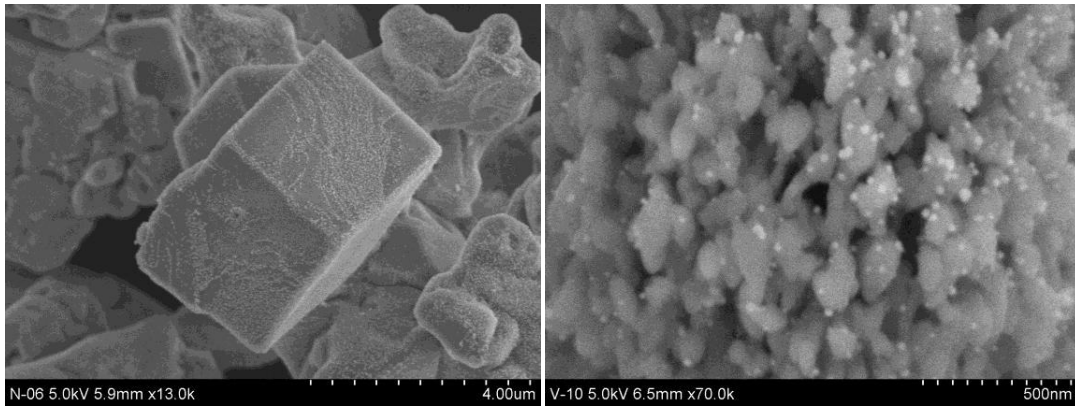
**Obr. 15** Snímky ze SEM pro vzorek S3 připravený sorpční metodou. Snímek vlevo s rozlišením 20 μm a snímek vpravo s rozlišením 500 nm.



**Obr. 16** Snímky ze SEM pro vzorek S5 připravený sorpční metodou. Snímek vlevo s rozlišením 10 μm a snímek vpravo s rozlišením 2 μm.



**Obr. 17** Snímky z TEM pro vzorky připravené redukční metodou. Vlevo vzorek RM1a s rozlišením 200 nm, vpravo vzorek RM5a s rozlišením 200 nm.



**Obr. 18** Snímky ze SEM pro vzorky připravené redukční metodou. Vlevo vzorek RM1a s rozlišením 4 $\mu$ m, vpravo vzorek RM5a s rozlišením 500 nm.

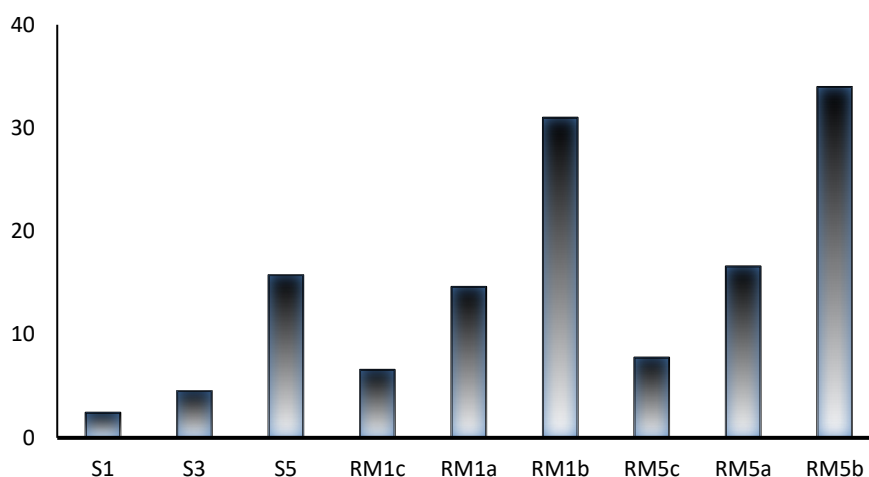
**AAS.** Jak již bylo zmíněno dříve obsah nanočástic stříbra se u kompozitních materiálů připravených redukční metodou lišil. Výchozí koncentrace stříbra v reakční směsi mg/l odpovídá připraveným kompozitům označeným RM1a a RM5a, u dalších kompozitů byl obsah stříbra dvojnásobný (RM1b, RM5b) nebo naopak poloviční (RM1c, RM5c).

U kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> připravených sorpční metodou byl obsah stříbra ve výchozí disperzi stejný pro všechny připravované kompozity. Výsledný obsah stříbra v jednotlivých kompozitech je uveden v Tab 4. Z výsledků je patrné, že kompozity, u nichž byl jako výchozí typ mikročástic CaCO<sub>3</sub>, tvar porézních koulí (CaCO<sub>3</sub> C5), byly schopny adsorbovat největší množství nanoAg v porovnání s kompozity s využitím mikročástic CaCO<sub>3</sub> C1 a C3. Tato skutečnost je jednoznačně způsobena daleko větší porozitou a tím pádem i větším povrchem mikročástic. U redukční metody se tento trend opakoval.



**Tab. 4 Obsah stříbra v kompozitech nanoAg@CaCO<sub>3</sub> vyhodnocený pomocí AAS**

Typ kompozitu	Obsah Ag [mg/1 g kompozitu]	Obsah Ag [%]
S1	2,44	0,24
S3	4,54	0,45
S5	15,76	1,55
RM1a	14,62	1,44
RM1b	31,00	3,00
RM1c	6,585	0,65
RM5a	16,60	1,63
RM5b	33,98	3,29
RM5c	7,77	0,77



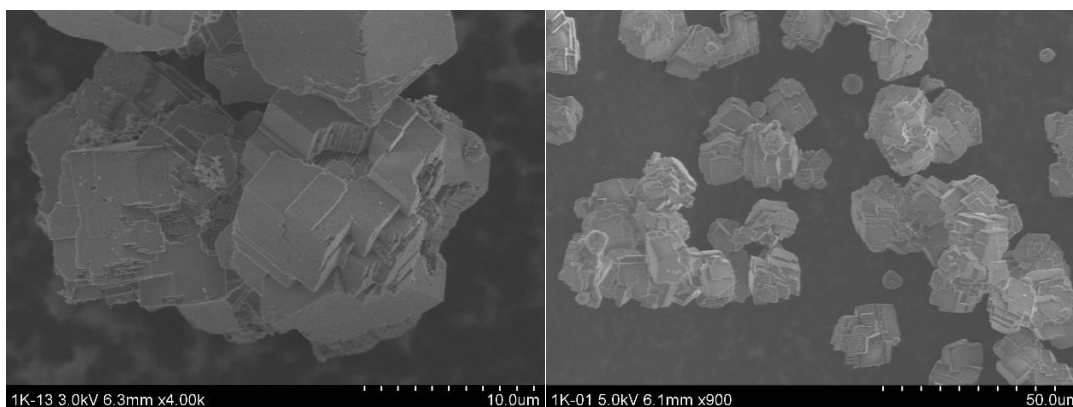
**Obr. 19** Obsah stříbra v kompozitech nanoAg@CaCO<sub>3</sub> v mg/1 g kompozitu.

## 9.2.2 Kompozit s nanočásticemi stříbra připravenými redukcí NaBH<sub>4</sub>

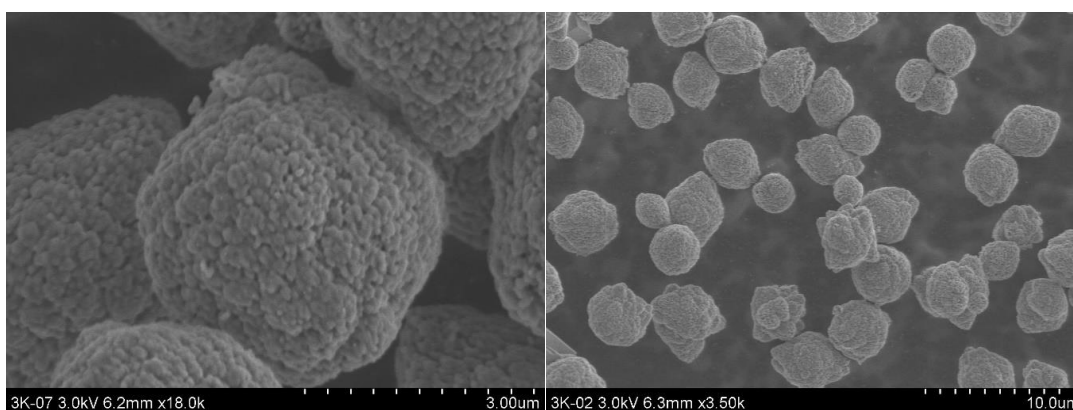
*TEM, SEM, EDS.* Kompozitní materiály připravené pomocí metody založené na přípravě disperze CaCO<sub>3</sub> v prostředí amoniakálního komplexu stříbra s následnou redukcí NaBH<sub>4</sub>, byly charakterizovány skenovacím (SEM) a transmisním (TEM) elektronovým mikroskopem. Touto metodou bylo připraveno 6 vzorků CaCO<sub>3</sub>, které se lišily nejen tvarem a velikostí mikročástic CaCO<sub>3</sub>, ale i obsahem stříbra.

Vyhodnocením snímků z elektronové mikroskopie byla prokázána částečná změna tvaru uhličitanových částic oproti případu, kdy byl připravován čistý CaCO<sub>3</sub>, která se nejvíce projevila u CaCO<sub>3</sub> typu C1 a C3. U obou vzorků došlo k výrazné změně morfologie mikročástic. Mikročástice se začaly transformovat do kulovitěho tvaru, avšak

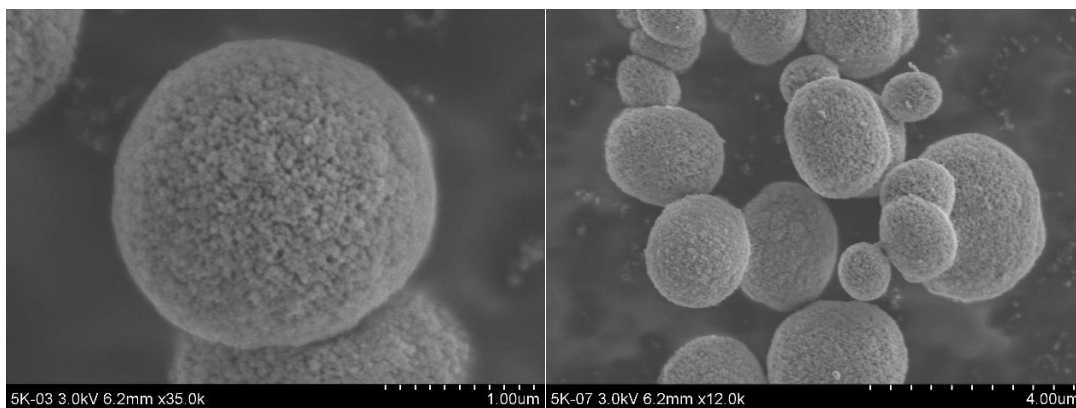
nedošlo k úplné přeměně a jsou viditelné mikročástice ve tvaru koule se zúženými konci, tento jev je nejvíce patrný u vzorku RB3a a RB3b (Obr. 20, 21, 25, 26). U mikročástic  $\text{CaCO}_3$ , které byly připraveny v poměru vody a etylenglykolu 1:5, nedošlo k výrazné změně a mikročástice si zachovaly svůj původní kulovitý tvar (Obr. 22, 27). Pravděpodobným zdrojem modifikace je přítomnost amoniakálního komplexu stříbra při tvorbě mikročástic  $\text{CaCO}_3$ . Z toho důvodu předpokládám, že kulovitý tvar mikročástic  $\text{CaCO}_3$  je daleko stabilnější než tvar krychlový. S největší pravděpodobností dochází k modifikaci částic zvýšením pH. Snímky z TEM byly provedeny, aby se potvrdilo zabudování nanoAg do mikročástic  $\text{CaCO}_3$ . Ukázalo se, že nanočástice stříbra jsou nejvíce situovány na povrchu mikročástic  $\text{CaCO}_3$ , případně vstupují jen do vrstvy o hloubce několika nanometrů (Obr. 28, 29, 30). U kompozitů s nižším obsahem stříbra RB1a, RB3a, RB5a není patrná přítomnost nanoAg (Obr. 23, 24). Spolu se snímky ze SEM byla provedena i EDS analýza, která zaznamenala přítomnost  $\text{CaCO}_3$  i nanočástic stříbra. Metodou EDS byla pouze potvrzena přítomnost nanočástic stříbra a  $\text{CaCO}_3$ . Vzor EDS analýzy pro vzorek Rb3b je uveden na Obr. 31.



