

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC A
NANOVLÁKEN NA BÁZI BIOPOLYMERŮ A JEJICH VYUŽITÍ V
POTRAVINÁŘSTVÍ A KOSMETICE**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMER-BASED NANOPARTICLES AND
NANOFIBERS AND THEIR APPLICATION IN FOOD AND COSMETICS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

PHD THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. Vojtěch Kunderát

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2021

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá polymerem polyhydroxybutyrátem a dalšími biopolymery jakožto základním stavebním kamenem pro výstavbu mikro a nanoskopických struktur a materiálů použitelných v potravinářství a kosmetice. V rámci práce byla vypracována literární rešerše seznamující čtenáře se základy tohoto aplikačního pole. Experimentální část práce je sestavena ze tří bloků výsledků získaných během doktorského studia. V prvním, hlavním bloku jsou uvedeny komentované publikované výsledky a patentové výstupy, které zahrnují dva publikované recenzované články zabývající se elektrostatickým a mokřým zvlákněním PHB a vlastnostmi připravených materiálů. Patentové výstupy jsou tvořeny několika přijatými a podanými patenty, které shrnují několikaletou práci jednak na metodách zvláknění PHB, ale také na obecných přístupech umožňující zpracovávat PHB v podobě roztoku do podob umožňujících mnohé aplikace v potravinářství a kosmetice. Druhá část je tvořena jedním z praktických výstupů, jímž je patentovaná kompozice ochranného krému proti UV záření založena na připravených nanoskopických a mikroskopických morfologiích PHB. Ve třetím bloku jsou shrnuty další výsledky zaměřené na elektrostatické zvláknění PHB a dalších biopolymerů. V závěru práce je uveden stručný popis projektů souvisejících s tématem disertační práce. Jde o praktické rozvojové práce ve střední Tanzánii a západní Africe, které ale čerpají z vědomostí a kontaktů nabytých během studia na FCH VUT Brno.

Klíčová slova:

biopolymer, zvláknění, elektrospinning, nanovlákna, PHB, PHA, PBAT, krém, UV

ABSTRACT

The presented dissertation thesis deals with the polymer polyhydroxybutyrate and other biopolymers as a basic building block for the construction of micro- and nanoscopic structures and materials used in food and cosmetics. In the theoretical part, current literary review is prepared to introduce - the basics of this application field. The practical part of the work is composed of three blocks developed during the doctoral study. In the first and most important part are summarized comments to the academic and patent outputs, where among the academic ones it is possible to find two peer-reviewed articles dealing with the electrostatic and wet spinning of PHB and properties of prepared materials. The patent outputs consist of several accepted and applied projects, which summarize results on both PHB spinning methods, but also on general approaches enabling the processing of PHB into forms enabling many applications in food and cosmetics. Second part was focused on the patented composition of the UV protection cream based on the prepared nanoscopic and micro- morphologies of PHB. The third block summarizes results focused predominantly on the electrostatic spinning of PHB and other biopolymers. Finally, a short chapter containing a brief description of projects that were in a way related to the dissertation topic, but rather practical development work in Central Tanzania and West Africa, which draw on knowledge and contacts gained during studies at FCH BUT Brno.

Key words:

Biopolymer, spinning, electrospinning, nanofibers, PHB, PHA, PBAT, sunscreen, UV

KUNDRÁT, Vojtěch. *PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN NA BÁZI BIOPOLYMERŮ A JEJICH VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ A KOSMETICE*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113333>. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

Prohlášení:

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

.....

podpis studenta

Poděkování:

Rád bych zde poděkoval především vedoucí práce, paní profesorce Márové, za vedení, výjimečný a lidský přístup, podporu a pomoc v mnoha situacích, ale i za neskutečně osvěžující rozhovory a příjemné chvíle. Dále bych rád poděkoval Andrei Němcové a Lukáši Houdkovi za skvělou spolupráci na vývoji ochranného krému pro albínskou populaci v Ghaně a otci Janu Kotíkovi za ukázání cesty a otevření dveří do světa. Dále panu doktorovi Pospíšilovi za spolupráci a seznámení s patentovým světem. Firmě Nafigate a paní doktorce Mynářové za cenné pracovní a životní zkušenosti v oblasti průmyslového vývoje a výzkumu. Hlavně ale děkuji své rodině, rodičům a bratrovi za podporu, zázemí a trpělivost.

OBSAH

ABSTRAKT	1
ABSTRACT	2
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Biopolymery	10
2.1.1 Biopolyestery a polyhydroxyalkanoáty	10
2.1.2 Poly-(R)-3-hydroxybutyrát	11
2.2 Způsoby zpracování PHB v roztoku	14
2.3 Přehled metod klasického zvlákňování	14
2.3.1 Zvlákňování z taveniny	14
2.3.2 Suché zvlákňování	15
2.3.3 Mokrý zvlákňování	16
2.3.4 Sucho-mokrý zvlákňování	16
2.3.5 Gelové zvlákňování	17
2.3.6 Emulzní zvlákňování	17
2.4. Mokrý zvlákňování	17
2.5 Elektrostatické zvlákňování	21
2.5.1 Parametry zvlákňovaného roztoku	22
2.5.2 Parametry zvlákňovacího zařízení	27
2.5.3 Parametry prostředí	31
2.5.4 Elektrostatické zvlákňování v průmyslu	32
2.6 Nanotechnologie v potravinářství	34
2.6.1 Aplikace nanovláken v zemědělství	36
2.6.2 Aplikace nanovláken v potravinářství	39
2.7 Nanotechnologie v kosmetice	41

3.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	44
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
4.1	Komentovaný soubor publikací a patentů – přehled výsledků	45
4.1.1	Recenzované články	45
4.1.2	Příhlášky vynálezů a užitných vzorů	45
4.2	Komentář k výsledkům publikovaným v časopisech	46
4.2.1	Kinetika uvolňování léčiv z PHB vláken připravených elektrostatickým zvlákněním (Příloha 1)	46
4.2.2	Příprava porézních mikrovláken na bázi poly-3-(R)-hydroxybutyrátu a jejich aplikace (Příloha 2)	48
4.3	Komentář k patentovým přihláškám	49
4.3.1	Polymerní vlákno a způsob jeho výroby (Příloha 3)	49
4.3.2	Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi (Příloha 4)	51
4.3.3	UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a způsob jeho přípravy (Příloha 5)	54
4.3.4	Způsob rozpouštění biodegradabilních polyesterů (Příloha 6)	54
4.3.5	Nanovláknenný sorpční materiál na bázi polyhydroxybutyrátu pro sorpci těžkých kovů (Příloha 7)	57
4.4	Dílčí závěry	58
4.5	Přehled dalších projektů řešených v rámci disertační práce	58
4.5.1	Úvod - elektrostatické zvláknění PHB a dalších polyesterů	58
4.5.2	Materiály a metody	59
4.5.2.1	Materiály	59
4.5.2.2	Metody	59
4.5.3	Výsledky a diskuse	62
4.5.3.1	Pilotní elektrostatické zvláknění PHB (Biomer) ze systému MDCA a TFE	62
4.5.3.2	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na koncentraci PHB	63

4.5.3.3	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na koncentraci TEAB	65
4.5.3.4	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na napětí a vlhkosti	66
4.5.3.5	Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF)	69
4.5.3.6	Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF) z MDCA s TFE	70
4.5.3.7	Elektrostatické zvláknění PLA (Natureworks) z MDCA	72
4.5.3.8	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PBAT (BASF) z MDCA s TFE	72
4.5.3.9	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) z MDCA s TCE	74
4.5.3.10	Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF) z MDCA s TCE	75
4.5.3.11	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PLA z MDCA s TCE	75
4.5.3.12	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PBAT (BASF) z MDCA s TCE	76
4.5.3.13	Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PVP (Sigma Aldrich) z MDCA s TCE	77
4.5.3.14	Elektrostatické naprašování PHB (Nafigate) z horkého DMAc roztoku	77
4.5.4	Dílčí závěry z elektrostatického zvláknování polymerů	79
4.6	DOPLŇKOVÉ VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE	79
4.6.1	Tanzánie	80
4.6.2	Ghana	82
5.	ZÁVĚR	83
	LITERATURA	84
	POUŽITÉ ZKRATKY	93
	PŘÍLOHA 1	94
	PŘÍLOHA 2	107
	PŘÍLOHA 3	121
	PŘÍLOHA 4	133
	PŘÍLOHA 5	174

PŘÍLOHA 6.....	204
PŘÍLOHA 7.....	215
PŘÍLOHA 8 - ŽIVOTOPIS	222
SEZNAM PUBLIKAČNÍCH A DALŠÍCH VÝSTUPŮ AUTORA	223

1. ÚVOD

Biopolymery, vyznačující se biodegradabilitou představují slibnou substituci klasickým polymerním systémům a plastům v odvětvích typickým krátkodobou funkčností a používáním. Problematika narůstání odpadních plastů v životním prostředí se poslední roky dostává do popředí zájmu především u běžných spotřebitelů vyspělého západního světa. Ačkoliv snahy o implementaci vzdělávání o environmentální odpovědnosti vedou jistě k širšímu povědomí o recyklaci klasických plastů a taktéž k praktickému třídění a znovuzavedení již použitých plastových výrobků do oběhu, není možné označit využívání klasických polymerů jako uzavřený cyklus opakovaného používání, který je pouze ideálem [1]. Prakticky to znamená, že značná část plastových užitých a obalových materiálů se vždy dostane mimo koloběh recyklace. V lepším případě dochází k sekundárnímu energetickému využití nebo alespoň ke skládkování. Velkou pozornost budí pak konečný jev spojený s únikem plastových materiálů do životního prostředí v podobě mikroplastů. Právě mikročástice a fibrily nalezené v rybách, ptactvu a vlastně v celém potravním řetězci včetně jeho vrcholu v podobě člověka přispěly k velké diskusi o odpovědném užití jednorázových výrobků, a především o podobě užitých materiálů s důrazem na již zmíněný cyklus využívání [2,3].

V tomto úvodu je již možné se dostat k podstatě práce, která je zaměřena na aplikační potenciál a stav techniky využívání biopolymerů jako součást plastových produktů s vyšší přidanou hodnotou, a to jak aplikační, tak ekonomickou, než je například tvorba extruzních výrobků. Zhodnocení biodegradabilních plastů v podobě obalových materiálů, nákupních tašek, předmětů denní potřeby je podrobeno silnému ekonomickému a společenskému tlaku a je již možné pozorovat důsledky výzkumů, technologického pokroku a změny legislativ v běžném životě, třeba v nákupních centrech. Pro vytyčení motivace a záměru práce je nezbytné zmínit, že výzkumné a podnikatelské snahy v této oblasti, kterou můžeme označit jako tvorbu produktů s nižší přidanou hodnotou, jsou popsány řadou odborných prací, článků, kompendií, zkušeností a úspěšných i neúspěšných podnikatelských záměrů [4,5,6,7,8].

Oblast aplikačního zájmu, kdy na biopolymer nenahlížíme pouze jako na společensky vynucenou alternativu, k již zavedeným materiálům, ale jako na skutečně jedinečnou a plnohodnotnou surovinu, je dle názoru autora silně podhodnocena. Disertační práce si klade za cíl na základě patentových a publikačních výstupů a na získaných praktických zkušenostech dokázat, že potenciál biopolymerů, v čele s poly-(R)-3-hydroxybutyrátem (PHB) a jeho kopolymery, netkví pouze v environmentální a ekonomické substituci polypropylénu či podobných materiálů, ale hlavně jako výhodná materiálová platforma pro řadu cennějších aplikací mimo spotřební trh.

Disertační práce se zaměřuje na několik segmentů, jejichž výchozím bodem je zpracování biopolymerů v podobě roztoku. Z rozpuštěné formy je polymer možné upravovat mnohými procesy, jako jsou klasické metody zvlákňování, tvorba filmů, srážení rozličných morfologií nebo elektrostatické zvlákňování netkaných nanotextilií. Práce zaměřená na opracování některých biopolymerů dala vzniknout některým novým metodám laboratorního zvlákňování s potenciálem pro průmyslovou aplikaci. Dále byly provedeny některé experimenty cílené na změnu chemické podstaty polymerů s motivací vylepšit materiálové vlastnosti, či dodat do struktury lépe chemicky opracovatelné funkční skupiny.

Je nezbytné podtrhnout aplikační pole, ve kterém se práce nachází, a to je především potravinářství. Už samotný fakt, že primární cílený polymer PHB je produktem zhodnocení odpadu potravinářského průmyslu, konkrétně odpadního rostlinného oleje, nabízí využít surový polymer za pomoci technik materiálového výzkumu v tomto odvětví. S výhodou je možné využít hydrofobní charakter PHB, jeho možné sorpční vlastnosti nebo možnost užití jako matrici a nosič pro jiné látky. Vytvořené materiály pak nacházejí aplikace při filtraci, bariérové vlastnosti nebo jako obal s aktivním působením, indikací čerstvosti a další [9,10,11]. Vedle využití v potravinářství se nabízí relativně příbuzný segment využití v kosmetice, kde je využitelný jako biodegradabilní aditivum.

V rámci teoretické části disertace byla vypracována teoretická základna popisující základní termíny a konkrétněji vymezující okruh zájmu. Dále jsou definovány některé méně známé technologické metody zpracování polymeru a přípravy vláken s důrazem na mokré a elektrostatické zvlákňování. Pozornost je věnována především oblastem materiálové přípravy a aplikace. Experimentální část práce se opírá především o autorské kompendium publikačních a patentových výstupů.

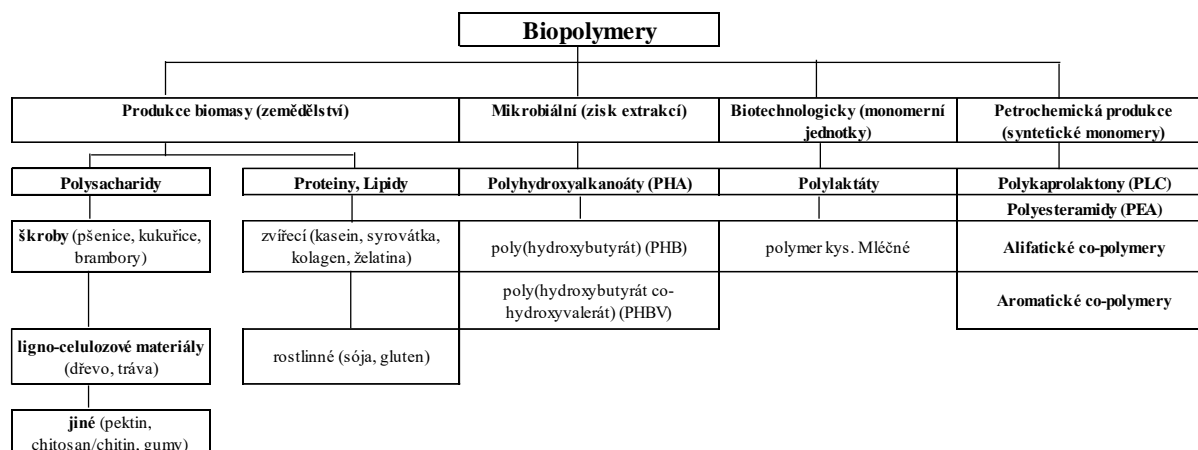
Během doktorského studia bylo realizováno rovněž několik souběžných doplňkových projektů, které okrajově spadají do tématu disertace, avšak jsou zaměřeny na praktické aplikace. Autor považuje za přinejmenším zajímavé do práce zahrnout, protože bez zkušeností získaných při řešení tématu DSP by tyto doplňkové větve nemohly vzniknout. Především se jedná o projekt vývoje a výroby dostupného krému na opalování pro albínskou populaci v Západní Africe a vývoj ekonomicky dostupného nanovlákněného filtru na pitnou vodu vyvíjeného ve spolupráci se soukromým sektorem.

Disertační práce vznikla za specifických okolností spolupráce akademického a soukromého sektoru. Podmínky tohoto meziprostoru daly vzniknout některým technologickým principům, které doposud nebyly popsány. V rámci tohoto působení byly autorovi této práce poskytnuty podmínky k naprosto svobodné práci bez výrazných oborových nebo materiálových mantinelů. Jediným ukotvením byl polymer poly-3-(R)-hydroxybutyrát jako produkt biosyntézy a jeho materiálové opracování pro aplikace v potravinovém průmyslu, přičemž hlavním cílem byla filtrace vody a vývoj vlákněných materiálů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biopolymery

Biopolymery jsou široká skupina látek, ve které dle různých definic možné nalézt od čistě přírodních látek také látky semi-přírodní nebo čistě syntetické. Ve skupině biopolymerů je možné nalézt biologické polymery jako jsou proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny. Taktéž ale polymery, které se přirozeně v přírodě nevyskytují, ale jsou vytvářeny z biologických surovin, příkladem takového polymeru může být biodegradabilní polymléčná kyselina (PLA), která je syntetizována chemicky anebo chitosan, který je deacetylovaným derivátem chitinu, tedy pouze úpravou již existujícího polymeru bez chtěného zásahu do hlavního řetězce. Samotnou a obrovskou rodinou těchto látek jsou deriváty celulózy, škrobu, hyaluronové kyseliny nebo již zmíněného chitinu, respektive chitosanu, typickým motivem je O-glykosidová vazba. Velmi významnou skupinou biopolymerů jsou polyester, kam patří jednak již zmíněná PLA a taktéž PHB a jeho kopolymery, na které důrazně cílí tato práce. Jedním z užitečných dělení biopolymerů do skupiny je strukturalizace na základě rozdílného způsobu produkce (Obrázek 1).



Obrázek 1 – Rozdělení biopolymerů na základě způsobu produkce [12]

Existuje dle různých pohledů více různých definic a dělení, ale pro naše účely lze biopolymery nejlépe definovat jako polymery produkované z biologicky obnovitelných zdrojů a polymerizované chemickou nebo biologickou cestou [12].

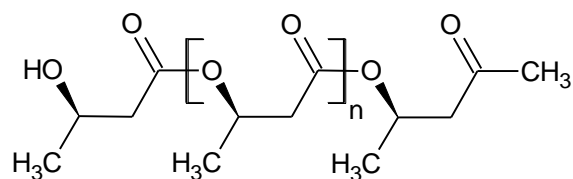
2.1.1 Biopolyestery a polyhydroxyalkanoáty

Obzvláště využitelné a rozšířené jsou polyesterové biopolymery. Jak název napovídá, skupina se vyznačuje přítomností esterové skupiny v hlavním řetězci. Souhrnně můžeme biodegradabilní polyester označit za polymer obsahující opakující se esterovou vazbu v hlavním řetězci, který vykazuje za vhodných podmínek biodegradabilitu dle definice Evropské normy EN14432. Jako v současnosti nejdůležitější zástupce je využívána polymléčná kyselina, která ovšem kvůli svému semisyntetickému původu, a především závislosti produkce na potravinových zdrojích (nejčastější zdroj prekurzorů pro syntézu PLA je kukuřice nebo cukrová třtina) se v zemích s nedostatkem orné půdy logicky střetává s etickými a ekonomickými aspekty. PLA byla úspěšně zvlákněna extruzním, mokřým, suchým i elektrostatickým způsobem [13, 14, 15]. Syntetický původ umožňuje širokou variabilitu pramenic z možné optické rotace jednotlivých monomerů, která se ve výsledku projeví na krystalinitě, respektive amorfności. V experimentální části této práce jsou experimenty zabývající polymléčnou kyselinou taktéž zahrnuty, avšak hlavní důraz je kladen na polymer PHB a jeho variace a kopolymery. Pro další informace o PLA je možné čerpat v použité literatuře [16, 17, 18].

Do skupiny biodegradabilních polyesterů patří mnoho různých homopolymerů, kopolymerů, blokových kopolymerů a dalších polymerů s různým uspořádáním opakujících se jednotek. Příkladem takových materiálů je rodina polyhydroxyalkanoátů (PHA) zahrnující vedle mnohých dalších polymerů nejdůležitější poly-(R)-3-hydroxybutyrát (PHB) a kopolymer poly-3-hydroxybutyrát-ko-3-hydroxyvalerát (PHBV) s proměnlivým obsahem valerátu ve struktuře. Polykaprolakton (PCL) nachází uplatnění především v tkáňovém inženýrství. Nejjednodušší polyesterovou strukturou je polyglykolová kyselina (PGA), jejímuž širšímu využití brání citlivost vůči hydrolýze. Polydioxanon (PDO) je polymer využívaný v medicíně pro přípravu chirurgického šití. Jako další příklady mohou být uvedeny polyvalerolakton (PVL), polyethylensukcinát (PES) a poly(ϵ -decalakton) (PDL). Mezi průmyslově využívané polymery patří syntetický polyhydroxybutyrát-adipát-tereftalát (PBAT) a polybutylen sukcinát (PBS). Zmíněné polymery jsou charakteristické nerozpustností ve vodě a dle polymeru proměnlivou chemickou nestálostí vůči alkalické nebo kyselé hydrolýze. Biodegradabilní polymery mohou být přírodního původu, jak je to například u PHB nebo PHBV, synteticky přírodního původu, kdy prekurzor pro polymerizaci je získán z přírodních zdrojů a následně je polymerizace provedena synteticky (PLA), nebo čistě syntetického původu (PCL, PBAT, PES, PBS). U PBS je očekáván přesun do kategorie synteticky přírodního původu z důvodu možnosti produkce kyseliny butandiové fermentací [19].

2.1.2 Poly-(R)-3-hydroxybutyrát

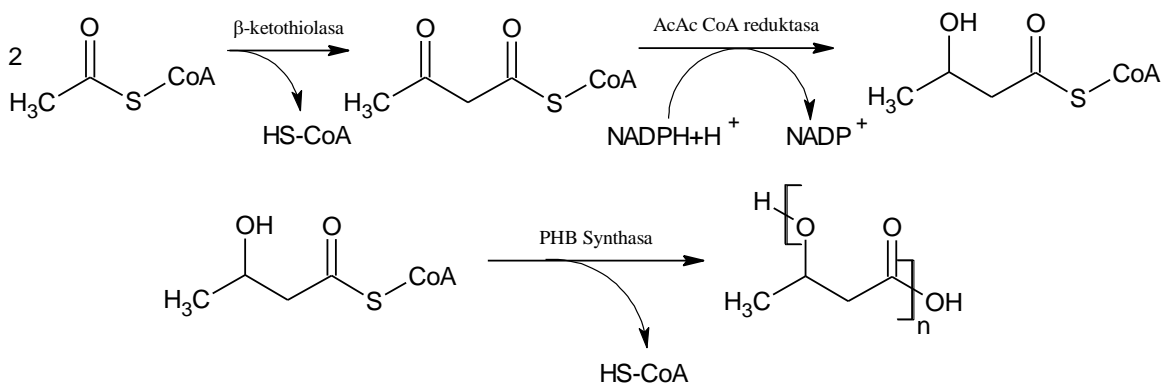
PHB představuje v rodině PHA majoritního a nejdůležitějšího zástupce. Strukturálně se jedná o izotaktický opticky čistý polyester sestávající se z jednotek (R)-3-hydroxybutanové kyseliny (Obrázek 2).



Obrázek 2 Struktura polyhydroxybutyrátu [20]

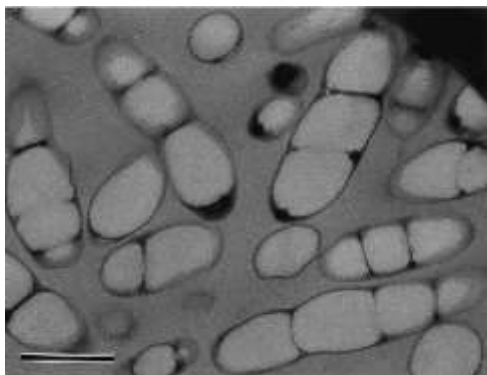
Homopolymer PHB je limitovaný svými mechanickými vlastnostmi, především křehkostí, polymer obsahující mimo jednotky butyrátu i valerát je v aplikační sféře mnohem uspokojivější. V rodině polyhydroxyalkanoátů můžeme najít kopolymery s jednotkami obsahujícími delší a nenasycené řetězce, případně substituenty zahrnující hydroxylovou, kyano- či karbonylovou skupinu [20].

Polyhydroxybutyrát se tvoří v cytoplasmě bakterií za pomoci několika enzymů, přičemž klíčovým enzymem pro tuto syntézu je PHA syntáza (PhaC). Dráha syntézy začíná u syntézy acetoacetyl koenzymu A ze dvou molekul acetyl koenzymu A. Následujícím krokem je stereospecifická redukce na 3-(R)-hydroxybutyryl koenzym A. Závěrečným krokem je polymerační reakce za účasti PHA syntázy, kde dochází k uvolňování koenzymu A a výstavbě PHB (Schéma 3) [12].



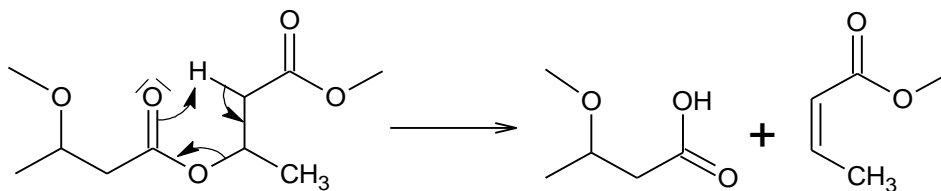
Obrázek 3 Biosyntéza PHB [12]

Produkce PHB v bakteriích nastává jako reakce na nedostatečný přísun živin umožňujících růst, a proto můžeme chápat PHB jako zásobní látku. PHB nabývá v bakteriích schopných jeho produkce až 90% hmotnostního zastoupení. Názorně je to zobrazeno na transmisním elektronovém snímku *Ralstonia eutropha*, kde bílé skvrny uvnitř bakterií jsou PHB a měřítko znázorněné na snímku odpovídá 0,5 μm (Obrázek 4) [21].



Obrázek 4 TEM snímek *Ralstonia eutropha* s nakumulovaným PHB [21]

PHB je jak ve formě homopolymeru, tak i kopolymeru s obsahem valerátu bílá až lehce nažloutlá semikrystalická látka relativně dobře rozpustná v chloroformu a částečně i v dalších halogenovaných rozpouštědlech. Samotný homopolymer je křehký, ale s procentuálním nárůstem valerátu dochází ke snížení krystalinity a zlepšení materiálových vlastností. PHB je často srovnáván s polypropylenem (Tabulka 1), vzhledem k podobnému bodu tání a krystalinitě materiálu [19]. PHB má větší hustotu než voda. Chemická odolnost PHB je omezena esterovou podstatou materiálu. V přítomnosti kyselin a zásad se snižuje jeho molekulová váha a v případě koncentrované kyseliny sírové dochází k eliminaci hydroxylové skupiny na krotonovou kyselinu. [22] Bod teplotní degradace materiálu (cca 200 $^{\circ}\text{C}$) je relativně blízko bodu tání (180 $^{\circ}$). Mechanismus teplotní degradace probíhá výhradně skrze pomyslný šestičlenný cyklus za vytvoření dvojné vazby až na finální kyselinu krotonovou (Obrázek 5) [23].



Obrázek 5 Tepelná degradace PHB [23]

Tabulka 1 Srovnání vlastností PHB a jeho kopolymerů s polypropylenem [1]

Polymer	PHB	P(HBcoHV) 10 %	P(HBcoHV) 20 %	PP
Teplota tání [°C]	177	140	130	170
Krystalinita	80	60	35	80
Pevnost v tahu [MPa]	40	25	20	33
Modul pružnosti v ohybu [GPa]	3,5	1,2	0,8	1,24
Relativní prodloužení při přetržení [%]	8	20	50	150
PHB – poly-3-hydroxybutyrát; P(HBcoHV)10% - poly-3-hydroxybutyrátvalerát kopolymer 10% mol; P(HBcoHV)10% - poly-3-hydroxybutyrátvalerát kopolymer 20 mol%; PP - polypropylen izotaktický				

Vzhledem k podstatě vzniku a biodegradabilitě PHB se tento polymer jeví jako vhodná náhrada ropných plastů. Díky tomu je na PHB zaměřována pozornost plastikářského průmyslu již od 60. let minulého století. Enormní zájem o PHB byl v 70. letech kvůli tehdejší ropné krizi, kdy se začalo o PHB uvažovat jako o náhradě polypropylénu, s nímž má podobné mechanické a fyzikální vlastnosti [20,23]. Průmyslová produkce PHB spočívá na několika základních krocích. Pro biosyntézu PHB je nutný výběr vhodného substrátu, média, živin a bakteriálního kmenu a třídy. U substrátu se o nižší sacharidy, tuky, mastné kyseliny apod. [24]. Po kultivaci následuje extrakce PHB z biomasy, kterou lze provádět chlorovanými uhlovodíky, například chloroformem. Byly vypracovány separační postupy založené na vymývání biomasy, či rozdělení materiálů odstředivou silou [20]. Výsledný polymer má bílou či světle nažloutlou barvu. Následné zpracování je možné formou taveniny s přidavkem vhodných aktivačních přísad v extruderu nebo odpařením z roztoku. PHB je taktéž vhodné pro přípravu netkaných textilií. Byly popsány i směsi PHB s dalšími biodegradabilními polymery (PCL, PLA apod.) a z těchto směsí je možno vytvářet obaly na potraviny a další užité výrobky [23, 25, 26, 27]. Na trhu můžeme najít několik firem produkujících výrobky z PHB. Jedná se například o Metabolix GmbH, Kaneka corp., Procter&Gamble, Monstanto a další.

Jelikož se struktura polymeru skládá z opticky čistého monomeru (R-3-hydroxy butanoátu), nabízí se PHB jako ideální prekurzor pro syntézu opticky čistých látek. Vedle těchto látek PHB slouží taktéž pro přípravu krotónové kyseliny jako monomeru pro polymerní reakce. Alkoholýza PHB vede k získání opticky čistých esterů kyseliny 3-(R)-hydroxybutanové. Podmínkami podobná je příprava opticky čistých 3-hydroxylovaných amidů butanové kyseliny [22, 28].

PHB vykazuje jako řada dalších přírodních polymerů biokompatibilní vlastnosti. Je popsána řada případů úspěšných aplikací v rámci tkáňového inženýrství. Jsou popsány případy, kde PHB o různé morfologii slouží pro výstavbu kůže, cév, kosti atd. Vedle popsaných aplikací je polymer zajímavý v podobě nanovláken, kdy získaný vysoký povrch podstatně zvyšuje efektivitu medicínálních procesů, především výstavby tkání. Je popsáno použití zvlákněného PHB ve směsi s hydroxyapatitem pro úspěšnou regeneraci kostí [29]. Základními kritérii materiálů pro úspěch v tkáňovém inženýrství je biokompatibilita, podpora buněčného růstu a adheze, řízení a směřování buněk do kýžené morfologie budoucí tkáně, přístup živin a odvod odpadních látek i při pokročilé fázi růstu tkáně, a nakonec degradabilita materiálu po ukončení výstavby. V mnoha případech PHB splňuje tyto klíčové požadavky. [29, 30].

2.2 Způsoby zpracování PHB v roztoku

Rozpustnost polymerů je určena zvoleným systémem polymer – rozpouštědlo a dále jejich strukturou, případným větvením, molekulovou hmotností, polydisperzitou, krystalinitou a vnějšími podmínkami jako je například teplota. V některých případech i zdánlivě rozpuštěný polymer po vychladnutí a daném čase vytvoří termoreverzibilní gel, který po opětovném zahřátí opět přejde do roztoku [31], jako je to například u poly-(R)-3-hydroxybutyrátu [32] ve většině běžně používaných rozpouštědel (dimethylformamid (DMF), dimethylacetamid (DMAc), dimethylsulfoxid (DMSO), toluen (TN), chlorbenzen (CB) a mnohé další) nebo u polymeru PBAT v případě DMF, DMAc. Zda ke tvorbě gelu dojde či nikoliv závisí na koncentraci, teplotě, krystalinitě polymeru a ve výsledku na termodynamické výhodnosti gelace [31]. U malých koncentrací nemusí ke gelaci dojít vůbec, případně velmi pomalu. Tvorba termoreverzibilního gelu je jistě zajímavým fenoménem pro určité aplikace, ovšem získání časově a teplotně stabilního roztoku je základem mnohých druhů zpracování, jak bylo zmíněno výše. Stabilita roztoku je pak klíčová pro dlouhodobé průmyslové procesy, například elektrostatického nebo mokrého zvlákňování [48].

Zatímco například polyamidy bývají rozpouštěny v kyselině mravenčí nebo octové [33], u polyesterů může takové rozpouštědlo reagovat s rozpouštěným materiálem a snížit tak molekulovou hmotnost polymeru, což se projeví v mechanických vlastnostech výsledného materiálu. Volba rozpouštědla by měla taktéž zahrnovat environmentální a pracovní bezpečnostní odpovědnost. Pokud není možné se toxickým rozpouštědlem vyhnout bývá zajištěna buď recyklace nebo katalytické odbourání použitého, například vypařeného, rozpouštědla.

Popsané biodegradabilní polyesteru ve většině případů jsou rozpustné v halogenovaných rozpouštědlech. Nejběžněji používány jsou chloroform (CF) a dichlormethan (DCM) a dále 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), hexafluoroisopropanol (HFIP). V minulosti bývaly používány látky jako 1,2-dichloroethan (DCE), 1,1,2,2-tetrachloroethan (TCE), tetrachlormethan (TCM), 1,2,3-trichloropropan (TCP) a další, které jsou dnes zakázány vzhledem k velké akutní toxicitě a environmentální zátěži.

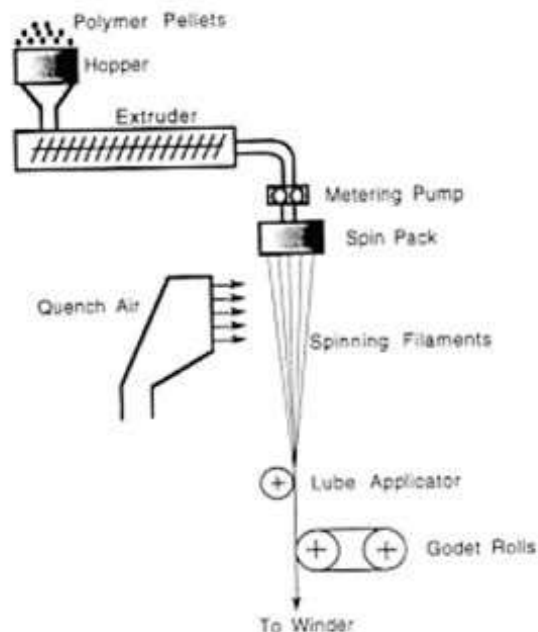
Používaná zmíněná rozpouštědla společně s dimethylformamidem a dimethylacetamidem tvoří základní sestavu rozpouštědel jak v akademické, tak průmyslové literatuře. Kromě užití jako rozpouštědla se halogenované sloučeniny používají jako extrakční činidlo při separaci přírodních biopolymerů, PHB a PHBV, z biomasy [34].

2.3 Přehled metod klasického zvlákňování

Vzhledem k tematickému zaměření je vhodné zmínit klasické metody zvlákňování, jejich výhody a procesní podmínky. Výčet popsaných metod zvlákňování je následující: z taveniny, suché, mokré, sucho-mokré, gelové, emulzní [35, 36].

2.3.1 Zvlákňování z taveniny

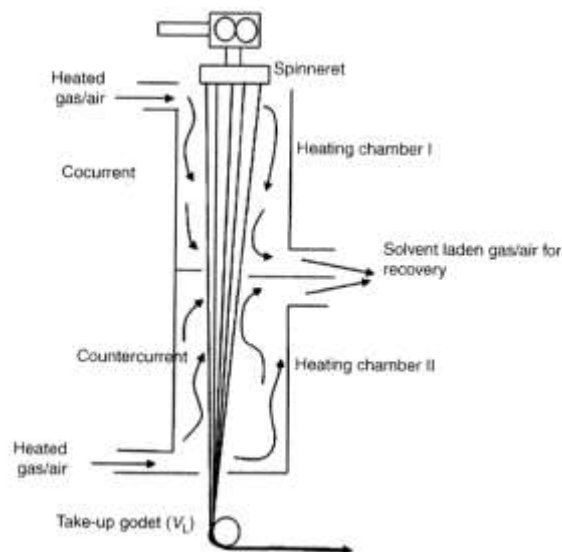
Nejrozšířenější uspořádání (Obrázek 6), které pracuje s klasickým extruderem, ve kterém jsou taveny granule použitého polymeru a pod tlakem jsou ze zvlákňovací hlavičky vytlačovány filamenty, které jsou následně ochlazené a odtahovány navíječem. Takto je možné získat mono i multifilamenty ve velkém produkčním měřítku. Výhodou procesu jsou velmi nízké náklady, absence rozpouštědla a vysoká rychlost produkce pohybující se kolem 8000 m/min. Proces je nejčastěji používán pro zpracování polymerů nepodléhajících teplotní degradaci, a u kterých je zajištěna stabilní a definovaná viskozita taveniny, stejně tak čistota surového polymeru. Takto se získávají běžně vlákna z polyethylenu, polypropylenu nebo polyesteru PET [35].



Obrázek 5 – Zvlákňování z taveniny – Melt spinning [35]

2.3.2 Suché zvlákňování

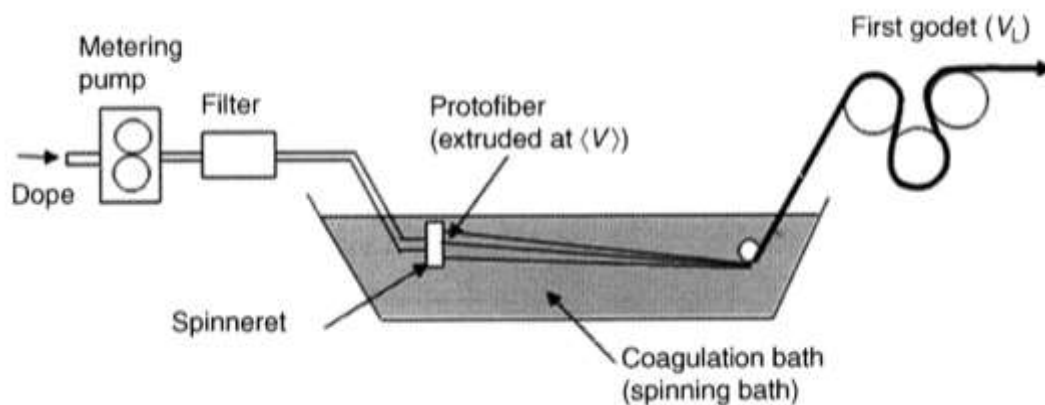
Tento typ zvlákňování pracuje již s roztokem polymeru ve vhodném rozpouštědle. Rozpuštěný polymer je vtlačován čerpadlem skrz zvlákňovací hlavu s jednotlivými otvory do oblasti s proudícím plynem, nejčastěji horkým vzduchem (Obrázek 6). Dochází k vypaření rozpouštědla a solidifikaci polymeru v podobě vlákna, které je možné dloužit a následně navíjet obdobně jako v u extruzního zvlákňování. Rozpouštědlo se poté regeneruje, odchází do atmosféry nebo skrze katalytickou linku spaluje na neškodné produkty. Tento druh zvlákňování je finančně náročnější, ale u polymerů, které jsou nestálé je možné tuto techniku použít [35].



Obrázek 6 – Suché zvlákňování – Dry spinning [35]

2.3.3 Mokrý zvlákňování

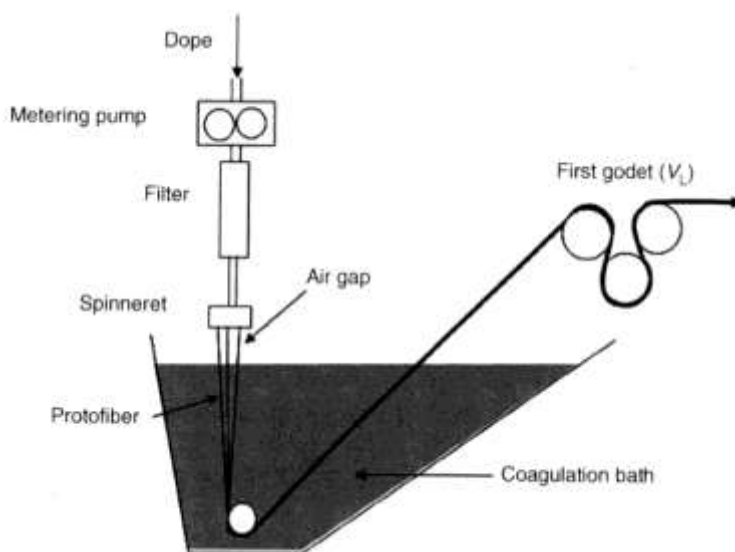
Rozdíl mokrého zvlákňování oproti suchému tkví v náhradě komory s proudem horkého plynu za precipitační lázeň, ve které dochází k vysrážení polymerního vlákna a promísení rozpouštědla polymeru s lázní (Obrázek 7). Následně je pak možné vhodnými způsoby lázeň i rozpouštědlo regenerovat, například destilací apod. Mokrému zvlákňování bude vzhledem k povaze experimentální práce věnovat samostatná kapitola. Metodou mokrého zvlákňování se připravují vlákna z polyakrylonitrilu, viskóza nebo PVC [35].



Obrázek 7 – Mokrý zvlákňování – Wet spinning [35]

2.3.4 Sucho-mokrý zvlákňování

Odborně známější anglický ekvivalent zní dry-jet wet spinning. Název je výstižný, jelikož se stále jedná o mokré zvlákňování s tím rozdílem, že zvlákňovací hlava není ponořena ve srážecí lázni, ale je v určité vzdálenosti od hladiny srážedla (Obrázek 8). Důvodem tohoto uspořádání je získání celistvější morfologie a hladší povrch vlákna. Jedná se o kombinaci suchého a mokrého zvlákňování, přičemž v prvním kroku dojde k částečnému vypaření rozpouštědla a povrchovému „zaschnutí“ vlákna. Následně pak dochází k vysrážení vlákna a zpracování dlužením a navíjením [35].



Obrázek 8 – Sucho mokrý zvlákňování – Dry-jet wet spinning [35]

2.3.5 Gelové zvlákňování

Jedná se o již speciální metodu, která se nachází na pomezí extruzního a suchého zvlákňování. Využívá děje, kdy polymerní materiál tvoří s rozpouštědlem gel, který je vytlačován a formován do podoby vlákna. Gelové zvlákňování bývá používáno v uspořádání shodném s mokro suchým zvlákňováním, kdy gel se vytváří zchlazením během průchodu mezerou mezi hladinou a zvlákňovací hlavou. Proces bývá taktéž charakteristický použitím polymerů o vysoké molekulové hmotnosti a lázni s nízkou teplotou [37]. Tento proces se s úspěchem používá pro zvlákňování nanokrystalické celulózy za vzniku vysoce pevnostního vlákna [38], případně pro zvlákňování PAN s vysokou mol. hmotností [35].

2.3.6 Emulzní zvlákňování

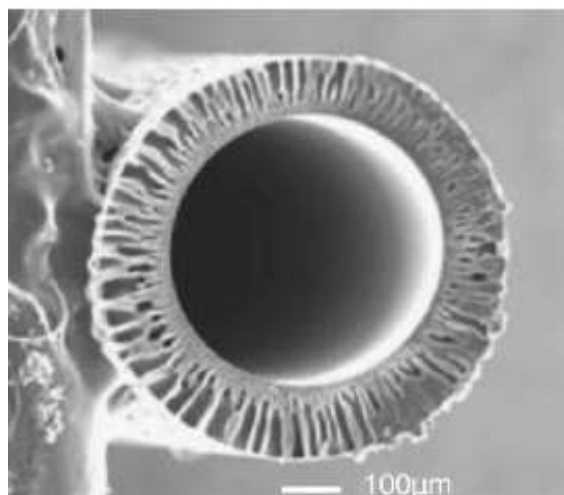
Velmi zajímavá metoda [39], kdy místo pravého roztoku se vytlačuje suspenze nerozpuštěné křížené složky a pomocného rozpuštěného polymeru. Název emulzní je mírně zavádějící, jelikož se ve většině případů jedná právě o suspenzi částic nikoliv pravou emulzi dvou nemísitelných roztoků. Pravděpodobně tento název vznikl pro nutnost použití velmi jemných částic vzniklých například emulzní polymerizací. Výhodou metody je možnost zvláknit nerozpustné polymery jakým je například polytetrafluorethylen. Ten je suspendován v roztoku viskózy a následně vytlačován skrz hlavici do precipitační lázně tvořené kyselinou sírovou s rozpuštěným síranem sodným a zinečnatým. Následně je vlákno sušeno při 190 °C a posléze spékáno při teplotě 389 °C, přičemž viskóza je vypálena pryč, vlákno je dluženo a jednotlivé částice PTFE se spojí do vlákna. Takto je možné připravovat i keramické částice, při použití vhodných prekurzorů. Dalším polymerním příkladem může být zvlákňování kompozitního vlákna z PVA a PVC – generickým názvem polychlal [35].

2.4. Mokrý zvlákňování

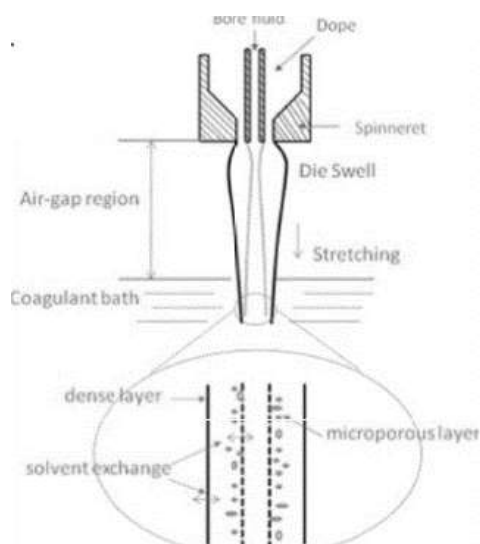
Tomuto již zhruba nastíněnému způsobu formace vlákna bude věnována větší pozornost vzhledem k faktu, že na základě modifikované podoby tohoto klasického procesu bylo PHB a další biopolymery zvlákněny do aplikačně zajímavé podoby mikrovlákna s nanostrukturou [36].

Zvlákňování polymerů z roztoku je technologie dobře známá a průmyslově využívaná již více než 100 let. Zvlákňování z roztoku bylo a stále je používáno pro zvlákňování celulózy a jejích derivátů. Klasický způsob zvlákňování celulózy na viskózní vlákno spočívá v rozpuštění surové celulózy v hydroxidu sodném, následném vzniku xantogenátu za pomoci sirouhlíku. V následujícím kroku je opět získána čistá celulóza v podobě vlákna. Dále je zvlákňování běžné pro PAN, z roztoku v DMF do vodní lázně. Takto je nyní vyráběno méně než jeden milion tun vláken ročně [36, 39, 40].

Proces zvlákňování závisí na mnoha faktorech. Nejdůležitějším rysem procesu je systém zvolený polymer-rozpouštědlo-srážecí lázeň. Platí, že rozpouštědlo a srážedlo musí být navzájem mísitelné a zároveň, že polymer musí být rozpustný v rozpouštědle, ale již nerozpustný ve srážedle. To jsou logické předpoklady metody, které ačkoliv se zdají samozřejmé, tak ve složitějších systémech, například po přidání aditiv na ně musí být brán zřetel při plánování experimentů. S výhodou je například možné využít rozpustnost aditivního polymeru v roztoku i srážedle, což je možné využít pro získání porézní struktury, čehož se využívá při přípravě membrán v uspořádání dutého vlákna (hollow fiber membrane). Příkladem může být kombinace polyether sulfonu (PESL) s aditivním, vodou rozpustným polymerem, například polyvinylpyrrolidonem (PVP). Roztok je v DMF a vysrážením ve vodě a následným loužením dojde vytvoření porozity v PES membráně (Obrázek 9). Duté vlákno je získáno vlivem tvaru otvoru ve srážecí hlavě (Obrázek 10) [39].



Obrázek 9 – řez membránou ve formě dutého vlákna [39]



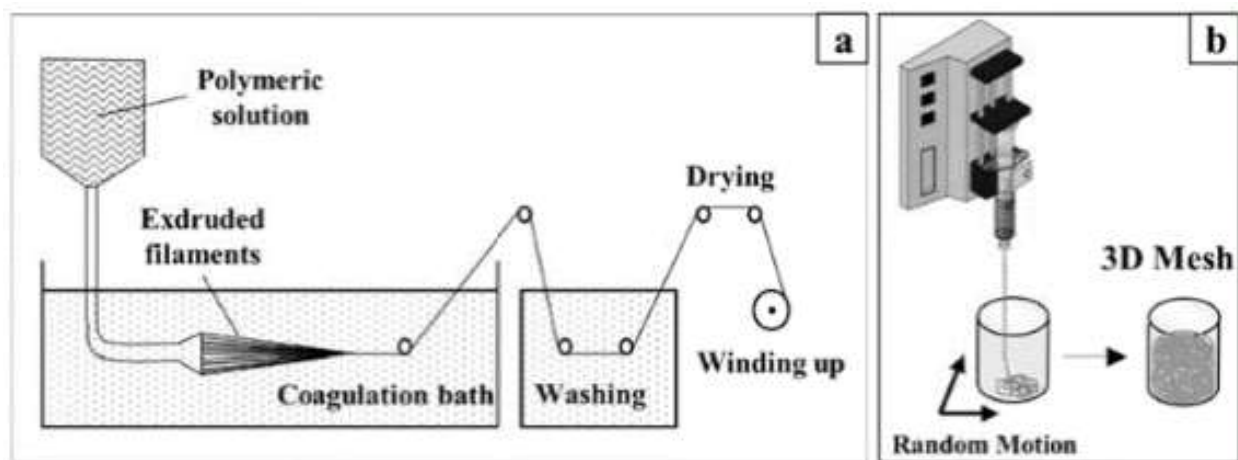
Obrázek 10 – uspořádání trysky pro tvorbu membrány ve formě dutého vlákna [39]

Tvar zvláknovací trysky tedy je důležitým faktorem procesu, kdy můžeme použít širokou paletu možných morfologií a uspořádání od nejjednoduššího kruhového otvoru, přes hvězdovitý tvar, až po již zmíněnou trubičku. Jsou známy i systémy, kdy vznikají kompozitní vlákna vytvořené za pomoci trysky tvořené jehlou v jehle a dvěma odlišnými přívody roztoků. Taktéž je možné použít paralelní uspořádání dvou otvorů vedle sebe a vytvoření spleného dvojevlákna. V průmyslovém uspořádání je běžné mnoha tryskové uspořádání, které se následně sbíhá v multifilament, se kterým se poté manipuluje vcelku [41, 42].

Faktory týkající se roztoku polymeru jsou především koncentrace a teplota. Vyšší koncentrace je preferována vzhledem k menší finanční náročnosti a celkové rychlosti produkce. To, jak jsou rychle vlákna produkována závisí na koncentraci, rychlosti srážení a obecně na vlastnostech kompletně nevysráženého vlákna, označovaného anglicky jako „protofiber“, a které musí vykazovat mechanickou soudržnost, jelikož se jedná o stav mezi roztokem polymeru a kompletně vysráženého vlákna. Může tak docházet snadno k odtržení, což znemožňuje návin. Tyto charakteristiky se v důsledku projeví na rychlosti navíjení, která je v porovnání s metodami suchého a extruzního zvláknování mnohem nižší. Rychlost navíjení poté logicky souvisí i s rychlostí tlačení roztoku skrze zvláknovací trysky a musí být tyto dva parametry spřažené [39].

Počet srážecích lázní často přesahuje jednokrokový přístup. Ať už se jedná o chemicky naprosto odlišné směsi nebo o koncentrační gradient, přičemž v první srážecí lázni může být vyšší koncentrace rozpouštědla zvláknovaného polymeru, a to z toho důvodu, aby nedošlo ke skokovému vysrážení, ale k postupnému tvrdnutí a možnosti vlákno dloužit. Případně se za poslední srážecí lázeň zavádí nádrž s vodou nebo s rozpouštědlem, která zbavuje vlákno zbytků předchozí lázně. Pěkným příkladem budiž zvláknění chitosanu ze zředěného roztoku kyseliny octové, který je zaváděn do silně alkalické lázně. Vlákno je ovšem ihned vytahováno a zaváděno do lázně s vodou, kdy se jednak vymyje roztok hydroxidu, ale především se naředí a vymyje i stále nezneutralizovaný vnitřek vlákna a vznikne tak vlákno duté bez nutnosti používat speciální zvláknovací trysky. Charakteristikou lázně je mimo samotné složení i teplota, která hraje zásadní roli, pro důkladné vysrážení. Platí, že při nižší zvolené teplotě je srážení efektivnější [40].

Výhodou metody je snadné uspořádání v laboratorním měřítku, které se sestává v podstatě pouze z lineárního dávkovače, definované trysky, což může být i jehla, a srážecí lázně v podobě kádinky. Oproti průmyslovému zařízení se jedná o velmi nenákladné a variabilní uspořádání (Obrázek 11). S takto primitivním zařízením lze získat velmi zajímavé materiály, jelikož variabilita metody tkví v použitých polymerech, rozpouštědlech a precipitační lázni. Vlivem aditiv nebo zvláknovaného materiálu pro emulzní zvláknění je tak možné získat jedinečné materiály [39, 40].



Obrázek 11 – Srovnání průmyslového a laboratorního uspořádání mokrého zvláknování [40]

Tato jednoduchost přilákala zájem ze strany tkáňového inženýrství, což je důležitý aplikační segment biopolymerů. Spojení mokrého zvláknování s 3D tiskem dalo vzniknout materiálům pro regenerativní medicínu. Na tomto poli byl studován prvně PCL a následně kopolymer hydroxybutyrátu s hydroxyhexanoátem s označením PHBHH (rodina PHA). Pro zvláknění byly použity vysoké koncentrace – kolem 25 %. Vlivem této koncentrace bylo dosaženo tlustých vláken s makroporozitou v oblasti desítek mikrometrů (Obrázek 12) [43, 44].

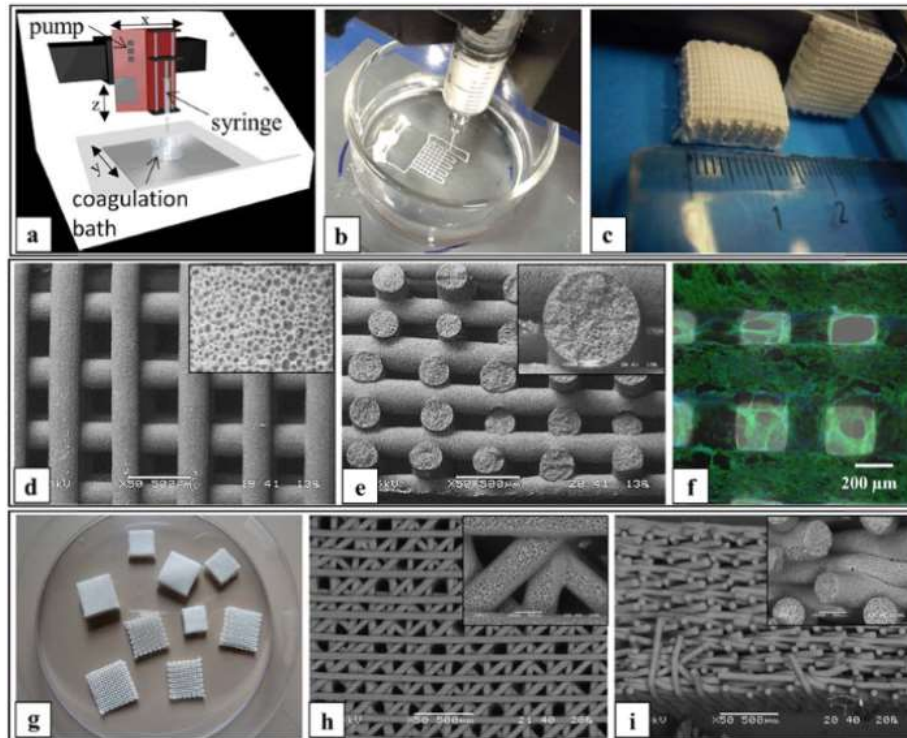
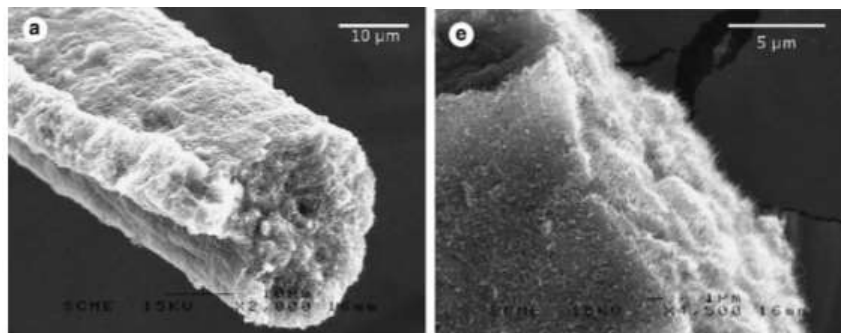


Figure 4. Polymeric scaffolds by computer-aided wet-spinning (CAWS): (a) schematics of CAWS apparatus and (b) representative photograph of the layer-by-layer fabrication process;⁵² representative (c) photograph and (d, e) SEM micrographs of PCL scaffolds, and (f) Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) micrograph of MC3T3-E1 preosteoblast cells cultured *in vitro* on PCL scaffolds (day 35);⁸ representative (g) photograph, and (h) top view and (i) cross-section SEM micrographs of PHBHHx scaffolds.⁵³

Obrázek 11 – Spojení mokrého zvláknění a 3D tisku za vzniku makroporézních biomateriálů [43]

Využití možnosti emulzního zvláknování pro přípravu nanostrukturovaných mikrovláken je nasnadě. Bylo toho využito pro přípravu vláken z uhlíkových nanotrubiček. Připravené nanotrubičky byly dispergovány za pomoci dodecylsulfátu sodného a společně se směsí ethanolu a glycerolu byly extrudovány skrze zvláknovací trysku. Jako srážecí lázeň je použit vodný roztok dusičnanu hlinitého. Následně byl vymyt glycerol a takto byly získány čistá mikrovláknna tvořená nanotrubičkami (Obrázek 12) [45].



Obrázek 12 – mikrovláknno z uhlíkových nanotrubiček [45]

Samozřejmou variantou vyplývající z obrázku 11b je metoda označována za gravitační mokré zvláknování. Spočívá pouze ve faktu, že vlákna nejsou horizontálně vedena lázní, ale že se ukládají na dno srážecí lázně. V určitých variantách může docházet k dloužení protovláknna, kdy k vysrážení dochází až v určité vzdálenosti od zvláknovací trysky. Nezbytným předpokladem gravitačního zvláknění je vyšší

hustota sráženého vlákna než hustota srážecí lázně. Jinak by docházelo k „vyplavání“ vlákna na hladinu a nedokonalému vysrážení. Takto byly vytvořeny vlákna z PCL. Roztok polymeru byl v acetonu a srážecí lázeň byla tvořena methanolem. Zajímavý je fakt, že při nízké koncentraci polymeru nedocházelo k tvorbě vláken a proces byl úspěšný pouze při koncentraci přesahující 6 hm. % (Tabulka 2). S rostoucí koncentrací roztoku klesala ale paradoxně rychlost produkce. To je vysvětleno právě gravitačním způsobem zvláknění, jelikož nedochází u tohoto způsobu k tlačení roztoku dávkovačem, ale pouze k volnému toku roztoku. Vyšší koncentrace je spojená pak s vyšší viskozitou, a tedy pomalejším tokem přes stejně širokou trysku v jednotlivých případech. To se projevuje i na tloušťce vlákna, kdy u nejnižší koncentrace je dosaženo nevyššího průměru, a to z důvodu rychlosti průtoku a pomalejšímu dloužení protovlákna [46].

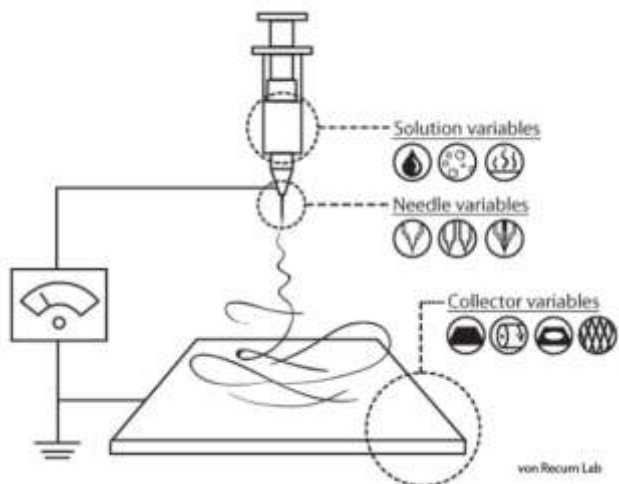
Tabulka 2 – vlastnosti mokrého zvláknění a PCL vlákna v závislosti na koncentraci [46]

PCL solution concentration (%)	Fibre production rate (m/min)	Fibre diameter (μm)
5	Fibres not formed	—
6	2.5 ± 1.0	190.0 ± 52.2
10	2.1 ± 0.6	153.3 ± 4.7
15	1.9 ± 0.6	151.7 ± 6.2
20	0.9 ± 0.1	147.6 ± 4.7

Na závěr této části věnované širšímu popisu mokrého zvláknění je možné říct, že ačkoliv je metoda na první pohled jednoduchá, tak dokonalé zvládnutí technologie vyžaduje dlouhou a náročnou optimalizaci podmínek. Laboratorní verze procesu pak nabízí širokou paletu možností pro výzkumné záměry a aplikace. Největší výhodou tohoto způsobu tvorby vláken je fakt, že umožňuje práci i s polymerními systémy, které jsou teplotně citlivé nebo z jiných důvodů nezvláknitelné z taveniny.

2.5 Elektrostatické zvláknění

Elektrostatické zvláknění (elektrospinning; electrospinning) je postup přípravy nanovláken a zároveň obecně nanomateriálů s vysokou přidanou hodnotou, například filtračních membrán. Při prvním pohledu na schéma aparatury je snad možné prohlásit, že se jedná o principiálně jednoduchou techniku (Obrázek 13) [47]. Kapitola popisující elektrostatické zvláknění je převzata z diplomové práce autora [47].



Obrázek 13 – Schéma jednoduchého zařízení pro elektrostatické zvláknění [47]

Zařízení na elektrostatické zvláknění se skládá ze zdroje vysokého napětí, který je připojen na jehlu injekční stříkačky, ve které se nachází zvláknovací roztok. Ta bývá nejčastěji usazena v lineárním dávkovači. Ve vzdálenosti několika jednotek až desítek centimetrů od jehly je ustaven uzemněný kolektor,

který je tvořen kovovým plechem. Na lineárním dávkovači je nastaven průtok a po jeho zapnutí je roztok tlačěn skrze jehlu, na jejímž konci se vytváří kapička. Simultánně je zapnuto vysoké napětí. Vlivem vzniklé elektrostatické síly potenciálového rozdílu je z kapky vysokou rychlostí vytahováno vlákno, které během letu ke kolektoru tuhne, až utváří vrstvu netkané nanovlákněné textilie. [48] Tento prvotní popis bude zatím stačit jako základna pro popsání mnoha proměnných, vlivů a mezních stavů tohoto vnitřně velmi komplikovaného procesu, ve kterém je po delším studiu možné nalézt obecně platné zákonitosti. Je potřeba zmínit, že úspěšné zvláknění mnohdy závisí na nalezení kompromisu mezi parametry a práce tak často bývá prováděna na základě empirie.

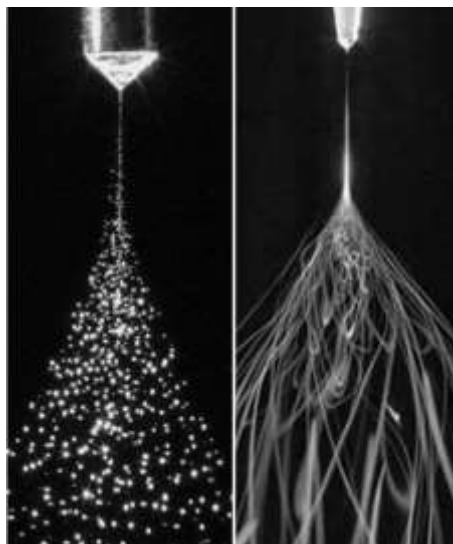
- Parametry určující zvláknovací proces je možné rozdělit na tři skupiny:
- Parametry roztoku (viskozita, vodivost, povrchové napětí a další)
- Parametry zařízení (napětí, vzdálenost elektrod, tvar kolektoru a další)
- Parametry prostředí (teplota, vlhkost vzduchu, atmosféra a další)

Po uvedení těchto souvislostí bude popsán průmyslový způsob elektrostatického zvláknování.

2.5.1 Parametry zvláknovaného roztoku

Nejdůležitějším krokem při elektrospinningu je výběr systému polymer-rozpouštědlo. Z této volby jednak vyplývají chemické a mechanické vlastnosti nanovláken, ale především zda vůbec zvláknování bude úspěšné. V době sepsání této práce byla již zvlákněna většina technicky a průmyslově důležitých polymerů jako například jsou PU, PA-6, PE, PS, PVDF, PVAc, PAN, PVC, PMMA, PET a mnohé další. Z biopolymerů je vhodné zmínit chitosan, PLA, PCL, PHB či celulózu a její deriváty. Důležitou skupinou, především pro účely této práce, jsou vodou rozpustné polymery jako je PEO, PVP a PVA [49].

U polymeru je velmi důležitá rozpustnost ve zvoleném rozpouštědle a výsledné vlastnosti roztoku, kterými jsou viskozita, elektrická vodivost, povrchové napětí a v neposlední řadě těkavost. Rozpustnost, koncentrace, kterou je možné v systému dosáhnout, viskozita a další parametry přímo souvisí s molekulovou hmotností a polydisperzitou polymeru. Obecně platí, že při velmi nízkých koncentracích polymeru v roztoku a nízké viskozitě roztoku místo electrospinningu pozorujeme electro spraying [50] (Obrázek 14).



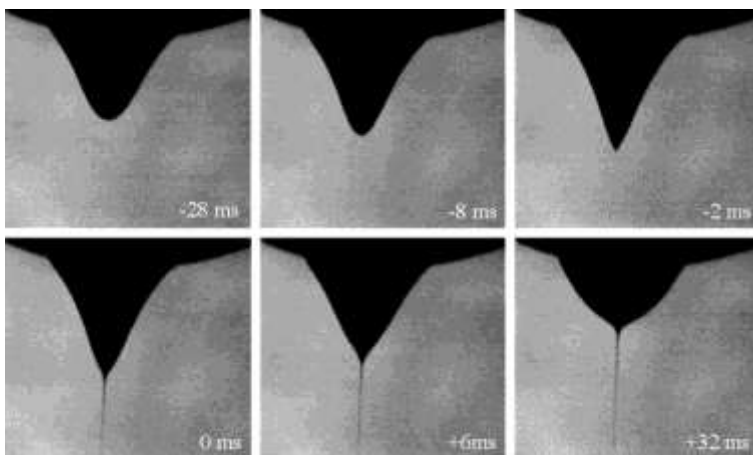
Obrázek 14 – Fotografie electro sprayingu (vlevo) a electrospinningu (vpravo) [51]

Oba tyto děje jsou založeny na společném jevu, který vzniká vlivem intenzivního pole, tzv. Taylorův kužel (Obrázek 15), útvar vzniklý navzdory povrchovému napětí roztoku. Pokud aplikované vysoké napětí

přesáhne kritickou hodnotu, ze špičky kužele vytryskne proud roztoku, který je buď rozprášen (electrospraying) nebo protažen ve vlákno (electrospinning) [52].

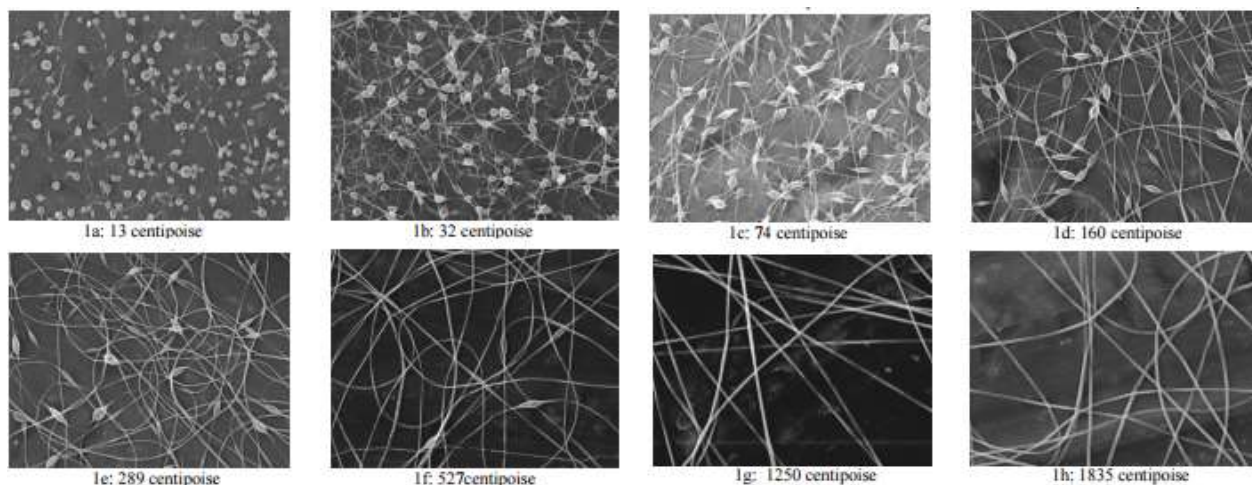
2.5.1.1. Vliv koncentrace polymeru a viskozity

Při koncentraci a viskozitě polymerního roztoku, kdy začne nad tvorbou kapek převládat zvlákňování, pozorujeme stále jisté defekty ve vlákenné struktuře připomínající protažené kapky, neboli perličky (anglicky beads). Jedná se o nejčastější defekt, který je způsoben kapilárním roztržením (anglicky capillary breakup), kdy povrchové napětí roztoku je natolik vysoké, že kapalina se formuje do útvarů o nejnižší energii. Propojení mezi perličkami je ovšem zachováno.



Obrázek 15 – Formace Taylorova kužele a vznik proudu roztoku [52]

Průměr takto vzniklých vláken bývá jednak vzhledem k nízké koncentraci roztoku a taktéž díky popsaným defektům velmi malý (někdy i desítky nanometrů). Se zvyšující se viskozitou a koncentrací polymeru v roztoku narůstá průměr vláken, zatímco počet perličkových defektů se snižuje a ty zbývající se protahují. Při určité koncentraci jsou získána vlákna bez defektů, ovšem v porovnání s prvotním příkladem je průměr vlákna několikanásobný [50] (Obrázek 16).



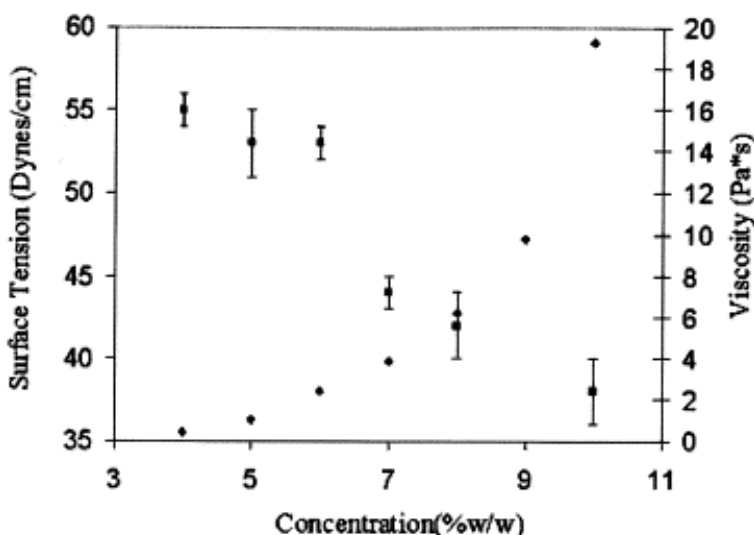
Obrázek 16 – Závislost morfologie vláken na viskozitě zvlákňovaného roztoku [50]

Obrázek 16 je převzat z literatury [50], kde byla studována tvorba perličkových defektů v závislosti na procesních parametrech electrospinningu vodného roztoku polyethylenoxidu. Jednotka 1 „centipoise“ zmíněná v popisech jednotlivých obrázků odpovídá 1 mPa·s. Pro ilustraci dynamická viskozita vody při 20

°C činí přibližně 1 mPa·s, olivového oleje 100 mPa·s, glycerolu 1500 mPa·s a medu přibližně 10000 mPa·s [53].

Příliš vysoká koncentrace polymeru v roztoku často vede k samovolné, teplotně reverzibilní gelaci [54]. To bývá při electrospinningu velký problém, protože vzniklý gel ucpává jehlu a je pro zvlákňování nepoužitelný. Často se stává, že roztok ztuhne, až v injekční stříkačce během zvlákňování, což vede k hromadění náboje v injekční stříkačce potažmo v celém lineárním dávkovači, který pokud není uzemněn, bývá takto často poškozen. Stabilní, ale vysoce koncentrovaný roztok taktéž není vhodný, buď z důvodu produkce vláken s příliš velkým průměrem, nebo kvůli vysoké viskozitě, která brání vytvoření Taylorova kužele [55]. Vysoce koncentrovaný roztok polymeru v rozpouštědle, které se snadno vypařuje (například chloroform) navíc často předčasně ztuhne ještě během zvlákňování, což na jednu stranu může vést k vytvoření 3D mikrovlákných struktur [56], ale pro vytvoření jednotných vrstev s nízkým průměrem vláken je, pokud pomíneme aktivaci, nevhodný [57].

Koncentrace polymeru v roztoku a jeho viskozita úzce souvisí taktéž s povrchovým napětím. To v prvé řadě působí jako protisíla při tvorbě Taylorova kužele a zároveň způsobuje perličkové defekty vlivem kapilárního roztržení. Je tedy vhodné do určité míry pracovat s roztokem o nižším povrchovém napětí [50]. V předešlém odstavci bylo zmíněno, že zvýšením koncentrace polymeru v roztoku se dá předejít přítomnosti perličkových defektů. To je spojeno většinou právě se snížením povrchového napětí (Obrázek 17).



Obrázek 17 – Závislost viskozity a povrchového napětí na koncentraci polymeru [55]

Na obrázku 17 je možné vidět, že viskozita výrazně roste s koncentrací, zatímco povrchové napětí (symboly s chybovou úsečkou) klesá. Mohlo by se zdát, že tedy vysoce koncentrované roztoky jsou pro zvlákňování ideální, ale jak již bylo zmíněno, není tomu vždy tak. V praxi se hledá vhodné koncentrační rozmezí, případně se vhodnými aditivami upravují reologické vlastnosti roztoku [58]. Koncentrace odpovídající průsečíku křivek závislostí viskozity a povrchového napětí by mohla být označena za nejvhodnější pro zvlákňování, ale ani toto tvrzení není možné zobecnit vzhledem k mnoha dalším parametrům zvlákňovacího procesu.

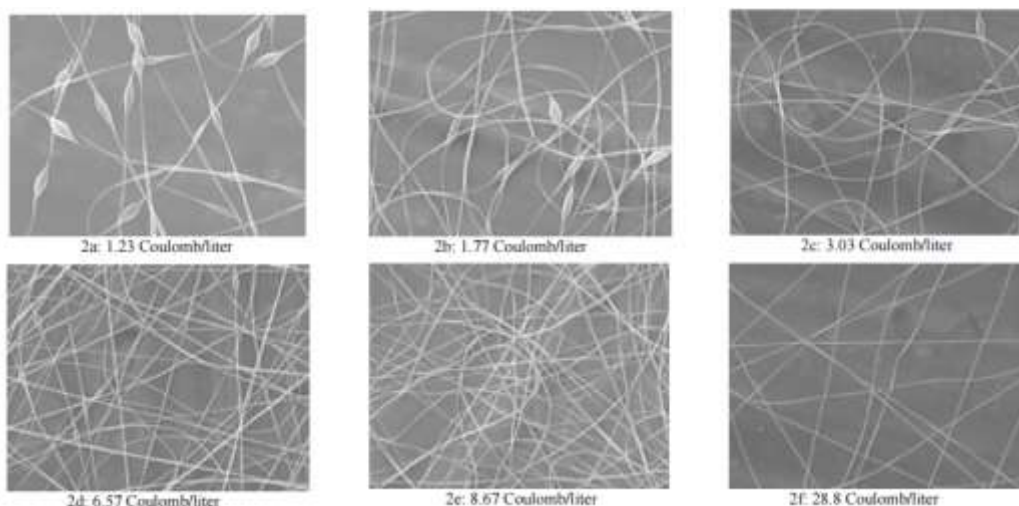
2.5.1.2 Vliv elektrické vodivosti roztoku

Jedním z nich je elektrická vodivost roztoku. Roztoky s nízkou elektrickou vodivostí je obtížné zvlákňovat [59], a pokud už je to možné, tak morfologie vláken není ideální, objevují se perličky a velké průměry vláken [50]. Výkonnost procesu, tedy přenos vlákně hmoty za jednotku času, bývá nízký. Je

nutné podotknout, že opět výkonnost nezávisí pouze na elektrické vodivosti, ale na kombinaci všech parametrů v čele s výparností a vhodností použitého rozpouštědla, použitým napětím a průtokem nastavenému na lineárním dávkovači. Parametrem, který ovlivňuje průměr vláken a je závislý na vodivosti zvlákněvaného roztoku je objemová hustota prošlého náboje, ρ_q [60]. Jednotka této veličiny je coulomb na litr [C/l] a získá se jako součin proudu I prošlého mezi elektrodami [A], času t po který je zvlákněováno [s], koncentrace roztoku c [hm. %], hustoty roztoku ρ [kg/l], tento součin je vydělený hmotností vláken m , sbíraných na kolektoru (Vztah 1) [61].

$$\rho_q = c\rho_{roztok} \int_0^t I dt / m_{vlákna} \quad (1)$$

Objemová hustota náboje je obecně závislá na vodivosti roztoku. Důvody zlepšení zvláknování (menší množství defektů, menší průměr vláken, výkonnost) při zvýšení vodivosti roztoku jsou výborně popsány ve studii profesora Renekera [50]. Na modelovém příkladu zvláknování polyetylen oxidu ve vodě s přísádkou chloridu sodného pozoruje zvýšení vodivosti roztoku a následně i objemové hustoty náboje při elektrostatickém zvláknování. Přísádku soli ovšem nesnižuje odpor roztoku natolik, aby se projevila iontová vodivost v tryskajícím a odpařujícím se roztoku, avšak umožňuje koncentrování náboje uvnitř a na okraji jehly, kde se tvoří Taylorův kužel. Vyšší koncentrace náboje zvyšuje síly působící na tryskání roztoku, což zapříčiňuje menší průměr vláken a potlačuje mechanismus tvorby perličkových defektů (Obrázek 18) [50].



Obrázek 18 – Závislost morfologie vláken na objemové hustotě náboje [50]

2.5.1.3 Vliv druhu rozpouštědla

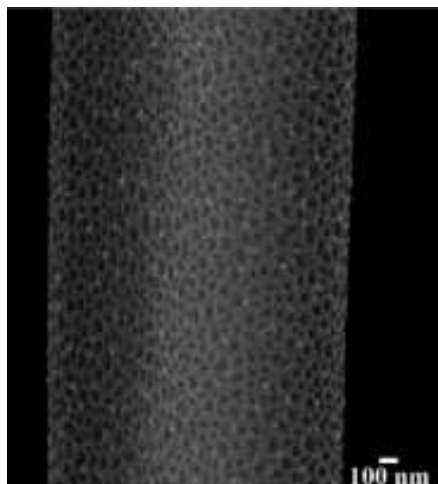
Volba rozpouštědla vhodného pro elektrostatické zvláknování je v první řadě řízena tím, zda je kompatibilní se zvlákněvaným polymerem a případnými aditivy. Roztok musí být stabilní a složky by spolu neměly reagovat. U rozpouštědla a vzniklého roztoku sledujeme všechny doposud zmíněné charakteristiky jako elektrickou vodivost, povrchové napětí a viskozitu. Další informací může být dipólový moment a dielektrická konstanta rozpouštědla. Důležitou vlastností je tenze par, bod varu a s těmito vlastnostmi spojená výparnost rozpouštědla [59]. Jelikož je ale tato problematika mimořádně rozsáhlá a do jisté míry závislá na empirii, bude popsáno několik příkladů, které lépe nastíní souvislosti vedoucí k volbě vhodného rozpouštědla.

Experimentálně bylo zjištěno na opakovaných studiích zvláknování polystyrenu, že rozpouštědla s vysokým dipólovým momentem vykazují velmi dobré výsledky jak ve výkonnosti procesu, tak i ve výsledné morfologii vláken [62]. Mezi tato rozpouštědla patří například DMF, DMAc nebo DMSO. DMF

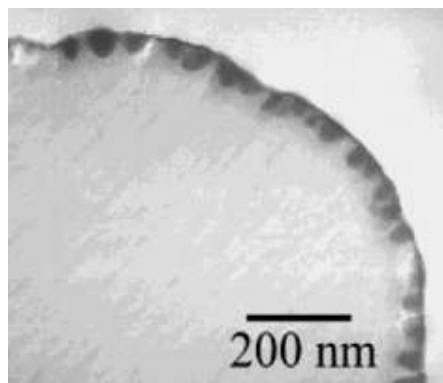
patří mezi nejpoužívanější rozpouštědla v elektrostatickém zvlákňování z mnoha důvodů [63, 64, 65] Rozpouští velké spektrum polymerů, včetně PVDF, PU, PAN nebo PMMA. Vyznačuje se nízkou výparností, vysokým bodem varu a schopností rozpouštět alkylamonné soli [66], velmi používaný je například bromid tetraethyl amonný, TEAB nebo chlorid lithný [67]. Nevýhodou DMF i DMAc je toxicita, která omezuje použití pro kosmetické a medicínské aplikace. Stále aktuálním průmyslovým problémem je, zda a kolik zbytkového rozpouštědla zůstává ve vzniklých nanovlákních.

V mnoha případech roztok polymeru pouze v jednom druhu rozpouštědla nevykazuje parametry použitelné pro kvalitní a výkonné zvlákňování. Příkladem budiž zvlákňování vodného roztoku polyethylenoxidu, do kterého se přidává ethanol pro zvýšení viskozity, snížení povrchového napětí a zvýšení výparnosti [68]. V případě zvlákňování polyhydroxybutyrátu PHB [69] nebo polymléčné kyseliny PLA [70] se do jejich chloroformového roztoku přidává DMF pro snížení výparnosti roztoku a tím snížení průměru vláken a zvýšení koncentrační stability roztoku.

Volbou vhodného rozpouštědla se dá ovlivňovat morfologie vzniklých vláken nejen v rámci průměrů, ale i struktury. Porézní struktury se dá snadno dosáhnout použitím rozpouštědla s vysokou výparností (Obrázek 19). Přidavkem takového rozpouštědla do výše vroucího roztoku je možné dosáhnout podobného efektu [71]. Snímek z elektronového mikroskopu ukazuje takto připraveného vlákna. Je-li ale pořízen snímek v řezu na transmisním elektronovém mikroskopu (Obrázek 20), vidíme, že se jedná pouze o povrchovou strukturu. Výsledná morfologie nezávisí pouze na aditivaci, ale především na vlhkosti vzduchu při zvlákňování. Mechanismus tohoto jevu je popsán v kapitole o parametrech prostředí.



Obrázek 19 – Struktura vlákna z roztoku s vysokou výparností rozpouštědla [71]



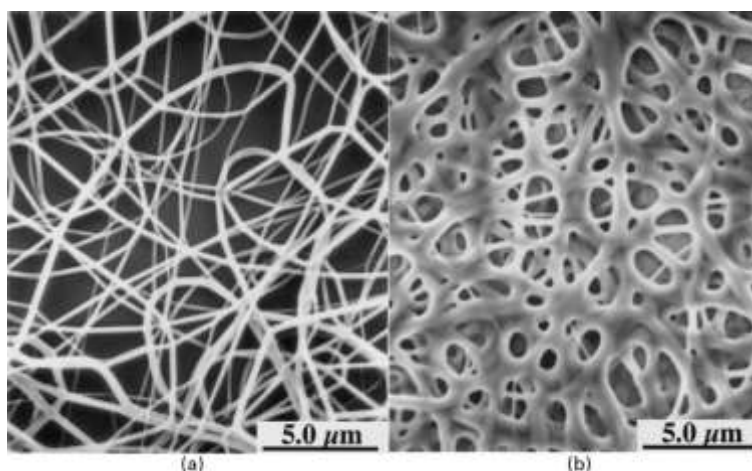
Obrázek 20 – TEM snímek řezu povrchově porézního vlákna [71]

2.5.2 Parametry zvlákňovacího zařízení

Jak bylo popsáno v úvodu, zařízení na elektrostatičké zvlákňování se v nejjednodušším uspořádání skládá ze tří částí, zdroje vysokého napětí, dávkovacího zařízení s injekční stříkačkou, ve které je zvlákňovací roztok a uzemněným kolektorem. Z tohoto uspořádání můžeme vyvodit možné varianty. Nejdříve budou popsány ty proměnné, které nejvíce souvisí se zvlákňovacím roztokem a již popsanými veličinami.

2.5.2.1 Parametry zdroje vysokého napětí

Elektrodová vzdálenost je definována jako vzdálenost od hrotu jehly k nejbližšímu bodu kolektoru. Zásadně ovlivňuje celý proces, protože se vzrůstající vzdálenosti klesá intenzita elektrického pole. Zároveň ale dostatečná dráha letu vláken umožňuje jejich protažení do nanoskopických průměrů. Dostatečná elektrodová vzdálenost je velmi důležitá pro vznik jednotlivých navzájem neslepených vláken, a to z důvodu potřebné doby vypaření a zpevnění vlákna (Obrázek 21). Byly popsány varianty, kdy vzdálenost neměla na morfologii zásadní vliv, ale v mnoha případech snížení vzdálenosti a tím zvýšení síly elektrického pole způsobuje přítomnost perličkových defektů z důvodu nárůstu nestability tryskání. Pokud je naopak vzdálenost příliš velká tak síla pole je zanedbatelná a na kolektoru se vlákna neukládají [59].