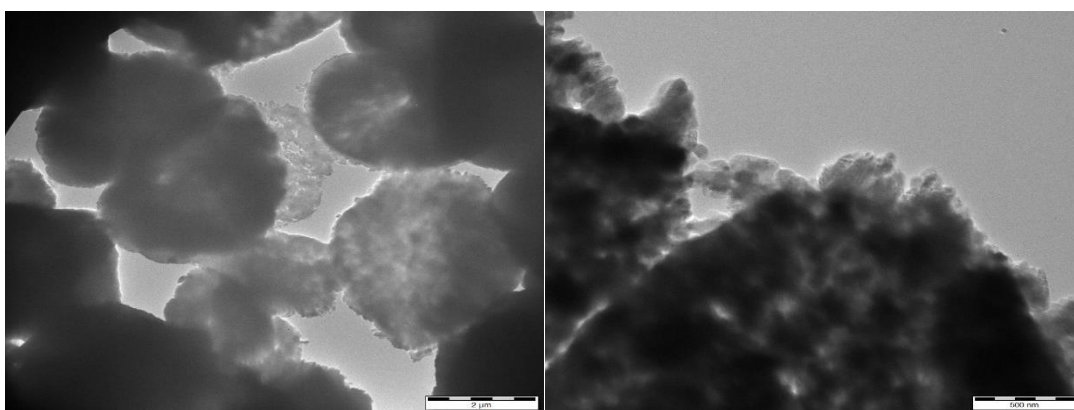
**Obr. 20** Snímky ze SEM pro vzorek kompozitního materiálu RB1a. Rozlišení snímku vlevo je 10  $\mu\text{m}$  a snímku vpravo je 50  $\mu\text{m}$ .



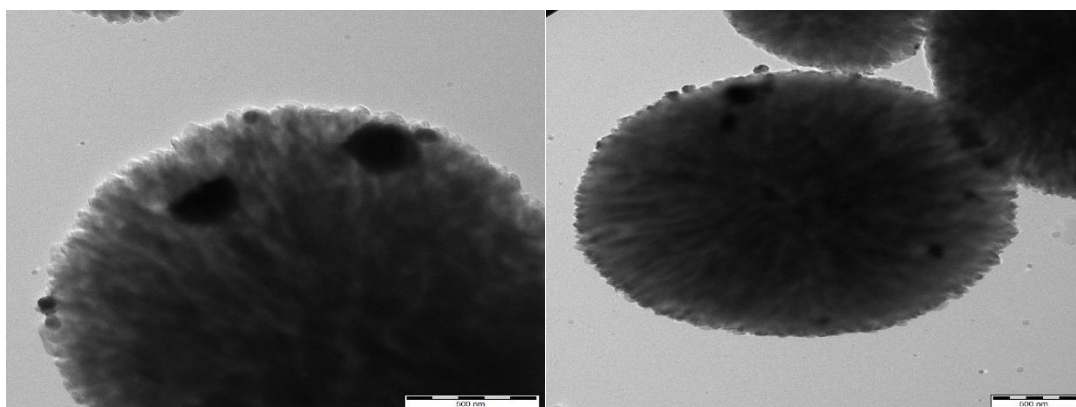
**Obr. 21** Snímky ze SEM pro vzorek kompozitního materiálu RB3a. Rozlišení snímku vlevo je 3  $\mu\text{m}$  a snímku vpravo je 10  $\mu\text{m}$ .



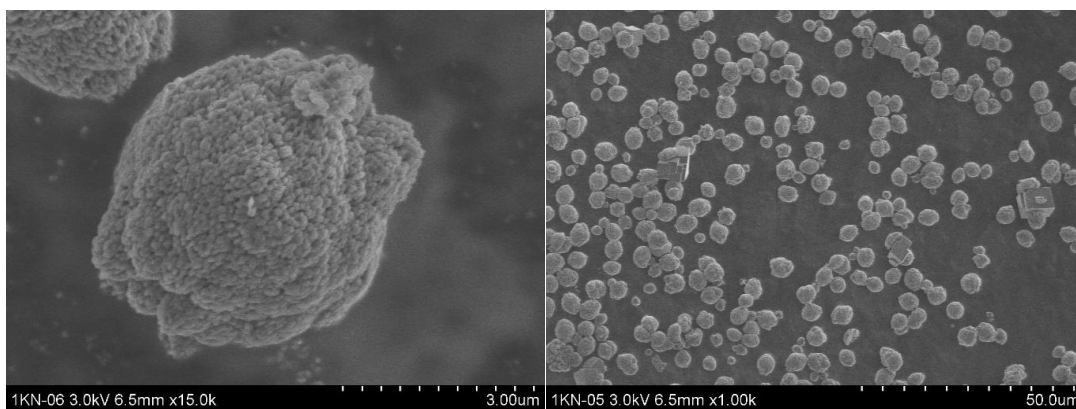
**Obr. 22** Snímky ze SEM pro vzorek kompozitního materiálu RB5a. Rozlišení snímku vlevo je 1  $\mu\text{m}$  a snímku vpravo je 4  $\mu\text{m}$ .



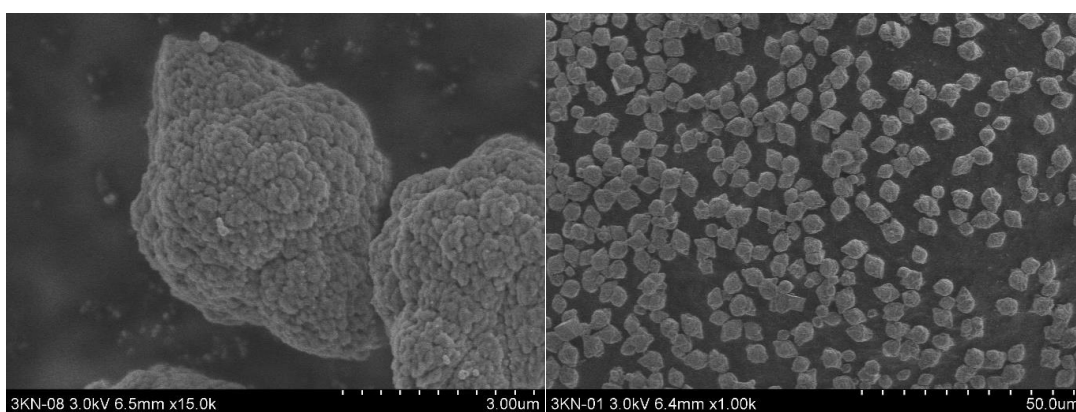
**Obr. 23** Snímky TEM pro vzorek kompozitního materiálu RB3a. Rozlišení snímku vlevo je 2  $\mu\text{m}$  a snímku vpravo 500 nm.



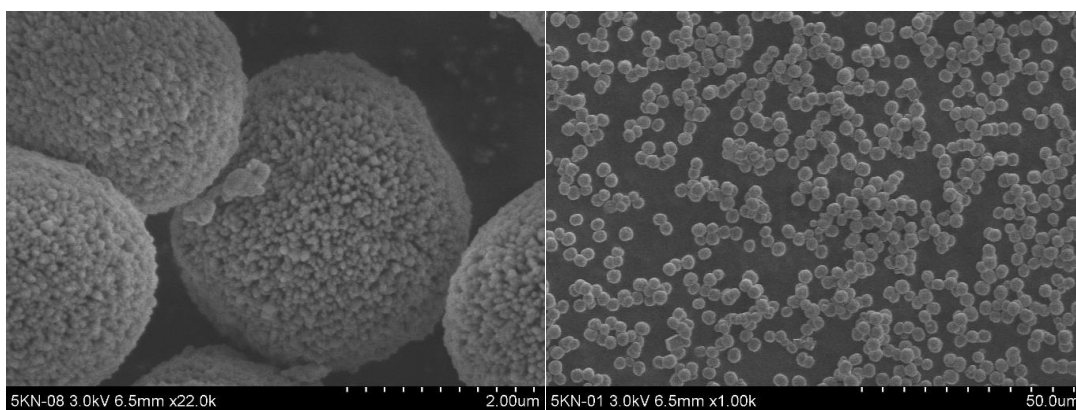
**Obr. 24** Snímky TEM pro vzorek kompozitního materiálu RB5a. Rozlišení snímků je 500 nm.



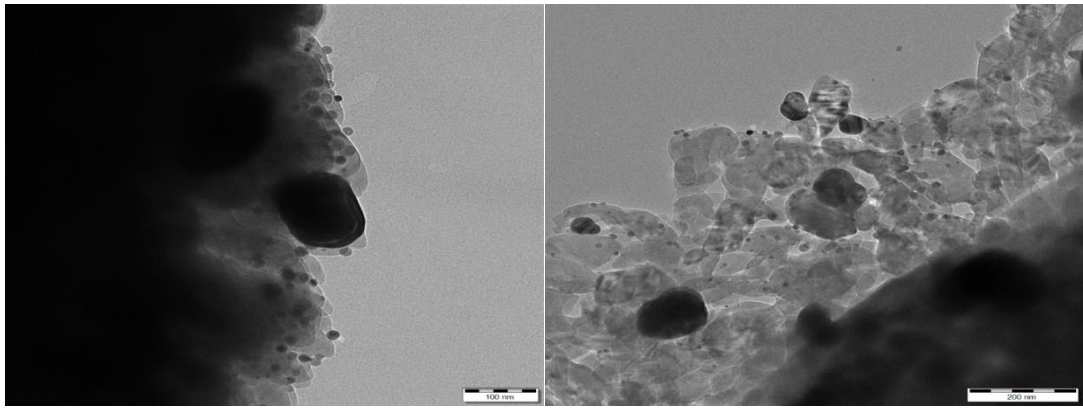
**Obr. 25** Snímky ze SEM pro vzorek kompozitního materiálu RB1b. Rozlišení snímku vlevo je 3 μm a snímku vpravo je 50 μm.



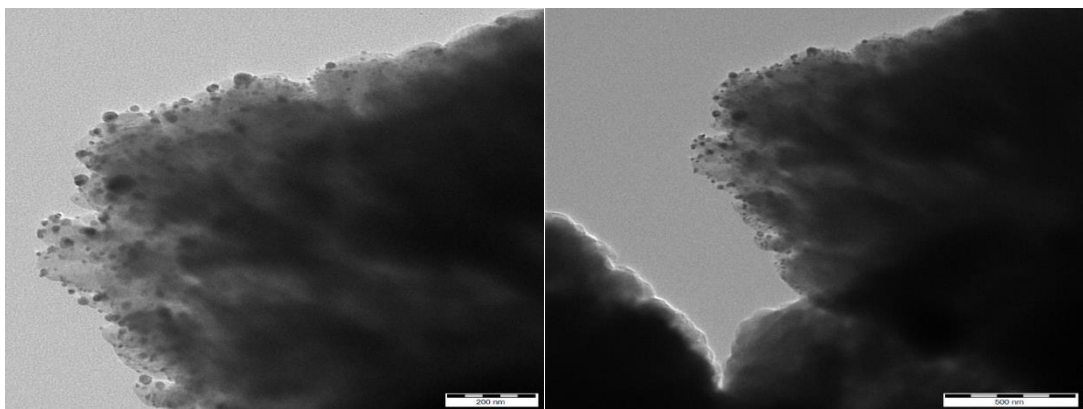
**Obr. 26** Snímky ze SEM pro vzorek kompozitního materiálu RB3b. Rozlišení snímku vlevo je 3 μm a snímku vpravo je 50 μm.



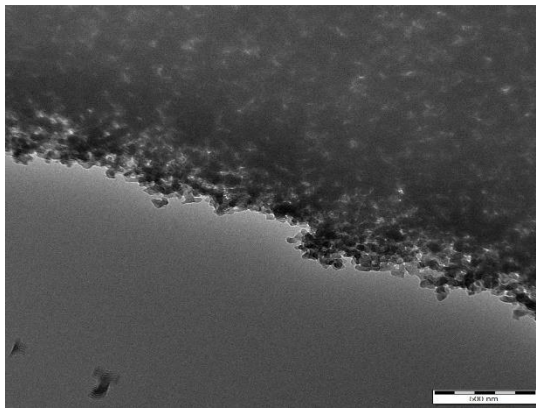
**Obr. 27** Snímky ze SEM pro vzorek kompozitního materiálu RB5b. Rozlišení snímku vlevo je 2 μm a snímku vpravo je 50 μm.