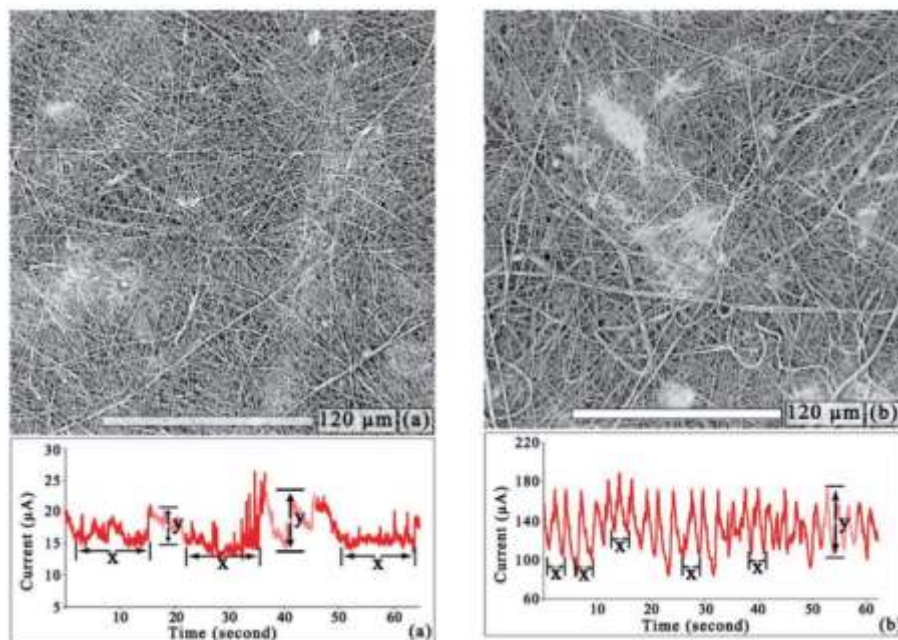
Obrázek 21 – SEM snímek PA vláken při vzdálenosti elektrod 2 cm (a) a 0,5 cm (b)[59]

Síla elektrického pole je vedle elektrodové vzdálenosti určena především aplikovaným napětím na zvlákňovací jehlu. Používají se napětí od několika kilovoltů až po desítky kilovoltů, a to i na obou elektrodách, kdy se na kolektor zavádí záporný potenciál. Tím se velmi dobře fokusuje tryskající svazek vláken. Nejčastěji je na jehlu aplikován kladný pól a je použito stejnosměrné napětí. Byly popsány případy, kdy je výhodné na zvlákňovaný roztok aplikovat záporné napětí anebo i střídavý proud, ale nejedná se o příliš využívané podmínky [59].

Aplikované vysoké napětí a jím vzniklá elektrostatičká síla musí překonat povrchové napětí roztoku, aby z takto vzniklého Taylorova kužele začaly tryskat vlákna směrem ke kolektoru. Tato vlákna jsou nositelem elektrického proudu mezi jehlou a kolektorem. Pokud zapojíme mezi kolektor a zem citlivý ampérmetr dostaneme tak velmi důležitý vhlad do celého procesu. Prošlý proud v závislosti na čase dává poznat kolik a zda vůbec docházelo k přenosu hmoty a pokud proud integrujeme dle času, získáme nezbytnou hodnotu pro výpočet objemové hustoty náboje, dle již popsané rovnice 1. Z tvaru závislosti prošlého proudu na čase a jejich výkyvů také dokážeme určit, zda během procesu docházelo k electro sprayingu nebo kdy se například z jehly odtrhla kapka roztoku (Obrázek 22). V reálném čase pak dokážeme odhadnout, zda vlákna budou morfologicky v pořádku anebo bude zvlákněná vrstva obsahovat defekty nebo naprášené kapičky. Procházející proud I je možné odhadnout za pomoci empirické rovnice 2. E je síla elektrického pole, Q je nastavený průtok a K je vodivost roztoku.

$$I_{\text{celkový}} = EQ^{0,5}K^{0,4} \quad (2)$$

Tohoto výpočtu lze využít pro hrubý odhad výkonů zvláknování a výsledných morfologií jen na základě měření vodivosti vzorku [72]. Hodnotu síly elektrického pole lze snadno určit jako podíl použitého rozdílu napětí poděleného vzdáleností mezi elektrodami [kV/cm].



Obrázek 22 – Závislost morfologie vláken na profilu prošlého proudu [72]

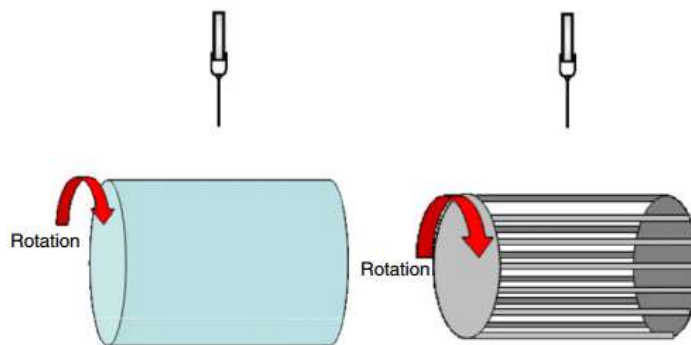
Na předchozím Obrázku 22 lze vidět závislosti procházejícího proudu na čase a morfologii vzniklých vrstev nanovláken z roztoku 20 hm.% PU (a) a 20 hm.% PU s přidavkem 1,27 % TEAB (b). Přídavek soli zvýšil podstatně procházející proud. Na závislosti jsou vidět i vyšší absolutní oscilace procházejícího proudu (úsečky y). Morfologie vláken je podstatně odlišnější vzhledem k většímu průměru vláken v druhém případě [73].

Nastavený průtok hraje roli hlavně ve stabilitě tryskání vláken. Přílišný průtok vzhledem k dalším parametrům se projeví buď zvětšením průměru vláken anebo zvětšováním kapičky na hrotu jehly a jejím následným odtržením. V takovém případě může dojít k narušení vrstvy vláken. Naopak nedostatečný průtok snižuje výkonnost procesu a může vést k nerovnoměrné distribuci průměrů vláken. Hledáme tedy podobně jako u jiných parametrů stabilní, střední cestu [59].

2.5.2.2 Parametry kolektoru

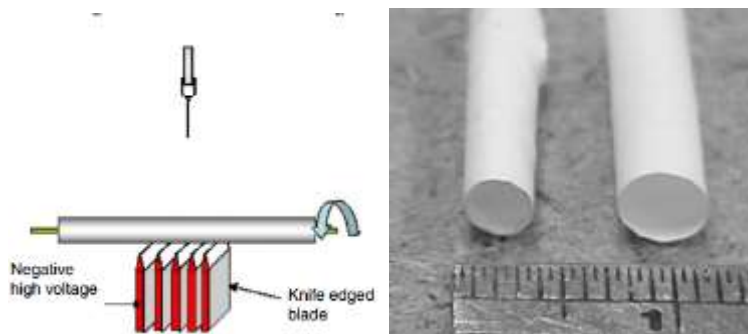
Doposud byl použit v příkladech pro jednoduchost jako kolektor kovový uzemněný plech. Variabilita použitelných kolektorů dává electrospinningu nový rozměr, co se týče možného tvarování vláken a jejich konečné aplikace-[74]. Pro značnou rozsáhlou budou uvedena pouze některá, nejdůležitější uspořádání.

Pro získání většího množství nanovláken v laboratorním měřítku se běžně používá otočný válec o různých průměrech a rychlosti otáčení. Pokud válec není tvořen jednotným povrchem, ale paralelními dráty získáme uspořádaná vlákna ve víceméně pravém úhlu vůči napnutým strunám (Obrázek 23).



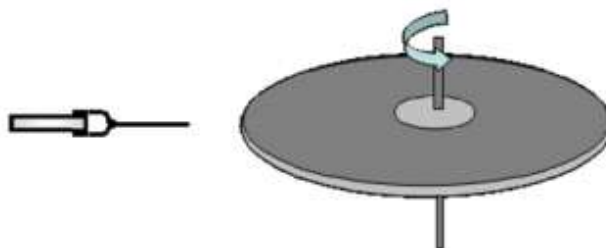
Obrázek 23 – Válcové kolektory pro netkaná a uspořádaná nanovlákná [74]

Pokud máme k dispozici zdroj negativního vysokého napětí, snadno můžeme vytvořit zařízení pro získání trubičky z paralelně uspořádaných nanovláken. Průměr takové trubičky se omezuje do přibližně jednoho až několika centimetrů. Na paralelně uspořádané nože je přivedeno negativní napětí, nad nimi je postavena velmi rychle rotující tyč, kolem které se vlákna uspořádávají. Po zvláknění můžeme z tyče stáhnout trubičku, která pokud je z vhodného biokompatibilního materiálu, může sloužit v tkáňovém inženýrství jako pomocný materiál pro obnovu cév (Obrázek 24). Pokud v uspořádání vynecháme negativně nabitě nože, získáme trubičku bez paralelního uspořádání vláken.



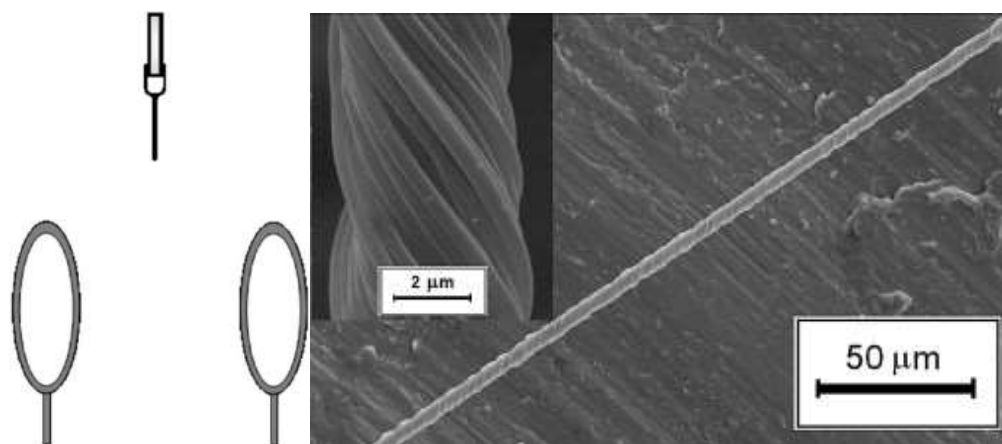
Obrázek 24 – Kolektor pro získání trubičky s paralelně uspořádanými vlákny [74]

Pro získání makroskopického multifilamentu z paralelně uspořádaných nanovláken je možné použít rychle rotující ostrý disk (Obrázek 25). Vlákna se ukládají po obvodu disku.



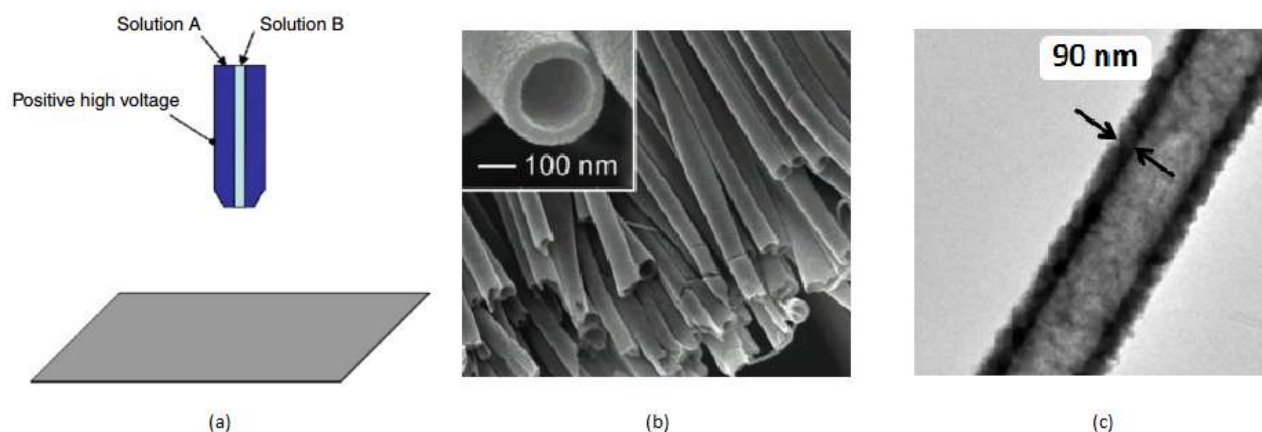
Obrázek 25 – Kolektor pro získání multifilamentu z nanovláken [74]

Zapředený nanovlákný multifilament je možné připravit, když použijeme dva uzemněné kruhové kolektory uspořádané proti sobě (Obrázek 26).



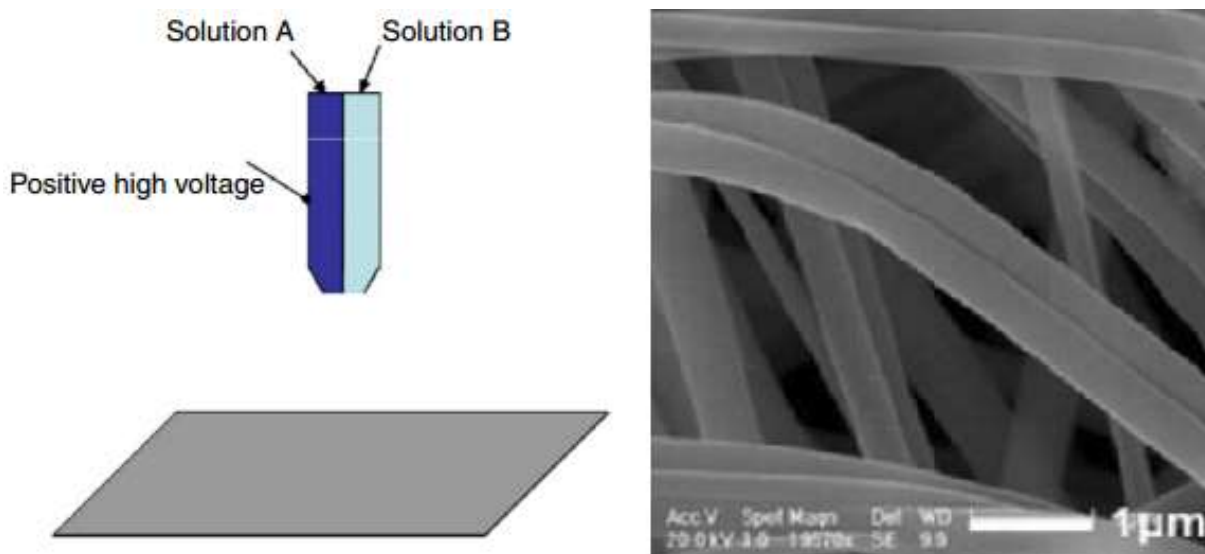
Obrázek 26 – Kolektor pro získání zapředeného multifilamentu [74]

Podobnou variabilitu jako uspořádání kolektoru nabízí i možnost opačné elektrody, tedy v nejjednodušším případě jehly. Při použití tohoto nejjednoduššího uspořádání dochází často k zasychání hrotu jehly. Aby se předešlo tomuto negativnímu jevu, byl zaveden tzv. koaxiální electrospinning (Obrázek 27a). Názorně řečeno jedná se o jehlu uvnitř jehly. Do vnitřní jehly je aplikován původní polymerní roztok a do vnějšího pláště rozpouštědlo, které brání zaschnutí trysky. Toto uspořádání, po modifikaci, kdy byly zaměněny roztoky, tak aby polymerní roztok byl ve vnější jehle, otevřelo cestu pro tvorbu složitějších nanovláknenných struktur, jako jsou kontinuální nanotrubičky (Obrázek 27b) nebo core-shell nanovláknna (jádro-plášť) (Obrázek 27c). Další variantou je tzv. triaxilní electrospinning, který vznikne použitím dvou plášťů, tedy tří jehel v sobě.



Obrázek 27 – Koaxiální electrospinning a možné struktury [74]

Méně využívaným, ale dozajista zajímavým zařízením je jehla pro tzv. „side-by-side“ electrospinning. Jedná se o jehlu rozpůlenou přepážkou umožňující oddělený přívod dvou roztoků. Na špičce se oba roztoky potkávají a je z nich vytažen společný Taylorův kužel. Vlivem správné volby obou roztoků ale nedochází k mísení a vzniká dvojitě až půlené vlákno s rozdílným složením na každé straně (Obrázek 28).



Obrázek 28 – Side-by-side electrospinning [74]

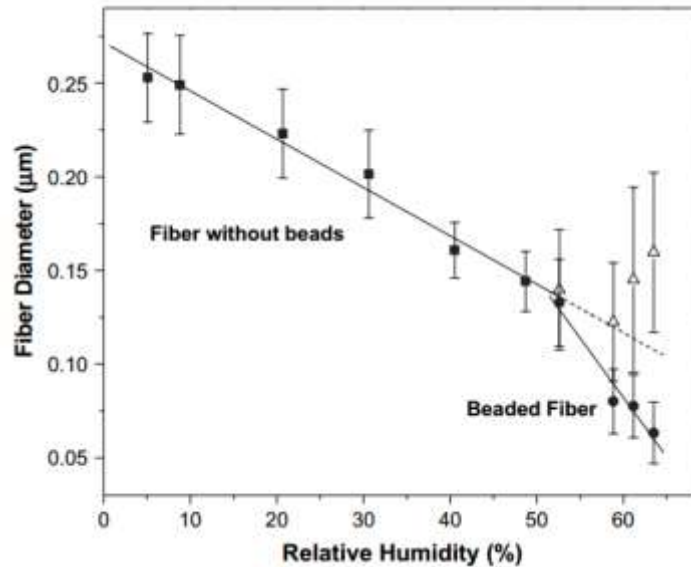
2.5.3 Parametry prostředí

Nejdůležitějšími, a i v průmyslovém zvlákňování kontrolovanými, parametry jsou teplota a vlhkost vzduchu. Oba parametry výrazně ovlivňují výparnost roztoku a tím celý zvlákňovací proces. Bylo zjištěno, že při vysoké relativní vlhkosti vzduchu a vhodně vysoké výparnosti rozpouštědla se na povrchu vláken častěji objevují póry. Tento jev je způsoben kondenzací vody vlivem rychlého ochlazení povrchu vlákna, kapičky vody takto penetrují strukturu vlákna. Bylo zjištěno, že hloubka pórů se zvětšuje s rostoucí vlhkostí [59].

Morfologie povrchu vlákna je důležitým prvkem, ale vlhkost vzduchu ovlivňuje především samotné zvlákňování a výsledný průměr vláken. Čím je vlhkost vyšší, tím pomalejší je rychlost vypařování rozpouštědla během tryskání vláken. Při správném nastavení vlhkosti je tak možné získat vlákna s velmi nízkým průměrem, a to z důvodu delší doby elasticity pro protažení vláken během electrospinningu. Na modelovém příkladu zvlákňování polyethylenoxidu z vodného roztoku byla dokumentována závislost průměru vláken na relativní vlhkosti (Obrázek 29) [75]. Při vysoké vlhkosti se začaly objevovat perličkové defekty vláken.

Bylo popsáno, že atmosféra vzhledem k chemickému složení ovlivňuje proces zvlákňování. Nejčastěji a v průmyslu výhradně se používá vzduch. Pro zajímavost je možné uvést, že electrospinning je neproveditelný v héliové atmosféře z důvodu nízkého průrazného napětí. Naopak plyny s vyšším průrazným napětím než vykazuje vzduch, je možné použít. Příkladem budiž dichlordifluormethan (freon 12), kdy vzniklá vlákna v porovnání s atmosférou vzduchu vykazují dvakrát větší průměr [59].

Teplota atmosféry ovlivňuje výparnost roztoku. Při vyšší teplotě pozorujeme vyšší průměry vláken. Pro modulaci vlhkosti a teploty vzduchu se v průmyslu používají výkonné klimatizační jednotky. V laboratorním uspořádání je jednodušší modulovat teplotu roztoku vnějším zahříváním injekční stříkačky [76].

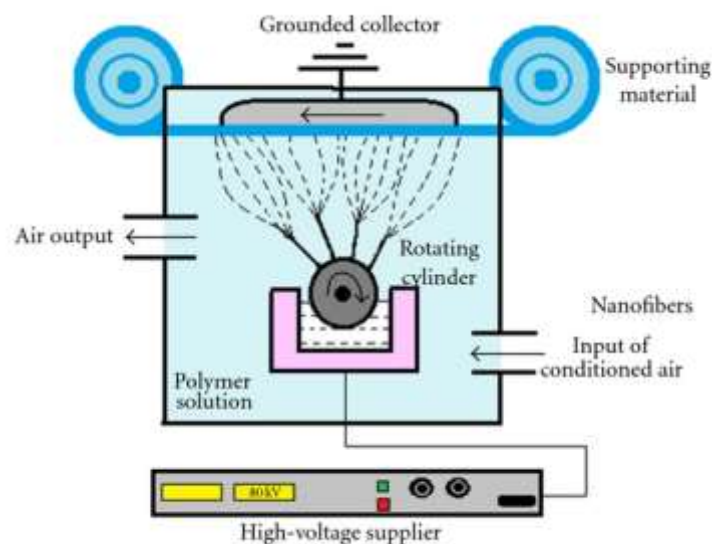


Obrázek 29 – Závislost průměru vláken PEO na relativní vlhkosti vzduchu [75]

2.5.4 Elektrostatické zvlákňování v průmyslu

V této části budou stručně popsány principy, které umožnily rozšíření elektrostatického zvlákňování z laboratoře do výrobních hal a tím otevřely dveře vzniku nanovlákných užitných předmětů každodenní potřeby. K datu sepsání této práce již existuje vícero technologických přístupů průmyslového electrospinningu, avšak pozornost bude zaměřena pouze na technologii Nanospider od firmy Elmarco s.r.o. na jejichž přístrojích byla tato práce prováděna.

Přestože od roku 2007, kdy byla prodána první průmyslová linka, se technologie Nanospider výrazně vylepšila, principiálně se stále jedná o tzv. bezjehlové zvlákňování z povrchu. Prvotní uspořádání spočívalo v otáčejícím se válci ponořeném částečně ve zvlákňovaném roztoku, který zároveň sloužil jako kladná elektroda. Vlákna se ukládala na netkanou textilii, či papír umístěný před druhou, uzemněnou nebo záporně nabitou elektrodou (Obrázek 30) [77].



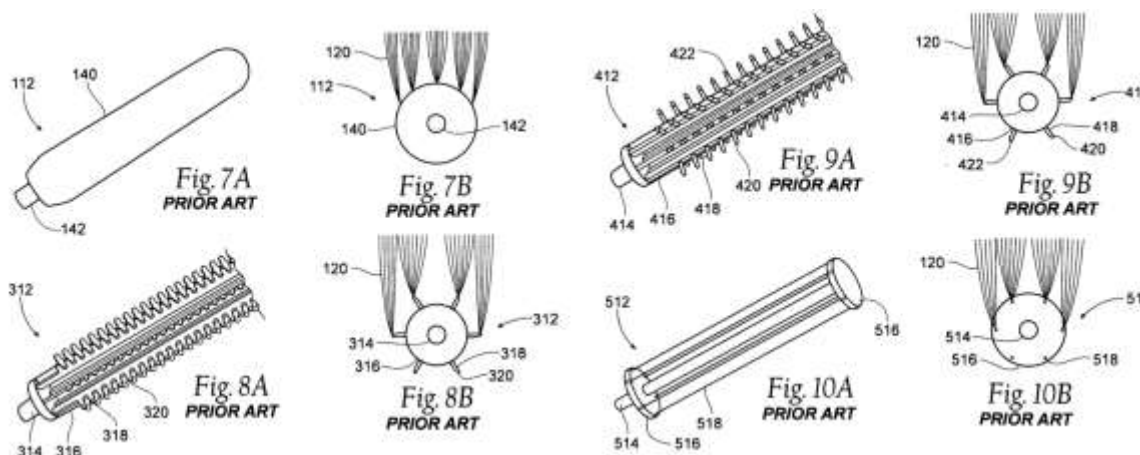
Obrázek 30 – Schéma bezjehlového zvlákňování z povrchu válce [77]

Na povrchu válce se po zapnutí vysokého napětí vytváří desítky až stovky zvlákňujících trysek (Obrázek 31). Velký povrch válce je ale zároveň velkou nevýhodou uspořádání, která snižuje sílu elektrostatického pole a umožňuje vypařování rozpouštědla mimo elektrostatický děj. Zvlákňování roztoků například z THF nebo chloroformu je tedy znemožněno rychlým zaschnutím a následným zaseknutím elektrody.



Obrázek 31 – Válcová elektroda v technologii Nanospider [78]

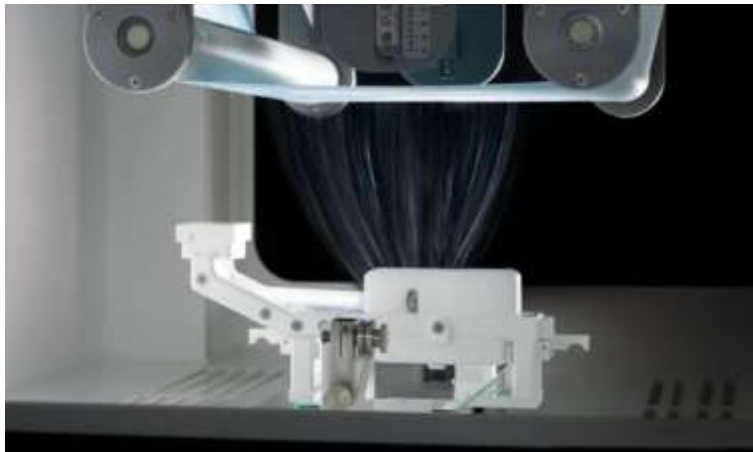
Nevýhoda slabé intenzity elektrického pole může být částečně vykompenzována použitím upravené elektrody složené z natažených paralelních strun, případně z dalších bodových, lopatkových a dalších tvarů (Obrázek 32). Takové uspořádání je výhodné pro vodné a pomalu se vypařující roztoky [79].



Obrázek 32 – Možné uspořádání a tvary válcových elektrod v technologii Nanospider [79]

Zavedení takového typu elektrod ovšem stále neumožňuje efektivní zvlákňování většiny druhů roztoků. Tyto problémy byly vyřešeny novým druhem jednostrunné elektrody (Obrázek 33), která je stabilní rychlostí pokrývána roztokem v posuvném pojezdu [80]. Se zavedením jak válcové, tak strunové elektrody vstupuje do procesu mnoho nových proměnných a na kvalitu zvlákňovacího roztoku to klade ještě větší nároky než u jednoduchého zvlákňování z jehly. Některé parametry jako použité napětí, vzdálenost elektrod a vlastnosti roztoku zůstávají stejné, mění se ovšem rychlost průtoku, která je nahrazena rychlostí

otáčení válce, či frekvencí pojezdu zvlhčující strunovou elektrodu. Plošná hmotnost vláken je nyní snadno modulovatelná rychlostí návinu podpůrné netkané textilie nebo jiného materiálu bez potřeby přerušovat kontinuální proces zvlákňování. Objevují se nové problémy spojené s jednotností vrstvy a morfologií vláknenných vrstev, ale vzhledem k zaměření a rozsahu práce nebudou dále popisovány, protože hrají větší roli při tvorbě vláken určených k filtraci kapalin a plynů.



Obrázek 33 – Jednostrunná elektroda s posuvným pojezdem obsahující roztok [81]

Největší dostupné průmyslové zařízení obsahuje osm zvlákňovacích strunových elektrod o délce 1,6 metru. Celkové rozměry stroje jsou 2,6 x 2,6 x 2,5 metrů (Obrázek 34). Hodnoty produkce závisí samozřejmě na konkrétním zvlákňování, ale například u PA6 je možné za den vyrobit desítky tisíc metrů čtverečních netkané textilie o plošné hmotnosti 0,03 g.m⁻² [82].



Obrázek 34 – Produkční linka NS 8S1600U pro průmyslovou produkci nanovláken [81]

2.6 Nanotechnologie v potravinářství

V předchozích kapitolách byly popsány metody přípravy nanobiomateriálů se zacílením na potravinové a kosmetické aplikace. Následující kapitola si klade za úkol představit základní aplikace, trendy a určující práce v oboru. Pro získání náhledu do situace bylo vybráno několik přehledových publikací v rámci několika let [83, 84, 85, 86, 87].

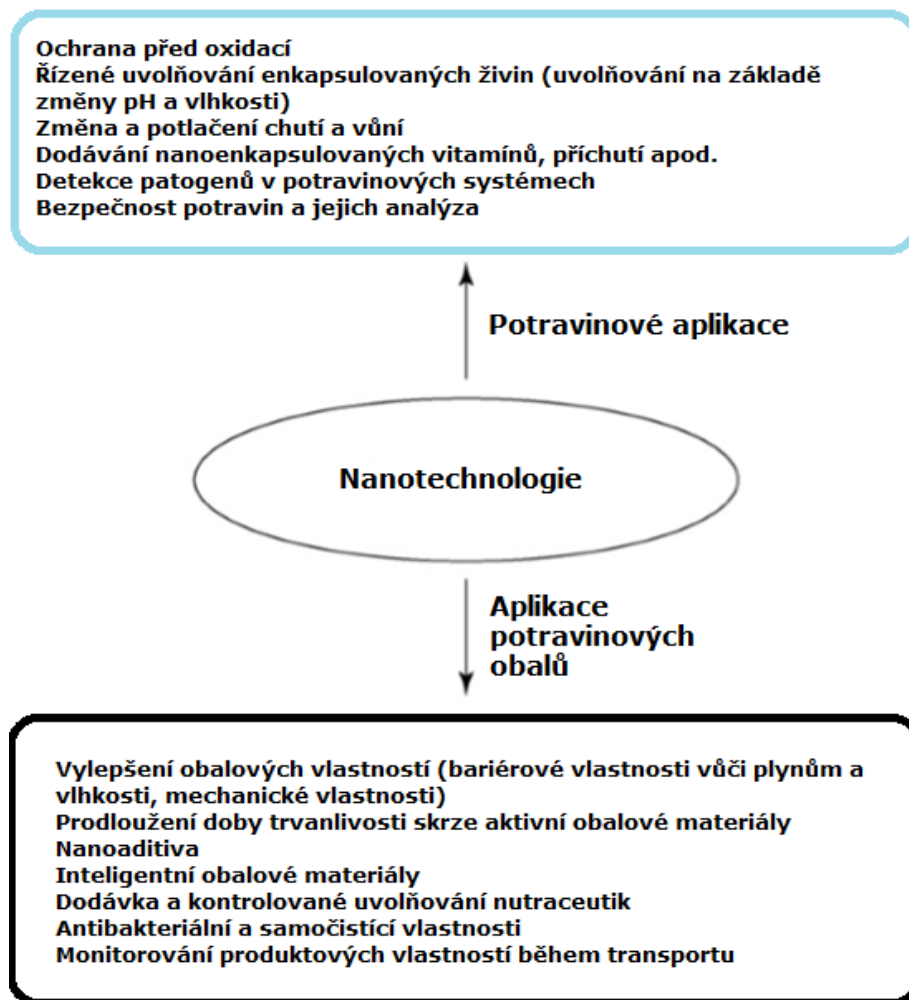
Stejně jako v materiálové nanotechnologii, tak i v potravinové aplikaci rozlišujeme produkty vzniklé postupy „bottom-up“ a „top-down“, přičemž jako top-down proces můžeme považovat mletí,

sekání a podobné úpravy. Prostým mletím byl získán například prášek zeleného čaje s vyššími antioxidačními účinky, a to na základě lepšího uvolnění rozpustných složek vlivem většího měrného povrchu submikronových a nanočástic. Z druhé strany spektra jako příklad bottom-up metody je možné uvést self-assembly micel tvořených kaseinem, škroby, proteiny a další. Nanoskopický rozměr se vyskytuje v potravinách běžně v podobě koloidů, emulzí a na fázových rozhraních. Příklad rozměrů molekul a útvarů v potravinách je zobrazen v následující tabulce (Tabulka 3) [83].

Tabulka 3 – přehled rozměrů nanoskopických sloučenin a materiálů v potravinovém sektoru [38]

Structures	Diameter or length (nm)
DNA	12
Glucose	21–75
Liposome	30–10000
LDH	40–300
Amylopectin	44–200
Casein micelle	60–100
PLA nanosphere	100–300
Zein	200
Cubosome	500
Nanosensors	<1000

Základní aplikační větve vedou do oblasti obalových materiálů a samotných potravin. Přehled potenciálních aplikací shrnuje následující grafika (Obrázek 35) [83].



Obrázek 35 – Rozdělení potenciálních aplikací [83]

Dělení dle použitého materiálu se pak rozšiřuje na využití vláknenných vrstev a částic. Dalšími materiálovými uspořádáními jako jsou například kompozity, kompaktní tenké vrstvy se bude text zabírat pouze okrajově.

Následující text shrnuje využití nanovláknenných vrstev a membrán v potravinovém a agrikulturním sektoru. Obě tyto oblasti jsou úzce provázány a v literatuře se popisují často dohromady [88].

2.6.1 Aplikace nanovláken v zemědělství

Existuje několik přehledových studií zaměřených na aplikace a aplikační potenciál nanovláken v potravinách a zemědělství. Základní segmenty, kde mohou nanovláknena být využívána shrnuje následující schéma (Obrázek 36) [88].

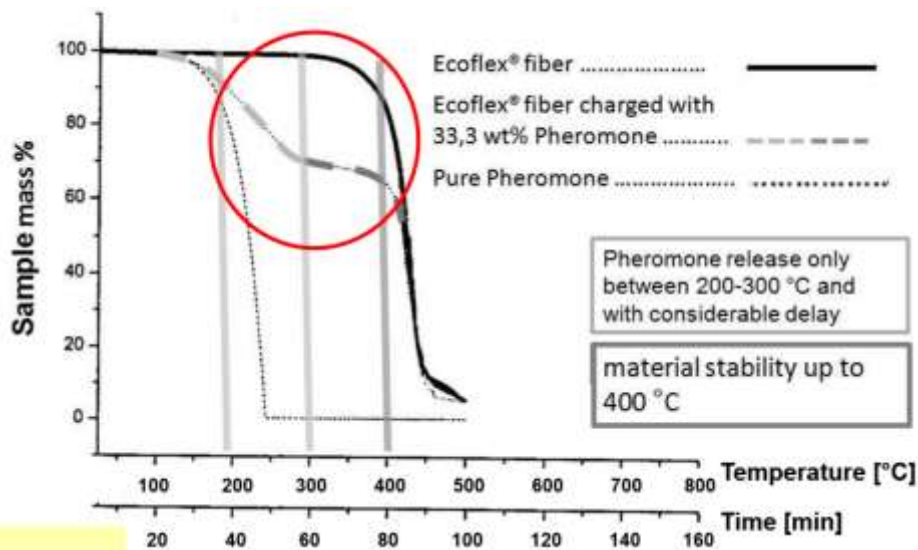


Obrázek 36 – Schéma aplikačního potenciálu nanovláken v zemědělství a potravinách [88]

Průkopníkem přímé aplikace nanovláken na rostliny, a dokonce na celá pole (Obrázek 37) je výzkumná skupina z Bayretské technické univerzity [48], která se touto aplikací zabývá již řadu let. Funkce nanovláken v závislosti na místě aplikace má dva cíle - ochranu rostliny, případně nosnou funkce feromonů ve struktuře vlákna pro pomalejší a řízené uvolňování těchto sloučenin [89]. Funkce feromonů spočívá ve zmatení samců a zredukování reprodukce škůdců. Pouhé poprášení pole feromony je neefektivní vzhledem k jejich vysoké těkavosti a často i oxidační nestabilitě. Termogravimetricky pak byl dokázán rozdíl v těkavosti (Obrázek 38). Rychlost úbytku feromonů je v rámci nanovláken pomalejší než u samotné látky bez nosiče. Nanovlákná obsahující feromony byly připraveny z biodegradabilního polymeru PBAT [90].

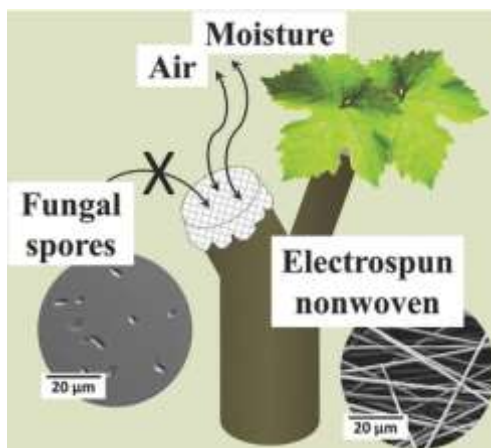


Obrázek 37 – Elektrostatické zvlákňování přímo na pole [48]



Obrázek 38 -Termogravimetrická analýza a srovnání nanovláken s feromony [48]

Při ochraně rostliny je pak používáno zakrytí řezu stonků a větví membránou a zabránění průchodu plísní (Obrázek 39). Použitý polymer byl opět PBAT. Nevýhodou přístupu jsou však použité rozpouštědla, která zahrnovala DMF, chloroform a taktéž drahý a toxický hexafluoroisopropanol [89].



Obrázek 39 – Princip použití nanovláken při ochraně řezu větví [48]

Další aplikací nanovláken je enkapsulace organismů chránících rostliny před patogeny. Jedná se o vylepšení metod využití živých organismů jako přirozených nepřátel dalších, rostlinám nebezpečných organismů. Výhodou této enkapsulace je jednak lepší manipulace, jelikož nanovláknenná vrstva je makroskopický, celistvý útvar podobný papíru a taktéž zpomalení uvolňování organismů vlivem buď degradace nosného materiálu nebo zpomalením úniku organismů z vláknenné vrstvy. Konkrétně bylo vyzkoušeno ukotvení spór trichodermy v nanovláčkách, které byly připraveny za pomoci elektrostatičké zvláknění. Elektrické pole nemělo vliv na životaschopnost spór. Nanovláčka byla aplikována přímo na kořenový systém a listy, přičemž uspořádání vykazovalo velkou aktivitu proti houbám rodu *Fusarium*, zodpovědným za tzv. fusariové vadnutí, a černí střídavé [88].

2.6.2 Aplikace nanovláken v potravinářství

Aplikace nanovláken v potravinách má tři hlavní oblasti - enkapsulaci, obalové materiály a filtraci [88].

2.6.2.1 Enkapsulace

Enkapsulace si klade za cíl ochranu potravin vůči oxidaci, vlhkosti, světlu a obecně okolním podmínkám snižující například dobu životnosti, chuť a další chtěné charakteristiky potravin. Dále je enkapsulace využívána pro zakrytí nechtěných chutí a pachů, imobilizace buněk a enzymů, zpomalení nebo řízení uvolňování složek potravin nebo zlepšení manipulace a navýšení životaschopnosti probiotik. Některé klasické metody enkapsulace jako je sprejové sušení vyžadují vyšší teploty, které však mohou poškodit chtěné enkapsulované látky nebo navíc vytvořit toxické sloučeniny. Nanovláčka vzniká elektrosinningem se nabízí jako vhodný nosič látek, a to díky jednak snadné přípravě, nezvýšené teplotě a snadné manipulaci s výslednou nanovláknennou vrstvou. S výhodou je pak využívána základní charakteristika nanovláken, a to relativně vysoký měrný povrch a nízká objemová hustota umožňující snadné řízené uvolňování. Příkladem je enkapsulace karotenu v zeinových nanovláčkách, což je kukuřičný protein postrádající některé aminokyseliny [88]. Enkapsulace karotenu ve vláčkách zvýšila jeho stabilitu vůči oxidaci. Výhodou taktéž je, že zein je rozpustný v ředěném ethanolu, a nikoliv v toxických solventech. Enkapsulace byla taktéž provedena na kmenu bifidobakterií, a to v nanovláčkách vytvořených koaxiálním zvlákněním, tedy metodou, kterou se dají připravit dutá či core-shell vláčka (Obrázek 40). Byl sledován vliv zamrazení vláken na životaschopnost v delším časovém úseku a enkapsulované bakterie vykazovaly delší životnost. V literatuře je možné najít řadu příkladů jednoduché enkapsulace například vonných látek, cyklodextrinů, antioxidantů a dalších [91].

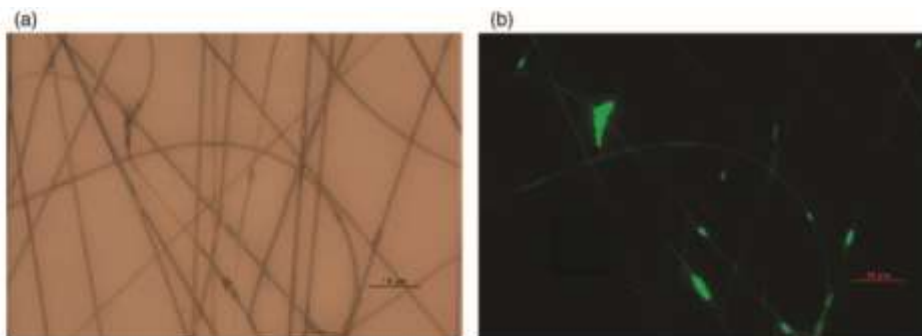
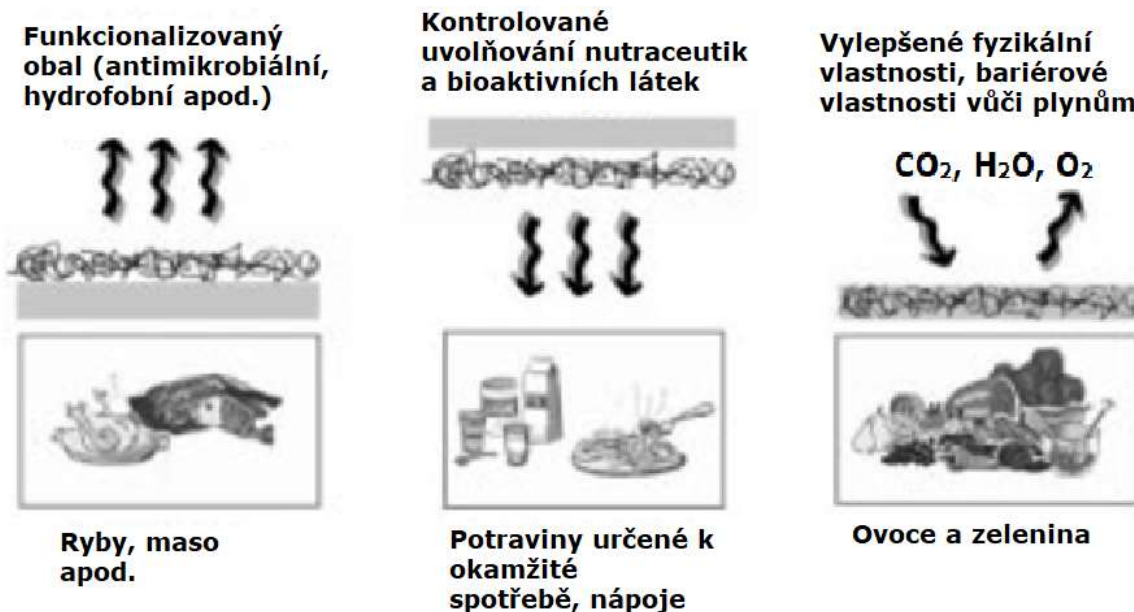


Figure 7. (a) Optical micrograph of *Bifidobacterium*-loaded PVA nanofibres under polarised light. (b) Fluorescence microscopy image of *Bifidobacterium*-loaded PVA nanofibres. (Reprinted, with permission, from López-Rubio et al.³⁷ Copyright 2009, American Chemical Society)

Obrázek 40 – Enkapsulované bakterie v core-shell nanovláčkách – vizualizace fluorescencí [88]

2.6.2.2 Obalové materiály

Obalový segment nanovláčkových aplikací se taktéž dá rozdělit dle požadované funkce (Obrázek 40). Buď obal působí na okolí, antibakteriálním nebo hydrofobním působením nebo dovnitř vypouštěním bioaktivit, případně slouží jako bariéra nebo senzor čerstvosti [88].



Obrázek 40 – rozdělení nanovláčkových obalů dle funkce [88]

Obecně se dá říci, že nároky na obalové materiály v potravinách jsou hlavně schopnost prodloužit životnost a zachovat kvalitu produktu po požadovanou dobu, uchovat stabilní požadovanou hodnotu vlhkosti, zabránit průniku bakterií, zabránit nebo naopak propustit kyslík nebo jiných plynů a požadavky na mechanickou pevnost. Zároveň všechny tyto aspekty musí korelovat s cenovou dostupností a možností vysoké produkce materiálu. Mechanické vlastnosti nanovláčkových vrstev nejsou zrovna vynikající, ale v podobě kompozitních výztuží jistě výhodnou alternativu představují. Avšak hlavním důvodem potenciálu nanovláček v potravinových obalech je několik zásadních vlastností. Jednak je to možnost již zmíněné enkapsulace aktivních složek obalu, dále velký měrný povrch, propustnost plynu, bariérové vlastnosti vůči mikroorganismům nebo inkorporace indikátorů čerstvosti. Požadavky na materiálové vlastnosti pak jsou zmíněná mechanická pevnost, inertnost, nesmí být příliš hmotné a objemné a další [88].

Co se týče plnění vláken aktivní složkou, převažuje motivace spojit bariérové antibakteriální vlastnosti membrány a antibakteriálních vlastností plniva. S úspěchem se zkoumají kompozity biopolymery a anorganických nanočástic, například na bázi stříbra nebo mědi. Samozřejmě tyto nabízející se aplikace vzbuzují obavy vzhledem k stále velkému nedostatku znalostí toxicity těchto systémů. Jako plnivo ovšem mohou být použity nanočástice oxidů kovů, například oxid titaničitý, který vykazuje fotoaktivní a baktericidní vlastnosti, stejně tak oxid zinečnatý. Dalším postupem může být inkorporace peptidů s antibakteriálním působením (pleurocidin) nebo konečně aditivace malých molekul, ať již přírodních nebo syntetických. Příkladem může být použití hřebíčkového oleje obsahujícího eugenol, nebo přídavek kvartérních amoniových solí. V každém případě musí být samozřejmě posouzen objektivní benefit uspořádání ať již z funkčního, praktického nebo cenového hlediska. Mnoho prací tak vzbuzuje pocit, že sledují spíše aktuální trend přídavku antibakteriálních složek, které jsou z logické podstaty nepoužitelné v obrovském segmentu potravinových obalů. Čerstvost potravin je možné sledovat například inkorporací pH citlivých malých molekul, změna pH vlivem stárnutí potravin se pak projeví změnou barvy obalu. Nanovláknem svým vysokým měrným povrchem zapříčiní lepší vizualizaci a citlivost senzoru [92].

2.6.2.3 Filtrace

Filtrace kapalin za pomoci nanovláken je obrovské téma překračující potravinové užití. Vlivem vysoké pórovitosti a nízké objemové hustoty jsou nanovláknem oproti stávajícím membránám lepší co se týče tlakové ztráty a průtoku. Přestože nanovláknem vrstvy a jimi tvořené membrány jsou velmi slibné v tomto poli, potýkají se v praktickém použití stále s aplikačními problémy, které jsou přiblíženy v doplňkových výsledcích disertační práce v závěru experimentální části.

Příkladem úspěšné aplikace PA6 membrány pro filtraci je přefiltrování zákalu jablečné šťávy. Membrána měla průměry vláken 95 nm. Zároveň bylo zjištěno, že polymamid vykazuje sorpční vlastnosti vůči polyfenolům, které v džusu způsobují nahořklou chuť [93]. Další zajímavou aplikací může být hydrofobní filtrace použitého fritovacího oleje a možnosti jeho opakovaného použití. Vláknem v takovém případě mohou sloužit jako objemný filtr a zároveň jako sorbent akrylátů a podobných degradačních složek přepáleného oleje. Stejně systémy jsou používány pro víno, pivo a další [94].

2.7 Nanotechnologie v kosmetice

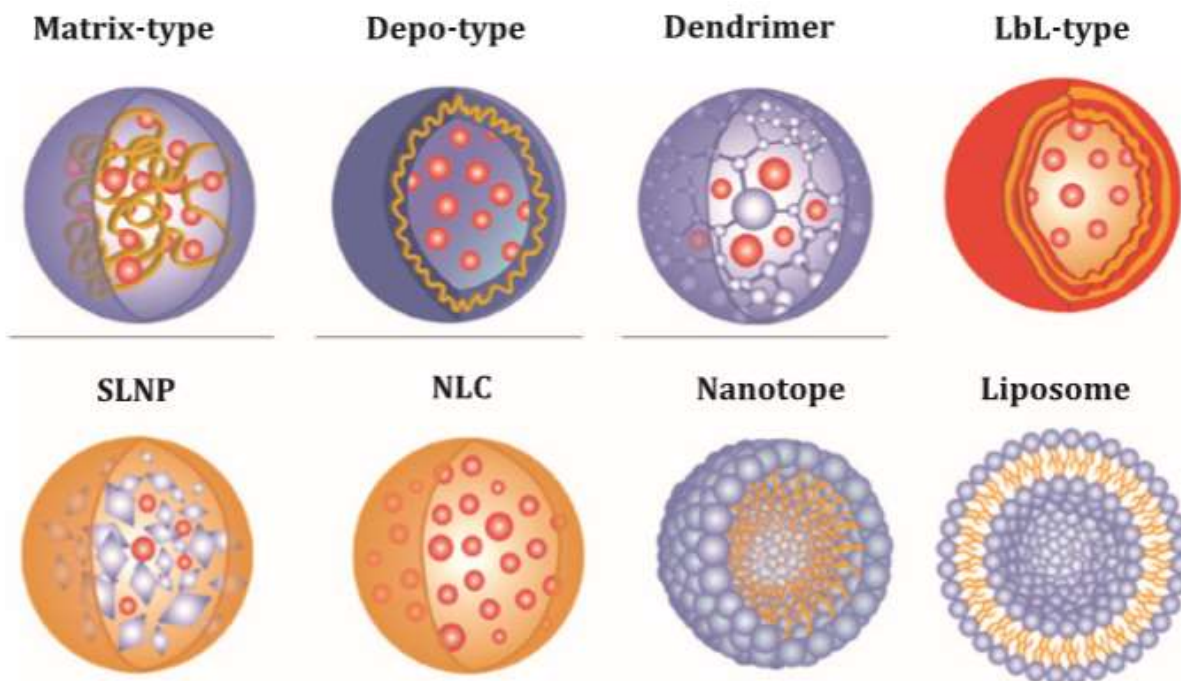
Nanotechnologie v kosmetickém odvětví již několik let pronikly na běžný trh (oproti nanotechnologiím v potravinách). Jasným důkazem je použití nanočástic oxidu titaničitého a zinečnatého v opalovacích krémech. Produkce nanoskopického oxidu titaničitého se pohybuje v tisících tun za rok [95]. U oxidu titaničitého se jedná o částice s průměrem 14 nm, které jsou však shlukovány do větších agregátů. Výhoda nanočástic oxidů spočívá, jak ve funkci stínit UV záření a taktéž fakt, že po nanesení nevznikají bílé skvrny [96]. Nanotechnologie v kosmetických aplikacích ovšem je velice široké téma. Pěkným přehledem různých produktů a aplikací je následující tabulka (Tabulka 4) [97].

Tabulka 4 – Příklady využití nanotechnologických produktů v kosmetice [97]

Příklady nanomateriálů používaných v kosmetických produktech			
Třída materiálu	Materiál	Funkce	Příklad produktu
Aktivní	Arbutin	Bělící	Nano Bright™
Kovy a oxidy kovů	ZnO	UV ochrana	ZinClear-IM™
	Ag	Antibakteriální	GNS Nanogist; Susie-K Nano Beauty Soap

	Fe _x O _y	Korektor	Mineral Foundation
	Au		Chantecaille Nano Gold Energizing Cream, Nanorama
	Pt, Ag	Abosbující nanočástice	Platinu Silver Nanocolloid Milky Essence
	TiO ₂	UV ochrana	Soltan
	Al/Al ₂ O ₃	Korektor	Alusion™
	Ag/Ti/TiO ₂	Hair care	Nano Weight Pro 1800
Uhlík	Fullereny	Inhibice volných radikálů	Zelens®; Radical Sponge®
	Fullerosomy	Inhibice volných radikálů	Sircuit®
Nanoskopické jíly a silika	SiO ₂	Nosič, pleťový modifikátor	LEOREX®; Rénergie®
	SiO ₂ /Me _x O _y /Mica/ZnO/TiO ₂	UV ochrana	Eusolex®; UV Pearls Dual Finish Pressed Compacts
Vezikulární lipidové nanonosiče	Liposomy, ceramidy, nanoemulze	Nosiče aktivních látek	Revitalift®; Lyphazome®; Celazome®; Psorinel Lotion; Hydra Zen®
		Ethosomy	anti-cellulite
Pevné lipidové nanočástice	Pevné lipidy	Nosiče aktivních látek	Swiss Cellular™ White Illuminating eye essence; Olivenol™ AntiFAlter Pflege, IOPE™ Super Vital Cream; Surmer™ Creme Legere
Přírodní a modifikované polymery	Modifikované polyaminokyseliny	Péče o pleť	Collamin_G™
	Hyaluronová kyselina	Zvlhčovač	PowerMoist™ Nano Hyaluronic acid
	Koalgen	Péče o pleť	Bim-e-ne®
Syntetické polymery	nanokapsuly	Nosiče aktivních látek	Primordiale Intense; Hydra Flash® Brnozer

Nanočástice kromě UV stínění slouží taktéž jako nosiče aktivních složek, například antioxidantů, vitamínů, výživy, hydratačních látek a dalších. Druhy nanoskopických nosičů jsou zobrazeny níže (Obrázek 41) [97].



Obrázek 41 – Druhy nanoskopických nosičů aktivních látek [97]

Matrix-type je označení pro částici tvořenou maticí, například porézním zeolitem, ze kterého se postupně uvolňuje sorbovaná látka. Depo-type je schránkové uspořádání kde aktivní složka je ukryta ve slupce, jedná se o obdobu core-shell částic. Dendrimerní uspořádání je speciální typ makromolekuly, které se dá přirovnat k větvím od stromu. Jedná se často o precizně syntetizované struktury větvené specifickým způsobem. Mezery mezi větvemi pak tvoří prostor pro zachycení aktivní přenášené látky. Zkratka LBL znamená layer-by-layer což je uspořádání podobné Depo-type jen s tím rozdílem, že částici tvoří vícero slupek. SLNP je zkratka pro solid-lipid nanoparticles. Aktivní látka je v tomto případě zachycena mezi ztuhlými lipidickými molekulami. NLC znamená nanolipid carrier a je společně s liposomy tvořen lipidickými uspořádáními. Nanotope je obchodní značka pro surfaktanty stabilizovanou lipidickou jednovrstvu uchováající aktivní látku [97].

Použití nanovláken v kosmetice je zatím otázkou vývoje, ale již na trhu existuje zajímavý kosmetický produkt na vyhlazení vrásek z laboratoří firmy Nafigate Cosmetics. Produkt „Nanoeyelift“ spočívá v aplikaci hyaluronové kyseliny na místo, které je vyhlazováno a následně překrytí vrstvou nanovláken citlivých na vlhkost. Po styku s navlhčenou kůží se jednak vlákna přisají na kůži a následně se pomalu vypínají, což vede k vypnutí hydratované kůže a relativnímu zmizení vrásek. Ze stejné dílny pochází kosmetický, dermatologický přípravek „Acne Invisible“, který spočívá v hojení a krytí akné za pomoci hyaluronové kyseliny a vrstvy nanovláken. Celá kompozice se dá nakonec zakrýt krémem nebo make upem [98].

Celé odvětví nanokosmetiky je mimořádně široké a pro detailnější představení by bylo zapotřebí celé jedné velké shrnující studie. Za zmínku stojí fakt, že nanokosmetika přitahuje mimořádnou pozornost ve vztahu ke kontrole a regulaci [99, 100, 101].

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

V rámci disertační práce byly zpracovávány následující dílčí úkoly:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na:

- a. screening a výběr vhodných přírodních biopolymerů
- b. modifikace přírodních polymerů za účelem změny vlastností a zpracování
- c. moderní aplikační formy – nanočástice, nanovlákná, jejich struktura a využití
- d. metody přípravy a funkcionalizace nanovláken
- e. přehled aplikací v potravinářství a kosmetice

2. Vývoj a optimalizace metod

- a. optimalizace metod přípravy a charakterizace mikro-a nanočástic na bázi přírodních polymerů
- b. příprava nanovláken metodou elektrospinningu, zvlákněním z roztoku a odstředivým zvlákněním
- c. mikroskopické techniky a fyzikálně-chemické postupy charakterizace nanovláken a nanočástic

3. Aplikace připravených nanovláknenných materiálů

- a. příprava funkcionalizovaných částic a nanovláken
- b. testování fyzikálně-chemických vlastností materiálů
- c. enkapsulace a vazba biologicky aktivních látek do nanovláknenných a částicových materiálů, srovnání využitelnosti různých aplikačních forem
- d. stabilita a biodegradabilita polymerů a aplikačních forem v modelových environmentálních a fyziologických podmínkách.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Komentovaný soubor publikací a patentů – přehled výsledků

Experimentální část práce je rozdělena na tři části. V první části je uveden komentovaný soubor publikovaných výsledků a patentových výstupů. V další části jsou shrnuty další výsledky práce získané v rámci menších projektů a spolupráce s praxí. Třetí část tvoří doplňkové výsledky disertační práce získané ve specifických podmínkách (v rámci spolupráce s průmyslovou praxí), a to souběžně s hlavními výstupy disertační práce na základě zavedených metod a materiálů. Práce je koncipována tak, že publikované práce a patentové přihlášky jsou komentovány přehledně s odkazem na příslušnou přílohu. Přílohy obsahují recenzované postupy a výstupy, které již byly posouzeny v rámci recenzního řízení. Výsledky ve druhé části jsou rozděleny na jednotlivé projekty a příslušný souhrn materiálů, metodických postupů a výsledků je komentován zvláště pro každý dílčí projekt, a to z důvodu jisté heterogenity jednotlivých částí práce a zachování přehlednosti. Doplňkové výsledky jsou stručně komentovány v závěru práce.

Podkladem k první části experimentální práce je následující soubor publikovaných prací v časopisech s IF a přijatých či zapsaných přihlášek patentů a užitečných vzorů.

4.1.1 Recenzované články

Drug Release Kinetics of Electrospun PHB Meshes (Příloha 1)

Kundrat, V.; Cernekova, N.; Kovalcik, A.; Enev, V.; Marova, I. Drug Release Kinetics of Electrospun PHB Meshes. *Materials* **2019**, *12* (12), 1924. IF: 3,057 <https://doi.org/10.3390/ma12121924>.

Facile Preparation of Porous Microfiber from Poly-3-(R)-Hydroxybutyrate and Its Application (Příloha 2)

Kundrat, V.; Matouskova, P.; Marova, I. Facile Preparation of Porous Microfiber from Poly-3-(R)-Hydroxybutyrate and Its Application. *Materials* **2019**, *13* (1), 86. IF: 3,057 <https://doi.org/10.3390/ma13010086>.

4.1.2 Přihlášky vynálezů a užitečných vzorů

Polymerní vlákno a způsob jeho výroby (Příloha 3)

Márová, I.; Kundrát, V.; Pospíšil, L. Polymerní vlákno a způsob jeho výroby CZ Patent CZ306448. WO2017076374A1, 6.11.2015

Biodegradabilní vláknenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi (Příloha 4)

Márová, I.; Kundrát, V.; Benešová, P. Biodegradabilní vláknenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi, Zveřejněná přihláška PV 2016-423, 11.7.2016

UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a způsob jeho přípravy (Příloha 5)

Márová, I.; Pavelková, R.; Kundrát, V.; Matoušková, P. UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a způsob jeho přípravy, Zveřejněná přihláška 2018-197, 24.4.2018

Způsob rozpouštění biodegradabilních polyesterů (Příloha 6)

Márová, I.; Kundrát, V. Způsob rozpouštění biodegradabilních polyesterů, Zveřejněná přihláška PV 2017-317, 2.6.2017

Nanovláknenný sorpční materiál na bázi polyhydroxybutyrátu pro sorpci těžkých kovů (Příloha 7)

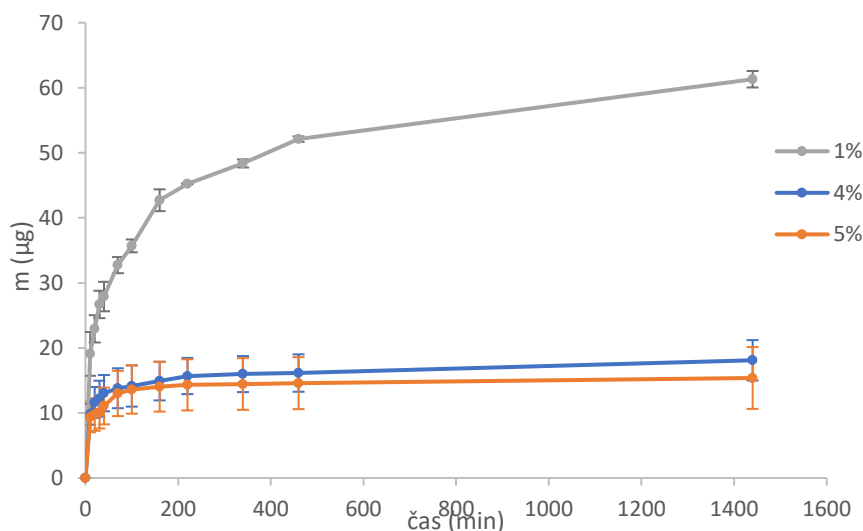
Kundrát, V.; Márová, I. Nanovláknenný sorpční materiál na bázi polyhydroxybutyrátu pro sorpci těžkých kovů, PUV 30069, 13.6.2016

4.2 Komentář k výsledkům publikovaným v časopisech

4.2.1 Kinetika uvolňování léčiv z PHB vláken připravených elektrostatickým zvlákňováním (Příloha 1)

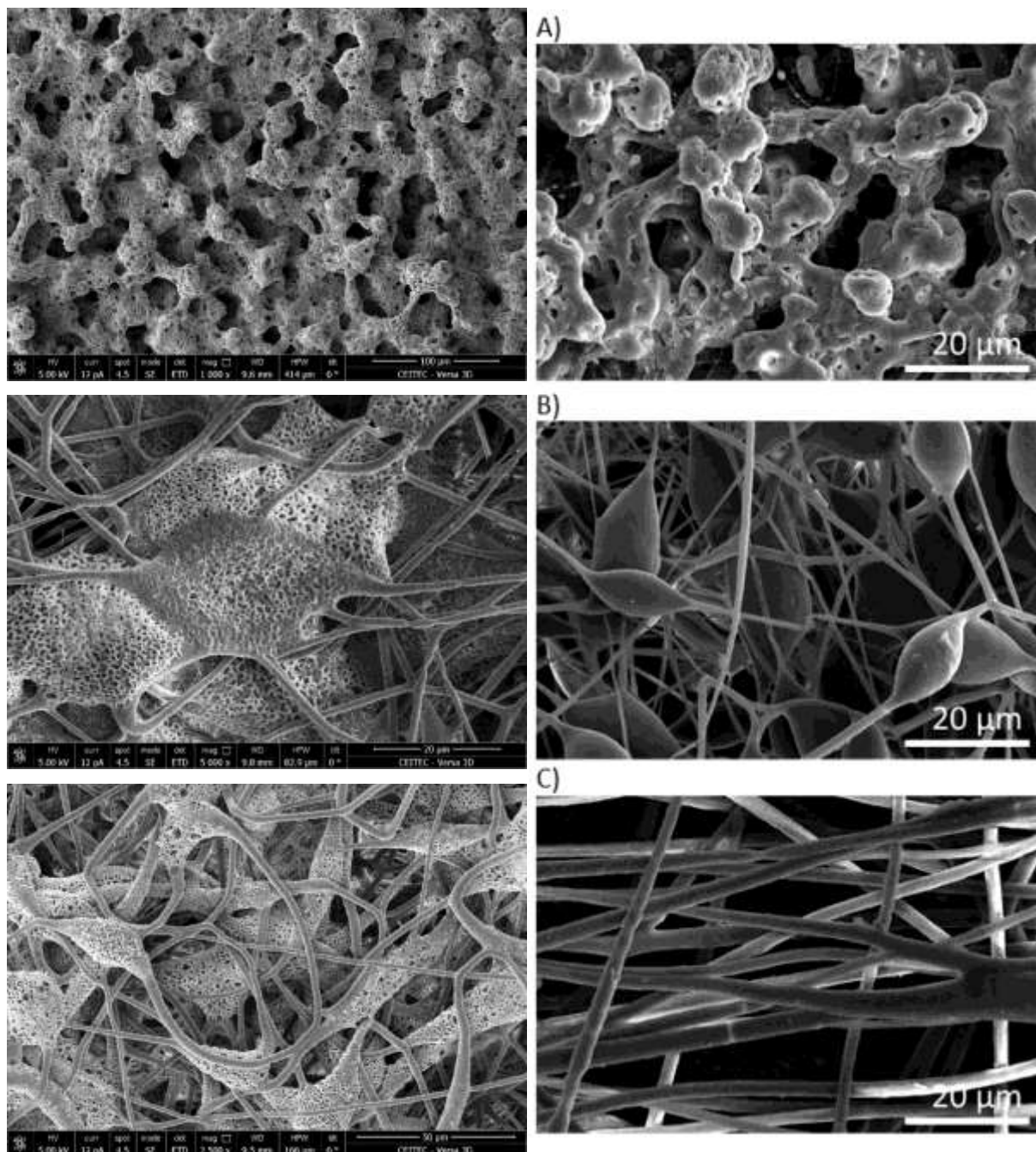
Předpokladem této práce byl fenomén vzniku porézních struktur při užití dvousložkového rozpouštědla při elektrostatickém zvlákňování, přičemž rychlost výparu jednoho je nižší (CHCl_3) než druhého (CH_2Cl_2). Při takovém uspořádání dochází ochlazení povrchu formovaného vlákna, kondenzaci vodní páry a utvoření pórovitého povrchu, jak již bylo zmíněno v teoretické části disertační práce (Obrázek 19). Zároveň byla při návrhu práce zvolena koncentrační řada polymeru v roztoku tak, aby došlo jak k electrospinningu, tak i electro sprayingu a získání rozličných morfologií. V některých případech možnou výhodou elektrostatického zvlákňování a potažmo elektrostatického naprašování je právě návaznost obou procesů. V nízkých koncentracích a při nízké viskozitě převládá electro spraying, jehož výsledkem může být tenký film, vrstva nebo jednotlivé naprašované částice na povrchu, případně kombinace zmíněného. Ve vysokých koncentracích a při vysoké viskozitě pak proces probíhá jako elektrostatické zvlákňování s výsledkem netkané textilie o různém průměru vláken. Mezi oběma procesy je spojitá část, kde nalezneme defektní vlákna opatřená tzv. perličkami (beads), případně částice propojené velmi tenkými nanovláknými. Výhodou elektrostatického zvlákňování je teoreticky maximální možný přenos hmoty mezi elektrodami. To znamená, že zvlákňovaný roztok je možné aditivovat rozpustnými látkami, případně jemnou suspenzí nebo koloidními částicemi. Pokud se aditivum nevypařuje, je beze zbytku přeneseno společně se vzniklými nanovláknými, respektive obecně strukturami. Vznik možných defektů nebo fázových separací není možné vyloučit a závisí na konkrétním systému.

V této studii bylo jako aditivum zvoleno antibiotikum levofloxacin, které bylo plně inkorporováno do vzniklých struktur. Následně byl zjišťován záchyt antibiotika ve strukturách a jejich uvolňování. Ukázalo se, že největší záchyt poskytla porézní vrstva připravená electro sprayingem. Nejmenší poté nanovláknenné formy, což se dle možného vysvětlení pojí s vyšší viskozitou roztoků, u kterých byla zaznamenán menší záchyt. Je taktéž možné, že i přes plné rozpuštění antibiotika došlo k fázové separaci nebo sorpci. Následná analýza uvolňování antibiotika (Obrázek 42) ukázala, že v počátcích uvolňování byla zaznamenána nejvyšší koncentrace uvolněného antibiotika u nanovláknenného vzorku, pravděpodobně z důvodu vysokého měrného povrchu v poměru k ostatním morfologiím.



Obrázek 42 – závislost uvolňování antibiotika z připravených vrstev na čase (norm. na 100 mg vzorku)

Jeden z důležitých výsledků je rozdíl mezi strukturou aditivovaných a neaditivovaných materiálů. I malý přídavek antibiotika ovlivnil výslednou morfologii (Obrázek 43). Zatímco neaditivované vrstvy se vyznačovaly vysokou porozitou, přídavek levofloxacinu zamezil vzniku porézních struktur. V případě 5 hm. % roztoku (Obrázek 43 C) došlo k odstranění defektních struktur a vzniku morfologicky jednotných mikrovláken.

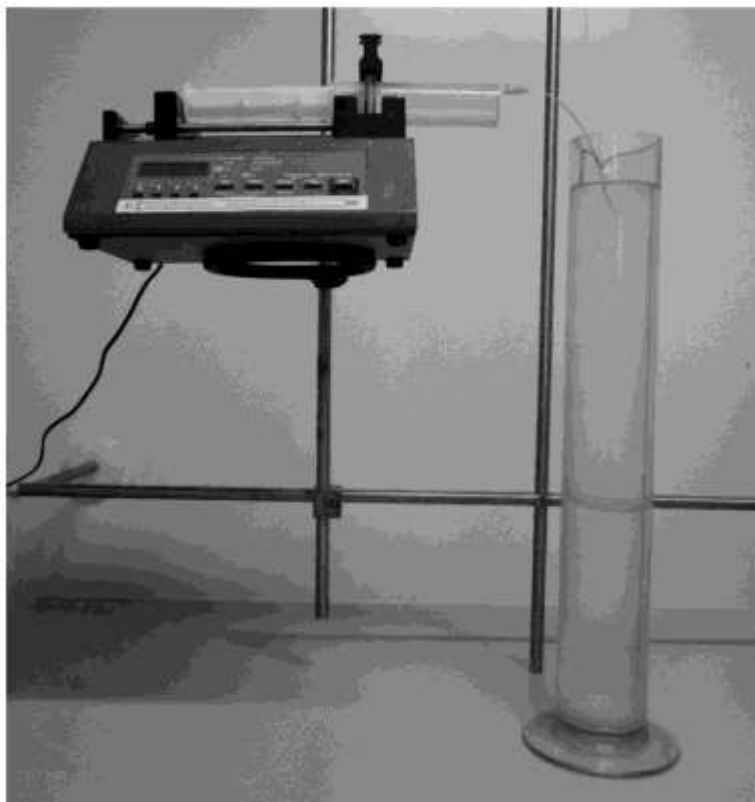


Obrázek 43 – porovnání morfologií vzniklých elektrostatickým zvlákňováním/naprašováním bez přídavku antibiotika (levý sloupec) a s přídavkem antibiotika (pravý sloupec) při stejných koncentracích a složení roztoků (A–1 hm. %, B–4 hm. %, C–5 hm. % PHB v CHCl_3 a DCM)

Jedním z přínosů studie je vznik modelového systému pro vytvoření funkcionalizovaných PHB vrstev, kde nanosená vrstva z 1 hm. % roztoku ukázala pomalé a stabilní uvolňování modelového antibiotika. Připravené vrstvy tak mohou ukázat směr pro další vývoj funkcionalizovaných membrán nebo povrchů založených na PHB. Popisovaná technologie pracuje s přímočarou soustavou rozpouštědel založených na polychlorovaných derivátech methanu. V dalších částech disertační práce je popsán nový postup zvláknění ze soustavy methyl dichloroacetátu (MDCA) a trifluoroethanolu, který umožňuje získání nanovláknenných struktur s průměry vláken pod 100 nm.

4.2.2 Příprava porézních mikrovláken na bázi poly-3-(R)-hydroxybutyrátu a jejich aplikace (Příloha 2)

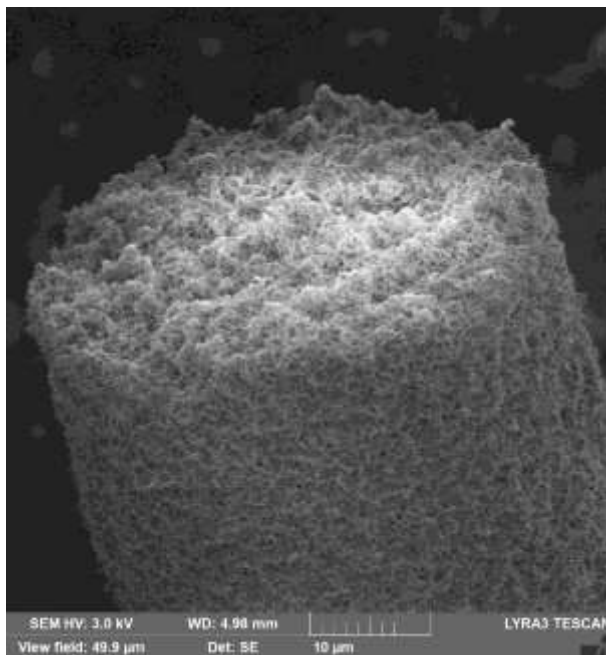
Při vypouštění zbytku zvláknovacího roztoku PHB v CHCl_3 do ethanolu během úklidu laboratoře bylo pozorováno, že vysrážený polymer při pomalém vypouštění vytváří kontinuální strukturu podobnou monofilamentu. Na tento jev byla zaměřena pozornost a vyhotoven obdobný experiment v kontrolovaném prostředí za pomoci jednoduché aparatury složené z lineárního dávkovače s injekční stříkačkou a dlouhou tenkou jehlou výstupem zavedenou pod hladinu ethanolové srážecí lázně nalité do vyššího odměrného válce (Obrázek 44).



Obrázek 44 – aparatura pro mokré zvláknování PHB

Byla navržena série roztoků a k nim přiřazených experimentů s proměnnou koncentrací a rychlostí vtlačování roztoku do lázně. Při kontaktu roztoku polymeru s ethanolom dochází nejprve k vytvoření fázového rozhraní, které je možné nazvat protovláknem, protože je stále v rozpuštěném stavu, dochází k difuzi rozpouštědel a v určitém momentu dojde k vysrážení polymerního vlákna, které gravitačně klesá ke dnu odměrného válce. Jedná se tedy o potenciálně kontinuální proces. V rámci laboratorního testování bylo ovšem pracováno pouze v popsaném diskontinuálním módu, kdy vlákno nebylo odtahováno, dlouženo a navíjeno. Z tohoto hlediska, tedy absence dloužení, vzniklé vlákno nevykazuje klasicky

aplikovatelné mechanické vlastnosti, avšak při bližší analýze za pomoci elektronové mikroskopie byla pozorována specifická povrchová a vnitřní struktura vlákna (Obrázek 45). Získaná vlákna vykazovala značnou makroporozitu jak na povrchu, tak v průřezu vlákna. V závislosti na použité koncentraci polymeru v roztoku se proměňuje vlivem rozdílné viskozity i charakter porozity. Pro charakterizaci vzniklých materiálů byla použita vedle elektronové mikroskopie i plynová absorpční porosimetrie.



Obrázek 45 – SEM analýza sráženého PHB vlákna

Na základě získaných výsledků byly sledovány závislosti tloušťky vzniklých vláken na procesních parametrech. Dále byl získán v několika měřeních měrný povrch připravených materiálů, který se řádově pohyboval v jednotkách až desítkách metrů čtverečních na gram. Nejvyšší dosažený měrný povrch byl v $28 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ u vláken vzniklých z pěti procentního roztoku, který byl vytlačován rychlostí $0,5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Tato rychlost přípravy je z praktického hlediska velmi pomalá, v porovnání s nejvyšší používanou rychlostí, $15 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ a při nejvyšší používané koncentraci, 10 hm. % PHB v CHCl_3 .

Následně byly připravené materiály použity pro sorpci rostlinných extraktů s antimikrobiálním účinkem. Bylo sledováno krátkodobé (do 60 min) a dlouhodobé (2 měsíce) uvolňování a antibakteriální aktivita. Relativně vysokou antimikrobiální aktivitu vykazovaly materiály se sorbovanými skořicovými a hřebíčkovými extrakty.

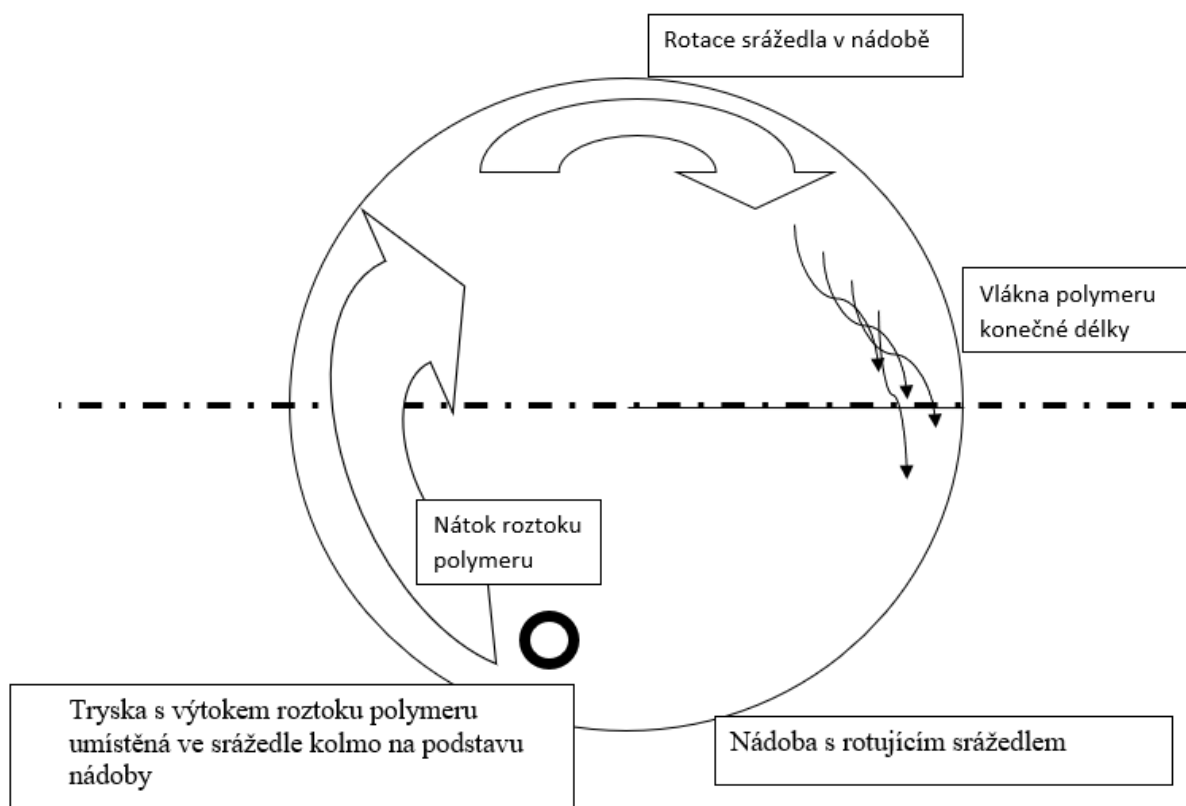
Popsané materiály jsou připravovány velmi jednoduchou a snadno reprodukovatelnou cestou s konzistentními výsledky. Relativně vysoký měrný povrch spojený s jednoduchou přípravou a novostí daly vzniknout patentové přihlášce přiložené v Příloze 3 s názvem *Polymerní vlákno a způsob jeho výroby*. Připravený materiál byl použit jako aditivum pro patentovanou kompozici UV ochranného filtru v přihlášce *UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a způsob jeho přípravy*, přiložené jako Příloha 5.

4.3 Komentář k patentovým přihláškám

4.3.1 Polymerní vlákno a způsob jeho výroby (Příloha 3)

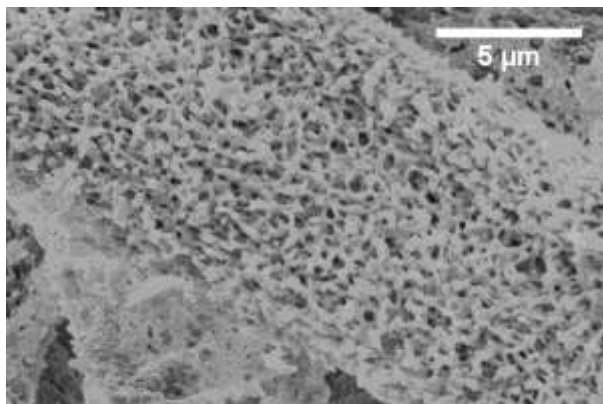
Udělený patent zabývající se porózním polymerním vláknem, popsáním v předchozím článku byl prvně uveden jako patentová přihláška. V rámci práce byl studován vliv srážecí lázně, teploty a rychlosti

vytlačování na výsledné vlákno. Systém byl shledán v zásadě dostatečně robustním, což bylo dokázáno v již popsané publikaci. Jako zajímavá extenze práce je možné vylepšení produktivity metody v rámci laboratorního nastavení. Určujícím krokem produktivity je kromě rychlosti vtlačování i klesání vlákna v rámci gravitačního působení. Pokud klesá příliš pomalu, tak se začne v určité úrovni odměrného válce hromadit chloroformový roztok, který na povrchu vysráží vrstvu polymeru, která brání dalšímu procesu a celý proces se zastaví, případně pozastaví za vzniku defektu nebo přetržení kontinuálního vlákna. Tento problém byl pozorován často u vyšších koncentrací roztoku a pomalejšího vytlačování. Je problematické přesně určit, kdy k tomuto dochází, děje se tak víceméně nahodile a jevu nebyla věnována dostatečná pozornost kromě návržení jednoduchého uspořádání předcházející tomuto jevu. Pokud místo odměrného válce použijeme například dvoulitrovou nebo větší kádinku, vložíme do ní dostatečně velké magnetické míchadlo a postavíme srážecí lázeň na magnetickou míchačku, tak dokážeme při dostatečně rychlém míchání dosáhnout ve srážecí lázni víru. Pokud provedeme srážení do víru, tak při adekvátně rychlém vtlačování roztoku (řádově mililitry za minutu) dosáhneme kontinuálního zvláknění, kdy trasa vlákna je vedena po směru vzniklého víru ve srážecí lázni (Obrázek 46). Tento postup dokáže výrazně zvýšit produktivitu celého procesu, který v předchozím uspořádání pracuje řádově v mililitrech za hodinu vtlačovaného roztoku.



Obrázek 46 – Schéma mokrého zvláknění do víru srážedla (pohled shora)

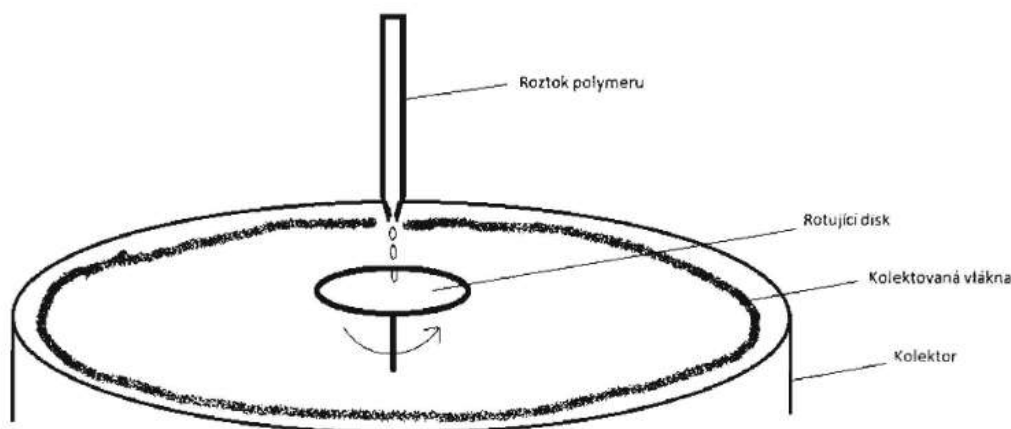
Výsledné vlákno (Obrázek 47) je morfologicky podobné s vláknem připraveným bez této extenze). Nevýhodou procesu je možné mechanické poškození kontinuálního vlákna při styku s rotujícím míchadlem, k čemuž při procesu v určité fázi zvláknění dojde, kontinuální vlákno je pak namotáno na míchadlo, kde je rozcupováno na menší fibrily. U určitých aplikací, například v kosmetice ve formě částic, nasekání vlákna na cupaninu není překážkou.