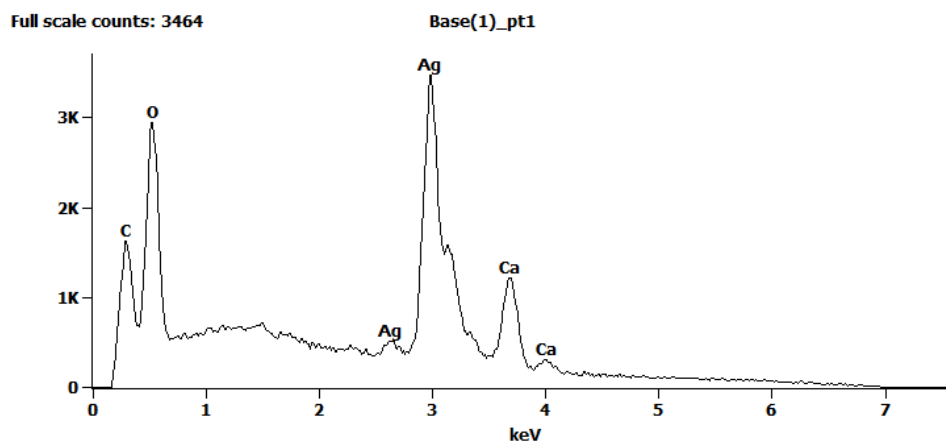
**Obr. 28** Snímky TEM pro vzorek kompozitního materiálu RB1b. Rozlišení snímku vlevo je 100 nm a snímku vpravo 200 nm.



**Obr. 29** Snímky z TEM pro vzorek kompozitního materiálu RB3b. Rozlišení snímku vlevo je 200 nm a snímku vpravo je 500 nm.



**Obr. 30** Snímek z TEM pro vzorek kompozitního materiálu RB5b. Rozlišení snímku je 500 nm.



Obr. 31 Vyhodnocení EDS analýzy pro vzorek RB3b.

AAS. Obsah stříbra byl vyhodnocen metodou atomové absorpční spektroskopie (AAS). Výsledné procentuální zastoupení nanočástic stříbra v kompozitech je shrnuto v Tab.5.

Tab. 5 Obsah stříbra v kompozitech nanoAg @CaCO<sub>3</sub>

Typ Ag @ CaCO <sub>3</sub>	Obsah Ag v kompozitech [%]
RB1a	0,345
RB3a	0,425
RB5a	0,330
RB1b	0,580
RB3b	0,580
RB5b	0,750

Mikročástečky CaCO<sub>3</sub>s nižším obsahem nanočástic stříbra, jedná se vzorky RB1a, RB3a, RB5a, nebyly využívány pro další měření a charakterizaci, jelikož na rozdíl od vzorků RB1b, RB3b a RB5b, nevykazovaly antibakteriální vlastnosti.

**Uvolňování nanočástic stříbra z kompozitního materiálu.** Uvolňování nanočástic stříbra z připravených kompozitů se testovalo v ultrazvukové lázni, kde byly kompozity RB1a, RB3a, RB5a, RB1b, RB3b a RB5b umístěny do Erlenmeyerových baněk a následně po dobu 15 minut vytřepávány do H<sub>2</sub>O. K tomuto účelu bylo použito 0,5 g jednotlivých kompozitů, které byly postupně rozdispergované v 150 ml H<sub>2</sub>O.

Uvolněný obsah nanočástic stříbra byl stanoven metodou AAS, přičemž jednotlivé vzorky byly vysušeny a následně rozpuštěny v roztoku H<sub>2</sub>O a HNO<sub>3</sub>. Procento uvolněných nanoAg bylo stanoveno na základě rozdílu mezi množstvím nanoAg

v původních kompozitech a mezi množstvím nanoAg v kompozitech po vytřepávání. Změna obsahu nanočástic stříbra v kompozitech je uvedena v Tab. 6.

**Tab. 6 Vytřepávání kompozitních materiálů**

Typ kompozitu	Ag v kompozitu bez vytřepávání (mg /1 g kompozitu)	Ag v kompozitu po vytřepávání (mg /1 g kompozitu)	Úbytek Ag (mg)	Úbytek Ag (%)
<b>RB1a</b>	3,450	2,563	0,887	25,7
<b>RB3a</b>	4,247	3,561	0,686	16,2
<b>RB5a</b>	3,322	2,830	0,492	14,8
<b>RB1b</b>	5,795	3,738	2,057	35,5
<b>RB3b</b>	5,780	4,299	1,481	25,6
<b>RB5b</b>	7,530	5,720	1,810	24,0

\*(5 mg kompozitu / 25 ml H<sub>2</sub>O s přísadkou 0,4 ml HNO<sub>3</sub>)

Z vytřepávání je patrné, že kompozitní materiály typu RB1a, RB3a, RB1b, RB3b uvolňovaly největší množství nanočástic stříbra, a to až z 35,5 %. Průměrný uvolňovaný obsah nanočástic stříbra se pohyboval okolo 25 %. Nanočástice stříbra byly nejsilněji ukotveny v kompozitech s kulovitými částicemi (RB5a, RB5b). Pravděpodobný důvod je usazení nanočástic stříbra v pórech mikročástic CaCO<sub>3</sub>. Obecně však u kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> s větším obsahem nanočástic stříbra došlo i k většímu uvolnění.

### 9.3 Příprava vrstev s kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub> na povrchu Ti slitiny

#### 9.3.1 Titanové destičky s kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub> sintrované na 500 °C

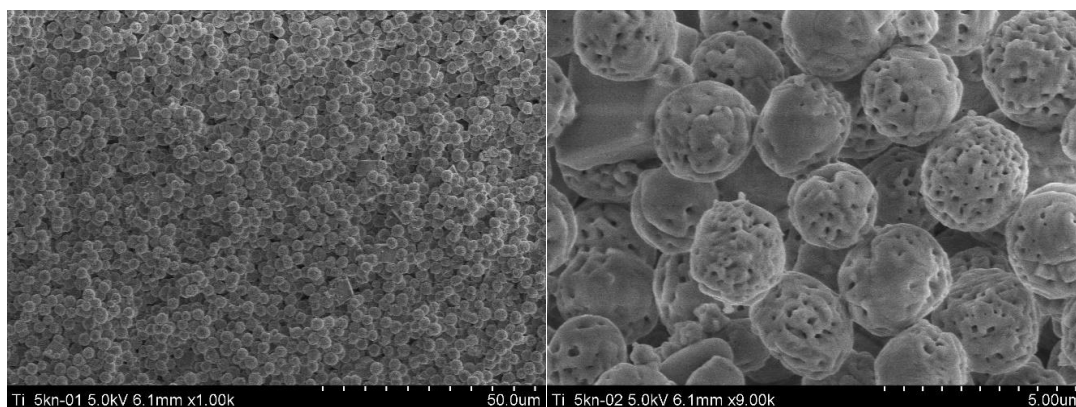
Uhličitan vápenatý a stejně tak i kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> není možné přichytit na titanový podklad bez dalších úprav. Nanesením metodou adsorpce z disperze (1 mg kompozitu/1 ml H<sub>2</sub>O) nedocílíme dostatečné mechanické odolnosti a vrstva kompozitního materiálu takřka ihned odpadá. Jednou z metod, která by mohla potenciálně sloužit ke zpevnění materiálu, je sintrování kompozitu při vysoké teplotě. Během experimentů bylo testováno sintrování při 300 °C, 400 °C, 500 °C a 600 °C. Doba zahřívání titanových destiček s kompozitním materiálem se pohybovala mezi 30–60



minutami. Nejlepší alternativou se ukázal experiment se sintrováním titanové destičky s kompozitem (RB1b, RB3b a RB5b) na teplotu 500 °C po dobu 60 minut. Vyšší teplota způsobovala odloupení celé vrstvy kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub> od titanového terčíku, a naopak nižší teploty neprokázaly dostatečnou mechanickou odolnost vůči seškrábnutí. Výsledkem byly titanové destičky s lehce nažloutlou vrstvou kompozitu, kterážto barva byla pravděpodobně způsobena nanočásticemi stříbra.

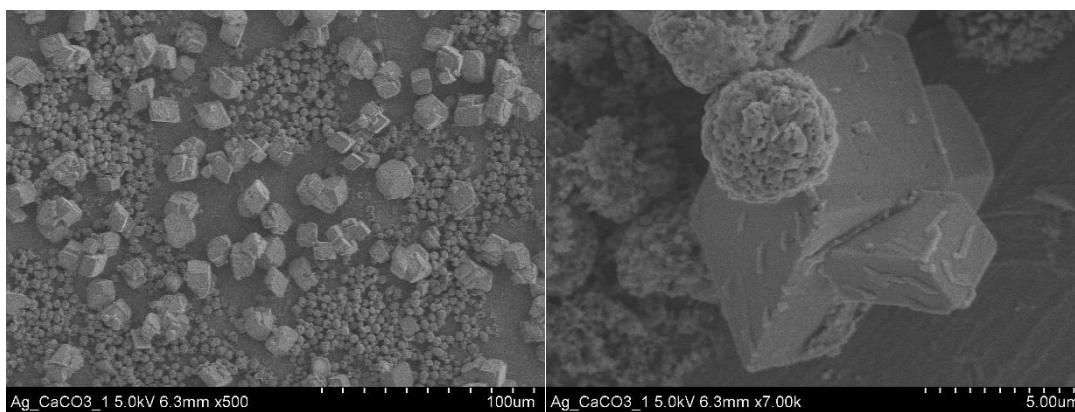
**SEM, EDS.** Snímky ze SEM poukázaly na změny mikročástic kompozitního materiálu během sintrování. Vlivem vysoké teploty (500 °C) došlo ke změně morfologie u mikročástic RB5b, z původně vysoce porézních kuliček proběhla přeměna na hladké sbalené koule s menší pórovitostí (Obr. 32). Důvodem je patrně teplota, která způsobila částečný rozklad CaCO<sub>3</sub>. U kompozitů typu RB1b a RB3b došlo k ještě výraznější změně morfologie. S narůstajícím obsahem etylenglykolu použitého při přípravě kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub> došlo při sintraci k postupné přeměně na kulovité mikročástice (Obr. 33), které se v případě kompozitu RB3b stávaly spíše dutými koulemi (Obr. 34). S ohledem na tvar mikročástic CaCO<sub>3</sub> je patrné, že kulovité mikročástice jsou stabilnější než částice ve tvaru krychlí. Příčinou může být i snaha o snížení povrchové energie.

Vyhodnocení z EDS potvrdilo přítomnost jak nanočástic stříbra, tak CaCO<sub>3</sub>. Ve spektru je vidět i pík Al, který je zastoupen v titanové slitině. Výsledné vzorové spektrum pro kompozit RB5b je zobrazeno na Obr. 35.

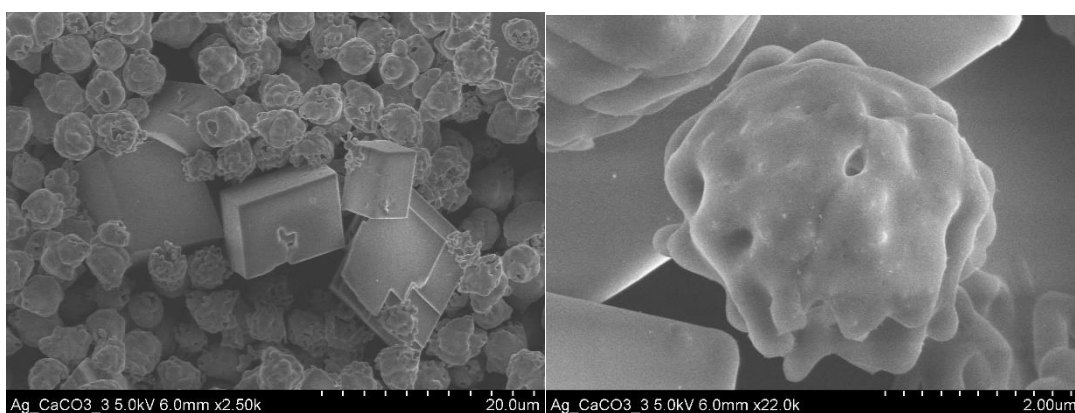


**Obr. 32** Snímky ze SEM pro kompozit RB5b, sintrovaný při teplotě 500 °C po dobu 60 min. Snímek vlevo s rozlišením 50 µm a snímek vpravo s rozlišením 5 µm.

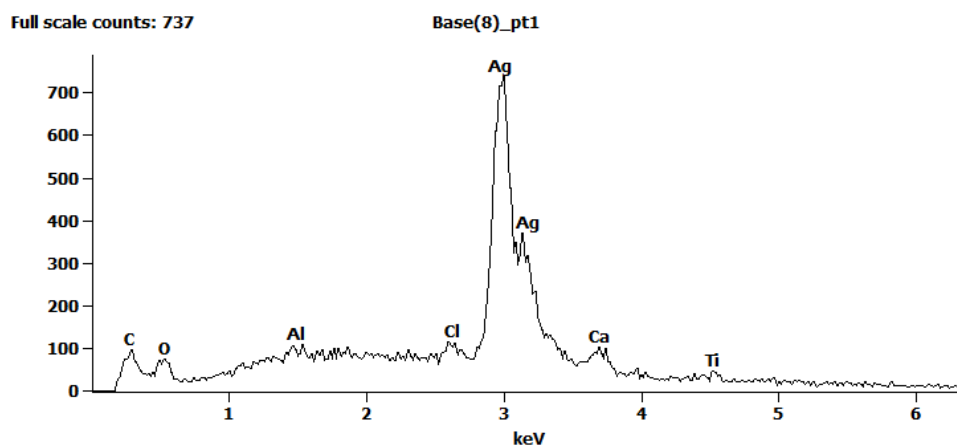




**Obr. 33** Snímky ze SEM pro kompozit RB1b sintrovaný na teplotu 500 °C po dobu 60 min. Snímek vlevo s rozlišením 100 μm a snímek vpravo s rozlišením 5 μm.



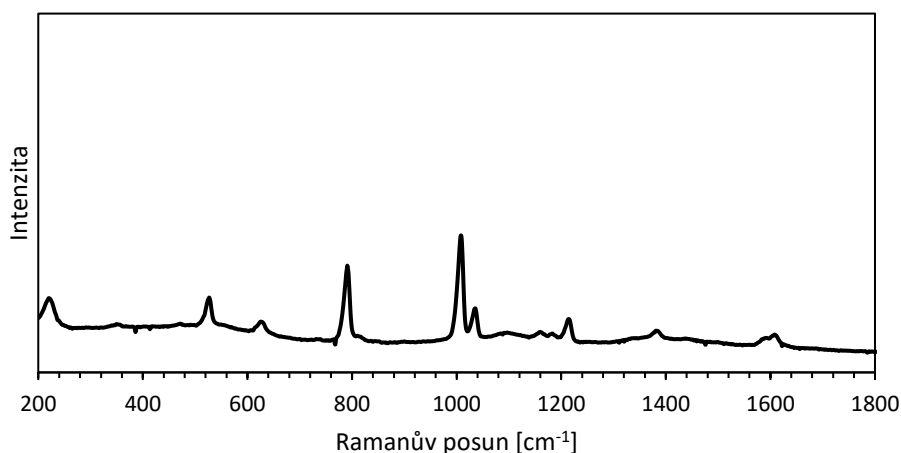
**Obr. 34** Snímky ze SEM pro kompozit RB3b sintrovaný na teplotu 500 °C po dobu 60 min. Snímek vlevo s rozlišením 20 μm a snímek vpravo s rozlišením 2 μm.



**Obr. 35** EDS titanové destičky s kompozitem RB5b po sintrování na teplotu 500 °C, po dobu 60 min.

### 9.3.2 Titanové destičky s PDMS a kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub>

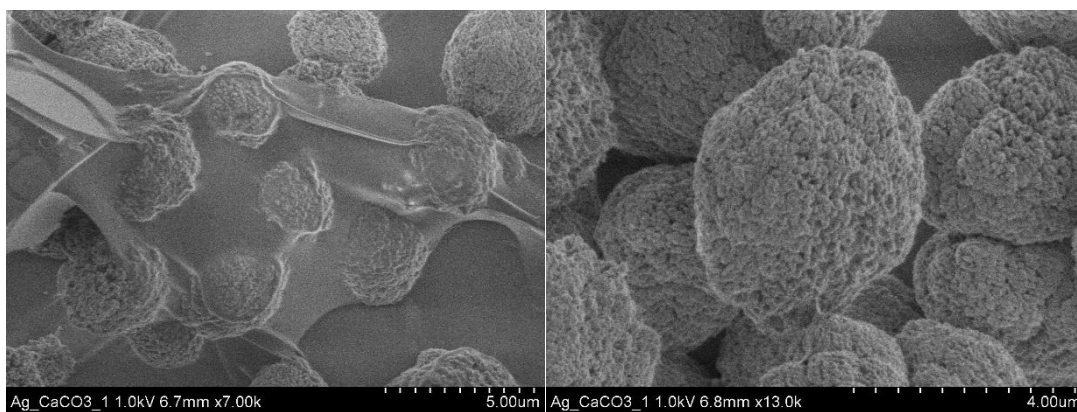
Další typickou možností, jak stabilizovat kompozitní materiál na titanové podložce je primární modifikace titanové podložky vhodným polymerem před nanosením kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub>. V našem případě se jednalo o poly(dimethylsiloxan) (PDMS). Tento polymer byl rovněž studován jako možný substrát k nanášení nanoAg s následnou aplikací v SERS, jelikož umožňuje pevné ukotvení nanočástic na vybrané podložce. [51] PDMS bylo připraveno na Ústavu makromolekulární chemie v Praze a jeho chemická identita byla potvrzena na základě Ramanovského spektra (Obr. 36).



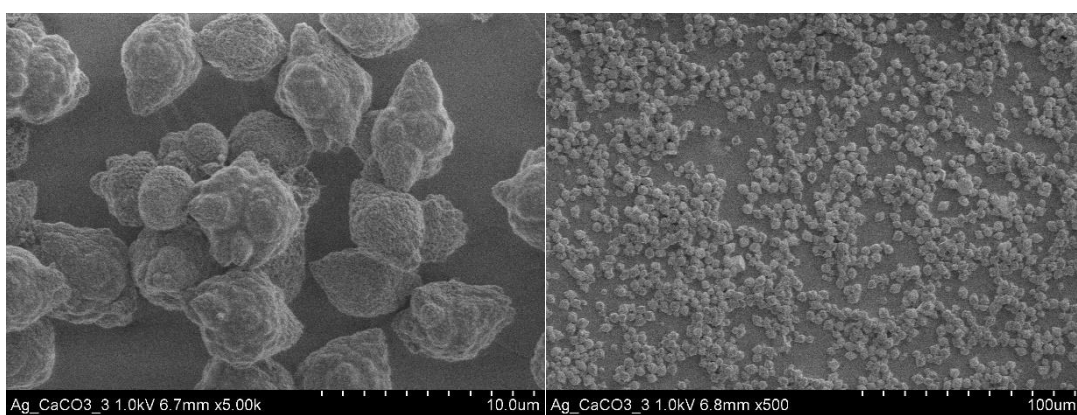
**Obr. 36** Spektrum z Ramanovy spektroskopie pro PDMS (2,5 mg/ml toluenu)

**SEM, EDS.** Vyhodnocením snímků ze SEM bylo zřejmé, že tento typ modifikace povrchu na rozdíl od sintrace, nepozměnil mikročástice kompozitního materiálu, z pohledu morfologie. Na snímcích je patrná přítomnost polymerního materiálu, který slouží jako adhezivum (Obr. 37, 38, 39). Přítomnost PDMS je nejvíce patrná na Obr. 37 v přítomnosti mikročástic kompozitu RB1b. Na rozdíl od vzorků připravených metodou sintrace na 500 °C, jsou patrné shluky mikročástic kompozitu a nerovnoměrné pokrytí povrchu. Nedošlo k vytvoření jedolité vrstvy na titanové podložce modifikované PDMS, nýbrž k tvorbě agregátů mikročástic kompozitu.

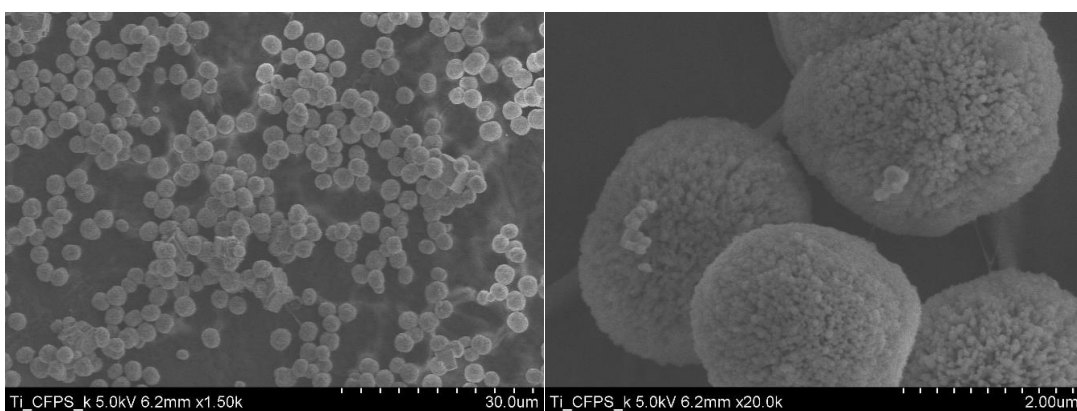
Spektrum z EDS potvrdilo přítomnost kompozitního materiálu i PDMS, který je zastoupen pod píkem charakterizující křemík. Z vyhodnocení bylo vybráno reprezentativní spektrum pro kompozitní materiál RB5b (Obr. 40).



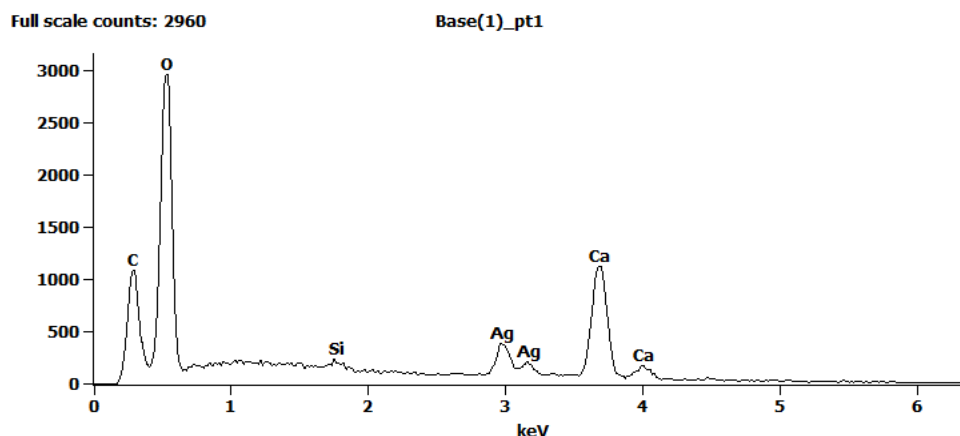
**Obr. 37** Snímky ze SEM pro vzorek RB1b, nanesený na PDMS. Snímek vlevo s rozlišením 5  $\mu\text{m}$  a snímek vpravo s rozlišením 4  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 38** Snímky ze SEM pro vzorek RB3b, nanesený na PDMS. Snímek vlevo s rozlišením 10  $\mu\text{m}$  a snímek vpravo s rozlišením 100  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 39** Snímky ze SEM pro vzorek RB5b, nanesený na PDMS. Snímek vlevo s rozlišením 30  $\mu\text{m}$  a snímek vpravo s rozlišením 2  $\mu\text{m}$ .



Obr. 40 EDS titanové destičky modifikované PDMS s kompozitem RB5b.

## 9.4 Antibakteriální aktivita

Antibakteriální vlastnosti byly otestovány metodou MIC vůči standardní sadě patogenních bakterií na Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc.

**Antibakteriální aktivita kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub>.** Pro testování antimikrobiální aktivity bylo shodně používána výchozí koncentrace 7 mg kompozitu/1 ml H<sub>2</sub>O. Výsledky provedených testů jsou shrnuty v Tab. 7. Antimikrobiální aktivitu vykazovaly všechny 3 typy kompozitních materiálů. Nejvýraznější antimikrobiální vlastnosti byly prokázány u kompozitního materiálu RB5b, který zároveň obsahoval největší množství nanočástic stříbra. Jednalo se o 0,75 hm. % stříbra v kompozitu. Příčinou této nejvyšší dosažené koncentrace nanoAg v kompozitu jsou porézní mikročástice CaCO<sub>3</sub>, které umožnily větší prostupnost nanoAg do struktury. I u antimikrobiální účinnosti lze zaznamenat trend, který se vyznačuje výraznějšími antibakteriálními vlastnostmi s ohledem na množství nanočástic stříbra v kompozitech. Spolu s kompozity nanoAg@CaCO<sub>3</sub> byl otestován i maltózový koloid s obsahem stříbra 108 mg/l. V porovnání s kompozity RB1b a RB3b vykazuje maltózový koloid vyšší antibakteriální vlastnosti. Naopak kompozit RB5b je v tomto ohledu srovnatelný a mnohdy účinnější než samotný maltózový koloid.