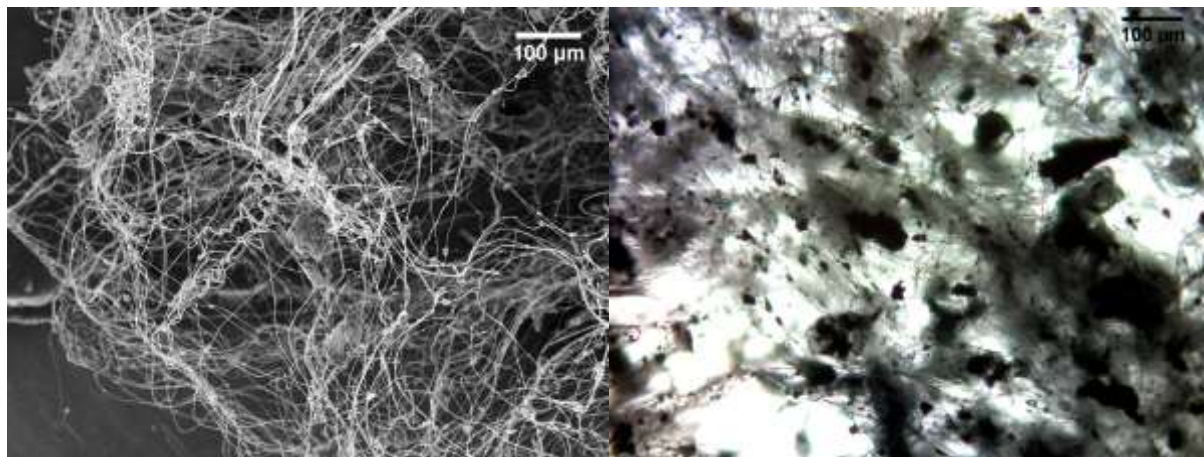
Obrázek 47 SEM analýza připraveného vlákna sráženého do víru srážecí lázně

4.3.2 Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi (Příloha 4)

Byla nejprve vyvinuta a ověřena metoda zvláknění PHB z chloroformového roztoku za pomoci odstředivé zvláknování. Vysoká výparnost rozpouštědla u chloroformového roztoku PHB umožňuje za pomoci odstředivé síly získat za krátký čas a kontinuálně velké množství mikrovláknenných struktur. Vyvinutá metoda není nepodobná přípravě cukrové vaty, kdy cukrová tavenina je rozstříkována z rotující odstředivé hlavy a ochlazením tuhne do známé podoby. V případě zvláknování PHB je na rychle rotující disk (20000 otáček za minutu) o průměru do tří centimetrů přiváděn 5 % roztok, který je rotujícím diskem rozstříkáván (Obrázek 48), protahován vlivem odstředivé síly a dostatečné viskozity roztoku a následně po odpaření chloroformu deponován přibližně ve vzdálenosti 10-15 cm od rotujícího disku v podobě chomáče nebo vrstvy mikrovláken. Díky relativně vysoké viskozitě je možné roztok aditivovat pevnými částicemi, které pouze omezeně sedimentují. Následně je pak možné vytvářet kompozity PHB s pevnými aditivami, například aktivním uhlím (Obrázek 49).



Obrázek 48 – Schéma odstředivé zvláknování z rotujícího disku



Obrázek 49 – mikrovláknenný kompozit PHB a aktivního uhlí (SEM – vlevo, optická mikroskopie – vpravo)

Variabilita aditivace je velmi široká a zahrnuje i aditivaci v chloroformu rozpustnými látkami. Je možné získat i neaditivovaná vlákna, přičemž se jedná o velmi jednoduchý a laboratorně dostupný způsob získání většího množství mikrovláknenného materiálu, který umožňuje rozličné aplikace. Příkladem může být v patentu popsána sorpce do objemného vláknenného kompozitu PHB a aktivního uhlí. Bylo zjištěno, že velká distribuce velikostí aktivního uhlí se inkorporuje do vláken dvěma způsoby. Menší částice jsou celkově obaleny polymerem a fungují jako plnivo vláken. Větší částice, než je průměrná tloušťka vláken jsou obaleny pouze částečně, případně pouze tenkým filmem polymeru a propůjčují materiálu adsorpční vlastnosti, v patentu dokázané na příkladu adsorpce organického barviva. Charakter objemné textilie je možné dále využít při částicové filtraci, která byla dokázána na příkladu filtrace suspenze bakterií. Pro poslední charakteristiku vytvořených materiálů byla provedena biodegradační zkouška, která na třech modelových kompozitech dokázala rozpad struktury vláken během jednoho až dvou týdnů v ideálních podmínkách umělého kompostu při 58 °C [12].

Navržený materiál byl dále aplikován na filtraci mikroorganismů. Byly použity kmeny *Serratia marcescens* - G⁻ bakterie, velikost buněk: 0,9-2,0 x 0,5-0,8 (µm), tyčinky a *Micrococcus luteus* - G⁺ bakterie, velikost buněk: 0,9-1,8 (µm), kulovité buňky. Pro kultivaci bakterií bylo použito NB médium. Kultivace probíhala aerobně, při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

Pro filtraci byl použit mikro (nano) vláknenný kompozitní materiál tvořený PHA a aktivním uhlím o hmotnosti 1 g. V sérii za sebou byly použity tři tyto filtry. Suspenze buněk byla filtrována přes filtrační vrstvu za působení tlaku 250 mBar. Po filtraci buněčné suspenze o objemu 400 ml byl z filtrátu odebrán vzorek pro stanovení celkového množství buněk a stanovení množství živých buněk. Rovněž v průběhu filtrace byly odebírány vzorky pro stanovení množství buněk. Pro zjištění celkového počtu buněk v roztoku bylo použito turbidimetrické měření zákalu. Spektrofotometrické měření bylo provedeno při vlnové délce 630 nm ve vzorcích před filtrací a následně ve filtrátech.

Získané údaje byly analyzovány a získány filtrační účinnosti v procentech. Ve všech případech byla filtrace účinná nad 95 %. Při filtraci malých objemů byla filtrační účinnost stoprocentní. S Navyšujícím se objemem docházelo k průchodu bakterií.

Tabulka 5 Spektrofotometrické stanovení celkového množství buněk – směs *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*

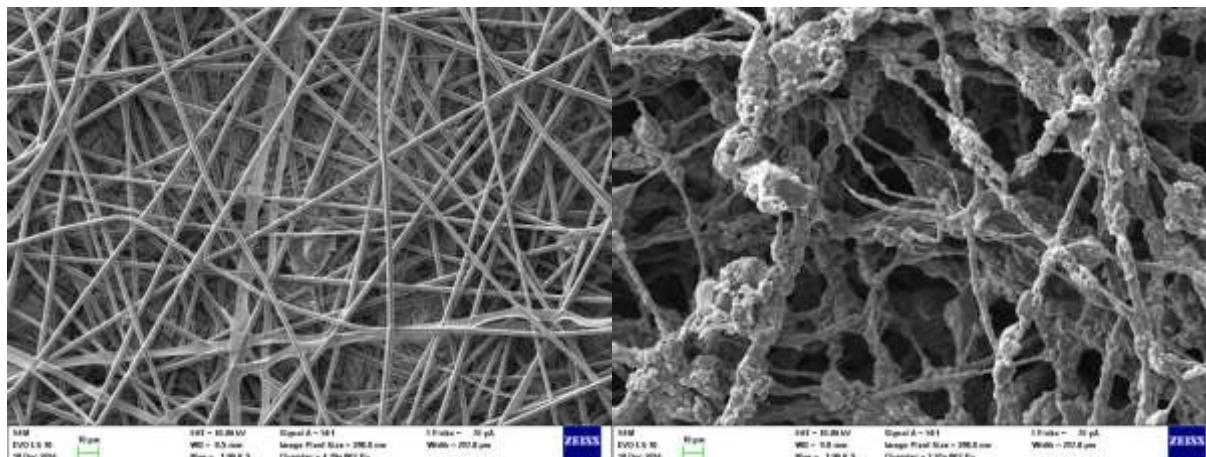
1g 3x	absorbance				odfiltrováno %
	a1	a2	a3	aØ	
před filtrací SM	0,087	0,081	0,085	0,084	
před filtrací ML	0,106	0,107	0,104	0,106	
před filtrací SM+ML	0,098	0,103	0,100	0,100	
po filtrací SM+ML (50ml)	0,000	0,000	0,000	0,000	100,0
po filtrací SM+ML (100ml)	0,000	0,000	0,000	0,000	100,0
po filtrací SM+ML (200ml)	0,000	0,000	0,000	0,000	100,0
po filtrací SM+ML (400ml)	0,002	0,005	0,003	0,003	96,7

K analýze množství živých buněk bylo využito nepřímého stanovení počtu životaschopných buněk plotnovou metodou. Počet životaschopných buněk (CFU) byl zjištěn počítáním kolonií na agarových plotnách po kultivaci daného vzorku.

Tabulka 6 Stanovení počtu životaschopných buněk – směs *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*

1g 3x	CFU				ředění	počet buněk v ml	odfiltrováno %	odfiltrováno buněk
	1	2	3	Ø				
před filtrací SM+ML	55	57	59	58,0	100000 0	5,80E+08		
po filtrací SM+ML (200ml)	11	14	13	12,7	10000	1,27E+06	99,8	1,16E+11
po filtrací SM+ML (400ml)	13 2	14 0	13 5	135, 7	10000	1,36E+07	97,7	2,27E+11

Mimo odstředivé zvlákňování kompozitních materiálů je patent zaměřen na přípravu plošných netkaných textilií za pomoci elektrostatického zvlákňování z roztoku 1,2-dichloroethanu (DCE) s přísádkem aktivního uhlí (Obrázek 50).



Obrázek 50 – mikrovláčna PHB bez aditivace (vlevo) a s obsahem aktivního uhlí v hm. poměru 1:1

Oba materiály, aditivovaná mikrovláčna připravená elektrostatickým a odstředivým zvlákněním, byly následně použity jako aditivum pro patentovanou kompozici UV ochranného filtru v přihlášce jako Příloha 5.

4.3.3 UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a způsob jeho přípravy (Příloha 5)

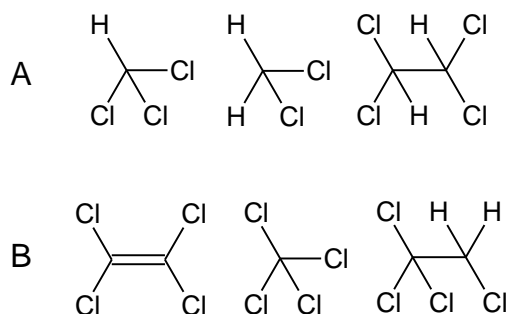
V předchozích komentářích byly stručně představeny publikované výsledky zabývající se přípravou vláknenných materiálů na bázi PHB vystupujících jako aktivní nosiče, sorbenty nebo filtrační materiály. Jednotlivé materiály, monofilamentní mikrovláknem s porézní strukturou vzniklé mokřím zvlákněním, objemné vlákno s možností plnění vzniklé odstředivým zvlákněním a submikronové a mikronové vlákno ve formě netkané textilie vzniklé elektrostatickým zvlákněním, byly použity při vývoji ochranného UV filtru na bázi PHB v různých formách a přírodních extraktů vykazujících absorpci v UV oblasti. Relativně vysoký měrný povrch připravených vláken umožňuje adsorpci například kávového oleje, který synergicky s PHB dokáže absorbovat (olej) a částečně odrážet (PHB) škodlivé UV záření. Přírodní oleje vykazující tyto vlastnosti je možné sorbovat na povrch vláken buď přímo při zvlákněním, tedy v případě zvláknění odstředivého nebo elektrostatického, anebo v následujícím kroku při mletí jednotného porézního vlákna. Pro účely UV filtru je vláknenná forma nevhodná, ale mikroskopické a nanoskopické charakteristiky jsou zachovány i při dezintegraci za pomoci mletí, případně drcení. Společně s částicemi PHB je v patentu uveden taktéž liposomální systém získaný ultrazvukovým působením na chloroformový roztok fosfolipidů, cholesterolu a PHB společně s organickým UV filtrem z přírodních olejů. Vzniká tak uzavřený liposomální systém s polymerním jádrem z PHB s nasorbovaným UV filtrem v polymeru a v liposomální membráně. Částice s nasorbovaným extraktem ze zelené kávy vzniklé pomletím srážených mikrovláken tak například vykazovaly sluneční ochranný faktor okolo hodnoty 36. Podobné výsledky vykazovaly namletá odstředivá mikrovláčna s obsahem extraktu. Vzniklý patent je vlastněn a průmyslově využíván firmou Nafigate a.s.

4.3.4 Způsob rozpouštění biodegradabilních polyesterů (Příloha 6)

Popisovaná práce si klade za cíl představit nový způsob získání stabilního roztoku PHB a dalších biodegradabilních polyesterů. Samotný patent je relativně stručný a obsahuje hlavně technické vymezení vzniku roztoku PHB ve směsi rozpouštědel methylesteru dichlorooctové kyseliny a trifluoro-případně trichloroethanolu. V následujícím komentáři, který je dále rozšířen v sekci nepublikovaných výsledků, bude popsán teoretický rámec systému PHB-rozpouštědlo.

PHB je specificky rozpustný polymer vykazující tvorbu roztoků především v chlorovaných rozpouštědlech, přičemž nejznámějším a obecně nejrozšířenějším rozpouštědlem je chloroform, případně

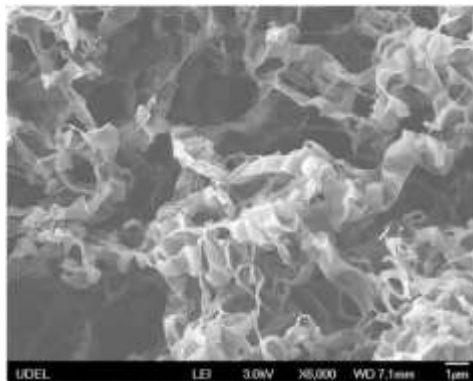
pro polymer o nižší molekulové hmotnosti je možné jako rozpouštědlo použít i dichlormethan. Pokud ale za rozpouštědlo budeme chtít použít tetrachlormethan, tak se nesetkáme s úspěchem ani za zvýšené teploty. Primárně se nabízející teorie o rozpustnosti PHB obecně v chlorovaných rozpouštědlech je tedy nedostatečná. To potvrzuje i nerozpustnost PHB v dalším běžně používaném chlorovaném rozpouštědle, tetrachlorethylenu. Zvolíme-li jako rozpouštědlo 1,1,2-tetrachlorethan, získáme po zahřátí v podstatě ideální systém umožňující vznik až 50 hm. % stabilního roztoku o velmi vysoké viskozitě a pastovité konzistenci. To je umožněno relativně nízkou výparností rozpouštědla, například vůči používanému chloroformu. Pokud se podíváme zblízka na struktury použitých rozpouštědel, můžeme si povšimnout jednoho společného strukturního prvku u rozpouštědel vytvářející roztoky PHB (Obrázek 51).



Obrázek 51 – Příklady chlorovaných sloučenin rozpouštějících PHB (A) a vůči PHB inertních (B)

Sloučeniny vykazující tvorbu roztoku PHB mají společnou dichloromethylovou skupinu- CHCl_2 . Sloučeniny strukturně podobné, avšak tuto skupinu neobsahující, PHB nerozpouštějí. Tento fakt byl ověřen na popsaných sloučeninách laboratorně a za zvýšené teploty.

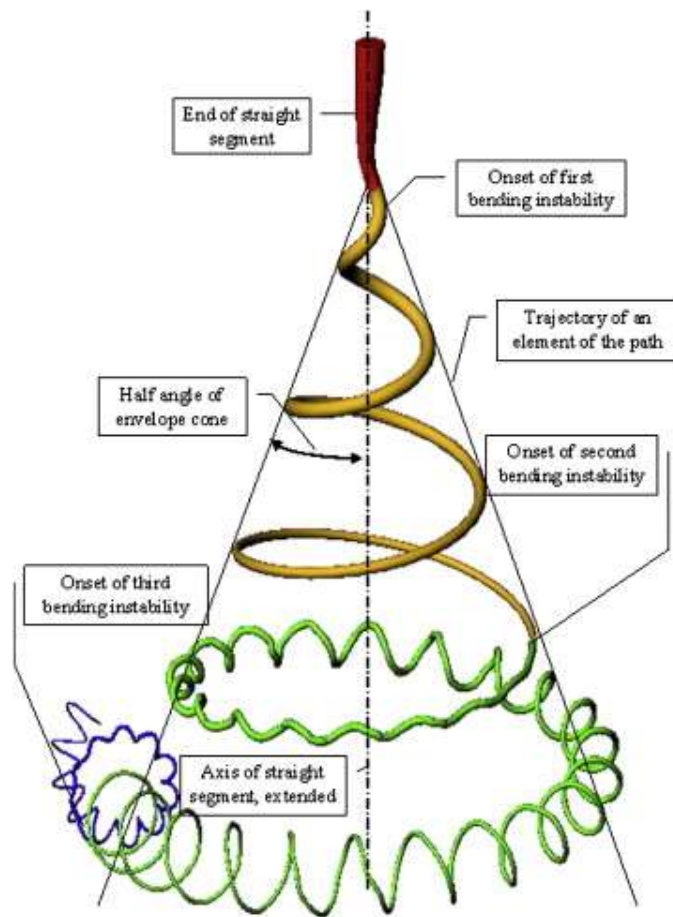
Pomineme nyní chlorovaná rozpouštědla a zaměříme se na sloučeniny chlor neobsahující, avšak interagující s PHB. PHB je teoreticky rozpustné v řadě solventů, alespoň dle predikce dle Hansenových třídimenzionálních parametrů [102]. Vysoká krystalinita polymeru ovšem zabraňuje praktickému použití široké řadě zmíněných rozpouštědel [102]. Dle praktické zkušenosti je tedy široký výčet rozpouštědel omezen na DMF, DMAc, DMSO a případně další vysoko vroucí sloučeniny umožňující krátkodobé zahřátí na teplotu až 150 °C. Při dosažení této teploty dochází k umenšení krystalinity polymeru, penetraci molekul rozpouštědla do struktury a získání horkého roztoku. Po vychladnutí ovšem v závislosti na koncentraci roztoku dochází dříve, či později k formaci gelu. Tento fenomén byl studován v několika publikacích [103-105] a je vysvětlován jako uspořádání krystalických fází polymeru propojených fázemi amorfními. Při záměně rozpouštědla DMF za vodu a následné lyofilizaci byla získána struktura gelu formovaného do propojených „stuh“ (Obrázek 52).



Obrázek 52 – morfologie získaná záměnou rozpouštědla a lyofilizací gelu PHB s DMF [104]

Za pomoci rentgenové difrakce byla zjištěna přítomná krystalinita v gelu, přičemž vzdálenost mezi jednotlivými rovinami byla větší než v běžném krystalickém PHB v pevné fázi. Autoři práce to vysvětlují interakcí mezi rozpouštědlem a krystalickým polymerem, čímž dochází k bobtnání [104].

Tento jev zamezuje použití běžných rozpouštědel pro roztokové zpracování v čele s elektrostatickým zvlákněním PHB. Chloroform sám o sobě použitelný je, ale pouze při zvláknění z jehly, a i tak je získán materiál o řádově mikronové tloušťce. Určitou variantou je zvláknění z výše vroucího chlorovaného rozpouštědla, jakým je například 1,2-dichloroethan, či další již zmíněné sloučeniny, čímž je prodloužena doba letu vlákna mezi elektrodami a její dlužení. Během elektrostatického zvláknění dochází k několika fázím tzv. ohybové nestability (bending instability) (Obrázek 53 [106]).

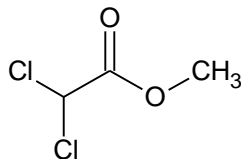


Obrázek 53 – Ohybová nestabilita vlákna při elektrostatickém zvláknění [106]

Pokud je této nestabilitě dosaženo, což závisí na mnoha faktorech, přičemž ale podmínkou je dloužitelný stav protovlákna v semi-pevném stavu, vzniklé vlákno nabývá velmi malých a kýžených průměrů. Volba vhodného rozpouštědla, s adekvátní výparností a bodem varu, stejně tak dipólovým momentem je zásadní pro úspěšné elektrostatické zvláknění. Tyto popsané vlastnosti rozpouštědla jsou ještě důležitější při elektrostatickém zvláknění na průmyslové lince, kdy je polymerní roztok nanášen na strunu zvláknovací hlavou. Příliš výparné rozpouštědlo na struně rychle zasychá a dochází k ucpání zvláknovací hlavy a zastavení procesu.

Spojíme-li tyto poznatky, získáme profil teoretického rozpouštědla PHB, umožňující vznik stabilního roztoku a úspěšného elektrostatického zvláknění na nanoskopickou úroveň. Jako nejvhodnější

rozpouštědlo obsahující – CHCl₂ skupinu, vysoký dipólový moment a adekvátně vysoký bod varu se jeví, i vzhledem k ekonomické dostupnosti, látka methyl ester dichlorooctové kyseliny (MDCA) (Obrázek 54).



Obrázek 54 – struktura methyl esteru dichlorooctové kyseliny

Jedná se o čirou kapalinu pronikavého zápachu, která v přítomnosti vody pomalu hydrolyzuje, což zapříčiňuje její dráždivost a mírnou toxicitu. Její bod varu dosahuje 143 °C (atm.) a vykazuje dipólový moment. Experimentálně bylo dokázáno, že PHB je v MDCA rozpustný při zahřívání na 120 °C. Rozpustnost je prakticky limitovaná pouze vysokou hustotou rozpouštědla a nízkou hustotou a velkou objemností polymeru v pevném stavu. Kýžený roztok o vysoké koncentraci tedy zpočátku vypadá jako napěchovaný pevný polymer v uzavřené lahvi v celém objemu, s hladinou rozpouštědla v dolní polovině lahve. Zahříváním a mícháním dochází k rozpouštění a vytvoření nažloutlého roztoku, jehož barevnost je udána především nečistotami v polymeru. Prakticky bylo dosaženo až 20 hm. % koncentrace PHB v čistém MDCA. Při samovolném ochlazení roztoku ovšem dochází i v nižších koncentracích k relativně rychlé gelaci, stejně jako v případě DMF. Prvně bylo od MDCA po tomto zjištění upuštěno a byl testován často používaný systém rozpouštědel – chloroform s DMF v různých poměrech. Problém tohoto systému byl ovšem identický, i relativně malý přírůstek DMF (20 hm. %) po čase způsobil gelaci celého roztoku. Navíc přítomnost chloroformu nedovolovala získání nanoskopických vláken. Metoda využívání systému rozpouštědel byla ale převzata pro systém s MDCA. Byla vyzkoušena řada rozpouštědel, od chloroformu, přes DMF a dioxan až po DMSO. Při ochlazení ovšem stále dochází v těchto systémech k relativně rychlé gelaci zamezující dlouhodobou použitelnost roztoku v kontinuálních procesech bez externího ohřevu. Ukázalo se, že přírůstek trifluoroethanolu (TFE) má stabilizační funkci a zabraňuje rychlé gelaci roztoku. V další práci pak byl nahrazen toxický TFE méně nebezpečným trichloroethanolem (TCE), který gelaci kompletně neinhibuje, ale značně zpomaluje. Byla tak získána cesta k dostatečně stabilnímu roztoku PHB. V sekci dalších výsledků je dále popsána praktická část s elektrostatickým zvlákněním a optimalizací tohoto procesu, až do průmyslové použitelnosti.

4.3.5 Nanovláknenný sorpční materiál na bázi polyhydroxybutyrátu pro sorpci těžkých kovů (Příloha 7)

Užitný vzor je praktickým vyústěním experimentů s cílem chemické modifikace PHB. Polyhydroxybutyrát reaguje v chlorační reakci s homogenní reakcí s rozpuštěným elementárním chlorem v chloroformu za intenzivního osvětlení halogenovou lampou. Takto vzniká velmi nahodile substituovaný a pravděpodobně i nenasycený modifikovaný polymer, který je obtížně definovatelný. Základní charakteristikou chlorovaného PHB je středně hmotnostní molekulová hmotnost, polydisperzní index, a obsah vázaného chlóru, určitelného titrací po rozkladu hydroxidem sodným.

K získání materiálu, který je schopen na sebe vázat těžké kovy, například kadmátové nebo stříbrné ionty, je potřeba zavést do struktury thiolové skupiny. Jednou z motivací chlorování PHB je právě zavedení skupiny, která je dále chemicky modifikovatelná. Reakcí s hydrosulfidem sodným dochází částečně k substituci za vzniku dále neidentifikovatelných R-SH skupin. Pravděpodobně je i výskyt disulfidických můstků či dalších forem vázané síry. Následně byla provedena konduktometrická titrace pro určení schopnosti materiálu vázat těžké kovy. Vzhledem k několika-krokové přípravě, náročné separaci a velmi obtížné charakterizaci bylo od další práce upuštěno.

4.4 Dílčí závěry

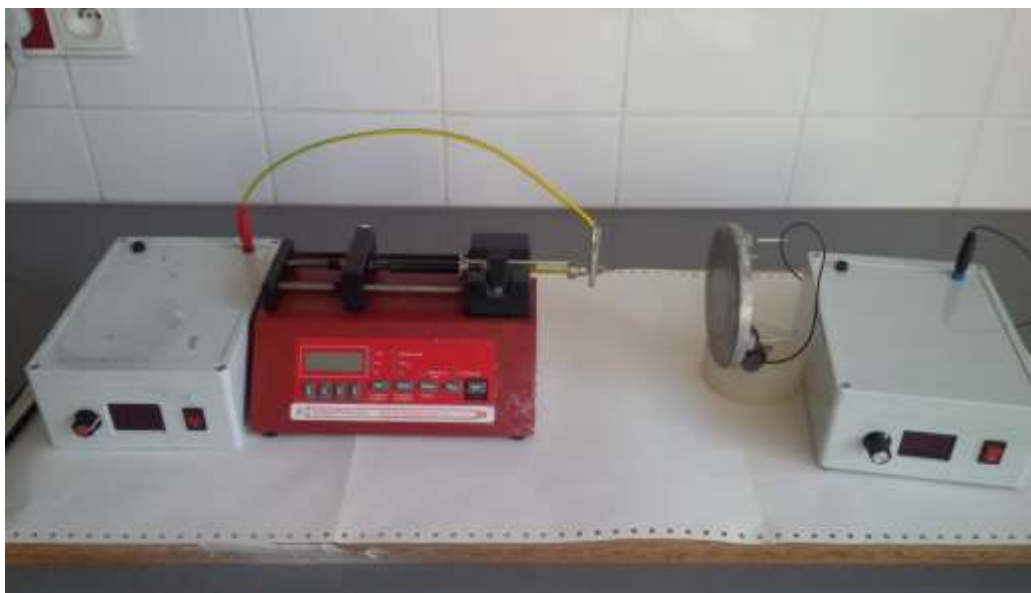
V rámci předchozí kapitoly byly představeny vyvinuté metody rozpouštění a zvláknění PHB. Byly popsány dvě publikace v odborném periodiku Materials (IF = 3,057) zabývající se elektrostatickým zvlákněním polymeru s antibiotikem a následně popsáním materiálových vlastností při uvolňování aditivního antibiotika. Druhou publikací byla metoda mokrého zvláknění PHB z chloroformového roztoku, přičemž vzniklá vlákna se vyznačovala relativně velkým měrným povrchem a nanoskopickou vnitřní porézní strukturou. Těchto vlastností bylo využito pro sorbování přírodních olejů a extraktů. V patentové oblasti bylo popsáno pět přihlášek a přijatých patentů, které charakterem spadají do široké rodiny metod, způsobů výroby a samotných materiálů. Pro další vývoj v oblasti zvláknění PHB je možné na závěr podtrhnout způsob rozpouštění PHB v systému rozpouštědel methyl dichloroacetát a trichloro či trifluoroethanol. Jako prakticky využívaný produkt je možné zmínit patentovanou UV absorbující kompozici na bázi PHB. V této kompozici byla využita většina získaných poznatků popsaných v dalších pracích.

4.5 Přehled dalších projektů řešených v rámci disertační práce

4.5.1 Úvod - elektrostatické zvláknění PHB a dalších polyesterů

V následující kapitole budou popsány experimentální práce na systému zvláknění PHB a dalších polyesterů (PBAT a PLA) na pilotních linkách pro získání nanovláknenných textilií průmyslové kvality. Jedná se o sérii seřazených experimentů tak, jak postupoval vývoj a optimalizace, přičemž práce nebyla předem celistvě určena. Mnohé experimenty byly ukončeny na základě komerční neaktuálnosti, či přesměrování výzkumného záměru. Práce probíhaly ve spolupráci s firmami Nafigate a.s. a Elmarco s.r.o. a jejich výsledky mohou snad posloužit jako inspirace či vodítka pro další výzkum v zvláknění biopolymerů. Zvlákněno bylo na následujících přístrojích:

Electrospinner (Obrázek 55) umožňující zvláknění z jehly je laboratorní testovací zařízení, které významně urychluje vývoj produktů, protože parametry jehlového zvláknění se velmi přibližují strunovému, průmyslovému zvláknění (56).



Obrázek 55 – Jehlové zařízení – prototyp



Obrázek 56 – Strunové zařízení – Nanospider NS1WS500U

Na obrázku 56 v pravé části je vidět povoskovaný papír, na který jsou nanovlákná nanášena. Vnitřek stroje funguje na základě struny, na kterou je pojezdem s polymerním zásobníkem nanášen zvláknovací roztok.

4.5.2 Materiály a metody

4.5.2.1 Materiály

Polymery:

PHB (5 g, Biomer, $M_w = 600$ kDa, $M_n = 400$ kDa dle GPC), PHB (tři druhy, Nafigate, $M_w = 560$ kDa, $M_n = 180$ kDa; $M_w = 650$ kDa, $M_n = 210$ kDa; $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa), PBAT (Ecoflex, $M_n = 142$ kDa, PDI = 2,46, BASF), PLA (Ingeo Biopolymer 6060D, amorfní, $V_R = 3,3$, Natureworks), PVP (K90, $M_w = 360$ kDa, Sigma Aldrich)

Rozpouštědla a aditiva:

MDCA (Sigma-Aldrich; $\geq 99\%$), trifluoroethanol (Sigma-Aldrich; $\geq 99\%$), trichloroethanol (Sigma-Aldrich; $\geq 99\%$), CHCl_3 (PENTA, čistý), DMF (PENTA, čistý), 1,4-dioxan (Sigma Aldrich, 99 %), Tetraethyl ammonium bromid (Sigma-Aldrich; 99 %)

4.5.2.2 Metody

a) Pilotní elektrostatické zvláknění PHB (Biomer) ze systému MDCA a TFE

Zvláknování bylo provedeno na přístroji Nanospider NS 1S500U s kontrolovanou klimatizovanou atmosférou o dané vlhkosti a teplotě vzduchu. Jako podkladový materiál byl použit silikonovaný, pečicí papír o šířce 500 mm. Připravené nanovláknenné vrstvy byly charakterizovány, po pokovení 5 nm vrstvou zlata, elektronovou mikroskopií (Nova NanoSEM, FEI, Česká republika) a byla změřena získaná plošná

hmotnost (m_{gsm}) vrstev za pomoci vážení výřezu o rozměru 100x100 mm a následném přepočtu. Získané snímky z elektronového mikroskopu byly analyzovány za pomoci softwaru ImageJ.

PHB (5 g, Biomer, $M_w = 600$ kDa, $M_n = 400$ kDa dle GPC) byl za horka (120 °C) rozpuštěn v MDCA (45 g, Sigma-Aldrich) v uzavřené a míchadlem opatřené tlustostěnné lahvi. Následně byl po ochladnutí na přibližně 60 °C za míchání přidán trifluoroethanol (50 g, Sigma Aldrich). Byl vytvořen lehce nažloutlý viskózní roztok, který byl zaveden do zvláknovací hlavy opatřené průvlakem číslo 6 (0,6 mm šířka otvoru, viz. Obrázek 33 v kapitole Elektrostatické zvláknování v průmyslu). Vnitřek zvláknovací komory byl vytemperován na (T) 21 °C s relativní vlhkostí vzduchu (H_{rel}) na 18 %. Vzdálenost elektrod (l_{eld}) byla nastavena na 200 mm. Translační pohyb elektrody nanášející roztok na zvláknovací strunu byl nastaven na rychlost (S_{EMW}) 350 mm.s⁻¹. Rychlost navíjení ($s_{podklad}$) podkladového materiálu na 10 mm.min⁻¹. Na kladnou spodní elektrodu bylo zavedeno napětí (U_+) 50 kV a na elektrodu vrchní (U_-) -10 kV.

b) Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na koncentraci PHB

PHB (Nafigate, $M_w = 560$ kDa, $M_n = 180$ kDa) byl za horka rozpuštěn v MDCA a TFE v hmotnostním poměru 4:1 a takto byla připravena série roztoků (hm. koncentrace 5; 6; 7; 8 a 9 %) které byly zvlákněny za předchozích podmínek.

c) Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na koncentraci TEAB

PHB (Nafigate, $M_w = 650$ kDa, $M_n = 210$ kDa) byl za horka rozpuštěn v MDCA a TFE v hmotnostním poměru 4:1 na koncentraci 9 hm. %. K vzniklému roztoku byl přidán TEAB v různých přídavcích na 100 g roztoku a takto byla připravena série aditivovaných roztoků s přídavky 0; 50; 100; 150 a 200 mg na 100 g roztoku. Připravené roztoky byly zvlákněny za předchozích podmínek.

d) Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na napětí a vlhkosti

PHB (20 g, Nafigate, $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa), MDCA (160 g), TFE (40 g) a Tetraethylammonium bromid (0,1 g, TEAB, Sigma Aldrich) byly rozpuštěny a zvlákněny při různých podmínkách shrnutých v tabulce 9. Konstantní zvláknovací podmínky byly nastaveny na $T = 23$ °C, $s_{podklad} = 10$ mm.min⁻¹.

e) Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF)

PBAT byl prvně zvlákněn z laboratorního jehlového zařízení. Pro získání přehledu o polymeru bylo připraveno několik roztoků:

1. 10 hm. % PBAT v CHCl₃
2. 10 hm. % PBAT v DMF
3. 5 hm. % PBAT v 1,4-dioxanu
4. 10 hm. % PBAT v 1,4-dioxanu
5. 5 hm. % PBAT ve směsi 1,4-dioxan/CHCl₃ 1:1
6. 5 hm. % PBATve směsi 1,4-dioxan/DMF 1:1

Zvláknovací podmínky byly u všech experimentů nastaveny identicky:

$U_+ = 15$ kV; $U_- = -5$ kV; $l_{eld} = 150$ mm; $T = 23$ °C; $H_{rel} = 35 \pm 10$ %

f) Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF) z MDCA s TFE

PBAT byl rozpuštěn za horka a míchání ve směsi rozpouštědel MDCA a TFE v hmotnostním poměru 4:1 a byla vytvořena koncentrační řada roztoků (Tabulka 10), které následně byly zvlákněny na strunovém Nanospideru. Podmínky zvláknění: $U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $l_{eld} = 180$ mm; $T = 23$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $S_{EMW} = 500$ mm.s⁻¹; $s_{podklad} = 50$ mm.min⁻¹; průvlak 6 (0,6 mm).

g) Elektrostatické zvláknění PLA (Natureworks) z MDCA

PLA (25 g, Ingeo Biopolymer 6060D, amorfni, $V_R = 3,3$, Natureworks) byl rozpušten v MDCA (225 g) spolecne s TEAB (0,1 g) pro zvyseeni vodivosti roztoku. Pripraveny 10 hm. % roztok byl zvlaknen na strunovem Nanospideru.

$U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $I_{elid} = 180$ mm; $T = 23$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $S_{EMW} = 500$ mm.s⁻¹; $S_{podklad} = 50$ mm.min⁻¹; pruvlak 6 (0,6 mm)

h) Elektrostaticke zvlakneni PHB (Nafigate) a PBAT (BASF) z MDCA s TFE

PHB (16 g, Nafigate, $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa) a PBAT (4 g, Ecoflex, $M_n = 142$ kDa, PDI = 2,46, BASF) byly rozpušteny v MDCA (160 g) a TFE (40 g) spolecne s TEAB (0,1 g) pro zvyseeni vodivosti roztoku. Roztok byl zvlaknen na strunovem Nanospideru pri ruznych podminkach procesu (Tabulka 11). $T = 23$ °C; $S_{podklad} = 10$ mm.min⁻¹

i) Elektrostaticke zvlakneni PHB (Nafigate) z MDCA s TCE

PHB (20 g, Nafigate, $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa) byl rozpušten za horka (100 °C) ve smesi MDCA (160 g) a TCE (40 g) s pridakem 0,1 g TEAB. Roztok byl zahrivan v uzavrene lahvi po dobu dvou hodin a mican. Vytvoril se viskozni nazloutly roztok, který byl ponechan pres noc k vychladnuti, avsak vytvoril gel. Nasledne byl opetovne ohrivan az do kapalneho stavu a ochlazen na laboratorni teplotu. Poté byl zvlaknovan po dobu 3 hodin, přičemž po dobu procesu roztok zůstal v kapalné formě. Podmínky zvlaknovani: $U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $I_{elid} = 180$ mm; $T = 22$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $S_{EMW} = 400$ mm.s⁻¹; $S_{podklad} = 10$ mm.min⁻¹; pruvlak 6 (0,6 mm).

j) Elektrostaticke zvlakneni PBAT (BASF) z MDCA s TCE

PBAT (30 g) byl rozpušten ve smesi MDCA (160 g) a TCE (40 g) s pridakem 0,1 g TEAB a nasledne zvlaknen za nasledujicich podminek: $U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $I_{elid} = 180$ mm; $T = 22$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $S_{EMW} = 400$ mm.s⁻¹; $S_{podklad} = 10$ mm.min⁻¹; pruvlak 6 (0,6 mm).

k) Elektrostaticke zvlakneni PHB (Nafigate) a PLA (Natureworks) z MDCA s TCE

PHB (16 g, Nafigate, $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa) a PLA (4 g, Ingeo Biopolymer 6060D, amorfni, $V_R = 3,3$, Natureworks) byly rozpušteny v MDCA (160 g) a TCE (40 g) spolecne s TEAB (0,1 g) pro zvyseeni vodivosti roztoku. Pripraveny roztok byl zvlaknen na strunovem Nanospideru: $U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $I_{elid} = 180$ mm; $T = 23$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $S_{EMW} = 600$ mm.s⁻¹; $S_{podklad} = 30, 50$ a 100 mm.min⁻¹; pruvlak 6 (0,6 mm).

l) Elektrostaticke zvlakneni PHB (Nafigate) a PBAT (BASF) z MDCA s TCE

PHB (12 g, $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa) a PBAT (3 g) byly rozpušteny v MDCA (120 g) a TCE (30 g) spolecne s TEAB (0,1 g) pro zvyseeni vodivosti roztoku. Pripraveny roztok byl zvlaknen na strunovem Nanospideru: $U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $I_{elid} = 180$ mm; $T = 22$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $S_{EMW} = 330$ mm.s⁻¹; $S_{podklad} = 10$ mm.min⁻¹; pruvlak 6 (0,6 mm).

m) Elektrostaticke zvlakneni PHB (Nafigate) a PVP (Sigma Aldrich) z MDCA s TCE

PHB (3,5 g, $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa) a PVP (0,35 g, K90, $M_w = 360$ kDa, Sigma Aldrich) byly rozpušteny v MDCA (28 g) a TCE (7 g). Pripraveny roztok byl zvlaknen na strunovem Nanospideru. Podmínky zvlaknovani $U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $I_{elid} = 180$ mm; $T = 23$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $S_{EMW} = 600$ mm.s⁻¹; $S_{podklad} = 30$ mm.min⁻¹; pruvlak 6 (0,6 mm).

n) Elektrostaticke zvlakneni PHB (Nafigate) a PVP (Sigma Aldrich) z MDCA s TCE

PHB (3,5 g, $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa) a PVP (0,35 g, K90, $M_w = 360$ kDa, Sigma Aldrich) byly rozpušteny v MDCA (28 g) a TCE (7 g). Pripraveny roztok byl zvlaknen na strunovem Nanospideru. Podmínky

zvlákňování $U_+ = 60$ kV; $U_- = -5$ kV; $l_{eld} = 180$ mm; $T = 23$ °C; $H_{rel} = 15$ %; $s_{EMW} = 600$ mm.s⁻¹; $s_{podklad} = 30$ mm.min⁻¹; průvlak 6 (0,6 mm).

o) Elektrostatické naprašování PHB (Nafigate) z horkého DMAc roztoku

Byla vytvořena série roztoků PHB (Nafigate $M_w = 960$ kDa, $M_n = 360$ kDa) v DMAc a následně elektrostaticky naprašeny. Roztoky jsou popsány v tabulce 12 společně s výsledky. Pro účely procesu byly zvoleny parametry: $U_+ = 15$ kV; $U_- = -5$ kV; $l_{eld} = 150$ mm; $T = 23$ °C; $H_{rel} = 40$ %; $s_{dávkování} = 50$ μl.min⁻¹ Jako podkladový materiál byl použit potravinářský alobal.

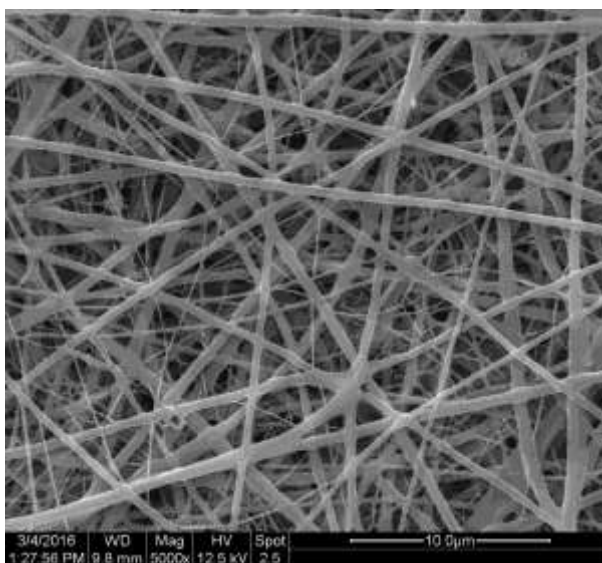
4.5.3 Výsledky a diskuse

4.5.3.1 Pilotní elektrostatické zvlákňování PHB (Biomer) ze systému MDCA a TFE

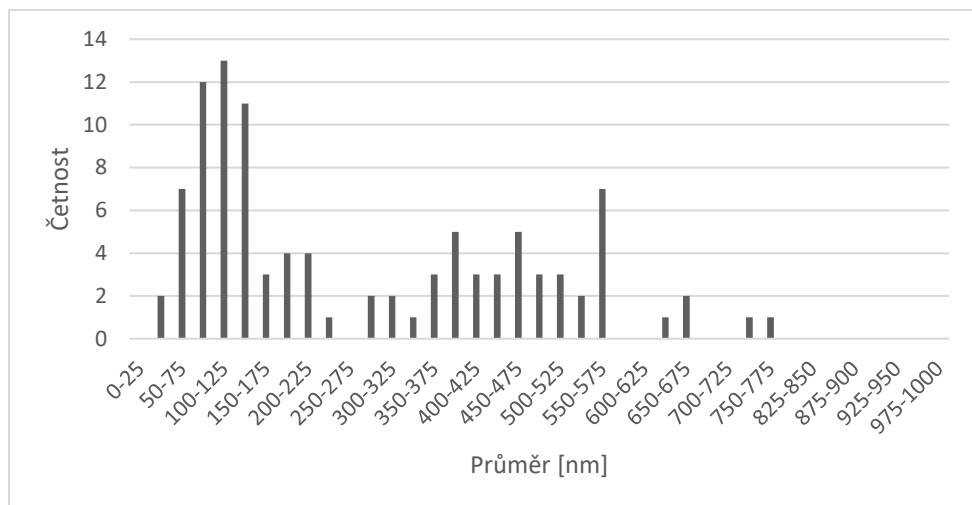
Byla získána bílá homogenní vrstva (Obrázek 57) o plošné hmotnosti 15 g.m⁻². Vzorek byl změřen za pomoci elektronové mikroskopie (Obrázek 58) a byla určena průměrná tloušťka vláken (l_{pp}) a jejich distribuce. Vrstva se skládá z navzájem propojených submikronových a nanoskopických vláken. Distribuce průměrů (Obrázek 59) je nehomogenní z důvodu dvou maxim tlouštěk (119±43; 475±108 nm). Tato morfologie je z hlediska vlastností vrstvy výhodná, kdy vlákna tlustší propůjčují vrstvě dobré mechanické vlastnosti a odolnost vůči otěru, zato vlákna menší zlepšují například filtrační vlastnosti, či relativní měrný povrch. Vzhledem k úspěchu této kompozice byl postup dále optimalizován.



Obrázek 57 – První získaná vrstva nanovlákněného PHB ze systému MDCA a TFE



Obrázek 58 – SEM snímek připravených nanovláken PHB ze systému MDCA a TFE



Obrázek 59 – Distribuce průměrů nanovláken PHB ze systému MDCA a TFE

4.5.3.2 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na koncentraci PHB

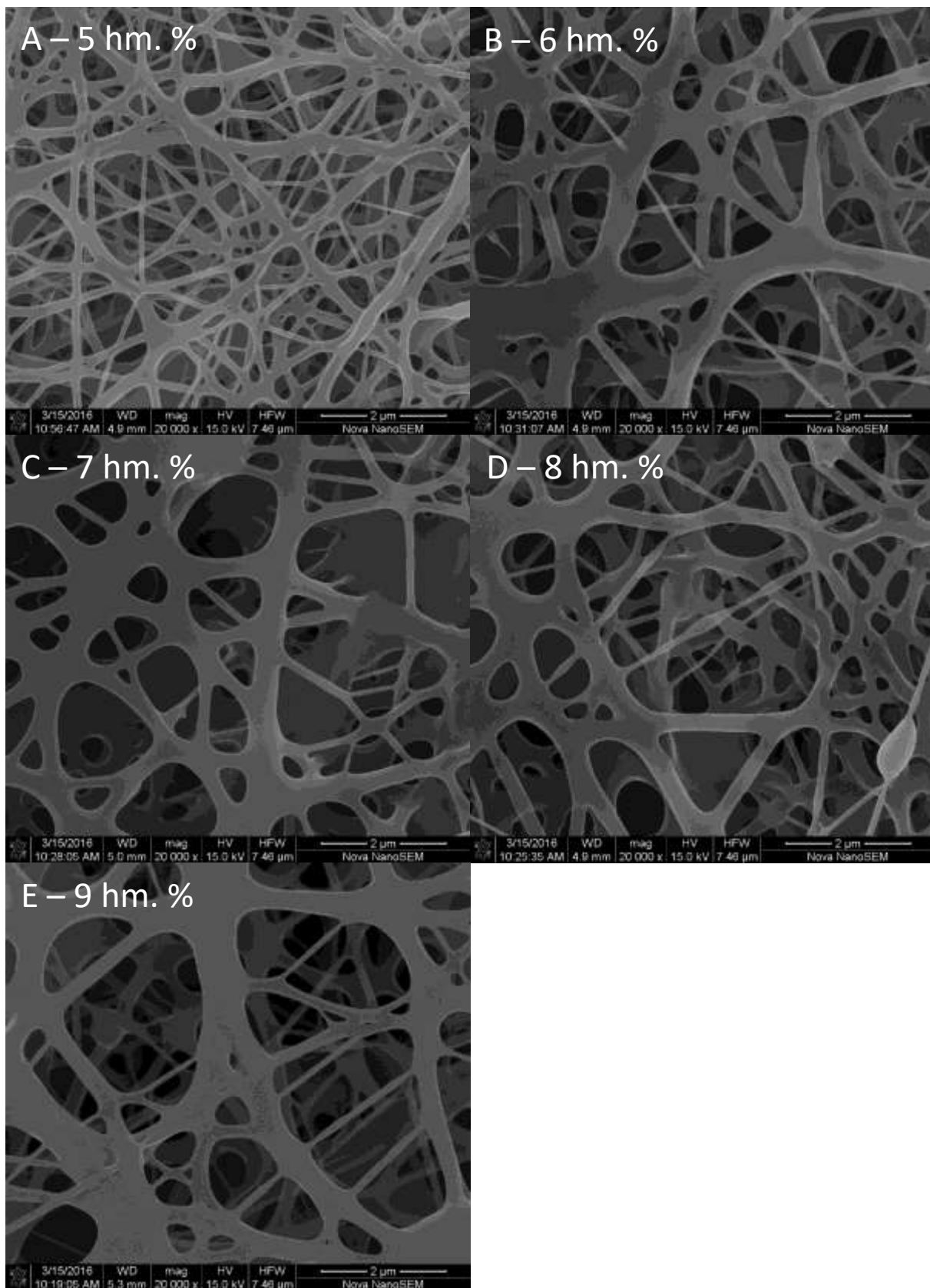
První experimenty ukázaly zajímavé výsledky, kde roztok umožňuje dlouhodobé zvláknění na strunovém Nanospideru, tedy potenciálně v průmyslovém měřítku. V dalších experimentech byl změněn zdroj polymeru na PHB z produkce firmy Nafigate spolupracující s FCH VUT. PHB (Nafigate, $M_w = 560$ kDa, $M_n = 180$ kDa) byl za horka rozpuštěn v MDCA a TFE v hmotnostním poměru 4:1 a takto byla připravena série roztoků (Tabulka 7). Roztoky byly zvlákněny na strunovém Nanospideru za podmínek z předchozího experimentu a změřeny na SEM (Obrázek 60).

Tabulka 7 – Koncentrace PHB v roztocích a výsledné průměrné tloušťky vláken

Koncentrace polymeru [hm. %]	Průměrná tloušťka vláken [nm]
5	87±42
6	156±104
7	163±85
8	142±74
9	182±120

V dalších experimentech byly získány relativně křehké nanovláknenné vrstvy, u kterých byla zjištěna průměrná tloušťka vláken, které vykazovaly slepený charakter. Výsledky se výrazně lišily od předchozího zvláknění z důvodu odlišného zdroje PHB, jiné molekulové hmotnosti, indexu polydispersity a taktéž čistoty, která velmi pravděpodobně hraje pro zvláknování PHB zásadní roli, protože výrazně určuje viskozitu roztoku a výsledné mechanické vlastnosti vrstvy. Charakter nečistot v materiálu je pravděpodobně taktéž zásadní proměnnou.

Se vzrůstající koncentrací roztoku docházelo mírně k navyšování průměrné tloušťky vláken, avšak tento trend je velmi nejednoznačný z důvodu velkého rozpětí průměrů vláken. Jednoznačný rozdíl je vidět v okrajových koncentracích řady, kdy průměr vláken vzniklých z koncentrovanějšího roztoku je podstatně vyšší než u roztoku obsahující méně polymeru. V následujících experimentech byl již použit odlišná šarže PHB s vyšší čistotou a odlišnou molekulovou hmotností.



Obrázek 60 – SEM měření připravených nanovláčkových vrstev z různě koncentrovaných roztoků PHB

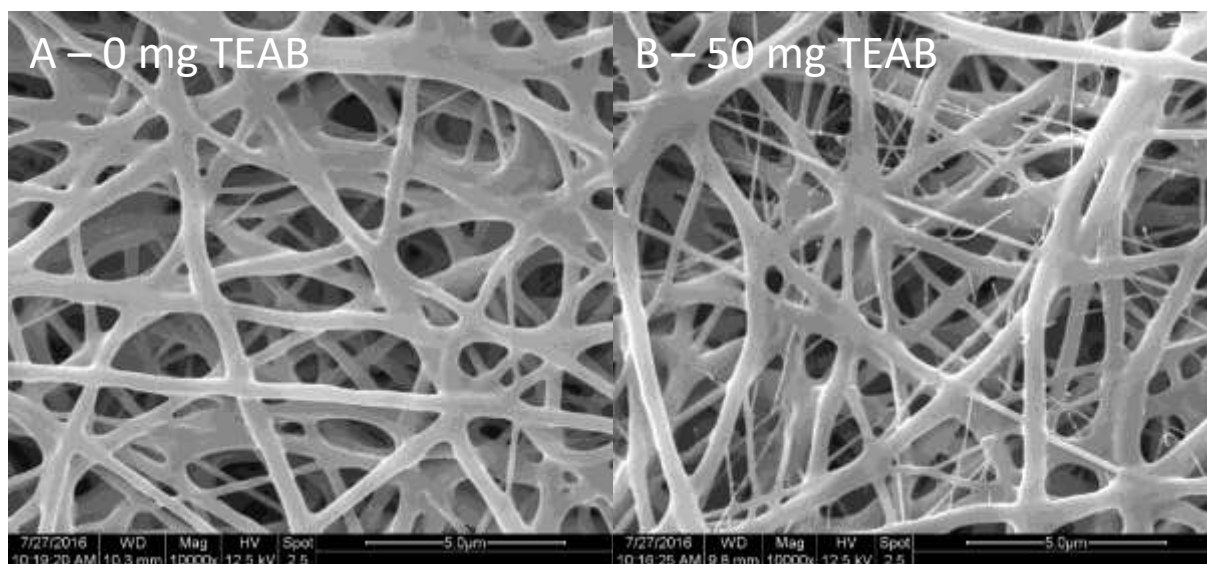
4.5.3.3 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na koncentraci TEAB

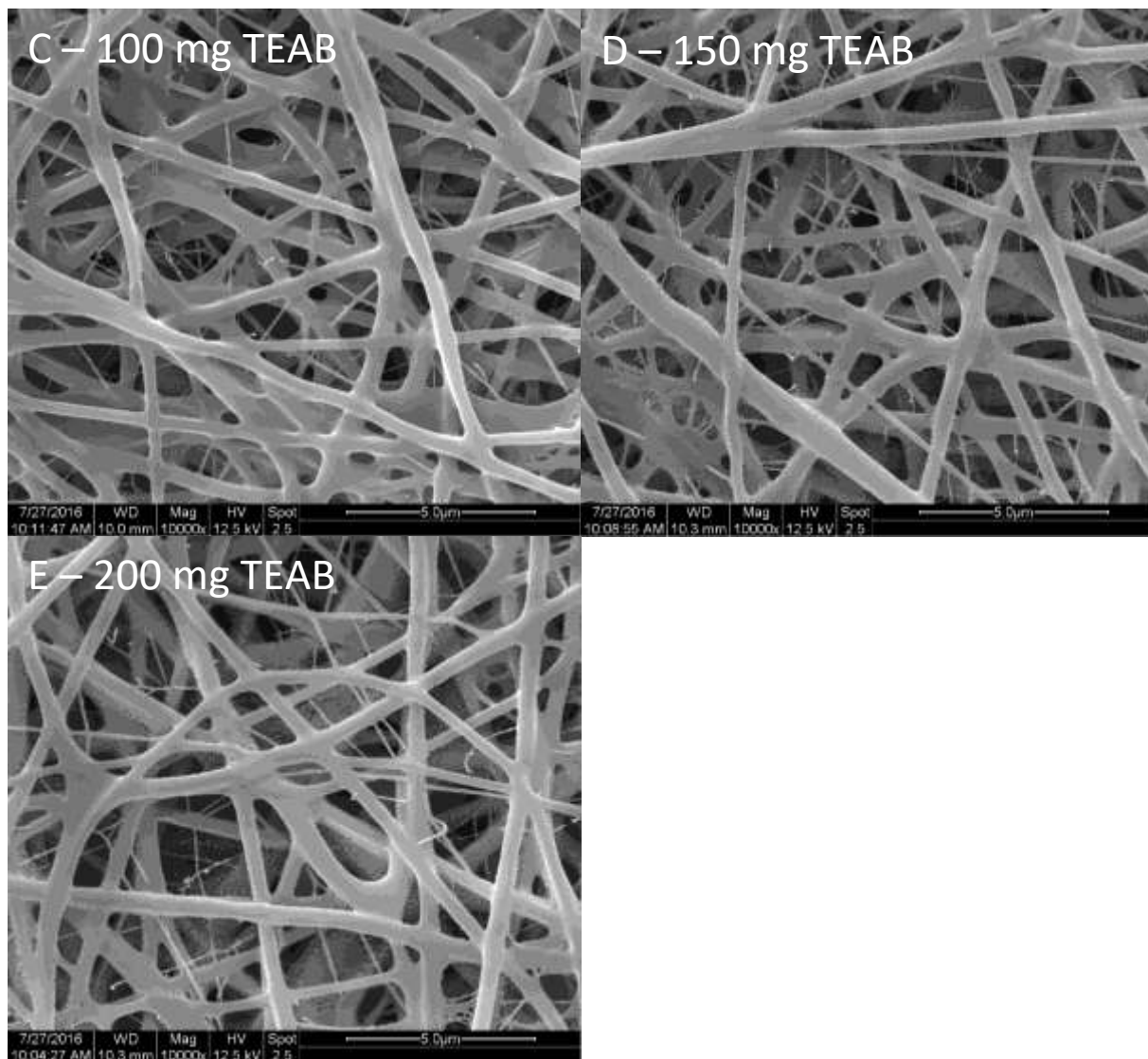
Přídavek tetrethylammonium bromidu je využíván pro zvýšení vodivosti roztoků v organických rozpouštědlech a tím zlepšení průběhu elektrostatického zvláknění a ovlivnění výsledné morfologie vláken. PHB (Nafigate, $M_w = 650$ kDa, $M_n = 210$ kDa) byl za horka rozpuštěn v MDCA a TFE v hmotnostním poměru 4:1 na koncentraci 9 hm. %. K vzniklému roztoku byl přidán TEAB v různých přídavcích na 100 g roztoku a takto byla připravena série aditivovaných roztoků (Tabulka 8). Roztoky byly zvlákněny na strunovém Nanospideru za podmínek z předchozího experimentu a změřeny na SEM (Obrázek 61).

Tabulka 8 – Koncentrace TEAB v roztocích a výsledné průměrné tloušťky vláken

Přídavek TEAB na 100 g roztoku [mg]	Průměrná tloušťka vláken [nm]
0	289±86
50	335±118
100	327±97
150	334±132
200	317±106

Morfologie ani průměry vláken se výrazně přídavkem TEAB zásadně nemění. Změna morfologie vrstvy byla pozorována z důvodu změn parametrů použitého PHB včetně čistoty. Tento fakt se ukázal jako zásadní pro celý proces zvláknění PHB a možností dalšího rozvoje, které jsou závislé na konzistenci vstupního materiálu. Pro další experimenty byla použita opět další a odlišná šarže produktového PHB.





Obrázek 61 – SEM měření PHB nanovláken s přidavkem TEAB pro zvýšení vodivosti roztoku

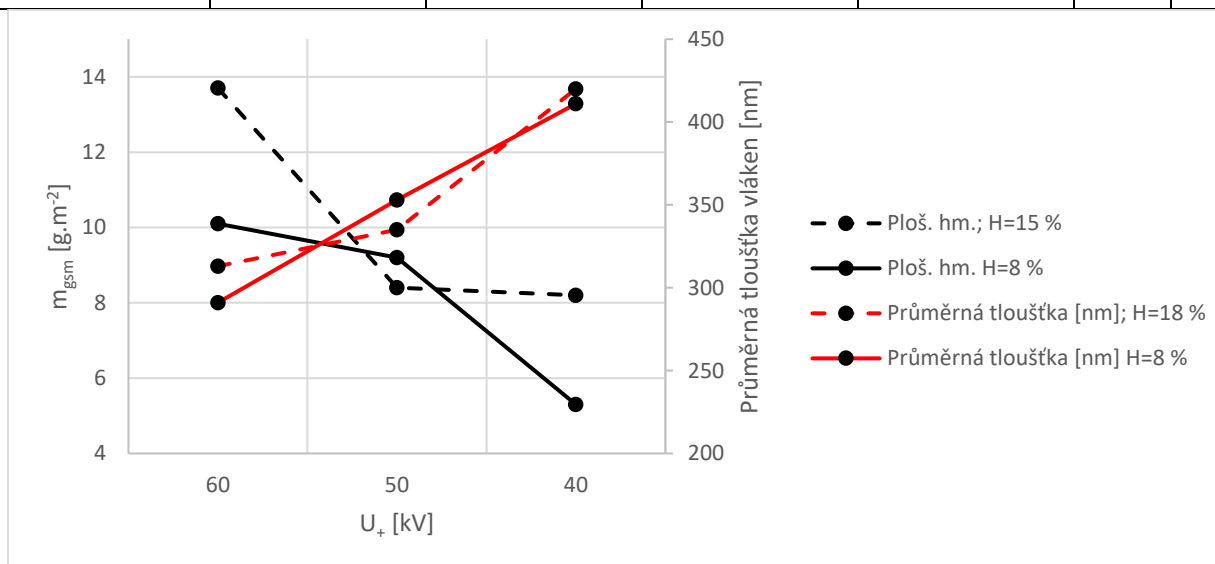
4.5.3.4 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) ze systému MDCA a TFE – závislost na napětí a vlhkosti

Připravené materiály byly změřeny za pomoci SEM (Obrázek 63) a charakterizovány na plošnou hmotnost a průměrnou tloušťku vláken. Výsledky jsou zobrazeny v Tabulce 9 a Obrázku 62, který graficky popisuje závislost charakteristik na použitém kladném napětí. Jsou tak získané dvě série závislostí při různých vzdušných vlhkostech.

Oproti prvnímu experimentu byla zvýšena koncentrace PHB v roztoku a byl změněn poměr rozpouštědel. Dalším rozdílem byl odlišný původ polymeru, přičemž použitý polymer obsahoval pravděpodobně více nečistot což se projevilo výraznou žlutou barvou roztoku. Zvýšení koncentrace a snížení obsahu TFE zapříčinilo taktéž gelaci roztoku, avšak až po dvou dnech od přípravy.

Tabulka 9 – zvláknovací podmínky a charakterizace výsledných materiálů

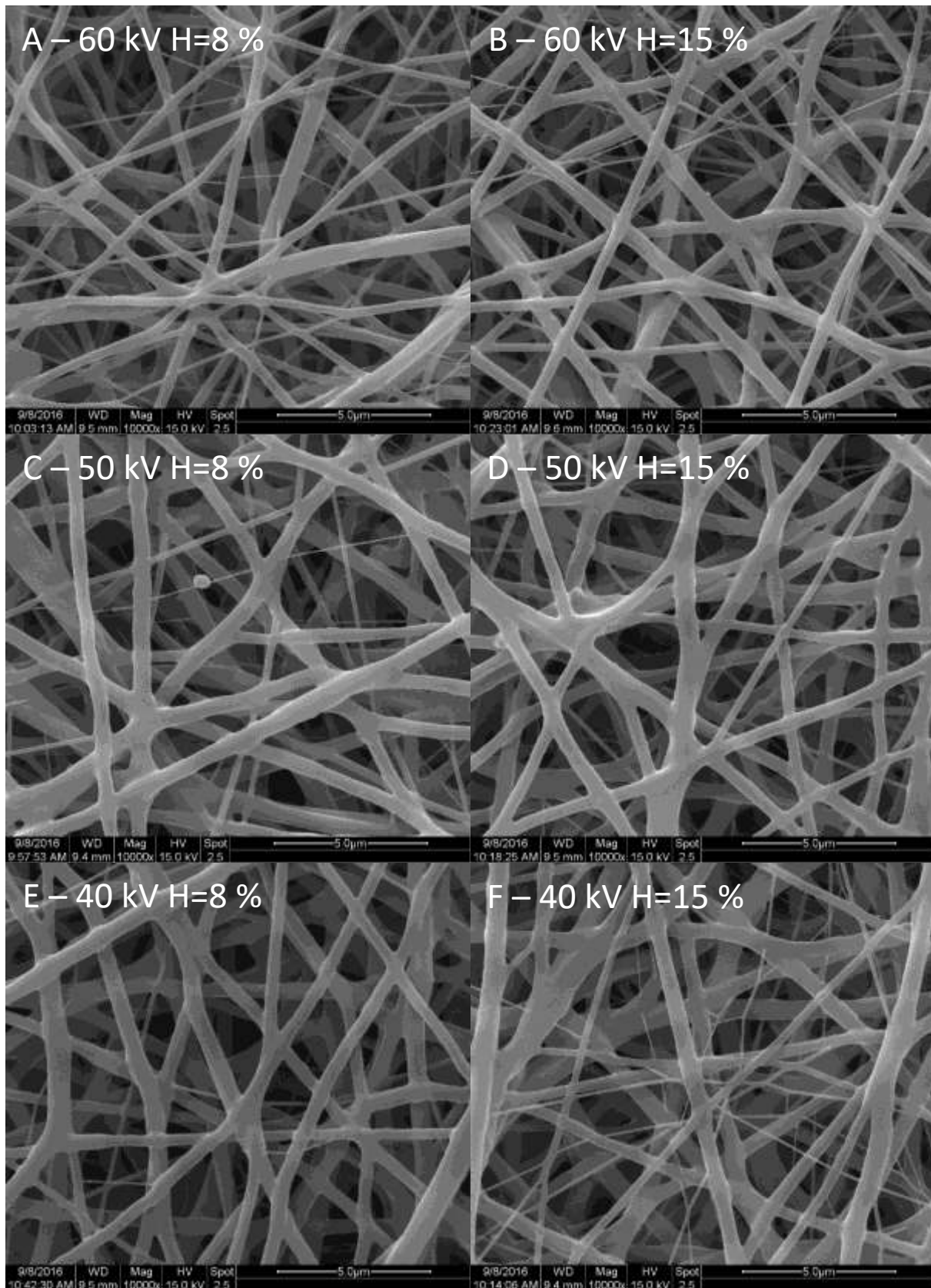
Experiment	U_+ [kV]	U_- [kV]	l_{eld} [mm]	H_{rel} [%]	m_{gsm} [g.m ⁻²]	l_{pp} [nm]
1	60	-5	180	15	13,7	313
2	50	-5	180	15	8,4	335
3	40	-5	180	13	8,2	420
4	60	-5	180	8	10,1	291
5	50	-5	180	8	9,2	353
6	40	-5	180	8	5,3	411



Obrázek 62 – Závislost průměrné tloušťky a plošné hmotnosti vláken na aplikovaném kladném napětí při dvou různých vzdušných vlhkostech

Snížením urychlovacího napětí dochází v obou případech k zvýšení průměrné tloušťky vláken, což je vysvětlitelné slabší intenzitou elektrického pole tedy, menší silou dlužící vlákna. Dochází taktéž ke snížení přenosu hmoty mezi elektrodami, což se projevuje na snížení plošné hmotnosti vrstev. Rozdílná vzdušná vlhkost příliš neovlivňuje průměrnou tloušťku vláken, zato ale má pravděpodobně vliv na rozdíl v získané plošné hmotnosti materiálů jak při vysokém, tak nízkém urychlovacím napětí.

Morfologie vláken se zvýšením koncentrace roztoku a snížením obsahu TFE a pravděpodobně i změrnou původu polymeru taktéž změnila. Nanovláknenné struktury s průměry pod 100 nm se nevyskytují již tak často jako v předchozím měření a vrstva je tedy homogennější. Subjektivní pevnost membrány byla o poznání horší a celá vrstva byla mechanicky nedostatečná. Zatímco v předchozím případě byla vrstva relativně pružná, tak v tomto případě se materiál velmi snadno trhal a i po přejetí prstem po vrstvě docházelo k otěru, což je možné přisoudit odlišnému původu polymeru a obsahu nečistot. Podobné experimenty byly opakovány s různými vstupními šaržemi polymeru o rozdílných čistotách a systém se ukázal jako velmi proměnlivý. Z toho důvodu byla pozornost směřována ke stabilizaci mechanických vlastností, tak aby výsledek byl co nejrobustnější. Pro vylepšení zmíněných vlastností byla vybrána cesta elektrostatického zvláknování roztoku PHB a dalších biopolymerů.

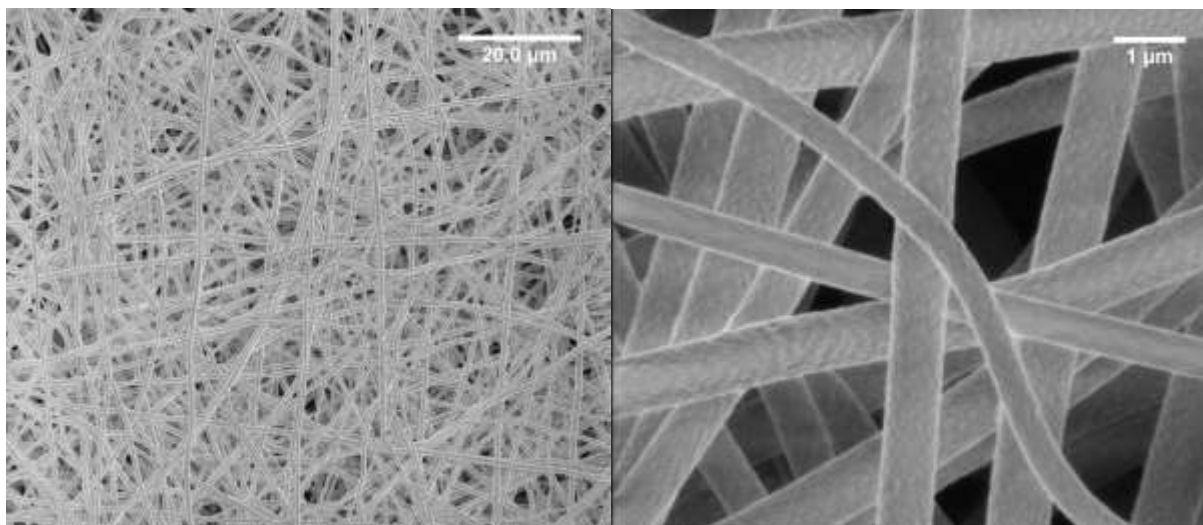


Obrázek 63 – SEM měření připravených PHB nanovláken

4.5.3.5 Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF)

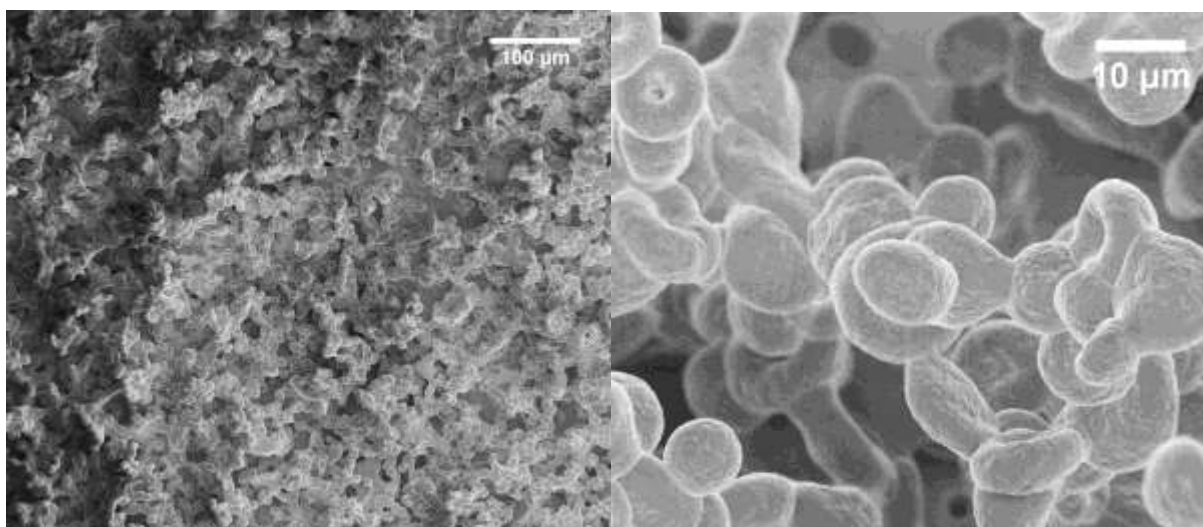
Jako jeden z možných polymerů pro aditivaci byl zvolen PBAT (Ecoflex, $M_n = 142$ kDa, PDI = 2,46, BASF). Prvně byl zvlákněn samostatně a z různých rozpouštědlových systémů pro získání obecného povědomí o zvláknitelnosti a následně ze systému s MDCA (viz Metody).

1. Byla získána bílá vrstva mikrovláken, která byla analyzována za pomoci SEM (Obrázek 64). Vzhledem k velkému průměru vláken nebylo dále pokračováno v tomto systému, podobnému zvláknění PHB. Za povšimnutí stojí zvrásněná struktura povrchu vláken vzniklá vlivem výparu chloroformu.



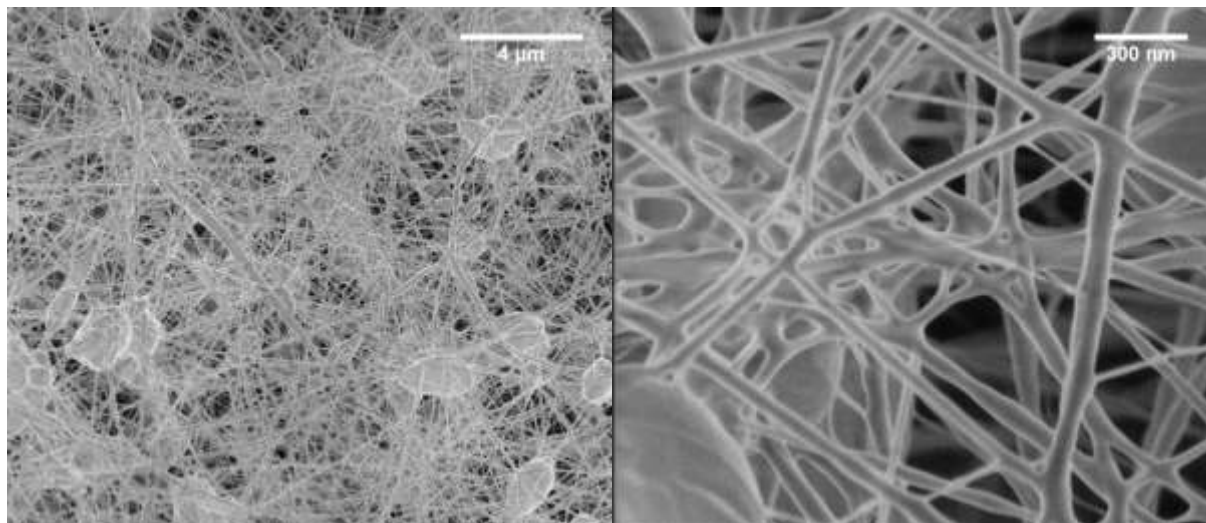
Obrázek 64 – PBAT mikrovláknina z roztoku 10 hm. % v CHCl_3

2. Po vychladnutí roztok vytvořil gel a dále nebylo v experimentu pokračováno
3. Roztok nebyl zvláknitelný, docházelo pouze k přenosu roztoku na kolektor v nezměněném stavu (tzv. flooding).
4. Identické jako v předchozím případě.
5. Docházelo k čistému electro sprayingu, vrstva byla analyzována na SEM (Obrázek 65) a vzhledem k částicové povaze materiálu bylo od dalšího rozvoje systému upuštěno.



Obrázek 65 – PBAT electro sprayingem připravené částice z roztoku 1,4-dioxan/ CHCl_3 1:1

6. Přídavkem dioxanu byla zastavena gelace, probíhající v čistém DMF. Roztok byl zvlákněn a získána nehomogenní vrstva analyzována na SEM (Obrázek 66). Byly získané defektní nanovlákná s vysokým obsahem perličkových defektů.



Obrázek 66 – PBAT defektní nanovlákná připravená zvlákněním z roztoku 1,4-dioxan/DMF 1:1

Vzhledem k rozpustnosti například TEAB v DMF se jeví tato směs jako zajímavá pro další výzkum pro získání nanovláknenných vrstev tohoto komerčního polymeru.

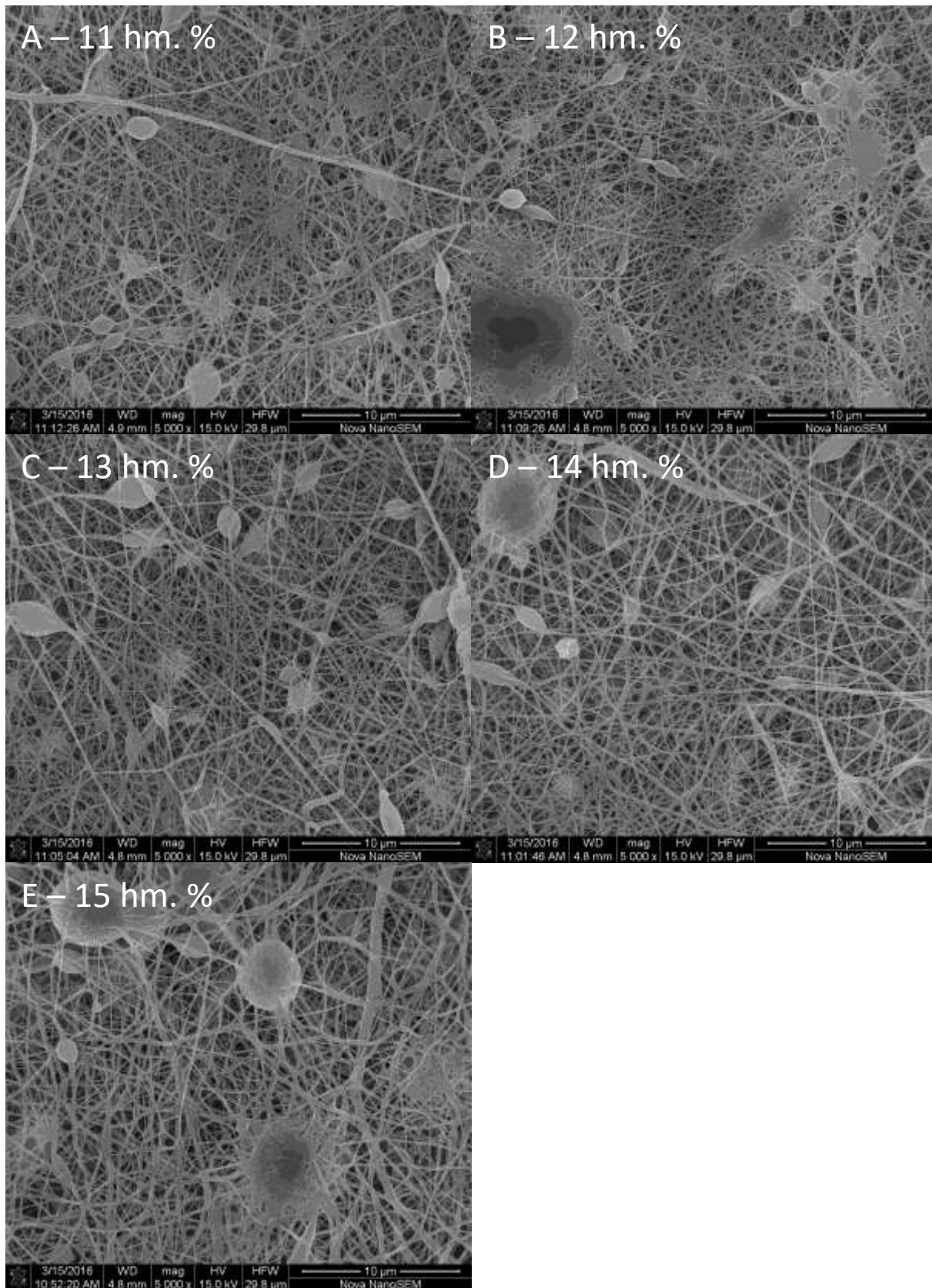
4.5.3.6 Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF) z MDCA s TFE

PBAT byl rozpuštěn za horka a míchání ve směsi rozpouštědel MDCA a TFE v hmotnostním poměru 4:1 a byla vytvořena koncentrační řada roztoků (Tabulka 10), které následně byly zvlákněny na strunovém Nanospideru a změřeny na SEM (Obrázek 67).

Tabulka 10 Koncentrace PBAT v roztocích a výsledné průměrné tloušťky vláken

Koncentrace PBAT [%]	Průměrná tloušťka vláken [nm]
11	76±20
12	65±17
13	76±26
14	76±31
15	86±32

Byly připraveny mechanicky pevné a flexibilní vrstvy, které po analýze SEM ukázaly velmi malé průměry vláken nacházející se pod 100 nm. Získané vrstvy obsahovaly taktéž velký počet perličkových defektů, které překvapivě výrazně nesnižovaly subjektivní mechanické vlastnosti vrstvy. To značí, že případný ideální nanovláknenný materiál založený na PBAT bez defektů by měl vykazovat mimořádné mechanické vlastnosti umožňující rozličné aplikace, kde mechanické vlastnosti jsou klíčové, například filtrace. Dalším zjištěním je fakt že změna koncentrace polymeru nemá zásadní vliv na průměr a morfologii vláken, alespoň ve zvoleném intervalu a je možné tedy koncentraci i navýšit pro odstranění defektů vlivem zvýšené viskozity.

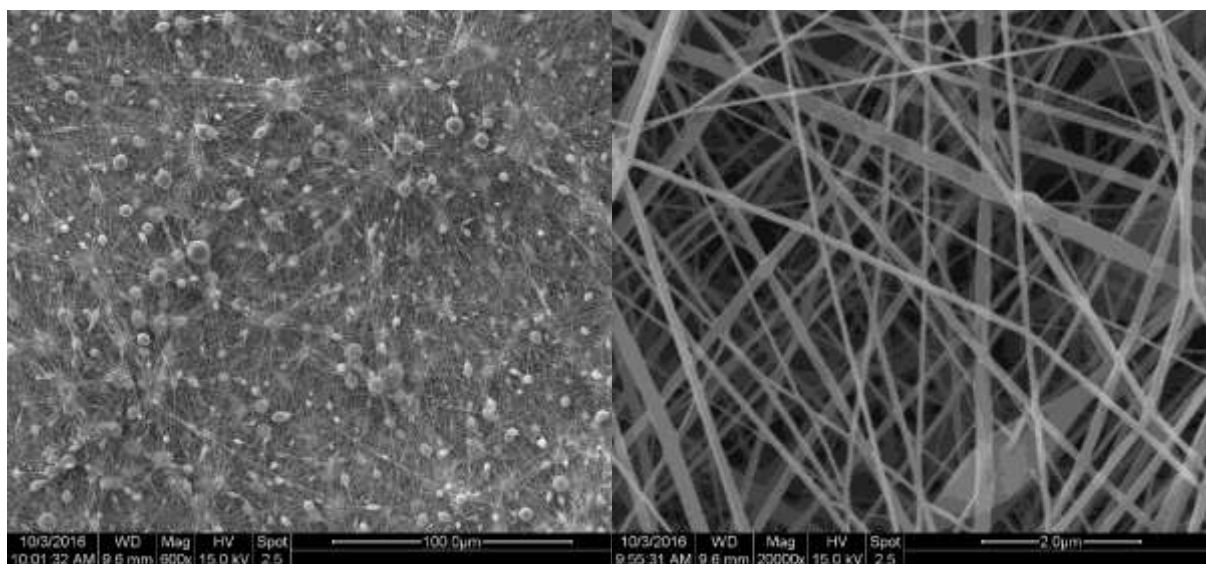


Obrázek 67 – SEM analýzy připravených PBAT nanovláken z roztoku MDCA a TFE

4.5.3.7 Elektrostatické zvláknění PLA (Natureworks) z MDCA

PLA je elektrostaticky zvláknitelný polymer. Byl proveden experiment na otestování zvláknění čistého polymeru z roztoku MDCA.

Zvláknění probíhalo velmi dobře, přičemž viditelně docházelo k efektivnímu přenosu hmoty, kdy zmizení viditelné trysky probíhalo velmi blízko struny. Znamená to, že dochází k ohybové nestabilitě a dlužení vláken (viz - Obrázek 53 – konec přímého segmentu je často viditelný pouhým okem, následně je pozorován jev připomínající „květ“, v tomto případě byl viditelný pouze „květ“ rovnou u struny). Byla získána mechanicky křehká bílá vrstva, následně změřená SEM (Obrázek 68). Získaná vlákna obsahovala velký počet perličkových defektů indikujících potřeba navýšení viskozity. Samotná vlákna vykazovala průměrný průměr 89 nm. Výsledná vlákna ukazují slibnou cestu pro další výzkum v rámci získání ultrajemných nanovláknenných testilí z PLA. Případná další práce může zahrnovat jiné typy PLA, například krystalický či s rozdílnou molekulovou hmotností. Vzhledem k zaměření na zvláknění PHB nebylo dále v práci pokračováno.



Obrázek 68 – Čisté PLA zvlákněné z MDCA s TEAB

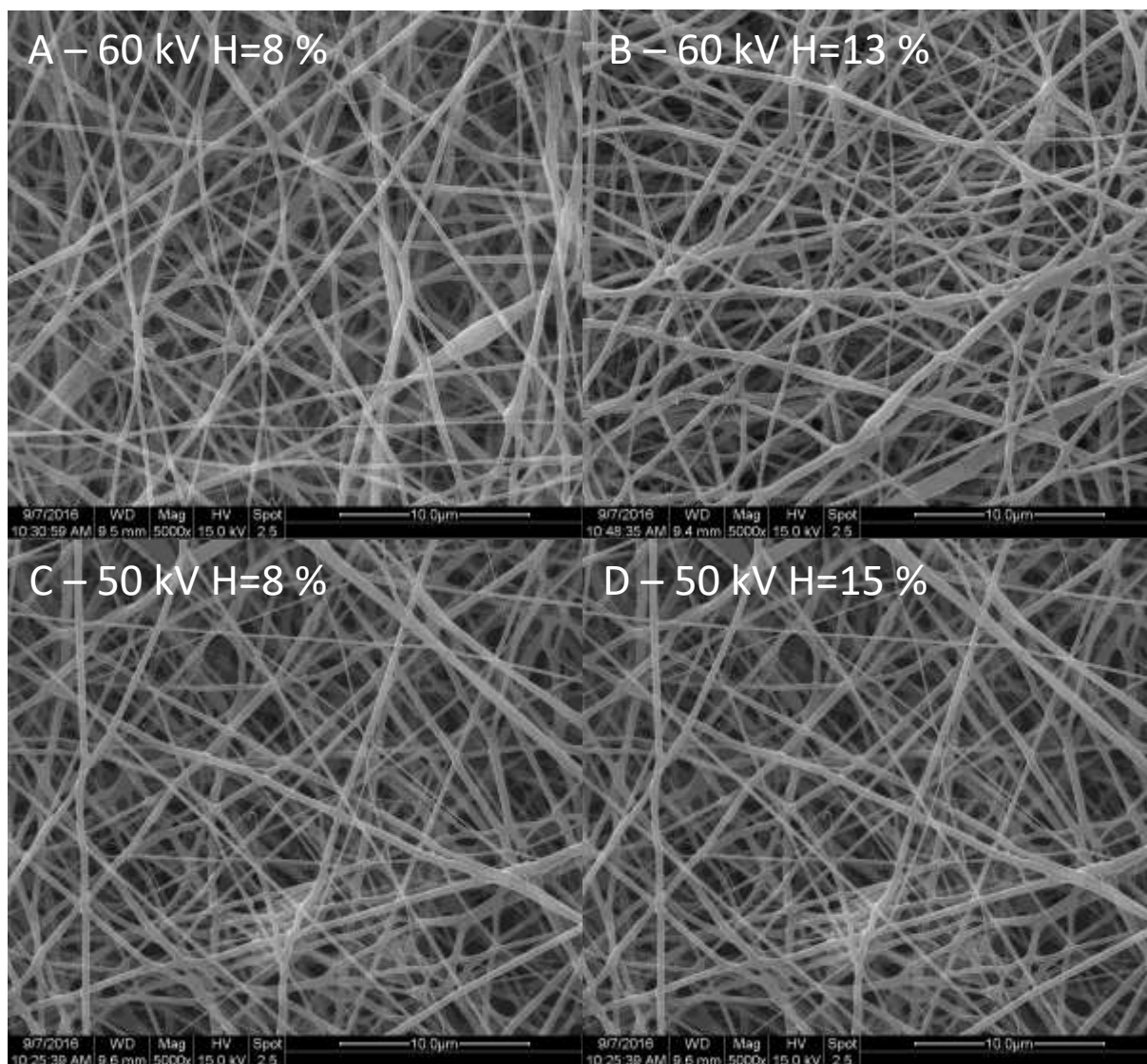
4.5.3.8 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PBAT (BASF) z MDCA s TFE

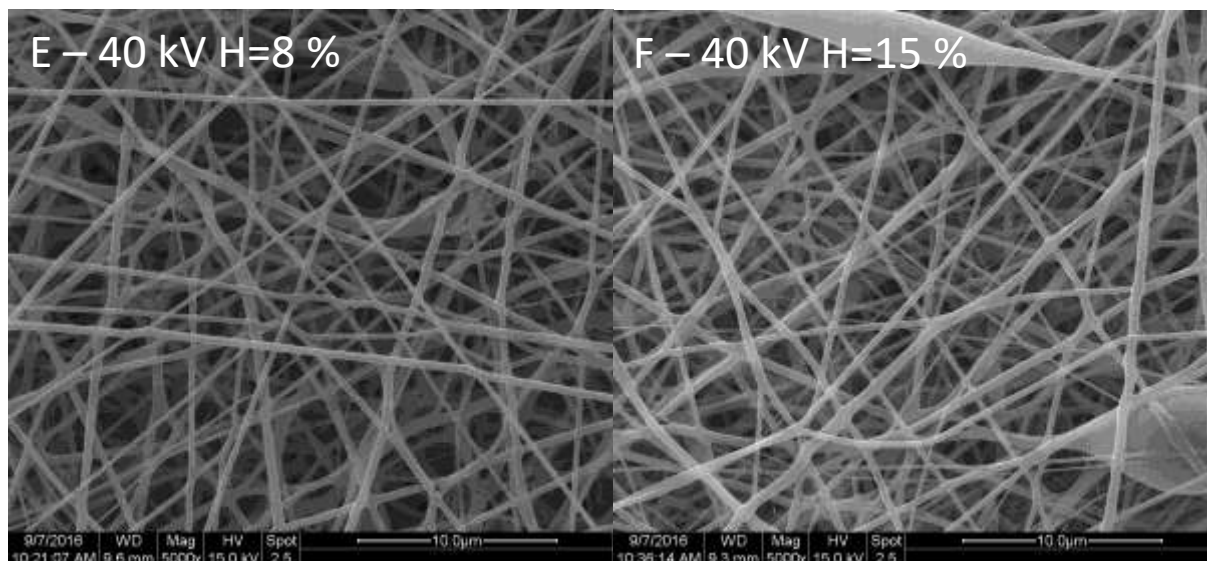
Následující práce byly zaměřeny na vylepšení mechanických vlastností PHB nanovláken přidávkem dalšího biodegradabilního polymeru. /řipravený roztok byl zvlákněn v šesti experimentech lišících se zvláknovacími podmínkami shrnutými společně s výsledky v tabulce 11.

Aditivace PHB polymerem PBAT se ukázala jako velmi výhodná z hlediska mechanických vlastností, produktivity, a i stability roztoku, který je odolnější vůči gelaci než samotné PHB při stejném poměru rozpouštědel. Zvláknovací výkony při 60 kV byly shledány velmi dobrými, dokonce vyššími než pro samotné PHB. Morfologie vrstev (Obrázek 69) pro všechny případy byla podobná, stejně tak průměry vláken. Směs polymerů PHB a PBAT je taktéž velmi mechanicky odolná, flexibilní a pružná. Jedinou nevýhodou systému je přítomnost TFE jako toxického rozpouštědla. Na základě tohoto faktu byl vytyčen další cíl pro optimalizaci, a to náhrada TFE za netoxické, respektive méně toxické rozpouštědlo vykazující podobné vlastnosti zabraňující urychlené gelaci roztoku.

Tabulka 11 – zvlákňovací podmínky a charakterizace výsledných materiálů

Experiment	U ₊ [kV]	U ₋ [kV]	l _{eid} [mm]	H _{rel} [%]	m _{gsm} [g.m ⁻²]	l _{pp} [nm]
1	60	-5	180	13	17,0	233
2	50	-5	180	13	8,9	255
3	40	-5	180	13	7,6	214
4	60	-5	180	8	17,3	228
5	50	-5	180	8	11,7	239
6	40	-5	180	8	8,1	297

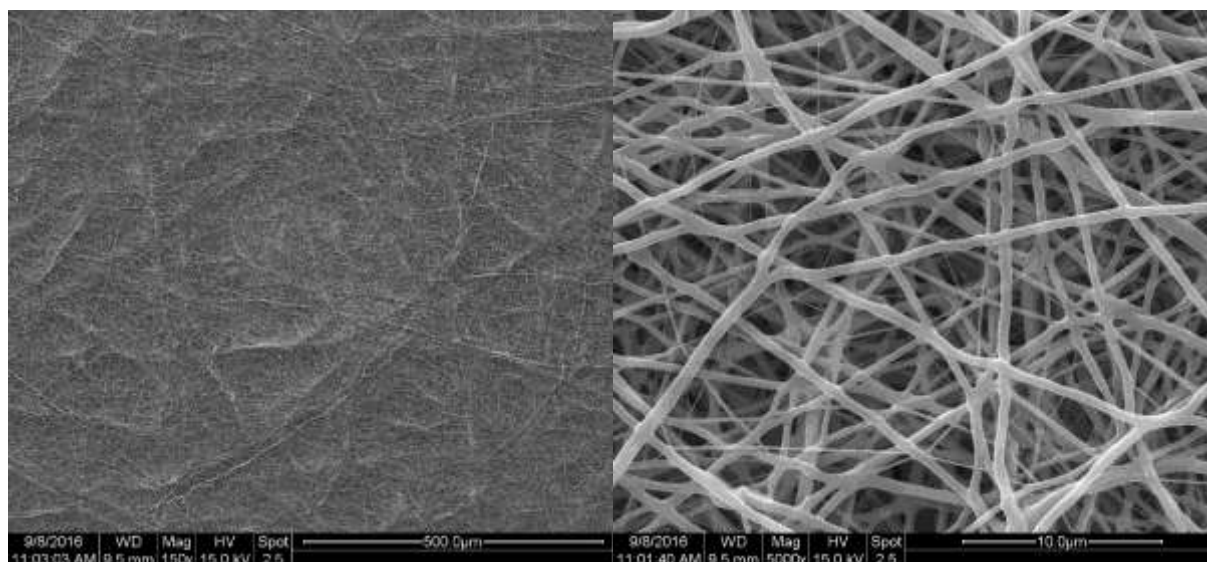




Obrázek 69 – SEM analýza nanovláken blendu PHB a PBAT

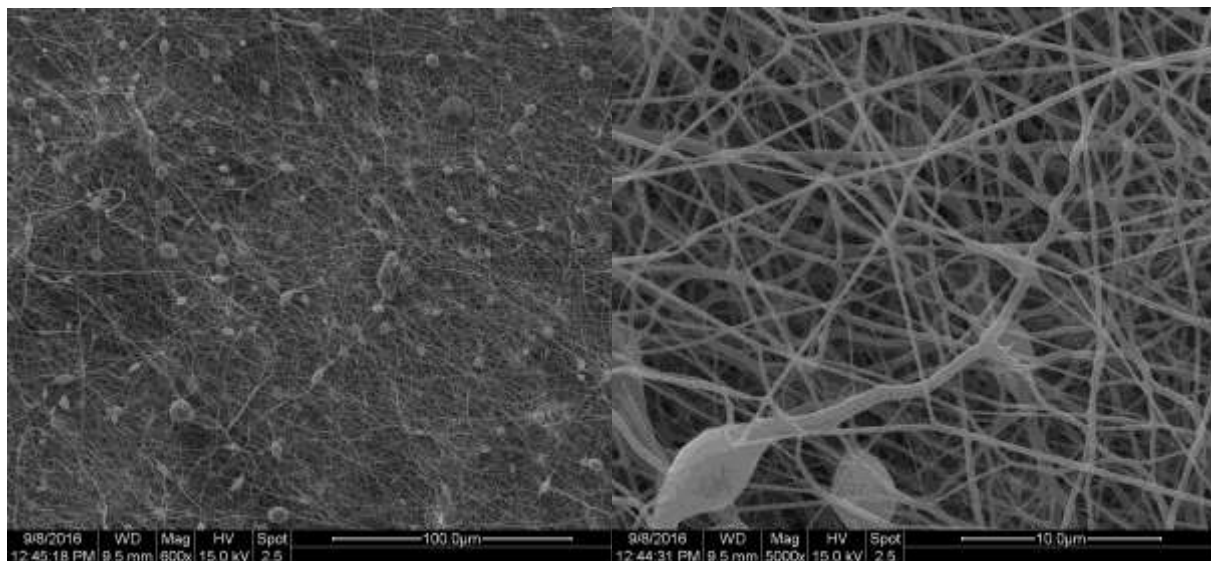
4.5.3.9 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) z MDCA s TCE

Jako vhodná náhrada TFE byl zvolen 2,2,2-trichloroethanol, který je méně toxický. Pro první zkoušku byl vytvořen roztok PHB a následně byl zvlákněn. Proces byl vizuálně srovnatelný s roztokem obsahující TFE. Byla získána pevná textilie se slabou adhezí k podkladovému papíru. Plošná hmotnost vrstvy byla změřena na $12,3 \text{ g.m}^{-2}$. Průměrná tloušťka vláken 310 nm byla získána z SEM měření (Obrázek 70).



Obrázek 70 – SEM analýza nanovláken PHB připravených z MDCA a TCE

50 g připraveného roztoku bylo naředěno na 5 %, tedy přidáno 40,9 g směsi MDCA a TCE v poměru 4:1. Roztok byl promíchán a zvlákněn. Zvláknění probíhalo při identických podmínkách jako u původního roztoku až na EMW, které činilo 500. Proces byl velmi rychlý. Odlupování textilie probíhalo i v tomto případě. Mechanicky byla vrstva podstatně horší, kvůli přítomnosti perličkových defektů zjištěných analýzou SEM (Obrázek 71), která zároveň poskytla průměrnou tloušťku vláken 212 nm . Plošná hmotnost vrstvy činila $13,4 \text{ g.m}^{-2}$. Naředěním roztoku tedy došlo k vyššímu přenosu hmoty pravděpodobně poklesem viskozity, růstem tekutosti roztoku, a tedy potřeby rychlejšího nanášení na elektrodu.

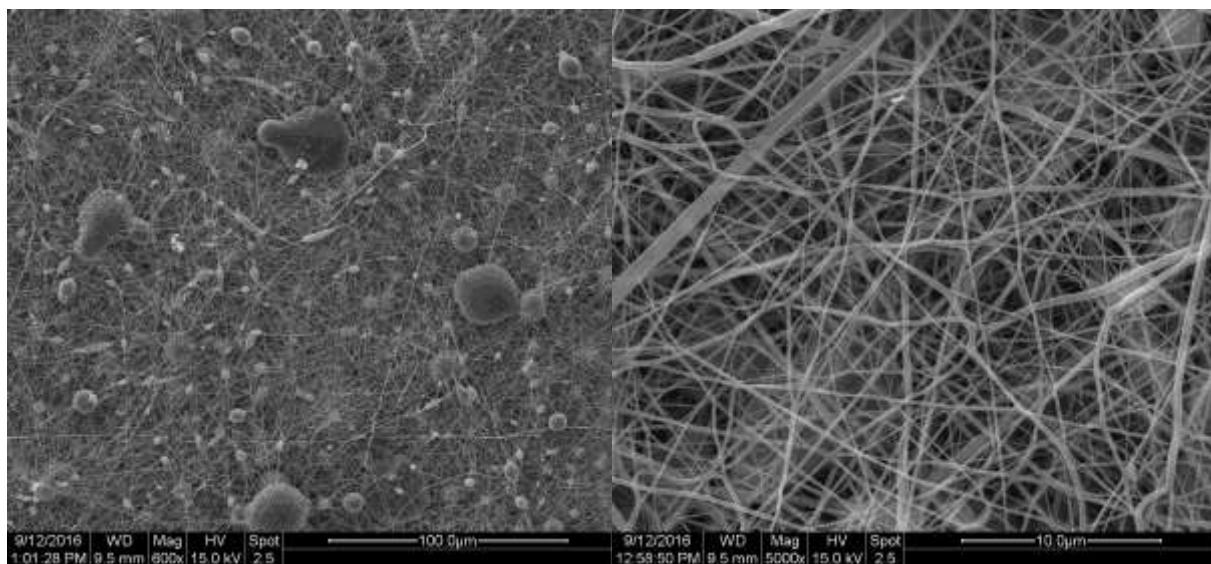


Obrázek 71 - SEM analýza nanovláken PHB připravených z ředěného roztoku PHB v MDCA a TCE

Experimenty ukázaly, že náhrada TCE za TFE je možná a následně bylo pracováno s PBAT a blendy.

4.5.3.10 Elektrostatické zvláknění PBAT (BASF) z MDCA s TCE

Připravená vrstva se neodlupovala od podkladového papíru a celý proces byl efektivní a stabilní. Vrstva byla měřena SEM (Obrázek 72), poskytla plošnou hmotnost $16,9 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ a průměrnou tloušťku vláken 120 nm. I přes mnoho defektů byla vrstva relativně a subjektivně mechanicky pevná.



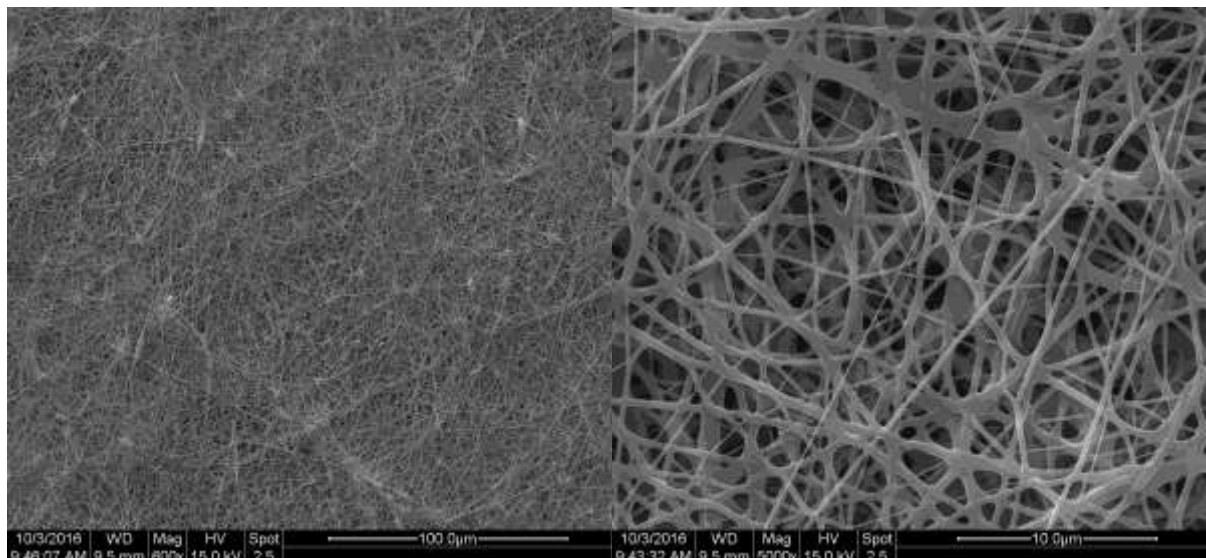
Obrázek 72 – SEM analýza nanovláken PBAT z MDCA a TCE

Přítomnost defektů a relativně tenkých vláken značí možnost navýšení koncentrace polymeru v roztoku.

4.5.3.11 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PLA z MDCA s TCE

Výsledný roztok byl stabilní, avšak po 4 dnech vytvořil gel. Elektrostatické zvláknění bylo velmi výkonné a zvláknovací hlava nestíhala ani při zvýšeném pojezdu dostatečně zásobovat elektrodu. Byly získány tři

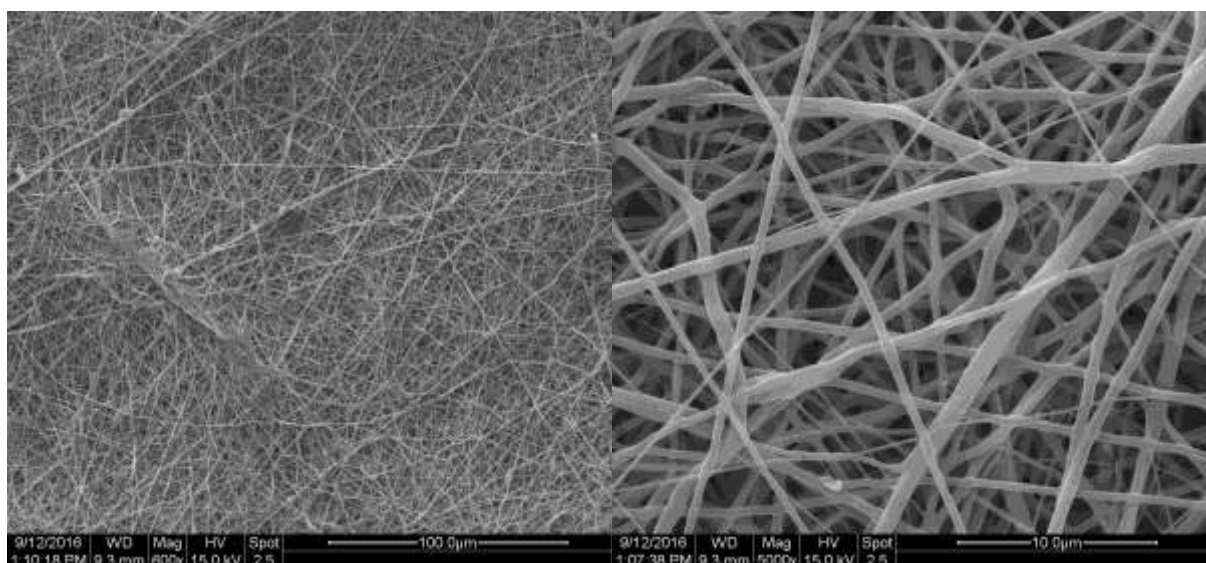
různé plošné hmotnosti vrstev (10; 5,4 a 3,6 g.m⁻²) připravených při rychlostech 30; 50 a 100 mm.min⁻¹ v daném pořadí. Vrstva byla změřena na SEM (Obrázek 73) a byla určena průměrná tloušťka vláken na 202 nm. Morfologicky vykazovaly vlákna slepený charakter a subjektivně byla vrstva pevná.



Obrázek 73 – SEM analýza nanovláken blendu PHB a PLA

4.5.3.12 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PBAT (BASF) z MDCA s TCE

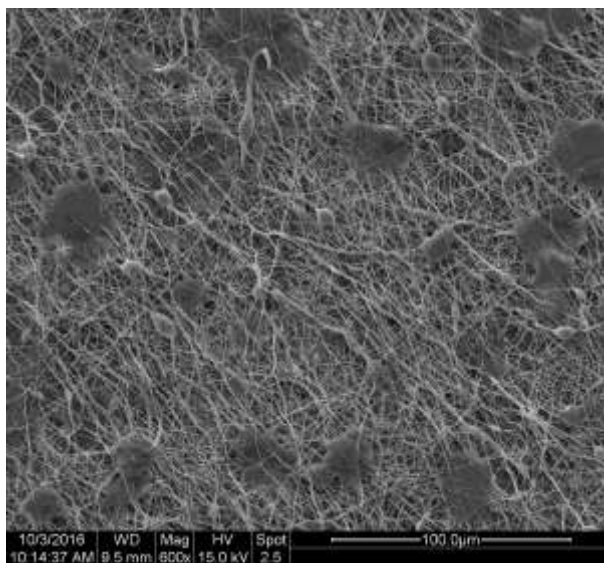
Elektrostatické zvláknění proběhlo bezproblémově, podobně jako analogický experiment s TFE. Získaná vrstva ovšem nevykazovala dostatečnou adhezi k podkladovému materiálu, pravděpodobně ale velkou plošnou hmotností materiálu (17,8 g.m⁻²). Vrstva byla změřena SEM (Obrázek 74) a určena průměrná tloušťka vláken na 329 nm.



Obrázek 74 – SEM analýza nanovláken PHB a PBAT z MDCA a TCE

4.5.3.13 Elektrostatické zvláknění PHB (Nafigate) a PVP (Sigma Aldrich) z MDCA s TCE

Bylo vyzkoušeno zvláknění blendy PHB a hydrofilního polyvinylpyrrolidonu. Byla vytvořena velmi křehká vrstva, která byla změřena Sem a poskytla nehomogenní morfologii (Obrázek 75). Dále nebylo pokračováno, protože docházelo k fázové separaci polymerů.



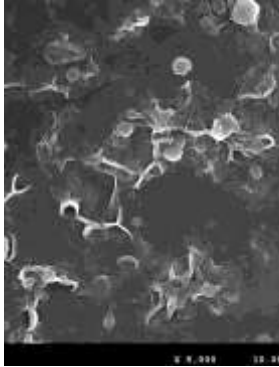
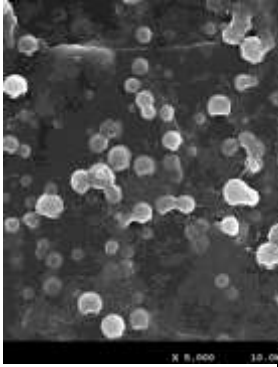
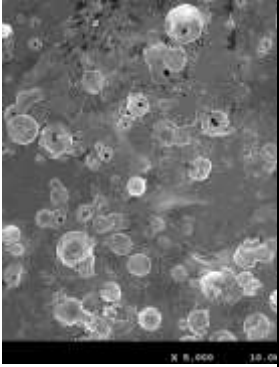
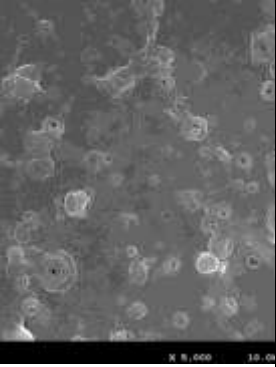
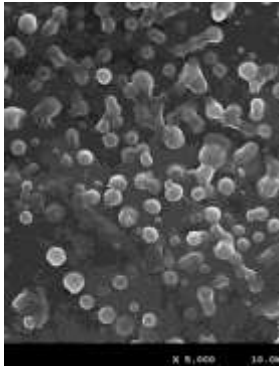
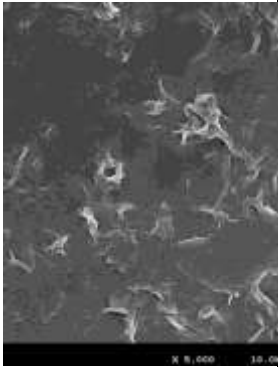
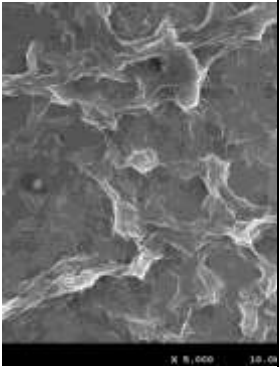
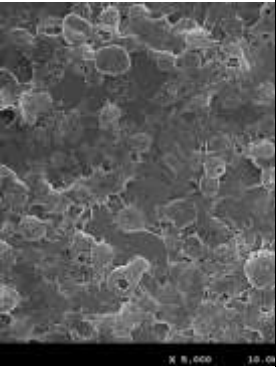
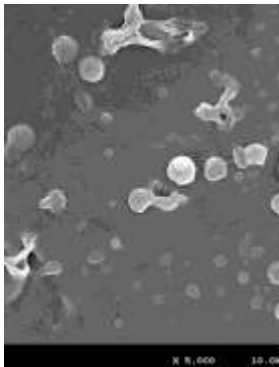
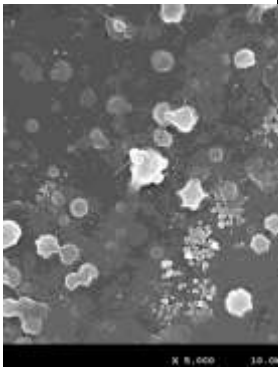
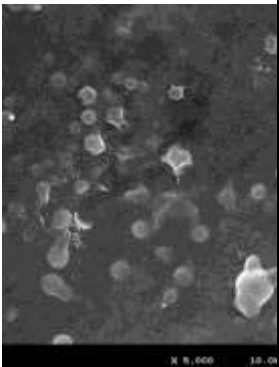
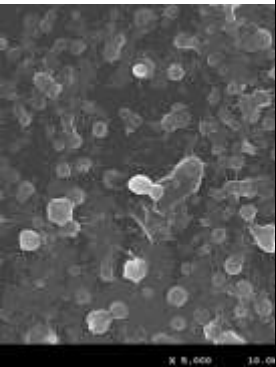
Obrázek 75 – Vrstva PHB a PVP

4.5.3.14 Elektrostatické naprašování PHB (Nafigate) z horkého DMAc roztoku

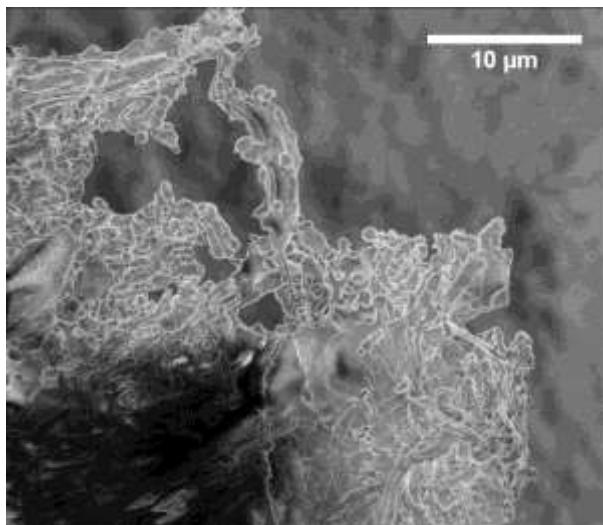
Při hledání rozpouštědla PHB umožňující elektrostatické zvláknění byl vyzkoušen i roztok PHB v dimethylacetamidu, rozpouštědle podobnému DMF, avšak méně toxickému. Roztok PHB v DMAc ovšem není stálý stejně jako v případě DMF a po ochladnutí geluje. Myšlenka za zvlákněním spočívala ve zvláknění zahřátého roztoku a to aplikací externího ohřevu injekční stříkačky v laboratorním uspořádání. Byla připravena série roztoků (Tabulka 12) spočívající v rozdílných koncentracích a přídavku TEAB. Následně byly tyto série roztoků podstoupeny elektrostatickému přenosu hmoty. Následně byly vrstvy změřeny na SEM (Tabulka 12 – SEM snímky 5000 x zvětšeny).

Připravené povrchy se od sebe liší v několika případech morfologicky, kdy u vzorku připraveného při 50 °C a z roztoku o koncentraci 2,5 hm. %m vznikaly zřetelně ohraničené kuličky polymeru přilepené na PHB vrstvě. Při zvýšení vodivosti přídavkem TEAB dochází ke vzniku zárodků vláken. U všech vzorků jsou pak viditelná residua elektrostatického naprašování. Je tedy zřejmé, že zvýšená teplota roztoků způsobuje natolik velký pokles viskozity, že nedochází k elektrostatickému zvláknění. Nabízí se možnost navýšit koncentraci polymeru v roztoku na mnohem vyšší obsah a udržovat teplotu okolo 100 °C. Z výrobního průmyslového hlediska ale je tato varianta pravděpodobně neschůdná, protože zařízení umožňující takový externí ohřev pro roztokové zvláknění není zatím komerčně dostupné.

Tabulka 12 – připravené morfologie PHB electrospayingem z DMAc

	Bez přídavku TEAB		Přídavek TEAB 0,1 hm. %	
Koncentrace PHB [%] / teplot [°C]	50 °C	100 °C	50 °C	100 °C
1,25 hm. %				
2,5 hm. %				
5,0 hm. %				

Zbytek roztoku PHB v DMAc byl vytlačen ze stříkačky do kádinky s vodou. Byly získány elastické a nabobtnalé morfologie vysráženého PHB (Obrázek 76). Tato fázová transformace je taktéž zajímavým fenoménem, který vykazuje PHB. Stejně tak vytlačování gelu PHB do vody, po kterém dochází k vymývání rozpouštědla a srážení PHB z gelu do celistvé pevné formy je zajímavou transformací, na jejímž základě by bylo možné pokračovat ve výzkumu aplikovatelných materiálů.



Obrázek 76 – vysrážené PHB z roztoku DMAc do vody

4.5.4 Dílčí závěry z elektrostatického zvláknování polymerů

V předchozí části nepublikovaných výsledků byly popsány práce zabývající se elektrostatickým zvlákněním PHB a dalších biopolymerů. Především, PHB do vyřešení této práce nebylo adekvátně zvlákněno tak, aby poskytlo submikrometrová a nanoskopická vlákna z roztoku, který by byl dlouhodobě stabilní, alespoň pro jednodenní práci na průmyslové lince. Práce popisuje soubor experimentů, které vedly k úspěšnému zvláknění PHB a blendů obsahujících tento polymer a další biopolymery, a to v průmyslové kvalitě. Popsané zkušenosti přinášejí konkrétní složení roztoků a podmínek elektrostatického zvláknění a s tím potenciálně další možné směry aplikovaného výzkumu. Většina popsanych přístupů má publikační potenciál, protože většina publikovaných článků o aplikacích nanovláken obsahujících PHB vychází z roztoků založených na chloroformu a směsi chloroformu a DMF, přičemž je ale dosaženo průměrů vláken mnohdy silnějších, než popisuje tato práce. Vedle úspěšných zvláknění je popsáno několik slepých cest, či přístupů, u kterých nevznikají čistě vláknenné materiály. Popsané nanovláknenné vrstvy mají potenciál vést k mnoha aplikacím v potravinářském průmyslu. Autor této práce věří, že byla takto vybudována platforma pro další práce, které dále rozvinou potenciál mikroskopických a nanoskopických vláken v potravinovém, kosmetickém, materiálovém a obecně užitném odvětví chemie.

4.6 DOPLŇKOVÉ VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE

Během DSP na FCH VUT Brno bylo autorovi této práce vlivem životních okolností umožněno podílet se na rozvojových a humanitárních aktivitách v centrální Tanzánii a v západoafrické Ghaně. V obou případech byly využity, alespoň do určité míry, zkušenosti, a především kontakty získané taktéž díky působení na FCH VUT. Získané výsledky přímo souvisí s tématem disertační práce.

4.6.1 Tanzánie

Vývoj nanovlákněného filtru pro analýzu a filtraci vody byl realizován v Tanzánii, ve vesnici Mpanga. První návštěva vesnice Mpanga byla uskutečněna v únoru 2017 a tehdejší výprava, alespoň z chemického hlediska byla velmi naivní a zpětně se dá hodnotit hlavně jako získávání zkušeností a představy o tom, jak funguje zásobování vodou v rurální Tanzánii (Obrázek 77). Na základě určitých předběžných informací byla do Mpangy dovezena analytická výbava sloužící k určení chemické a bakteriologické kontaminace vody. Byla provedena zevrubná analýza kvality vody v několika farnostech v oblasti Kilombero Valley a odebrány vzorky na další analýzu na obsah prvků. Posléze bylo dovezeno další zařízení (Obrázek 78) skládající se z vodovodních baterií, které byly nainstalovány poblíž základní školy a dispenzáře a osazeny nanovlákněným a keramickým filtrem. Nejdůležitějším přínosem cesty bylo ale získání povědomí o tamní situaci a vzniku základu pro další technická řešení.



Obrázek 77 –zdroje vody v rurální Tanzánii – říční voda a voda z vykopaných jam



Obrázek 78 – nainstalované vodní filtry obsahující nanovlákněné membrány

Následující cesty až do data sepsání této práce byly zaměřeny jednak na pomoc s vylepšením tamních zásobníků na vodu, instalace pískových filtrů a oprava solárních čerpadel. Z předchozí zkušenosti

vykrytalizoval nápad na vodní filtr pracující s nejzákladnější charakteristikou nanovláken vyráběných na strojích Nanospider a to, že se jedná o plošnou textilií vycházející ze stroje o určité šířce. Laminací nanovláken s klasickou textilií možné získat kompozitní sendvičový materiál s dobrými mechanickými vlastnostmi, který je možné strojově nařezat na čtverce a vyřezat v rozích otvory umožňující složení do podoby vaku (Obrázek 79). Volbou vhodného složení, aditivace antibakteriální složkou a jednotlivých kroků následujících zvláknění bylo dosaženo materiálu, který vykazuje výjimečné filtrační a antibakteriální vlastnosti. V současné době je výrobek ve fázi vývoje firmou Nafigate.



Obrázek 79 – Nanovláknový filtr Ecobrane

Z experimentální práce jak na tlakovém tak i gravitačním filtru vyplynuly následující poznatky a technologické výzvy:

- Mechanická pevnost – samotná membrána o ekonomicky únosné plošné hmotnosti nevykazuje zdaleka uspokojivé mechanické vlastnosti. Vzhledem k nárokům na čištění membrán zpětným proudem, praním nebo ultrazvukem je to jedna z největších překážek dlouhodobého použití. Částečně se tato nevýhoda obchází vytvářením laminátů nebo kompozitních materiálů, ale i spojení nanovlákněné vrstvy s pevnějším materiálem nezaručí požadovanou odolnost vůči lokálnímu protržení.
- Mobilita vláken – nanovlákněná membrána běžně vypadá jako netkaná textilie, kde vlákna jsou volně ložena na sebe. Vlivem průtoku filtrované kapaliny dochází jednak ke kompresi vrstvy jako u jiných filtrů, ale taktéž k mobilitě jednotlivých vláken. To může způsobit lokální zvětšení póru a v nejhorším případě průnik nechtěné kontaminace. Tato nevýhoda bývá umenšena buď mezivlákněným propojením vlivem teploty, což ovšem vyžaduje další krok při výrobě membrán, nebo zvýšením koncentrace par rozpouštědla polymeru během sušení, tím dojde k bobtnání horní vrstvy vlákna a propojení. Následným sušením jsou pak vlákna propojena. Poslední způsob mezivlákněného spojení je aplikace jiného polymeru ať již v roztoku, ve spreji nebo jinak. Ten je použit jako lepidlo. Všechny tyto metody mají sice za cíl snížit mobilitu vláken, ale zároveň do určité míry snižují průtok. Nalezení vhodného kompromisu je poté dosaženo optimalizací a empirickým ověřením.
- Kultivační médium – nevýhoda a zároveň v některých případech přednost nanovlákněných vrstev, a zvláště těch biodegradabilních a biokompatibilních je fakt, že mohou sloužit jako kultivační médium pro bakterie, buňky a obecně organismy, například řasy. Toho je využíváno v regenerativní medicíně, avšak při bakteriální filtraci vody nebo čehokoliv jiného se jedná o značnou překážku dlouhodobého užívání. Ve vhodných podmínkách pak dochází k biofoulingu a v nejhorším případě prorostení celou membránou, ucpání a migraci na opačnou stranu membrány.

Tyto děje je možné předejít buď častým čištěním, což je opět v rozporu s první zmíněnou nevýhodou nebo aditivou v podobě baktericidních a antibiofoulingových aditiv jakými je například nanoskopické stříbro. Všechny aditiva ovšem ovlivňují proces zvláknění nebo výslednou membránu, a to například z hlediska mechanické pevnosti.

- Minimální tloušťka vrstvy – elektrostatické zvláknění na průmyslové úrovni je i přes veškeré nesporné výhody stále finančně náročná metoda, a to především v oblasti vyšších plošných hmotností. Existuje minimální možná plošná hmotnost, kdy ještě dochází k efektivní filtraci, a to v závislosti na filtrovaných částicích a průměru použitých vláken. Platí, že nanovlákna o větším průměru se připravují rychleji a tím i levněji. Získání například vláken o průměrné tloušťce 60 nm je časově a finančně náročnější než například 100 nm.

I když sepsané nevýhody vyznívají pravděpodobně znepokojivě, je potřeba s nimi při vývoji nových aplikací počítat a hledat kompromis. To, co činí z nanovláknenných membrán využitelný produkt, je několik faktů. Prvním z nich je obrovská variabilita polymerů a možnost jejich opracování. Už jen samotné využití polymerů například chitosanu nebo kopolymerů obsahující volné karboxylové funkce dává membráně schopnost sorpce těžkých kovů. To platí pro celou řadu dalších polymerů. Další výhodou je možnost získávání kompozitních filtrů. Je pravděpodobné, že úspěšná cesta pro získání skutečně použitelného a komerčně úspěšného filtru tkví právě v kombinaci přístupů a materiálů. Velká variabilita filtru taktéž spočívá v aditivaci ať již zmíněnými antibakteriálními aditivou nebo například aditivou fotoaktivními či sorpčními. Výsledná membrána může být sensoricky i katalyticky aktivní. Variabilita celého procesu je obrovská, rodina využitelných materiálů taktéž. Hlavní překážkou, která ovšem zůstává a pravděpodobně zůstane nevyřešena je vysoká cena vzniklých materiálů vzhledem ke konkurenčním přístupům.

4.6.2 Ghana

Další specializovaný produkt byl vyvíjen v Ghaně. Jednalo se o dostupný ochranný krém proti UV záření pro místní lidi trpící albinismem. Koncem roku 2018 byla navázána spolupráce s organizací Hatefree culture a vyvinut projekt vývoje dostupného ochranného krému proti UV záření pro albínskou populaci v Západní Africe (Obrázek 80). Na základě zkušeností FCH VUT byla vyvinuta kompozice založená na bambuckém másle, kokosovém oleji a chemických UV filtrech. Následně bylo podniknuto několik cest do Ghany za účelem výstavby manufaktury a vyučení místní albínské populace krém vyrábět. Na projekt byly získány finance prostřednictvím veřejné sbírky. Přes určité překážky se podařilo založit manufakturu a rozjet celkovou výrobu včetně distribuce tak, že celý projekt funguje samostatně bez další pomoci a pouze s občasnou konzultací.



Obrázek 80 – ochranný krém proti UV záření a jeho výroba v Ghaně

5. ZÁVĚR

Hlavní výstupy disertační práce lze stručně shrnout do následujících bodů:

Byla vypracována literární rešerše zaměřená na skupinu využitelných biopolymerů, především biopolyesterů na bázi polyhydroxybutyrátu. Na základě literárních údajů byly selektovány vhodné přírodní, syntetické a semisyntetické biopolymery, které byly následně zkoumány v materiálových procesech zaměřených na získání vláken a částic použitelných v kosmetice a potravinářství.

Rešerše byla taktéž zaměřena na chemickou a fyzikální modifikaci biopolymerů za účelem zlepšení vlastností a zpracování. Účelem bylo získání teoretických poznatků o rozpouštění polyhydroxybutyrátu, které byly využity ve vývoji systému rozpouštědel pro získání stabilního roztoku PHB a dalších biopolymerů. V teoretické části byly též popsány moderní aplikační formy – zejména nanovlákná a jejich příprava. Hlavní důraz byl kladen na metody klasických zvláknovacích technik, a především na metodu elektrostatického zvláknování, která je popsána detailněji. Dále byly tyto formy představeny z hlediska konkrétních aplikací v potravinářství a kosmetice.

Praktická část práce byla zpracována jako komentovaný soubor publikací a patentových spisů. Byly zde prezentovány zejména získané poznatky ve vývoji zvláknovacích metod. Jednou z nejvýznamnějších vyvinutých metod byla modifikovaná metoda klasického mokrého zvláknování, která dala vzniknout poréznímu vláknu z PHB a byla patentována a prezentována v publikaci s IF. Toto vlákno bylo následně podrobně popsáno a využito v několika aplikacích, z nichž některé byly přihlášeny jako vynálezy.

Dále byla prezentována metoda odstředivého zvláknování PHB, kterou byly připraveny sorpční a filtrační objemné materiály připomínající vatu. Tyto materiály byly funkcionalizovány zejména za účelem využití při sorpci těžkých kovů a jako filtrační systémy pro odstranění mikroorganismů z kapalin, například z vody. Na tuto aplikaci byl získán zápis průmyslového vzoru.

Dále byla intenzivně studována metoda elektrostatického zvláknování vycházející z nového systému rozpouštědel umožňujících získání submikronových vláken. Připravené materiály byly studovány jak mikroskopicky, tak i charakterizovány pomocí fyzikálních, chemických i biologických metod. Byla sledována biodegradabilita, sorpční vlastnosti, či uvolňování aditiv. Byla popsána a publikována funkcionalizace antibiotikem levofloxacinem a sledována kinetika jeho uvolňování z nanovláknenných materiálů. Dále byly materiály funkcionalizovány antimikrobiálními látkami a sledován antimikrobiální účinek a krátkodobé i dlouhodobé uvolňování sorbovaných látek.

Jedním z dalších výstupů aplikace připravených vláknenných a částicových materiálů na bázi PHA jako UV filtrů využitelných zejména v kosmetice. Tento výstup byl realizován v rámci smluvního výzkumu a přihlášen jako vynález.

Vedle publikačních výstupů byly získány rozsáhlé zkušenosti popsané v doplňkových výsledcích disertační práce zabývající se praktickými aplikacemi materiálů při filtraci pitné vody v terénu a v rámci praktických kosmetických aplikací realizovaných na africkém kontinentu. Výstup zaměřený na formulaci opalovacího krému pro albinos byl oceněn mezinárodní cenou. Mnohé získané poznatky byly dále převedeny do průmyslové praxe ve spolupráci se soukromým sektorem a jsou vyvíjeny pro další aplikace v potravinářství i kosmetice.

LITERATURA

- [1] YATES, Madeleine R. a Claire Y. BARLOW. Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers—A critical review. *Resources, Conservation and Recycling*. 2013, **78**, 54-66. ISSN 09213449. Dostupné z: doi:10.1016/j.resconrec.2013.06.010
- [2] DERRAIK, José G.B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 2002, **44**(9), 842-852. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/S0025-326X(02)00220-5
- [3] BARNES, David K. A., Francois GALGANI, Richard C. THOMPSON a Morton BARLAZ. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009, **364**(1526), 1985-1998. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2008.0205
- [4] LÖRCKS, Jürgen. Properties and applications of compostable starch-based plastic material. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, **59**(1-3), 245-249. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-3910(97)00168-7
- [5] MEKONNEN, Tizazu, Paolo MUSSONE, Hamdy KHALIL a David BRESSLER. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A*. 2013, **1**(43). ISSN 2050-7488. Dostupné z: doi:10.1039/c3ta12555f
- [6] CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009, **38**(8). ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b812677c
- [7] RAHMAN, M a C BRAZEL. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in Polymer Science*. 2004, **29**(12), 1223-1248. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2004.10.001
- [8] SWAIN, SN, BISWAL, SM, NANDA, PK *et al.* Biodegradable Soy-Based Plastics: Opportunities and Challenges. *Journal of Polymers and the Environment*. 2004, **12**, 35-42 . Dostupné z: doi:10.1023/B:JOOE.0000003126.14448.04
- [9] NEO, Yun Ping, Sudip RAY, Jianyong JIN, Marija GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, Michel K. NIEUWOUDT, Dongyan LIU a Siew Young QUEK. Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system. *Food Chemistry*. 2013, **136**(2), 1013-1021. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.010
- [10] LAGARON, JM. *Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 9780857092786.
- [11] GRUMEZESCU, Alexandru a Alina Maria HOLBAN, ed. *Impact of Nanoscience in the Food Industry - 1st Edition - ISBN: 9780128114414, 9780128114933 View on ScienceDirect Impact of Nanoscience in the Food Industry: Volume 12*. Bucharest: Academic Press, 2018. ISBN 9780128114414.
- [12] BENEŠOVÁ, P. Bioprodukce, charakterizace a aplikace vybraných biopolymerů Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 147s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

- [13] LIM, L.-T., R. AURAS a M. RUBINO. Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*. 2008, **33**(8), 820-852. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004
- [14] GUPTA, Bhuvanesh, Nilesh REVAGADE a Jöns HILBORN. Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science*. 2007, **32**(4), 455-482. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005
- [15] TONCHEVA, Antoniya, Mariya SPASOVA, Dilyana PANEVA, Nevena MANOLOVA a Iliya RASHKOV. Polylactide (PLA)-Based Electrospun Fibrous Materials Containing Ionic Drugs as Wound Dressing Materials: A Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2014, **63**(13), 657-671. ISSN 0091-4037. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2013.854240
- [16] GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*. **9**(2), 63-84. ISSN 15662543. Dostupné z: doi:10.1023/A:1020200822435
- [17] RASAL, Rahul M., Amol V. JANORKAR a Douglas E. HIRT. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*. 2010, **35**(3), 338-356. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003
- [18] MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K., Nimisha Rajendran NAIR a Rojan Pappy JOHN. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010, **101**(22), 8493-8501. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2010.05.092
- [19] POIRIER, Y., D. E. DENNIS, K. KLOMPARENS a C. SOMERVILLE. Polyhydroxybutyrate, a Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants. *Science*. 1992, **256**(5056), 520-523. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.256.5056.520
- [20] – STAŇKOVÁ, Marie. *Regulace produkce polyhydroxybutyrátu bakterií Wautersia eutropha: Regulation of polyhydroxybutyrate production in Wautersia eutropha*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009.
- [21] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [22] ARIFFIN, Hidayah, Haruo NISHIDA, Yoshihito SHIRAI a Mohd Ali HASSAN. Highly selective transformation of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] into trans-crotonic acid by catalytic thermal degradation. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, **95**(8), 1375-1381. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.018
- [23] LENZ, Robert W. a Robert H. MARCHESSAULT. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* [online]. 2005, **6**(1), 1-8 [cit. 2021-02-13]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049700c
- [24] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 2003, **87**(2), 137-146. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2

- [25] ALEXY, P. *Biologically Degradable Polymeric Composition with High Deformability* WIPO Patent Application, WO/2012/141660. Uděleno 18.10.2012.
- [26] WILLIAMS, SF a OP PEOPLES. Biodegradable plastics from plants. *Chemtech*. 1996, (26), 38-44. Dostupné z: doi:10.12691/jaem-5-1-2
- [27] BIO-ON. *The world's first product made with PHAs* [online]. 4.5.2012. [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: <http://mocoloco.com/archives/027152.php>
- [28] LUHUA, Z., Whitehouse R. S.. *Methods of making intermediates from polyhydroxyalkanoates*. USA. US Patent, 6897338 B2. Uděleno 24. 5. 2004.
- [29] ZINN, Manfred, Bernard WITHOLT a Thomas EGLI. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, **53**(1), 5-21. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00218-6
- [30] WILLIAMS, Simon F, David P MARTIN, Daniel M HOROWITZ a Oliver P PEOPLES. PHA applications: addressing the price performance issue. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1999, **25**(1-3), 111-121 [cit. 2021-02-13]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00022-7
- [31] SEMENOV, Alexander N. a Michael RUBINSTEIN. Thermoreversible Gelation in Solutions of Associative Polymers. 1. Statics. *Macromolecules* [online]. 1998, **31**(4), 1373-1385 [cit. 2021-02-13]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma970616h
- [32] CESÀRO, Attilio, Deborah FABRI, Fabiana SUSSICH a Gaio PARADOSSI. Structural and thermodynamic features of the polyhydroxybutyrate physical gels. *Macromolecular Symposia*. 1999, **138**(1), 165-174. ISSN 10221360. Dostupné z: doi:10.1002/masy.19991380121
- [33] *Handbook of Polymers* [online]. Elsevier, 2012 [cit. 2021-02-13]. ISBN 9781895198478. Dostupné z: doi:10.1016/C2011-0-04631-8
- [34] HAHN, S K, Y K CHANG a S Y LEE. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 1995, **61**(1), 34-39. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.61.1.34-39.1995
- [35] *Klasické zvláknovací metody* [online]. [cit. 2018-07-16]. Dostupné z: <http://www.tikp.co.uk/knowledge/technology/fibre-and-filament-production/>
- [36] MÁROVÁ, I.; POSPÍŠIL, L.; KUNDRÁT, V.; VUT v Brně: *Polymerní vlákno a způsob jeho přípravy*. 306448, patent. (2016)
- [37] BARHAM, P. J. a A. KELLER. High-strength polyethylene fibres from solution and gel spinning. *Journal of Materials Science*. 1985, **20**(7), 2281-2302. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/BF00556059
- [38] LUNDAHL, Meri J., Ville KLAR, Ling WANG, Mariko AGO a Orlando J. ROJAS. Spinning of Cellulose Nanofibrils into Filaments: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2016, **56**(1), 8-19. ISSN 0888-5885. Dostupné z: doi:10.1021/acs.iecr.6b04010
- [39] EWIN, Menachem a Eli M. PEARCE. *Handbook of fiber chemistry*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c1998. ISBN 0-8247-9471-0.

- [40] *Advances in filament yarn spinning of textiles and polymers*. Amsterdam: Woodhead Publishing Ltd. in association with the Textile Institute, 2014. Woodhead publishing in textiles, no. 150. ISBN 978-0-85709-499-5.
- [41] LI, S.-G., G.H. KOOPS, M.H.V. MULDER, T. VAN DEN BOOMGAARD a C.A. SMOLDERS. Wet spinning of integrally skinned hollow fiber membranes by a modified dual-bath coagulation method using a triple orifice spinneret. *Journal of Membrane Science*. 1994, **94**(1), 329-340. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/0376-7388(94)00076-X
- [42] WIENK, I.M., F.H.A. OLDE SCHOLTENHUIS, Th. VAN DEN BOOMGAARD a C.A. SMOLDERS. Spinning of hollow fiber ultrafiltration membranes from a polymer blend. *Journal of Membrane Science*. 1995, **106**(3), 233-243. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/0376-7388(95)00088-T
- [43] PUPPI, Dario, Alessandro PIROSA, Andrea MORELLI a Federica CHIELLINI. Design, fabrication and characterization of tailored poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate] scaffolds by computer-aided wet-spinning. *Rapid Prototyping Journal*. 2018, **24**(1), 1-8. ISSN 1355-2546. Dostupné z: doi:10.1108/RPJ-03-2016-0037
- [44] PUPPI, Dario, Anna Maria PIRAS, Federica CHIELLINI, Emo CHIELLINI, Albino MARTINS, Isabel B. LEONOR, Nuno NEVES a Rui REIS. Optimized electro- and wet-spinning techniques for the production of polymeric fibrous scaffolds loaded with bisphosphonate and hydroxyapatite. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2011, **5**(4), 253-263. ISSN 19326254. Dostupné z: doi:10.1002/term.310
- [45] STEINMETZ, J., M. GLERUP, M. PAILLET, P. BERNIER a M. HOLZINGER. Production of pure nanotube fibers using a modified wet-spinning method. *Carbon*. 2005, **43**(11), 2397-2400. ISSN 00086223. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbon.2005.03.047
- [46] WILLIAMSON, Matthew R. a Allan G.A. COOMBES. Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. *Biomaterials*. 2004, **25**(3), 459-465. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00536-2
- [47] KUNDRÁT, Vojtěch. Příprava nanovláken pomocí elektrostatičkého zvláknování [online]. Brno, 2016 [cit. 2021-02-24]. Dostupné z: <<https://is.muni.cz/th/s37ci/>>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jiří Pinkas.
- [48] GREINER, Andreas a Joachim H. WENDORFF. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, **46**(30), 5670-5703. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200604646
- [49] YARIN, Alexander L., Behnam POURDEYHIMI a Seeram RAMAKRISHNA. *Fundamentals and Applications of Micro and Nanofibers* [online]. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. ISBN 9781107446830. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781107446830
- [50] FONG, H, I CHUN a D.H RENEKER. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*. 1999, **40**(16), 4585-4592. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(99)00068-3
- [51] Eletrospinning vs Electrospaying [online] 27.12.2015 Dostupné <http://www.bioinicia.com>

- [52] RENEKER, Darrell H. a Alexander L. YARIN. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*. 2008, **49**(10), 2387-2425. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2008.02.002
- [53] Viscosity of liquids Bürkle GmbH, 2011 [online] Dostupné <https://www.buerkle.de/en/knowhow/viscosity-of-liquids>
- [54] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-x. 201
- [55] DEITZEL, J.M, J KLEINMEYER, D HARRIS a N.C BECK TAN. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*. 2001, **42**(1), 261-272. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(00)00250-0
- [56] SUN, B., Y.Z. LONG, H.D. ZHANG, M.M. LI, J.L. DUVAİL, X.Y. JIANG a H.L. YIN. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science*. 2014, **39**(5), 862-890. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002
- [57] SOMBATMANKHONG, Korakot, Orawan SUWANTONG, Suchada WALEETORNCHEEPSAWAT a Pitt SUPAPHOL. Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2006, **44**(19), 2923-2933. ISSN 0887-6266. Dostupné z: doi:10.1002/polb.20915
- [58] HUANG, Zheng-Ming, Y.-Z. ZHANG, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. 2003, **63**(15), 2223-2253 [cit. 2021-02-15]. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7
- [59] RAMAKRISHNA, Seeram. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. New Jersey: World Scientific, c2005. ISBN 9789812564542.
- [60] SHIN, Y.M., M.M. HOHMAN, M.P. BRENNER a G.C. RUTLEDGE. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer*. 2001, **42**(25), 09955-09967. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(01)00540-7
- [61] ZHANG, Xiangwu. *Fundamentals of fiber science*. Lancaster: DEStech Publications, c2014. ISBN 978-1-60595-119-5.
- [62] JARUSUWANNAPOOM, Teeradech, Walaiporn HONGROJJANAWIWAT, Sujinda JITJAICHAM, et al. Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *European Polymer Journal* [online]. 2005, **41**(3), 409-421 [cit. 2021-02-15]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2004.10.010
- [63] UYAR, Tamer a Flemming BESENBACHER. Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer*. 2008, **49**(24), 5336-5343. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2008.09.025
- [64] GUPTA, Pankaj, Casey ELKINS, Timothy E. LONG a Garth L. WILKES. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation,

viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*. 2005, **46**(13), 4799-4810. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2005.04.021

[65] DEMIR, M.M, I YILGOR, E YILGOR a B ERMAN. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer* [online]. 2002, **43**(11), 3303-3309 [cit. 2021-02-15]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(02)00136-2

[66] CENGİZ, F. a O. JIRSAK. The effect of salt on the roller electrospinning of polyurethane nanofibers. *Fibers and Polymers* [online]. 2009, **10**(2), 177-184 [cit. 2021-02-15]. ISSN 1229-9197. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-009-0177-7

[67] QIN, Xiao-Hong, Yu-Qin WAN, Ji-Huan HE, Juan ZHANG, Jian-Yong YU a Shan-Yuan WANG. Effect of LiCl on electrospinning of PAN polymer solution: theoretical analysis and experimental verification. *Polymer*. 2004, **45**(18), 6409-6413. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2004.06.031

[68] THERON, S.A., E. ZUSSMAN a A.L. YARIN. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*. 2004, **45**(6), 2017-2030. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2004.01.024

[69] WANG, Chi, Yong-Wen CHENG, Chia-Hung HSU, Huan-Sheng CHIEN a Shih-Yung TSOU. How to manipulate the electrospinning jet with controlled properties to obtain uniform fibers with the smallest diameter?—a brief discussion of solution electrospinning process. *Journal of Polymer Research* [online]. 2011, **18**(1), 111-123 [cit. 2021-02-15]. ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-010-9397-1

[70] TOUNY, Ahmed H., Joseph G. LAWRENCE, Andrew D. JONES a Sarit B. BHADURI. Effect of electrospinning parameters on the characterization of PLA/HNT nanocomposite fibers. *Journal of Materials Research* [online]. 2010, **25**(5), 857-865 [cit. 2021-02-15]. ISSN 0884-2914. Dostupné z: doi:10.1557/JMR.2010.0122

[71] MEGELSKI, Silke, Jean S. STEPHENS, D. Bruce CHASE a John F. RABOLT. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* [online]. 2002, **35**(22), 8456-8466 [cit. 2021-02-15]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma020444a

[72] YALCINKAYA, Baturalp, Fatma YENER, Oldrich JIRSAK a Funda CENGİZ-CALLIOĞLU. On the Nature of Electric Current in the Electrospinning Process. *Journal of Nanomaterials*. 2013, **2013**, 1-10. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2013/538179

[73] YALCINKAYA, Baturalp, Funda Cengiz CALLIOĞLU a Fatma YENER. Measurement and analysis of jet current and jet life in roller electrospinning of polyurethane. *Textile Research Journal*. 2014, **84**(16), 1720-1728. ISSN 0040-5175. Dostupné z: doi:10.1177/0040517514528563

[74] TEO, W E a S RAMAKRISHNA. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006, **17**(14), R89-R106. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/17/14/R01

[75] TRIPATANASUWAN, Sureeporn, Zhenxin ZHONG a Darrell H. RENEKER. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly(ethylene oxide) aqueous solution.

Polymer [online]. 2007, **48**(19), 5742-5746 [cit. 2021-02-15]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2007.07.045

[76] DEMIR, M.M, I YILGOR, E YILGOR a B ERMAN. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*. 2002, **43**(11), 3303-3309. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(02)00136-2

[77] YENER, F. a O. JIRSAK. Comparison between the Needle and Roller Electrospinning of Polyvinylbutyral. *Journal of Nanomaterials*. 2012, **2012**, 1-6. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2012/839317

[78] Nafigate [online] 26.12.2015 Dostupné z: <http://www.nafigate.com>

[79] PEPPER, CB, S MCCARTHY, K REAL, et al. *Nanomaterial wound dressing assembly*. USA. US20110111012A1. Uděleno 14.5.2010.

[80] CMELIK, J, M MALY, P SEJAK, et al. *Způsob a zařízení pro nanášení kapalných polymerních matic na zvlákňovací struny*. CZ306438B6. Czech Republic. 306438. Uděleno 12.4.2011.

[81] Elmarco [online] 26.12.2015 Dostupné z: <http://www.elmarco.com>

[82] NS8S1600U [online] 2.1.2015 Dostupné <http://www.elmarco.com>

[83] SOZER, Nesli a Jozef L. KOKINI. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology* [online]. 2009, **27**(2), 82-89 [cit. 2021-02-15]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2008.10.010

[84] CHAUDHRY, Qasim a Laurence CASTLE. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science & Technology*. 2011, **22**(11), 595-603. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2011.01.001

[85] FREWER, L.J., N. GUPTA, S. GEORGE, A.R.H. FISCHER, E.L. GILES a D. COLES. Consumer attitudes towards nanotechnologies applied to food production. *Trends in Food Science & Technology*. 2014, **40**(2), 211-225. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2014.06.005

[86] CHAUDHRY, Qasim, Michael SCOTTER, James BLACKBURN, Bryony ROSS, Alistair BOXALL, Laurence CASTLE, Robert AITKEN a Richard WATKINS. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2008, **25**(3), 241-258. ISSN 1944-0049. Dostupné z: doi:10.1080/02652030701744538

[87] WEISS, Jochen, Paul TAKHISTOV a D. Julian MCCLEMENTS. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*. 2006, **71**(9), R107-R116. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x

[88] NORUZI, Masumeh. Electrospun nanofibres in agriculture and the food industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016, **96**(14), 4663-4678. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.7737

[89] HELLMANN, Christoph, Andreas GREINER a Joachim H. WENDORFF. Design of pheromone releasing nanofibers for plant protection. *Polymers for Advanced Technologies*. 2011, **22**(4), 407-413. ISSN 10427147. Dostupné z: doi:10.1002/pat.1532

[90] BUCHHOLZ, Viola, Melanie MOLNAR, Hui WANG, Steffen REICH, Seema AGARWAL, Michael FISCHER a Andreas GREINER. Protection of Vine Plants against Esca Disease by Breathable

Electrospun Antifungal Nonwovens. *Macromolecular Bioscience*. 2016, **16**(9), 1391-1397. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201600118

[91] WEN, Peng, Min-Hua ZONG, Robert J. LINHARDT, Kun FENG a Hong WU. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*. 2017, **70**, 56-68. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2017.10.009

[92] ANU BHUSHANI, J. a C. ANANDHARAMAKRISHNAN. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2014, **38**(1), 21-33. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2014.03.004

[93] FUENMAYOR, Carlos Alberto, Solomon Mengistu LEMMA, Saverio MANNINO, Tanja MIMMO a Matteo SCAMPICCHIO. Filtration of apple juice by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering*. 2014, **122**, 110-116. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.08.038

[94] - *Filtrex - spolehlivé a výkonné filtry: Nanovláknenné filtry* [online]. 2018 [cit. 2018-07-30]. Dostupné z: <http://www.filtrex.cz/cs/produkty.html>

[95] NOHYNEK, G.J., E.K. DUFOUR a M.S. ROBERTS. Nanotechnology, Cosmetics and the Skin: Is There a Health Risk? *Skin Pharmacology and Physiology*. 2008, **21**(3), 136-149. ISSN 1660-5535. Dostupné z: doi:10.1159/000131078

[96] MU, Li a Robert L. SPRANDO. Application of Nanotechnology in Cosmetics. *Pharmaceutical Research*. 2010, **27**(8), 1746-1749. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-010-0139-1

[97] MIHRANYAN, Albert, Natalia FERRAZ a Maria STRØMME. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*. 2012, **57**(5), 875-910. ISSN 00796425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2011.10.001

[98] - *Navigate cosmetics* [online]. 2018 [cit. 2018-07-30]. Dostupné z: <https://www.navigatecosmetics.cz>

[99] DELOUISE, Lisa A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012, **132**(3), 964-975. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2011.425

[100] WU, Yan, Yuan-Hong LI, Xing-Hua GAO a Hong-Duo CHEN. The application of nanoemulsion in dermatology: an overview. *Journal of Drug Targeting*. 2013, **21**(4), 321-327. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.3109/1061186X.2013.765442

[101] FAKHRAVAR, Zohreh, Pedram EBRAHIMNEJAD, Hadis DARAEE a Abolfazl AKBARZADEH. Nanoliposomes: Synthesis methods and applications in cosmetics. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2016, **18**(3), 174-181. ISSN 1476-4172. Dostupné z: doi:10.3109/14764172.2015.1039040

[102] TERADA, Mikio a R.H. MARCHESSAULT. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, **25**(1-3), 207-215. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(99)00036-7

[103] SOBIESKI, Brian J., Liang GONG, Steven R. AUBUCHON, Isao NODA, D. Bruce CHASE a John F. RABOLT. Thermally reversible physical gels of poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate]: Part 1 gelation in dimethylformamide. *Polymer*. 2017, **131**, 217-223. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2017.10.015



- [104] CESÀRO, Attilio, Deborah FABRI, Fabiana SUSSICH a Gaio PARADOSSI. Structural and thermodynamic features of the polyhydroxybutyrate physical gels. *Macromolecular Symposia*. 1999, **138**(1), 165-174. ISSN 10221360. Dostupné z: doi:10.1002/masy.19991380121
- [105] TURCHETTO, Alessandro a Attilio CESÀRO. Gel-sol phase transition of poly(3-hydroxybutyrate) in dimethylformamide. *Thermochimica Acta*. 1995, **269-270**, 307-317. ISSN 00406031. Dostupné z: doi:10.1016/0040-6031(95)02572-3
- [106] GARG, Koyal a Gary L. BOWLIN. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics*. 2011, **5**(1). ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.3567097

POUŽITÉ ZKRATKY

CB chlorbenzen	PHBHH polyhydroxyhexanoát
CF chloroform	PHBV poly-3-hydroxybutyrát-ko-3-hydroxyvalerát
DCE dichloroethan	PLA polymléčná kyselina
DMAc dimethylacetamid	PMMA polymethylemtakrylát
DMF dimethylformamid	PP Polypropylen
DMSO dimethylsulfoxid	PS polystyren
TCM trichlormethan	PTFE polytetrafluoroethylen
HFIP hexafluoroisopropanol	PU polyurethan
PA-6 polyamid-6	PVA polyvinylalkohol
PAN polyakrylonitril	PVAc polyvinyla cetát
PBAT polybutyrát-adipát-tereftalát	PVC polyvinylchlorid
PBS polybutylen sukcinát	PVDF polyvinlidendifluorid
PCL polykaprolakton	PVL polyvalerolakton
PDL poly(ϵ -decalakton)	PVP polyvinylpyrrolidon
PDO polydioxanon	SEM skenovací elektronová mikroskopie
PE polyethylen	TCE tetrachlorethan
PEO polyethylenoxid	TCM tetrachlormethan
PES polyethylen sukcinát	TCP trichloropropan
PESL polyethersulfon	TEM transmisní elektronová mikroskopie
PET polyethylentereftalát	TFE trifluoroethanol
PGA polyglykolová kyselina	THF tetrahydrofuran
PHA polyhydroxyalkanoát	TN toluen
PHB poly-(R)-3-hydroxybutyrát	

Article

Drug Release Kinetics of Electrospun PHB Meshes

Vojtech Kundrat ¹, Nicole Cernekova ¹, Adriana Kovalcik ^{1,*} , Vojtech Enev ²  and Ivana Marova ¹

¹ Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; kundrat@fch.vut.cz (V.K.); xccernekova@fch.vut.cz (N.C.); marova@fch.vut.cz (I.M.)

² Department of Physical and Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova 118, 612 00 Brno, Czech Republic; enev@fch.vut.cz

* Correspondence: kovalcik@fch.vut.cz

Received: 12 May 2019; Accepted: 13 June 2019; Published: 14 June 2019



Abstract: Microbial poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) has several advantages including its biocompatibility and ability to degrade in vivo and in vitro without toxic substances. This paper investigates the feasibility of electrospun PHB meshes serving as drug delivery systems. The morphology of the electrospun samples was modified by varying the concentration of PHB in solution and the solvent composition. Scanning electron microscopy of the electrospun PHB scaffolds revealed the formation of different morphologies including porous, filamentous/beaded and fiber structures. Levofloxacin was used as the model drug for incorporation into PHB electrospun meshes. The entrapment efficiency was found to be dependent on the viscosity of the PHB solution used for electrospinning and ranged from 14.4–81.8%. The incorporation of levofloxacin in electrospun meshes was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy and UV-VIS spectroscopy. The effect of the morphology of the electrospun meshes on the levofloxacin release profile was screened in vitro in phosphate-buffered saline solution. Depending upon the morphology, the electrospun meshes released about 14–20% of levofloxacin during the first 24 h. The percentage of drug released after 13 days increased up to 32.4% and was similar for all tested morphologies. The antimicrobial efficiency of all tested samples independent of the morphology, was confirmed by agar diffusion testing.

Keywords: biomaterials; electrospinning; drug release kinetics; levofloxacin; morphology; poly(3-hydroxybutyrate); scaffolds

1. Introduction

The goal of controlled drug delivery is to deliver a drug with a specific release profile to the targeted cells, tissues or organs [1]. In the area of controlled drug delivery, many release systems based on synthetic or natural polymers have been reported. Since 1950, three generations of drug delivery systems (DDS) have been developed. The first-generation DDS mainly included modifications of the drug release mechanisms, such as dissolution-controlled, diffusion-controlled, osmosis-controlled and ion-exchange-controlled mechanisms in oral and transdermal delivery. The advances in these first-generation DDS have been described in several excellent reviews [2–4]. The second-generation DDS, also known as smart drug delivery systems, were focused on zero-order release and introduced smart delivery systems encompassing nanoparticles, smart polymers and hydrogels, peptide and protein delivery. A large number of existing studies in the literature have reviewed the smart DDS and their clinical potential [5–8]. The third-generation DDS is still under development and involves modulated delivery systems, which would overcome the biological and physicochemical barriers [9,10]. Recently, a number of DDS have been developed based on biodegradable polymers, including polylactides [11,12], poly(lactide-co-glycolide) [13,14], poly(ϵ -caprolactone) [15], polyhydroxyalkanoates [16,17], chitosan, dextran, alginate and hyaluronic

acid [18,19]. The use of the polymer matrix based on biodegradable polymer brings many advantages but the most important one is their (bio)degradation into oligomers and monomers, which can be metabolized through normal physiological pathways [20,21].

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biopolyesters of 3-hydroxyalkanoic acids synthesized and accumulated in bacterial cells as intracellular carbon and energy storage materials [22]. A broad range of PHAs with different physicochemical properties can be biosynthesized using different substrates, co-substrates and microorganisms [23]. One of the disadvantages is their much higher cost compared to traditional petroleum-based polymers. The main reason for this is that the microbial syntheses of PHA require upstream and downstream processing, which are time, material and equipment demanding processes. Due to their high biocompatibility, non-toxicity and degradability in vivo, PHA polymers display high potential for application in drug delivery and tissue engineering [24]. The most extensively studied are poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-valerate) (PHBHV), mainly due to their availability on the market. Both PHB and PHBHV are semi-crystalline polymers with molecular weights ranging from 200 to 3000–8000 kg·mol⁻¹ [25]. Their degradation in body fluids occurs mainly through surface and bulk erosion combined with hydrolytic chain scission. This way of degradation is an attractive release mechanism for DDS [26]. Degradation of PHA materials in vitro depends on their chemical structure, molecular weight, crystallinity, sample dimensions, pH and temperature of the hydrolytic medium [27,28]. It was found that in vivo as well as in vitro degradation of PHA is much slower compared to other biopolyesters, e.g., polylactides (PLA). Gogolewski et al. reported that after six months of subcutaneous implantation using injection molded PHA samples in mice, only about 15–43% of the material was degraded. Polylactide-based materials under the same experimental conditions reached much higher degradation values in the range of 56–99% of the materials [29].

Numerous processing approaches are used for the preparation of the controllable drug delivery systems based on biodegradable polymers, including encapsulation, nanotechnology and electrospinning [30]. Electrospinning is a processing method for the preparation of fibrous polymer mats with different morphology and the fibers can be coated onto any surface, which offers great potential in tissue engineering [31]. Due to the slow hydrolysis rate, PHB electrospun fibers are preferable in tissue engineering and disease diagnosis but only with limitations in the DDS [32–34]. Therefore, various strategies have been used to modify drug release profiles from PHB. One of the ways of doing this is the blending of PHB with a polymer that has a shorter degradation time, for example with polyethylene oxide [35], and polylactides [31,36]. The next methodology to accelerate the degradation is the use of PHA with a chemical structure different to PHB, for example, the amorphous poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), where the presence of 4-hydroxybutyrate units in polyester accelerates the rate of hydrolytic degradation [37,38]. Another way of accelerating the degradation in vivo or in vitro is the modification of the surface morphology of PHB electrospun fibers loaded with the drug. The morphology and porosity of electrospun nonwoven meshes can be adjusted by many parameters such as polymer type (molecular weight, molecular weight distribution and architecture), solvent properties (solution concentration, viscosity, conductivity and surface tension), process parameters (electric potential, flow rate and concentration, deposition distance, and deposition time), and ambient parameters [39,40]. The release kinetics of the active substance also depends on the way it is incorporated in electrospun mats. Naveen et al. reported the 95% release of kanamycin sulphate-loaded PHB nanofiber mats within the first 8 h when the antibiotic was entrapped on the surface and sandwiched within the nanofiber mats [41]. However, some applications need much slower release of the active substances.

The purpose of this study was (1) to investigate the formation of porous morphologies of electrospun mats in relation to the solvent viscosity, and (2) to assess the resulting drug entrapment efficiency and drug release profile. Levofloxacin was selected as the model drug; it is an antibacterial agent belonging to the group of fluoroquinolones and has good solubility in chloroform. Its antibacterial activity is based on the inhibition of the supercoiling activity of bacterial DNA gyrase and halting

DNA replication [42]. The hypothesis was that the porous morphology would support easier incorporation of drug into the PHB matrix and might increase the drug entrapment efficiency. The type of formed morphology should subsequently influence the drug release kinetics. Recently, several works confirmed the biocompatibility of PHB electrospun mats despite the use of chlorinated solvents during processing [43]. Despite all of the aforementioned investigations, there is a lack of information on the influence of different morphologies, other than uniform fibers, on the drug release kinetics of electrospun meshes. Moreover, the addition of bioactive compounds often alters the morphology of electrospun mats [44,45]. In the present work, the viscosity of the electrospinning solvent was modified by the variation in the PHB concentration in the solvent, and by the ratio of dichloromethane and chloroform used as a binary solvent system. The morphology of the developed electrospun mats was proven by scanning electron microscopy and the drug release profile was monitored in vitro in phosphate-buffered saline solution.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of PHB Electrospun Films

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) with a weight-average molecular mass (M_w) of $350 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ and polydispersity \bar{D} of 1.2 was obtained from the Nafigate Corporation, Prague, Czech Republic. Scaffolds with various morphologies were produced by electrospinning as follows: PHB was dissolved in dichloromethane/chloroform in the ratio of 1:1 (sample set I), 1:2 (sample set II) and 1:3 (sample set III) at a concentration of 1%, 2%, 4%, 5% and 8% (w/v). PHB scaffolds loaded with levofloxacin (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) were prepared by the addition of 1 wt.% of the drug (related to the PHB mass) into the dissolved PHB and stirring for 15 min. For the preparation of fiber meshes, the resulting polymer solution was placed into a 10 mL syringe fitted with a metallic needle with a diameter of 1 mm. Electrospinning was performed on a laboratory-made device with two high voltage sources, one positively charged (0–25 kV) and the other negatively charged (–15–0 kV). The positive charge was placed to the tip of the needle through the spinning solution, pushed by a syringe pump. The negative charge was placed on a collector, which was represented by a metallic round plate with a diameter of 10 cm and covered by a flat aluminum sheet. Each sample was collected on the new aluminum sheet. The conditions of the electrospinning process are described in Table 1. The prepared electrospun meshes were left 24 h in a hood and 10 h at 40°C in a vacuum oven to evaporate solvents. The complete evaporation of solvents was confirmed by thermogravimetric analysis (data are not presented in this work). The electrospun samples without antibiotic were designated as EM_X, where X indicates the concentration of PHB in the solution used for the electrospinning. Additionally, electrospun samples loaded with levofloxacin were designated as EM_X_L.

Table 1. Set up conditions used for electrospinning of PHB solutions.

Electrode Distance (mm)	Syringe Diameter (mm)	Needle Diameter (mm)	Voltage Difference (kV)	Intensity of Electrical Field (kV/mm)	Feed Rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)
200 ± 1	18.0	1.0	20.0 ± 0.1	1	100

To determine the concentration of levofloxacin entrapped in PHB electrospun meshes, 100 mg of sample was dissolved in 5 mL of chloroform. One mL of dissolved sample was mixed with 10 mL of sodium phosphate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) for 30 min. The solution was filtered through $0.45 \mu\text{m}$ cellulose acetate membrane before UV-VIS determination of levofloxacin. The experiments were run in triplicate. The concentration of levofloxacin in the solution was determined by means of UV-VIS spectrophotometry at 292 nm. Subsequently, the entrapment efficiency was calculated by using the following equation:

$$\text{Entrapment efficiency (\%)} = \frac{\text{Weight of drug in electrospun film}}{\text{Initial weight of drug in solvent for electrospinning}} \times 100 \quad (1)$$

2.2. Characterization

2.2.1. Determination of Dynamic Viscosity

The dynamic viscosities, η , of the prepared solutions, were determined by using a rotating viscometer (Fungilab Alpha L, Barcelona, Spain) at 20 °C. The standard volume of the samples was 100 mL.

2.2.2. Morphological Analysis

Surface morphology of the PHB fiber meshes was investigated by scanning electron microscopy (FEI Versa3D SEM/FIB, Oregon, OR, USA). The microscope was operated under high-vacuum mode at an acceleration voltage of 5 kV. The surfaces were sputtered with a 5 nm layer of Pt.

2.2.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

The chemical structure of the prepared scaffolds was characterized by FT-IR in Attenuated Total Reflection mode with a single-reflection diamond crystal using a Nicolet iS50 spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The structure of the electrospun meshes was measured directly on the surface of the samples. Additionally, films were prepared from about 10 mg of electrospun samples with levofloxacin by dissolution in the ratio 1:150 (electrospun sample/chloroform), followed by evaporation. Spectra were collected as the average of 32 scans in the frequency range 4000–400 cm^{-1} with the resolution of 4 cm^{-1} . The spectrum of the clean, dry diamond crystal in the ambient atmosphere (air in the laboratory) was used as the background for FTIR measurement.

2.3. Drug in Vitro Release Studies

Levofloxacin loaded in PHB electrospun films of 1 cm^2 with a thickness of 13 μm (EM_1_L), 14 μm (EM_4_L) and 42 μm (EM_5_L) were poured in 2 mL glass vials with 1.5 mL of 0.1 M PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) and closed. The vials were stored in the shaker at 37 °C and 180 rpm. Levofloxacin release from PHB sheets was determined with UV-VIS spectrophotometry (S-220 Spectrophotometer, BOECO, Boeckel + Co, Hamburg, Germany) at 292 nm for seven days. The concentration of the released levofloxacin was calculated from the intensity of absorbance. The release data are presented as the average value of three specimens with the standard deviation.

2.4. Antimicrobial Tests

The antimicrobial activity of levofloxacin incorporated into PHB samples prepared by electrospinning was tested against gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* CCM 1569 (ML), gram-negative bacteria *Serratia marcescens* (SM) CCM 8587 and *Escherichia coli* (EC) CCM 7359. For the antimicrobial testing of electrospun films loaded with the drug, agar diffusion tests were conducted. All used microorganisms were supplied by the Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic. Soybean Casein Digest Agar (Tryptone Soya Agar, Himedia Laboratories, Mumbai, India) was used as the nutrient agar. The samples were cut from the PHB electrospun structures loaded with levofloxacin. The samples with a predetermined weight were placed onto the surface of the agar plate containing a microorganism suspension at a concentration of 5×10^5 CFU per mL. The agar plates were incubated for 24 h at 37 °C. Each sample was tested in triplicate and the growth inhibition halo is presented as the average value with the standard deviation.

3. Results and Discussion

3.1. Morphology of PHB Electrospun Meshes

The concentration of PHB solution was varied from 1 to 5 wt.%. All electrospinning parameters were kept constant; only the composition of binary solvent system was changed. SEM micrographs of electrospun meshes are shown in Figure 1. It is evident from the micrographs that the variation in PHB

concentration and ratio of dichloromethane (DCM) and chloroform (CF) in the binary solvent system influenced the formed morphology. All morphologies, except for the model with microfibers, shown in Figure 1D (within set I) are porous. The model shown in Figure 1A (set I) is the only one without fibers and resembles a sponge. Other models contain a mixture of spindle-like units, fibers and grains. The structure of the models formed by using a solvent system with an increased concentration of CF is more fused. Furthermore, the size of the grains increased with the increase in the PHB concentration. One of the objectives was to promote the formation of porous morphology in electrospun meshes. Morphologies within set I with the DCM and CF in the ratio of 1:1 fulfill this criterion. Both solvents, DCM and CF are good solvents for PHB, but have different physical properties (Table 2). Especially, they differ in their evaporation rate. The application of solvent with a higher evaporation rate supports the formation of a porous morphology. Similar findings have been reported by Mahaling and Katti in their work [39]. Providing that all conditions used for electrospinning are stable and only the kind of solvent and PHB concentration are modified, the viscosity of PHB solutions is another parameter that influences the final morphology. Figure 2 shows the increase in the dynamic viscosity with the increased concentration of PHB and chloroform in the solvent. We observed that solutions with PHB in a concentration higher than 5 wt.% partly solidified on the needle and the electrospinning was difficult.

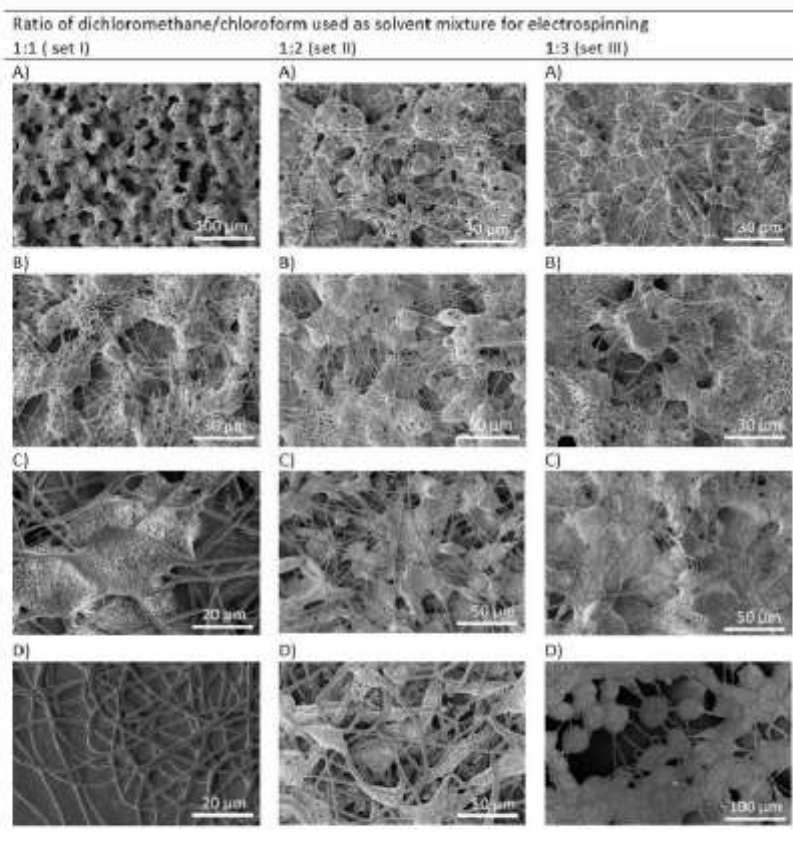


Figure 1. SEM morphology of electrospun meshes processed from dichloromethane/chloroform solution and PHB in the concentration of: (A) 1 wt.% (EM_1), (B) 2 wt.% (EM_2), (C) 4 wt.% (EM_4), and (D) 5 wt.% (EM_5).

Table 2. Physical properties of solvents.

Solvent	Boiling Point (°C)	Dynamic Viscosity at 20 °C (MPa)	Vapour Pressure at 20 °C (kPa)	Dielectric Constant at 20 °C	Surface Tension at 20 °C (mN·m ⁻¹)
Dichloromethane	40	0.43	47	9.1	28.1
Chloroform	61	0.58	21	4.8	27.2

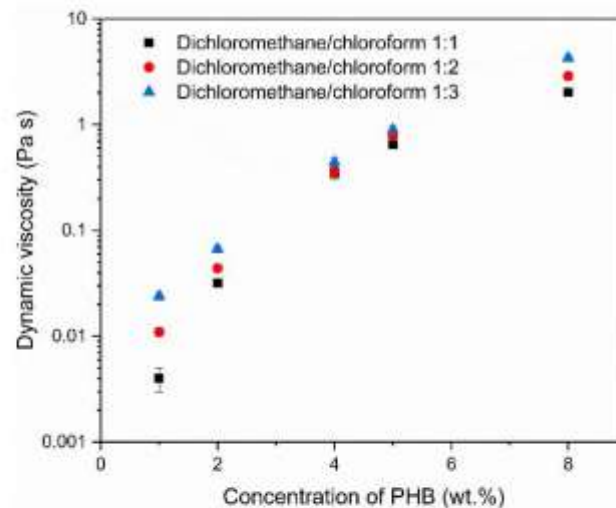


Figure 2. Dynamic viscosity of PHB solution in relation to the ratio of dichloromethane/chloroform (1:1—set I, 1:2—set II, 1:3—set III) and concentration of dissolved PHB.

3.2. Entrapment Efficiency and Drug Release Kinetics

After the morphological screening (see Figure 2), we selected three electrospun models with different morphologies prepared by dissolution of 1, 4 and 5 wt.% of PHB in a binary solvent system, selected from sample set I. The SEM micrographs of the selected electrospun models loaded with levofloxacin are shown in Figure 3. As was hypothesized, the incorporation of the drug influenced the final morphology of scaffolds. In Figure 3A levofloxacin crystals and droplets can be seen on the surface of sample EM_1_L. The original porous structure of the sample EM_4_L disappeared after the incorporation of levofloxacin. Figure 3B,C show fibers with beads and diversified fibers, respectively.

ATR-FTIR spectroscopic analysis verified the existence of entrapped levofloxacin in PHB electrospun meshes. In Figure 4 the FTIR spectra of the neat PHB electrospun sample and PHB electrospun meshes loaded with levofloxacin are shown. The FTIR spectrum of neat PHB shows characteristic bands typical for poly(3-hydroxybutyrate) [25]. The ATR-spectra collected from the surface of PHB samples loaded with the antibiotic did not show any differences compared to the neat PHB. However, the films prepared from the dissolution of electrospun meshes with the incorporated levofloxacin confirmed characteristic peaks of levofloxacin. This indicates that the drug was not adsorbed on the surface of the electrospun samples, but it was incorporated inside the meshes. Some characteristic bands typical for levofloxacin were overlapped with the peaks of PHB, e.g., the absorption band at 1725 cm⁻¹, which is ascribed to symmetric C=O stretching in ester groups. The bands, which were not overlapped were detected at 2848 cm⁻¹ (the peak corresponds to the symmetric C-H stretching in methylene groups.), and 1620 cm⁻¹ as well as 1521 cm⁻¹ (the band can be assigned to C=C stretching vibrations in the aromatic ring of levofloxacin). This indicates that levofloxacin was successfully

entrapped in PHB electrospun meshes. The entrapment efficiency (Equation (1)) was found to be 81.8% for EM_1_L, 22.3% for EM_4_L and 14.4% for EM_5_L. Although levofloxacin was fully dissolved in PHB solutions, which were used for electrospinning, the drug entrapment efficiency decreased with the increased viscosity of the PHB solution. The increase in the viscosity might cause higher sedimentation and thus the drug can adhere to the surfaces of the syringe and the needle. Moreover, the electrospinning was done at room temperature and the solubility of PHB in the chlorinated binary solvent system was higher at a temperature of about 60 °C.