**Tab. 7 Antimikrobiální účinnost vzorků**

Měření	Maltózový koloid [mg/l]			RB1b [mg Ag/l]			RB3b [mg Ag/l]			RB5b [mg Ag/l]		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
1.	54	27	27	-	20,7	-	20,7	20,7	-	13,4	26,9	-
2.	13,5	3,4	1,7	-	-	-	20,7	20,7	-	13,4	13,4	26,9
3.												
4.	6,8	3,4	3,4	-	-	-	-	-	-	13,4	6,7	6,7
5.	3,4	1,7	1,7	-	-	-	-	-	-	13,4	6,7	6,7
6.	27	27	13,5	20,7	20,7	10,3	-	20,7	10,3	13,4	6,7	13,4
7.	27	27	13,5	-	10,3	10,3	10,3	10,3	10,3	6,7	1,7	6,7
8.	27	27	27	-	-	-	-	-	-	26,9	13,4	13,4
9.	13,5	13,5	27	10,3	20,7	-	20,7	20,7	-	13,4	26,9	26,9
10.	13,5	13,5	13,5	-	-	-	-	-	-	-	26,9	26,9

1. *Enterococcus faecalis* CCM 4224

2. *staphylococcus aureus* CCM 3953

3. *Escherichia coli* CCM 3954

4. *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

5. *Pseudomonas aeruginosa* (532)

6. *Staphylococcus epidermidis* 1 (879)

7. *Staphylococcus epidermidis* 2 (901)

8. *Staphylococcus aureus* (MRSA) (4591)

9. *Enterococcus faecium* (VRE) (1324)

10. *Klebsiella pneumoniae* (ESBL) (2486)

**Antibakteriální aktivita titanové destičky s kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub> sintrované na 500 °C.** Antibakteriální účinnost byla otestována proti kolonii bakterií *E. coli*. Avšak vytvořené titanové terčíky s kompozity (RB1b, RB3b a RB5b) se nedaly plně otestovat, jelikož po namočení terčíku do bujónu došlo k uvolnění vrstvy kompozitu (RB1b, RB3b a RB5b) z jeho povrchu. Z tohoto důvodu tato úprava není vhodná pro biomedicínské aplikace, protože nevykazuje požadovanou soudržnost s upraveným povrchem.

**Antibakteriální aktivita titanové destičky s PDMS a kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub>.** Antibakteriální aktivita titanových destiček s pokrytím PDMS a kompozitem 1kn, 3kn, 5kn, byla testována na bakterii *E. coli*. Sterilizace připraveného titanového terčíku byla uskutečněna oplachem 72 % etanolem. Inkubace bakterií probíhala při 35 °C/24 hodin ve vlhké komoře. Výsledky prokázaly, že připravené titanové terčíky vykazují vysokou antibakteriální aktivitu proti bakterii *E. coli* (Tab. 8). Spolu s titanovými terčíky s kompozitními materiály byl otestován i terčík s nanočásticemi stříbra, které byly taktéž uchyceny pomocí polymeru PDMS. Nanočástice stříbra použité k tomuto účelu byly připraveny modifikovanou Tollensovou reakcí za použití redukčního činidla, maltózy. Výsledky prokázaly shodnou antibakteriální aktivitu jako v případě terčíků s kompozitními materiály (Tab. 8) Oproti

titanovým terčikům, které byly upraveny sintrací kompozitu na teplotu 500 °C, je tento způsob ukotvení kompozitu na povrchu kovového materiálu vhodný pro biomedicínské aplikace, protože vrstva v tomto případě odolává testovacím podmínkám a vykazuje požadovanou antibakterialitu.

**Tab. 8** Vyhodnocení antimikrobiální účinnosti pro titanové destičky pokryté PDMS s kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub> (RB1b, RB3b a RB5b)

TEST na bakterii <i>E.coli</i>				
Čas [hod]	Označení	Cfu/cm <sup>2</sup>	log cfu/cm <sup>2</sup>	R
0	PS povrch (kontrola)	10000	4	
24	PS povrch (kontrola)	344000	5,54	
	Ti PDMS RB1b	2	0,30	5,24
	Ti PDMS RB3b	2	0,30	5,24
	Ti PDMS RB5b	2	0,30	5,24
	Ti PDMS+nanoAg	2	0,30	5,24

\* Cfu/ cm<sup>2</sup>... počet kolonií po kultivaci na cm<sup>2</sup>

\* R... antibakteriální aktivita dle ISO 22196

## 9.5 Ramanova spektroskopie

Kompozitní materiály připravené sorpční (S1, S3, S5) a redukční metodou (RM1a, RM1b, RM1c, RB5a, RB5b, RB5c) byly testovány jako potencionální substráty pro povrchově zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS). K tomuto účelu byl použitý jako modelový analyt adenin, který byl testován v koncentracích 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-5</sup> M a 10<sup>-7</sup> M.

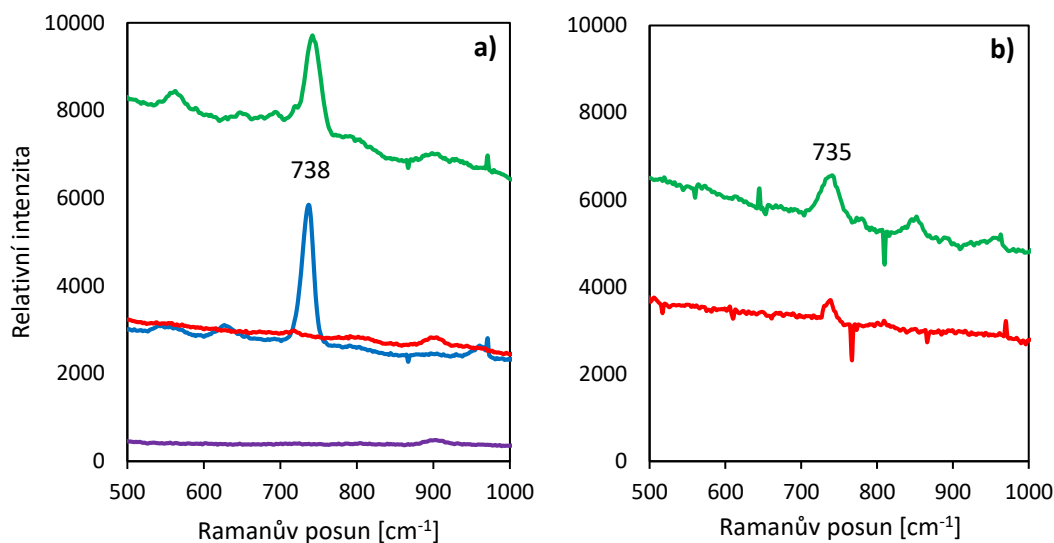
Jelikož jsou kompozitní materiály v práškovém stavu, který rychle v disperzi sedimentuje, byla zvolena metoda měření na tenké vrstvě tvořené kompozitem. Pro tuto metodu je podstatné vytvoření rovinné vrstvy materiálu, které bylo dosaženo několika způsoby.

**Měření na kapkovacích destičkách.** Jednou z možností, jak vytvořit tenkou, jednolitou vrstvu kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> bylo vysušení kompozitního materiálu z disperze (100 mg kompozitu/0,5 ml H<sub>2</sub>O). Jako substrát pro kompozitní materiál byla využita skleněná kapkovácí destička. Po nanesení disperze kompozitního materiálu, byla

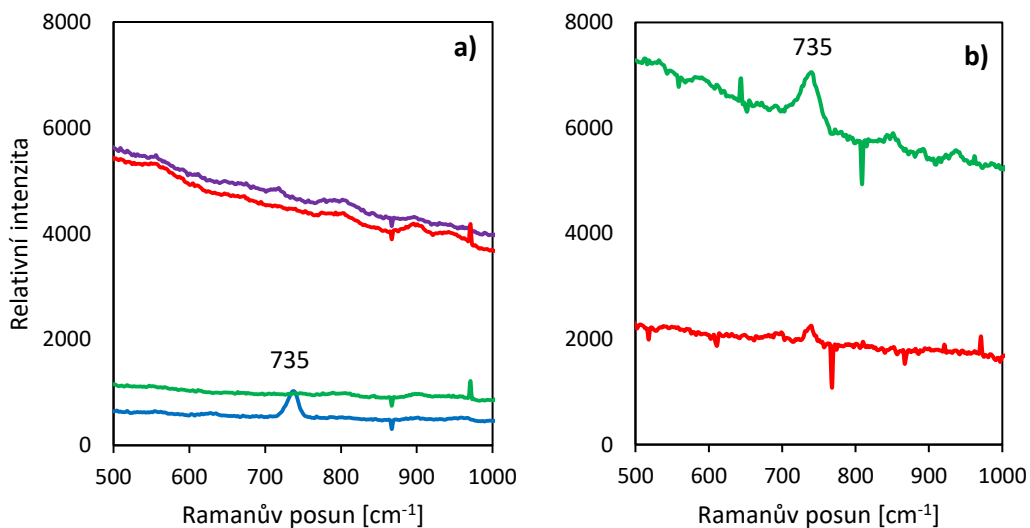
kapkovací destička umístěna do sušárny, kde byl kompozit vysušen při teplotě 100 °C. Díky tomu vznikla hladká vrstva kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub>. Na vysušený substrát byla nanášena kapka roztoku adeninu (10 μl) o zmíněných koncentracích. Provedená měření ukázala využitelnost takto připraveného substrátu pouze pro roztok adeninu o nejvyšší použité koncentraci 10<sup>-3</sup> M. Obecně nejsilněji zesilovaly signál kompozity připravené redukční metodou, které obsahovaly největší podíl nanočástic stříbra.

Další měření bylo provedeno s přidavkem 50 mM NaCl (10 μl) ke kompozitu, který aktivuje nanoAg. Měření probíhalo 10 min po aktivaci kompozitního materiálu roztokem NaCl za využití roztoků adeninu o koncentraci 10<sup>-5</sup> M a 10<sup>-7</sup> M. Měření spekter se uskutečnilo 3 minuty po nanesení adeninu.

U vzorků připravených sorpční i redukční metodou došlo v některých případech k zesílení Ramanova signálu i při nižších koncentracích adeninu, než to bylo v případě kompozitů bez aktivace NaCl. U kompozitů RM1a a RM1b se dokonce objevil paradoxní výsledek, kdy byl ve spektrech pozorován zřetelný signál pocházející od adeninu pouze v případě použití roztoku o koncentraci adeninu 10<sup>-7</sup> M a ne u roztoku o koncentraci 10<sup>-5</sup> M. Tento jev souvisí pravděpodobně s pokrytím povrchu nanočástic stříbra adeninem a s jeho saturací při vyšších koncentracích než 10<sup>-7</sup> M. Vzhledem k tomu že kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> obsahuje nízké koncentrace nanoAg je tato možnost velice pravděpodobná, navíc při rekrystalizaci pomocí NaCl dochází ke zvětšení částic a tím pádem ke zmenšení celkového povrchu. Tento jev poklesu signálu při přesycení povrchu analytem byl pozorován již dříve Ing. Marcelou Dendisovou, která potvrdila souvislost poklesu Ramanova signálu s nasycením povrchu, a tedy nemožností dalšího zesílení. [57] V případě spekter pro získaných s kompozity RM1c a RM5c při aktivaci s NaCl došlo k výraznému poklesu Ramanova signálu a zašumění spekter, což velmi pravděpodobně souvisí s nízkým obsahem stříbra v těchto kompozitech (méně než 1 hm.%).

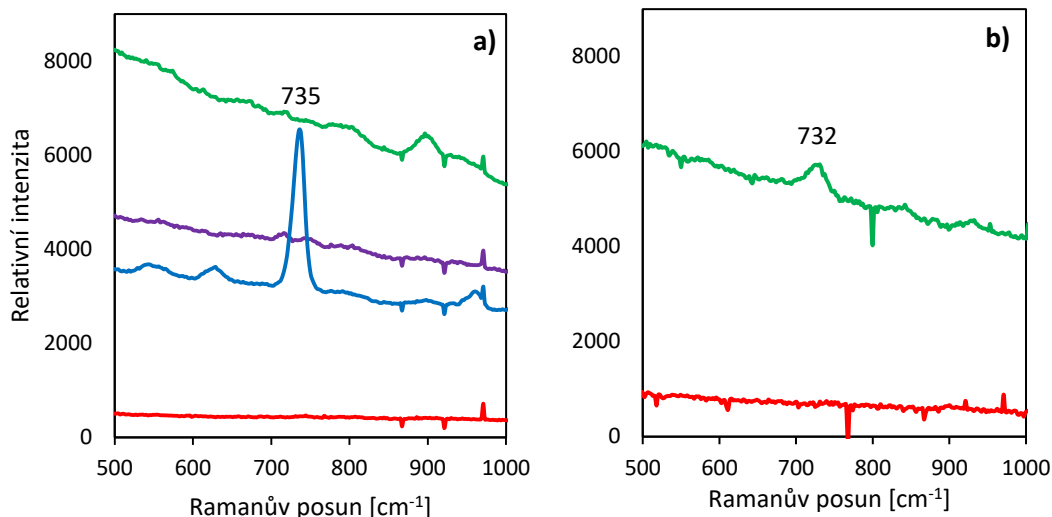


**Obr. 41** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **S1**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci  $10^{-3}$  M (modrá),  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). V oblasti 734-738  $\text{cm}^{-1}$  je viditelný charakteristický pík adeninu.