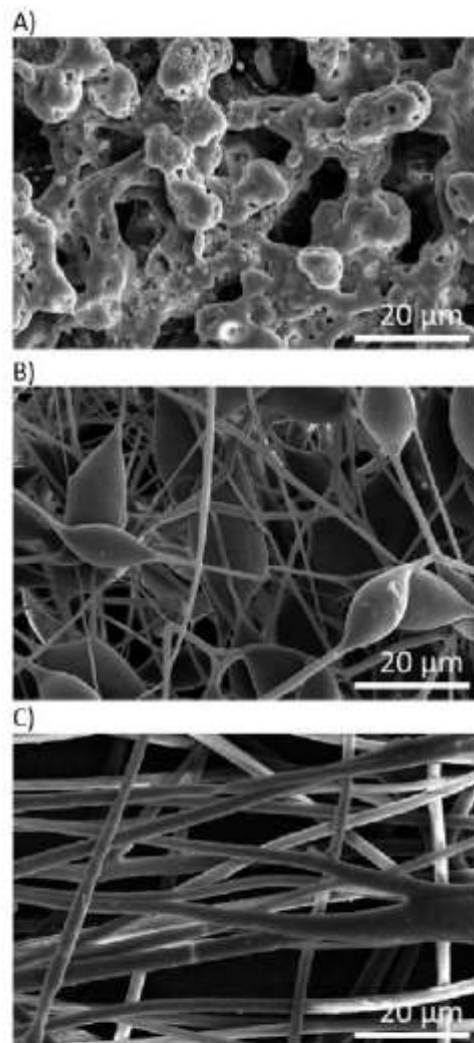


Figure 3. SEM morphologies of PHB electrospun meshes loaded with levofloxacin: (A) EM_1_L, (B) EM_4_L, (C) EM_5_L.

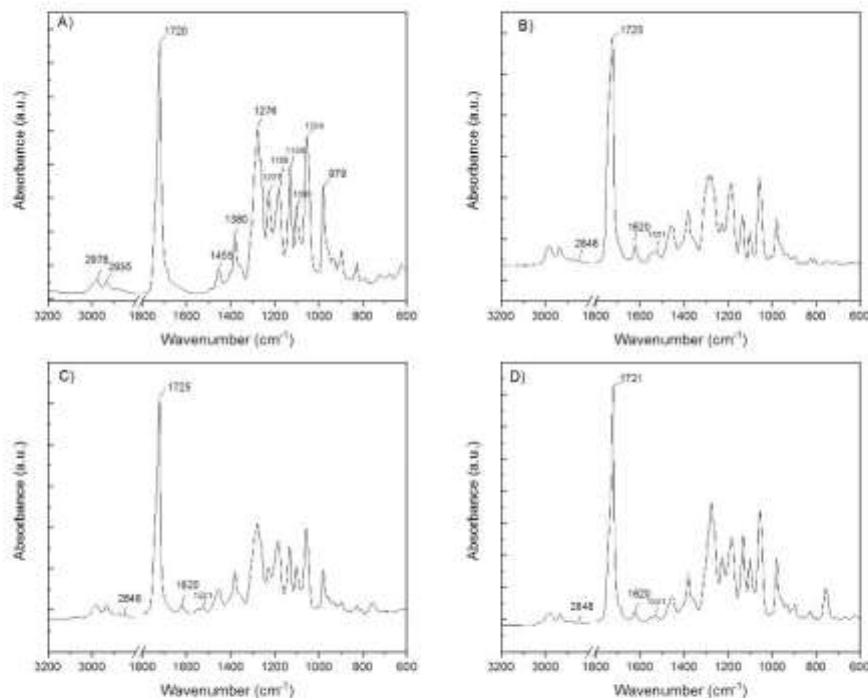


Figure 4. FT-IR spectra of electrospun samples: (A) neat PHB, (B) EM_1_L, (C) EM_4_L, (D) EM_5_L.

The levofloxacin release profiles from the three above mentioned electrospun samples were recorded from the immersion in PBS solution (pH 7.4, 37 °C) for 13 days. The solubility of levofloxacin is pH dependent and reaches about 30 mg·mL⁻¹ at 20 °C and pH 7.5 [40]. The release of the drug incorporated in a degradable polymer matrix depends on many factors. PHB is a hydrolysable polymer and the course of its degradation in PBS solution relies on its molecular weight, crystallinity and morphology. Moreover, hydrolysis is a time, temperature, and pH dependent process. When all parameters except the morphology of electrospun meshes were kept constant, samples gradually released about 14–20% of the drug during the first 24 h (see Figure 5). The release of the drug began with a slight burst effect after the first 10 min and continued with a gradual release up to 24 h. This release tendency indicates the surface erosion of the polymer matrix. The course of the drug release was changed when the bulk erosion of PHB started. The visible changes in the release tendency were detected after the investigated samples were immersed in PBS solution for 13 days. It is interesting to note that sample EM_1_L, which released only 14% of the entrapped drug after 24 h, overtook the other two models and reached a cumulative drug release of 32.5%. In spite of different morphologies, all the tested electrospun models reached a comparable cumulative drug release of about 30.4–32.5% after 13 days. These findings correspond to the use of the same type of PHB. At the beginning of drug release test, the main differences arose from the different morphologies. The morphology of the electrospun meshes markedly influenced the capability of the sample to entrap the drug as well as the drug release rate during the first stage of degradation, which corresponded with the variations in the surface erosion.

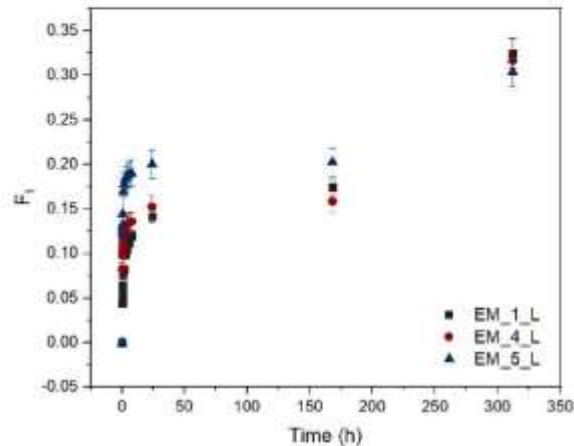


Figure 5. Cumulative fractional release of levofloxacin from electrospun films EM_1_L, EM_4_L and EM_5_L. (F_t —fraction of drug released in t time. The data points and error bars represent mean values and standard deviation of data sets, respectively).

3.3. The Antimicrobial Susceptibility of PHB Loaded Levofloxacin Electrospun Meshes

The antimicrobial susceptibility of different electrospun meshes loaded with levofloxacin was determined using the agar diffusion test (Figure 6). The antimicrobial activity of samples with a surface of 1 cm^2 , was recorded after 24 h as a growth inhibition halo. Due to the variation in the samples' thickness, the determined values were correlated with the corresponding values of the mesh thickness (Table 3). All tested PHB meshes showed distinctive antimicrobial activity against the gram-positive bacterium (*M. luteus*) and gram-negative bacteria (*S. marcescens* and *E. coli*) with the following order of efficiency: $\text{EM}_1\text{-L} > \text{EM}_4\text{-L} \geq \text{EM}_5\text{-L}$. The antimicrobial efficiency corresponded with the amount of the entrapped antibiotic and with the morphology of the mesh. It should be highlighted that levofloxacin is an antibacterial agent with a broad spectrum of activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Interestingly, the activity of levofloxacin incorporated into PHB electrospun meshes displayed much higher efficiency against the gram-negative bacteria compared to gram-positive bacteria. Gram-positive bacteria compared to gram-negative bacteria are usually more susceptible to the action of antibiotic agents, mainly due to differences in the structure and composition of their cell walls [46,47]. Therefore, these PHB electrospun meshes with levofloxacin seem to be highly promising for tissue engineering applications. They could contribute to the prevention and treatment of wound and surgical site infections caused by gram-negative bacteria [48,49].

Table 3. Antimicrobial activity conducted as growth inhibition halos (average value \pm standard deviation, $n = 3$).

Sample	Growth Inhibition Halo (mm)					
	Micrococcus Luteus		Serratia Marcescens		Escherichia Coli	
	^a Measured Value	^b Corrected Value	Measured Value	Corrected Value	Measured Value	Corrected Value
EM_1_L	3.7 ± 1.1	3.7 ± 1.1	4.1 ± 1.1	4.1 ± 1.1	5.1 ± 1.1	5.1 ± 1.1
EM_4_L	0.8 ± 1.0	0.75 ± 0.9	1.2 ± 1.2	1.1 ± 1.1	2.0 ± 1.1	1.9 ± 1.0
EM_5_L	2.1 ± 1.2	0.65 ± 0.4	2.2 ± 1.1	0.68 ± 0.3	3.0 ± 1.0	0.93 ± 0.3

^a measured value—the value of the growth inhibition halo determined on the agar; ^b corrected value—the value of the growth inhibition halo corrected according to the thickness of the sample (in relation to sample EM_1_L).

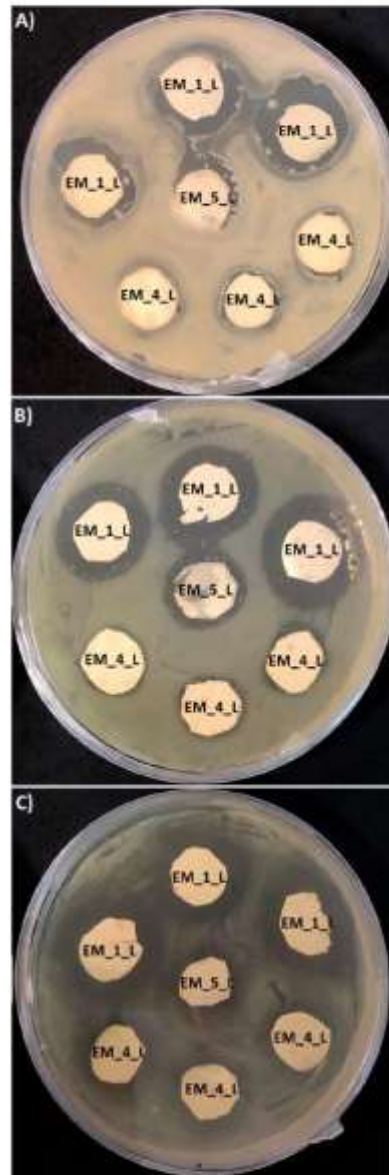


Figure 6. Antimicrobial activity of PHB electrospun meshes M_1_L, M_4_L and M_5_L tested against (A) *Micrococcus luteus*, (B) *Serratia marcescens*, and (C) *Escherichia coli*.

4. Conclusions

Electrospinning of poly(3-hydroxybutyrate) in a dichloromethane/chloroform binary solvent system was demonstrated as a simple method for the preparation of scaffolds with different morphologies. Systems that resulted in sponge, beaded fibers and fiber morphologies were selected

for the incorporation of the drug. Based on its solubility, levofloxacin was selected as the model drug. PHB electrospun scaffolds differed in their entrapment efficiency of the drug. The sponge model was able to entrap about 81.8% of drug. The other two models with a fiber structure with or without beads, were much less effective and entrapped 22.3% and 14.4%, respectively, of the originally loaded drug. All of the electrospun models gradually released from 30.4% to 32.5% of the incorporated levofloxacin after 13 days. When the sample was first immersed in PBS solution, the drug release course was influenced by the surface erosion and later it was also by the bulk erosion. All tested electrospun models entrapped and released a sufficient amount of levofloxacin to exhibit their antimicrobial efficiency. Based on the drug entrapment efficiency and the drug release profiles it can be concluded that the herein proposed electrospinning method of PHB, resulting in EM_1_L film with a sponge morphology might have the potential for the development of an efficient, controllable drug release system. However, faster in vitro hydrolysis of PHB needs to be promoted. This will be a subject of our further research.

Author Contributions: Conceptualization, A.K., I.M. and V.K.; Methodology, V.K. and A.K.; Software, V.K.; Validation, V.K. and A.K.; Formal Analysis, A.K. and N.C.; Investigation, N.C., V.K., A.K. and V.E.; Resources, I.M.; Data Curation, V.K., A.K. and V.E.; Writing—Original Draft Preparation, A.K., V.K., V.E., N.C. and I.M.; Writing—Review & Editing, A.K.; Visualization, N.C. and A.K.; Supervision, A.K.; Project Administration, I.M.; Funding Acquisition, I.M. and A.K.

Funding: This research was funded by [Horizon 2020, Marie Skłodowska-Curie actions, Individual fellowships] grant number [665860] and by [South Moravian Region] grant number [SoMoPro No. 65A18032].

Acknowledgments: This work was funded through the project SoMoPro (project No. 65A18032). This project received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under the Marie Skłodowska-Curie programme, and it is co-financed by the South Moravian Region under grant agreement No. 665860. Note: The authors confirm that the content of this work reflects only the author's view and that the EU is not responsible for any use that may be made of the information it contains.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sudhakar, Y.; Jayaveera, K.N. *Novel Drug Delivery Systems and Regulatory Affairs*; SCHAND & Company Limited: New Delhi, India, 2014.
2. Langer, R.; Peppas, N.A. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE J.* **2003**, *49*, 2990–3006. [[CrossRef](#)]
3. Forbes, D.C.; Peppas, N.A. Oral delivery of small RNA and DNA. *J. Control. Release* **2012**, *162*, 438–445. [[CrossRef](#)]
4. Acar, H.; Ting, J.M.; Srivastava, S.; La Belle, J.L.; Tirrell, M.V. Molecular engineering solutions for therapeutic peptide delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6553–6569. [[CrossRef](#)]
5. Shi, J.; Votruba, A.R.; Farokhzad, O.C.; Langer, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3223–3230. [[CrossRef](#)]
6. Li, J.; Fan, C.; Pei, H.; Shi, J.; Huang, Q. Smart Drug Delivery Nanocarriers with Self-Assembled DNA Nanostructures. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 4386–4396. [[CrossRef](#)]
7. Liu, D.; Yang, F.; Xiong, F.; Gu, N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics* **2016**, *6*, 1306–1323. [[CrossRef](#)]
8. Ramasamy, T.; Ruttala, H.B.; Gupta, B.; Poudel, B.K.; Choi, H.-G.; Yong, C.S.; Kim, J.O. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review. *J. Control. Release* **2017**, *258*, 226–253. [[CrossRef](#)]
9. Rezaie, H.R.; Bakhtiari, L.; Öchsner, A. *A Review of Biomaterials and their Applications in Drug Delivery*; Springer: Singapore, 2018.
10. Park, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J. Control. Release* **2014**, *190*, 3–8. [[CrossRef](#)]
11. Rancan, F.; Papakostas, D.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Delair, T.; Primard, C.; Verrier, B.; Steery, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 2027–2036. [[CrossRef](#)]

12. Pellis, A.; Silvestrini, L.; Scaini, D.; Coburn, J.M.; Gardossi, L.; Kaplan, D.L.; Herrero Acero, E.; Guebitz, G.M. Enzyme-catalyzed functionalization of poly(L-lactic acid) for drug delivery applications. *Process. Biochem.* **2017**, *59 Pt A*, 77–83. [CrossRef]
13. Fukuzaki, H.; Yoshida, M.; Asano, M.; Kumakura, M.; Mashimo, T.; Yuasa, H.; Imai, K.; Yamanaka, H. In vivo characteristics of high molecular weight copoly(L-lactide/glycolide) with S-type degradation pattern for application in drug delivery systems. *Biomaterials* **1991**, *12*, 433–437. [CrossRef]
14. Xu, P.; Gullotti, E.; Tong, L.; Highley, C.B.; Errabelli, D.R.; Hasan, T.; Cheng, J.-X.; Kohane, D.S.; Yeo, Y. Intracellular Drug Delivery by Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles, Revisited. *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 190–201. [CrossRef]
15. Xiao, Y.; Yuan, M.; Zhang, J.; Yan, J.; Lang, M. Functional Poly(ϵ -caprolactone) Based Materials: Preparation, Self-assembly and Application in Drug Delivery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 781–818. [CrossRef]
16. Michalak, M.; Kurcok, P.; Hakkarainen, M. Polyhydroxyalkanoate-based drug delivery systems. *Polym. Int.* **2017**, *66*, 617–622. [CrossRef]
17. Shrivastav, A.; Kim, H.-Y.; Kim, Y.-R. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 581684. [CrossRef]
18. Merli, D.; Profumo, A.; Quadrelli, P.; Arciola, C.R.; Visai, L. Drug Delivery Systems for Chemotherapeutics through Selected Polysaccharidic Vehicles. *Curr. Org. Chem.* **2018**, *22*, 1157–1192. [CrossRef]
19. Salehi Dashtebayaz, M.S.; Nourbakhsh, M.S. Interpenetrating networks hydrogels based on hyaluronic acid for drug delivery and tissue engineering. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2019**, *68*, 442–451. [CrossRef]
20. Siepmann, J.; Siegel, R.A.; Rathbone, M.J. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*; Springer: New York, NY, USA, 2011; p. 594.
21. Thakur, V.K.; Thakur, M.K. *Handbook of Polymers for Pharmaceutical Technologies, Biodegradable Polymers*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2015; p. 608.
22. Koller, M.; Marsalek, L.; de Sousa Dias, M.M.; Braunegg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* **2017**, *37 Pt A*, 24–38. [CrossRef]
23. Anjum, A.; Zuber, M.; Zia, K.M.; Noreen, A.; Anjum, M.N.; Tabasum, S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 161–174. [CrossRef]
24. Ray, S.; Kalia, V.C. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian J. Microbiol.* **2017**, *57*, 261–269. [CrossRef]
25. Kovalcik, A.; Meixner, K.; Mihalic, M.; Zeilinger, W.; Fritz, I.; Fuchs, W.; Kucharczyk, P.; Stelzer, F.; Drosig, B. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 497–504. [CrossRef]
26. Pouton, C.W.; Akhtar, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *18*, 133–162. [CrossRef]
27. Atkins, T.W.; Peacock, S.J. In vitro biodegradation of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate microcapsules exposed to Hank's buffer, newborn calf serum, pancreatin and synthetic gastric juice. *J. Microencapsul.* **1997**, *14*, 35–49. [CrossRef]
28. Yu, J.; Plackett, D.; Chen, L.X.L. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, *89*, 289–299. [CrossRef]
29. Gogolewski, S.; Jovanovic, M.; Perren, S.M.; Dillon, J.G.; Hughes, M.K. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, *27*, 1135–1148. [CrossRef]
30. Asiri, A.M.; Mohammad, A. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*; Elsevier Science: Cambridge, UK, 2018.
31. Cao, K.; Liu, Y.; Olkhov, A.; Siracusa, V.; Iordanskii, A. PLLA-PHB fiber membranes obtained by solvent-free electrospinning for short-time drug delivery. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2018**, *8*, 291–302. [CrossRef]
32. Acevedo, F.; Villegas, P.; Urtuvia, V.; Seeger, M.; Hermosilla, J.; Navia, R. Bacterial polyhydroxybutyrate for electrospun fiber production. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *106*, 692–697. [CrossRef]
33. Ding, Y.; Li, W.; Zhang, F.; Liu, Z.; Zanjanizadeh Ezazi, N.; Liu, D.; Santos, H.A. Electrospun Fibrous Architectures for Drug Delivery, Tissue Engineering and Cancer Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*. [CrossRef]

34. Koller, M.; Koller, M. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules* **2018**, *23*, 362. [CrossRef]
35. Fernandes, J.G.; Correia, D.M.; Botelho, G.; Padrao, J.; Dourado, F.; Ribeiro, C.; Lanceros-Mendez, S.; Sencadas, V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. *Polym. Test.* **2014**, *34*, 64–71. [CrossRef]
36. Wang, C.; Yan, K.-W.; Lin, Y.-D.; Hsieh, P.C.H. Biodegradable Core/Shell Fibers by Coaxial Electrospinning: Processing, Fiber Characterization, and Its Application in Sustained Drug Release. *Macromolecules* **2010**, *43*, 6389–6397. [CrossRef]
37. Doi, Y.; Kanesawa, Y.; Kunioka, M.; Saito, T. Biodegradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **1990**, *23*, 26–31. [CrossRef]
38. Lee, Y.-F.; Sridewi, N.; Ramanathan, S.; Sudesh, K. The influence of electrospinning parameters and drug loading on polyhydroxyalkanoate (PHA) nanofibers for drug delivery. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* **2015**, *4*, 103–113.
39. Mahaling, B.; Katti, D.S. Fabrication of micro-structures of poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] by electro-spraying/-spinning: Understanding the influence of polymer concentration and solvent type. *J. Mater. Sci.* **2014**, *49*, 4246–4260. [CrossRef]
40. Mhlanga, N.; Ray, S.S. Kinetic models for the release of the anticancer drug doxorubicin from biodegradable polylactide/metal oxide-based hybrids. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 1301–1307. [CrossRef]
41. Naveen, N.; Kumar, R.; Balaji, S.; Uma, T.S.; Natrajan, T.S.; Sehgal, P.K. Synthesis of Nonwoven Nanofibers by Electrospinning—A Promising Biomaterial for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Adv. Eng. Mater.* **2010**, *12*, B380–B387. [CrossRef]
42. Levofloxacin. Available online: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01137> (accessed on 29 April 2019).
43. Correia, D.M.; Ribeiro, C.; Ferreira, J.C.; Botelho, G.; Ribelles, J.L.G.; Lanceros-Mendez, S.; Sencadas, V. Influence of electrospinning parameters on poly (hydroxybutyrate) electrospun membranes fiber size and distribution. *Polym. Eng. Sci.* **2014**, *54*, 1608–1617. [CrossRef]
44. Sofokleous, P.; Stride, E.; Edirisinghe, M. Preparation, characterization, and release of amoxicillin from electrospun fibrous wound dressing patches. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 1926–1938. [CrossRef]
45. Fan, X.; Jiang, Q.; Sun, Z.; Li, G.; Ren, X.; Liang, J.; Huang, T. Preparation and characterization of electrospun antimicrobial fibrous membranes based on polyhydroxybutyrate (PHB). *Fibers Polym.* **2015**, *16*, 1751–1758. [CrossRef]
46. Soares, G.M.S.; Figueiredo, L.C.; Faveri, M.; Cortelli, S.C.; Duarte, P.M.; Feres, M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J. Appl. Oral. Sci.* **2012**, *20*, 295–309. [CrossRef]
47. Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2017**, *33*, 300–305. [CrossRef]
48. Percival, S.L.; Suleman, L.; Vuotto, C.; Donelli, G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 323–334. [CrossRef]
49. Chen, S.; Liu, B.; Carlson, M.A.; Gombart, A.E.; Reilly, D.A.; Xie, J. Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 1335–1352. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Facile Preparation of Porous Microfiber from Poly-3-(R)-Hydroxybutyrate and Its Application

Vojtech Kundrat *, Petra Matouskova  and Ivana Marova

Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno 612 00, Czech Republic; matouskova@fch.vutbr.cz (P.M.); marova@fch.vutbr.cz (I.M.)

* Correspondence: vojtechkundrat@seznam.cz

Received: 16 November 2019; Accepted: 19 December 2019; Published: 23 December 2019



Abstract: In this study, we described the development of a simplified wet spinning method of the production of a novel type of porous continuous fiber based on poly-3-(R)-hydroxybutyrate (PHB). The principle of this method is precipitation of PHB dissolved in chloroform solution into the ethanol precipitation bath. The influence of various PHB concentrations and feed rates on specific surface area (measured by nitrogen absorption method) was studied. Materials were also characterized by SEM. Surface areas of fibers achieved by wet spinning were in the range of tens of $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, and the biggest surface area value was $55 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. The average diameter of fibers was in the range of 20–120 μm and was dependent on both PHB concentration and feed rate. Optimum conditions for reaching stable fibers of high surface area were 3–5 % w.t. of PHB and feed rate 0.5–3 $\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$. Fibers were functionalized by adsorption of some natural plant extracts. The incorporation of active substances into fibers was confirmed by infrared spectroscopy. High antioxidant and antimicrobial effect of PHB-fibers with cloves extract was found, as well as excellent long-term stability and optimal dynamics of the release of active compounds. The newly produced material would be applicable in pharmacy, cosmetics, and wound healing.

Keywords: P-3-HB; PHB; wet spinning; microfiber; pores

1. Introduction

Polyhydroxybutyrate (PHB) from a family of polyhydroxyalkanoates is a deeply studied polymer with big application potential in material, medicinal, agricultural, and protection fields [1–5]. The main advantage of this well-known stiff and a rather brittle biopolymer of high crystallinity is its production from waste food oil via bacterial transformation [6]. The huge production of waste food oil could lead to a promising future of PHB; however, the feedstock could compete with the needs of biofuel production [7]. Many interesting materials have been prepared based on polyhydroxyalkanoates, especially on PHB. We could find big development in the area of extrusion [8], film production [9], composites [10], scaffolds [11], particles [12], nanofibers [13], conventional fibers [14], filters [15], paper modification [16], cosmetics [17], food packaging [18], and more [19]. Natural hydrophobic properties of PHB could lead towards perspective sorption application [20] of material with high surface area and pores.

All those applications and development are focused on two different groups of PHB processing. The first one works with extruded polymer, while the second one with a dissolved polymer. PHB itself is not easily processed by extrusion because of thermal degradation [21]. Recently, substantial work in this field has been done [5]. However, the processing is not straight forward as in conventional polymers. Due to this problem, an alternative method based on PHB solubilization could be used. More importantly, additional positive properties like higher surface area or porosity could be gained

by those methods. For example, solvent casting or wet spinning could be found very useful in the preparation of porous membrane materials [22].

Wet spinning [23] is one of the oldest spinning techniques originally performed on cellulose spinning from cellulose xanthate [24]. Nowadays, it is mostly used during the production of carbon fibers based on polyacrylonitrile precursor fibers. The general idea of wet spinning is based on continuous precipitation of polymer from an appropriate solution where a solvent is miscible with precipitation bath, and the polymer is not soluble in the bath [23]. For example, precipitation of polyacrylonitrile could be done from a dimethylformamide solution to water. In the first phase, fiber is not yet in the form of the final product. However, a semi-state of protofibril can be reached, which is partly liquid and partly solid and could be drawn, prolonged, and strengthened. Then, it could be dried, lubricated, and wound up. By this method, it is possible to obtain high strength fibers in mono- or multifilament state depending on used spinneret. Wet spinning by its simple set up is possible to practice in laboratory conditions. The simplest set up (Figure 1) could be just from a syringe pump, spinneret, which could be just a simple needle and precipitation bath formed by glassware filled with proper solvent, solution, or a mixture of liquid compounds. The design of experiments could be done by controlling several parameters, where the straightest forward is the speed of the feed-in syringe pump and polymer concentration. Other parameters could be the temperature of bath or polymer solution and concentrations of various additives in solution or precipitation bath.



Figure 1. Wet spinning set up.

In recent literature, the wet spinning process is described with a highly concentrated solution of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (PHBHHx) in chloroform [25]. Work is focused on potential in 3D printing of scaffold material and with co-polymer with 3-hydroxyhexanoate units rather than homopolymer PHB.

In our previous study, PHB electrospun meshes were prepared, and levofloxacin was used as the model drug for their functionalization [26]. The effect of the morphology of the electrospun meshes on the levofloxacin release profile was confirmed. Depending upon the morphology, the electrospun

meshes released about 14%–20% of levofloxacin during the first 24 h and after 13 days increased up to 32.4%. This amount was relatively low for a potential healing effect.

Based on the above-mentioned data, in this work, a novel type of PHB-based biomaterial with the high surface area using a wet-spinning technique was described. Further, the functionalization of such material by natural antimicrobial compounds was tested to receive new promising biomaterial with optimal and controlled release applicable in many different areas of interest.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Poly-3-(R)-hydroxybutyrate was obtained from company Nafigate Corp (Prague, Czech Republic) with molecular weights of M_w 600 kDa and M_n 450 kDa (GPC). Chloroform (pure) and ethanol (96%) were purchased from Penta (Prague, Czech Republic) and used as received. For setting up the spinning equipment, the New Era Scientific syringe pump was used. The syringe was provided by a long needle with a diameter of 0.8 mm and 200 mm length (Figure 1).

2.2. Preparation of Fibers by Wet Spinning

PHB was dissolved in heated chloroform during stirring in a closed vial to obtain concentrations in the range of 1–10 wt.% (1, 3, 5, 7.5, and 10 wt.%). Solutions were transferred to the syringe and were pushed out through nozzle to precipitation bath made from ethanol on ambient or cooled temperature. Precipitation bath had to be in a graduated tall cylinder to extend the path of fiber precipitation (Figure 1). Various rates of feed were tested from 0.5 to 15 mL·min⁻¹ in various combinations. In cases where fibrous structures were obtained, the material was taken out from the bath, dried on-air, and analyzed by electron microscopy (BET) and nitrogen absorption method (according Brunauer-Emmett-Teller (BET) theory). Some testing material was also analyzed by DSC to obtain the crystallinity of precipitated fiber.

2.3. Characterization of Fibrous Materials

For the characterization of fibrous material, electron microscopy VERSA 3D (FEI Co., Brno, Czech Republic) was used where acceleration voltage was 3 kV, and the regime of detection was set to secondary electrons. All samples were coated with a platinum layer with a thickness of 5 nm. The average diameter of fibers was obtained as an arithmetic mean of ten measurements of thickness on different locations on continuous fiber. In the case of irregular shape (e.g., oval), both maximal and minimal thickness was measured and calculated. Measurement, calculation of average diameter, and the standard deviation were obtained via ImageJ software (1.51, Wayne Rasband, USA). For thermal stability, differential scanning calorimetry was performed using DSC2920 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) with a 10 K/min heating regime. Specific surface area screening was determined by the BET method using nitrogen as gaseous adsorbate and performed on the Quantachrome Autosorb-1 porosimeter (Quantachrome, Odelzhausen, Germany). Detailed measurement of pore diameter, specific surface area, and pore size distribution, including adsorption-desorption isotherm, was performed additionally on Quantachrome Nova Station A porosimeter (Quantachrome, Odelzhausen, Germany) using also nitrogen as the gaseous adsorbate. Initial desorption of ambient gases and water vapor removal was done at 100 °C.

2.4. Functionalization of PHB Fibers by Natural Plant Extracts

Four types of plant extracts were used for incorporation into PHB fibers newly prepared by the wet spinning of 5% PHB with a feed rate of 0.5 mL·h⁻¹. As model plant materials, water and oil extracts of cinnamon, cloves, oregano, and oak bark were used. Water extracts were prepared by extraction of 1 g of material in 100 ml hot water for 15 min, followed by filtration and centrifugation. Oil extracts were prepared by Folch extraction (chloroform:methanol; 2:1) according to [27], dissolved in chloroform, and stored in darkness at 4 °C. Totals phenolics [28] and antioxidant activity [29] were

determined by spectrophotometry. Antimicrobial activity was evaluated according to [26]. Fibers were exposed to water and oil extracts for 24 h at laboratory temperature and darkness. Incorporation of natural extracts into PHB fibers was characterized by FT-IR in attenuated total reflection mode with a single-reflection diamond crystal using a Nicolet iS50 spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to [26].

Plant extracts loaded in PHB fibers (100 mg) were poured in 2 ml of water. The vials were stored at laboratory temperature. Short-term stability was measured by phenolics [28] release from PHB fibers for 5, 10, 20, 30, and 60 min. The release data were presented as the average value with the standard deviation ($n = 3$). Long-term stability was measured after 2 months of storage of dried functionalized fibers at laboratory temperature in darkness as a change of antioxidant activity [29]. The antimicrobial activity of functionalized PHB fibers prepared by wet spinning was tested against gram-positive bacterium *Micrococcus luteus* CCM 1569, gram-negative bacterium *Serratia marcescens* CCM 8587, and yeast *Candida glabrata* CCM 8270. For the antimicrobial testing, dilution tests were conducted according to [30]. Test microorganisms (150 μ L) were cultivated in 96-well microtitration plate in the presence of 10 mg of functionalized fibers in 50 μ L of water for 24 h. The absorbance of the wells was measured using ELISA reader (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany) at 630 nm, before and after 24 h incubation at 37 $^{\circ}$ C. As a blank, 150 μ L of culture with 50 μ L of water was used. Each sample was tested in triplicate, and the average value with the standard deviation ($n = 3$) was presented.

3. Results

3.1. Wet Spinning

Fiber products were characterized by SEM for analysis of morphology differences and by BET to obtain specific surface area. Crystallinity was determined by comparison of measured heat enthalpy 87.56 $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figure 2) and reference value 146 $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ [26]. By dividing those numbers, we could obtain a resulting crystallinity of 60%, according to Equation (1).

$$X_{DSC} = \frac{\Delta H_w}{\Delta H_w^0} \times 100\% \quad (1)$$

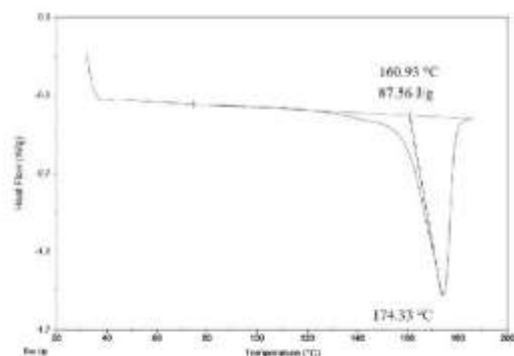


Figure 2. DSC measurement of precipitated fiber (3 wt.%; 3 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$).

The development of the wet spinning method started with the idea of the performance of classical wet spinning, where the spun polymer has to be in the form of a stable solution. Polyhydroxybutyrate is soluble in halogenated solvents, where the most used one is chloroform. PHB is insoluble in other common solvents, or thermo-reversible gel is formed. We found that the solution above 10 wt.% was challenging to obtain due to high viscosity and undissolved residues of polymer in the final solution.

Therefore, only 10 wt.% and lower concentrated solutions were prepared. For the production needs, it was necessary to achieve the maximum rate in the fiber-forming process. Due to that, the influence of PHB concentration and feed rate of the solution on the precipitation bath were studied. In the case of spinning of 1 wt.% solution at a feed rate of 0.5 ml/h, no fiber precipitation was observed (Table 1). The stream of the solution was just diluted, and the white dust of particles was formed. With a feed speed of 1 ml.h⁻¹, the stream of the solution was steady enough to form protofibril, which precipitated continuous fiber (Figure 3). Higher speed, however, did not result in the formation of protofibril, and the stream was decomposed to small fibrils and beads, which were not collected. More useful concentrations for the fiber-forming process started with 3 wt.%. A gradual increase of specific surface was possible to observe also with feeding speed up to 3 ml.h⁻¹ (Figure 4A,AD). Faster speed resulted in fibrils and beads, as in the previous case. A higher concentration of polymer in the solution formed a viscous liquid that was capable of spun from the lowest speed rate, which resulted in the highest formed specific surface area of 55 m².g⁻¹ (Table 1, Figure 4B,BD). It was challenging to observe specific trends in measured surface areas, depending on the chosen variables of the process. In all measured cases, we observed surface areas in the region of tens of square meters per gram. A higher concentration of PHB and higher speed led to the production of fibers with a very porous surface (Figure 4C,CD); however, the specific surface was lower than in previous cases. The most concentrated PHB solution led to the production of fiber only at higher feed rate due to clogging of needle and precipitation of polymer in the form of a bulky amorphous object on the tip of the needle. However, when faster feed rate was set, a continuous stream of the solution was formed, and during the path in ethanol bath fiber, precipitation was observed (Figure 4D,DD).

Table 1. Screening of specific surface areas of prepared samples (BET) [m².g⁻¹].

Conc. (wt.%)	1	3	5	7.5	10
0.5	N.A.	23	55	N.A.	N.A.
1	0*	17	36	16	N.A.
2		18	15	15	N.A.
3		43	20	21	29
5			17	23	13
8			16	28	34
10				11	17
15					25

Note: Low (approx. 10 mg) amount of fibrous material was used for analysis. *—material was found nonporous according to BET; however, SEM measurement showed the porous bulk structure. N.A.—the process of precipitation resulted in particles or didn't form fiber that was possible to collect.

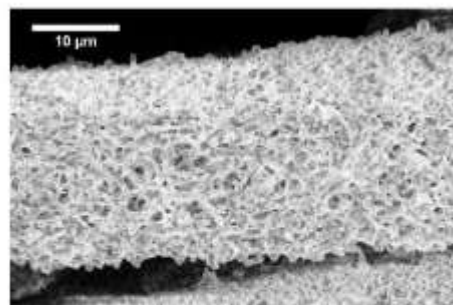


Figure 3. Fiber formed from 1 wt.% solution with 0.5 ml.h⁻¹ feed rate.

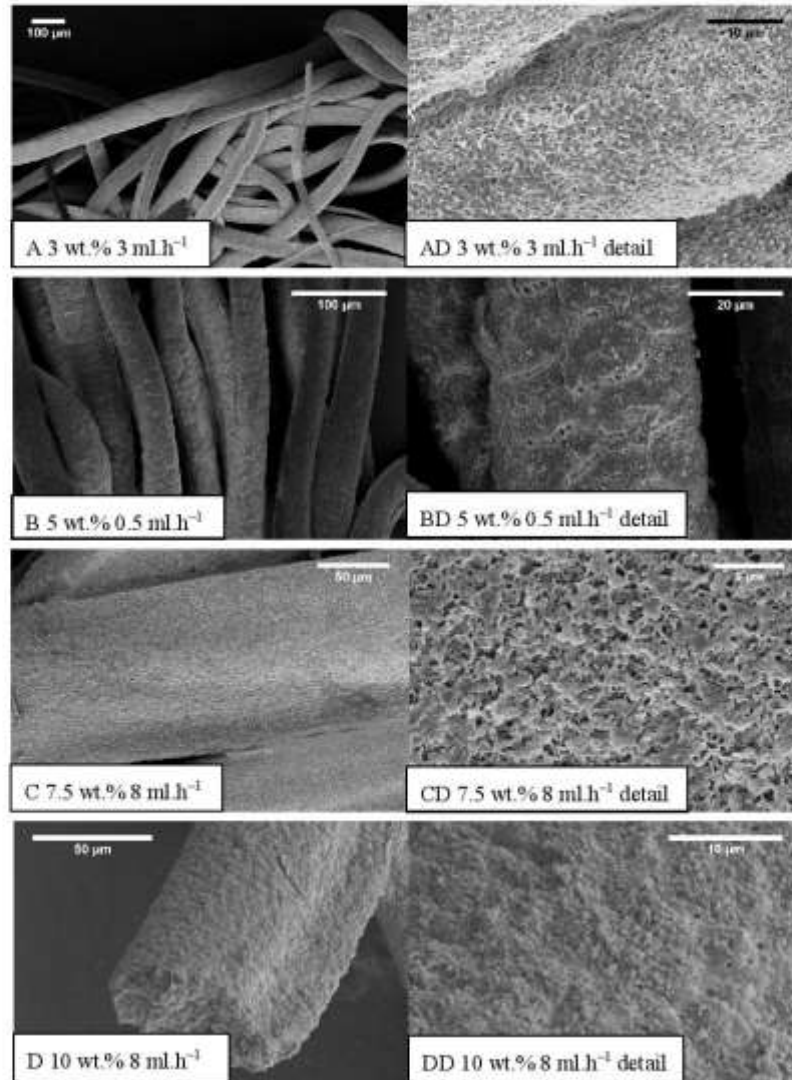


Figure 4. Example SEM images of prepared samples (concentration (wt.%) feed rate (ml.h^{-1})), (A–D) the standard magnitude with an overall picture of fibers, (AD–DD) detailed measurements.

Obtained specific surface areas (Table 1) should be taken as screening results due to the smaller amount of prepared material. Approximately 10 milligrams were analyzed, which could lead to a higher error of the obtained results. Faster feeding didn't result in fibrous morphologies, especially in low concentrated PHB solutions. Highly concentrated solutions formed fibers only with faster feed speed because of the high viscosity of those solutions, causing the formation of big precipitated lump on the tip of the needle. When optimum velocity set up on the pump was used, the stream of the solution was released and felt down, and a long protofibril was formed, which precipitated around 15–20 cm far from the tip of the needle. By summarizing the results of the study, it was possible to say

that for the production of material with a higher specific surface area, the best conditions were: 5 wt.% and very slow speed of 0.5 ml.h^{-1} (Figure 4B,BD). However, with doubling the PHB concentration and using the speed of 15 ml.h^{-1} , it was possible to obtain a satisfying result with a lower surface area, but with a much higher production rate. Based on the described production window, it was clear that with higher concentration, it was necessary to increase the feed rate due to the clogging of the nozzle. However, with an increase in speed, it was observed a prolonged area of protofibril formation before precipitation. Due to that effect, it was not possible to study a higher speed with a 10 wt.% solution because of the setup. Based on this observation, we could assume that a bigger precipitation bath with longer precipitation could lead to possible higher production rates. Photography of example prepared material is shown in Figure 5.



Figure 5. Photography of sample 3 wt.% and 3 ml.h^{-1} detail.

3.2. Characterization of Fibrous Material

The average diameter of fibers had an increasing trend with speeding up the syringe pump in most of the cases except 10 wt.% of PHB, where increased feeding speed resulted in a decrease in average fiber diameter (Table 2). It was most probably due to the higher viscosity of the sample and also the higher mass of the initial solution droplet, which goes faster towards the bottom of the precipitation bath. In most cases, fibrous morphology was not regular round but the oval (e.g., Figure 4D). In such cases, the average diameter was measured from two axes, and, therefore, the standard deviation was bigger.

Table 2. Average diameter of fiber (μm).

Conc. (wt.%)	1	3	5	7.5	10
0.5	N.A.	41 ± 18	40 ± 6	N.A.	N.A.
1	19 ± 2	40 ± 7	46 ± 10	29 ± 15	N.A.
2		53 ± 6	51 ± 7	56 ± 9	N.A.
3		58 ± 11	63 ± 11	66 ± 11	136 ± 12
5			74 ± 3	69 ± 12	86 ± 10
8			75 ± 22	119 ± 22	72 ± 15
10					72 ± 10
15					83 ± 10

The values of surface area were in the range of tens of square meters per gram of fibers in most measured cases.

After preliminary screening of specific surface area (Table 1) and obtaining morphology data by SEM (Figures 3 and 4), a higher amount of material was prepared to measure whole adsorption/desorption isotherms (Figure 6). Additionally, to BET measurement, density function theory (DFT) and Barrett, Joyner, and Halenda (BJH) calculations were done to the more precise determination of average pore diameter and pore size distribution. Results of measured surface area, average pore diameter, and total pore volume at selected conditions are introduced in Table 3. Measurements were performed using two types of equipment. The first one (Quantachrome Autosorb-1 porosimeter; Quantachrome, GER) was the same as in the previous screening of BET surface area measurement (Table 1). The second one (Quantachrome Nova Station A porosimeter; Quantachrome, GER) provided also additional BJH and DFT results (Table 3). From those results, we could see some differences between the two measured data sets. Therefore, the method of production could be considered as less reproducible regarding the obtained surface area. However, still, the reasonable surface area was achieved even in large samples.

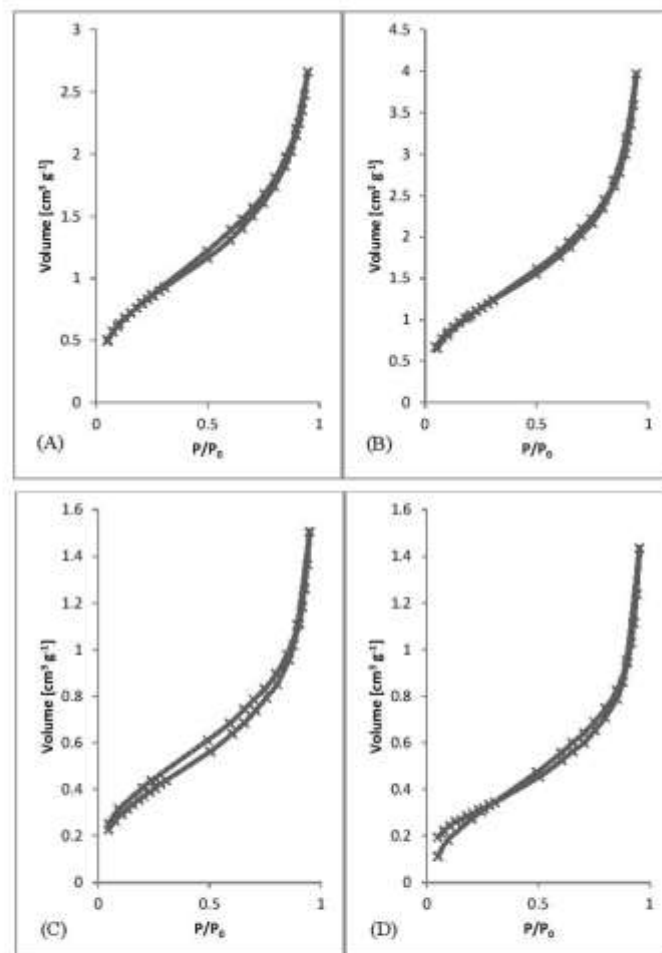


Figure 6. Adsorption/desorption Isotherms. (A) 3 wt.%; 3 mL.h⁻¹, (B) 5 wt.%; 0.5 mL.h⁻¹, (C) 7.5 wt.%; 8 mL.h⁻¹, (D) 10 wt.%; 8 mL.h⁻¹.

Table 3. Detailed analysis of fibrous materials prepared by different conditions.

Sample/Measurement	3 wt.%; 3 mLh ⁻¹	5 wt.%; 0.5 mLh ⁻¹	7.5 wt.%; 8 mLh ⁻¹	10 wt.%; 8 mLh ⁻¹
Surface area BET ⁰ [m ² .g ⁻¹]	43	55	28	34
Surface area BET ¹ [m ² .g ⁻¹]	16.1	25.1	15.2	8.5
Surface area BET ² [m ² .g ⁻¹]	18.5	28	14.7	11.5
Surface area BJH ² [m ² .g ⁻¹]	25.8	38.4	21.3	22.9
Surface area DFT ² [m ² .g ⁻¹]	12	18.3	10	7.6
Pore diameter BJH ² [nm]	1.4	1.4	1.4	1.4
Pore diameter DFT ² [nm]	5.6	6.3	6.5	8.2

⁰—BET analysis by Quantachrome Autosorb-1 porosimeter—screening from Table 1. ¹—BET analysis by Quantachrome Autosorb-1 porosimeter. ²—BET analysis by Quantachrome Nova Station A porosimeter.

From SEM micrographs (Figures 3 and 4), it is visible that pores of obtained material were in the range of sub-micro- to micrometer scale. However, more detailed BET and DFT analysis showed that surface areas formed by nanopores were also present (Figure 7). From the shape of isotherms, we could estimate that the adsorption/desorption mechanism was mostly responsible for the isotherm type III, which corresponded to mesoporous materials (Figure 6). By combining this information from gas adsorption measurement and SEM analysis, we could say that novel material had both characteristics of mesoporous (2–50 nm, according to DFT and BET)/microporous (<2 nm, according to BJH, DFT, histograms) and macroporous (>50 nm, according to SEM) material families.

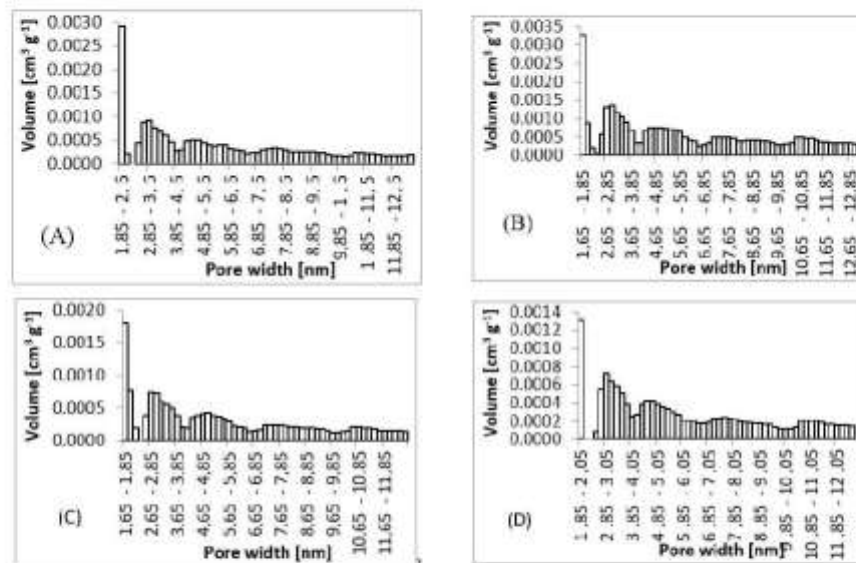


Figure 7. Pore size histograms. (A) 3 wt.%; 3 mLh⁻¹, (B) 5 wt.%; 0.5 mLh⁻¹, (C) 7.5 wt.%; 8 mLh⁻¹, (D) 10 wt.%; 8 mLh⁻¹.

3.3. Functionalization of Fibrous Material by Natural Extracts

As model natural antimicrobial substances, extracts from cloves, cinnamon, oregano, and oak bark were prepared and tested according to Section 2.4. Total phenolic and antioxidant activity of these extracts were analyzed to characterize their potential biological activity. The data obtained are introduced in Table 4.

Table 4. Characteristics of extracts and adsorption capacity to PHB (polyhydroxybutyrate) fibers.

Extract	Phenolics mg/g of Plant Material		ABTS* mg of Trolox/g of Plant Material		Absorption Efficiency % ABTS/100 mg of Fibres	
	Water	Oil	Water	Oil	Water	Oil
Cinnamon	7.5 ± 0.8	43.8 ± 1.3	34.2 ± 1.3	13.3 ± 0.8	41.5 ± 2.3	
Cloves	11.6 ± 0.8	65.2 ± 2.2	14.1 ± 1.2	6.9 ± 0.6	95.1 ± 5.2	
Oregano	37.5 ± 1.7	32.5 ± 1.2	37.5 ± 1.8	14.8 ± 1.1	35.8 ± 1.9	
Oak bark	34.1 ± 1.3	11.6 ± 0.7	32.2 ± 0.8	15.3 ± 1.1	32.5 ± 0.9	

*—2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

Data introduced in Table 4 indicate that used plant extracts contained a high amount of total phenolic compounds. Some of them were better soluble in water, the other in oil extracts. Antioxidant activity of both water and oil extracts was also high in most of the samples, especially in water extracts. No direct correlation between phenolics content and antioxidant activity was found. The absorption efficiency of oil extracts incubated for 24 h with PHB fibers (see 2.4) was in the range of 32%–95%, and the highest adsorption activity to PHB fibers was found in cloves extract.

Fourier transform infrared spectroscopic method with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) technique was used for verification that plant extracts were incorporated into the structure of PHB fibers. Absorbance was measured in the frequency range 4000–500 cm^{-1} with a resolution of 8 cm^{-1} . Significant differences between individual samples of functionalized fibers were found in the range of 3100–2800 cm^{-1} . Spectra of all samples are presented in Figure 8.

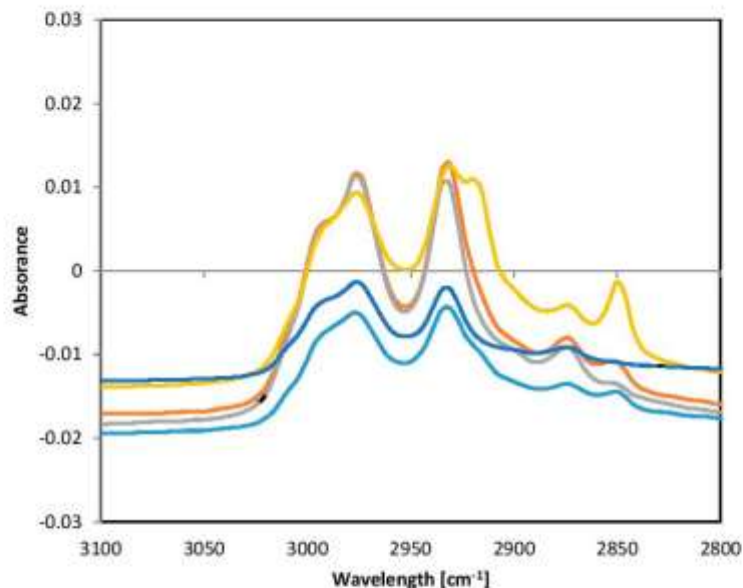


Figure 8. FTIR-ATR spectra of PHB fibers with incorporated plant oil extracts. Note: blue—pure PHB fibers, turquoise—PHB + oak bark, red—PHB + cinnamon, green—PHB + cloves, violet—PHB + oregano.

The frequency range of 4000–2500 cm^{-1} corresponded to stretching vibrations of hydrogen bonds in organic compounds, especially C-H, O-H, and N-H. The frequency range of 3300–2700 cm^{-1} could be assigned to C-H bonds. The band 2850 cm^{-1} corresponded to C-H stretching in aldehyde groups [31]. Lipid extracts isolated from natural sources are complex mixtures of different compounds, such as alcohols, ethers, ketones, aldehydes, esters, amines, phenols, etc. [32]. The differences in the spectra

of the fibers alone and fibers with extracts showed that some active substances were bound to PHB fibers. The differences in the peak 2850 cm^{-1} indicated that some aldehydes from oil extracts were incorporated into PHB fibers.

Functionalized PHB fibers were stored for evaluation of a long-time (2 months) stability. Samples were stored in dried form according to Section 2.4. Dried samples were then solubilized in water and water:oil emulsion. After 2 months, only marginal changes in antioxidant activity were found no higher than 4%–8% of the original value measured in freshly prepared fibers.

Short-term stability and release of active compounds were evaluated during 60 min in regular intervals (see Section 2.4). Data were evaluated as a percentage of released total phenolics per time interval from two parallel samples. The complete data set is introduced in Table 5. Short-term stability was strongly dependent on plant material type. After 60 min, 25%–91% of phenolics were released to the water environment, and 28%–82 % to the emulsion, which was more acceptable in topical preparations. The relatively rapid release of some extracts was very important for their biological effect.

Table 5. Short-term stability and release of phenolics from fibers in water and emulsion.

Extract	Water (% of Phenolic Release)					Microemulsion (Phenolic Release %)				
	5	10	20	30	60	5	10	20	30	60
Cinnamon	47.2	62.4	83.5	86.1	91.5	29.3	41	61.9	68.4	82.6
Cloves	34.6	62.9	67.1	71.6	86.8	28.3	54.2	52.7	61.2	71.4
Oregano	21	22.7	27.5	30.4	34.5	-	5.1	9.6	24.7	28.8
Oak bark	7.4	11.5	15.7	15.8	25.8	9.8	16.8	30	40.7	61

Note: Data are expressed as a mean of two parallel analyses.

All tested functionalized fibers with adsorbed water, as well as oil extracts, exhibited distinctive antimicrobial effects. Inhibition of microbial growth was observed in G+ and G− bacteria (G+/- for Gram positive/negative). Moreover, the antimycotic effect against test yeast strain *Candida glabrata* was found, especially in cinnamon and cloves extracts (Table 6). The intensity was dependent on the plant material type and extraction agent. The highest antibacterial effect against both G+ and G− bacteria was found in PHB material with cloves extract. This extract exhibited also the highest antimycotic effect. It should be highlighted that especially oil extracts of all tested plants acted as antibacterial agents with a broad spectrum of activity. Interestingly, the PHB fibers with oil extracts displayed similar efficiency against the gram-negative bacteria compared to gram-positive bacteria. Therefore, these PHB fibers with plant extracts seemed to be highly promising for tissue engineering, medical, and pharmaceutical applications.

Table 6. Antimicrobial effect of functionalized fibers.

Extract	<i>C. glabrata</i> (% of Cell Count Decrease = % of Antimicrobial Effect)		<i>M. luteus</i> (% of Cell Count Decrease = % of Antimicrobial Effect)		<i>S. marcescens</i> (% of Cell Count Decrease = % of Antimicrobial Effect)	
	Water	Oil	Water	Oil	Water	Oil
Cinnamon	16 ± 0.8	50.2 ± 3.3	8 ± 0.6	73.2 ± 4.6	37.1 ± 1.5	53.5 ± 4.3
Cloves	21.5 ± 1.8	58.5 ± 3.1	47.5 ± 3.1	56.6 ± 3.1	42.9 ± 2.2	62.9 ± 5.6
Oregano	30.8 ± 2.5	4.3 ± 0.8	42.2 ± 7	39.1 ± 1.8	-	32 ± 2.3
Oak bark	35.4 ± 2.8	25.2 ± 1.6	8 ± 0.5	13 ± 0.9	17.1 ± 1.4	43.7 ± 2.2
none		1.2 ± 0.1		3 ± 0.2		2.4 ± 0.1

4. Discussion

A series of fibrous materials were prepared by simplified wet spinning from chloroform solution of poly-3-(R)-hydroxybutyrate precipitated through a syringe to ethanol precipitation bath. Materials were collected and analyzed by SEM and BET. First, preliminary BET analysis was performed, obtaining results for specific surface area. Using this screening together with electron microscopy

analysis, the average diameter of fibers was measured. According to those results, several conditions were selected to prepare a large quantity of desired material and studied it further by nitrogen absorption-desorption porosimetry and also again by electron microscopy. By preparing a larger amount of materials, it was possible to measure whole absorption-desorption curves and distribution of pores. For the overall information on prepared materials, photography was taken to show wool-like morphology.

Wet spinning [23] belongs to traditional spinning techniques. Nowadays, it is mostly used during the production of carbon fibers based on polyacrylonitrile precursor fibers. Wet spinning is based on continuous precipitation of polymer from an appropriate solution where a solvent is miscible with precipitation bath, and the polymer is not soluble in the bath [23]. Pores of newly obtained material are in the range of sub-micro- to micrometer scale; however, surface areas formed by nanopores are also present. Adsorption/desorption mechanism is mostly responsible for the isotherm type III, which corresponds to mesoporous materials. By combining this information from gas adsorption measurement and SEM analysis, we could say that novel material had both characteristics of mesoporous/microporous and macroporous material families. The high specific surface area of newly produced fibrous material is an important characteristic of future applications. As the optimum conditions for fibers with a higher specific surface, 5 wt.% of PHB and speed of $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ were found. These conditions were used for the preparation of a high amount of fibrous material for testing of functionalization and biological properties.

Natural antimicrobial substances, especially phenolic compounds, can be used as stand-alone or adjunctive therapies with antibiotics. The use of essential oils or other plant extracts may exert synergistic antimicrobial activity [31]. However, there are certain limitations, such as low water solubility and low stability. Adsorption of natural antimicrobials to biodegradable nanofibers might help to increase these components' chemical stability, and solubility also supports controlled and sustained release, enhancing the bioavailability and efficiency against pathogens [32]. So, the antimicrobial efficiency against microorganisms was tested using newly prepared PHA (polyhydroxyalkanoates) nanofibers functionalized by some natural antimicrobials.

All tested PHB fibers with plant extracts showed distinctive antimicrobial activity against the gram-positive bacterium (*M. luteus*), gram-negative bacteria (*S. marcescens*), and the yeast *Candida glabrata*. The antimicrobial efficiency corresponded with the type of entrapped extract. The dynamics of the release of active compounds is probably strongly related to the morphology of the newly prepared PHB fibers [33]. In comparison with our previous study, the release of the antimicrobial drug from electrospun meshes was substantially slower [26]. It should be highlighted that a high specific surface area was probably responsible for a relatively high degree of adsorption (namely in cloves extract) and also for the short-term release of active compounds (50%–90% during 20–60 min) into an environment similar to the skin surface (emulsion). Together with the excellent long-term stability of functionalized PHB fibers, this material seemed to be highly promising for skin covering, wound healing, and supporting therapy of bacterial and fungal infections [34]. Another application of such fibrous material could be in food packaging as antimicrobial adsorption material.

5. Conclusions

In this work, a novel porous material with a relatively high specific surface area was prepared by a simple and versatile method of gravity-driven wet spinning of a chloroform solution of PHB into a precipitation bath of ethanol. Such type of material based on PHB was not described yet. The described method of preparation could be possibly enhanced and extended towards multifilament production, which can find application as a material for sorption or drug release. Obtained fibers exhibited diameter in the range of tens of micrometers and internal pores in the range covering macro- to a microscopic scale. Obtained specific surface areas were in the range of tens of $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$. Application potential was verified by the functionalization of newly prepared fibers by antimicrobial natural extracts. Significant antibacterial and antimycotic effects were found in all types of functionalized fibers, especially in oil

extract from cloves. Excellent long-term stability and controlled release of active compounds in the optimum period were probably dependent on specific morphology and high skin surface area of new PHB fibers prepared by wet spinning. The properties of produced novel porous material could predict its broad use as scaffold or carrier for active compounds, such as drugs, enzymes, and additives in pharmacy, cosmetics, and wound healing applications.

Author Contributions: Conceptualization, validation, investigation, writing, review and editing, V.K.; Investigation, P.M.; Supervision, writing, review and editing, I.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the project Nr FCH-S-19-5983 of the Brno University of Technology, Brno, Czech Republic.

Acknowledgments: Authors are highly grateful to Tomas Opravil and Zdenek Moravec for BET analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.


References

1. Abdul Khalil, H.P.S.; Banerjee, A.; Saurabh, C.K.; Tye, Y.Y.; Suriani, A.B.; Mohamed, A.; Karim, A.A.; Rizal, S.; Paridah, M.T. Biodegradable Films for Fruits and Vegetable Packaging Application: Preparation and Properties. *Food Eng. Rev.* **2018**, *10*, 139–153. [\[CrossRef\]](#)
2. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. Synthesis, structure, and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 1503–1555. [\[CrossRef\]](#)
3. Chen, G.-Q.; Wu, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6565–6578. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Chen, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2434. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 233–247. [\[CrossRef\]](#)
6. Verlinden, R.A.; Hill, D.J.; Kenward, M.A.; Williams, C.D.; Piotrowska-Seget, Z.; Radecka, I.K. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express* **2011**, *1*, 11. [\[CrossRef\]](#)
7. Mandolesi de Araújo, C.D.; de Andrade, C.C.; de Souza e Silva, E.; Dupas, F.A. Biodiesel production from used cooking oil: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2013**, *27*, 445–452. [\[CrossRef\]](#)
8. Yu, L.; Dean, K.; Li, L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 576–602. [\[CrossRef\]](#)
9. Godbole, S. Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate–starch blend films. *Bioresour. Technol.* **2003**, *86*, 33–37. [\[CrossRef\]](#)
10. Singh, S.; Mohanty, A. Wood fiber reinforced bacterial bioplastic composites: Fabrication and performance evaluation. *Compos. Sci. Technol.* **2007**, *67*, 1753–1763. [\[CrossRef\]](#)
11. Misra, S.K.; Valappil, S.P.; Roy, I.; Boccacini, A.R. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2249–2258. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Horowitz, D.M.; Sanders, J.K.M. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: Preparation, characterization, and biological implications. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2695–2702. [\[CrossRef\]](#)
13. Ito, Y.; Hasuda, H.; Kamitakahara, M.; Ohtsuki, C.; Tanihara, M.; Kang, I.-K.; Kwon, O.H. A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *100*, 43–49. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Yamane, H.; Terao, K.; Hiki, S.; Kimura, Y. Mechanical properties and higher order structure of bacterial homo poly(3-hydroxybutyrate) melt spun fibers. *Polymer* **2001**, *42*, 3241–3248. [\[CrossRef\]](#)
15. Nicosia, A.; Gieparda, W.; Foksowicz-Flaczyk, J.; Walentowska, J.; Wesolek, D.; Vazquez, B.; Prodi, F.; Belosi, F. Air filtration and antimicrobial capabilities of electrospun PLA/PHB containing ionic liquid. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *154*, 154–160. [\[CrossRef\]](#)
16. Kuusipalo, J. PHB/V in Extrusion Coating of Paper and Paperboard: Part I: Study of Functional Properties. *J. Polym. Environ.* **2000**, *8*, 39–47. [\[CrossRef\]](#)

17. Da Silva-Valenzuela, M.G.; Wang, S.H.; Wiebeck, H.; Valenzuela-Diaz, F.R. Nanocomposite Microcapsules from Powders of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Smectite Clays. *Mater. Sci. Forum* **2010**, *660–661*, 794–798. [CrossRef]
18. Rhim, J.-W.; Park, H.-M.; Ha, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 1629–1652. [CrossRef]
19. Wu, Q.; Wang, Y.; Chen, G.-Q. Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2009**, *37*, 1–12. [CrossRef]
20. Rivera-Briso, A.; Serrano-Aroca, A. Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications. *Polymers* **2018**, *10*, 732. [CrossRef]
21. Gogolewski, S.; Jovanovic, M.; Perren, S.M.; Dillon, J.G.; Hughes, M.K. The effect of melt-processing on the degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides, polyhydroxybutyrate, and polyhydroxybutyrate-co-valerates. *Polym. Degrad. Stab.* **1993**, *40*, 313–322. [CrossRef]
22. Chiono, V.; Ciardelli, G.; Vozzi, G.; Sotgiu, M.G.; Vinci, B.; Domenici, C.; Giusti, P. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(ϵ -caprolactone) blends for tissue engineering applications in the form of hollow fibers. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *85*, 938–953. [CrossRef] [PubMed]
23. Zhang, D. *Advances in Filament Yarn Spinning of Textiles and Polymers*; Association with the Textile Institute; Woodhead Publishing Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2014; 210p.
24. Qin, Y. *An Overview of Medical Textile Products. Medical Textile Materials*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Available online: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081006184000029> (accessed on 21 July 2019).
25. Mota, C.; Wang, S.; Puppi, D.; Gazzari, M.; Migone, C.; Chiellini, F.; Chen, G.Q.; Chiellini, E. Additive manufacturing of poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate] scaffolds for engineered bone development. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *11*, 175–186. [CrossRef] [PubMed]
26. Kundrat, V.; Cemekova, N.; Kovalcik, A.; Enev, V.; Marova, I. Drug Release Kinetics of Electrospun PHB Meshes. *Materials* **2019**, *12*, 1924. [CrossRef] [PubMed]
27. Cheirsilp, B.; Louhasakul, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 329–337. [CrossRef]
28. Ramon-Goncalves, M.; Gomez-Mejia, E.; Rosales-Conrado, N.; Leon-Gonzalez, M.E.; Madrid, Y. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. *Waste Manag.* **2019**, *96*, 15–24. [CrossRef]
29. Re, R.; Pellegrini, N.; Prottogente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [CrossRef]
30. Matouskova, P.; Marova, I.; Bokrova, J.; Benesova, P. Effect of Encapsulation of Antimicrobial Activity of Herbal Extracts with Lysozyme. *Food Technol. Biotechnol.* **2016**, *54*, 304–316. [CrossRef]
31. Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R.A., Ed.; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 2000; pp. 10815–10837.
32. Sepahpour, S.; Selamat, J.; Abdul Manap, M.; Khatib, A.; Abdull Razis, A. Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems. *Molecules* **2018**, *23*, 402. [CrossRef]
33. Fan, X.; Jiang, Q.; Sun, Z.; Li, G.; Ren, X.; Liang, J.; Huang, T. Preparation and characterization of electrospun antimicrobial fibrous membranes based on polyhydroxybutyrate (PHB). *Fibers Polym.* **2015**, *16*, 1751–1758. [CrossRef]
34. Yilmaz, F.; Celep, G.; Tetik, G. Nanofibers in Cosmetics. In *Nanofiber Research*; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2016.



PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA  ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	(21) Číslo přihlášky	2015-790	(11) Číslo dokumentu:	306 448
	(22) Přihlášeno	06.11.2015	(13) Druh dokumentu: B6	
	(40) Zveřejněno: (Věstník č. 4/2017)	25.01.2017	(51) Int. Cl.:	
	(47) Uděleno:	14.12.2016	D01D 5/06	(2006.01)
	(24) Oznámení o udělení ve věstníku: (Věstník č. 4/2017)	25.01.2017	C08G 63/02	(2006.01)
			C08G 63/08	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
 S Vju et al.: "Preparation and properties of PLLA/PLCL fibres for potential use as a monofilament suture" The Journal of The Textile Institute 101(9), 835-841, 2010; B. Azimi et al.: "Poly(ϵ -caprolactone) Fiber: An Overview" Journal of Engineered Fibers and Fabrics 9(3) s. 74-90 (2014); B. Gupta et al.: "Poly(lactic acid) fiber: An overview" Prog. Polym. Sci. 32, 455-482 (2007); S. Zhu et al.: "Study on the Morphologies and Formational Mechanism of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Ultrafine Fibers by Dry-Jet-Wet-Electrospinning", Journal of Nanomaterials Vol. 2012, Article ID 525419
 DOI: 10.1155/2012/525419; POLY(LACTIC ACID) Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications (R. Auras et al Eds.) Wiley, Hoboken 2010 ISBN 978-0-470-29366-9 (cloth)
[https://books.google.de/books?id=UBUdo_mhr6AC&pg=PA59&dq=poly\(lactic+synthesis+structures+properties+applications&source=bl&ots=IDCnlHu5eVII&sig=VXek54myLo71nT0sScWlSKlKE&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKew7r77m5ZLNahJGvxQKH1GjAheQ6AF1YTAH#v=onepage&q=335&f=false](https://books.google.de/books?id=UBUdo_mhr6AC&pg=PA59&dq=poly(lactic+synthesis+structures+properties+applications&source=bl&ots=IDCnlHu5eVII&sig=VXek54myLo71nT0sScWlSKlKE&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKew7r77m5ZLNahJGvxQKH1GjAheQ6AF1YTAH#v=onepage&q=335&f=false)
 ; M. R. Williamson, A.G.A.Coomes et al.: "Gravity spinning of polycaprolactone fibres for application in tissue engineering" Biomaterials 25, 459-465 (2004).
 WO 2012/047100 A1.

(73) Majitel patentu:
 Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ

(72) Původce:
 prof. RNDr. Ivana Márová, CSc., Brno - Bystřice, CZ
 Vojtěch Kundrát, Ostrava - Moravská Ostrava, CZ
 RNDr. Ladislav Pospíšil, CSc., Brno, CZ

(54) Název vynálezu:
Polymerní vlákno a způsob jeho výroby

(57) Anotace:
 Způsob výroby polymerního vlákna z polyhydroxybutyrátu nebo kopolymery hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem zvlákněním z roztoku polymeru v rozpouštědle vytlačovaného do srážedla, kde množství hydroxyvalerátu v kopolymery hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem činí maximálně 30 % hmotn., zvlákněný polymer nebo kopolymer má hmotnostně střední molekulovou hmotnost 50000 až 1000000 Da, srážedlem jsou alkoholy s teplotou tuhnutí vyšší než -70 °C a koncentrací minimálně 75 % hmotn., rozpouštědlem polymeru nebo kopolymery je chloroform, dichloretan a/nebo dichlormethan, přičemž koncentrace polymeru nebo kopolymery v rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel je 0,1 až 20 % hmotn., teplota roztoku polyhydroxybutyrátu nebo kopolymery hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem je v rozmezí 0 °C až 50 °C a teplota srážedla je v rozmezí -70 °C až 70 °C.

CZ 306448 B6

Polymerní vlákno a způsob jeho výroby

Oblast techniky

Vynález se týká polymerů obsahujících v hlavním řetězci heteroatomy kyslíku a patřících do kategorie polyesterů a způsobu přípravy vláken se submikronovou strukturou postupem zvláknění z roztoku těchto polymerů.

Dosavadní stav techniky

Polyestery, hlavně pak polyethyltereftalát (PETP), jsou polymery, jejichž použití pro výrobu vláken je známo již mnoho desetiletí. PETP je v současnosti nejrozšířenějším polymerem používaným k výrobě vláken. PETP, stejně jako polyamidy (PA), jsou nyní průmyslově zvláknovány výhradně z taveniny.

V posledních zhruba 25 letech je vyvíjeno úsilí o to, aby byly využívány v praxi i jiné druhy polyesterů, zvláště pak těch, které lze zařadit do kategorie polymerů vyráběných člověkem či jinými živými organismy z obnovitelných přírodních zdrojů. Toho lze v případě PETP docílit pouze částečně tak, že ethylenglykol použitý v jeho syntéze, je vyráběn postupem, vycházejícím z látek patřících do skupiny sacharidů. Příkladem jsou sacharóza a škrob.

Polyestery, které lze zařadit do kategorie polymerů vyráběných člověkem či jinými živými organismy z obnovitelných přírodních zdrojů obvykle patří do kategorie biodegradovatelných materiálů. Mezi biodegradovatelné materiály ovšem patří i polymery vyrobené ze surovin neobnovitelných, například polykaprolakton (PCL).

Z hlediska vyráběného množství je v současnosti nejvíce rozšířeným polymerem vyráběným člověkem či jinými živými organismy z obnovitelných přírodních zdrojů kyselina polymléčná (PLA). Na významu nyní nabývá i polyhydroxybutyrát (PHB). Jeho biotechnologická příprava je popsána např. v patentu CZ 304 183 a patentové přihlášce WO 2014/032633/A1. Jak PLA, tak PHB se ale vyznačují tím, že k dosažení prakticky použitelných vlastností výrobků vyráběných z taveniny těchto polymerů je nutno tyto polymery modifikovat. Konkrétně se jedná o jejich velmi rychlou krystalizaci z taveniny a z toho resultující křehkost vyráběných výrobků.

Syntéze a zpracování PLA je věnována monografie [1]. Zvláknění polymerů lze uskutečnit technologicky třemi způsoby: z taveniny, z roztoku a z gelu. Zvláknění polymerů z roztoku je technologie dobře známá a průmyslově využívaná již více než 100 let. V současnosti jasně dominuje postup zvláknění z taveniny, kterým je vyráběno přibližně 50 až 100 milionů tun vláken a/nebo monofilů ročně.

Zvláknění z gelu je používáno u polyvinylchloridu (PVC) a polyethylenu (PE). Tato vlákna jsou minoritní svým rozsahem výroby. Takto je nyní vyráběno přibližně sto tisíc tun vláken ročně.

Základní informace o zvláknění z roztoku, včetně obrázků podává literatura [1] a [2]. Zvláknění z roztoku bylo a stále je používáno pro zvláknění celulózy a jejích derivátů. Dále se běžně používá u polyakrylonitrilu (PAN). Takto je nyní vyráběno méně než jeden milion tun vláken ročně. Zvláknění z roztoku je věnována celá řada patentů, např. CN103526371, US2013300013, JP2011256488, US5234651, US3996321, US3676540, JP2004277898, JP2004-218169, JPH01156507, JPH02139407, JPS62141115, JPH0544104, JPS5988930, JPH0226911, JP5584833, CH707560.

Princip zvlákňování z roztoku je v principu jednoduchý. Polymer se rozpustí a pak vysráží zpět ve formě vlákna. Z hlediska roztoku polymeru je však nutno řešit výběr rozpouštědla či směsi rozpouštědel, koncentrace roztoku polymeru a teplotu roztoku polymeru. Z hlediska srážení polymeru je nutno řešit výběr srážedla či směsi srážedel a teplotu srážedla. Z hlediska zařízení je nutno řešit výtlač roztoku (ml/min), průměr vytlačovací trysky (mm), rychlost odtahu vlákna (cm/min) a vlivy dalších faktorů [1]. Chceme-li tedy z polymerů jako je kyselina polymléčná (PLA), polykaprolakton (PCL) či polyhydroxybutyrát (PHB) (=přirodní polyestery) vyrábět vlákna, je výhodným pracovat technologií zvlákňování z roztoku. Roztoky lze zvlákňovat jak na nanovlákna metodou elektrostatického zvlákňování, jak uvádí např. spisy WO2014127099, US2014106167, CN103451753, DE 102012004227, CN101429685, US5234651, US3996321), tak na mikrovlákna technologií výše popsanou.

V případě PHB je tento postup zvláště výhodným, protože PHB je ze směsi získané biotechnologií izolován rozpuštěním PHB, následným odstředěním nerozpuštěného zbytku, vysrážením a vysušením. Případně může následovat i granulace. Použití roztoku PHB k výrobě vláken lze tedy vynechat kroky vysrážení a vysušení. Roztok PHB lze zvlákňovat jak na nanovlákna metodou elektrostatického zvlákňování tak na mikrovlákna technologií výše popsanou. Obě tyto technologie zvlákňování jsou použitelné i pro PLA a PCL. Zvlákňování PHB a/nebo kopolymeru PHBV je uváděno v řadě patentových spisů, jako například CN102493021, CN102181960, CN102146598, CN102146597 a CN10293676.

Pro zvlákňování z roztoku na mikrovlákna je udáváno v literatuře [5], že pro zvlákňování za sucha jsou používány koncentrace polymeru 15 až 60 % hmotn. při zvlákňování mokřem (do srážedla) pak koncentrace polymeru 5 až 25 % hmotn.

Reference:

1. Auras R., Loong-Tak-L, Selke S.E.M., Hideto T. (Editors): POLY(LACTIC ACID), Synthesis, Structure, Properties and Applications, J. WILEY & SONS, Inc. Publications, New Jersey 2008, ISBN 978-0-470-29366-9 (cloth)
2. Kebl F.: Technologie chemických vláken, SNTL Praha 1977, str. 201 a 203
3. Pachekoski, W.M., Dalmolin, C., Marcondes Agnelli, J.A. *Materials Research-Ibero-American Journal of Materials* 2013, 16, 2, 327-332
4. Mishra S.P.: A Text Book of Fibre Science and Technology, New Age International, Bombay 2000, ISBN 81-224-1250-5
5. Kudláček L., Blažek J., Lauruský V.: Technologie chemických vláken, SNTL Praha, 1986, str. 276

Podstata vynálezu

Při zvlákňování PHB z roztoku se zjistilo, že při použití koncentrací polyhydroxybutyrátu (PHB) od velmi nízké (0,1 % hmotn.) až po vysokou max. 20 % hmotn., při laboratorní teplotě 23 °C srážením (mokřím zvlákňováním) do čistého srážedla. Vzniklé mikrovlákno není kompaktního průřezu, ale obsahuje v celém průřezu nanopóry, mikropóry a také póry o velikosti 200 nm až 1 µm.

Předmětem vynálezu je způsob výroby polymerního vlákna z polyhydroxybutyrátu (PHB) nebo kopolymeru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem (PHBV) zvlákňováním z roztoku polymeru v rozpouštědle vytlačovaného do srážedla, kde v případě kopolymeru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem činí množství hydroxyvalerátu v polymeru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem maximálně 30 % hmotn. Zvlákňovaný polymer nebo kopolymer má hmotnostně střední molekulovou hmotnost 50000-1000000 Da, srážedlem jsou alkoholy s teplotou tuhnutí vyšší než -70 °C a koncentrací minimálně 75 % hmotnostních. Srážedlem může být ethanol, isopropanol a/nebo methanol. Rozpouštědlem polymeru nebo kopolymeru je chloroform, dichlorethan a/nebo dichl-

lornethan, přičemž koncentrace polymeru nebo kopolymeru v rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel je 0,1 až 20 % hmotn. Teplota roztoku polyhydroxybutyrátu nebo kopolymeru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem je v rozmezí 0 °C až 50 °C a teplota srážedla je v rozmezí - 70 °C až 70 °C.

- 5 Při zvlákňování je pro prodloužení využíváno rozdílu hustot rozpouštědel (vyšší hustota) a srážedel (nižší hustota), čímž je vlákno samovolně prodlouženo gravitačním působením i bez mechanického odtahu vlákna.
- 10 Z uvedených polymerů se způsobem podle vynálezu získá polymerní vlákno, které má submikronovou strukturu, obsahující v celém průřezu nanopóry, mikropóry a také póry o velikosti 200 nm až 1 μm.

15 Objasnění výkresů

Obrázek 1: Schéma zvlákňování z roztoku do srážecí lázně [1]

Obrázek 2: Schéma zvlákňování z roztoku do temperované a odsávané komory [1]

Obrázek 3: Schéma zvlákňování z roztoku do srážecí lázně s prvním stupněm do vzduchu (plynu) [1]

- 20 Obrázek 4: Příčné řezy vláken z regenerované celulózy [2]

Obrázek 5: Schéma zvlákňování celulózy z roztoku [2]

Obrázek 6: SEM snímek PHB vlákna se submikronovou strukturou vyrobeného podle příkladu 1 – celé vlákno

- 25 Obrázek 7: SEM snímek PHB vlákna se submikronovou strukturou vyrobeného podle příkladu 1 – detail submikronové struktury uvnitř vlákna

Obrázek 8: SEM snímek PHB vlákna se submikronovou strukturou vyrobeného podle příkladu 1 – detail submikronové struktury na povrchu vlákna

Obrázek 9: SEM snímek PHB vlákna se submikronovou strukturou vyrobeného podle příkladu 7 – celé vlákno

- 30 Vynález je dále popsán podle příkladů provedení, které však žádným způsobem neomezuji jiná možná provedení v rozsahu patentových nároků.

35 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu (PHB)

- 40 Polymerní vlákno se připravilo z komerčně dostupného polyhydroxybutyrátu (PHB) s hmotnostně střední molekulovou hmotností 900 000 Da. Připravil se roztok PHB o teplotě 23 °C v chloroformu (2,5 % hmotn.) jako rozpouštědle. Tento byl vytlačován z trysky o průměru 0,3 mm do ethanolu (azeotropická směs ethanol – voda obsahující 95,57 % hmotnostních ethanolu) o teplotě 23 °C. Rychlost vytlačování byla 1 ml/minuta a rychlost výtoku ve směru trysky byla 14 m/min.
- 45 PHB se srážel ve formě vláken cca. 30 mm od ústí trysky. Vysrážená vlákna byla pak vysušena při teplotě 23 °C a dále hodnocena.

- 50 Diferenciální dynamickou kalorimetrií (DSC) bylo zjištěno, že krystalinita PHB je 60 % hmotnostních. Krystalinita (% hmotn.) = $(\Delta_{cr}/\Delta_{100}) \cdot 100$, Δ_{cr} je enthalpie tání měřeného vlákna. Pro en-

talpii tání PHB byl převzat údaj z literatury [3]. Entalpie tání 100 % krystalického PHB činí dle literatury 146 J.g^{-1} . Experimentálně získaný údaj entalpie činí $87,6 \text{ J.g}^{-1}$.

Na SEM snímcích (viz obrázky 6–8) je vidět submikronová struktura vzniklých vláken v celém jejich průřezu a na povrchu respektive.

Příklad 2

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že ethanol (azeotropická směs ethanol – voda obsahující 95,57 % hmotn. ethanolu) měl teplotu $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Příklad 3

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že jako srážedlo byl použit isopropanol při teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

Příklad 4

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že hmotnostně střední molekulová hmotnost PHB byla 80000 Da.

Příklad 5

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že koncentrace PHB z roztoku v chloroformovém roztoku byla 0,1 % hmotn.

Příklad 6

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že rozpouštědlem byl dichloroethan.

Příklad 7

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že roztok PHB byl ochlazen na teplotu $0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Příklad 8

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

- 5 Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že roztok PHB byl ohřát na teplotu 50 °C.

Příklad 9

10

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

- 15 Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že hmotnostně střední molekulová hmotnost PHB byla 80 000 Da, koncentrace polymeru v roztoku byla 20 % hmotn. a rozpouštědlem byl dichlormethan.

Příklad 10

20

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že srážedlem byl ethanol o koncentraci 75 % hmotn. a chloroform o koncentraci 25 % hmotn.

25

Příklad 11

Zvlákňování polyhydroxybutyrátu

30

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že srážedlem byl methanol.

Příklad 12

35

Zvlákňování kopolymeru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem (PHBV)

Polymerní vlákno se připravilo jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že polymerem byl kopolymer hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem s obsahem hydroxyvalerátu 30 % hmotn. PHBV měl s hmotnostně střední molekulovou hmotnost 900000 Da.

40

Průmyslová využitelnost

45

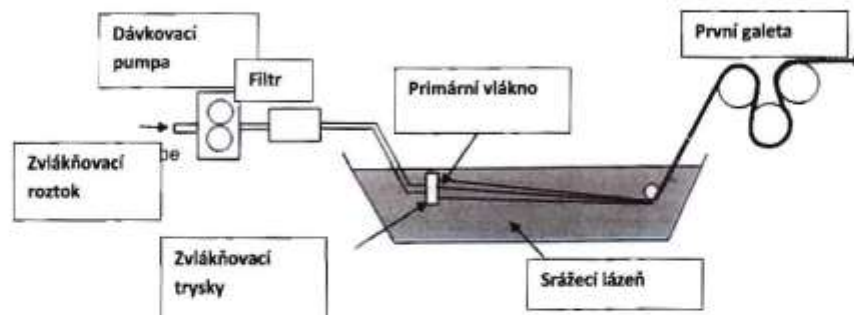
Polymerní vlákna připravená způsobem podle tohoto vynálezu jsou vyrobena z obnovitelných zdrojů a vyznačují biodegradabilitou. Jsou vhodná pro filtraci tekutin a plynů a mají využití také v oblasti tkáňového inženýrství.