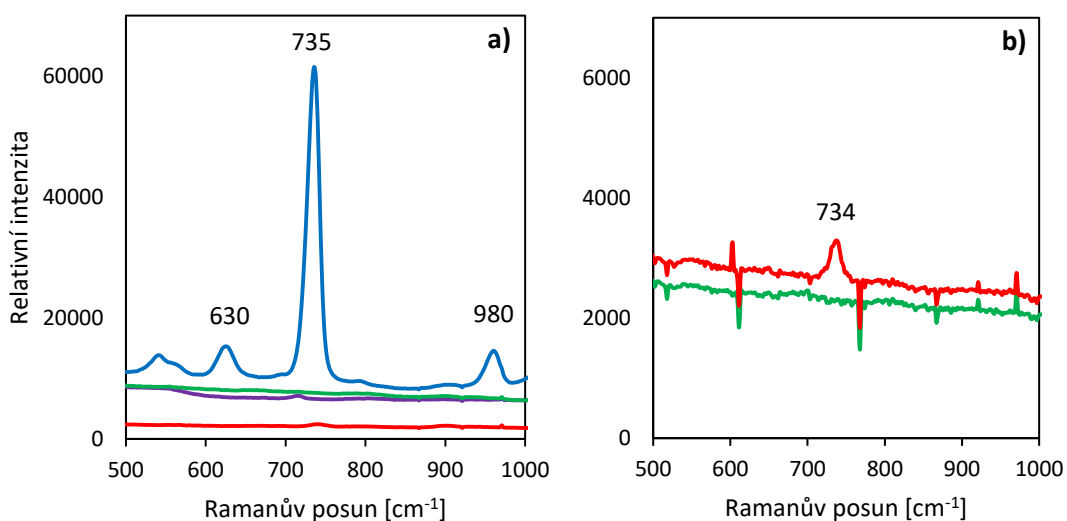


**Obr. 42** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **S3**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci  $10^{-3}$  M (modrá),  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). V oblasti 734-738  $\text{cm}^{-1}$  je viditelný charakteristický pík adeninu.

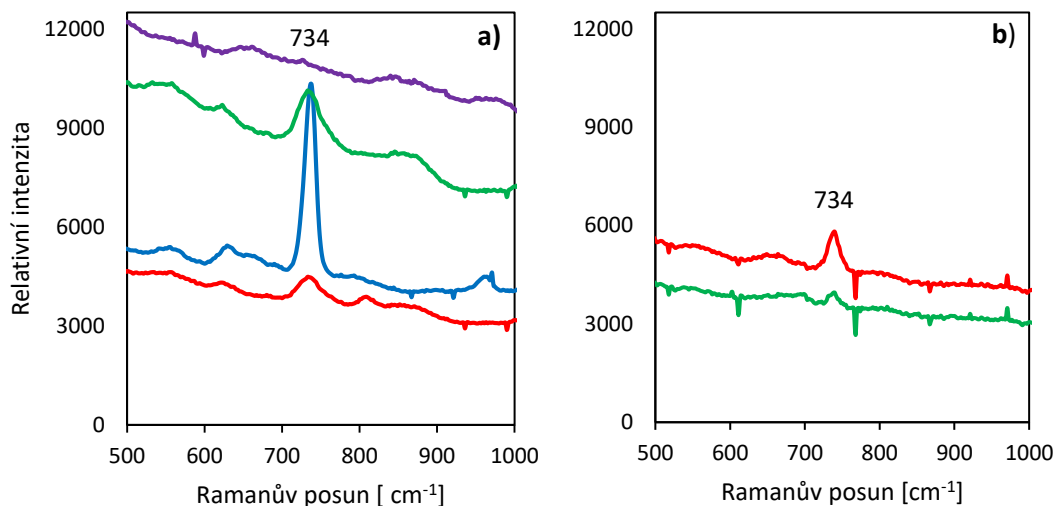




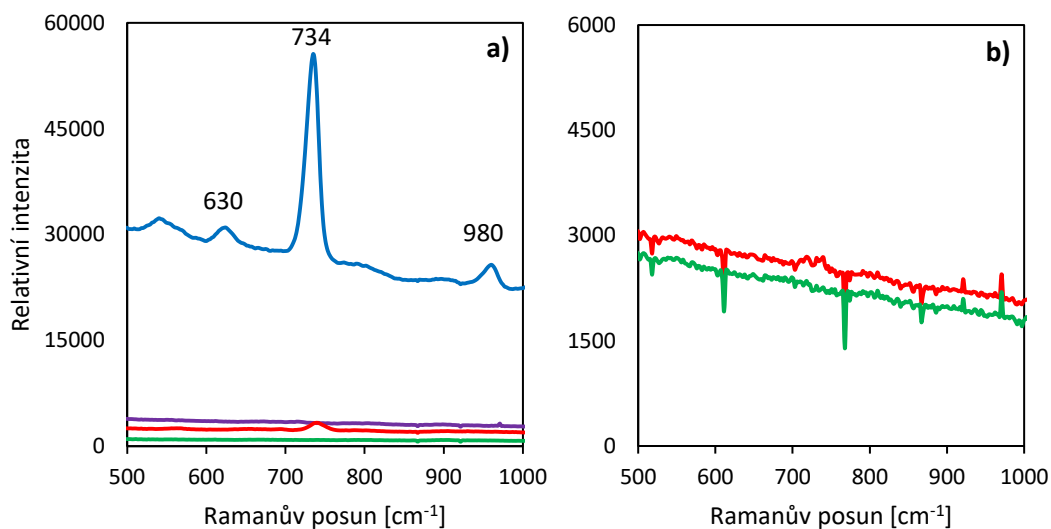
**Obr. 43** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **S5**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci  $10^{-3}$  M (modrá),  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). V oblasti 734-738  $\text{cm}^{-1}$  je viditelný charakteristický pík adeninu.



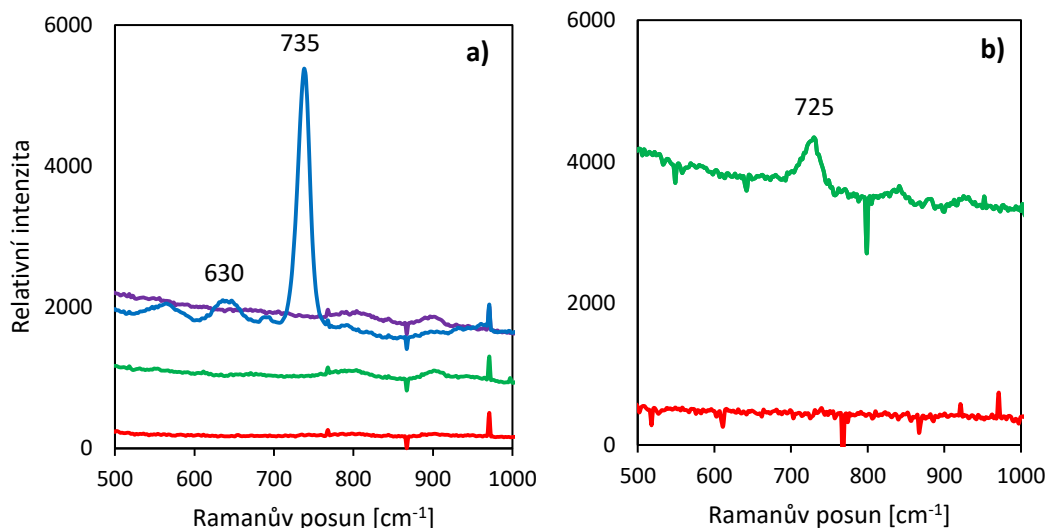
**Obr. 44** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **RM1a**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci  $10^{-3}$  M (modrá),  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). V oblasti 734-738  $\text{cm}^{-1}$  je viditelný charakteristický pík adeninu. Pík v oblasti  $\sim 630$   $\text{cm}^{-1}$  je také od adeninu. Pík v oblasti  $\sim 980$   $\text{cm}^{-1}$  je způsobený výskytem  $\text{CaCO}_3$ .



**Obr. 45** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **RM1b**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci  $10^{-3}$  M (modrá),  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená).  
V oblasti  $734\text{--}738\text{ cm}^{-1}$  je viditelný charakteristický pík adeninu.

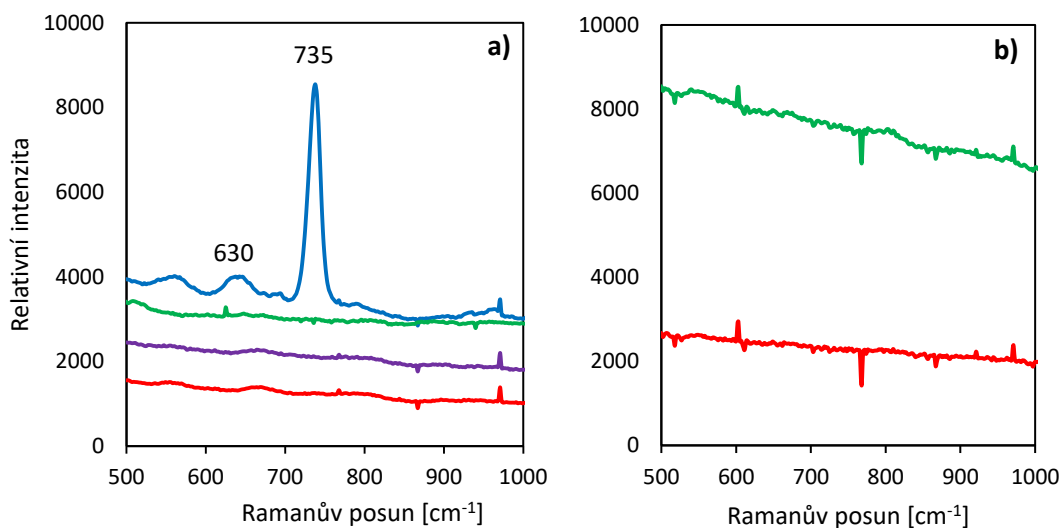


**Obr. 46** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **RM1c**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci  $10^{-3}$  M (modrá),  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená).  
V oblasti  $734\text{--}738\text{ cm}^{-1}$  je viditelný charakteristický pík adeninu. Pík v oblasti  $\sim 630\text{ cm}^{-1}$  je taktéž od adeninu. Pík v oblasti  $\sim 980\text{ cm}^{-1}$  je způsobený výskytem  $\text{CaCO}_3$ .

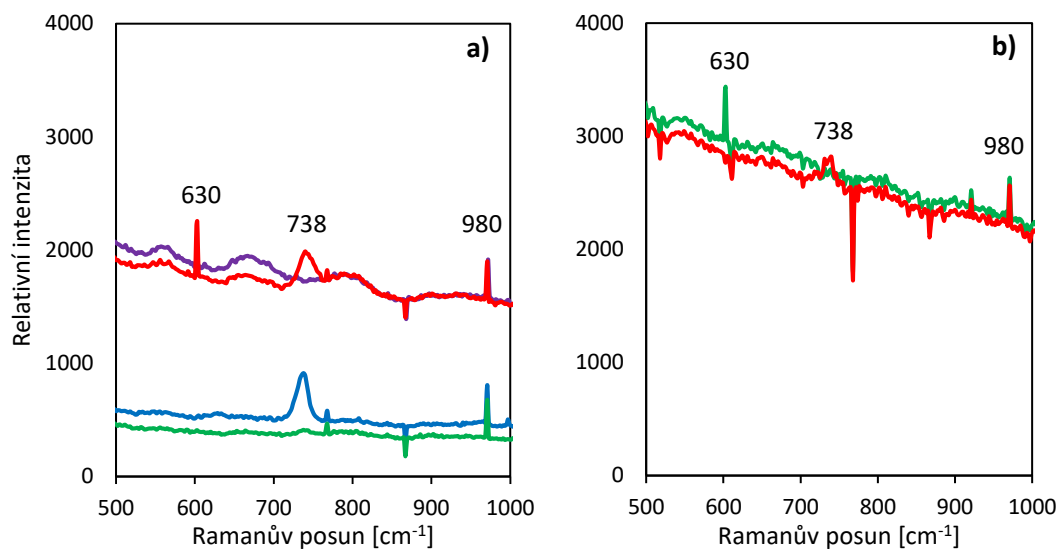


**Obr. 47** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **RM5a**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci 10<sup>-3</sup> M (modrá), 10<sup>-5</sup> M (zelená) a 10<sup>-7</sup> M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci 10<sup>-5</sup> M (zelená) a 10<sup>-7</sup> M (červená). V oblasti 734-738 cm<sup>-1</sup> je viditelný charakteristický pík adeninu. Pík v oblasti ~630 cm<sup>-1</sup> je taktéž od adeninu. V případě přídavku NaCl se charakteristický pík adeninu posunul o ~ 10 cm<sup>-1</sup>

1.



**Obr. 48** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **RM5b**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci 10<sup>-3</sup> M (modrá), 10<sup>-5</sup> M (zelená) a 10<sup>-7</sup> M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci 10<sup>-5</sup> M (zelená) a 10<sup>-7</sup> M (červená). V oblasti 734-738 cm<sup>-1</sup> je viditelný charakteristický pík adeninu. Pík v oblasti ~630 cm<sup>-1</sup> je taktéž od adeninu.



**Obr. 49** Zesílení signálu adeninu pro vzorek **RM5c**. **Graf a)** Příprava na kapkovací destičce bez přídavku NaCl. Čistý kompozit bez přídavku adeninu (fialová) a roztoky adeninu o koncentraci  $10^{-3}$  M (modrá),  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). **Graf b)** Příprava na kapkovací destičce s přídavkem NaCl. Roztoky o koncentraci  $10^{-5}$  M (zelená) a  $10^{-7}$  M (červená). V oblasti  $734-738\text{ cm}^{-1}$  je viditelný charakteristický pík adeninu. Pík v oblasti  $\sim 630\text{ cm}^{-1}$  je také od adeninu. Pík v oblasti  $\sim 980\text{ cm}^{-1}$  je způsobený výskytem  $\text{CaCO}_3$ .

## 10 Závěr

V práci byla pozornost soustředěna zejména na tvorbu, modifikaci a fixaci kompozitního materiálu nanoAg@CaCO<sub>3</sub> na titanovou destičku, která zde zastupuje titanovou kostní náhradu. Povrch titanové destičky byl pro přípravu bioaktivní vrstvy modifikován dvěma způsoby, a to polymerem PDMS a sintrováním na 500 °C. Oba tyto postupy mají potencionálně zvýšit mechanickou odolnost a zafixovat kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> na titanové destičce. Současně byla otestována aktivita kompozitů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> pro metodu SERS, jelikož obsažené nanoAg v kompozitu jsou schopny zesilovat spektroskopický signál. Je tedy možné předpokládat, že kompozitní materiály s obsahem nanoAg mohou posloužit jako potencionální substráty pro metodu SERS.

V první fázi byla testována nejvhodnější varianta přípravy definovaných mikročastic CaCO<sub>3</sub> a jejich kompozitu s nanoAg. Na základě toho byly připraveny kompozitní materiály s rozdílnou morfologií a obsahem nanoAg. Testování prokázalo, že všechny takto připravené kompozity vykazují antibakteriální aktivitu. Kompozity nanoAg@CaCO<sub>3</sub> byly následně fixovány na pevný substrát (titanovou destičku), přičemž byly použity 2 způsoby ukotvení. Prvním z nich byla modifikace titanové destičky polymerem s následným přilnutím kompozitního materiálu, a v druhém případě došlo k sintraci kompozitu na titanové destičce při vysoké teplotě (500 °C). Při sintrování došlo k částečné změně morfologie u mikročastic CaCO<sub>3</sub>, u kterých byl pravděpodobně stabilnější kulovitý tvar. Z pohledu pokrytí povrchu titanové destičky kompozitem bylo zřejmé, že zatímco u sintrování kompozit nanoAg@CaCO<sub>3</sub> pokryl celý povrch titanové destičky, u modifikace polymerem PDMS došlo k tvorbě agregátů mikročastic kompozitu a povrch nebyl zcela homogenně pokrytý. U výsledných titanových destiček modifikovaných kompozitem nanoAg@CaCO<sub>3</sub> byla testována antibakteriální aktivita vrstvy kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub>. Metoda sintrace se kvůli malé mechanické odolnosti vrstvy ukázala jako nepoužitelná, zatímco vrstvy připravené s pomocí polymeru PDMS vykazaly dostatečnou mechanickou odolnost a vysokou antibakteriální aktivitu.

V druhé fázi experimentální práce byly připraveny kompozitní materiály nanoAg@CaCO<sub>3</sub> za účelem testování jejich využitelnosti v Ramanově spektroskopii. V tomto případě bylo připraveno 9 kompozitních materiálů nanoAg@CaCO<sub>3</sub> s odlišným typem přípravy, obsahem nanoAg a tvarem mikročastic CaCO<sub>3</sub>. Obsah nanoAg se pohyboval od 0,25-3 % v kompozitu s ohledem na způsob přípravy, přičemž byly

testovány metody volné sorpce nanoAg na mikročástice CaCO<sub>3</sub> a metoda přímé redukce, kdy byly částice nanoAg vyredukovány přímo v prostředí mikročástic CaCO<sub>3</sub>. Kompozity nanoAg@CaCO<sub>3</sub> byly upraveny mnoha způsoby, avšak jako nejefektivnější způsob se ukázalo nanášení kompozitu do kapkovací destičky, která po vysušení zajistila hladký povrch vrstvy kompozitu. Výsledky prokázaly výrazné zesílení signálu modelového analytu adeninu v roztocích o koncentraci 10<sup>-3</sup> M a v některých případech kompozitů aktivovaných NaCl i pro koncentraci 10<sup>-7</sup> M.

Se zřetelem na získané experimentální výsledky bylo prokázáno, že k potencionálnímu využití v oblastech medicínských aplikací je nejvhodnější využít titanovou destičku s modifikací polymerem PDMS a následnou fixací kompozitu nanoAg@CaCO<sub>3</sub>, jelikož tato vrstva vykazuje vysokou antibakteriální účinnost vůči testovanému patogenním bakteriím. Výsledky z testování připravených kompozitů jako substrátů pro SERS ukazují na zesílení signálu modelového analytu adeninu po vhodné úpravě (aktivace NaCl) i při velmi nízké koncentraci analytu (10<sup>-7</sup> M), takže připravené kompozity mají potenciál pro využití i v oblasti SERS.

## 11 Summary

At work, attention was focused mainly on the formation, modification and fixation of the composite material nanoAg@CaCO<sub>3</sub> on the titanium plate, which represents the titanium bone replacement. The surface of the titanium plate was modified for the bioactive layer preparation in two ways, namely PDMS polymer and sintering at 500 ° C. Both of these procedures potentially increase mechanical resistance and fix the nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite on the titanium plate. At the same time, the activity of the nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composites for the SERS method was tested, since the contained nanoAg in the composite are capable of amplifying the spectroscopic signal. It is therefore possible to assume that nanoAg composite materials can serve as potential substrates for the SERS method.

In the first phase, the most suitable variant of preparation of the defined CaCO<sub>3</sub> microparticles and their nanoAg composite was tested. Based on this, composite materials with different morphology and nanoAg content were prepared. Testing has shown that all of the composites thus prepared exhibit antibacterial activity. The nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composites were then fixed to a solid substrate (titanium plate) using 2 anchoring methods. The first of these was the modification of the titanium plate with a polymer followed by adhesion of the composite material, and in the latter case, the titanium plate was sintered on the titanium plate at a high temperature (500 ° C). During sintering there was a partial change in the morphology of CaCO<sub>3</sub> microparticles, which were probably more stable in spherical shape. From the surface coating of the titanium plate, it was clear that while sintering the nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite covered the entire surface of the titanium plate, PDMS polymer modification produced aggregates of microparticles of composites and the surface was not completely homogeneous. The antibacterial activity of the nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite layer were tested for the resulting titanium plates modified with the nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite. The sinteration method, due to the low mechanical resistance of the layer, proved to be unusable, whereas the PDMS-polymerised layers showed sufficient mechanical resistance and high antibacterial activity.

In the second phase of experimental work, nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite materials were prepared to test their usability in Raman spectroscopy. In this case, nine composites of nanoAg@CaCO<sub>3</sub> were prepared with a different type of preparation, nanoAg content and different type of CaCO<sub>3</sub> microparticles. The nanoAg content varied from

0.25-3 % in the composite with respect to the preparation method, free nanoAg sorption methods were used for the CaCO<sub>3</sub> microparticles and the direct reduction method where the nanoAg particles were reduced directly in the CaCO<sub>3</sub> microparticles. The nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composites have been modified in many ways, but the most efficient method has been to apply the composite to a dropping plate that after drying has ensured a smooth surface of the composite layer. The results showed a marked amplification of the adenine model analyte signal in 10<sup>-3</sup> M solution and, in some cases, NaCl-activated composites even at a concentration of 10<sup>-7</sup> M.

Taking into account the experimental results obtained, it has been shown that the use of the titanium plate with PDMS polymer modification and the subsequent fixation of the nanoAg@CaCO<sub>3</sub> composite is most likely to be used in the medical applications, as this layer exhibits high antibacterial activity against the pathogenic bacteria tested. The results of testing the prepared composites as substrates for SERS show the signal strength of the adenine model analyte after appropriate treatment (NaCl activation) even at a very low concentration of analyte (10<sup>-7</sup> M) so that the prepared composites have potential for use in the SERS region as well.



## 12 REFERENCE

- [1] KUBÍNEK, Roman a Vendula STRÁNSKÁ. *Úvod do problematiky nanotechnologií* [online]. B.m.: Univerzita Palackého v Olomouci. Dostupné z: <http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>
- [2] CBDB.CZ. *Úvod do nanovědy a nanotechnologií (Lucie Kolářová) | Detail knihy / CBDB.cz* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://www.cbdb.cz/kniha-142099-uvod-do-nanovedy-a-nanotechnologii-uvod-do-nanovedy-a-nanotechnologii>
- [3] KUBÍNEK, Roman. *Nanotechnologie a jejich aplikace* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2010. Dostupné z: <http://www.upol.cz/fakulty/prf/struktura/katedry-a-pracoviste/katedra-experimentalni-fyziky>
- [4] CBDB.CZ. *Nanotechnologie a jejich aplikace v elektronice (Roman Kubínek, Milan Vůjtek) | Detail knihy / CBDB.cz* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://www.cbdb.cz/kniha-141724-nanotechnologie-a-jejich-aplikace-v-elektronice-nanotechnologie-a-jejich-aplikace-v-elektronice>
- [5] KUBÍNEK, Roman. *Jak měřit „NANO“ Nástroje pro měření a vyhodnocování nanostruktur* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2010. 1. ISBN 978-80-244-2689-1. Dostupné z: [https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/merit\\_nano.pdf](https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/merit_nano.pdf)
- [6] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [7] HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. B.m.: České vysoké učení technické, 2011. ISBN 978-80-01-04555-8.
- [8] *Od sazí k nanotrubičkám a ještě kousek dál...* [online]. [vid. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/2409165/>
- [9] *Kovové nanomateriály pro praxi - PDF* [online]. [vid. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/3079307-Kovove-nanomaterialy-pro-praxi.html>
- [10] *Cvičení ze základů nanomateriálové chemie (CZNMC) | Katedra fyzikální chemie* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/vyuka/cviceni-ze-zakladu-nanomaterialove-chemie-cznmc/>
- [11] PENDLETON, Jack N., Sean P. GORMAN a Brendan F. GILMORE. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [online]. 2013, **11**(3), 297–308. ISSN 1478-7210. Dostupné z: doi:10.1586/eri.13.12
- [12] MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A., N. NIÑO-MARTÍNEZ, F. MARTÍNEZ-GUTIERREZ, J. R. MARTÍNEZ-MENDOZA a Facundo RUIZ. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of*

*Nanoparticle Research* [online]. 2008, **10**(8), 1343–1348. ISSN 1388-0764, 1572-896X. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-008-9428-6