PATENTOVÉ NÁROKY

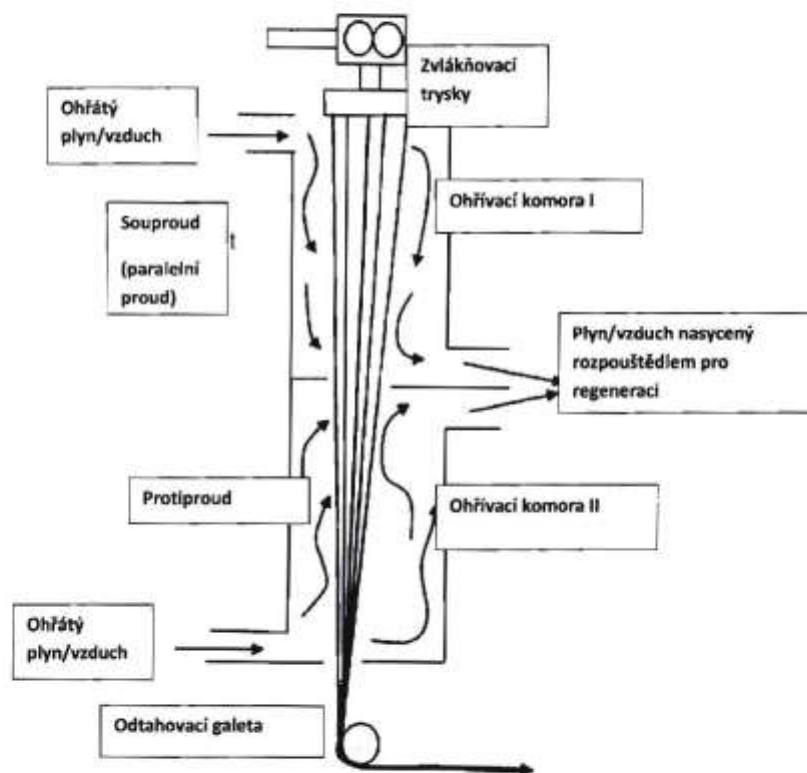
- 5 **1.** Způsob výroby polymerního vlákna z polyhydroxybutyrátu nebo kopolymeru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem zvlákněním z roztoku polymeru v rozpouštědle vytlačovaného do srážedla, **vyznačující se tím**, že množství hydroxyvalerátu v kopolymeru u hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem činí maximálně 30 % hmotn., zvlákněný polymer nebo kopolymer má hmotnostně střední molekulovou hmotnost 50000 až 1000000 Da, srážedlem jsou alkoholy s
10 teplotou tuhnutí vyšší než $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a koncentrací minimálně 75 % hmotn., rozpouštědlem polymeru nebo kopolymeru je chloroform, dichlorethan a/nebo dichlormethan, přičemž koncentrace polymeru nebo kopolymeru v rozpouštědle nebo směsi rozpouštědel je 0,1 až 20 % hmotn., teplota roztoku polyhydroxybutyrátu nebo kopolymeru hydroxybutyrátu s hydroxyvalerátem je v rozmezí $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplota srážedla je v rozmezí $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 15 **2.** Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že srážedlem je ethanol, isopropanol a/nebo methanol.

20

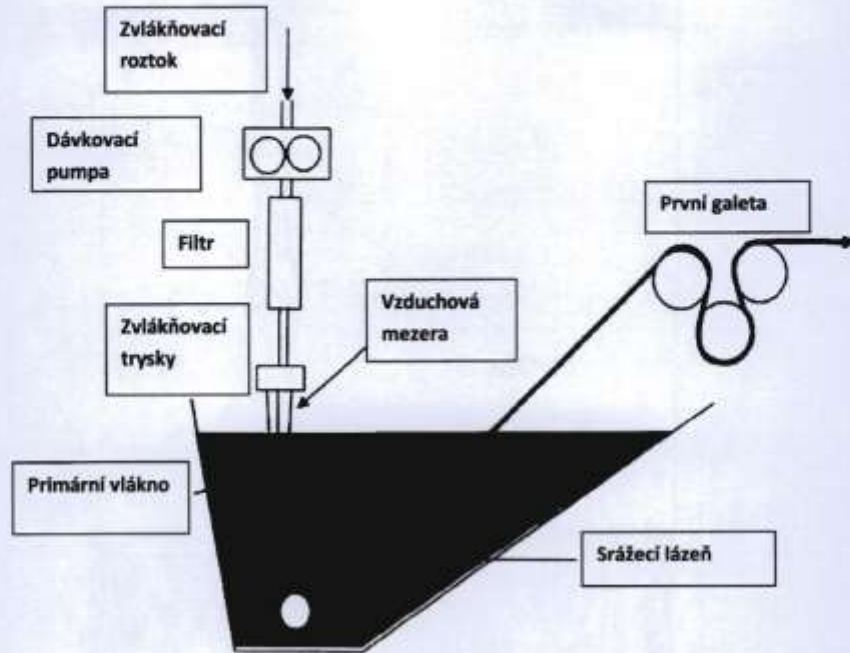
5 výkresů



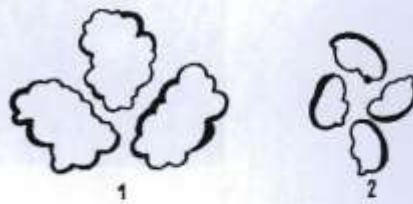
Obr. 1



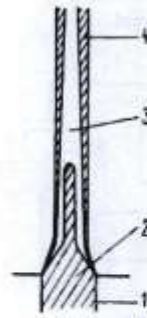
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

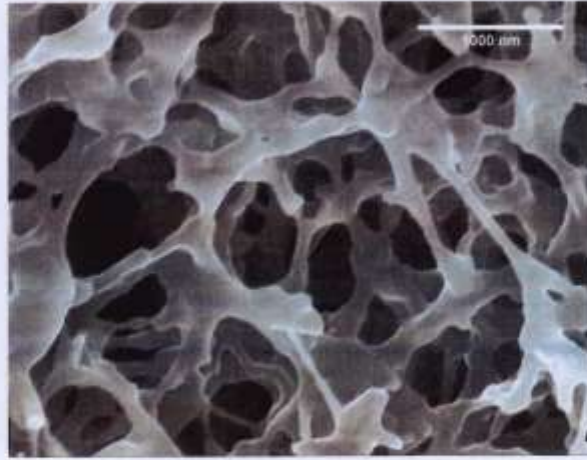


Obr. 5

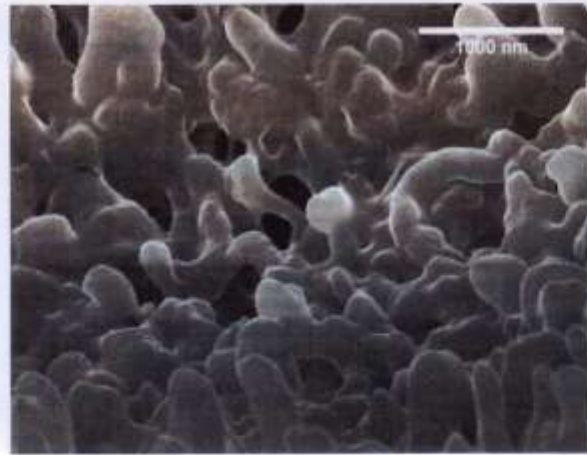


Obr. 6

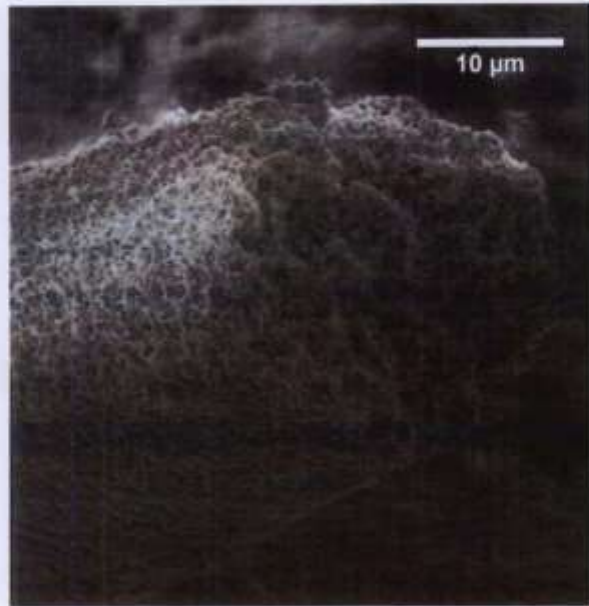
CZ 306448 B6



Obr. 7



Obr. 8




Obr. 9

Konec dokumentu

PŘÍLOHA 4

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

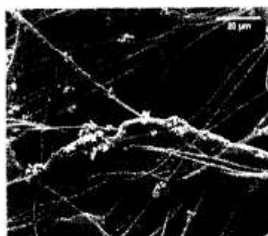
<p>(19) ČESKÁ REPUBLIKA</p>  <p>ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ</p>	<p>(22) Přihlášeno: 11.07.2016</p> <p>(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 28.02.2018 (Věstník č. 9/2018)</p>	<p>(21) Číslo dokumentu: 2016-423</p> <p>(13) Druh dokumentu: A3</p> <p>(51) Int. Cl.:</p> <ul style="list-style-type: none"><i>B01D 39/08</i> (2006.01)<i>B01D 39/16</i> (2006.01)<i>B32B 27/02</i> (2006.01)<i>B32B 27/36</i> (2006.01)<i>D01D 5/06</i> (2006.01)<i>C08L 67/06</i> (2006.01)<i>C08F 8/42</i> (2006.01)<i>B82B 3/00</i> (2006.01)<i>B82Y 40/00</i> (2011.01)<i>B82Y 99/00</i> (2011.01)
--	--	---

- (71) Přihlašovatel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ
- (72) Původce:
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc., Brno - Bystřice, CZ
Vojtěch Kundrát, Ostrava - Moravská Ostrava, CZ
Ing. Pavla Benešová, Frenštát pod Radhoštěm, CZ
- (74) Zástupce:
A. Holas & partner
Patentová a známková kancelář, Ing. Mgr. Hana
Holasová, Křížová 4/105, 603 00 Brno

(54) Název přihlášky vynálezu:
Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi

- (57) Anotace:
Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi, ve kterém sorbent je spojen s vláknem vybraným ze skupiny biodegradabilních polymerů polyhydroxyalkanoátů, poly-3-hydroxybutyrátu a biodegradabilního kopolymeru poly-3-hydroxybutyrátu-co-valerátu. Způsob výroby biodegradabilního vlákenného filtračního materiálu, ve kterém se zvláknění provádí technikou odstředivého zvláknění, přičemž z vláken se vytváří vlákenné rouno, které se vytváří propojením vláken o průměru do 50 μm.

CZ 2016 - 423 A3



Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi

Oblast techniky

Vynález se týká biodegradabilního vlákenného filtračního materiálu se sorpčními vlastnostmi a způsobu jeho výroby.

Dosavadní stav techniky

Poly[3-(R)-hydroxybutyrát], zkráceně PHB, je biopolymer náležící do rodiny polyhydroxyalkanoátů, a zároveň je jejich nejrozšířenějším zástupcem. Produkce PHB je založena na několikastupňové biochemické transformaci acetylkoenzymu A za účasti PHA syntézy. Produkce PHB v bakteriích nastává jako reakce na nedostatečný přísun živin umožňujících růst, a proto můžeme chápat PHB jako zásobní látku. PHB nabývá v bakteriích schopných jeho produkce až 90% hmotnostního zastoupení. PHB se vyskytuje jako homopolymer, ale častější je forma s obsahem hydroxyvalerátu s různých molárním obsahem ve struktuře. Jedná se pak o kopolymer jednotek hydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu. PHB je jak ve formě homopolymeru tak i kopolymeru s obsahem valerátu bílá až lehce nažloutlá semikrystalická látka relativně dobře rozpustná v chloroformu a částečně i v dalších halogenovaných rozpouštědlech. Samotný homopolymer je křehký, ale s procentuálním nárůstem valerátu dochází ke snížení krystalinity a zlepšení materiálových vlastností. PHB je často srovnáván s polypropylenem, vzhledem k podobnému bodu tání a krystalinitě materiálu. PHB má vyšší hustotu než voda. Chemická odolnost PHB je omezena esterovou podstatou materiálu. V přítomnosti kyselin a zásad se snižuje délka řetězců a v případě koncentrované kyseliny sírové dochází k eliminaci hydroxylové skupiny na krotonovou kyselinu. Bod teplotní degradace materiálu (cca 200 °C) je relativně blízko bodu tání (180°).

Tvorba submikronových a mikronových vláken za pomoci elektrostatického pole, neboli electrospinning, je průmyslově aplikovatelná technologie spočívající v aplikaci vysokého napětí na elektrodu s roztokem či taveninou zvlákněvaného polymeru. Při správně zvolených parametrech překoná aplikované elektrostatické pole povrchové napětí roztoku a vzniká lokální erupce ve formě tvorby Taylorova kužele. Z něj jsou vytahovány vlákenné struktury, které následně přitahovány na uzemněnou nebo negativně nabitou elektrodu neboli kolektor. Popisovaný systém zahrnuje mnoho měřitelných parametrů, z nichž nejdůležitější je druh

elektrody. Základní dělení je na zvlákňování z jehly a z volného povrchu, tedy například z otáčeneho válce částečně ponořeného do zvlákňovaného roztoku. Z nekonečných vláken je nejčastěji připravována plošná netkaná textilie.

Submikronová a mikronová vlákna jsou získatelná taktéž vlivem odstředivé síly. Jsou aplikovány dva odlišné principy, přičemž v prvním je použita rotující zvlákňovací hlavice zakončená například jehlami. V druhém případě je popsána aplikace roztoku polymeru na rotující disk. Odstředivá síla je natolik účinná, že dosáhne vytažení vlákna z roztoku za současného odpaření rozpouštědla. Je možné takto získat netkané, objemné struktury.

Spis CZ PV 1989-2717 o názvu *Plošný vláknový útvar pro čištění odpadních vod* se týká vláknenného materiálu pro čištění odpadních vod, jehož základní vlastností jsou adhezivem vázané částice na povrchu vláken. Částicemi (práškovým materiálem) je chápáno aktivní uhlí, anorganické ve vodě nerozpustné sloučeniny. Rozměr částic je maximálně 1000 μm . Vláknenný materiál je tvořen buď organickými polymery, případně minerálními a chemicky upravenými. Materiál primárně funguje jako nosič biomasy pro biologické čištění odpadních vod. Nejedná se ovšem o materiál určený ke kapalinové filtraci. V této části je zmíněn z důvodu podobného principu stavby materiálu.

Spis CZ PV 2011-255 o názvu *Filtrační a/nebo sorpční člen* se týká filtračního a/nebo sorpčního členu obsahující uhlíkatý sorbent, který je rozptýlen v mezivláknenném prostoru objemné textilie. Částečně jsou fixovány na povrchu vláken i některé částice uhlíkatého sorbentu. Způsob výroby zahrnuje mykání vláken, aplikaci sorpčního členu například vtíráním a následnou teplovzdušnou úpravu materiálu, během které dojde k pojení a fixaci některých částic na povrch bikomponentních vláken. Materiál je určen jako plošný filtr do klimatizačních jednotek, roušek pro osobní ochranu apod. a dále jako sorpční element pro zachycování nebezpečných nebo nežádoucích látek z vody a ze vzduchu. Nejedná se tedy o materiál určený ke kapalinové filtraci, což vyplývá i z absence fixace sorpčního členu na povrchu vláken. Průtokem kapaliny filtračního a sorpčního členu může zjevně docházet ke strhávání uhlíkatého sorbentu a změně homogenity materiálu.

Spis US4603070 o názvu *Non-woven fibrous material* se týká produkce vláken výhradně z poly-3-hydroxybutyrátu a to několika způsoby. Patent zahrnuje metody centrifugálního zvlákňování z taveniny a chloroformového případně dichlormethanového roztoku. Vzniklý materiál je aplikačně cílen především do zdravotnictví jako obvazový a univerzálně užitný materiál. Patent zahrnuje taktéž přísadky povrchové aktivní látky (surfaktantu) potlačující hydrofobní charakter použitého polymeru. Roztok používaný pro zvlákňování je charakterizován

tedy týká vytvoření vláken ze samotného, případně surfaktantem aktivovaného, poly-3-hydroxybutyrátu pro medicínální použití.

Spis CZ PUV 1996-6119 o názvu *Směs pro filtraci odpadové a silně kontaminované vody* se týká směsi pěnového polymerního materiálu a aktivního uhlí o různém poměru a velikosti zrn, která je uložena v síťce z netkané textilie. Uspořádání slouží k úpravě odpadových vod. Nejedná se o vláknenný materiál v nano či mikro rozměru.

Spis CZ PV 1990-6933 o názvu *Vrstvená filtračně absorpční textilie* se týká textilie určené k filtraci plynů či kapalin. Materiál je tvořen vpichovanou textilií, která vedle vláknenných filtračních vrstev obsahuje i objemnou netkanou textilií opatřenou náplní vhodného absorbentu. Vláknena opatřená absorbentem jsou tvořena tak aby ve výsledném objemném útvaru byly dutiny obsahující použitý sorbent. Z patentu je zřejmé že absorpční materiál je v dutinách, tedy v mezivláknenném prostoru.

Spis EP 2123440 B1 *Absorbent sheet of fibrous material* se týká absorpčního členu, který se vyznačuje využíváním celulózy a vláknitého materiálu (konkrétně polymerů vhodných pro technologii melt-spinning) z polyuretanu, polyetyleny, polypropylenu, fluorovaných polymerů a polymerů na silikonové bázi. Vláknena materiálu se vyznačují tím, že na jejich povrchu je zachycen absorpční materiál, konkrétně oxid titaničitý, křída, kaolin, supersorpční polymery, zápach pohlcující částice, konkrétně cyklodextrin.

Podstata vynálezu

Úkolem vynálezu je vytvořit vhodný biodegradabilní vláknenný materiál vhodný pro filtraci vody kontaminované chemicky, bakteriálně a mechanickými nečistotami a způsob jeho výroby.

Toho se značnou měrou dosáhne, podle tohoto vynálezu, jehož podstata spočívá zejména v tom, že sorbent je spojen s vláknem vybraným ze skupiny biodegradabilních polymerů polyhydroxyalkanoátů, poly-3-hydroxybutyrátu a biodegradabilního kopolymeru poly-3-hydroxybutyrátu-co-valerátu.

Dále se jeví výhodné, když je vlákno tvořeno směsí biodegradabilního poly-3-hydroxybutyrátu a k němu odlišnému biodegradabilního polymeru.

Z hlediska účinnosti je vhodné, když průměr vlákna je menší než použitý sorbent, přičemž částice sorbentu zasahují alespoň část celého průřezu vlákna, a když sorbent je tvořen částicemi o průměru od 50 nm do 50 μ m.

Je účelné, aby sorbent byl vybrán ze skupiny sorbentů tvořených aktivním uhlím, oxidů kovů a oxidů polokovů.

Z hlediska výroby je účelné použít způsob výroby biodegradabilního vlákenného filtračního materiálu, při němž se zvlákňování provádí technikou odstředivého zvlákňování, přičemž z vlákna se vytváří vlákenné rouno, které se vytváří propojením vláken o průměru do 50 μm nebo je také vhodné, když se zvlákňování provádí technikou elektrostatického zvlákňování, přičemž z vlákna se vytváří vlákenné rouno, které se vytváří propojením vláken o průměru do 50 μm .

Z hlediska výroby je také výhodné, když se sorbent uzavře mezi vlákna vytvářenými současně se zvlákňováním z taveniny případně se sorbent uzavře mezi vlákna vytvářenými současně se zvlákňováním ze suspenze.

Objasnění výkresů

Vynález bude bližší objasněn s prostřednictvím výkresů, na nichž jsou

- Obr. 1 Centrifugální zvlákňovač
- Obr. 2 Mirkovlákná vata z PHB
- Obr. 3 Elektrostaticky zvlákněný PHB
- Obr. 4 Kompozit PHB:Aktivní uhlí 1:1 hmotnostně
- Obr. 5 Kompozit PHB:Aktivní uhlí 5:1 hmotnostně
- Obr. 6 Kompozit PHB:Aktivní uhlí 1:1 hmotnostně
- Obr. 7 Kompozit PHB:Aktivní uhlí 5:1 hmotnostně
- Obr. 8 Kompozit PHB:Silikagel 2:1 hmotnostně
- Obr. 9 Kompozit PHB:Silikagel 2:1 hmotnostně – detail
- Obr. 10 Kompozit PHB:Silikagel 1:1 hmotnostně
- Obr. 11 Kompozit PHB:Silikagel 1:1 hmotnostně – detail
- Obr. 12 EDX spektrum snímané z plochy vzorku kompozitu PHB:Silikagel 1:1
- Obr. 13 Kompozit PHB:MnO₂ 2:1 hmotnostně
- Obr. 14 Kompozit PHB:MnO₂ 2:1 hmotnostně - detail
- Obr. 15 Kompozit PHB:MnO₂ 1:1 hmotnostně
- Obr. 16 Kompozit PHB:MnO₂ 1:1 hmotnostně – detail
- Obr. 17 EDX spektrum snímané z plochy vzorku kompozitu PHB:MnO₂ 1:1
- Obr. 18 Kompozit PHB:La₂O₃ 2:1 hmotnostně



- Obr. 20 EDX spektrum snimané z plochy vzorku kompozitu PHB:La₂O₃ 2:1
- Obr. 21 Kompozit PHB:ZnO 2:1 hmotnostně
- Obr. 22 Kompozit PHB:ZnO 2:1 hmotnostně – detail
- Obr. 23 EDX spektrum snimané z plochy vzorku kompozitu PHB:ZnO 2:1
- Obr. 24 Kompozit PHB:CuO 2:1 hmotnostně
- Obr. 25 Kompozit PHB:CuO 2:1 hmotnostně – detail
- Obr. 26 EDX spektrum snimané z plochy vzorku kompozitu PHB:CuO 2:1
- Obr. 27 Kompozit PHB:ZrO₂ 2:1 hmotnostně
- Obr. 28 Kompozit PHB:ZrO₂ 2:1 hmotnostně – detail
- Obr. 29 EDX spektrum snimané z plochy vzorku kompozitu PHB:ZrO₂ 2:1
- Obr. 30 Kompozit PHB:TiO₂ 2:1 hmotnostně
- Obr. 31 Kompozit PHB:TiO₂ 2:1 hmotnostně – detail
- Obr. 32 EDX spektrum snimané z plochy vzorku kompozitu PHB:TiO₂ 2:1
- Obr. 33 Kompozit PHB:Al₂O₃ 2:1 hmotnostně
- Obr. 34 Kompozit PHB:Al₂O₃ 2:1 hmotnostně – detail
- Obr. 35 EDX spektrum snimané z plochy vzorku kompozitu PHB:Al₂O₃ 2:1
- Obr. 36 Kompozit PHB:Aktivní uhlí 1:1 hmotnostně připravený elektrospinningem
- Obr. 37 Kompozit PHB:Aktivní uhlí 1:1 hmotnostně připravený elektrospinningem – detail
- Obr. 38 Kompozit PHB:MnO₂ 1:1 hmotnostně připravený elektrospinningem I
- Obr. 39 Kompozit PHB:MnO₂ 1:1 hmotnostně připravený elektrospinningem – detail
- Obr. 40 Graf filtrační účinnosti PHB – aktivní uhlí (průtoková cytometrie)
- Obr. 41 Graf filtrační účinnosti PHB – oxidy (průtoková cytometrie)
- Obr. 42 Graf filtrační účinnosti PHB – oxidy (průtoková cytometrie)
- Obr. 43 Graf filtrační účinnosti PHB, PHB – MnO₂, PHB – Akt. uhlí (průtoková cytometrie)
- Obr. 44 Elektrostaticky zvlákněný PHB po filtraci buněčné suspenze *S. cerevisiae*
- Obr. 45 Kompozit PHB:MnO₂ 1:1 hmotnostně po filtraci bakteriální suspenze *M. luteus*
- Obr. 46 Graf průběhu degradace vlákněných textilií

Popis příkladného uskutečnění

Podstata vynálezu tkví v nano- a/nebo mikrovlákněném polymerním materiálu, který na povrchu vlákna a/nebo přes větší část a/nebo přes celý průřez vlákna navázaný sorbent. Způsob přípravy takového materiálu spočívá v centrifugálním nebo elektrostatickém zvlákněování

fáze sorbentu. Vlákná polymeru musí mít menší průměr než použitý sorbent. Další možná metoda přípravy je elektrostatické zvlákňování, při němž je zvlákňována suspenze sorbentu v roztoku polymeru. Zvlákňování je možné provádět také z taveniny opět za pomoci odstředivé síly směsi polymeru a sorbentu. Takto vyrobená textilie spojuje v sobě mechanickou filtraci, máje otvory mezi vlákny v oblasti řádově $10 \mu\text{m} - 10^3 \text{ nm}$, a adsorpci na použitém plnivu, případně jeho baktericidní účinek.

Použitým polymerním materiálem je poly-3-hydroxyalkanoát, případně jiný zástupce ze skupiny polyhydroxyalkanoátů, vyznačující se biodegradabilitou. Jako polymer může být použit samotný homopolymer poly-3-hydroxybutyrát nebo kopolymer poly-3-hydroxybutyrát-co-valcrát, případně zmíněné polymery s přidavkem dalšího biodegradabilního polymeru, který lze rozpustit ve vhodném rozpouštědle. Přídavným polymerem může být polybutylenadipát-co-butyltereftalát (PBAT), kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), polykaprolaktan (PCL) a další. Obsah přídavného polymeru dosahuje až 50 hmotnostních procent. Jako vhodné rozpouštědlo je chápán například chloroform, 1,2-dichlorethan, dichlormethan, dimethylformamid, dimethylacetamida a další. Jako sorbent může být použito především aktivní uhlí, zcolit, křída, kaolin, oxidy kovů (například Fe_2O_3 , Al_2O_3 , TiO_2) a další, přičemž průměr použité částice může nabývat hodnot od několika nanometrů až po několik mikrometrů, s výhodou poté je částice většího průměru než průměru vzniklého vlákna. Hmotnostní obsah sorbentu v materiálu může dosahovat až 60 hmotnostních procent. Materiál s vyšším obsahem sorbentu už totiž nemá jednoznačnou vláknitou strukturu a rozpadá se, což bylo experimentálně zjištěno.

Použité způsoby přípravy vláknenného polymerního materiálu

Centrifugální způsob přípravy objemné textilie (vaty)

Zvlákňovací zařízení: odstředivý zvlákňovač tvořený rotujícím diskem – viz obr. 1.

Zvlákňovaný roztok: roztok PHB v chloroformu (koncentrace 3-5 %). Při zvlákňování nižších koncentrací nedochází k vytažení vlákna, ale ke vzniku filmu. Zvlákňování vyšších koncentrací je omezen rozpustností polymeru. Optimální koncentrace pro ustálenou produkci je 5%.

Do roztoku je možné přidat například jemně nadrcené, ve vodě a použitých rozpouštědlech nerozpustné látky dle požadované aplikace. Například aktivní uhlí, oxidické materiály, užitné materiály (doiomit, křída, mikroceluloza, nanočástice různých látek apod.)

Bylo zjištěno, že koncentrace nad 50 % je již obtížně použitelná pro tvorbu vláken, dochází k jejich trhání, vlákna jsou křehká a vzniklý materiál je sypký.

Rychlost rotujícího disku: rychlost otáčení pohybuje od 0-36000/min. Zvlákňování probíhá úspěšně přibližně od 20000 otáček/min výše.

Přívod polymeru na disk: nebyla nalezena limitní rychlost přítoku na rotující disk. Byla používána rychlost 5 ml za sekundu – tzn., bylo dávkováno 5ml roztoku za jednu sekundu na rotující disk a byla takto vytvořena velmi jemná vlákna.

Ostatní podmínky:

- teplota vzduchu 23 °C,
- větrání/odtah v rozsahu odpovídajícím bezpečnosti a efektivitě od řádově l/min m³/min vzduchu

Přípravu většího množství vláken je nutné podpořit zvýšením proudění vzduchu ve zvlákňovacím prostoru. Je možné podpořit odpařování zvýšením teplota proudícího vzduchu, vlákna mají poté větší průměr.

Standardní pracovní postup použitý v příkladech 1 - 6: 5% roztok PHB v chloroformu s 25 % obsahem aktivního uhlí o střední velikosti částic 5 µm je přiváděn za průtoku 1 ml/s na rotující disk o rychlosti 36000otáček za minutu. Na vnitřním plášti válce (průměr 300 mm, výška 100 mm) obklopujícího rotující disk se vytváří hustá síť vláken, která jsou následně odebrána, dosušena proudem horkého vzduchu (teplota 20 - 100 °C) a používána.

Způsob přípravy popisovaného materiálu spočívá v centrifugálním zvlákňování suspenze tvořené roztokem polymeru ve vhodném rozpouštědle a rozdispergované heterogenní fáze sorbentu. Zvlákňování je možné provádět taktéž z taveniny opět za pomoci odstředivé síly směsí polymeru a sorbentu, přičemž vlákna sorbentu musí mít menší průměr než použitý sorbent. V případě zvlákňování ze suspenze je taktéž možné aplikovat suspenzi na rychle rotující disk. Způsob produkuje na okrajích disku vlákna o průměru od 25 nm do 5 µm. Otáčky rotujícího disku je možné volit dle požadovaného průměru vláken od 3000 otáček za minutu až po 36000 otáček za minutu dle použitého vybavení. Při odstředivém zvlákňování tedy vzniká objemný vlákněný materiál, který na vlákněch má nekovalentními vazbami navázaný sorbent. Rozpouštědlo je odpařeno samovolně při tvorbě vláken, vypařování je možné podpořit aplikací odtahu plynu, případně ventilátoru. Takto je ovšem výrazně ovlivňován průměr vzniklého vlákna.

Další možný způsob přípravy je elektrostatické zvlákňování, při němž je zvlákňována suspenze sorbentu v roztoku polymeru. Při takovém způsobu zvlákňování je možné připravit

objemnou textilií i plošnou netkanou textilií v závislosti na použitých parametrech zvlákňování. S výhodou je používán 2,5-5,0 hm. % roztok PHB v chloroformu nebo v dalších rozpouštědlech s přídavkem 0,25 hm. % tetraethylamonium bromidu nebo další alkylamoniové soli rozpustné v chloroformu. Účelem přídavku je navýšení vodivosti roztoku a snížení povrchového napětí roztoku, čímž je usnadněno elektrostatické zvlákňování.

Vzniklý materiál, ať už je zvlákňován centrifugální nebo cestou elektrostatického zvlákňování, je charakteristický tím, že vlákna obsahují zakomponované struktury sorpčního materiálu. Použití takového materiálu se nachází v oblasti filtrace vody od mechanických, chemických a biologických nečistot. Testována byla filtrační účinnost na bakteriální kmeny a byl objeven mechanismus filtrace spočívající v adhezi bakterií na povrchu vláken. V následujících odstavcích je sepsána podrobně příprava, charakterizace a účinnost materiálů v dané aplikační oblasti.

Příklady

Příklad 1

Centrifugální a elektrostatické zvlákňování PHB bez přídavku sorbentu

První experimenty byly provedeny se samotným polyhydroxybutyrátem. PHB (výrobek společnosti Biomcr) o hmotnostně střední molekulové hmotnosti 566 kDa a polydisperzním indexu 3,26 byl rozpuštěn v chloroformu na 5,0 hm. % koncentraci. Čirý lehce nažloutlý roztok byl přiváděn na rotující disk (20000 otáček za minutu) rychlostí průtoku 1 ml/s. Okamžitě se vytvořila síť bílých vláken ve vzdálenosti přibližně 10 cm od kotouče. Vlákna byla sušena a charakterizována elektronovým mikroskopem (Obr. 2). Průměr vláken se pohyboval od 0,5 do 5,0 μm .

Elektrostatické zvlákňování bez přídavku sorbentu bylo provedeno z 2,5 hm. % roztoku PHB v 1,2-dichlorethanu s přídavkem 0,25 hm. % tetraethylamonium bromidu. Zvlákňování bylo provedeno z jehly [6] na uzemněný kovový kolektor ve tvaru čtverce. Použité napětí bylo 20 kV a vzdálenost elektrod byla 15 cm. Průtok byl nastaven na lineárním dávkovači na 2 ml/h. Kolektor se pokryl hustou sítí submikronových vláken ve formě netkané textilie a následně byl produkt analyzován na elektronovém mikroskopu. (Obr. 3). Průměrná tloušťka vláken byla analyzována měřením sto průměrů vláken a byl zjištěn údaj 170 ± 130 nm (data průměrů vláken

Příklad 2*Centrifugální zvláknování PHB s přidavkem aktivního uhlí*

Následující práce byly zaměřeny na přípravu vlákenného kompozitu s aktivním uhlím zakoupeným u firmy Lach-Ner. Byl připraven 5 hm. % roztok PHB v chloroformu s přidavkem aktivního uhlí a to ve dvou koncentracích, 1 a 5 hm. %. Bylo použito aktivní uhlí o středním průměru částic 5 μm a disperzi od submikronových částic až po 7 μm . Tato suspenze byla přiváděna na rotující kotouč (20000 otáček za minutu) rychlostí průtoku 1 ml/s. Vytvořila se vlákněná síť šedého až tmavě šedého zabarvení a jemné vatové struktury. Materiál byl sušen a charakterizován na světelném (Obr. 4, 5) a elektronovém mikroskopu (Obr. 6, 7).

Příklad 3*Centrifugální zvláknování PHB s přidavkem silikagelu*

Jako další sorpční materiál byl vyzkoušen silikagel určený pro náplně chromatografických kolon od firmy Sigma-Aldrich a o průměru částic v rozsahu 35-60 μm . Suspenze v 5 hm. % roztoku PHB v chloroformu dosahovala koncentrace silikagelu 5,0 hm. % a 2,5 hm. % respektive. Suspenze byla přivedena na rotující disk (20000 otáček za minutu) při rychlosti průtoku 1 ml/s. Byly získány materiály jemné vlákenné formy, které byly analyzovány za pomoci elektronového mikroskopu. (Obr. 8, 9, 10, 11) Kvalitativní přítomnost silikagelu v konkrétních strukturách byla dokázána energo-disperzní spektrometrií (EDX). (Obr. 12)

Získané struktury v obou poměrových případech jsou zajímavé svou morfologií, kdy částice silikagelu jsou obaleny sítí z PHB a navzájem propojené polymerními mikrovláknky. Materiál je celistvý, sypkost sorbentu vymizela propojením za pomoci polymeru.

Příklad 4*Centrifugální zvláknování PHB s přidavkem oxidu manganičitého*

Další zvolené plnivo s možnou sorpční a případně i katalytickou funkcí byl oxid



zvoleny dva poméry PHB:MnO₂, 2:1 a 1:1. Charakterizace materiálu proběhla za pomoci elektronové mikroskopie (Obr. č. 13, 14, 15, 16) a EDX analýzy (Obr. č. 17).

V případě poměru PHB:MnO₂ 2:1 se vytvářely porézní shluky spojené polymerem. Při zvolení poměru 1:1 byly vlákna uniformní a bez výraznější porézní struktury. Barva materiálu v obou případech je šedohnědá a morfologie je opět celistvá. Vlákna jsou objemná a velmi jemná na omak. Přítomnost oxidu manganického byla potvrzena metodou EDX.

Příklad 5

Centrifugální zvláknování PHB s přidavkem oxidu lanthanitého

Stejným způsobem jako v předchozích případech byl připraven zvláknovací roztok pro získání kompozitu PHB:La₂O₃. Poměr byl zvolen 2:1. Získaný materiál byl charakterizován za pomoci elektronového mikroskopu a EDX (Obr. 18, 19, 20)

Příklad 6

Centrifugální zvláknování PHB s přidavkem oxidu zinečnatého

Stejným způsobem jako v předchozích případech byl připraven zvláknovací roztok pro získání kompozitu PHB:ZnO. Poměr byl zvolen 2:1. Získaný materiál byl charakterizován za pomoci elektronového mikroskopu a EDX (Obr. 21, 22, 23)

Signály v intervalu 2-3 kV náleží pozlaccní vzorku za účelem zvýšení vodivosti pro elektronovou mikroskopii.

Příklad 7

Centrifugální zvláknování PHB s přidavkem oxidu měďnatého

Stejným způsobem jako v předchozích případech byl připraven zvláknovací roztok pro získání kompozitu PHB:CuO. Poměr byl zvolen 2:1. Získaný materiál byl charakterizován za pomoci elektronového mikroskopu a EDX (Obr. 24, 25, 26)

Příklad 8*Centrifugální zvlákňování PHB s přidavkem oxidu zirkoničitého*

Stejným způsobem jako v předešlých případech byl připraven zvlákňovací roztok pro získání kompozitu PHB:ZrO₂. Poměr byl zvolen 2:1. Získaný materiál byl charakterizován za pomoci elektronového mikroskopu a EDX (Obr. 27, 28, 29)

Příklad 9*Centrifugální zvlákňování PHB s přidavkem oxidu titaničitého*

Stejným způsobem jako v předešlých případech byl připraven zvlákňovací roztok pro získání kompozitu PHB:TiO₂. Poměr byl zvolen 2:1. Získaný materiál byl charakterizován za pomoci elektronového mikroskopu a EDX (Obr. 30, 31, 32)

Příklad 10*Centrifugální zvlákňování PHB s přidavkem oxidu hlinitého*

Stejným způsobem jako v předešlých případech byl připraven zvlákňovací roztok pro získání kompozitu PHB:Al₂O₃. Poměr byl zvolen 2:1. Získaný materiál byl charakterizován za pomoci elektronového mikroskopu a EDX (Obr. 33, 34, 35)

Příklad 11*Elektrostatické zvlákňování PHB s přidavkem aktivního uhlí*

Elektrostatické zvlákňování s přidavkem aktivního uhlí bylo provedeno z 2,5 hm. % roztoku PHB v 1,2-dichlorethanu s přidavkem jemně nadrceného aktivního uhlí a 0,25 hm. % tetraethylamonium bromidu. Přidavek uhlí byl zvolen v hmotnostním poměru ku PHB 1:1. Bylo použito aktivní uhlí o středním průměru částic 5 μm a disperzi od submikronových částic až po 7 μm. Zvlákňování bylo provedeno z jehly o vnitřním průměru 1mm na uzemněný kovový kolektor ve tvaru čtverce. Použité napětí bylo 20 kV a vzdálenost elektrod byla 15 cm. Průtok



kompozitních vláken ve formě netkané textilie a následně byl produkt analyzován na elektronovém mikroskopu. (Obr. 36, 37).

Příklad 12

Elektrostatické zvlákňování PHB s přidavkem oxidu mangančitého

Elektrostatické zvlákňování s přidavkem oxidu mangančitého bylo provedeno z 2,5 hm. % roztoku PHB v 1,2-dichlorethanu s přidavkem jemně nadrceného oxidu mangančitého o středním průměru částic 10 μm a 0,25 hm. % tetracylamonium bromidu. Přidavek oxidu byl zvolen v hmotnostním poměru ku PHB 1:1. Zvlákňování bylo provedeno z jehly o vnitřním průměru 1mm na uzemněný kovový kolektor ve tvaru čtverce. Použité napětí bylo 20 kV a vzdálenost elektrod byla 15 cm. Průtok byl nastaven na lineárním dávkovači na 5 ml/h. Kolektor se pokryl hustou sítí kompozitních vláken ve formě netkané textilie a následně byl produkt analyzován na elektronovém mikroskopu. (Obr. 38, 39).

V kompozitu PHB:oxid mangančitý je vidět, že velká část vláken je uniformní. Je to způsobeno velkým obsahem jemných částic plniva s průměrem okolo 2 μm . Zbylé velké struktury jsou neoddělené fáze plniva s velkým průměrem.

Příklad 13

Poly-3-hydroxybutyrát (5 g) o molární hmotnosti 200 kDa je rozpuštěn za intenzivního míchání při 60 °C v 100 g chloroformu. Do vzniklého viskózního roztoku je přidáno aktivní uhlí (5 g) o středním průměru částic 7 μm a směs je intenzivně míchána až do vzniku rovnoměrně rozdispergované heterogenní směsi. Následně je roztok zkoncentrován na 5 hm. % obsah polyhydroxybutyrátu. Směs je přikapávána injekční stříkačkou na rotující disk o rychlosti 20000 otáček za minutu. Vzniklá vlákna jsou sbírána záchytným kotoučem o průměru 30 cm a výšce 10 cm postaveným kolem disku.

Příklad 14

Poly-3-hydroxybutyrát (5 g) o molární hmotnosti 200 kDa je rozpuštěn za intenzivního míchání při 60 °C v 100 g chloroformu. Do vzniklého viskózního roztoku je přidáno aktivní uhlí



(1 g) o středním průměru částic 7 μm a směs je intenzivně míchána až do vzniku rovnoměrně rozdispergované heterogenní směsi. Následně je roztok zkoncentrován na 5 hm. % obsah polyhydroxybutyrátu. Směs je přikapávána injekční stříkačkou na rotující disk o rychlosti 20000 otáček za minutu. Vzniklá vlákna jsou sbírána záchytným kotoučem dle příkladu 13 postaveným kolem disku.

Příklad 15

Poly-3-hydroxybutyrát (2,5 g) o molární hmotnosti 200 kDa je rozpuštěn společně s kyselinou polymléčnou (2,5 g) za intenzivního míchání při 60 °C v 100 g chloroformu. Do vzniklého viskózního roztoku je přidán práškový oxid titaničitý o průměru částic 2 μm a směs je intenzivně míchána až do vzniku rovnoměrně rozdispergované heterogenní směsi. Následně je roztok zkoncentrován na 5 hm. % obsah polymerů. Směs je přikapávána injekční stříkačkou na rotující disk o rychlosti 20000 otáček za minutu. Vzniklá vlákna jsou sbírána záchytným kotoučem dle příkladu 13 postaveným kolem disku.

Příklad 16

Poly-3-hydroxybutyrát (4 g) o molární hmotnosti 200 kDa je rozpuštěn společně s polymerem PBAT (1 g) za intenzivního míchání při 60 °C v 100 g chloroformu. Do vzniklého viskózního roztoku je přidáno aktivní uhlí (5 g) o středním průměru částic 7 μm a směs je intenzivně míchána až do vzniku rovnoměrně rozdispergované heterogenní směsi. Následně je roztok zkoncentrován na 5 hm. % obsah polyhydroxybutyrátu. Směs je přikapávána injekční stříkačkou na rotující disk o rychlosti 20000 otáček za minutu. Vzniklá vlákna jsou sbírána záchytným kotoučem dle příkladu 13 postaveným kolem disku.

Příklad 17

Poly-3-hydroxybutyrát (2,5 g) o molární hmotnosti 200 kDa je rozpuštěn společně s polymléčnou kyselinou (2,5 g) za intenzivního míchání při 60 °C v 100 g chloroformu. Do vzniklého viskózního roztoku je přidán práškový oxid titaničitý o průměru částic 2 μm a směs je intenzivně míchána až do vzniku rovnoměrně rozdispergované heterogenní směsi. Následně je roztok zkoncentrován na 5 hm. % obsah polymerů. Směs je přikapávána injekční



stříkačkou na rotující disk o rychlosti 20000 otáček za minutu. Vzniklá vlákna jsou sbírána záchytným kotoučem dle příkladu 13 postaveným kolem disku.

Příklad 18

Poly-3-hydroxybutyrát (4 g) o molární hmotnosti 200 kDa je rozpuštěn společně s polymerem PCL (1 g) za intenzivního míchání při 60 °C v 100 g chloroformu. Do vzniklého viskózního roztoku je přidáno aktivní uhlí (5 g) o středním průměru částic 7 μm a směs je intenzivně míchána až do vzniku rovnoměrně rozdispergované heterogenní směsi. Následně je roztok zkoncentrován na 5 hm. % obsah polymerů. Směs je přikapávána injekční stříkačkou na rotující disk o rychlosti 20000 otáček za minutu. Vzniklá vlákna jsou sbírána záchytným kotoučem dle příkladu 13 postaveným kolem disku.

PŘÍKLADY OVĚŘOVÁNÍ VYNÁLEZU

FILTRACE MIKROBIÁLNÍCH SUSPENZÍ

POUŽITÉ MIKROORGANISMY

Bacillus subtilis

Jedná se o gramnegativní tyčinkovitou bakterii tvořící rezistentní spory. *B. subtilis* je nepatogenním mikroorganismem vyskytujícím se převážně v půdě. Bakterie je řazena mezi mezofilní mikroorganismy s optimální teplotou pro růst mezi 25 – 35°C. Stres a nedostatek nutrientů v prostředí obvykle vede k tvoření termo-rezistentních spor. *Bacillus subtilis* je striktní aerob. Z biotechnologického hlediska se jedná o důležitý producenta zejména antibiotik, ale také enzymů jako například proteáz a amyláz.

Saccharomyces cerevisiae

Jedná se o jednobuněčný eukaryotní mikroorganismus řadící se mezi kvasinky. Samotná buňka má oválný nebo kulatý tvar o velikosti 5 – 10 μm. *S. cerevisiae* je fakultativně anaerobním mikroorganismem. optimální teplota růstu 25 – 30 °C ji řadí mezi mezofilní

výskyt především na ovoci. Výskyt *S. cerevisiae* byl také zaznamenán v tělech živočichů – trávicím traktu. *S. cerevisiae* je jedním z nejdéle používaných mikroorganismů v biotechnologii, využitím sacharidového substrátu dochází k přeměně na alkohol a případně organické kyseliny, čehož se po staletí využívá především v potravinářských výrobcích.

Escherichia coli

Escherichia coli je jedním z nejznámějších zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o nesporulující tyčinkovitou bakterii o velikosti 0,3 – 600 µm, odvíjející se od druhu. Z hlediska kyslíkových nároků jde o fakultativního anaeroba s optimální teplotou růstu 37 °C. V omezené míře se vyskytuje ve střevní mikroflóře, ale jedná se o podmíněného patogena, který při přemnožení způsobuje závažné zdravotní potíže ve formě infekci

ZPŮSOBY STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technika pomocí níž lze analyzovat fyzikální charakteristiky jednotlivých částic (buněk). V průběhu měření jsou buňky unášeny proudem nosné kapaliny (voda), kdy dochází k „scfazení“ buněk v systému tak, aby každá jednotlivá buňka procházela optickou částí, kde je osvětlena zdrojem světla. Rozptyl světla a případná fluorescence, emitována buňkou při excitaci zdrojem, jsou zaznamenány. Analýza je založena na relativní velikosti buněk, granulitě, a případné intenzitě fluorescence. Cytometrie je řazena mezi nejcitlivější metody pro stanovení počtu a charakteristik buněk, proto byla vybrána jako primární technika pro stanovení počtu buněk ve filtrátu.

Světelná mikroskopie

Další možná metoda pro zjištění celkového počtu buněk v roztoku je možnost použití Bürkerovy komůrky ve spojení se světelným mikroskopem. Principem této přímé metody stanovení počtu buněk je přímé počítání buněk v mikroskopickém preparátu. Pro počítání buněk mikroorganismů jsou používány různé typy komůrek - Bürkerova, Thomova.



Turbidimetrické měření zákalu

Jednou z možných technik stanovení počtu mikroorganismů v tekutém médiu je využitím turbidimetrie. Mikroorganismy v průběhu množení tvoří v tekutém vzorku zákal. Turbidimetrie patří mezi nepřímé metody stanovení a využívá měření změn intenzit zákalu média v závislosti na čase a slouží pro měření celkového počtu mikroorganismů. Spektrofotometrické měření je obvykle prováděno při vlnových délkách 550 – 650 nm.

KULTIVACE MIKROORGANISMŮ:

Bakterie *B. subtilis* CCM2794 byla kultivována na NB (Nutrient Broth w/ 1% Peptone) médiu, které je běžně využíváno pro kultivaci bakterií. Buňky pro přípravu buněčné suspenze byly použity po 48 hodinách kultivace při teplotě 30 °C. Velikost buněk v bakteriální suspenzi se pohybovala v rozmezí od 3 do 6 μm.

Kvasinka *S. cerevisiae* CCM 8191 byla kultivována při aerobních podmínkách na YPD médiu (médiu pro kvasinky s peptonem a dextrózou). Buňky pro přípravu suspenze byly kultivovány po dobu 24 hodin při 25 °C. Velikost buněk se pohybovala v rozmezí od 2 μm do 10 μm.

Pro kultivaci bakterie *M. luteus* CCM1569 bylo použito NB médium. Kultivace probíhala aerobně, při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Velikost buněk se pohybovala v rozmezí od 1 do 2 μm.

Bakterie *E. coli* CCM 7395 byla kultivována na LB (Luria-Bertani - obsahující trypton, aminokyseliny, kvasničný extrakt a chlorid sodný) médiu při teplotě 37 °C. K přípravě buněčné suspenze byly použity buňky kultivovány po dobu 48 h. V suspenzi se nacházely buňky o velikosti od 1 μm do 3 μm.

Médium pro kultivaci *B. subtilis* a *M. luteus*:

Hovězí extrakt	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Médium pro kultivaci *S. cerevisiae*:

Kvasničný autolyzát	10 g
Pepton	20 g
Glukóza	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

Médium pro kultivaci *E. coli*:

Kvasničný autolyzát	10 g
Trypton	10 g
NaCl	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Příklad 19

EXPERIMENT PHB s AKTIVNÍM UHLÍM

Filtrační materiály:

Pro filtraci byla použita mikro (nano) vlákenný kompozitní materiál tvořený PHB a aktivním uhlím v různém procentuálním zastoupení, připraveným podle příkladů 13 a 14. Procentuální podíl aktivního uhlí v PHB vatě byl 66 %, 50 %, 37,5 %, 16,7 %, 0 %. Filtrační vrstva měla výšku 10 cm o průměru 1 cm. Suspenze obsahující $5 \cdot 10^5$ /ml buněk bakterií *Bacillus subtilis* byla filtrována přes filtrační vrstvu za působení tlaku 0,25 MPa. Po filtraci suspenze o objemu 50 ml byl z filtrátu odebrán vzorek pro stanovení buněčné populace průtokovou cytometrií, viz obr. 40.

Průtoková cytometrie

Z výše uvedených materiálů měl prokazatelně nejvyšší filtrační účinnost materiál obsahující 66 % aktivního uhlí a 34 % PHB. Se snižujícím se obsahem aktivního uhlí ve filtračním materiálu docházelo ke snížení filtrační účinnosti a to až o 55%. Z výše uvedených výsledků také vyplývá, že obsah aktivního uhlí v PHB má lepší filtrační vlastnosti pouze v případě, kdy je procentuální zastoupení aktivního uhlí nad 50 %. U materiálů obsahující 37, 50



% a 16,70 % byla účinnost filtrace srovnatelné s filtračním materiálem bez přídavku aktivního uhlí ~ 15 %.

Příklad 20

EXPERIMENT s PHB a OXIDY KOVŮ

Filtrační materiály:

Pro testování filtrační účinnosti byl připraven kompozit PHB s oxidy v poměru 1:1 vyrobených podle příkladu 1, 4, 7, 8, 9. Filtrace byla provedena ve standardním modulu (výška sloupce 10 cm, průměr 1 cm). Pro filtraci byla opět zvolena suspenze buněk *B. subtilis* o koncentraci $4 \cdot 10^5$ buněk/ml. Celkový objem filtrovaného materiálu tvořil 50 ml a tento objem byl filtrován přes filtrační vrstvu 10 cm za působení tlaku 0,25MPa.

Průtoková cytometrie

Filtrační účinnost kompozitních materiálů byla ověřena filtrací buněčných suspenzí *B. subtilis*. Jako nejvhodnější materiál se zdá být oxid PHB s oxidem zirkoničitým (97 %). Vysoká filtrační účinnost byla také u filtračních materiálů s obsahem TiO_2 (84 %), MnO_2 (84 %), ale i čistého PHB (82 %). Nejméně vhodným materiálem pro mikrobiální filtraci je kompozit tvořený směsí PHB a CuO . Viz obr. 41.

Jako ověřovací experiment bylo zvoleno nepřímé stanovení počtu buněk za použití turbidimetrického měření při $\lambda=630$ nm. Trend úspěšnosti filtrace korespondoval s daty naměřenými průtokovou cytometrií. Materiál s nejvyšší úspěšností filtrace byl opět PHB s oxidem zirkoničitým (94 %). Velice dobrých výsledků bylo dosaženo při filtracích mikrobiálních suspenzí za použití materiálu tvořeného z PHB a TiO_2 (92 %), MnO_2 (90 %). V případě čistého PHB filtračního materiálu, bez použití příměsí, byla úspěšnost 88 %. Viz obr. 42.

Příklad 21**EXPERIMENT S TEXTILÍ*****Filtrační materiály:***

Pro účely filtrace mikroorganismů byla vyrobena mikro (nano)-vlákněná textilie (membrána) z PHB podle příkladu 11, 12 a 1:

- i) aktivní uhlí (1:1)
- ii) MnO_2 (1:1)
- iii) bez příměsí.

Samotný proces filtrace byl prováděn přes textilii za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky o průměru 77 mm. Bakterie *E. coli*, *Micrococcus luteus* a kvasinka *S. cerevisiae* byly použity pro přípravu buněčných suspenzí určených pro filtraci. Suspenze o objemu 50 ml a koncentraci buněk $5 \cdot 10^5$ byla filtrována přes filtrační textilii.

Průtoková cytometrie:

Další aplikační forma kompozitního materiálu pro účely filtrace byla zvolena vlákněná textilie PHB s příměsí aktivního uhlí, MnO_2 a čistá PHB o průměru 6 cm. Pro filtraci byly použity tři různé buněčné suspenze - *S. cerevisiae*, *M. luteus* a *E. coli*. Viz obr. 43.

Nejvyšší filtrační účinnost měla kompozitní textilie PHB – aktivní uhlí v případě filtrace suspenze tvořené buňkami *S. cerevisiae* (78 %). Všeobecně u všech tří materiálu bylo dosaženo nejvyšší účinnosti filtrace právě při filtraci suspenze *S. cerevisiae*. Filtrace za pomoci vlákněné textilie PHB- MnO_2 se v porovnání s čistým PHB a PHB – aktivní uhlí zdá být nejméně účinná.

Filtrační materiály z předchozího experimentu byly použity také pro studium absorpčních vlastností vlákněných materiálů. Po filtraci buněčných suspenzí, byl odebrán vzorek vlákněné textilie a připraven mikroskopický preparát vhodný pro skenovací elektronový mikroskop (SEM). U takto upravených vzorků byl zkoumán princip/mechanismus absorpčních vlastností jednotlivých materiálu při mikrobiální filtraci. Viz obrázky 44 a 45.

Ze snímků pořízených na SEM je patrné, že dochází k přilnutí mikroorganismu na kompozitním vlákněném materiálu.

Příklad 22

TESTOVÁNÍ ABSORPČNÍCH VLASTNOSTÍ

Pro testování absorpčních vlastností kompozitních vláken připravených podle příkladů 1 a 2 byl připraven roztok dichromanu draselného (15 mg rozpuštěno v 50 ml destilované vody) a roztok methylenové modři (15 mg rozpuštěno v 50 ml destilované vody). Přes filtrační vrstvu 10 cm o průměru 1 cm bylo filtrováno 25 ml výše uvedených roztoků. Pro ověření absorpčních vlastností filtrace byla změřena absorbance filtrovaného roztoku a filtrátu, methylenová modř 664 nm a dichroman draselný 410 nm. Výsledky jsou níže shrnuty (Tabulka 1).

Tabulka 1: Absorpční vlastnosti vybraných vláken

		PHB	PHB+ Aktivní uhlí 1:1
Dichroman draselný	Koncentrace barviva před filtrací [mg/50 ml]	15	15
	Absorbance po filtraci:	1,530 (zředěno 1:10)	1,063
	Koncentrace barviva po filtraci [mg/50 ml]	12,6	0,8
Methylenová modř	Koncentrace barviva před filtrací [mg/50 ml]	15	15
	Absorbance po filtraci:	1,856 (zředěno 1:20)	0,171
	Koncentrace barviva po filtraci [mg/50 ml]	10,3	0,03

Příklad 23

TESTOVÁNÍ BIODEGRADABILITY

Materiály použité k filtraci jsou vyrobeny podle příkladů 1, 11a 12 z biodegradabilního biopolymeru PHB. Pro ověření, zda i po vytvoření kompozitu s jednotlivými sorbenty bude tato vlastnost zachována, byl použit normovaný test IS/ISO 20200. Testovány byly PHB textilie s příměsí MnO₂, aktivního uhlí a také vlákenná textilie z PHB. Test zaměřený na dezintegraci materiálu probíhal při termofilních podmínkách - 58°C. Textilie byly vystaveny umělému kompostu (Tabulka 2) po dobu potřebnou k rozložení materiálu (15 dnů).

Tabulka 2: Složení kompostovací půdy

Materiál	Obsah [%]
Piliny	40
Králíčí krmivo	30
Čerstvý kompost	10
Kukuřičný škrob	10
Sacharóza	5
Kukuřičný olej	4
Močovina	1

Ze všech tří materiálů byl kompozit tvořený PHB – MnO₂ (1:1) nejrychleji dezintegrováným materiálem, ke kompletnímu rozpadu došlo již 8. den testování. Kompozitní vlákenná textilie PHB – aktivní uhlí byla zcela rozložena po 10 dnech od začátku testu. V porovnání s výše uvedenými materiály byla PHB vlákenná textilie nejvíce odolnou a ke kompletní dezintegraci došlo po 13 dnech. Můžeme konstatovat, že k rozpadu všech tří testovaných vlákných textilií došlo ve velice krátkém časovém úseku, intervalu 8 – 13 dní. Průběh degradace je uveden v Tabulce 3 a na obr. 46.

Tabulka 3: Průběh degradace vláknenných textilií

Den	PHB - mangan (1:1)	PHB - aktivní uhlí (1:1)	PHB	
0.	zahájen biodegradční test (teplota 58°C a vlhkost 55%) nano-vláknenných textilií (počáteční rozměry textilie 15x10 cm)			
1.				
2.				
3.	Pozorován počátek dezintegrace materiálu	Pozorován počátek dezintegrace materiálu	beze změny	
4.				
5.				
6.	Pozorována pokročilý stupeň dezintegrace	Pozorována pokročilý stupeň dezintegrace	beze změny	
7.				
8.	rozpad materiálu	Pozorována pokročilý stupeň dezintegrace	Pozorována pokročilý stupeň dezintegrace	
9.				
10.		rozpad materiálu	Pozorována pokročilý stupeň dezintegrace	
11.				
12.				
13.			rozpad materiálu	
14.				
15.				

Průmyslová využitelnost

Připravený materiál nachází uplatnění v oblasti filtrace vod, kde v materiálu jsou spojeny výhody polymerního materiálu připravitelného z obnovitelných zdrojů a jeho biodegradability s jeho vláknennou formou, která umožňuje filtraci objektů jak mechanického tak bakteriálního charakteru. Přidaný sorbent je přítomen v materiálu ve své aktivní formě, tedy umožňuje absorpci anorganických a organických látek. Materiál je využitelný jako účinná náplň filtračních zařízení, u kterých materiál umožňuje i zachycení absorbovatelných látek.

20 2016-12-3
D. O. P. S.

Patentové nároky

1. Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál se sorpčnými vlastnostmi, vyznačující se tím, že sorbent je spojen s vláknem vybraným ze skupiny biodegradabilních polymerů polyhydroxyalkanoátů, poly-3-hydroxybutyrátu a biodegradabilního kopolymeru poly-3-hydroxybutyrátu-co-valerátu.
2. Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál podle nároku 1, vyznačující se tím, že vlákno je tvořeno směsí biodegradabilního poly-3-hydroxybutyrátu a k němu odlišnému biodegradabilního polymeru.
3. Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál podle nároku 1 a 2, vyznačující se tím, že průměr vlákna je menší než použitý sorbent, přičemž částice sorbentu zasahují alespoň část celého průřezu vlákna.
4. Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál podle nároku 3, vyznačující se tím, že sorbent je tvořen částicemi o průměru od 50 nm do 50 μ m.
5. Biodegradabilní vlákenný filtrační materiál podle nároku 1-4, vyznačující se tím, že sorbent je vybrán ze skupiny sorbentů tvořených aktivním uhlím, oxidů kovů a oxidů polokovů.
6. Způsob výroby biodegradabilního vlákného filtračního materiálu podle nároku 1-5, vyznačující se tím, že zvláknování se provádí technikou odstředivého zvláknování, přičemž z vlákna se vytváří vlákně rouno, které se vytváří propojením vláken o průměru do 50 μ m.
7. Způsob výroby biodegradabilního vlákného filtračního materiálu podle nároku 1-5,

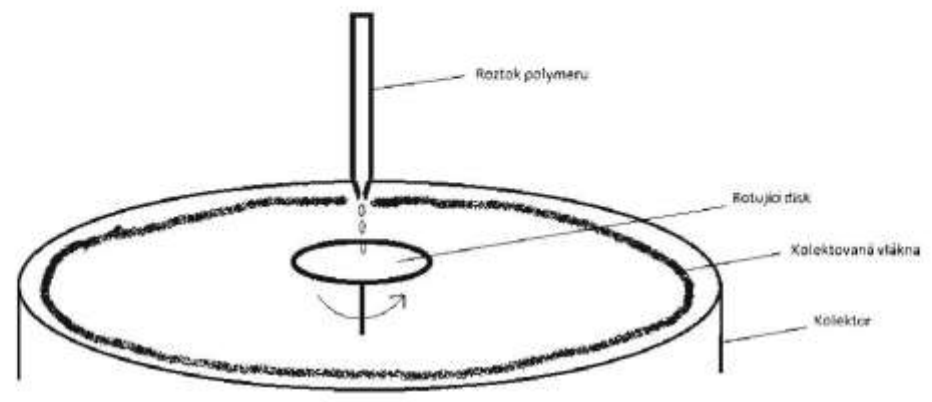


příčemž z vlákna se vytváří vlákenné rouno, které se vytváří propojením vláken o průměru do 50 μm .

8. Způsob výroby biodegradabilního vlákenného filtračního materiálu podle nároku 1-7, vyznačující se tím, že sorbent se uzavře mezi vlákny současně se zvlákněním z roztoku.
9. Způsob výroby biodegradabilního vlákenného filtračního materiálu podle nároku 1-7, vyznačující se tím, že sorbent se uzavře mezi vlákny současně se zvlákněním ze suspenze.