- [13] PANÁČEK, Aleš, Monika SMÉKALOVÁ, Martina KILIANOVÁ, Robert PRUCEK, Kateřina BOGDANOVÁ, Renata VEČEŘOVÁ, Milan KOLÁŘ, Markéta HAVRDOVÁ, Grażyna Anna PŁAZA, Joanna CHOJNIAK, Radek ZBOŘIL a Libor KVÍTEK. Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* [online]. 2015, **21**(1), 26. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21010026
- [14] PANÁČEK, Aleš, Monika SMÉKALOVÁ, Renata VEČEŘOVÁ, Kateřina BOGDANOVÁ, Magdaléna RÖDEROVÁ, Milan KOLÁŘ, Martina KILIANOVÁ, Šárka HRADILOVÁ, Jens P. FRONING, Markéta HAVRDOVÁ, Robert PRUCEK, Radek ZBOŘIL a Libor KVÍTEK. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* [online]. 2016, **142**, 392–399. ISSN 1873-4367. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.007
- [15] MIJNENDONCKX, Kristel, Natalie LEYS, Jacques MAHILLON, Simon SILVER a Rob VAN HOUDT. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* [online]. 2013, **26**(4), 609–621. ISSN 1572-8773. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-013-9645-z
- [16] VEČEŘOVÁ, Renata. Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2016, **30**(3), 18–20. ISSN 1803-5353.
- [17] SHARMA, Bhavya, Renee R. FRONTIERA, Anne-Isabelle HENRY, Emilie RINGE a Richard P. VAN DUYN. SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today* [online]. 2012, **15**(1–2), 16–25. ISSN 1369-7021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(12)70017-2
- [18] KVÍTEK, Libor. Nanočástice stříbra-příprava, vlastnosti a aplikace [online]. 2009. Dostupné z: [http://nanocon2012.tanger.cz/files/proceedings/nanocon\\_09/Lists/Papers/008.pdf](http://nanocon2012.tanger.cz/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/008.pdf)
- [19] SILVER COLLOIDS -METHODS OF PREPARATION AND UTILIZATION (PDF Download Available). *ResearchGate* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/267304409\\_SILVER\\_COLLOIDS\\_-METHODS\\_OF\\_PREPARATION\\_AND\\_UTILIZATION](https://www.researchgate.net/publication/267304409_SILVER_COLLOIDS_-METHODS_OF_PREPARATION_AND_UTILIZATION)
- [20] KVÍTEK, Libor. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. Dostupné z: [http://www.zdravestrebro.cz/admin/data/img/uploads/HP\\_Kvitek.pdf](http://www.zdravestrebro.cz/admin/data/img/uploads/HP_Kvitek.pdf)
- [21] *Biomechanika - studijní materiály - Katedra mechaniky* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://www.kme.zcu.cz/kmet/bio/kosti.php>

- [22] ROHLEDER, J. a E. KROKER. *Calcium Carbonate: From the Cretaceous Period into the 21st Century*. 2001 edition. Basel ; Boston: Birkhäuser, 2002. ISBN 978-3-7643-6425-0.
- [23] NĚMEC, Milan. *Slévárenské slitiny neželezných kovů*. Vyd. 1. B.m.: České vysoké učení technické, 2008. ISBN 978-80-01-04116-1.
- [24] ADAMEK, G. a J. JAKUBOWICZ. Mechanochemical synthesis and properties of porous nano-Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite layer for biomedical applications. *Electrochemistry Communications* [online]. 2010, **12**(5), 653–656. ISSN 1388-2481. Dostupné z: doi:10.1016/j.elecom.2010.02.023
- [25] ZEMKO, M., D. HRUŠÁK, L. DLUHOŠ a L. KRAUS. Použití nanostrukturního titanu pro nitrokostní implantáty. In: *In Nanocon 2009*. Rožnov pod Radhoštěm: Tanger s.r.o., 2009. ISBN 978-80-87294-12-3.
- [26] VARGAS, Mónica Andrea a Jorge E. RODRÍGUEZ-PÁEZ. Amorphous TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Synthesis and antibacterial capacity. *Journal of Non-Crystalline Solids* [online]. 2017, **459**, 192–205. ISSN 0022-3093. Dostupné z: doi:10.1016/j.jnoncrysol.2017.01.018
- [27] CALIA, Angela, Mariateresa LETTIERI a Maurizio MASIERI. Durability assessment of nanostructured TiO<sub>2</sub> coatings applied on limestones to enhance building surface with self-cleaning ability. *Building and Environment* [online]. 2016, **110**, 1–10. ISSN 0360-1323. Dostupné z: doi:10.1016/j.buildenv.2016.09.030
- [28] Influence of wastewater type on the impact generated by TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the oxygen uptake rate in activated sludge process. *ResearchGate* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/311961976\\_Influence\\_of\\_wastewater\\_type\\_on\\_the\\_impact\\_generated\\_by\\_TiO2\\_nanoparticles\\_on\\_the\\_oxygen\\_uptake\\_rate\\_in\\_activated\\_sludge\\_process](https://www.researchgate.net/publication/311961976_Influence_of_wastewater_type_on_the_impact_generated_by_TiO2_nanoparticles_on_the_oxygen_uptake_rate_in_activated_sludge_process)
- [29] MISHNAEVSKY JR., Leon, Evgeny LEVASHOV, Ruslan Z. VALIEV, Javier SEGURADO, Ilchat SABIROV, Nariman ENIKEEV, Sergey PROKOSHKIN, Andrey V. SOLOV'YOV, Andrey KOROTITSKIY, Elazar GUTMANAS, Irene GOTMAN, Eugen RABKIN, Sergey PSAKH'E, Luděk DLUHOŠ, Marc SEEFELDT a Alexey SMOLIN. Nanostructured titanium-based materials for medical implants: Modeling and development. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2014, **81**, 1–19. ISSN 0927-796X. Dostupné z: doi:10.1016/j.mser.2014.04.002
- [30] *Dentální implantologie (Antotnín Šimůnek a kolektiv)* [online]. nedatováno [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://www.martinus.cz/?uItem=51205>
- [31] *Nanostrukturní titan – nový materiál pro dentální implantáty | Česká stomatologie - proLékaře.cz* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: [http://www.prolekare.cz/ceska-stomatologie-clanek/nanostrukturni-titan-novy-material-pro-dentalni-implantaty-5063?confirm\\_rules=1](http://www.prolekare.cz/ceska-stomatologie-clanek/nanostrukturni-titan-novy-material-pro-dentalni-implantaty-5063?confirm_rules=1)

- [32] SUCHÝ, Tomáš. Kompozitní materiály v medicíně. In: [online]. Praha. Dostupné z: [http://www.csm-kompozity.wz.cz/tomas\\_suchy\\_kompozity.pdf](http://www.csm-kompozity.wz.cz/tomas_suchy_kompozity.pdf)
- [33] JANČÁŘ, Josef. *Úvod do materiálového inženýrství polymerních kompozitů* /. Vyd. 1. B.m.: Vysoké učení technické v Brně, 2003. ISBN 978-80-214-2443-2.
- [34] TAO, Hong, Yangyang HE a Xu ZHAO. Preparation and characterization of calcium carbonate–titanium dioxide core–shell (CaCO<sub>3</sub>@TiO<sub>2</sub>) nanoparticles and application in the papermaking industry. *Powder Technology* [online]. 2015, **283**, 308–314. ISSN 0032-5910. Dostupné z: doi:10.1016/j.powtec.2015.05.039
- [35] ZHAO, Lingzhou, Hairong WANG, Kaifu HUO, Lingyun CUI, Wenrui ZHANG, Hongwei NI, Yumei ZHANG, Zhifen WU a Paul K. CHU. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials* [online]. 2011, **32**(24), 5706–5716. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.040
- [36] SAINI, Monika, Yashpal SINGH, Pooja ARORA, Vipin ARORA a Krati JAIN. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World Journal of Clinical Cases : WJCC* [online]. 2015, **3**(1), 52. Dostupné z: doi:10.12998/wjcc.v3.i1.52
- [37] YANG, Lei a Chao ZHONG. Advanced engineering and biomimetic materials for bone repair and regeneration. *Frontiers of Materials Science* [online]. 2013, **7**(4), 313–334. ISSN 2095-025X, 2095-0268. Dostupné z: doi:10.1007/s11706-013-0226-4
- [38] MIDDLETON, John C a Arthur J TIPTON. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* [online]. 2000, **21**(23), Orthopaedic Polymeric Biomaterials: Basic Aspects of Biodegradables, 2335–2346. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00101-0
- [39] WONG, Joyce Y. a Joseph D. BRONZINO. *Biomaterials*. 1 edition. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 978-0-8493-7888-1.
- [40] SHALABY, Shalaby W. a Karen J. L. BURG. *Absorbable and Biodegradable Polymers*. B.m.: CRC Press, 2003. ISBN 978-0-203-49301-4.
- [41] LIU, Yi, Tao JIANG, Yi ZHOU, Zhen ZHANG, Zhejun WANG, Hua TONG, Xinyu SHEN a Yining WANG. Evaluation of the attachment, proliferation, and differentiation of osteoblast on a calcium carbonate coating on titanium surface. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2011, **31**(5), 1055–1061. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2011.03.003
- [42] WIESNEROVÁ, Ema. Ortopedická klinika testuje novou náhradu chrupavky. *online.muni.cz* [online]. [vid. 2017-03-07]. Dostupné z: <https://www.online.muni.cz/veda-a-vyzkum/3481-ortopedicka-klinika-testuje-novou-nahradu-chrupavky>
- [43] HE, Fupo, Jing ZHANG, Fanwen YANG, Jixiang ZHU, Xiumei TIAN a Xiaoming CHEN. In vitro degradation and cell response of calcium carbonate composite ceramic in comparison with other synthetic bone substitute materials. *Materials*

- Science and Engineering: C* [online]. 2015, **50**, 257–265. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2015.02.019
- [44] COMBES, C., Baoji MIAO, Reine BAREILLE a Christian REY. Preparation, physical–chemical characterisation and cytocompatibility of calcium carbonate cements. *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(9), 1945–1954. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.026
- [45] GIANNOUDIS, Peter V., Haralambos DINOPOULOS a Eleftherios TSIRIDIS. Bone substitutes: An update. *Injury* [online]. 2005, **36**(3, Supplement), Proceedings from the 1st European Clinical Symposium on Bone and Tissue Regeneration 27-28 November 2004, S20–S27. ISSN 0020-1383. Dostupné z: doi:10.1016/j.injury.2005.07.029
- [46] HRUŠÁK, D., L. DLUHOŠ a J. PETRUŽELKA. Nanoimplantát - implantát 3. tisíciletí. *StomaTeam: zubní technik & stomatolog: časopis Unie zubních techniků*. 2006, **6**(2), 2–3.
- [47] CAO, Guozhong. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. B.m.: World Scientific, 2004. ISBN 978-1-78326-088-1.
- [48] MOCHIZUKI, Chihiro, Hiroki HARA, Ichiro TAKANO, Tohru HAYAKAWA a Mitsunobu SATO. Application of carbonated apatite coating on a Ti substrate by aqueous spray method. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2013, **33**(2), 951–958. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2012.11.027
- [49] WEN, Cuie. *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials*. B.m.: Woodhead Publishing, 2015. ISBN 978-1-78242-316-4.
- [50] CATAURO, Michelina, Flavia BOLLINO a Ferdinando PAPALE. Surface modifications of titanium implants by coating with bioactive and biocompatible poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/SiO<sub>2</sub> hybrids synthesized via sol–gel. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. nedatováno [vid. 2017-03-10]. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2015.02.010
- [51] LIU, Yida, Ali DEMIRCI, Huie ZHU, Jinguang CAI, Shunsuke YAMAMOTO, Akira WATANABE, Tokuji MIYASHITA a Masaya MITSUISHI. A versatile platform of catechol-functionalized polysiloxanes for hybrid nanoassembly and in situ surface enhanced Raman scattering applications [online]. 2016, **4**(38), 8903–8910. ISSN 2050-7534. Dostupné z: doi:10.1039/C6TC02963A
- [52] STETCIURA, Inna Y., Alexey V. MARKIN, Andrei N. PONOMAREV, Alexander V. YAKIMANSKY, Tatiana S. DEMINA, Cristian GRANDFILS, Dmitry V. VOLODKIN a Dmitry A. GORIN. New surface-enhanced Raman scattering platforms: composite calcium carbonate microspheres coated with astralen and silver nanoparticles. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* [online]. 2013, **29**(12), 4140–4147. ISSN 1520-5827. Dostupné z: doi:10.1021/la305117t

- [53] ZAMBORINI, Francis P., Lanlan BAO a Radhika DASARI. Nanoparticles in Measurement Science. *Analytical Chemistry* [online]. 2012, **84**(2), 541–576. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac203233q
- [54] MAHMOUD, Khaled A. a Mohammed ZOUROB. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au nanoparticles/lignin modified microspheres as effectual surface enhanced Raman scattering (SERS) substrates for highly selective and sensitive detection of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT). *Analyst*. 2013, **138**(9), 2712–2719.
- [55] HE, Lili, Tom RODDA, Christy L. HAYNES, Timothy DESCHAINES, Todd STROTHER, Francisco DIEZ-GONZALEZ a Theodore P. LABUZA. Detection of a foreign protein in milk using surface-enhanced raman spectroscopy coupled with antibody-modified silver dendrites. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(5), 1510–1513. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac1032353
- [56] PARAKHONSKIY, B. V., Yu. I. SVENSKAYA, A. M. YASHCHENOK, H. A. FATTAH, O. A. INOZEMTSEVA, F. TESSAROLO, R. ANTOLINI a D. A. GORIN. Size controlled hydroxyapatite and calcium carbonate particles: Synthesis and their application as templates for SERS platform. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, **118**, 243–248. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2014.03.053
- [57] DENDISOVÁ, Marcela. *Analýza vrstev nízkomolekulárních látek na povrchu kovů metodami Ramanovy a infračervené spektroskopie disertační práce*. 2014.