20 1016-423
13.07.16

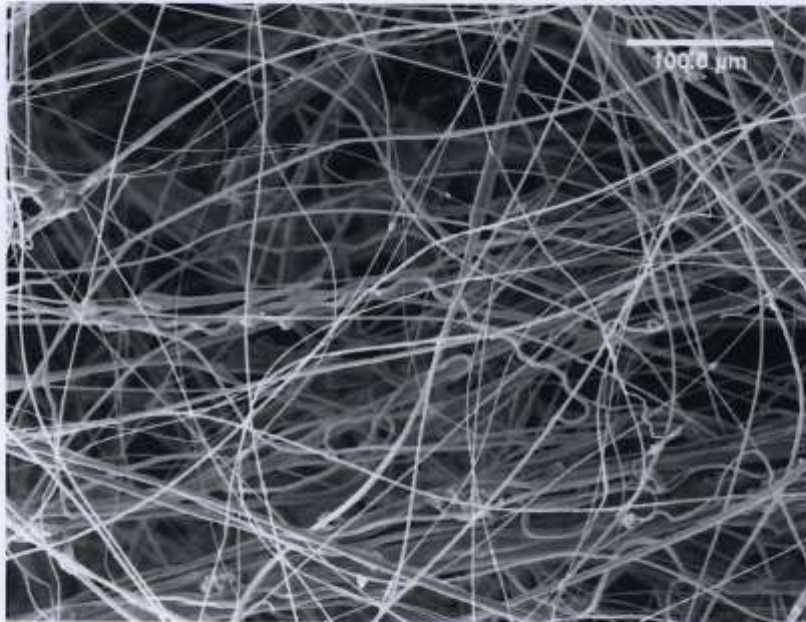
1/26



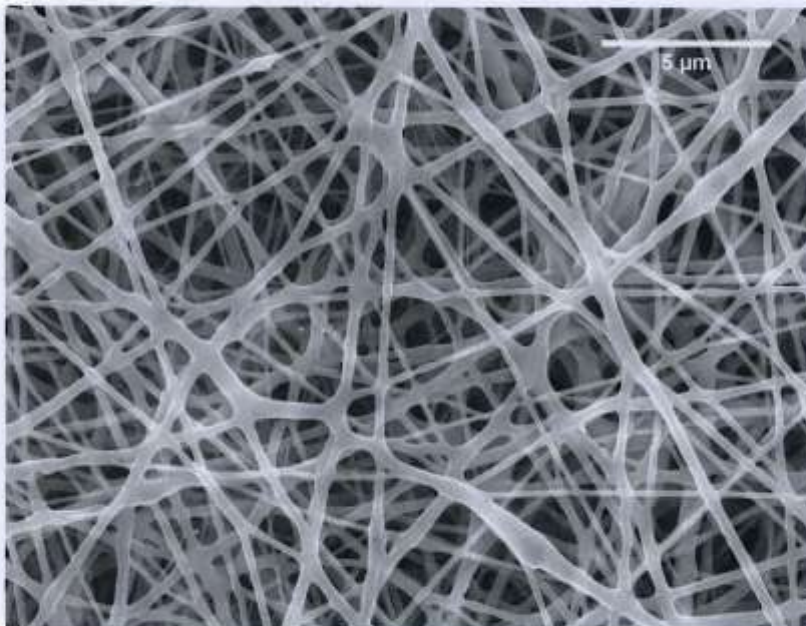
Obr. 1

PN 2016-421
13.07.18

2/26



Obr. 2



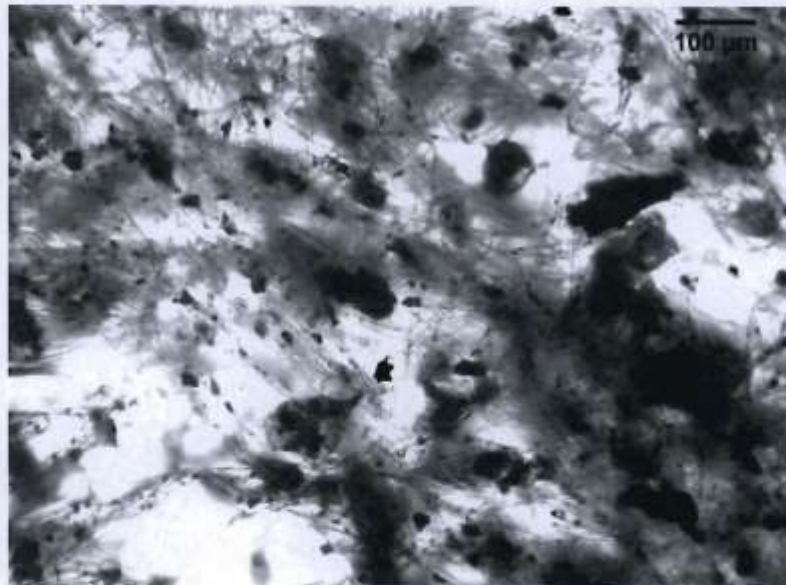
Obr. 3

202016-423
13.07.18

3/26



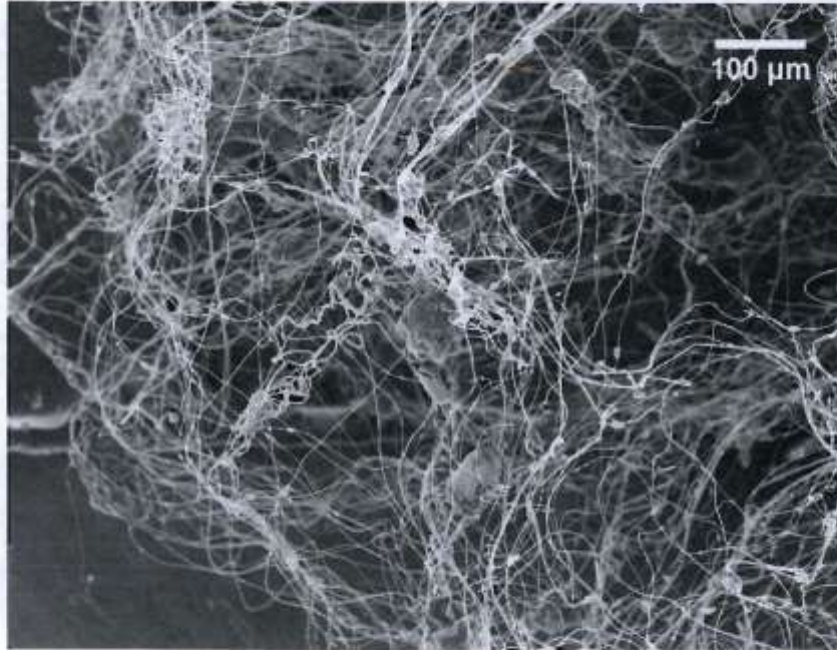
Obr. 4



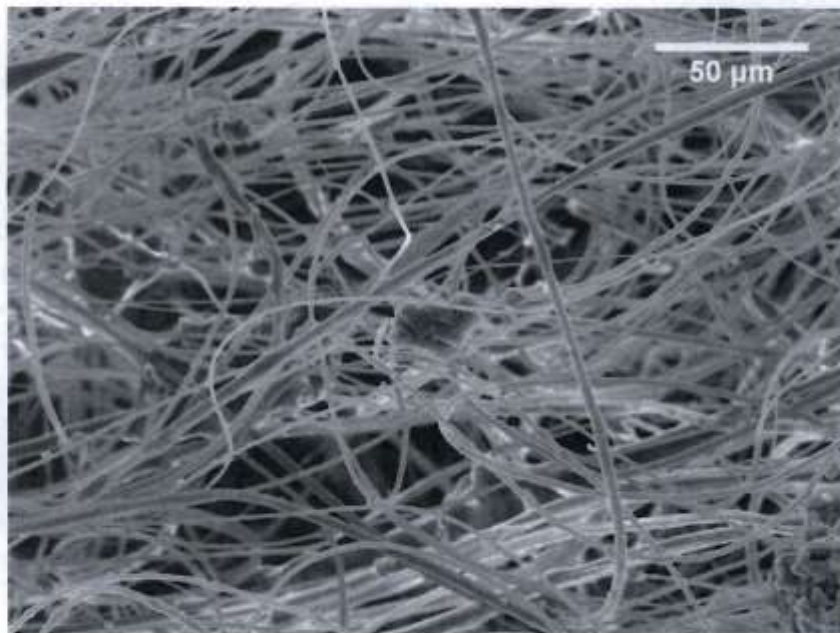
Obr. 5

4/26

20 2016-423
13.07.16



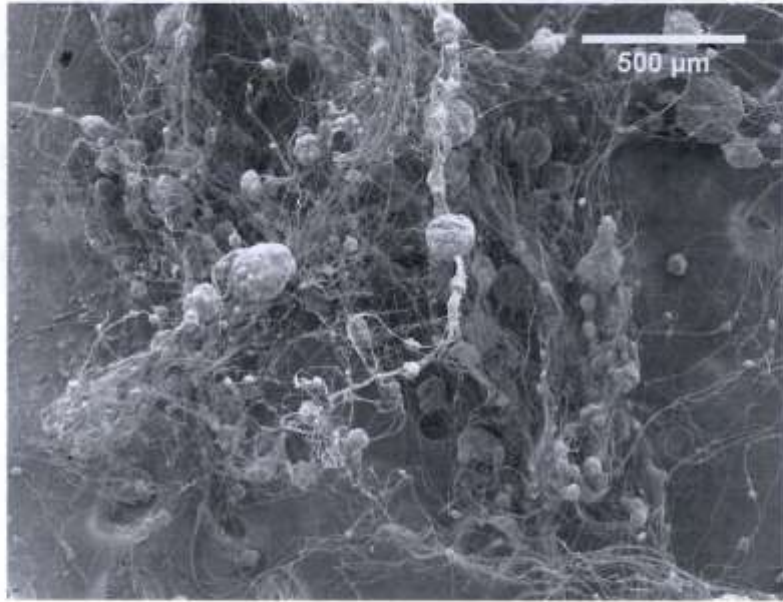
Obr. 6



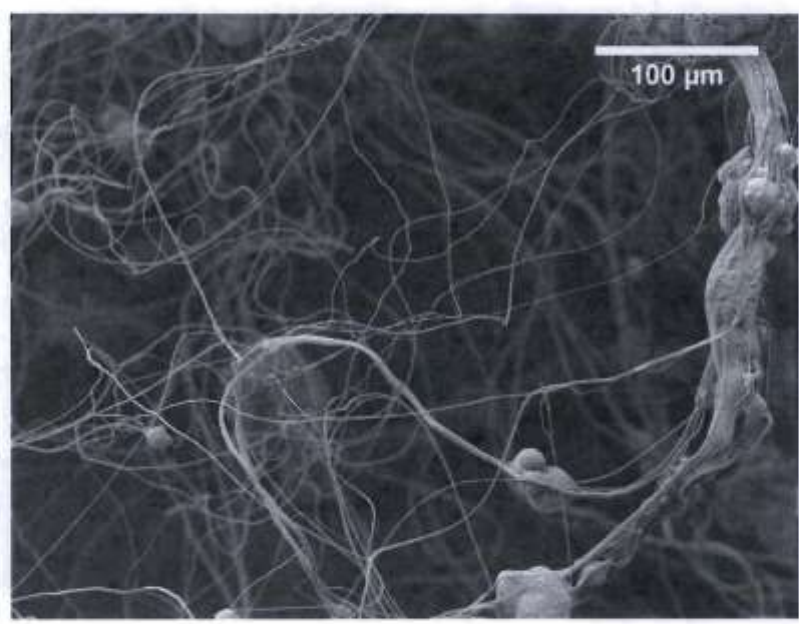
Obr. 7

RJ 2616-423
13.07.16

5/26



Obr. 8

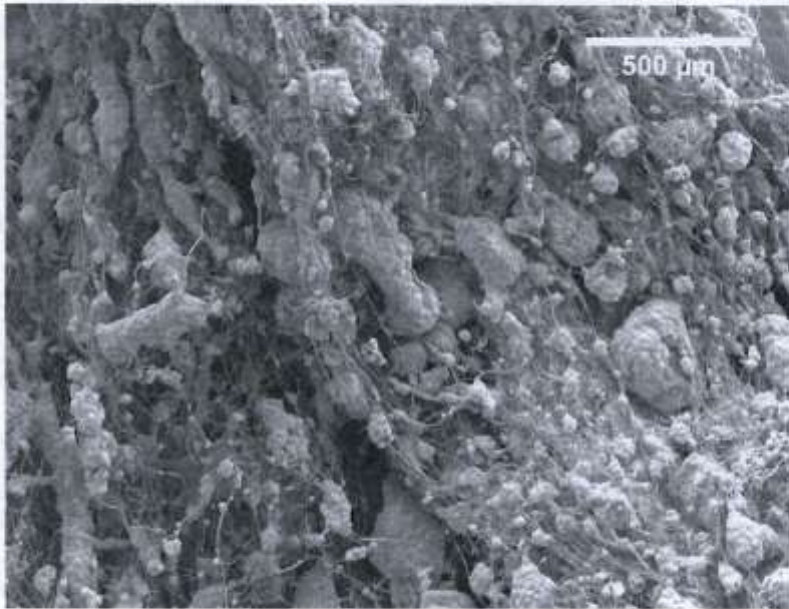


Obr. 9

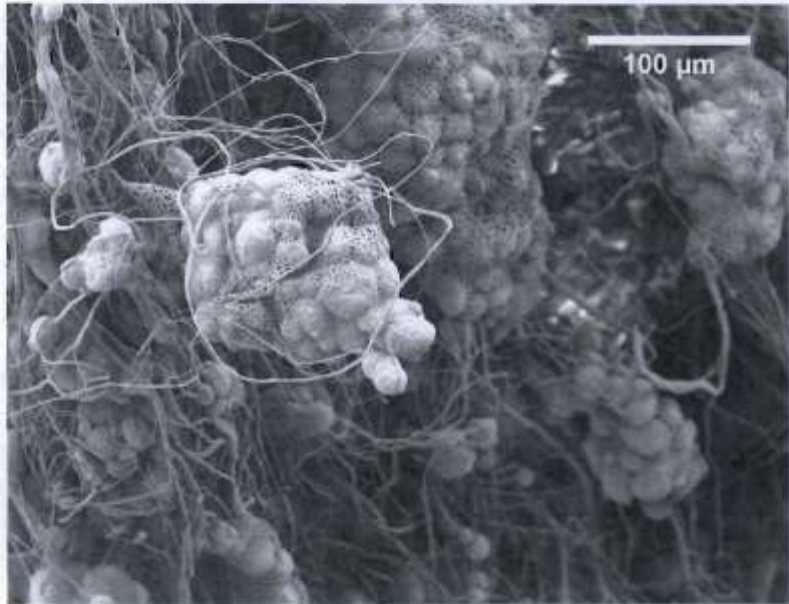
RJ 6016-423

13.07.16

6/26



Obr. 10

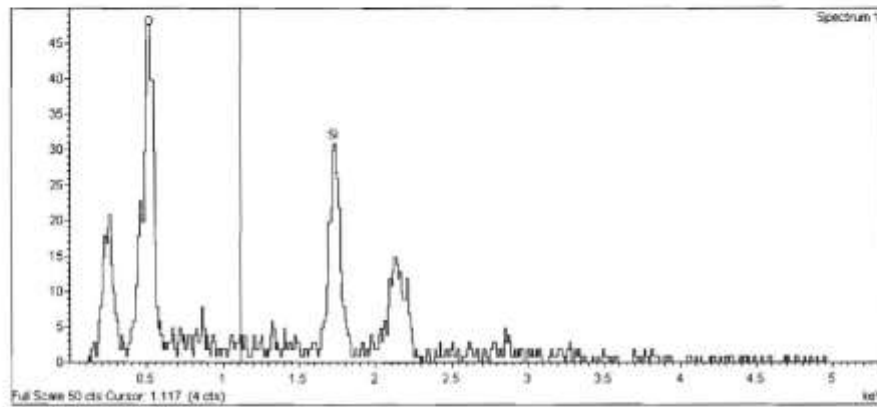


Obr. 11

702016-423

13.07.16

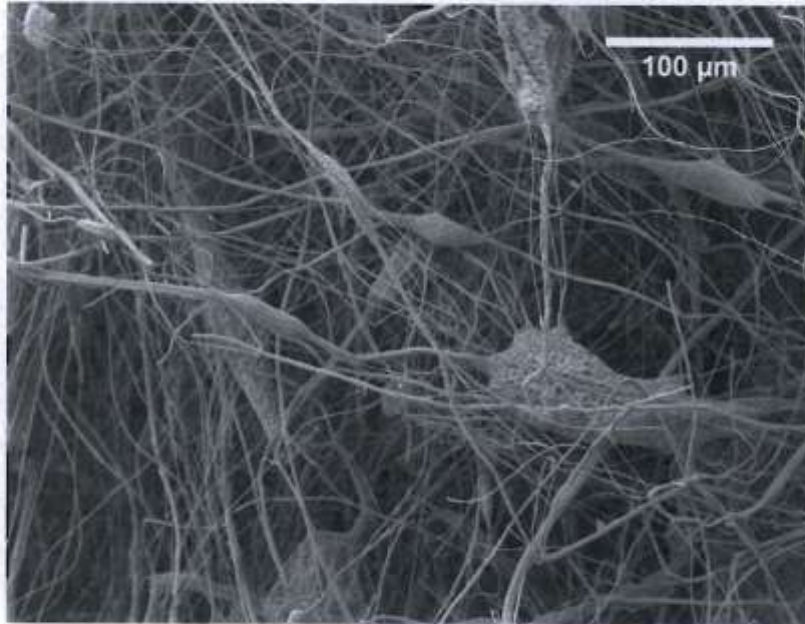
7/26



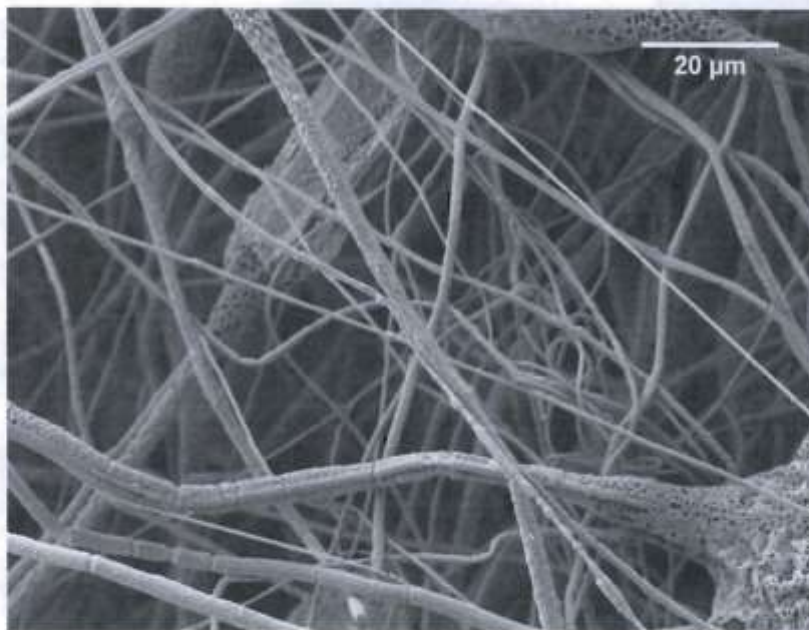
Obr. 12

8/26

RJ 2016-423
13.07.16



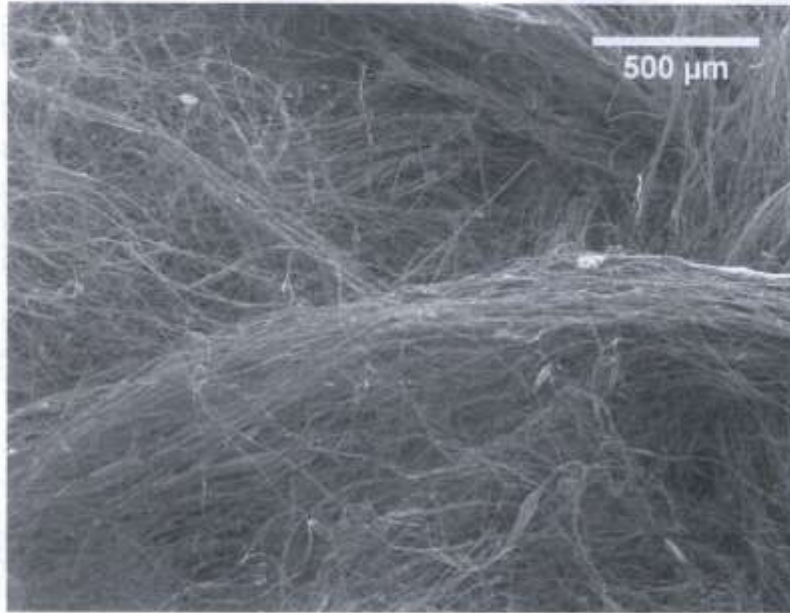
Obr. 13



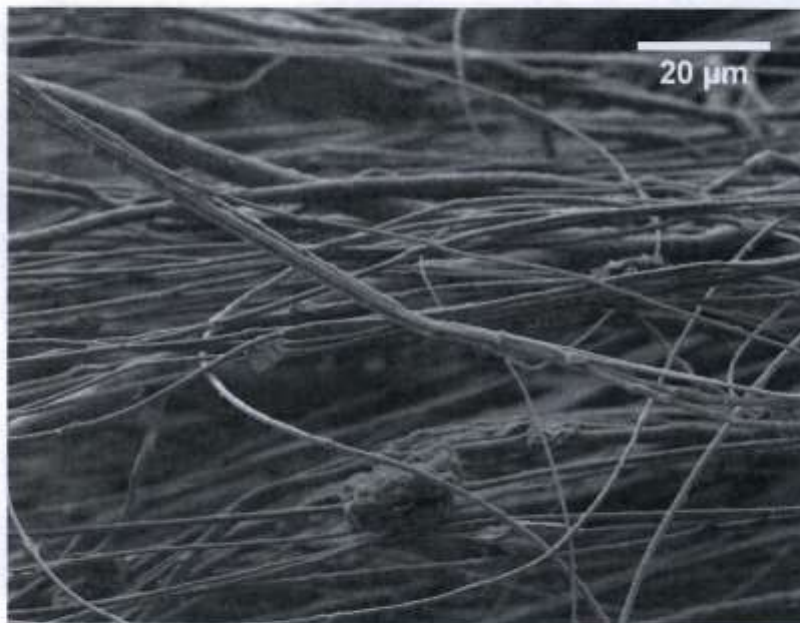
Obr. 14

R3 2016-423
13.07.16

9/26



Obr. 15

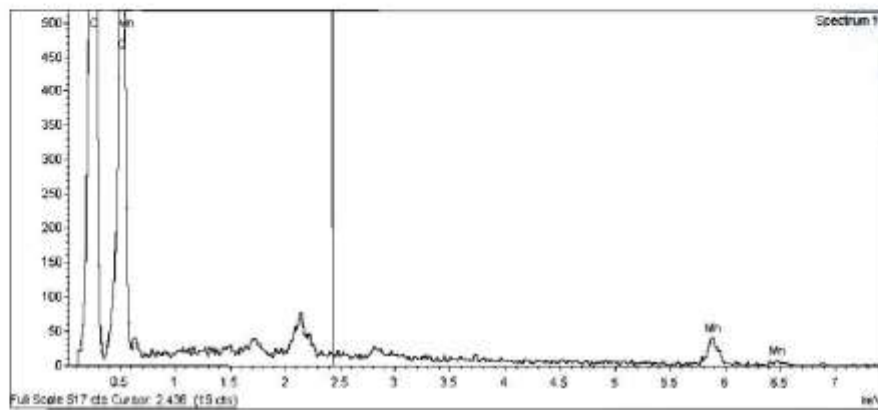


Obr. 16

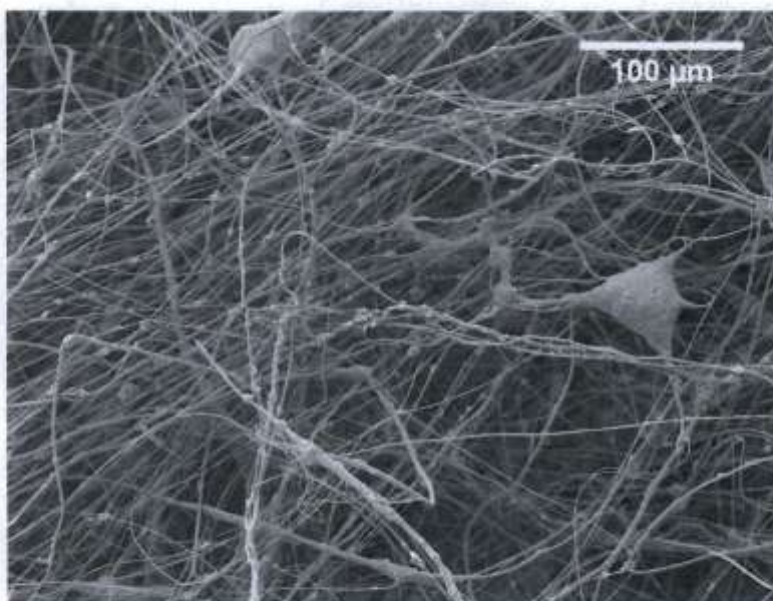
2016-423

13.07.16

10/26



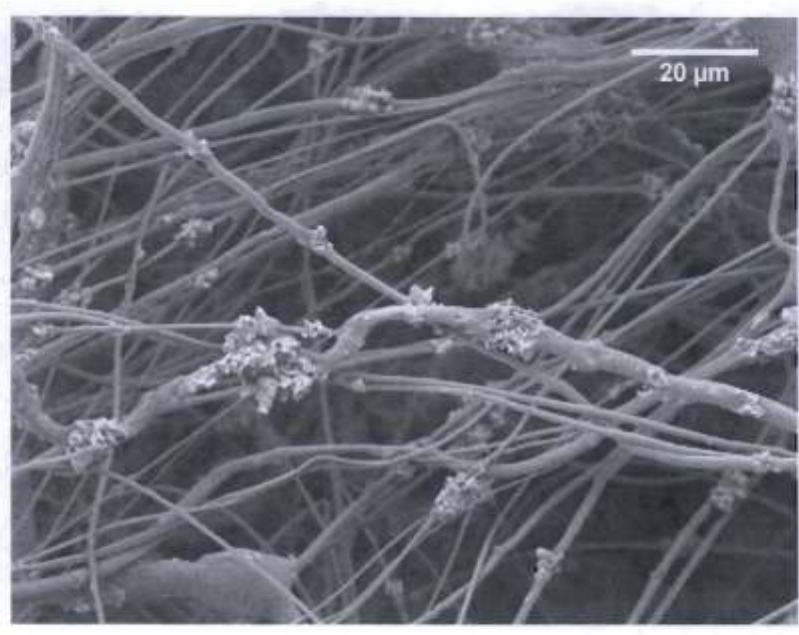
Obr. 17



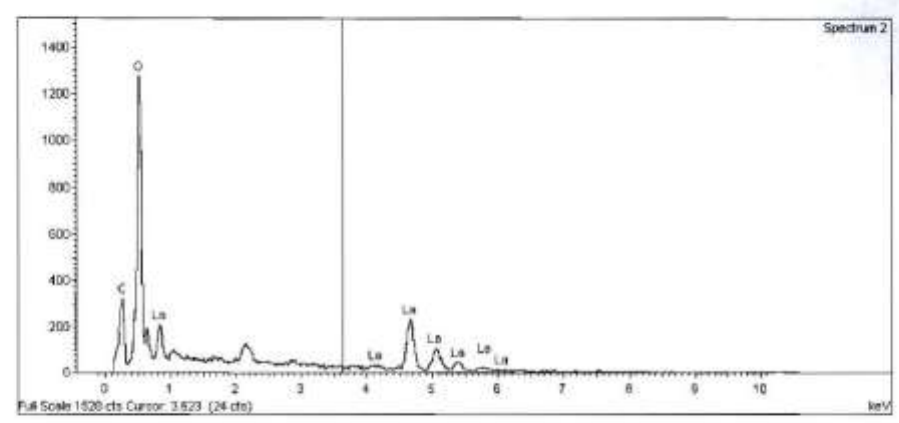
Obr. 18

DJ 2016-423
13.07.16

11/26



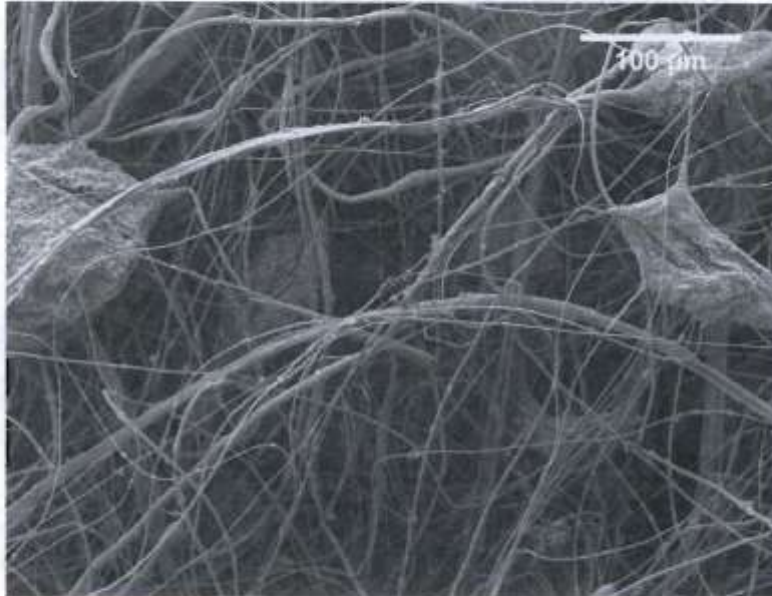
Obr. 19



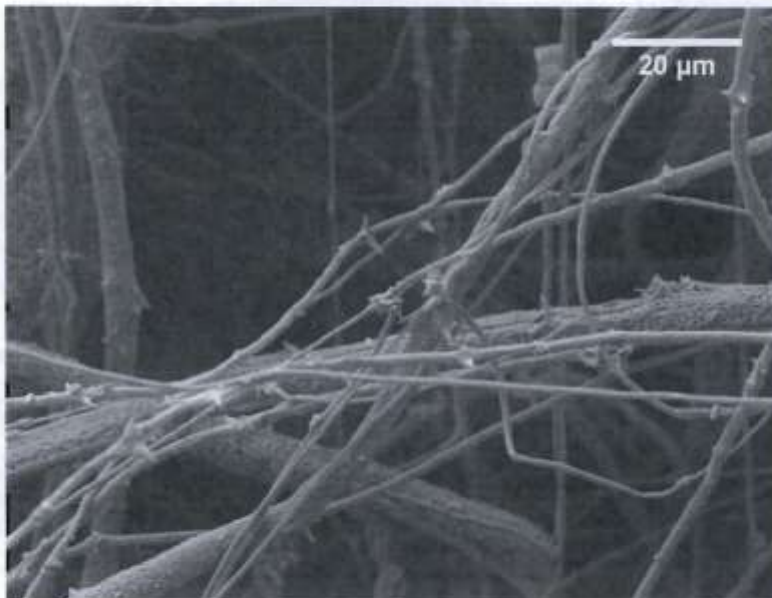
Obr. 20

PV 2016 - 423
13.07.16

12/26



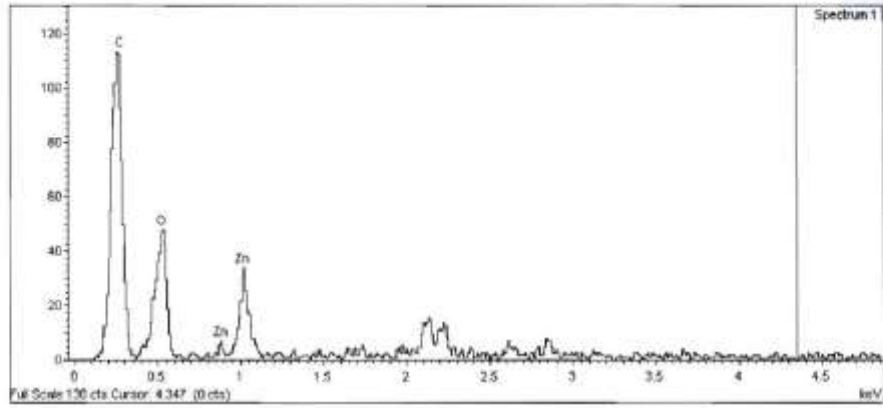
Obr. 21



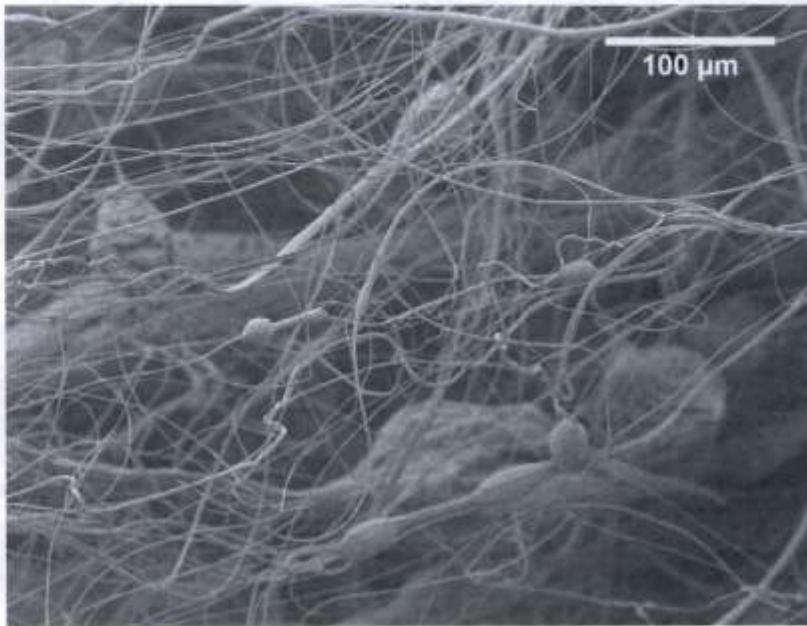
Obr. 22

DS 2016-423
13.07.16

13/26



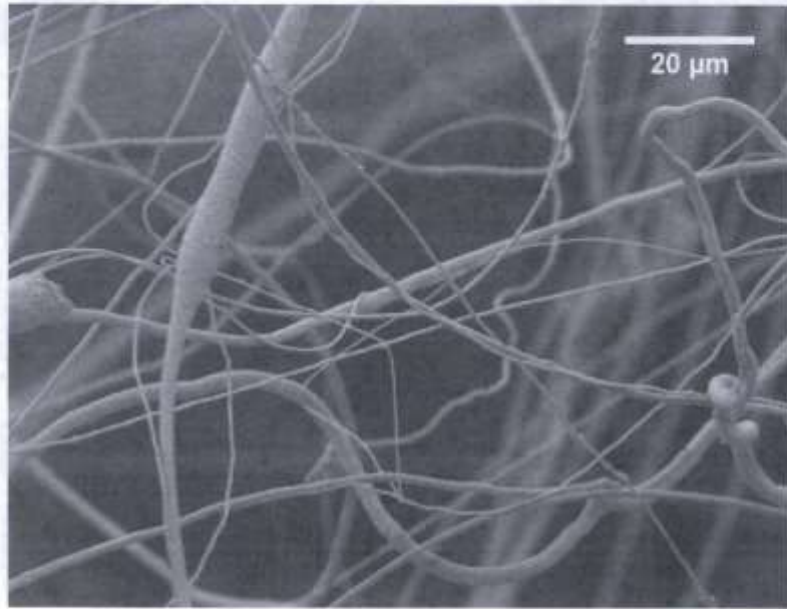
Obr. 23



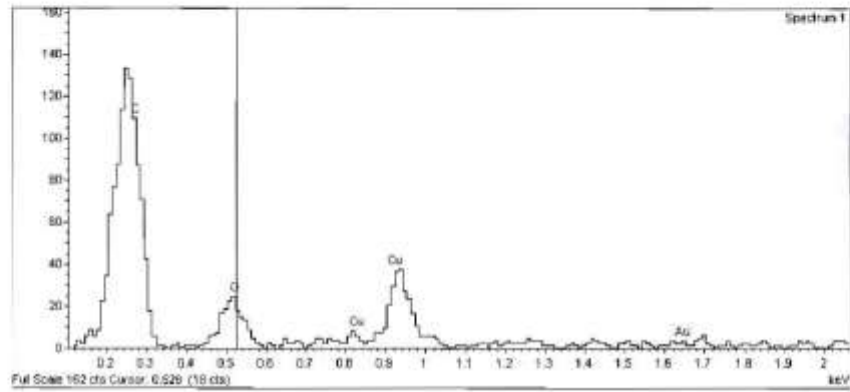
Obr. 24

FV 2016-423
13.07.18

14/26



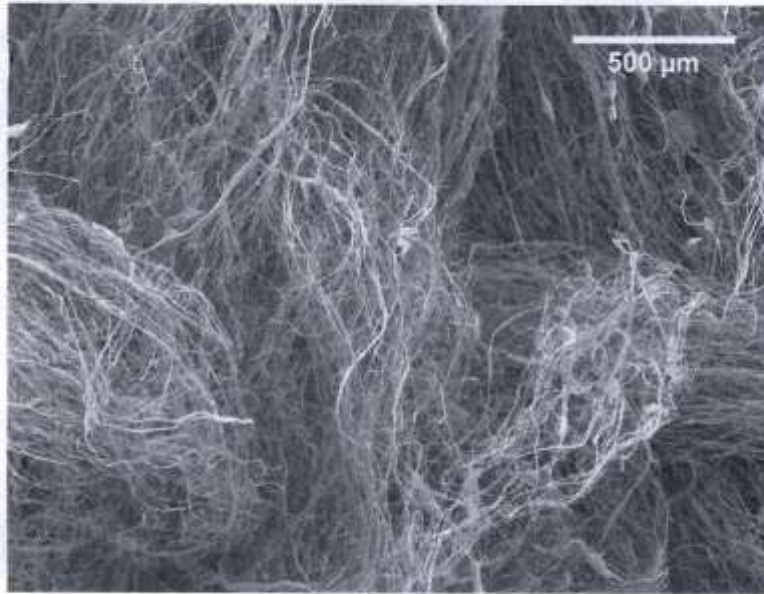
Obr. 25



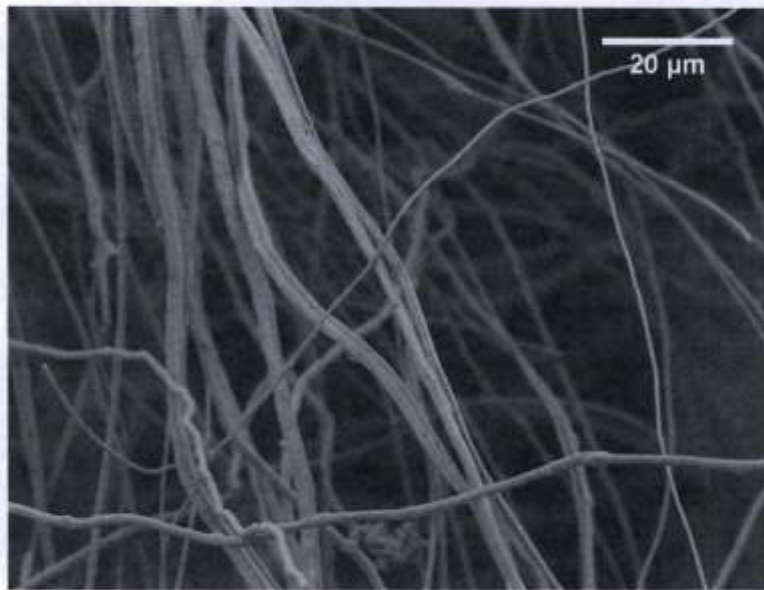
Obr. 26

20 2016-423
13.07.16

15/26



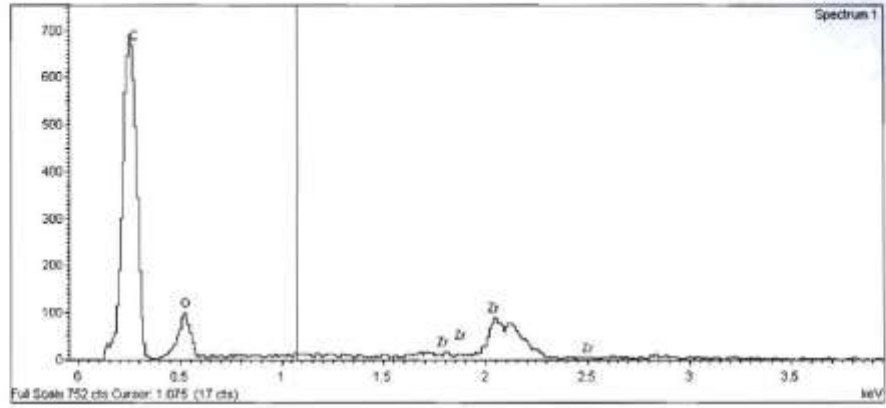
Obr. 27



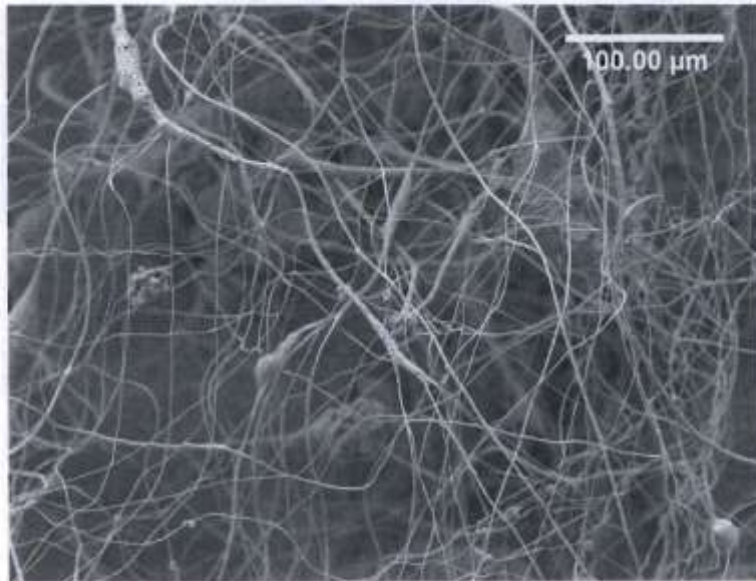
Obr. 28

2016-423
13.07.16

16/26



Obr. 29



Obr. 30

PŘÍLOHA 5

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2018-197

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08L 67/04 (2006.01)
C08K 5/19 (2006.01)
C08K 5/49 (2006.01)
D01F 8/14 (2006.01)
A61K 8/14 (2006.01)
A61K 8/63 (2006.01)
A61K 8/85 (2006.01)
A61K 8/96 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.04.2018**

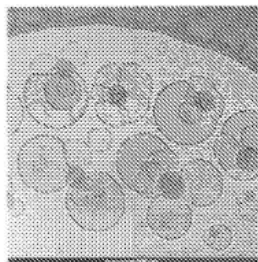
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **04.12.2019**
(Věstník č. 49/2019)

- (71) Přihlašovatel:
NAFIGATE Corporation, a.s., Praha 9, Prosek, CZ
- (72) Původce:
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc., Brno, Bystřice, CZ
Ing. Renata Pavelková, Znojmo, CZ
Mgr. Vojtěch Kunderát, Ostrava, Moravská Ostrava,
CZ
Ing. Petra Matoušková, Ph.D., Budišov, CZ
- (74) Zástupce:
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, Zábrdovická 801/11, 615 00
Brno, Zábrdovice

(54) Název přihlášky vynálezu:
**UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a
způsob jeho přípravy**

- (57) Anotace:
Popisuje se UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu,
který obsahuje částice z polyhydroxybutyrátu o
velikosti 0,2 až 500 µm, které jsou
funkcionalizované alespoň jedním organickým UV
filtrem přírodního původu v celkové koncentraci 2
až 10 %. Popisuje se také příprava tohoto UV filtru.

CZ 2018 - 197 A3



UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a způsob jeho přípravy

Oblast techniky

5

Vynález se týká UV filtru na bázi polyhydroxybutyrátu.

Vynález se dále týká také způsobu výroby UV filtru na bázi polyhydroxybutyrátu.

10

Dosavadní stav techniky

UV záření je elektromagnetické záření s vlnovou délkou 100 až 400 nm; podle vlnové délky a biologických účinků se dělí na tři typy:

15

UVA záření s vlnovou délkou 320 až 400 nm představuje cca 99 % UV záření, které dopadá na zemský povrch. Toto záření proniká hlouběji do kůže, vyvolává pigmentaci a erytém a ovlivňuje hlubší struktury v kóriu (imunosupresivní efekt, akcelerace aktinického stárnutí), kromě toho také vytváří velmi reaktivní druhy kyslíku, které nepřímo poškozují DNA. UVA záření z umělých zdrojů se používá např. v soláriích a v dermatologické fototerapii.

20

UVB záření s vlnovou délkou 290 až 320 nm představuje cca 1 % UV záření, které dopadá na zemský povrch. Toto záření je karcinogenní a je schopné rozkládat nebo narušovat bílkoviny nebo jiné životně důležité organické sloučeniny a prostřednictvím tvorby pyrimidinových dimerů přímo poškozovat DNA. UVB záření z umělých zdrojů se využívá např. v dermatologické fototerapii.

25

UVC záření s vlnovou délkou 100 až 290 nm a na zemský povrch v podstatě nedopadá, neboť je za vzniku ozonu inhibováno plynným kyslíkem v zemské atmosféře. Toto záření je prokazatelně zhoubné pro živé organismy – je karcinogenní.

30

V lidské pokožce je UV záření absorbováno řadou chromoforů, jako je melanin, DNA, RNA, proteiny, aromatické aminokyseliny (např. tyrosin a tryptofan), lipidy, voda a jiné. Absorbování UV záření těmito chromofory přitom vede k různým fotochemickým reakcím a sekundárním interakcím zahrnujícím reaktivní částice (kyslíku a dusíku), které mohou mít škodlivé účinky. Samotná lidská pokožka sice disponuje řadou antioxidantů a enzymů, které opravují poškozenou DNA, přesto však může vlivem UV záření docházet k jejímu poškození, mutacím a genetické nestabilitě. Proto se vyvíjí různé ochranné prostředky proti UV záření a jeho negativním účinkům (většně urychleného stárnutí kůže), které se nejčastěji přidávají do různých kosmetických přípravků – opalovacích mlék, krémů, plečových masek apod., nejčastěji v koncentraci 0,1 až 10 %.

35

40

V současné době jsou přitom k dispozici anorganické (fyzikální) a organické (chemické) UV filtry. Anorganické UV filtry odráží a rozptylují světlo, přičemž oba tyto jevy se uskutečňují na širokém spektru záření od viditelného, přes UV až po infračervené. K anorganickým UV filtrům patří např. minerální mikročástice TiO_2 , které vykazují lepší ochranu před UVB zářením nebo ZnO , které naopak vykazují vyšší ochranu před UVA zářením apod. Tyto UV filtry jsou fotostabilní, ale při jejich použití je nutné pro dosažení požadovaného účinku obvykle nanést větší vrstvu daného kosmetického přípravku. Při miniaturizaci částic těchto filtrů na velikosti 10 až 50 nm se snižuje rozptyl viditelného světla a efektivní rozptyl se posunuje k nižším vlnovým délkám, až pod rozsah UVA záření, čímž se dosahuje lepší přijatelnosti těchto filtrů k využití v kosmetických přípravcích. Částice těchto velikostí ale mají vyšší tendenci k agregaci, v důsledku čehož se může efektivita rozptylu světla snižovat. Díky vysoké fotostabilitě jsou anorganické UV filtry využívány především pro ochranu dětí a lidí alergických na organické UV filtry. Organické UV filtry, také známé jako chemické UV filtry pak sluneční záření absorbují a

55

mění zejména jeho UVB složku na tepelnou energii [1]. Jejich nevýhodou je, že absorbují záření jen v určité úzké oblasti, a proto je pro vytvoření produktu s ochrannou proti širšímu spektru UV záření většinou nutné použít vhodnou kombinaci několika z nich. K typickým a nejpopulárnějším představitelům organických UV filtrů patří filtry na bázi cinamátů, vě. octinoxatu a cinoxatu nebo na bázi salicylátů, které na kůži nevytvářejí skvrny a jen vzácně způsobují podráždění. Vzhledem k tomu, že tyto filtry vykazují menší účinnost a nižší voděodolnost, vyžadují častější aplikace. Další jejich nevýhodou je, že při vystavení slunci degradují, v důsledku čehož se snižuje jejich efektivita [1].

Kromě využití UV filtrů jednoho typu je možné v jednom prostředku kombinovat organické a anorganické filtry, přičemž tyto kombinace mohou vykazovat synergický efekt a dosahovat tak vyššího ochranného faktoru.

K hodnocení účinnosti UVB filtrů se používá ochranný faktor SPF („sun protection factor“), který udává poměr dávky UVB záření potřebné k vytvoření minimálního erytému (MED - „minimal erythema dose“) na chráněné pokožce ve srovnání s nechráněnou pokožkou. Tento faktor se stanovuje in vivo. Např. výrobek s ochranným faktorem 15 odfiltruje 94 % UVB záření, výrobek s ochranným faktorem 30 pak 97 % [2].

K hodnocení ochrany před UVA zářením je k dispozici standardní EN ISO 24443:2012 test pro stanovení ochranného faktoru kosmetických prostředků. Kromě ochranného faktoru se u kosmetických přípravků hodnotí také jejich rezistence a rezistence v nich obsažených UV filtrů vůči vodě [2].

Jako jedna z možností, jak prodloužit účinek a stabilitu UV filtrů v kosmetických prostředcích se jeví enkapsulace těchto filtrů do vhodných nosičů pro cílený transport do lidského organismu. S ohledem na hydrofobní bariéru na povrchu těla se jako takové nosiče nejčastěji využívají liposomy, které jsou schopné projít touto kožní bariérou, mají hydrofobní povrch a mohou enkapsulovat různé hydrofobní i hydrofilní molekuly.

Současný trend v kosmetice a v oblasti osobní ochrany před UV zářením směřuje k používání přírodních UV filtrů, jako jsou např. karotenoidy, některé polyfenoly, chlorofyly a další přírodní molekuly, často ještě v kombinaci s přírodními antioxidanty (jako např. tokoferolem, askorbátem a různými směsmi), a případně i k využívání přírodních nosičů, aby se co nejvíce eliminovalo používání syntetických polymerů a s tím související zátěž pro životní prostředí. V současné době jsou tak komerčně dostupné například preparáty z různých typů mořských a sladkovodních řas, u nichž se deklaruje nejen ochranný efekt proti UV záření, ale také pozitivní vliv na kůži a omlazovací efekt. Seriózní studie zaměřené na analýzu reálného potenciálu řas k ochraně před UV zářením a jejich použití v kosmetických přípravcích jsou přehledně shrnuté např. v [2]. Z [3] je pak známé např. použití extraktu z červené řasy (*Porphyra umbilicalis*) v komplexu s extraktem z *Ginkgo biloba* a vitaminy A, C a E, který zvyšuje ochranný faktor kosmetického přípravku o 20 %. Z [4] je známé, že extrakt z řas může v kosmetickém přípravku nahradit alespoň část syntetických UV filtrů, neboť působí jako ochrana proti poškození DNA a proti zarudnutí pokožky a současně podporuje buněčnou obnovu. Vhodným zdrojem dalších aktivních látek použitelných pro ochranu před UV zářením jsou mj. také sinice (cyanobakterie) [5]. Např. sinice *Scytonema hoffman*, rostoucí při vysokých intenzitách světla (300 až více než 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) je zdrojem scytonemin-3 α -iminu, což je nově identifikovaný pigment červeno-mahagonové barvy, který je považován za nový přírodní UV filtr použitelný v kosmetických přípravcích [6]. Kromě řas a extraktů z nich se z hlediska využitelnosti pro ochranu před UV zářením testovala také řada dalších přírodních látek a rostlinných extraktů, jako např. polyfenoly a flavonoidy. Mezi zdroje těchto aktivních látek patří také například zelený čaj, ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*), kurkuma dlouhá, réva vinná, spatodea zvonkovitá, kapara trnitá, bazalka pravá, mandloň obecná (*Prunus amygdalus*), kaleda lysá (*Pongamia pinnata*) a další – viz např. [7, 8]. Dále byl aktivně studován také efekt kůry stromu *Zanthoxylum rhetsa*, který může být využit jako přírodní aktivní složka širokospektrálních opalovacích prostředků a

prostředků proti stárnutí [8]. Dalším komplexním přírodním materiálem s vlastnosti UV filtru jsou různé druhy rostlinných olejů [9], vč. oleje ze zelené kávy [10], pražené kávy [11] i odpadů po přípravě kávy [12]. Nevýhodou je, že pro dosažení ochranného faktoru 20 je nutné tyto přírodní UV filtry kombinovat se syntetickými UV filtry, zejména anorganickými filtry typu TiO₂ nebo ZnO.

Jako potenciální nosiče těchto UV filtrů byla do současné doby vytipována a otestována řada různých polymerů a kompozitů, jako např. nanokompozit na bázi hydroxyapatitu, který absorbuje záření v UV oblasti, a kyseliny askorbové stabilizovaný polyvinylpyrrolidonem, jehož výhodou je, že není cytotoxický [13]. Další variantou je např. kompozit karboxymethyl-chitosanu a karboxymethylcelulózy z ananasové kůry, který se testoval jako nosič TiO₂ [14], apod.

Kromě toho je v současné době známý také gel proti slunečnímu záření s hydroxyapatitem a chitosanem, do kterého může být doplněna řada účinných látek, a který současně likviduje multirezistentní bakterie [15].

Cílem vynálezu je navrhnout UV filtr, čistě na bázi přírodních sloučenin a způsob pro přípravu takového filtru.

Reference

- [1] Trager R.: „US bans microbeads from personal care products“ Chemistry World, January 2016.
- [2] Wang H.M.D., Chen Ch.Ch., Hyunh P., Chang J.S.: „Exploring the potential of using algae in cosmetics“ Bioresource Technology 184, 2015, pp. 355-362.
- [3] Mercurio D.G., Wagemaker T.A.L., Alves V.M. et al.: „In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, *Ginkgo biloba* and red algae extracts“ Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 153, 2015, pp. 121-126.
- [4] Chiari B.G., Trovati E., Pecoraro E. et al.: „Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application“ Industrial Crops and Products 52, 2014, pp.389-393.
- [5] Sinha R.P., Häder D.P.: „UV-protectants in cyanobacteria“ Plant Science 174 (3), 2008, pp. 278-289.
- [6] Grant C.S., Louda J.W.: „Scytonenin-imine, a mahogany-colored UV/Vis sunscreen of cyanobacteria exposed to intense solar radiation“. Organic Geochemistry 65, 2013, pp. 29-36.
- [7] Rojas J., Londono C., Ciro Y.: „THE HEALTH BENEFITS OF NATURAL SKIN UVA PHOTOPROTECTIVE COMPOUNDS FOUND IN BOTANICAL SOURCES“ International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 8(3), 2016.
- [8] Santhanam R.K., Akhtar M.T., Ahmad S., Abas F., SafinarIsmael I., Rukayadi Y., Shaari K.: „Utilization of the ethyl acetate fraction of *Zanthoxylum rhetsa* bark extract as an active ingredient in natural sunscreen formulations“ Industrial Crops and Products 96, 2017, pp.165-172.
- [9] Lăcătușu G.B., Badea N., Ott C., Meghea A.: „Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity“ Industrial Crops and Products 67, 2015, pp 18-24.

[10] Chiari B.G., Trovati E., Pecoraro E. et al.: „Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application“ *Industrial Crops and Products* 52, 2014, pp. 389-393.

5 [11] Rodrigues F., Alves A.C., Nunes C. et al.: „Permeation of topically applied caffeine from a food by-product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option?“ *International Journal of Pharmaceutics* 513 (1-2), 2016, pp. 496-503.

[12] Marto J., Gouveia L.F., Chiari B.G. et al.: „The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products“ *Industrial Crops and Products* 80, 2016, pp. 93-100.

[13] Amin R.M., Elfeky S.A., Verwanger T., Krammer B.: „A new biocompatible nanocomposite as a promising constituent of sunscreens“ *Materials Science and Engineering C*, Volume 63, 1 June 2016, Pages 46-51. doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.044.

15 [14] Wongkom L., Jimtaisong A.: „Novel biocomposite of carboxymethyl chitosan and pineapple peel carboxymethylcellulose as sunscreen carrier“ *Int.J.Biol.Macromolek.* Volume 95, February 2017, Pages 873-880.

20 [15] Morsy R., Ali S.S., El-Shetchy M.: „Development of hydroxyapatite-chitosan gel sunscreen combating clinical multidrug-resistant bacteria“ *Journal of Molecular Structure* 1143, 2017, pp.251-258.

25 Podstata vynálezu

Cíle vynálezu se dosáhne UV filtrem na bázi polyhydroxybutyrátu, který obsahuje částice z polyhydroxybutyrátu o velikosti 0,2 až 500 µm, které jsou funkcionalizované alespoň jedním organickým UV filtrem přírodního původu v celkové koncentraci 2 až 10 %. Tento UV filtr je určený zejména pro dermální aplikace pro osobní ochranu před UV zářením. Všechny jeho složky jsou bezpečné a neškodné vůči lidskému zdraví i životnímu prostředí.

35 V závislosti na způsobu přípravy je alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu inkorporován, s výhodou s možností uvolnění, ve vnitřní struktuře a/nebo na povrchu částic z polyhydroxybutyrátu, nebo na povrchu částic z polyhydroxybutyrátu a/nebo v jejich liposomovém obalech a/nebo na povrchu jejich liposomových obalů a/nebo v prostorech mezi částicemi z polyhydroxybutyrátu a jejich liposomovými obaly.

40 V případě, kdy je UV filtr tvořen částicemi z polyhydroxybutyrátu s liposomovým obalem, je liposomový obal s výhodou tvořený lecithinem a zpevňným cholesterolem, přičemž poměr lecithinu a cholesterolu v tomto obalu je s výhodou 9:1 až 1:1.

Koncentrace polyhydroxybutyrátu u tohoto typu filtrů je pak s výhodou 20 až 30 %.

45 Cíle vynálezu se dále dosáhne také způsobem výroby UV filtru na bázi polyhydroxybutyrátu, při kterém se do 0,1 až 20% roztoku polyhydroxybutyrátu v chloroformu, dichlorethanu nebo dichlormethanu, nebo směsi alespoň dvou z nich, přidá alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu ve formě extraktu do destilované vody nebo do roztoku ethanolu v destilované vodě a z takto vytvořeného roztoku se zvlákněním vytvoří mikrovlákna o průměru 0,2 až 500 µm s alespoň jedním organickým UV filtrem zakomponovaným ve své struktuře. Tato mikrovlákna se pro další využití mechanicky dezintegrují např. mixováním a/nebo mletím v mechanickém mlýnu, čímž se z nich vytvoří částice polyhydroxybutyrátu o velikosti 0,2 až 500 µm, v jejichž struktuře je zakomponovaný alespoň jeden organický UV filtr v celkové koncentraci 2 až 10 %. Výhodným způsobem zvláknění roztoku polyhydroxybutyrátu je odstředivé zvláknění.

V jiné variantě se 0,1 až 20% roztok polyhydroxybutyrátu v chloroformu, dichlorethanu nebo dichlormethanu, nebo směsí alespoň dvou z nich, vytlačí do srážedla, např. 96% ethanolu, přičemž se z něj sráží mikrovlákna polyhydroxybutyrátu o průměru 0,2 až 500 μm , která mají porézní vnitřní strukturu. Takto vytvořená mikrovlákna se následně mechanicky dezintegrují, např. mixováním a/nebo mletím v mechanickém mlýnu, čímž se z nich vytvoří porézní částice polyhydroxybutyrátu o velikosti 0,2 až 500 μm . Tyto částice se dále inkubují alespoň 1 hodinu při laboratorní teplotě a bez přístupu světla s extraktem alespoň jednoho organického UV filtru přírodního původu extrahovaného 20 až 80% roztokem ethanolu v destilované vodě, přičemž se organický UV filtr/filtry přírodního původu sorbuje v celkové koncentraci 2 až 10 % do porů částic z polyhydroxybutyrátu a/nebo na jejich povrch.

Srovnatelných výsledků se dosáhne také v případě, kdy se mikrovlákna polyhydroxybutyrátu kontaktují s extraktem alespoň jednoho organického UV filtru extrahovaného do 20 až 80% roztoku ethanolu v destilované vodě až během mechanické desintegrace. I v tomto případě se organický UV filtr/filtry sorbuje do porů a/nebo na povrch vznikajících částic polyhydroxybutyrátu v celkové koncentraci 2 až 10 %.

V jiné variantě způsobu přípravy UV filtru podle vynálezu se v chloroformu v libovolném pořadí rozpustí alespoň jeden fosfolipid, cholesterol a polyhydroxybutyrát, a do takto vytvořeného roztoku se přidá alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu ve formě extraktu do destilované vody nebo do roztoku ethanolu v destilované vodě. Takto vytvořená směs se nařadí destilovanou vodou a vystaví se ultrazvuku, přičemž dojde ke spontánnímu uzavření liposomů tvořených obalem z dvojvrstvy fosfolipidu/fosfolipidů s vnitřním prostorem vyplněným vodnou fází kolem pevného jádra polyhydroxybutyrátu a organický UV filtr/filtry přírodního původu se dle polaritě uloží v částicích z polyhydroxybutyrátu a/nebo na jejich površích, a/nebo v jejich liposomovém obalech a/nebo na površích jejich liposomových obalů, a/nebo v prostorech mezi částicemi z polyhydroxybutyrátu a jejich liposomovými obaly. Poté se z takto vytvořené směsi odstraní chloroform a oddělí se z ní částice UV filtru, jejichž velikost je 0,2 až 100 μm , a které obsahují alespoň jeden organický UV filtr v celkové koncentraci 2 až 10 %.

Ve výhodné variantě provedení se alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu použije ve formě extraktu do 30 až 40% roztoku ethanolu v destilované vodě.

Pro vytvoření kombinovaných částic tvořených liposomovým obalem a pevným jádrem z polyhydroxybutyrátu, je výhodný poměr fosfolipidu/fosfolipidů a polyhydroxyalkanoátu v roztoku 9:1 až 1:9, výhodnější pak 8:2 až 7:3.

Ve výhodné variantě provedení se jako fosfolipid použijí lecithin a cholesterol v poměru 9:1 až 1:1.

Objasnění výkresů

Na příložených výkresech je na obr. 1a je snímek liposomových částic z kryogenní elektronové mikroskopie při zvětšení 50 000krát, na obr. 1b snímek kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 10 % z kryogenní elektronové mikroskopie při zvětšení 80 000krát, na obr. 1c snímek kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 20 % PHB z kryogenní elektronové mikroskopie při zvětšení 50 000krát, na obr. 1d snímek kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 30 % PHB z kryogenní elektronové mikroskopie při zvětšení 80 000krát, a na obr. 1e snímek kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 50 % z kryogenní elektronové mikroskopie při zvětšení 10 000krát. Na obr. 2 je graf zobrazující obsah polyfenolů v extraktu ze zelené kávy, pražené kávy a zbytků kávových bobů; na obr. 3 graf zobrazující antioxidační aktivitu extraktů ze zelené a pražené kávy vyjádřenou jako ekvivalent koncentrace standardu Troloxu; na obr. 4 graf

zobrazující účinnost enkapsulace různých typů extraktů ze zelené kávy, pražené kávy a zbytků kávových bobů do kombinovaných částic tvořených liposomy s přísadkou 30 % PHB, a na obr. 5 UV-vis spektra liposomů, PHB a kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s různou koncentrací PHB. Na obr. 6 je graf zobrazující hodnotu ochranného faktoru SPF pro liposomy, PHB a kombinované částice tvořené liposomy a PHB s různou koncentrací PHB a na obr. 7 je graf zobrazující hodnotu ochranného faktoru SPF pro liposomy, PHB a kombinované částice tvořené liposomy a PHB s různým přísadkou extraktu ze zelené a pražené kávy. Na obr. 8a je SEM snímek vláken PHB připravených odstředivým zvlákněním při zvětšení 1 000krát, na obr. 8b a 8c pak SEM snímek vláken PHB připravených srážením do roztoku při zvětšení 8 000krát a 80 000krát; na obr. 9a je SEM snímek dezintegrovaných vláken PHB připravených odstředivým zvlákněním a na obr. 9b SEM snímek dezintegrovaných vláken PHB připravených srážením do roztoku; na obr. 10a pak SEM snímek mletých vláken PHB připravených odstředivým zvlákněním a na obr. 10b SEM snímek mletých vláken PHB připravených srážením do roztoku. Na obr. 11a jsou UV-vis spektra různých extraktů ze zelené kávy; na obr. 11b UV-vis spektra různých extraktů z pražené kávy a na obr. 11c detail UV-vis spekter pro nejvhodnější extrakty ze zelené a pražené kávy. Na obr. 12 je graf znázorňující cytotoxicitu kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 30 %, vyjádřenou jako závislost viability keratinocytů na koncentraci těchto částic.

Příklady uskutečnění vynálezu

UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu (PHB) podle vynálezu je tvořen částicemi z PHB o velikosti 0,2 až 500 μm , které jsou funkcionalizované alespoň jedním známým organickým UV filtrem přírodního původu v celkové koncentraci 2 až 10 %.

Ve výhodné variantě provedení je jádro UV filtru podle vynálezu tvořeno částicí z PHB, přičemž organický UV filtr/filtry je/ jsou inkorporován/inkorporovány ve vnitřní struktuře této částice a případně i na jejím povrchu. Výhodou tohoto provedení je to, že uložení alespoň části UV filtru/filtrů ve vnitřní struktuře této částice prodlužuje jeho/jejich stabilitu a účinnost.

Pro výrobu UV filtru podle vynálezu v tomto provedení lze použít tři postupy, které jsou založené na zvláknění 0,1 až 20% roztoku PHB v chloroformu, dichlorethanu nebo dichlormethanu, nebo směsi alespoň dvou z nich.

V první variantě se do tohoto roztoku PHB pro zvláknění přidá požadovaný organický UV filtr/filtry, např. ve formě extraktu, a při následném zvláknění se tento UV filtr/filtry zakomponuje přímo do struktury vytvářených mikrovláken PHB. Pro zvláknění lze přitom použít libovolný známý postup – např. tryskové nebo beztryskové elektrostatické zvláknění, srážení z roztoku (např. dle CZ 306448) nebo odstředivé zvláknění (např. dle CZ 2016-423) atd. Výsledkem jsou přitom vždy mikrovlákna PHB s průměrem v závislosti na použitém postupu 0,2 až 500 μm s organickým UV filtrem/filtry zakomponovaným/zakomponovanými v jejich struktuře, s výhodou s možností uvolnění. Tato mikrovlákna se přitom pro praktické využití dezintegrují, např. mixováním a/nebo mechanickým mletím či drcením, čímž se z nich připraví částice z PHB o velikosti 0,2 až 500 μm .

Ve druhé variantě se zvlákněním roztoku PHB, s výhodou srážením z roztoku postupem dle CZ 306448 nebo odstředivým zvlákněním dle CZ 2016-423, připraví mikrovlákna PHB s průměrem 0,2 až 500 μm . Mikrovlákna PHB připravená těmito postupy jsou přirozeně porézní a mají vysoký měrný povrch, přičemž např. mikrovlákna připravená srážením z roztoku postupem dle CZ 306448 mají měrný povrch v rozmezí 36 až 50 m^2/g (BET analýza). Poté se z nich např. mixováním a/nebo mechanickým mletím či drcením připraví porézní částice z PHB o velikosti 0,2 až 500 μm . Takto připravené částice PHB se inkubují s extraktem obsahujícím alespoň jeden organický UV filtr, přičemž dochází k sorpci organického UV filtru do vnitřní struktury a na povrch těchto částic, s výhodou v takovém poměru, aby se do jejich struktury

navázal ekvivalent 20 až 100 mg původního materiálu (např. kávy – viz níže) na 1 g vláken (čímž se dosáhne celkové koncentrace organického UV filtru/filtrů v těchto částicích 2 až 10 %). Pro inkubaci se přitom organický UV filtr/filtry používá ve formě ethanolového extraktu (extrakce 20 až 80% roztokem ethanolu v destilované vodě) nebo olejového extraktu (extrakce do směsi methanolu a chloroformu – extrakce dle Folche). Inkubace probíhá alespoň 1 hodinu při laboratorní teplotě a bez přístupu světla.

Ve třetí variantě se alespoň jeden organický UV filtr přidává k mikrovláknům PHB ve stejném množství a ve stejné formě, jako v předchozí variantě, již během jejich desintegrace. Doba dezintegrace (obvykle 5 až 30 min) přitom nemá na výsledný materiál a jeho vlastnosti podstatnější vliv.

V jiné variantě UV filtru podle vynálezu tvoří PHB pevné jádro tohoto UV filtru, přičemž je toto jádro opatřeno liposomovým obalem, a alespoň jeden organický UV filtr je v závislosti na své polaritě uložen v jádru nebo liposomovém obalu nebo v prostoru mezi nimi, který je vyplněný hydrofilním prostředím.

Pro přípravu této varianty UV filtru se nejprve rozpustí fosfolipid/fosfolipidy (např. lecithin), s výhodou s přidáním cholesterolu, který následně zpevní liposomovou strukturu a PHB v chloroformu. Do takto vytvořeného roztoku se přidá alespoň jeden organický UV filtr, např. ve formě extraktu do destilované vody nebo roztoku ethanolu v destilované vodě, apod. (viz výše). Poté se takto vytvořená směs naředí destilovanou vodou a vystaví se ultrazvuku. Přitom dojde k její homogenizaci a také ke spontánnímu uzavření liposomů tvořených obalem z dvojvrstvy fosfolipidu/fosfolipidů s vnitřním prostorem vyplněným vodnou fází, kolem pevného jádra z PHB. Organický UV filtr se přitom dle své polaritě zařadí do jádra z PHB, liposomového obalu nebo do vodné fáze mezi nimi. Po odpaření chloroformu se z roztoku, např. centrifugací oddělí vytvořené částice UV filtru. Tyto částice mají menší velikost než částice připravené předchozími postupy – cca 0,2 až 100 μm . Vzájemný poměr fosfolipidu/fosfolipidů a cholesterolu je 9:1 až 1:1.

PHB pro přípravu UV filtru podle vynálezu může být připraven libovolným ze známých způsobů pro jeho přípravu, přičemž výhodný je zejména způsob známý z CZ patentu 304183 nebo analogické mezinárodní přihlášky WO 2014032633, podle kterého je PHB produkován bakterií *Cupriavidus necator* H16 na olejovém substrátu. Při tomto postupu přirozeně vzniká i určitý malý podíl (cca do 5 %) polyhydroxybutyrátu-valerátu (PHBV), který se při přípravě UV filtru podle vynálezu chová stejně jako PHB, a proto zde není samostatně uváděn.

Jak bude dále popsáno v příkladech 1 až 4, UV filtry podle vynálezu dosahují ve všech variantách provedení vysokého ochranného faktoru SPF, neboť k absorpci UV záření přispívá kromě organického UV filtru/filtrů také samotný PHB (a PHBV), který je schopen absorbovat nebo rozptylovat část UV záření a sám dosahuje v závislosti na koncentraci ochranného faktoru SPF cca 5 až 14. Díky svému hydrofobnímu charakteru danému buď přítomností liposomového obalu nebo povahou PHB je tento UV filtr dostatečně odolný vůči působení vody a současně je schopený částečně proniknout do pokožky a/nebo se udržet v jejích horních vrstvách; přitom jsou všechny jeho složky bezpečné a neškodné vůči lidskému zdraví i životnímu prostředí.

Příklad 1: Příprava liposomů, příprava kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB, a příprava částic z PHB

Rozpuštěním 90 mg lecithinu a 10 mg cholesterolu v chloroformu se připravil roztok pro přípravu liposomů. Tento roztok se následně naředil 10 ml destilované vody a poté se po dobu 1 minuty vystavil působení ultrazvuku (sondový ultrazvuk Sonopuls, Bandelin; průměr sondy 13 mm; frekvence 20 kHz). Přitom došlo k jeho homogenizaci a ke spontánnímu uzavření liposomů tvořených obalem z dvojvrstvy fosfolipidů stabilizovaného cholesterolem a vnitřkem vyplněným vodnou fází. Poté se pomocí magnetické míchačky s ohřevem z tohoto roztoku zcela

odpařil chloroform (zbytková koncentrace nižší než 0,06 pmol/l) a vytvořené liposomy se oddělily centrifugací při 6000 ot/min, která probíhala po dobu 5 minut. Po oddělení supernatantu se sediment tvořený liposomy rozsuspendoval ve sterilní vodě.

- 5 Rozpuštěním 80 mg lecithinu, 10 mg cholesterolu a 10 mg PHB (v libovolném pořadí) v chloroformu se připravil roztok pro výrobu kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB. Tento roztok se následně naředil 10 ml destilované vody a poté se po dobu 1 minuty vystavil působení ultrazvuku (sondový ultrazvuk Sonopuls, Bandelin; průměr sondy 13 mm; frekvence 20 kHz). Přitom došlo k jeho homogenizaci a ke spontánnímu uzavření liposomových částic
10 tvořených obalem z dvojvrstvy fosfolipidů stabilizované cholesterolem a vnitřkem vyplněným vodnou fází a s pevným jádrem tvořeným částicí z PHB o velikosti až 100 μm. Poté se pomocí magnetické míchačky s ohřevem z tohoto roztoku zcela odpařil chloroform a vytvořené kombinované částice se oddělily centrifugací při 6000 ot/min, která probíhala po dobu 5 minut. Po oddělení supernatantu se sediment tvořený kombinovanými částicemi
15 rozsuspendoval ve sterilní vodě. Koncentrace PHB v takto připravených kombinovaných částicích byla 10 %.

Stejným postupem se dále připravily kombinované částice tvořené liposomovým obalem a pevným jádrem z PHB, které obsahovaly PHB v koncentraci 20 %, 30 %, 50 % a 70 %. Podíl
20 PHB se přitom vždy zvyšoval na úkor podílu lecithinu.

Rozpuštěním 100 mg PHB v chloroformu se připravil roztok pro přípravu částic z PHB. Tento roztok se následně naředil 10 ml destilované vody a poté se po dobu 1 minuty vystavil působení ultrazvuku (sondový ultrazvuk Sonopuls, Bandelin; průměr sondy 13 mm; frekvence 20 kHz).
25 Přitom došlo ke spontánnímu vytvoření částic z PHB v průměrem až 100 μm.

Ve všech případech se přitom použil PHB připravený způsobem dle CZ patentu 304183 ve formě jemného prášku s velikostí částic 0,2 až 10 μm.

- 30 Unikátní struktura takto vytvořených částic se ověřila pomocí kryogenní elektronové mikroskopie (cryo-TEM, přístroj FEI Tecnai F20), jejich velikost a stabilita pak metodou dynamického rozptylu světla (DLS, přístroj ZetaSizer Nano ZS, Malvern) – viz níže.

Jako kontrolní a srovnávací vzorek se použil PHB komerčně dodávaný spol. Biomer (Německo).

35 Stanovení struktury částic pomocí kryogenní elektronové mikroskopie

Kryogenní elektronová mikroskopie je vysoce citlivá technika a současně jediná možná metoda, kterou lze zobrazit mikrostrukturu částic uspořádaných ze dvou různých bezbarvých materiálů.
40 Svazek elektronů přitom prochází velmi tenkou vrstvou vzorku a jejich vzájemná interakce se zaznamenává ve formě detailní struktury materiálu, jímž elektrony prochází. Zobrazit kvalitně pomocí této metody se podařilo pouze vzorky liposomů a kombinovaných částic s koncentrací PHB do 50 %. Vzorky kombinovaných částic s koncentrací PHB 70 a 100 % se chovaly již při přípravě odlišně a nebylo možné je spolehlivě zobrazit.

45 Na obr. 1a je snímek z kryogenní elektronové mikroskopie liposomů bez přítomnosti PHB při zvětšení 50 000krát, na kterém jsou zachyceny liposomy ve formě většinou unilamelárních částic o jednotné velikosti okolo 100 až 300 nm.

50 Na obr. 1b je snímek z kryogenní elektronové mikroskopie kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 10 % při zvětšení 80 000krát, ze kterého je patrný výrazný vliv PHB na strukturu těchto částic. Vytvořené částice mají pevné jádro z PHB, na kterém jsou shluknuty stěny liposomů, které tak svou hydrofilní slupkou chrání hydrofobní polymer.

Na obr. 1c je snímek z kryogenní elektronové mikroskopie kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 20 % při zvětšení 50 000krát, na kterém jsou zachyceny částice podobné těm, jako na obr. 1b, jen větší.

- 5 Na obr. 1d je snímek z kryogenní elektronové mikroskopie kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 30 % při zvětšení 80 000krát, na kterém jsou zachyceny částice podobné těm na obr. 1b a 1c, ale větší. Navíc se mezi nimi začínají objevovat samotné částice a shluky PHB, které mají oproti liposomům vyšší hustotu a při delší fokusované expozici v mikroskopu se mění jejich struktura.

- 10 Na obr. 1e je snímek z kryogenní elektronové mikroskopie kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 50 % při zvětšení 10 000krát, na kterém jsou patrné především částice PHB o velikosti cca 100 nm. Okolo nich je zřejmá vytvořená liposomová monovrstva, která je chrání před hydrofilním vodním prostředím.

- 15 Stanovení velikosti částic pomocí DLS, a jejich koloidní stabilita

- Velikost liposomů, částic z PHB a kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 10, 20, 30, 50 a 70 % se stanovila metodou dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji ZetaSizer Nano ZS. Stejnou metodou se současně stanovil jejich polydisperzní index (Pdl – rozptyl velikosti částic) a zeta potenciál (ZP), který definuje jejich koloidní stabilitu. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

25

Vzorek	Velikost částic [nm]	Pdl	ZP [mV]
Liposomové částice	135,9	0,207	-31,6
Kombinované částice s koncentrací PHB 10 %	194,3	0,262	-36,3
Kombinované částice s koncentrací PHB 20 %	255,3	0,334	-42,1
Kombinované částice s koncentrací PHB 30 %	263,2	0,301	-40,0
Kombinované částice s koncentrací PHB 50 %	218,3	0,312	-53,7
Kombinované částice s koncentrací PHB 70 %	265,2	0,267	-42,5
Částice z PHB	771,9	0,739	-34,4

- Průměrná velikost částic se pohybuje do 300 nm a polydisperzní index do 0,32. Výjimku tvoří jen vzorek částic z PHB, který má průměrnou velikost částic 770 nm a Pdl 0,74. Koloidní stabilita všech částic je vysoká a přesahuje významně limit stability daný hodnotou zeta potenciálu (ZP) -30 mV.

- Příklad 2: Příprava liposomů, kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB a částic z PHB s přísadkou organického UV filtru přírodního původu

- 35 Příprava částic

- Stejným způsobem jako v příkladu 1 se připravily liposomy, kombinované částice tvořené liposomy a PHB a částice z PHB, přičemž před sonifikací se do roztoků pro přípravu těchto částic přidaly různé extrakty ze zelené kávy, pražené kávy nebo zbytku kávových bobů (cascara) - viz níže, přičemž množství extraktu bylo vždy takové, aby se dosáhlo výsledné koncentrace přírodního materiálu 200 µg/ml, tedy 2 %.

Extrakce a charakterizace organických UV filtrů přírodního původu

Jako modelový organický UV filtr přírodního původu se použily aktivní látky extrahované ze zelené kávy, pražené kávy a ze zbytků kávových bobů. Extrakce probíhala 30 až 60 minut při laboratorní teplotě. Jako extrakční činidlo

se přitom pro hydrofilní složky použila destilovaná voda a 20 až 96% roztok ethanolu v destilované vodě, a pro hydrofobní složky směs methanolu a chloroformu v poměru 2:1 (extrakce dle Folche). Jak je patrné z následujícího, nejlépe se jako extrakční činidlo osvědčil 20 až 60% roztok ethanolu v destilované vodě.

U takto vytvořených extraktů se následně stanovil obsah polyfenolů, flavonoidů a pomocí ABTS radikálu jejich antioxidační aktivita. Kromě toho se měřila jejich UV-vis absorpční spektra a z naměřených hodnot pro UVB oblast se dle Mansurovy rovnice dopočítala hodnota ochranného faktoru SPF.

Stanovení polyfenolů

Obsah polyfenolů v jednotlivých extraktech se stanovil spektrofotometricky. Takto stanovený obsah polyfenolů je graficky znázorněn na obr. 2, ze kterého je zřejmé, že nejvíce polyfenolů ze zelené kávy se vyextrahovalo do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě, z pražené kávy do 60% roztoku ethanolu v destilované vodě a ze zbytků kávových bobů do 20% roztoku ethanolu v destilované vodě. Z obr. 2 je současně zřejmé, že extrakce je v případě zelené kávy neúčinnější při použití 20% a 40% roztoku ethanolu v destilované vodě, v případě pražené kávy pak při použití 60% roztoku ethanolu v destilované vodě.

Extrakce dle Folche byla provedena jen u vzorku pražené kávy, kdy se obsah polyfenolů shodoval s extraktem připraveným s použitím 90% roztoku ethanolu v destilované vodě.

Stanovení flavonoidů

Spektrofotometricky se současně stanovil obsahy flavonoidů v jednotlivých extraktech. Při extrakci do destilované vody nebo 20 až 80% roztoku ethanolu v destilované vodě byl vyšší obsah flavonoidů u vzorků zelené kávy, při extrakci do roztoku s obsahem ethanolu 90 a 96 % byl vyšší obsah flavonoidů u vzorků pražené kávy. Celkově byl však obsah flavonoidů v extraktu z pražené kávy nižší než u extraktu ze zelené kávy a pohyboval se v rozmezí 5 až 35 mg/ml; u extraktu ze zelené kávy pak o 10 až 15 % výše. Při extrakci dle Folche byl z pražené kávy naopak extrahován až čtyřnásobný obsah flavonoidů - 165 mg/ml.

Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita extraktů ze zelené kávy extrahovaných do destilované vody a do 20 až 60% roztoků ethanolu v destilované vodě byla velice podobná a pohybovala se mezi 5 a 7 mg·g⁻¹ (vyjádřeno jako mg ekvivalentu standardu Trolox na gram výchozího materiálu přírodního UV filtru). Podobné hodnoty antioxidační aktivity byly naměřeny také u extraktů z pražené kávy extrahovaných do 20, 90 a 96% roztoků ethanolu v destilované vodě. Při extrakci vzorků zelené kávy roztoky s vyššími koncentracemi ethanolu byla antioxidační aktivita vzorků téměř nulová. Naopak při extrakci vzorků pražené kávy do 40 až 80% roztoku ethanolu v destilované vodě byla antioxidační aktivita významně vyšší a dosahovala hodnot mezi 20 a 30 mg·g⁻¹.

Na obr. 3 je uveden graf znázorňující antioxidační aktivitu jednotlivých extraktů ze zelené a pražené kávy extrahovaných do destilované vody (na obr. označen jako 0 %) a do 20, 40, 60, 80, 90 a 96% roztoku ethanolu v destilované vodě.

Enkapsulační účinnost

Pomocí stanovení množství polyfenolů uvolněných z částic se stanovila účinnost enkapsulace kombinovaných částic s koncentrací PHB 30% pro různé typy extraktů. Na obr. 4 je takto zjištěná účinnost enkapsulace znázorněna graficky. Jednotlivé sloupce představují zleva: enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt ze zelené kávy extrahovaný do destilované vody, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt z pražené kávy extrahovaný do destilované vody, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt ze zbytků kávových bobů extrahovaný do destilované vody, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt ze zelené kávy extrahovaný do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt z pražené kávy extrahovaný do 20% roztoku ethanolu v destilované vodě, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt ze zbytků kávových bobů extrahovaný do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt z pražené kávy při extrakci de Folche, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt ze zelené kávy při extrakci de Folche, enkapsulační účinnost kombinovaných částic pro extrakt ze zbytků kávových bobů při extrakci de Folche.

Stanovení ochranného faktoru SPF liposomů, kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB, a částic z PHB

Liposomy, částice z PHB a kombinované částice tvořené liposomy a PHB s koncentrací PHB 10, 20, 30, 50 a 70 se naředily v ethanolu a poté se na UV-vis spektrofotometru měřila jejich absorbance pro záření s vlnovou délkou 280 až 320 nm (s krokem 5 nm). Ilustrační UV-vis spektra těchto částic jsou uvedena na obr. 5. Z těchto spekter se následně dle Mansurovy rovnice dopočítaly hodnoty ochranného faktoru SPF těchto částic, které jsou graficky znázorněny na obr. 6. Z obr. 6 je patrné, že nejvyšší hodnoty ochranného faktoru SPF dosáhly kombinované částice tvořené liposomy a PHB s koncentrací PHB 70 %. Tyto částice jsou ale už příliš kompaktní a kvůli tomu, že jsou tvořené prakticky jen PHB obaleným jednoduchou vrstvou fosfolipidů (viz např. obr. 1c) se do nich organický UV filtr inkorporuje jen obtížně. Z hlediska struktury částic, stability a zajištění kombinovaného efektu liposomů, PHB a organického UV filtru se jako nejvhodnější pro dermální aplikaci jeví kombinované částice s koncentrací PHB kolem 20 až 30 %, které mají ochranný faktor SPF kolem 6 a nejsou cytotoxické (viz příklad 4).

Stanovení ochranného faktoru SPF extraktů, liposomů, kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB, a částic z PHB s organickým UV filtrem

Liposomy a částice z PHB bez obsahu extraktu (obr. 7 - liposomy prázdné, resp. PHB prázdné), liposomy a částice z PHB s obsahem extraktu z pražené kávy extrahovaného do destilované vody (obr. 7 - lip praž voda, resp. PHB praž voda), liposomy částice a částice z PHB s obsahem extraktu ze zelené kávy extrahované do destilované vody (obr. 7 - lip zel voda, resp. PHB zel voda), a liposomy a částice z PHB s obsahem extraktu ze zelené kávy extrahovaného do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě (obr. 7 - lip zel 40%, resp. PHB zel 40%) se naředily v ethanolu a poté se na UV-vis spektrofotometru měřila jejich absorbance pro záření s vlnovou délkou 280 až 320 nm (s krokem 5 nm). Z těchto spekter se následně dle Mansurovy rovnice dopočítaly hodnoty ochranného faktoru SPF, které jsou graficky znázorněny na obr. 7, ze kterého je zřejmé, že nejvyšší hodnotu ochranného faktoru SPF měl vzorek zelené kávy extrahovaný do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě. Jeho ochranný faktor SPF měl hodnotu 31,8. K ochrannému efektu proti poškození UV zářením přitom významně přispívá i vysoký antioxidační účinek použitých extraktů.

Dále se připravily liposomy, částice z PHB a kombinované částice tvořené liposomy a PHB s koncentrací PHB 10, 20, 30, 50 a 70 %, které obsahovaly extrakt ze zelené kávy extrahovaný do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě s koncentrací původního materiálu 200 µg/ml, tedy 2 %. Tento extrakt se přitom inkorporoval dílem do jádra tvořeného PHB, dílem do liposomového obalu a dílem do prostoru mezi nimi vyplněného hydrofilním prostředím. Ochranný faktor SPF pro tyto částice dosahoval hodnotu 25,75 až 38,5 – viz tabulka 2.

Tabulka 2

Částice	SPF	Směrodatná odchylka SD
Liposomy bez extraktu	3,95	0,32
Liposomy s extraktem ze zelené kávy	33,80	4,12
Kombinované částice s koncentrací PHB 10 % s extraktem ze zelené kávy	34,75	2,56
Kombinované částice s koncentrací PHB 20 % s extraktem ze zelené kávy	32,62	1,88
Kombinované částice s koncentrací PHB 30 % s extraktem ze zelené kávy	38,50	2,54
Kombinované částice s koncentrací PHB 50 % s extraktem ze zelené kávy	25,75	3,80
Kombinované částice s koncentrací PHB 70 % s extraktem ze zelené kávy	27,80	4,60
Částice PHA s extraktem ze zelené kávy	32,20	3,64
Extrakt ze zelené kávy extrahovaný do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě	31,50	0,59

5 Příklad 3: Částice z PHB vytvořené dezintegrací mikrovláken PHB

Materiál

Způsobem dle CZ patentu 304183 se připravil PHB se střední molekulovou hmotností 50 000 až 1000000 Da, který se mletím zpracoval do formy granulátu s velikostí částic 200 až 500 μm . Takto vytvořený granulát se rozpustil v chloroformu, dichloretanu nebo dichlormethanu, nebo směsi alespoň dvou z nich, čímž se vytvořil roztok pro zvláknění s koncentrací PHB 0,1 až 20 % hmotnostních. Tento roztok se poté zvláknuje libovolným způsobem zvláknění - např. tryskovým nebo beztryskovým elektrostatickým zvlákněním, s výhodou pak srážením z roztoku (např. dle CZ 306448) nebo odstředivým zvlákněním (např. dle CZ 2016-423) atd., přičemž se z něj vytváří mikrovlákna PHB s průměrem mezi 0,2 a 500 μm .

Příprava porézních mikročástic z mikrovláken PHB

Ze 4% roztoku PHB v chloroformu připraveného výše popsaným způsobem se způsobem odstředivého zvláknění dle CZ PV 2016-423 připravila porézní mikrovlákna PHB s průměrem 0,5 až 100 μm . Čirý lehce nažloutlý roztok PHB se přitom rychlostí 1 ml/s přiváděl na rotující disk, který se otáčel rychlostí 20 000 otáček za minutu. Přitom se okamžitě ve vzdálenosti cca 10 cm od disku vytvořila síť bílých vláken. Tato mikrovlákna se následně sušila a charakterizovala elektronovou mikroskopií. SEM snímek takto připravených mikrovláken při zvětšení 1 000krát je na obr. 8a.

Mikrovlákna PHB s vyšší porézností se připraví srážením z roztoku způsobem dle CZ 306448, kdy se připraví 0,1 až 20% roztok PHB v chloroformu, který se následně vytlačuje do vhodného srážedla, kterým je např. ethanol o koncentraci 96 %. Průměr takto vytvořených mikrovláken je cca 0,2 až 100 μm , jejich délka stovky mikrometrů až milimetrů. SEM snímky tímto způsobem připravených mikrovláken při zvětšení 8 000krát je na obr. 8b a při zvětšení 80 000krát na obr. 8c.

Mikrovlákna vytvořená kterýmkoliv z těchto způsobů se rozstříhala a rozmixovala na částice o velikosti v rozmezí 0,2 až 500 μm – viz obr. 9a na kterém je SEM snímek nastříhaných a rozmixovaných vláken připravených odstředivým zvlákněním, a obr. 9b, na kterém je SEM

snímek nastříhaných a rozmixovaných vláken připravených vytlačováním do sražděla. Pokud by pouhé rozstříhání a rozmixování vláken nebylo dostatečné, je možné je nahradit nebo doplnit mletím v mechanickém mlýnu.

- 5 Na obr. 10a je pak SEM snímek takto připravených částic z PHB o rozměru 1 μm v každém směru.

Takto vytvořené částice z PHB se vyznačují podobným rozměrem jako mletý komerční polymer (Biomer), mají však podstatně vyšší sorpční kapacitu pro přírodní látky.

- 10 Všechny částice připravené dezintegrací mikrovláken PHB mohou být využity jako nosiče organických UV filtrů přírodního původu pro dermální aplikace (do opalovacích prostředků nebo pleťových masek, apod.).

- 15 **Příklad 4: Způsob funkcionalizace částic z PHB vytvořených dezintegrací mikrovláken PHB přírodním UV filtrem**

U částic z PHB připravených postupem dle příkladu 3 se zkoumala možnost sorpce přírodních UV filtrů do jejich struktury během zvláknění a u již připravených vláken, která se poté vyhodnotila kvalitativně pomocí časově rozliščené fluorescenční mikroskopie FLIM. Sorpce během zvláknění vedla k začlenění organického UV filtru do struktury vlákna, sorpce během dezintegrace byla zahájena přidáním UV filtru k vláknům těsně před dezintegrací. Sorpce na již připravená vlákna probíhala alespoň 1 hodinu při laboratorní teplotě a bez přístupu světla.

- 25 Poněvadž dosud nikde není popsán vliv dezintegrace mikrovláken PHB na hodnom jejich ochranného faktoru SPF, testovala se kromě dezintegrovaných mikrovláken PHB, také mikrovlákna PHB s přidáním různých extraktů z kávy, které se k materiálu mikrovláken přidávaly v různé fázi jejich zpracování (během jejich přípravy, během jejich desintegrace, po desintegraci).

- 30 Podrobně se testovalo několik různých materiálů, připravených různými postupy a za různých podmínek – viz tabulka 3. Jako kontrolní se použil mletý PHB komerčně dostupný od společnosti Biomer a supernatant odebraný z tohoto vzorku.

- 35 **UV-VIS spektra aktivních látek**

U extraktů ze zelené kávy (absorpční spektra na obr. 11a) a z pražené kávy (absorpční spektra na obr. 11b) extrahovaných do destilované vody, 20% roztoku ethanolu v destilované vodě, 40% roztoku ethanolu v destilované vodě, 60% roztoku ethanolu v destilované vodě roztoku, 80% roztoku ethanolu v destilované vodě, 90% roztoku ethanolu v destilované vodě a 96% roztoku ethanolu v destilované vodě se na UV-VIS spektrofotometru měřila jejich absorbance pro záření s vlnovou délkou 280 až 800 nm (s krokem 5 nm; detail příslušné části absorpčního spektra vybraných vzorků viz obr. 11c). Jako nejvhodnější pro UV filtry podle vynálezu se z této skupiny vybraly vzorky extraktu ze zelené kávy extrahované do destilované vody, do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě, 60% roztoku ethanolu v destilované vodě a 80% roztoku ethanolu v destilované vodě, a extraktu pražené kávy do 20% roztoku ethanolu v destilované vodě – viz obr. 11c.

- 50 Z takto získaných spekter se dle Mansurovy rovnice dopočítala hodnota ochranného faktoru SPF pro mikrovlákna PHB a částice připravené desintegrací těchto mikrovláken bez obsahu extraktu a pro mikrovlákna PHB a částice připravené desintegrací těchto mikrovláken s extraktem ze zelené kávy do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě – viz tabulka 3.

Tabulka 3

Označení	PHB		PHB s extraktem ze zelené kávy	
	SPF	SD	SPF	SD
Dezintegrovaná mikrovláčna PHB (9 g mikrovláčen/200 ml destilované vody; mixováno)	3,95	0,32	12,44	1,20
PHB získaný postupem dle z CZ patentu 304183 ve formě částic	12,2	0,82	35,15	2,56
Dezintegrovaná mikrovláčna PHB (4,5 g mikrovláčen/200 ml destilované vody; mixováno 10 minut)	3,75	0,54	15,85	1,98
Dezintegrovaná mikrovláčna PHB (4,5 g mikrovláčen/200 ml destilované vody; mixováno 5 minut)	3,62	0,46	17,75	3,53
Mikrovláčna PHB (4,5 g mikrovláčen/-200ml destilované vody) připravená odstředivým zvlákněním s 10% přísádkem kávového extraktu	-	-	15,85	1,98
Mikrovláčna PHB (4,5 g mikrovláčen/-200 ml destilované vody) připravená srážecím roztokem PHB do srážedla, dezintegrovaná v přítomnosti 15 ml extraktu ze směsi zelené a pražené kávy extrahovaného do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě	-	-	17,75	3,53
Biomer – kontrolní vzorek částic PHB o velikosti 1 až 100 µm	6,42	0,72	18,50	2,82
Supernatant z kontrolního vzorku	5,82	0,28	-	-
Částice z PHB o velikosti do 200 µm připravené desintegrací mikrovláčen připravených srážecím roztokem PHB	12,46	0,59	36,20	4,41
Částice z PHB o velikosti do 200 µm připravené desintegrací mikrovláčen připravených odstředivým zvlákněním roztokem PHB	11,65	0,68	34,50	3,82

- 5 Vzorek mletého PHB připraveného postupem dle z CZ patentu 304183 měl ochranný faktor SPF 12,2, zatímco PHB spol. Biomer ve formě částic o rozměru 1 až 100 µm měl SPF 6,4. Ochranný faktor SPF u částic z PHB připravených hrubou dezintegrací mikrovláčen PHB připravených odstředivým zvlákněním (obr. 9a) byl 3,75 (při mixování 10 minut), resp. 3,62 (při mixování 5 minut). Z toho je zřejmé, že doba dezintegrace neměla na výslednou hodnotu ochranného faktoru SPF významný vliv. Ochranný faktor SPF částic z PHB připravených jemnou dezintegrací mikrovláčen PHB připravených odstředivým zvlákněním (obr. 10a) byl 11,65; částic z PHB připravených srážecím roztokem pak 12,46. Z obr. 10b je patrné, že i po dezintegraci si porézni mikrovláčna PHB zachovala vnitřní komplexní nanostrukturu, což je velmi důležité pro sorpci organických UV filtrů.

- 15 Z tabulky 3 je současně zřejmé, že po přidání extraktu ze zelené kávy extrahovaného do 40% roztoku ethanolu v destilované vodě došlo k fyzikální adsorpci tohoto materiálu na mikrovláčna PHB, přičemž u většiny vzorků stoupla hodnota ochranného faktoru SPF o 7 až 23. Celkově bylo

možné dosáhnout hodnotu SPF cca 35, tedy podobnou jako u kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s extraktem ze zelené kávy o stejné koncentraci (srov. obr.7).

Stanovení interakce složek UV filtrů podle vynálezu s buňkami

5

Testy cytotoxicity a genotoxicity

Cytotoxicita

10 Cytotoxicita extraktů a liposomů se stanovila MTT testem, který je založený na tom, že žluté barvivo MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) je mitochondriálními enzymy dýchacího řetězce buněk redukováno na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Přidáním detergentu SDS (dodecylsiran sodný) se barvivo z buněk uvolní a rozpustí, a tím vznikne čirý fialový roztok, který se měří
15 spektrofotometricky při 540 nm. Test se provádí vždy s koncentrační řadou testovaného materiálu, v daném případě se k lidským buňkám v médiu přidaly liposomy s obsahem 30% PHB ve výsledné koncentraci 2 až 14 % v celkovém objemu a směs se inkubovala 24 hodin. Přitom se zjistilo, že liposomy ani kombinované částice tvořené liposomy a PHB nevykazovaly cytotoxický účinek.

20

Na obr. 12 je uveden graf viability keratinocytů v závislosti na koncentraci kombinovaných částic tvořených liposomy a PHB s koncentrací PHB 30% a s přidavkem extraktu ze zelené nebo pražené kávy v koncentraci 200 µg/g. Za hraniční hodnotu pro určení vzorku jako cytotoxického je považována hodnota přeživších buněk 60% a méně. Tabulka 4 shrnuje výsledky
25 spektrofotometrického stanovení intenzity fialového roztoku rozpuštěných krystalů formazanu vyjadřující množství živých buněk blanku (%) v porovnání s intenzitou tohoto roztoku v závislosti na množství kombinovaných částic. Čím více kombinovaných částic se přidalo, tím více se snižovala viabilita buněk. Za cytotoxickou lze považovat koncentraci kombinovaných částic vyšší než 12 %. Přidavek vláken cytotoxicitu nevykazoval.

30

Tabulka 4

materiál	Viabilita %	Směrodatná odchylka SD
Kombinované částice s extraktem z kávy, koncentrace 2 %	98	4,2
Kombinované částice s extraktem z kávy, koncentrace 4 %	94	8,3
Kombinované částice s extraktem z kávy, koncentrace 6 %	84	7,2
Kombinované částice s extraktem z kávy, koncentrace 8 %	75	5,6
Kombinované částice s extraktem z kávy, koncentrace 10 %	66	6,8
Kombinované částice s extraktem z kávy, koncentrace 12 %	61	5,2
Kombinované částice s extraktem z kávy, koncentrace 14 %	55	7,4
2,2 mg mletého PHB o velikosti do 500 µm připraveného postupem dle CZ patentu 304183	82	8,8
2,2 mg mletých mikrovláken PHB připravených srážením roztoku PHB	83,5	9,6
2,2 mg mletých mikrovláken PHB připravených odstředivým zvlákněním roztoku PHB	87,5	7,6
3 mg mletého PHB o velikosti do 500 µm připraveného postupem dle CZ patentu 304183	72,2	6,5
3 mg mletých mikrovláken PHB připravených srážením roztoku PHB	62,8	6,3
3 mg mletých mikrovláken PHB připravených odstředivým zvlákněním roztoku PHB	65,2	8,2

Genotoxicita

U stejných vzorků se SOS chromotestem stanovila jejich genotoxicita. Tato metoda je založena na sledování exprese genů indukovaných toxickými činidly v důsledku poškození DNA. Hodnocený vzorek působí během inkubace na geneticky modifikovaný kmen *E. Coli*, u kterého je gen pro β -galaktosidázu spojen s promotory reparačních genů. Po dané době je u exponovaných kultur hodnocena exprese galaktosidázy, která odpovídá míře SOS odpovědi. Měří se spektrofotometricky. Za genotoxickou je považována látka, která má hodnotu SOSIF větší nebo rovno 1,5. Žádný z testovaných materiálů této hodnoty nedosahuje.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu, **vyznačující se tím**, že obsahuje částice z polyhydroxybutyrátu o velikosti 0,2 až 500 μm , které jsou funkcionalizované alespoň jedním organickým UV filtrem přírodního původu v celkové koncentraci 2 až 10 %.
2. UV filtr podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu je inkorporován ve vnitřní struktuře a/nebo na povrchu částic z polyhydroxybutyrátu.
3. UV filtr podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu je ve vnitřní struktuře a/nebo na povrchu částic z polyhydroxybutyrátu inkorporován s možností uvolnění.
4. UV filtr podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že částice z polyhydroxybutyrátu jsou porézní a alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu je inkorporován v jejich pórech a/nebo na jejich povrchu.
5. UV filtr podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu je v pórech a/nebo na povrchu částic z polyhydroxybutyrátu inkorporován s možností uvolnění.
6. UV filtr podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že částice z polyhydroxybutyrátu mají velikost 0,2 až 100 μm a jsou obaleny liposomovým obalem, přičemž prostory mezi částicemi z polyhydroxybutyrátu a jejich liposomovými obaly jsou vyplněné hydrofilním prostředím, a alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu je uložený na povrchu částic z polyhydroxybutyrátu a/nebo v jejich liposomovém obalech a/nebo na povrchu jejich liposomových obalů a/nebo v prostorech mezi částicemi z polyhydroxybutyrátu a jejich liposomovými obaly.
7. UV filtr podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu je uložený na povrchu částic z polyhydroxybutyrátu a/nebo v jejich liposomových obalech a/nebo na povrchu jejich liposomových obalů a/nebo v prostorech mezi částicemi z polyhydroxybutyrátu a jejich liposomovými obaly s možností uvolnění.
8. UV filtr podle nároku 6 nebo 7, **vyznačující se tím**, že liposomový obal částic z polyhydroxybutyrátu je tvořen lecithinem a cholesterolem v poměru 9:1 až 1:1.
9. UV filtr podle libovolného z nároků 6 až 8, **vyznačující se tím**, že koncentrace polyhydroxybutyrátu v částicích UV filtru je 20 až 30 %.

10. Způsob výroby UV filtru na bázi polyhydroxybutyrátu, **vyznačující se tím**, že se do 0,1 až 20% roztoku polyhydroxybutyrátu v chloroformu, dichlorethanu nebo dichlormethanu, nebo směsi alespoň dvou z nich, přidá alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu ve formě extraktu do destilované vody nebo do roztoku ethanolu v destilované vodě a z takto vytvořeného roztoku se zvlákněním vytvoří mikrovlákná o průměru 0,2 až 500 µm s alespoň jedním organickým UV filtrem zakomponovaným ve své struktuře, poté se tato mikrovlákná mechanicky dezintegrují, čímž se z nich vytvoří částice polyhydroxybutyrátu o velikosti 0,2 až 500 µm, v jejichž struktuře je zakomponovaný alespoň jeden organický UV filtr v celkové koncentraci 2 až 10 %.
11. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že mikrovlákná polyhydroxybutyrátu se vytvoří odstředivým zvlákněním.
12. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že mikrovlákná polyhydroxybutyrátu s alespoň jedním organickým UV filtrem zakomponovaným v jejich struktuře se mechanicky dezintegrují mixováním a/nebo mletím v mechanickém mlýnu.
13. Způsob výroby UV filtru na bázi polyhydroxybutyrátu, **vyznačující se tím**, že 0,1 až 20% roztok polyhydroxybutyrátu v chloroformu, dichlorethanu nebo dichlormethanu, nebo směsi alespoň dvou z nich, se vytlačuje do srážedla, přičemž se z něj sráží mikrovlákná polyhydroxybutyrátu o průměru 0,2 až 500 µm, která mají porézní vnitřní strukturu, poté se takto vytvořená mikrovlákná polyhydroxybutyrátu mechanicky dezintegrují, čímž se z nich vytvoří porézní částice polyhydroxybutyrátu o velikosti 0,2 až 500 µm, které se inkubují alespoň 1 hodinu při laboratorní teplotě a bez přístupu světla s extraktem alespoň jednoho organického UV filtru přírodního původu extrahovaného 20 až 80% roztokem ethanolu v destilované vodě, přičemž se organický UV filtr přírodního původu sorbuje v celkové koncentraci 2 až 10 % do porů částic z polyhydroxybutyrátu a/nebo na jejich povrch.
14. Způsob podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že roztok polyhydroxybutyrátu v chloroformu, dichlorethanu nebo dichlormethanu, nebo směsi alespoň dvou z nich, se sráží ethanolom o koncentraci 96 %.
15. Způsob podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že mikrovlákná polyhydroxybutyrátu s alespoň jedním organickým UV filtrem zakomponovaným v jejich struktuře se mechanicky dezintegrují mixováním a/nebo mletím v mechanickém mlýnu.
16. Způsob výroby UV filtru na bázi polyhydroxybutyrátu, **vyznačující se tím**, že 0,1 až 20% roztok polyhydroxybutyrátu v chloroformu, dichlorethanu nebo dichlormethanu, nebo směsi alespoň dvou z nich, se vytlačuje do srážedla, přičemž se z něj sráží mikrovlákná polyhydroxybutyrátu o průměru 0,2 až 500 µm, která mají porézní vnitřní strukturu, poté se takto vytvořená mikrovlákná polyhydroxybutyrátu dezintegrují v přítomnosti extraktu alespoň jednoho organického UV filtru extrahovaného do 20 až 80% roztoku ethanolu v destilované vodě, přičemž během jejich desintegrace se organický UV filtr/filtry sorbuje v celkové koncentraci 2 až 10 % do porů a/nebo na povrch vznikajících částic polyhydroxybutyrátu.
17. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že mikrovlákná polyhydroxybutyrátu se mechanicky dezintegrují mixováním a/nebo mletím v mechanickém mlýnu.
18. Způsob výroby UV filtru na bázi polyhydroxybutyrátu, **vyznačující se tím**, že se v chloroformu v libovolném pořadí rozpustí alespoň jeden fosfolipid, cholesterol a polyhydroxybutyrát, a do takto vytvořeného roztoku se přidá alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu ve formě extraktu do destilované vody nebo do roztoku ethanolu v destilované vodě, takto vytvořená směs se naředí destilovanou vodou a vystaví se ultrazvuku, přičemž dojde ke spontánnímu uzavření liposomů tvořených obalem z dvojvrstvy fosfolipidu/fosfolipidů s vnitřním prostorem vyplněným vodnou fází kolem pevného jádra z polyhydroxybutyrátu a

organický UV filtr/filtry přírodního původu se uloží v částicích z polyhydroxybutyrátu a/nebo na jejich površích, a/nebo v jejich liposomovém obalech a/nebo na površích jejich liposomových obalů, a/nebo v prostorech mezi částicemi z polyhydroxybutyrátu a jejich liposomovými obaly, poté se z této směsi odstraní chloroform a oddělí se z ní částice UV filtru, jejichž velikost je 0,2 až 100 µm, a které obsahují alespoň jeden organický UV filtr v celkové koncentraci 2 až 10 %.

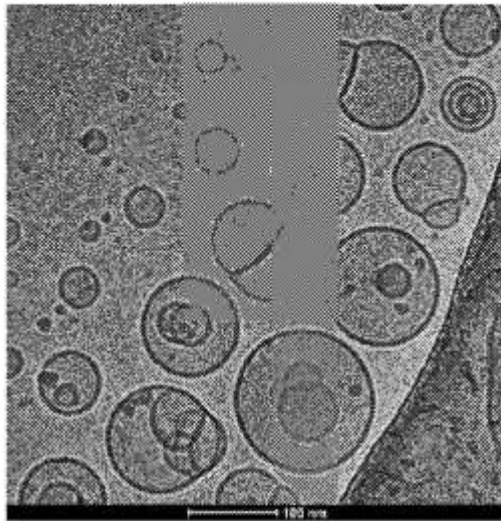
19. Způsob výroby podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že alespoň jeden organický UV filtr přírodního původu se přidá ve formě extraktu do 30 až 40% roztoku ethanolu v destilované vodě.

20. Způsob výroby podle nároku 18 nebo 19, **vyznačující se tím**, že poměr fosfolipidu a polyhydroxybutyrátu v roztoku je 9:1 až 1:9.

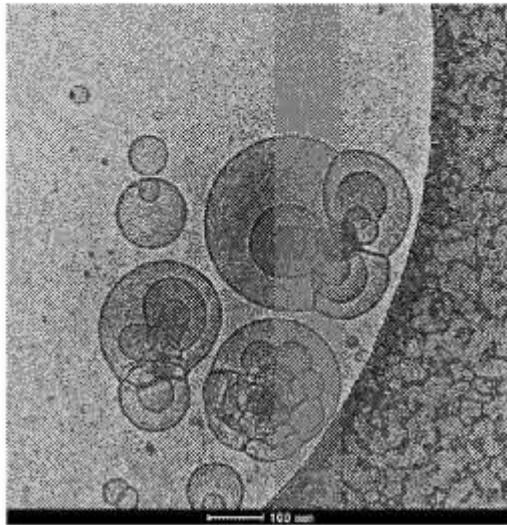
21. Způsob výroby podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že poměr fosfolipidu/fosfolipidů a polyhydroxybutyrátu v roztoku je 8:2 až 7:3.

22. Způsob výroby podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že fosfolipidy jsou tvořeny lecithinem a cholesterolem v poměru 9:1 až 1:1.

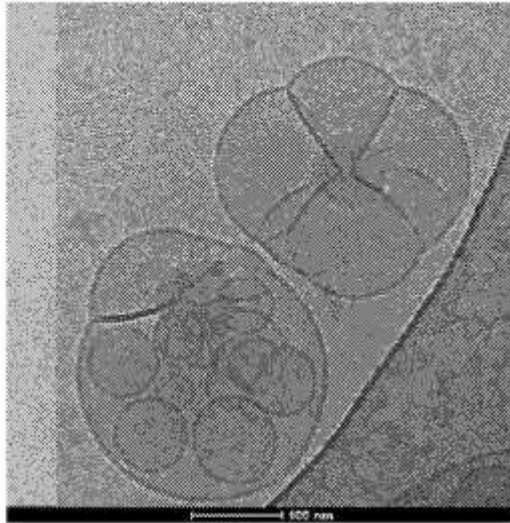
11 výkresů



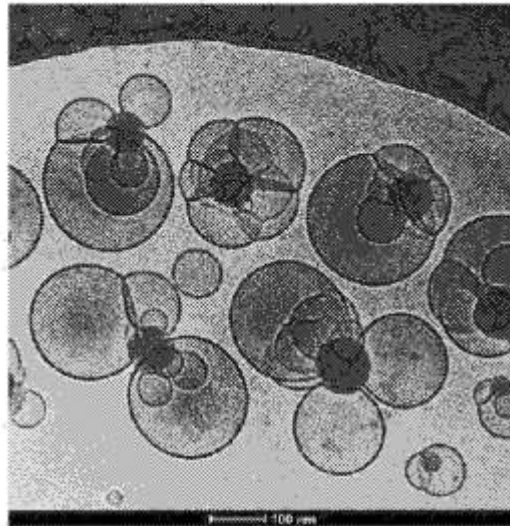
Obr. 1a



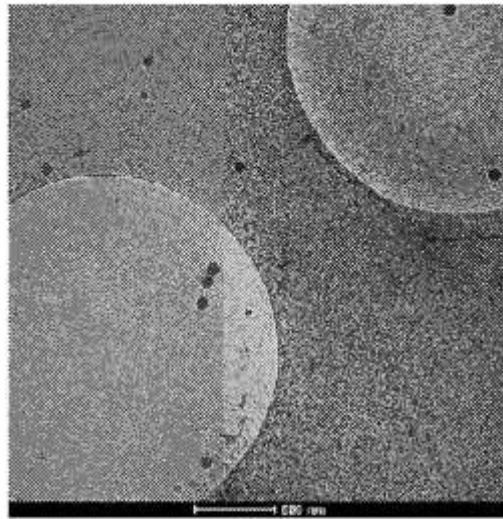
Obr. 1b



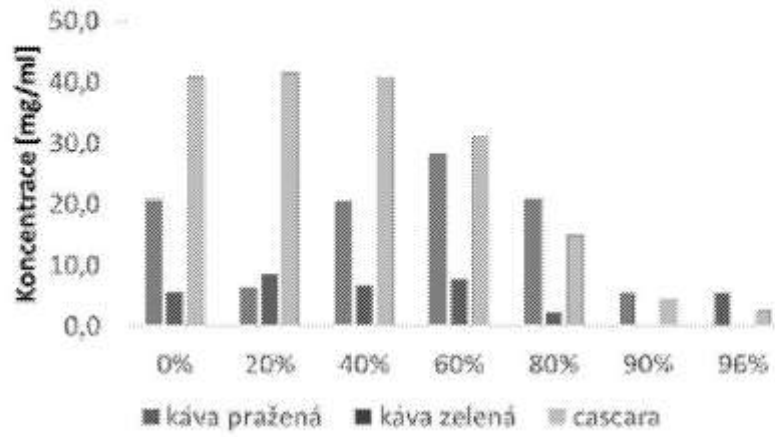
Obr. 1c



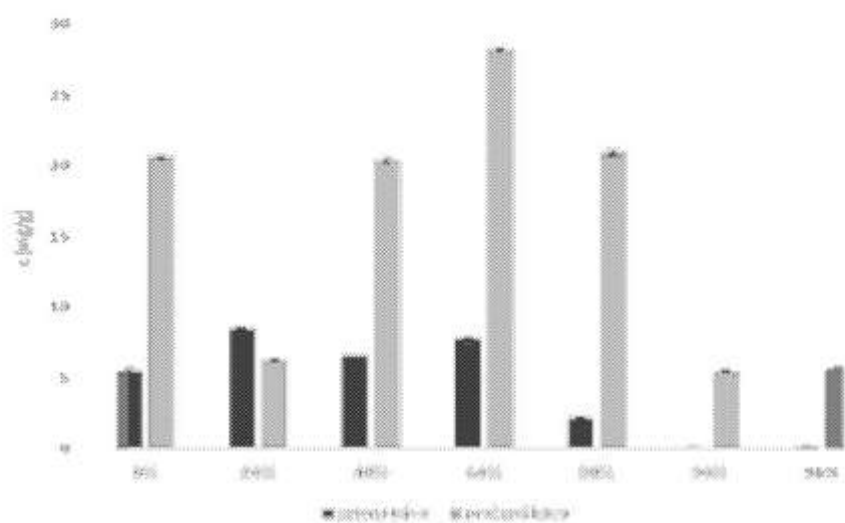
Obr. 1d



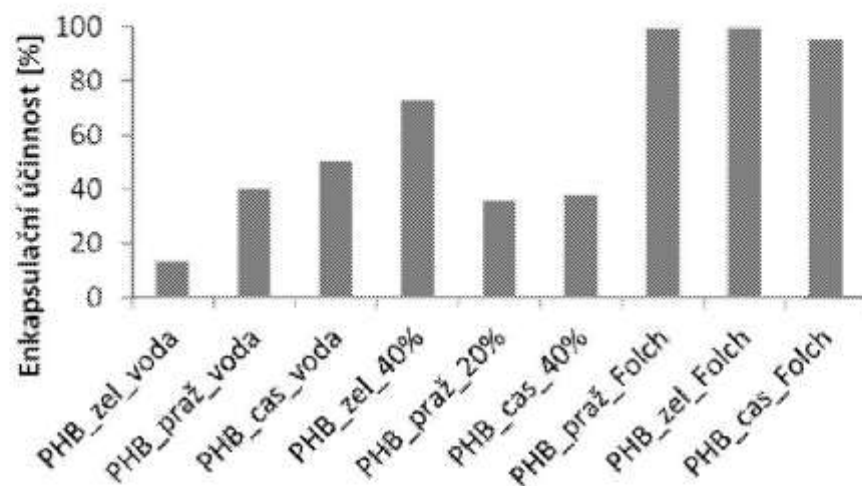
Obr. 1c



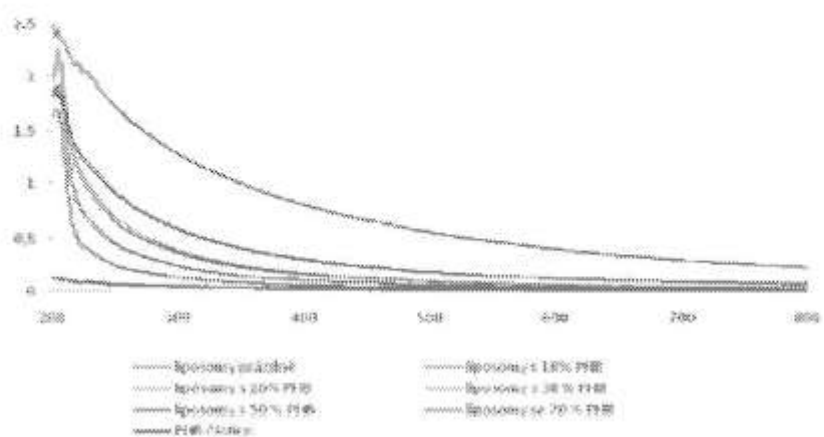
Obr. 2



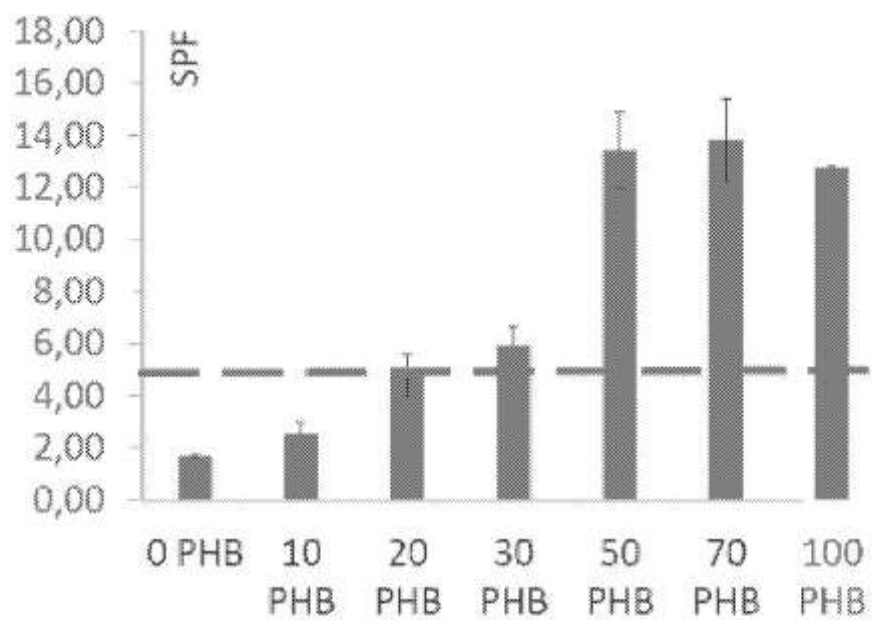
Obr. 3



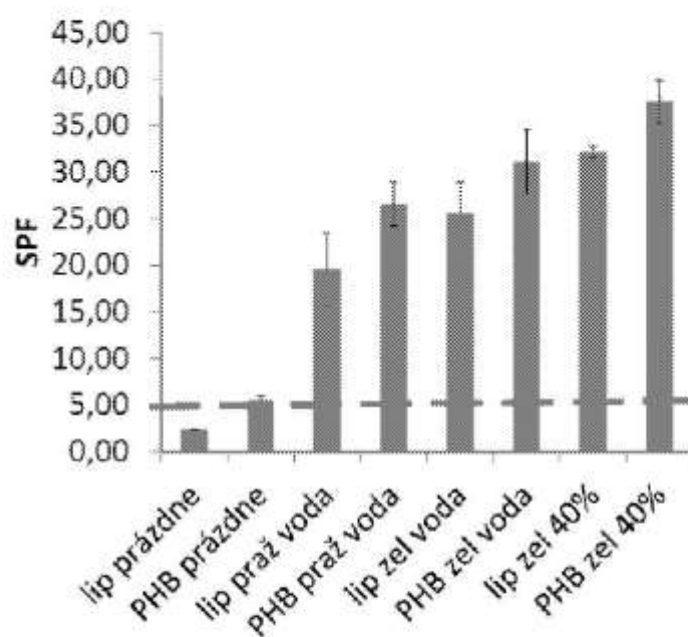
Obr. 4



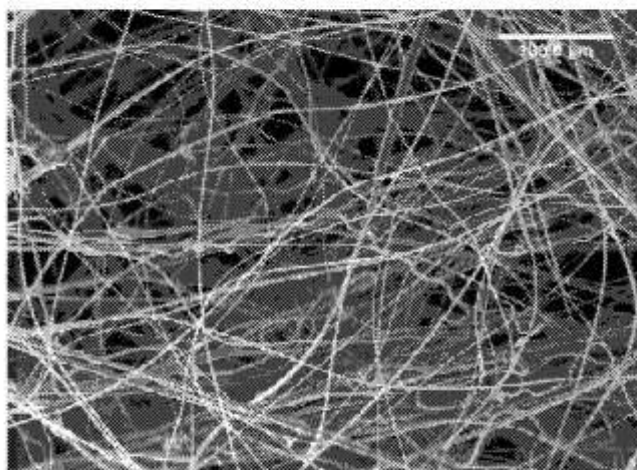
Obr. 5



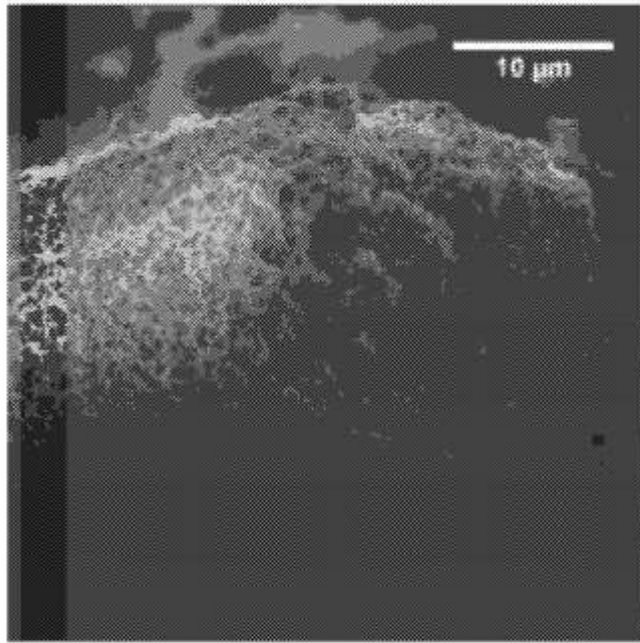
Obr. 6



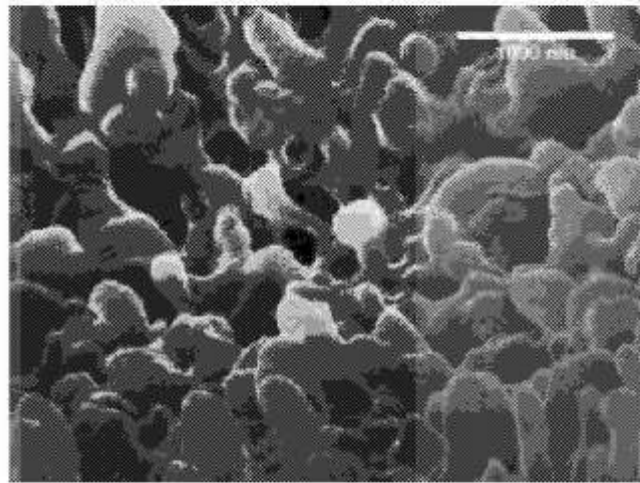
Obr. 7



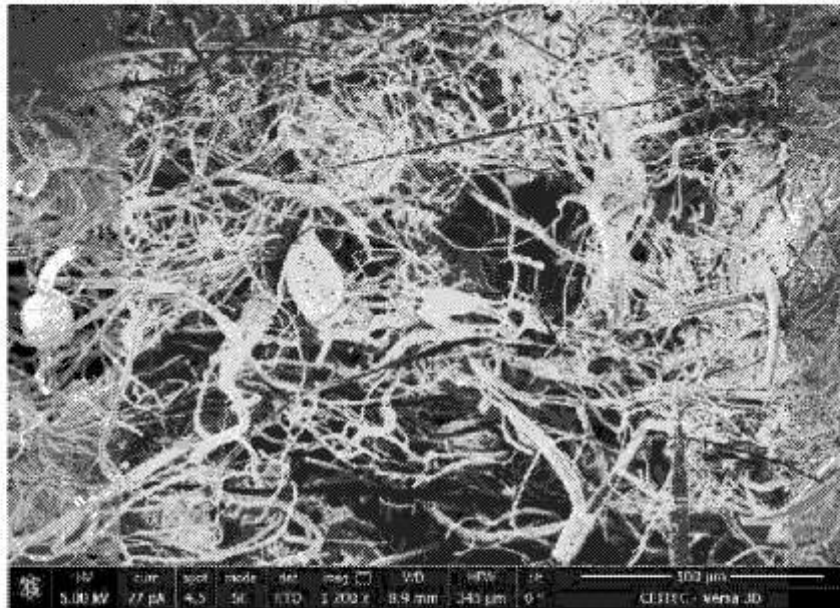
Obr. 8a



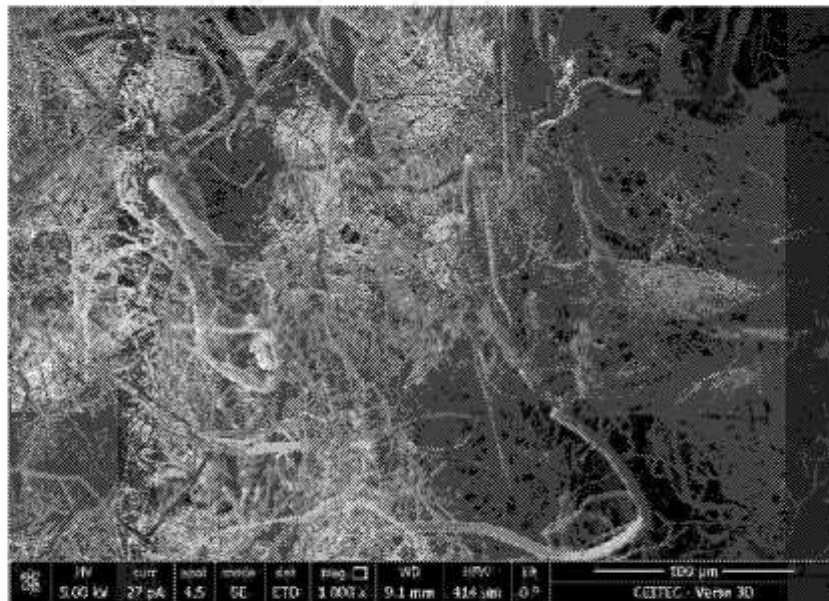
Obr. 8b



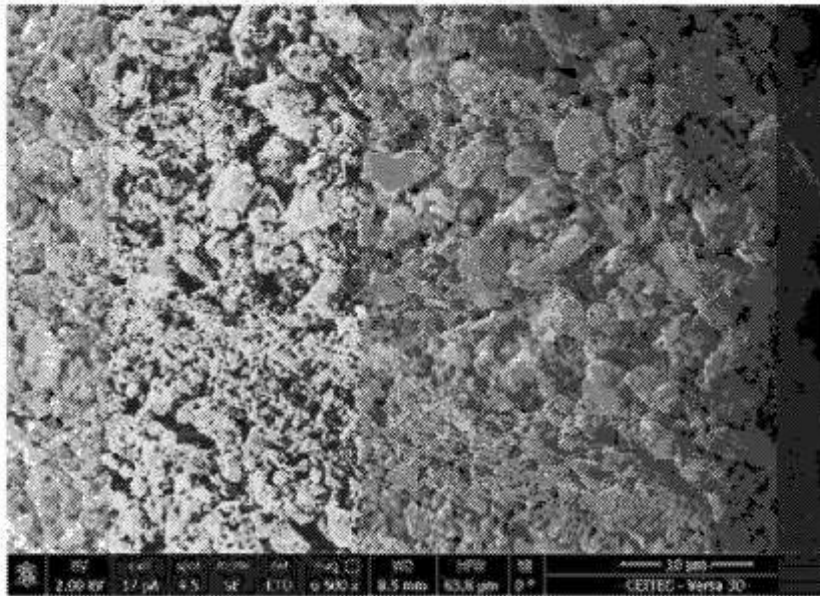
Obr. 8c



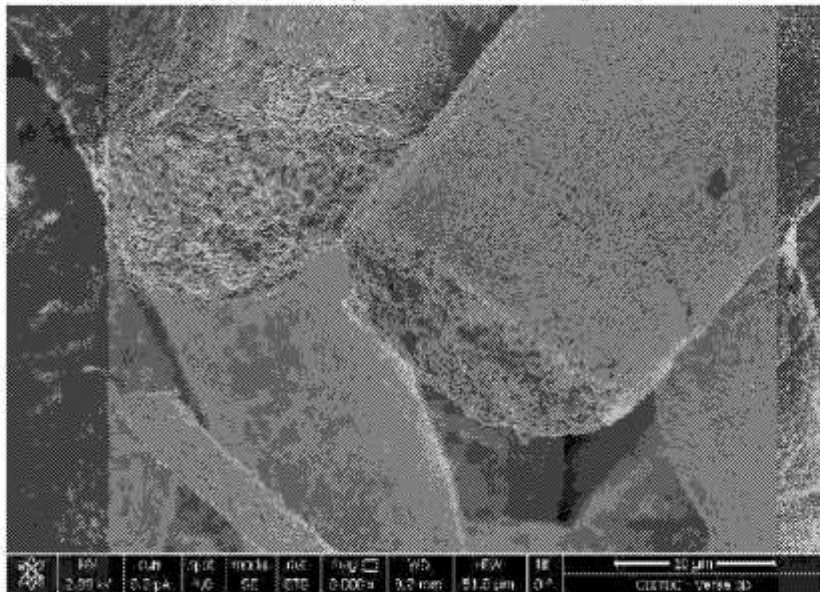
Obr. 9a



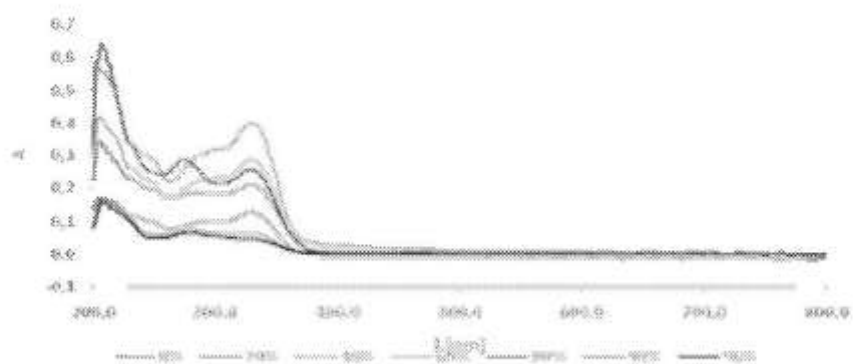
Obr. 9b



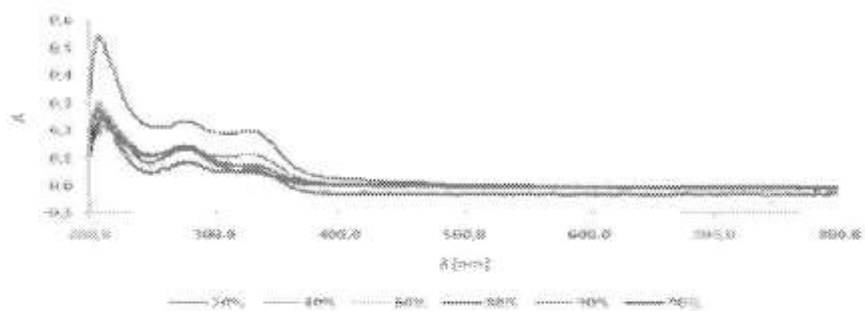
Obr. 10a



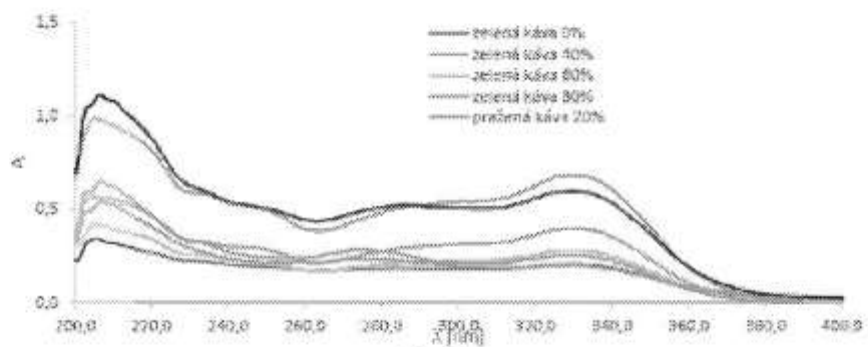
Obr. 10b



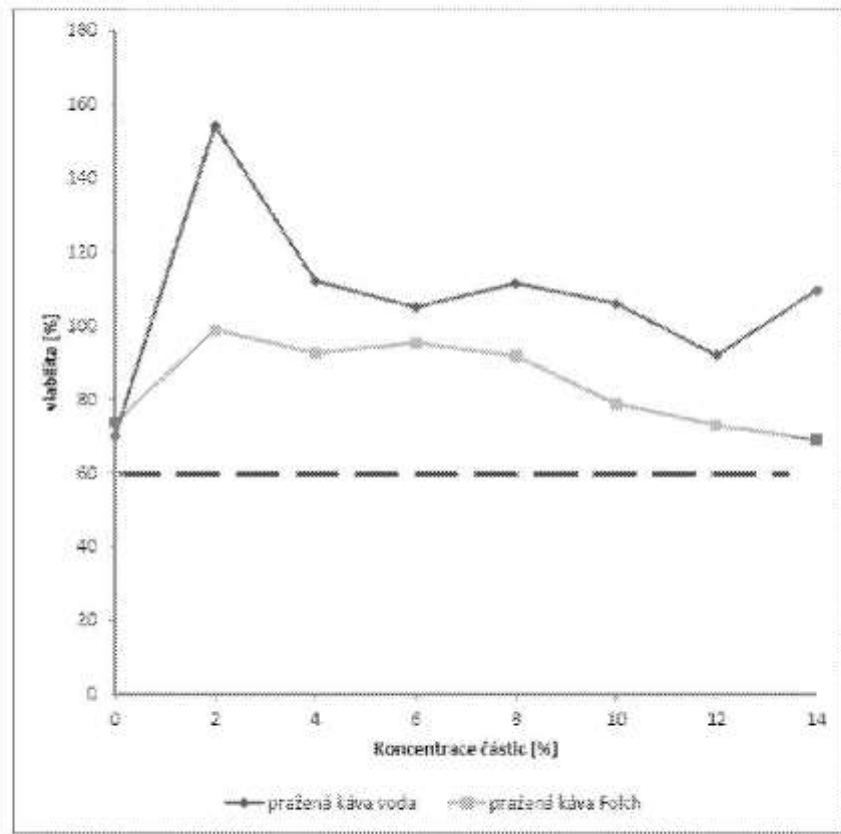
Obr. 11a



Obr. 11b



Obr. 11c



Obr. 12

PŘÍLOHA 6

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.06.2017**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.12.2018**
(Věstník č. 50/2018)

(21) Číslo dokumentu:

2017-317

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C08G 63/08 (2006.01)
C08G 63/06 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ
- (72) Původce:
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc., Brno - Bystrc, CZ
Mgr. Vojtěch Kundrát, Ostrava - Moravská
Ostrava, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsob rozpouštění biodegradabilních polyesterů

(57) Anotace:
Předmětem je způsob rozpouštění polymerů, patřících do skupiny biodegradabilních polyesterů, využívající dvou a více rozpouštědel, kdy rozpouštěným polymerem je poly-(R)-3-hydroxybutyrát, poly-(R)-3-hydroxybutyrát-ko-valerát, polymléčná kyseliny nebo polybutyrát adipát tereftalát. Polymr se za míchání rozpustí v methyl dichloroacetátu o teplotě 0 °C až 143 °C a následně se přidá 2,2,2-trichloroethanol a/nebo 2, 2,2-trifluoroethanol o teplotě v rozmezí 0 °C až 151 °C. Koncentrace polymeru ve směsi rozpouštědel činí 0,1 hm.% až 25 hm.%; hmotnostní poměr methyl dichloroacetátu vůči 2,2,2-trichloroethanolu a/nebo vůči 2,2,2-trifluoroethanolu ve směsi polymeru s rozpouštědly činí 1:99 až 99:1. Použitý systém rozpouštědel pro přípravu polymerního roztoku z biodegradabilních polyesterů je využitelný jako multifunkční prekurzor přípravy materiálů založených na roztoku polymeru.

CZ 2017 - 317 A3

Způsob rozpuštění biodegradabilních polyesterů

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu rozpuštění polymerů, patřících do skupiny biodegradabilních polyesterů v systému dvou a více rozpouštědel určených pro vytvoření stabilního roztoku o vysoké koncentraci polymeru nebo směsi polymerů.

Stav techniky

Vytvoření stabilního a vysoce koncentrovaného roztoku polymeru v ideálně netoxickém a vhodném rozpouštědle pro danou aplikaci je základem mnoha metod přípravy materiálů, od tenkých vrstev, filmů, vláken, nanovláken až po membrány nebo částice. Rozpuštěný polymer může být také základem pro užité výrobky zahrnující lepidla, barvy, laky nebo oleje s upravenou viskozitou a dalších [1]. Vytvořený roztok polymeru může sloužit i pro rychlejší a snadnější charakterizaci polymeru ať už jde o specifické znečištění zjistitelné turbidimetricky, získání průměrné viskozitní molární hmotnosti nebo příprava roztoku pro charakterizaci gelovou permeační chromatografií [2].

Do skupiny biodegradabilních polyesterů patří mnoho různých homopolymerů, kopolymerů, blokových kopolymerů a dalších polymerů s různým uspořádáním opakujících se jednotek. Souhrnně můžeme biodegradabilní polyester označit za polymer obsahující opakující se esterovou vazbu v hlavní řetězci, který vykazuje za vhodných podmínek biodegradabilitu dle definice Evropské normy EN14432. Příkladem takových materiálů je rodina polyhydroxyalkanoátů (PHA) zahrnující vedle mnohých dalších polymerů nejdůležitější poly-(R)-3-hydroxybutyrát (PHB) a kopolymer poly-3-hydroxybutyrát-ko-3-hydroxyvalerát (PHBV) s proměnlivým obsahem valerátu ve struktuře. Mezi průmyslově a užitém rozšířené biodegradabilní polyesterů patří polymléčná kyselina, v krystalické i amorfni formě. Polykaprolakton (PCL) nachází uplatnění především v tkáňovém inženýrství. Nejjednodušší polyesterovou strukturou je polyglykolová kyselina (PGA), jejímž širší využití brání citlivost vůči hydrolyze. Polydioxanon (PDO) je polymer využívaný v medicíně pro přípravu chirurgického šití. Jako další příklady mohou být uvedeny polyvalerolakton (PVL), polyetylen sukcinát (PES) a poly(ϵ -dekalakton) (PDL). Mezi průmyslově využívané polymery patří syntetický polybutyrát-adipát-tereftalát (PBAT) a polybutylen sukcinát (PBS). Zmíněné polymery jsou charakteristické nerozpustností ve vodě a dle polymeru proměnlivou chemickou nestálostí vůči alkalické nebo kyselé hydrolyze. Biodegradabilní polymery mohou být přírodního původu, jak je to například u PHB nebo PHBV, synteticky přírodního původu, kdy prekurzor pro polymerizaci je získán z přírodních zdrojů a následně je polymerizace provedena synteticky (PLA), nebo čistě syntetického původu (PCL, PBAT, PES, PBS). U PBS je očekáván přesun do kategorie synteticky přírodního původu z důvodu produkce kyseliny butandiové fermentací [3].

Rozpustnost polymerů je určena zvoleným systémem polymer – rozpouštědlo a dále jejich strukturou, případným větvením, molekulovou hmotností, polydisperzitou, krystalinitou a vnějšími podmínkami jako je především teplota. V některých případech i zdánlivě rozpuštěný polymer po vychladnutí a daném čase vytvoří termoreverzibilní gel, který po opětovném zahřátí opět přejde do roztoku [4], jako je to například u poly-(R)-3-hydroxybutyrátu [5] ve většině běžně používaných rozpouštědel (dimethylformamid (DMF), dimethylacetamid (DMAc), dimethylsulfoxid (DMSO), toluen (TN), chlorbenzen (CB) a mnohé další) nebo u polymeru PBAT v případě DMF, DMAc. Zda ke tvorbě gelu dojde či nikoliv závisí na koncentraci, teplotě, krystalinitě polymeru a ve výsledku na termodynamické výhodnosti gelace [4]. U malých koncentrací nemusí ke gelaci dojít vůbec, případně velmi pomalu. Tvorba termoreverzibilního gelu je jistě zajímavým fenoménem pro určité aplikace, ovšem získání časově a teplotně stabilního roztoku je základem mnohých druhů zpracování, jak bylo zmíněno výše. Stabilita

roztoku je pak klíčová pro dlouhodobé průmyslové procesy, například elektrostatického nebo mokrého zvláknování.

Zatímco například polyamidy bývají rozpouštěny v kyselině mravenčí nebo octové [1], u polyesterů může takové rozpouštědlo reagovat s rozpouštěným materiálem a snížit tak molekulovou hmotnost polymer, což se projeví v mechanických vlastnostech výsledného materiálu. Volba rozpouštědla by měla také zahrnovat environmentální a pracovní bezpečnostní odpovědnost. Pokud není možné se toxickým rozpouštědlem vyhnout, bývá zajištěna buď recyklace, nebo katalytické odbourání použitého, například vypařeného, rozpouštědla.

Popsané biodegradabilní polyesteru ve většině případů jsou rozpustné v halogenovaných rozpouštědlech. Nejběžněji používány jsou chloroform (CF) a dichlormethan (DCM) a dále 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), hexafluoroisopropanol (HFIP). V minulosti bývaly používány látky jako 1,2-dichloroethan (DCE), 1,1,2,2-tetrachloroethan (TCE), tetrachlormethan (TCM), 1,2,3-trichloropropan (TCP) a další, které jsou dnes zakázány vzhledem k velké akutní toxicitě a environmentální zátěži.

Používaná zmíněná rozpouštědla společně s dimethylformamidem a dimethylacetamidem tvoří základní sestavu rozpouštědel, jak v akademické, tak průmyslové literatuře. Kromě užití jako rozpouštědla se halogenované sloučeniny používají jako extrakční činidlo při separaci přírodních biopolymerů, PHB a PHBV, z biomasy [6], CN102493021.

Roztoky biodegradabilních polyesterů s různými rozpouštědly jsou využívány pro různé aplikace. Extrakci PHB a PHBV rozpouštědly isoamyl propionát, propyl butyrát, isoamyl valerát a isoamyl isovalerát se zabývá mezinárodní přihláška WO2006/092033 a také WO2006/031492A1, používající jako rozpouštědlo 4-methylpantan-2-on pro extrakci PHB a PHBV z biomasy. CN103446060 patent se zabývá přípravou nanočástic z PHB a dalších látek vycházející z CF nebo DCM roztoku PHB. Přípravou nanovláknenného kompozitu na základě polymerů PHB a PHBV vycházející z roztoku na základě dvou rozpouštědel, kdy prvním rozpouštědlem je DMF, DMAc, tetrahydrofuran (THF) nebo ethanol (EtOH), kdy druhým rozpouštědlem je DCM, DCE, CF, diethylen glykol, nebo dimethylether, se zabývá CN102493021. Směs DMSO a TFE jako roztok polymeru pro přípravu filmů částečně tvořených PHBV je použita v dokumentu CN102504298. CN1380114 uvádí přípravu materiálu pro tkáňové inženýrství z roztoku PHB a polyethylenu z CF, dioxanového nebo THF roztoku. Patent KR20080020580 se zabývá přípravou emulze dvou rozpouštědel a rozpuštěného polymeru, kdy rozpuštěným polymerem jsou alifatické polyesteru zahrnující PLA, PHB, PGA, PCL a další a rozpouštědlem polymeru jsou estery mono, di a tri halogenovaných organických kyselin, methyl chloroacetát, methyl dichloroacetát, ethyl dichloroacetát a další.

Literatura

- [1] Wypych G; Handbook of Polymers, *ChemTec Publishing*, 2012, ISBN: 978-1-895198-47-8
- [2] Billmayer FW Jr. *Polymer engineering and science*, 1966, 359-362
- [3] Niaounakis M; Biopolymers: Processing and Products, *Elsevier*, 2015, ISBN-13 978-0323266987
- [4] Semenov AN, Rubinstein M *Macromolecules* 1998, 31, 1373-1385
- [5] Césaró A; Fabri D; Sussich F; Paradossi G *Macromol. Symp.* 1999 138, 165-174
- [6] Hahn SK; Chang YK; Lee SY *Applied and Environmental Microbiology* 1995, 61, 34-39

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky používaných rozpouštědel polymerů řeší použití systému rozpouštědel podle vynálezu. Přednětem vynálezu je způsob rozpouštění polymerů, patřících do skupiny biodegradabilních polyesterů, využívající dvou a více rozpouštědel, kdy rozpouštěným polymerem je poly-(R)-3-hydroxybutyrát, poly-(R)-3-hydroxybutyrát-ko-valerát, polymléčná kyselina nebo polybutyrát adipát tereftalát. Polymer se za míchání rozpustí v methyl dichloroacetátu o teplotě 0 °C až 143 °C a následně se přidá 2,2,2-trichloroethanol a/nebo 2,2,2-trifluoroethanol o teplotě v rozmezí 0 °C až 151 °C. Koncentrace polymeru ve směsi rozpouštědel činí 0,1 hm.% až 25 hm.%, hmotnostní poměr methyl dichloroacetátu vůči 2,2,2-trichloroethanolu a/nebo vůči 2,2,2-trifluoroethanolu ve směsi polymeru s rozpouštědly činí 1:99 až 99:1. V případě přítomnosti tří rozpouštědel může být poměr methyl dichloroacetátu vůči 2,2,2-trichloroethanolu jiný, než poměr methyl dichloroacetátu vůči 2,2,2-trifluoroethanolu.

Ve výhodném provedení podle vynálezu nabývá poly-(R)-3-hydroxybutyrát hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 80 000 Da až 1 000 000 Da, poly-(R)-3-hydroxybutyrát-ko-valerát nabývá hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 80 000 Da až 1 000 000 Da, polymléčná kyselina nabývá výhodně hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 10 000 Da až 120 000 Da a polybutyrát adipát tereftalát nabývá výhodně hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 10 000 Da až 200 000 Da.

Přehled vobrazení

Obr. 1 – Závislost viskozity roztoku PHB v systému rozpouštědel na teplotě a času

Obr. 2 – Závislost viskozity roztoku PHB v methyl dichloroacetátu na teplotě a času

Obr. 3 – Závislost viskozity roztoku PBAT v systému rozpouštědel na teplotě a času

Obr. 4 – Závislost viskozity roztoku PBAT v methyl dichloroacetátu na teplotě a času

Příklady uskutečnění vynálezu

Měření viskozity roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu v závislosti na teplotě, koncentraci a čase a v různých rozpouštědlech

Při výzkumu rozpustnosti poly-(R)-3-hydroxybutyrátu (CAS - 29435-48-1) bylo zjištěno, že polymer je rozpustný v temperovaném rozpouštědle methyl dichloroacetát (CAS - 116-54-1) na teplotu v rozmezí od 0 °C do 143 °C v koncentracích od velmi nízké 0,1 hm. % až po velmi vysokou 25 hm. %. Po vychladnutí roztoku na laboratorní teplotu nebo uplynutí časové prodlevy v závislosti na zvolené koncentraci tvoří roztok pevné skupenství (Graf 2). Bylo zjištěno, že přídavek 2,2,2-trifluoroethanolu (CAS - 75-89-8) a/nebo 2,2,2-trichloroethanolu (CAS - 115-20-8) v celkové koncentraci od 1 hm. % až po 90 hm. % v libovolném poměru zpomaluje nebo zastavuje proces gelace roztoku. Tento proces byl studován na základě měření viskozity v závislosti a teplotě, koncentraci a čase.

Pro srovnání byl po rozpouštění veškerého polymeru za teploty 50 °C odebrán z magnetické míchačky s ohřevem roztok a na rotačním viskozimetru byla za pomoci vřetena R6 a rychlosti rotace 100 rpm měřena viskozita připraveného roztoku. Tak byla získána závislost viskozity roztoku na teplotě a času (Graf 1). Ani po uplynutí 25 hodin nedošlo ke ztuhnutí roztoku.

Měření viskozity roztoku polybutyrát-adipát-tereftalátu (Ecoflex -BASF) v závislosti na teplotě,

koncentraci a čase a v různých rozpouštědlech

Polybutyrát-adipát-tereftalát (PBATu (CAS - 55231-08-8) se rozpouštěl v temperovaném rozpouštědle methyl dichloroacetátu (CAS - 116-54-1) na teplotu v rozmezí od 0 °C do 143 °C v koncentracích od velmi nízké 0,1 hm. % až po velmi vysokou 25 hm. %. Po vychladnutí roztoku na laboratorní teplotu nebo uplynutí časové prodlevy v závislosti na zvolené koncentraci však tvořil roztok pevné skupenství.

Byl připraven 10 hm. % roztok PBAT (Ecoflex BASF) v systému rozpouštědel methyl dichloroacetát a 2,2,2-trichloroethanol v hmotnostním poměru 3:1 respektive. Bylo zjištěno, že přidavek 2,2,2-trifluoroethanolu (CAS - 75-89-8) a/nebo 2,2,2-trichloroethanolu (CAS - 115-20-8) v celkové koncentraci od 1 hm. % až po 90 hm. % v libovolném poměru zpomaluje nebo zastavuje proces gelace roztoku. Tento proces byl studován na základě měření viskozity v závislosti a teplotě, koncentraci a čase.

Byla sledována teplota roztoku, který po rozpuštění veškerého polymeru za teploty 50 °C byl odebrán z magnetické míchačky s ohřevem a na rotačním viskozimetru byla za pomoci vřetena R6 a rychlosti rotace 100 rpm měřena viskozita připraveného roztoku. Tak byla získána závislost viskozity roztoku na teplotě a času (Graf 3). Ani po uplynutí 25 hodin nedošlo ke ztuhnutí roztoku.

Jako porovnání byl zvolen 10 hm. % roztok PBAT (Ecoflex BASF) pouze v čistém methyl dichloroacetátu. Po vytvoření roztoku při 50 °C byl roztok měřen za stejných podmínek jako v předchozím případě. Takto byla získána závislost viskozity roztoku na teplotě a času (Graf 4). Ztuhnutí roztoku nastalo po 276 minutách. Viskozita výrazněji narůstala po uplynutí přibližně dvou až tří hodin.

Příklad 1

30 *Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu*

Komerčně dostupný polymer poly-(R)-3-hydroxybutyrát (2 g) o hmotnostně střední molekulové hmotnosti činící 600 000 Da byl za míchání rozpuštěn v temperovaném methyl dichloroacetátu (13,5 g) o teplotě 50 °C a následně bylo přidáno druhé rozpouštědlo, temperovaný 2,2,2-trichloroethanol (4,5 g), o teplotě 50 °C. Takto byl připraven roztok o koncentraci polymeru 10 hm. % s hmotnostním poměrem rozpouštědel 3:1.

Příklad 2

40 *Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu*

Roztok byl připraven dle příkladu 1 s tím rozdílem, že koncentrace polymeru v roztoku činila 25 hm. %.

45 Příklad 3

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

Roztok byl připraven dle příkladu 1 s tím rozdílem, že koncentrace polymeru v roztoku činila 50 0,1 hm. %.

Příklad 4

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

5 Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 3 s tím rozdílem, že hmotnostní poměr rozpouštědel činil 99:1.

Příklad 5

10 *Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu*

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 3 s tím rozdílem, že hmotnostní poměr rozpouštědel činil 1:99.

15 Příklad 6

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

20 Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 5 s tím rozdílem, že místo 2,2,2-trichloroethanolu byl použit 2,2,2-trifluoroethanol.

Příklad 7

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

25 Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 6 s tím rozdílem, že rozpouštědlo methyl dichloroacetát bylo temperováno na teplotu 0 °C.

Příklad 8

30 *Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu*

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 6 s tím rozdílem, že rozpouštědlo methyl dichloroacetát bylo temperováno na teplotu 143 °C.

35 Příklad 9

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

40 Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 8 s tím rozdílem, že druhým rozpouštědlem byl 2,2,2-trifluoroethanol, temperován na teplotu 0 °C.

Příklad 10

45 *Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu*

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 8 s tím rozdílem, že druhým rozpouštědlem byl 2,2,2-trifluoroethanol, temperován na teplotu 151 °C.

50 Příklad 11

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

55 Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 8 s tím rozdílem, že druhým rozpouštědlem byl 2,2,2-trichlorethanol, temperován na teplotu 0 °C.

Příklad 12

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

5

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 8 s tím rozdílem, že druhým rozpouštědlem byl 2,2,2-trichlorethanol, temperován na teplotu 151 °C.

Příklad 13

10

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 8 s tím rozdílem, že 2,2,2-trifluoroethanol byl temperován na teplotu 74 °C.

15

Příklad 14

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

20

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že hmotnostně střední molekulová hmotnost polymeru činila 80 000 Da.

Příklad 15

25

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že hmotnostně střední molekulová hmotnost polymeru činila 1 000 000 Da.

30

Příklad 16

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu-ko-valerátu

35

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že použitým polymerem byl komerčně dostupný poly-(R)-3-hydroxybutyrát-ko-valerát o hmotnostně střední molekulové hmotnosti polymeru 80 000 Da a obsahu valerátu v hlavní řetězci do 30 hm. %.

Příklad 17

40

Příprava roztoku poly-(R)-3-hydroxybutyrátu-ko-valerátu

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že použitým polymerem byl komerčně dostupný poly-(R)-3-hydroxybutyrát-ko-valerát o hmotnostně střední molekulové hmotnosti polymeru 1 000 000 Da a obsahu valerátu v hlavní řetězci do 30 hm. %.

45

Příklad 18

Příprava roztoku polybutyrát adipát tereftalátu

50

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že použitým polymerem byl komerčně dostupný polybutyrát adipát tereftalát o hmotnostně střední molekulové hmotnosti 10 000 Da.

Příklad 19

Příprava roztoku polybutyrát adipát tereftalátu

- 5 Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že použitým polymerem byl komerčně dostupný polybutyrát adipát tereftalát o hmotnostně střední molekulové hmotnosti 200 000 Da.

Příklad 20

10

Příprava roztoku polymléčné kyseliny

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že použitým polymerem byla komerčně dostupná polymléčná kyselina o hmotnostně střední molekulové hmotnosti 10 000 Da.

15

Příklad 21

Příprava roztoku polymléčné kyseliny

20

Roztoky byly připraveny dle příkladů 1 až 13 s tím rozdílem, že použitým polymerem byla komerčně dostupná polymléčná kyselina o hmotnostně střední molekulové hmotnosti 120 000 Da.

Příklad 22

25

Bylo postupováno jako v příkladech 1 až 21 s tím rozdílem, že kromě rozpouštědla methyl dichloroacetátu se použila také směs rozpouštědel 2,2,2-trichloroethanolu a 2,2,2-trifluoroethanolu v hmotnostním poměru 1:1.

30

Příklad 23

Bylo postupováno jako v příkladech 1 až 22 s tím rozdílem, že kromě rozpouštědla methyl dichloroacetátu se použila také směs rozpouštědel 2,2,2-trichloroethanolu a 2,2,2-trifluoroethanolu v hmotnostním poměru 99:1.

35

Příklad 24

40

Bylo postupováno jako v příkladech 1 až 23 s tím rozdílem, že kromě rozpouštědla methyl dichloroacetátu se použila také směs rozpouštědel 2,2,2-trichloroethanolu a 2,2,2-trifluoroethanolu v hmotnostním poměru 1:99.

Průmyslová využitelnost

45

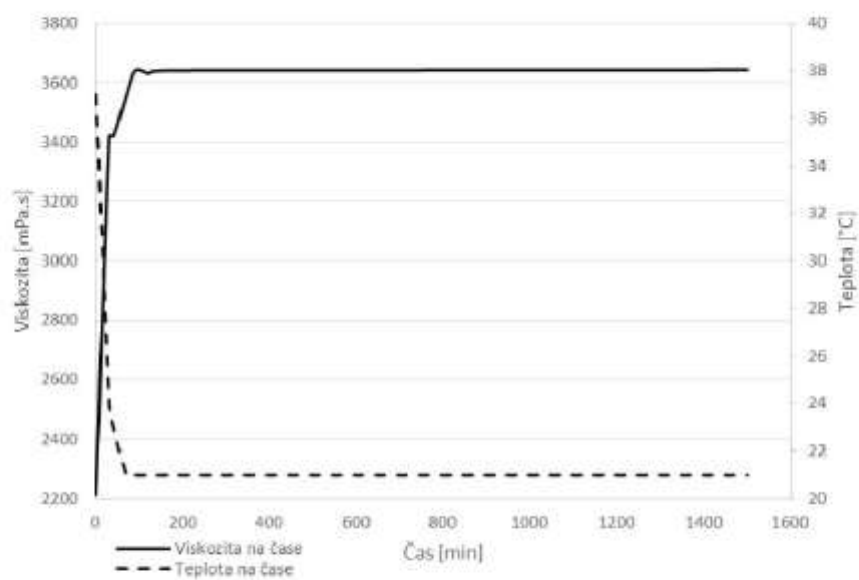
Použitý systém rozpouštědel pro přípravu polymerního roztoku z biodegradabilních polyesterů nalézá uplatnění jako multifunkční prekurzor přípravy materiálů založených na roztoku polymeru, například mokré zvláknování, příprava tenkých vrstev, příprava nanovláken elektrostatickým zvláknováním nebo příprava částic a nanočástic srážením.

50

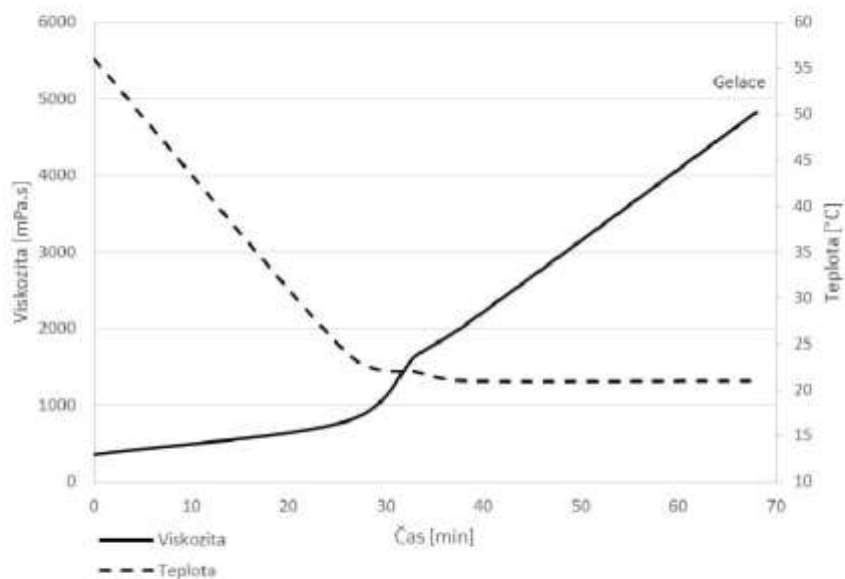
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob rozpouštění polymerů, patřících do skupiny biodegradabilních polyesterů využívající dvou a více rozpouštědel **vyznačující se tím**, že rozpouštěný polymer, kterým je poly-(R)-3-hydroxybutyrát, poly-(R)-3-hydroxybutyrát-ko-valerát, polymléčná kyselina nebo polybutyrát adipát tereftalát se za míchání rozpustí v methyl dichloroacetátu o teplotě 0°C až 143°C a následně se přidá 2,2,2-trichloroethanol a/nebo 2,2,2-trifluoroethanol o teplotě v rozmezí 0°C až 151 °C, přičemž koncentrace polymeru ve směsi rozpouštědel činí 0,1 hm.% až 25 hm.%, kde hmotnostní poměr methyl dichloroacetátu vůči 2,2,2-trichloroethanolu a/nebo vůči 2,2,2-trifluoroethanolu ve směsi polymeru s rozpouštědly činí 1:99 až 99:1, kde v případě přítomnosti tří rozpouštědel může být poměr methyl dichloroacetátu vůči 2,2,2-trichloroethanolu jiný než poměr methyl dichloroacetátu vůči 2,2,2-trifluoroethanolu.
2. Způsob dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že poly-(R)-3-hydroxybutyrát nabývá hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 80 000 Da až 1 000 000 Da.
3. Způsob dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že poly-(R)-3-hydroxybutyrát-ko-valerát nabývá hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 80 000 Da až 1 000 000 Da.
4. Způsob dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že polymléčná kyselina nabývá hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 10 000 Da až 120 000 Da.
5. Způsob dle nároku 1, **vyznačující se tím**, že polybutyrát adipát tereftalát nabývá hmotnostně střední molekulovou hmotnost v intervalu 10 000 Da až 200 000 Da.

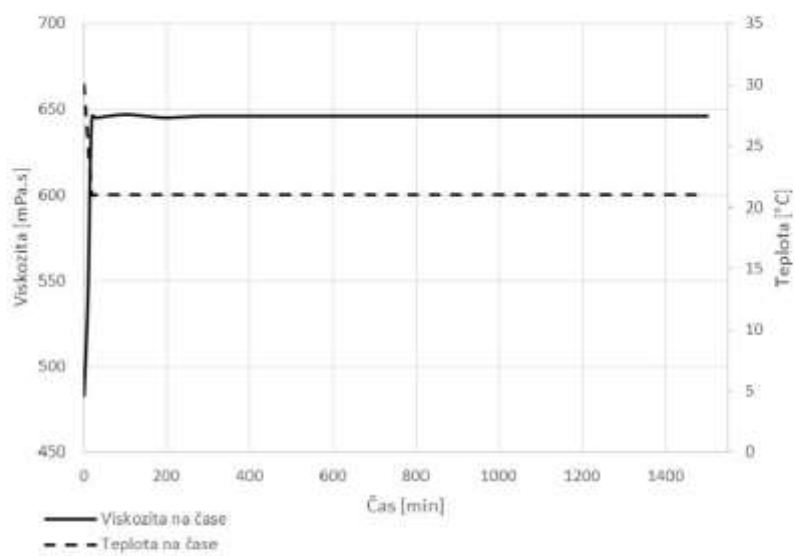
2 výkresy



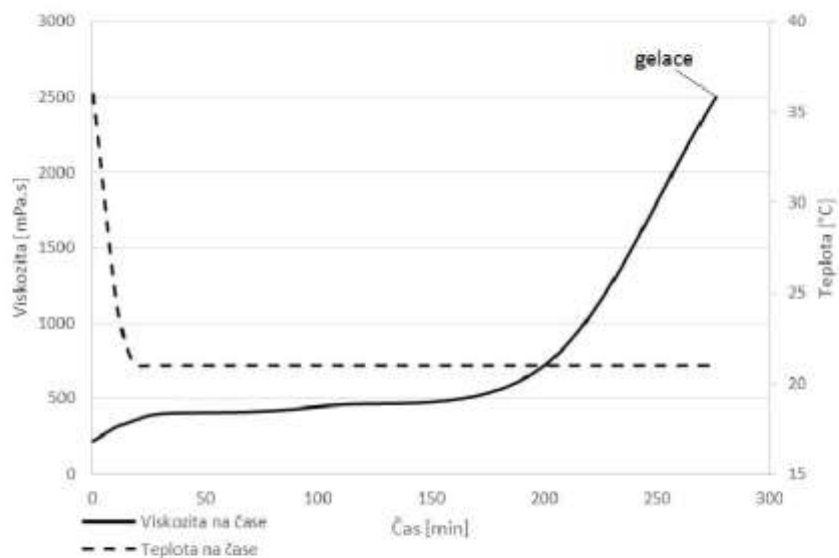
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

PŘÍLOHA 7

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

30 069

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C08L 67/06 (2006.01)
C08F 8/34 (2006.01)
D01F 9/26 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 99/00 (2011.01)
B01D 35/16 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-32468**
(22) Přihlášeno: **13.06.2016**
(47) Zapsáno: **29.11.2016**

- (73) Majitel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno - Veveří, CZ
- (72) Původce:
Vojtěch Kundrát, Ostrava - Moravská Ostrava, CZ
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc., Brno - Bystrc, CZ

- (54) Název užitého vzoru:
**Nanovlákný sorpční materiál na bázi
polyhydroxybutyrátu pro sorpci těžkých
kovů**

CZ 30069 U1

Nanovláknenný sorpční materiál na bázi polyhydroxybutyrátu pro sorpci těžkých kovůOblast techniky

Technické řešení se týká biodegradovatelného nanovláknenného sorpčního materiálu na bázi polyhydroxybutyrátu pro zachyt těžkých kovů.

5 Dosavadní stav techniky

10 Kontaminace vod těžkými kovy, především rtuť, kadmíem, arsenem, olovem a stříbrem je jedním z největších environmentálních problémů našeho věku. Tato kritická problematika spojená s principy surovin pro plastový průmysl využívající majoritně ropné produkty vede ke značnému znečištění jak plastovým odpadem tak již zmíněnými nebezpečnými neodbouratelnými těžkými kovy. Pro citlivé řešení tohoto problému je potřeba nových materiálů ideálně založených na obnovitelných a především cenově dostupných zdrojích [1]. Takovými zdroji můžeme chápat vedle jiných surovin, dále zmíněných, biodegradabilní polymery z rodiny polyhydroxyalkanoátů, konkrétně polyhydroxybutyrátu.

15 Technologicky nenáročnou úpravou skeletu [1] je možné docílit vzniku materiálu schopného aktivně zachytávat zmíněné těžké kovy, díky thiolovým skupinám navázaným přímo na hlavním polymerním řetězci. Thiolová skupina (-SH) se vyznačuje velkou afinitou a schopností komplexovat těžké kovy. Takovou vazbu je možné nalézt v mnoha užitečných, biogenních či syntetických látkách. Sorpce na polymerní materiál je řízena měrným povrchem sorbentu. Nanovláknenné materiály připravitelné metodou electrospinning (elektrického zvlákňování) vykazují vysoký měrný povrch [2].

20 Jsou známy metody, jak zavádět thiolovou skupinu do alkylového řetězce skrze reakci nukleofilní substituce vazby C-Br nebo C-Cl za pomoci hydrosulfidu sodného (NaSH), analogické látky k hydroxidu sodnému, vyznačující se však rozpustností v některých organických rozpouštědlech, například ethanolu nebo methanolu.

25 Vhodným biodegradabilním polymerem použitelným pro úpravu skeletu je polyhydroxybutyrát (PHB), biopolymer z rodiny polyhydroxyalkanoátů, připravitelný biosyntézou například z použitého potravinářského oleje. Výrobní postup tohoto polymeru představuje kultivaci a několika krokovou extrakci a přečištění od zbylé biomasy. Takto se získává přibližně 5% roztok polymeru v chloroformu, který se zavádí znovu do procesu extrakce [3].

30 Reference:

[1] Hazer, B. and Steinbüchel, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 1 (2007/02/012007), 1-12.

35 [2] Jirsak, O., Sanetnik, F., Lukas, D., Kotek, V., Martinova, L. and Chaloupek, J. A Method of Nanofibers Production from a Polymer Solution Using Electrostatic Spinning and a Device for Carrying Out the Method. WO 2005/024101 A1, City, 2005.

[3] Steinbüchel, A. Use of Biosynthetic, Biodegradable Thermoplastics and Elastomers from Renewable Resources: The Pros and Cons. *LMSA*, 32, 4 (1995), 653-660.

Podstata technického řešení

40 Technické řešení uvádí nanovláknenný sorpční materiál využívající polyhydroxybutyrát jako biodegradabilní polymer použitelný pro úpravu skeletu thiolovou skupinou (-SH), vyznačující se nerozpustností ve vodném prostředí a sorpční aktivitou vůči těžkým kovům jak v podobě iontů tak i nanočástic. Nanovláknna se především vyznačují vysokým měrným povrchem, který je klíčový pro efektivní zachyt cílených kontaminantů.

45 Podstatou technického řešení je nanovláknenný sorpční biodegradovatelný materiál na bázi polyhydroxybutyrátu, substituovaného thiolovými skupinami, s obsahem síry v tomto materiálu, stanoveným konduktometrickou titrací, 0,1 % hmotn. až 30 % hmotn.

Průměr vláken nanovláknenného sorpčního materiálu podle technického řešení činí 50 nm až 2000 nm.

Nanovláknenný sorpční materiál podle technického řešení se vyrobí chemickou úpravou skeletu z polyhydroxybutyrátu, kdy se polyhydroxybutyrát v chloroformovém roztoku podrobí přímé radikálové chloraci za pomoci elementárního chloru, zaváděného do chloroformového roztoku polyhydroxybutyrátu, při teplotě 0 °C až 25 °C, tlaku atmosférickém až maximálně 200 x 10³ Pa v objemu odpovídající molárnímu poměru polymer-chlor 1000:1 až 1:1 za osvětlení halogenovou lampou až do změny barvy roztoku ze žluté na bezbarvou za vzniku chlorovaného polyhydroxybutyrátu, který se následně rozpustí v organickém rozpouštědle na koncentraci 30 % hmotn. Organickým rozpouštědlem je výhodně chloroform, toluen, dimethylformamid nebo jejich směs.

Po přímé radikálové chloraci se provede elektrostatické zvláknění chlorovaného polyhydroxybutyrátu při napětí 5 až 70 kV, zvlákněný chlorovaný polyhydroxybutyrát se pak přidá do alkoholického roztoku s rozpouštěcí schopností vůči hydrosulfidu sodnému a nerozpustností vůči zvlákněnému polyhydroxybutyrátu o koncentraci 1 až 10 % hmotn. Alkoholickým roztokem s rozpouštěcí schopností vůči hydrosulfidu sodnému a nerozpustností vůči zvlákněnému polyhydroxybutyrátu je výhodně roztok ethanolu, isopropanolu, methanolu nebo jejich směsi.

Zvlákněný chlorovaný polyhydroxybutyrát se při teplotě 40 °C až 78 °C a za použití NaSH o koncentraci 1 až 10 % hmotn. podrobí substituční heterogenní reakci za vzniku zvlákněného materiálu polyhydroxybutyrátu substituovaného -SH skupinami až do obsahu thiolových skupin v polyhydroxybutyrátu 30 % hmotn. stanovených konduktometrickou titrací. S výhodou je možné využít aparaturu (Obrázek 1).

Na základě výpočtu molárního poměru je možné odhadnout výsledný obsah chloru v materiálu z hlediska toho, že polovina hmotnosti chloru bude zavedena v případě 100 % reaktivity do struktury a druhá polovina bude převedena na HCl.

Může se též nejprve provést elektrostatické zvláknění polyhydroxybutyrátu, vložením vláknenného materiálu do uzavíratelné nádoby s přívodem a odvodem plynu. Vláknenný materiál se vystaví působení plynného chloru za osvětlení halogenovou lampou bez použití rozpouštědla při teplotě 0 °C až 50 °C, tlaku atmosférickém až 200 x 10³ Pa a následně se provede substituční heterogenní reakce.

Podle výhodného provedení je obsah vázaného chloru v chlorovaném polyhydroxybutyrátu po radikálové chloraci stanovený titrací odměrným roztokem dusičnanu stříbrného 0,1 % hmotn.

Podle dalšího výhodného provedení je obsah síry ve zvlákněném polyhydroxybutyrátu, substituovaném -SH skupinami stanovený konduktometrickou titrací 0,1 až 30 % hmotn.

Tímto procesem je možné získat jak nízce tak vysoce substituovaný polymer, kde určujícím krokem je obsah vázaného chloru a míra substituce za thiolovou skupinu. To znamená, že pro získání materiálu s vysokým obsahem thiolových skupin je zapotřebí získat materiál s vysokým obsahem chloru, následná substituční reakce záměny chloru za thiol určuje koncentraci thiolových skupin. Obsah vázaného chloru je možné stanovit titračně, kdy materiál je degradován za zvýšené teploty koncentrovaným roztokem hydroxidu sodného a výsledný roztok je ztitrován roztokem dusičnanu stříbrného. Obsah vázané síry je možné zjistit jako sorpční kapacitu vhodného těžkého kovu, například olova.

Materiál se vyznačuje nerozpustností ve vodném prostředí a sorpční aktivitou vůči těžkým kovům jak v podobě iontů tak i nanočástic. Nanovláknna se především vyznačují vysokým měrným povrchem, který je klíčový pro efektivní záchyt cílených kontaminantů. Další výhodou materiálu je ovšem i snadná manipulace vzhledem k makroskopickým rozměrům materiálu, připomínající netkanou textilii. Je tedy možné materiál pohodlně aplikovat ať již jako aktivní filtr či jako sorbent, který po nasycení kontaminanty je pouze vytažen bez nutnosti další filtrace jako například u jiných sorbentů.

Objasnění výkresů

Obrázek č. 1 - schéma reakční aparatury

Obrázek č. 2 - snímek nanovláken z chlorovaného PHB z elektronového rastrovacího mikroskopu

Obrázek č. 3 - distribuce průměrů nanovláken z chlorovaného PHB

5 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1

Do 1 kilogramu roztoku polyhydroxybutyrátu ($M_w = 515$ kDa; $M_n = 175$ kDa), v chloroformu (Penta, stabilizovaný amylenem) o koncentraci 5 % hmotn. (50,00 g polymeru) se postupně zavedlo za chlazení polymerního roztoku ledovou lázní 7 litrů chloru (25 °C, 100 kPa, cca 21 g Cl_2). Následně se roztok ozařoval halogenovou lampou po dobu jedné hodiny. Reakce se ukončila na základě pozorování změny barvy roztoku ze žluté na bezbarvou. Rozpuštěný zbytkový chlor a chlorovodík se vystřípával probubláváním plynného dusíku po dobu dvou hodin při průtoku 5 litrů za minutu. Následně se roztok zahustil na rotační vakuové odparce na objem přibližně 250 ml roztoku a vysrážel se přidávkem 500 ml metanolu. Vysrážené kusy polymeru se odfiltrovaly a sušily v sušárně při 50 °C. Získalo se 59,87 g bílé amorfni polymerní látky, která se analyzovala na obsah chloru za pomoci titrace. Vzorek pro titraci se připravil termickým rozkladem v koncentrovaném roztoku hydroxidu sodného. Následně se určila koncentrace titrací odměrným roztokem dusičnanu stříbrného. Ze spotřeby se vypočítal hmotnostní obsah chloru ve vzorku na 15,3 hmotn. procent. Informace o molekulové hmotnosti získaná gelovou permeační chromatografií činila $M_w = 60$ kDa a $M_n = 24$ kDa. Chlorovaný polymer se opětovně rozpustil ve směsi rozpouštědel toluenu a dimethylformamidu (1:2 hmotnostně) na koncentraci 30 % hmotn. a zvláknil se na průmyslovém elektrostatickém zařízení na nanovlákná (Nanospider) za užití 50 kV vysokého napětí. Získaná nanovlákná textilie se charakterizovala za pomoci elektronové mikroskopie (Obrázek č. 2) a u 50 unikátních vláken se změnil průměr a určila se distribuce (Obrázek č. 3). Průměrný průměr vláken činil 295 nm.

Získaná textilie (5 g) o plošné hmotnosti 10 g/m^2 se vložila do 5 % hmotn. roztoku hydrosulfidu sodného v ethanolu (200 g). Heterogenní směs se zahřívala a refluxovala pod zpětným chladičem po dobu tří hodin. Chemicky upravená textilie se vyjmula, promyla destilovanou vodou, ethanollem a sušila se na vzduchu. Obsah chemicky dostupných thiolových skupiny se stanovil konduktometrickou titrací za pomoci odměrného roztoku octanu stříbrného. Vypočítaný obsah povrchově dostupné síry ze spotřeby odměrného roztoku činil 10,3 % hmotn. To odpovídá 3,21 mmol jednomocných kationtů těžkých kovů na gram sorpčního materiálu při úvaze stejné sorpční kapacity jako u stříbrných iontů. Pro dvojmocné kationty těžkých kovů je při stejné úvaze sorpce poloviční, tedy 1,61 mmol/g materiálu.

35 Příklad 2

Postupovalo se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že polyhydroxybutyrát se nejprve elektrostaticky zvláknil a chlorační úprava probíhala heterogenně na kontaktu nanovlákná membrána - plynný chlor, přičemž osvit halogenovou lampou byl zachován. Pracovalo se za atmosférického tlaku a laboratorní teploty.

40 Příklad 3

Postupovalo se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že průměrný průměr vláken činil 50 nm.

Příklad 4

Postupovalo se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že průměrný průměr vláken činil 2000 nm.

Příklad 5

45 Postupovalo se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že obsah vázaného chloru v chlorovaném polyhydroxybutyrátu činil 0,1 % hmotn.

Příklad 6

Postupovalo se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že obsah vázaného chloru v chlorovaném polyhydroxybutyrátu činil 30 % hmotn.

Příklad 7

- 5 Postupovalo se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že obsah síry po úpravě materiálu činil 0,1 % hmotn.

Příklad 8

Postupovalo se jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že obsah síry po úpravě materiálu činil 30 % hmotn.

10 Průmyslová využitelnost

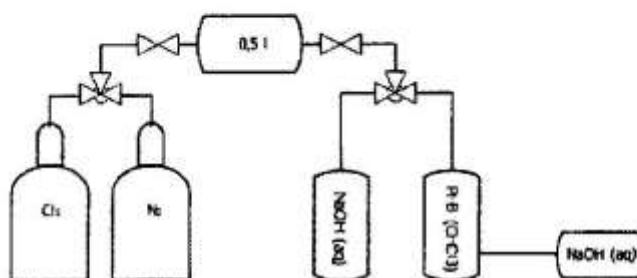
Nanovláknenný materiál polyhydroxybutyrátu je biodegradabilní. Díky makroskopickým rozměrům materiálu, připomínající netkanou textilií je možné materiál pohodlně aplikovat ať již jako aktivní filtr či jako sorbent, který po nasycení kontaminanty je pouze vytažen bez nutnosti další filtrace jako například u jiných sorbentů.

15

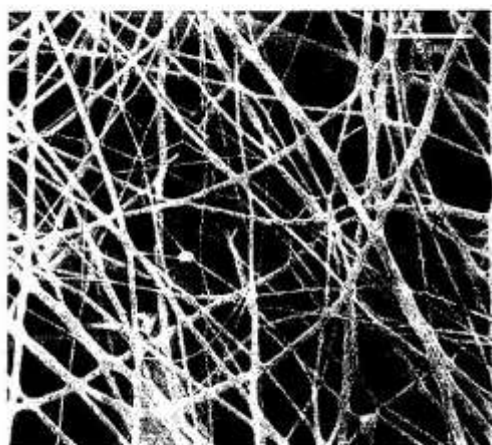
NÁROKY NA OCHRANU

1. Nanovláknenný sorpční biodegradovatelný materiál na bázi polyhydroxybutyrátu, substituovaného thiolovými skupinami, **vyznačující se tím**, že průměr vláken činí 50 nm až 2000 nm.
- 20 2. Nanovláknenný sorpční biodegradovatelný materiál na bázi polyhydroxybutyrátu, substituovaného thiolovými skupinami, podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsah síry v tomto materiálu, stanovený konduktometrickou titrací, činí 0,1 % hmotn. až 30 % hmotn.

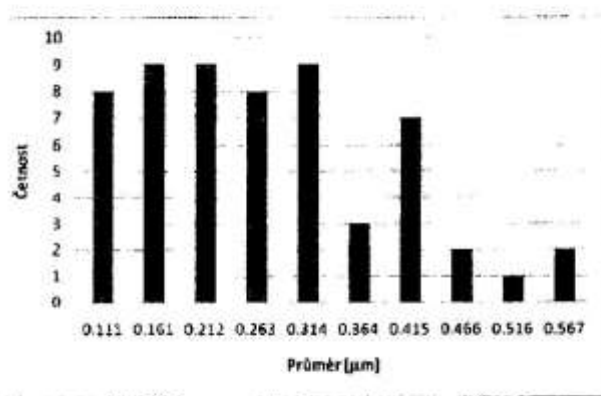
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

Konec dokumentu

PŘÍLOHA 8 - ŽIVOTOPIS

Mgr. Vojtěch Kunderát

Bydliště: 30. Dubna 23, Ostrava, 70200; Czech Republic,
e-mail: vojtechkunderat@seznam.cz
Tel.: +420 721 154 978

Vzdělání:

- doktorské studium – Potravinářská chemie, Vysoké učení technické, Brno (2016-)
- doktorské studium – Materiálová chemie, Masarykova Univerzita, Brno (2016-)
- magisterské studium – Materiálová chemie, Masarykova Univerzita, Brno (2014 –2016)
- bakalářské studium – Obecná chemie, Masarykova Univerzita, Brno (2011-2014)
- Středoškolské studium - SPŠCHG, Aplikovaná chemie, Ostrava (2008-2011)

Pracovní zkušenosti:

- **Srpen 2016 – prosinec 2019;** Nafigate corp.; výzkumný pracovník – Junior, Senior (od 2018)
- **Září 2011 – leden 2012;** Loschmidt Laboratories, Masarykova Univerzita, Brno, CZ
- **Květen 2009 – Září 2011;** Apigenex, soukromý výzkumný ústav, Praha - stážista

Absolvované výzkumné stáže a semináře:

- **Březen 2016;** Workshop analytických Technik pro charakterizaci nanovláken (TUL Liberec)
- **Leden 2016;** Jan Ravenstijn - workshop zaměřený na průmyslové aplikace PHB, Praha
- **Říjen 2015;** Prof. Greiner's research group, University Bayreuth, Bayreuth, Německo (1 měsíc); Projekt: Příprava nových kompozitů anorganických nanočástic a organických polymerů pro aktivní čištění odpadních vod
- **Únor 2015;** Prof. Mathur's research group, University of Cologne, Cologne, německo (1 měsíc); Projekt: Příprava anorganických nanovláken
- **2012;** Výuková stáž, Elmarco s.r.o. Liberec (průběžná, celkový čas 2-3 měsíce); Projekt: Elektrostatické zvlákňování PHB
- **Červenec 2012;** Scanning Electron Microscopy Workshop, UPOL Olomouc
- **Červen - září 2011;** Prof. Turecek's research group, University of Washington, Seattle, USA; Projekt: Electron transfer dissociation of peptides tagged with tunable fixed-charge groups

Získaná ocenění:

- **2015 - VUT Brno;** ocenění za patentovou přihlášku s vysokým ekonomickým potenciálem
- **2014 Nestlé Award II;** inovativní řešení v oblasti čištění odpadních vod – „Pro vodu“
- **2013 Nestlé Award I;** inovativní řešení v oblasti čištění odpadních vod – „Pro vodu“
- **2011 Cena Učené společnosti AVČR;** Grammar School Student Awards
- **2011 cena MŽP;** „Chytrá řešení pro životní prostředí“
- **2011 Talent roku;** MŽP – „Enzymes in the service of environment“

- **2010 České Hlavičky; „GENUS Award for the most significant scientific work“**

Zahraníční stáže absolvované v průběhu doktorského studia:

- **Únor 2017, Tanzánie** – analýza vody a instalace filtračního zařízení, stavba školy (1 měsíc)
- **Únor 2018, Tanzánie** – analýza vody, vývoj vodního filtru, rekonstrukce vodních nádrží, stavba školy (1 měsíc)
- **Červen 2018, Tanzánie** - analýza vody, vývoj vodního filtru, vrtání studny, stavba školy (1 měsíc)
- **Březen 2019, Tanzánie** – analýza vody, vývoj vodního filtru, výstavba modelové manufaktury na kompletaci vodních filtrů (1 měsíc)
- **Duben 2019, Ghana** – Manufaktura na UV ochranný krém pro albínskou populaci, vývoj krému (2 týdny)
- **Srpen 2019, Ghana** – Otevření manufaktury UV ochranného krému pro albínskou populaci, workshop - výroba krému (2 týdny)
- **Září 2020, Tanzánie** – konzultace, oprava vodní nádrže (1 měsíc)
- **Listopad 2020, Ghana** – Kontrola a poradenství výroby UV ochranného krému, školení pracovníků výroby (2 týdny)

Pedagogická činnost v průběhu doktorského studia:

- **Konzultant bakalářské práce** Nicole Černekové „Uvolňování aktivních látek z pórovitého materiálu na bázi poly(3-hydroxybutyrátu) (PHB)“, akademický rok 2018/19
- Metodické školení – konzultace a metodické stáže pro studenty bakalářských, navazujících magisterských i doktorských programů, školení v oblasti metod elektrostatického, mokrého a odstředivého zvlákňování a v oblasti organické syntézy – **předměty Laboratorní projekt I. Laboratorní projekt II, Laboratoř oboru I, Laboratoř oboru II** (8 semestrů, není detailně rozvrhováno)
Bakaláři – J. Hanák, M. Petrželková
Diplomanti – L. Dzurická, M. Káčeríková, J. Bokrová, S. Sosková, M. Plachá, K. Tilšarová,
Doktorandi – R. Pavelková, J. Bokrová, P. Benešová
- Spolupráce na praktické výuce – elektronová mikroskopie, TEM, BET analýza + interpretace výsledků

SEZNAM PUBLIKAČNÍCH A DALŠÍCH VÝSTUPŮ AUTORA

Publikace v recenzovaných časopisech s impaktovým faktorem:

- **KUNDRÁT, V.;** MATOUŠKOVÁ, P.; MÁROVÁ, I. Facile preparation of porous microfiber from poly-3-hydroxybutyrate and its application. *Materials*, 2019, roč. 13, č. 1, s. 1-14. ISSN: 1996-1944.
- **KUNDRÁT, V.;** ČERNEKOVÁ, N.; KOVALČÍK, A.; ENEV, V.; MÁROVÁ, I. Drug Release Kinetics of Electrospun PHB Meshes. *Materials*, 2019, roč. 12, č. 12, s. 1-13. ISSN: 1996-1944.

Přihlášky vynálezů, užitečných vzorů a další průmyslové výstupy:

- MÁROVÁ, I.; POSPÍŠIL, L.; **KUNDRÁT, V.;** VUT v Brně: *Polymerní vlákno a způsob jeho přípravy*. 306448, patent. (2016)
- **KUNDRÁT, V.;** MÁROVÁ, I.; Vysoké učení technické v Brně, Brno - Veveří, CZ: *Nanovláknenný sorpční materiál na bázi polyhydroxybutyrátu pro sorpci těžkých kovů*. 30069, užitečný vzor. (2016)

- MÁROVÁ, I.; **KUNDRÁT, V.**; MATOUŠKOVÁ, P.: PHA Filtr; *Filtr na bázi PHA nanovláken pro filtraci kontaminované vody*. Laboratoř biotechnologie a biomateriálů CMV, FCH VUT v Brně. (funkční vzorek, 2016)
- Kundrát V., Márová I. : **Nanovláknenný materiál na bázi PHA připravený elektrostatickým zvlákněním** Laboratoř biotechnologie a biomateriálů CMV, FCH VUT v Brně. (funkční vzorek, 2016)
- MÁROVÁ, I.; **KUNDRÁT, V.**; BENEŠOVÁ, P. Biodegradabilní vláknenný filtrační materiál se sorpčními vlastnostmi, Zveřejněná přihláška PV 2016-423, 11.7.2016
- MÁROVÁ, I.; PAVELKOVÁ, R.; **KUNDRÁT, V.**; MATOUŠKOVÁ, P. UV filtr na bázi polyhydroxybutyrátu a způsob jeho přípravy, Zveřejněná přihláška 2018-197, 24.4.2018
- MÁROVÁ, I.; **KUNDRÁT, V.** Způsob rozpouštění biodegradabilních polyesterů, Zveřejněná přihláška PV 2017-317, 2.6.2017

Sborníky z mezinárodních a národních konferencí, přednášky:

- MÁROVÁ, I.; PAVELKOVÁ, R.; **KUNDRÁT, V.**; MATOUŠKOVÁ, P.; KOVALČÍK, A.; BOKROVÁ, J. *Preparation and application of PHA based nanofibers and nanoparticles as natural organic UV filters with anti-inflammatory effect*. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. AMSTERDAM: ELSEVIER, 2019. s. S5 (S5 s.) ISSN: 1873-4863. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.05.034
- KOVALČÍK, A.; PERNICOVÁ, I.; KUČERA, D.; OBRUČA, S.; MATOUŠKOVÁ, P.; **KUNDRÁT, V.**; MÁROVÁ, I. *Properties of biogenic PHA nanofibrous materials originated from strains Burkholderia species and Pseudomonas species using grape pomace medium*. Program Agenda & Abstracts, 25th Annual Meeting of the BioEnvironmental Polymer Society, August 15-17, 2018, Rensselaer Polytechnic University, Troy, New York. Troy, New York, USA: Rensselaer Polytechnic University, 2018. s. 37-37.
- MATOUŠKOVÁ, P.; TILŠAROVÁ, K.; SOSKOVÁ, S.; **KUNDRÁT, V.**; PAVELKOVÁ, R.; KOVALČÍK, A.; MÁROVÁ, I. *Preparation and application of functionalized nanofibers from poly(3-hydroxybutyrate)*. Troy, New York, USA: Rensselaer Polytechnic University, 2018. s. 61-61.
- MÁROVÁ, I.; PAVELKOVÁ, R.; **KUNDRÁT, V.** *Souhrnná zpráva o řešení smluvního výzkumu*. FCH VUT v Brně: 2018. s. 1-16.
- MÁROVÁ, I.; MATOUŠKOVÁ, P.; SOSKOVÁ, S.; **KUNDRÁT, V.** Application of PHA-based bioplastics in nanomaterials. *Journal of Chemical Engineering and Process Technology*, 2017, roč. 8, č. 4, s. 38-39. ISSN: 2157-7048.
- MÁROVÁ, I.; **KUNDRÁT, V.**; BENEŠOVÁ, P.; MATOUŠKOVÁ, P.; OBRUČA, S. Use of biodegradable PHA-based nanofibers to removing microorganisms from water. In *2015 IEEE 15TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOTECHNOLOGY*. IEEE, 2015. s. 204-206. ISBN: 978-1-4673-8155-0.
- BENEŠOVÁ, P.; OBRUČA, S.; WURSTOVÁ, A.; **KUNDRÁT, V.**; MÁROVÁ, I. BIODEGRADABILITY TESTING OF MODIFIED PHA-BASED NANOMATERIALS BY STANDARD TEST. In *NANOCON 2014, 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE*. OSTRAVA, CZECH REPUBLIC: TANGER, 2015. s. 1-6. ISBN: 978-80-87294-53-6.
- MÁROVÁ, I.; **KUNDRÁT, V.**; WASSERBAUER, J.; PEKAŘ, M. *Charakterizace nanostrukturovaných materiálů, poradenská a technická pomoc při vývoji a laminaci nanovláknenných materiálů*. Brno: 2015. s. 1-18.

Další výstupy související s řešením tématu disertační práce:

- **KUNDRÁT, Vojtěch**, Zdeněk MORAVEC a Jiří PINKAS. Preparation of thorium dioxide nanofibers by electrospinning. *Journal of Nuclear Materials*. Amsterdam: Elsevier, 2020, roč. 534, JUN 2020, s. 1-8. ISSN 0022-3115. doi:10.1016/j.jnucmat.2020.152153.
- **KUNDRÁT, Vojtěch**, Aleš PATÁK a Jiří PINKAS. Preparation of ultrafine fibrous uranium dioxide by electrospinning. *Journal of Nuclear Materials*. Amsterdam: Elsevier, 2020, roč. 528, JAN 2020, s. 1-10. ISSN 0022-3115. doi:10.1016/j.jnucmat.2019.151877.
- VAŠINA, Petr, Jiří SOPOUŠEK, **Vojtěch KUNDRÁT**, David PAVLIŇÁK, Jakub KELAR a Zuzana JAYASUNDERA. Přírodovědecká fakulta MU proti COVID-19: výroba nanovlákných filtrů do dobrovolnický šitých roušek. In *MUNI Sci Aktuálně*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2020. 5 s.
- **KUNDRÁT, Vojtěch**, Jiří PINKAS a Jiří SOPOUŠEK. SYNTHESIS AND ELECTROSPINNING OF CHLORINATED POLYHYDROXYBUTYRATE. In *EUCHMS 2016 Sevilla*. 2016.

Projekty:

- Projekt smluvního výzkumu: „Vývoj přírodních UV filtrů s využitím nosičů na bázi PHA – Nafigate, a.s. (2019 – 2020)
- Projekt FCH-S-20-6316 - Aplikace progresivních metod a postupů v rámci moderních potravinářských věd, zahájení: 01.01.2020, ukončení: 31.12.2020, spoluřešitel
- Projekt FCH-S-19-5983 - Využití pokročilých metod a postupů v rámci moderních potravinářských věd, zahájení: 01.01.2019, ukončení: 31.12.2019, spoluřešitel
- Projekt smluvního výzkumu: „Aplikace polymeru PHA“ – Nafigate, a.s. (2018)
- Projekt FCH-S-18-5334 - Aplikace moderních postupů při výrobě, zpracování a analýze potravin, jejich složek a surovin a při valorizaci odpadů, zahájení: 01.01.2018, ukončení: 31.12.2018, spoluřešitel
- Projekt FCH-S-17-4695 - Progresivní postupy zpracování a hodnocení potravin a valorizace potravinářských odpadů, zahájení: 01.01.2017, ukončení: 31.12.2017, spoluřešitel
- Dílčí projekt TG01010054 VUT Šance: Příprava a využití mikro- a nanovlákných filtračních materiálů na bázi biopolymeru PHA (TAČR 2014 – 2016); člen řešitelského týmu

Popularizační projekty a vedlejší činnost:

- **Červen 2020** - přednáška „Hmota k ničemu“; výstava Hromada z jednoho zrnka písku; Plato Ostrava
- **Listopad 2019** - Science Café Zlín – přednáška o nanovlákné vodní filtraci
- **Březen 2018** - TedXYouth Brno – přednáška „Nanotechnologie pro africkou vodu“
- **Březen 2016** - aktivní účast a prezentace na veletrhu Chinaplast 2016, Shanghai – “Czech project Hydal – biopolymerní produkce PHA”
- **KUNDRÁT, Vojtěch**, Michaela KUCHAROVÁ, Vít VYKOUKAL a Jiří SOPOUŠEK. *Nanopondělí - workshop pro talentované středoškolské studenty*. 2016.
- **Červenec 2016** – Organizace “Letní školy nanotechnologií” pro PPNS Brno - Nanopondělí
- **2015 - 2016** – několik popularizačních přednášek na téma nanovláken – „Téma, Otázky, Pivo“