



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Nanovláknenný substrát s inkorporovaným přírodním extraktem

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: **Vojtěch Lafata**
Vedoucí práce: Ing. Miroslava Rysová





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Nanofibrous structure with incorporated natural extract

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Vojtěch Lafata**
Supervisor: Ing. Miroslava Rysová



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vojtěch Lafata**
Osobní číslo: **M15000140**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Nanovláknenný substrát s inkorporovaným přírodním extraktem**
Zadávající katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu a vypracujte rešerši týkající se možností a aktuálního stavu využití nanovláknenných krytí a nanovláken s antiseptickým účinkem v oblasti hojení ran.
2. Prostudujte teorii polymerních roztoků a vlivu rozpouštědlového systému na průběh elektrostatického zvláknění a výslednou morfologii nanovláknenné vrstvy.
3. Připravte extrakty zvolené rostliny, u níž lze předpokládat antibakteriální účinek, a ty charakterizujte.
4. Zvolte rozpouštědlový systém umožňující elektrostatické zvláknění polymeru polykaprolaktonu (PCL) s příměsí připraveného extraktu. Ověřte vliv dané příměsi na průběh a výsledný produkt elektrostatického zvláknění.
5. Připravená nanovláknna charakterizujte z hlediska výsledného obsahu extraktu, vlivu na morfologii a další relevantní parametry.
6. Výsledky shrňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

- [1] Bhardwaj, N. and Kundu, S. C., 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28 (2010), pp. 325-347.
- [2] Hansen, C. M. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook 2 ed., CRC Press, 2007. SBN 9780849372483
- [3] Yazgan, G. et al., 2017. Steering surface topographies of electrospun fibers: understanding the mechanisms. *Scientific Reports* 7: 158 (2017), DOI:10.1038/s41598-017-00181-0.
- [4] Katsogiannis, K.A.G. et al., 2015. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. *European Polymer Journal* (2015) 69, pp. 284-295.
- [5] Budovsky, A. et al., 2015. Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration* (2015) 23 , pp.171-183.
- [6] Safaei-Ghomi, J. and Abbasi Ahd, A., 2010. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacognosy Magazine* 6:23 (2010), pp. 172-175.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Miroslava Rysová

Datum zadání bakalářské práce: 19. října 2017

Termín odevzdání bakalářské práce: 14. května 2018

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan



Ing. Josef Novák, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 19. října 2017

Prohlášení

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 14. 5. 2018

Podpis:



Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat všem lidem z Technické univerzity v Liberci, kteří se nějakým způsobem podíleli na experimentech uskutečněných v této bakalářské práci nebo nějakým způsobem přispěli k jejímu úspěšnému dokončení.

Zároveň velké díky patří mé rodině, za trpělivost a podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu práce.

Největší vděk však patří mé vedoucí práce Ing. Miroslavě Rysové za její ochotu, pomoc a čas strávený konzultacemi věnovaných této práci, dále za její podporu a obrovskou trpělivost, kterou se mnou měla po celou dobu.

Abstrakt

Tato práce se zabývá možností vytvoření nanovláknenného substrátu obsahujícího přírodní extrakt vykazující antimikrobiální aktivitu. Dále jsou zde uvedeny možnosti aktuálního stavu využití nanovláknenných krytí s antiseptickým účinkem v oblasti hojení ran. Je zde také vysvětlen proces elektrostatického zvláknění a uveden vliv parametrů na tento proces. Experimentální část je zaměřena na přípravu přírodních extraktů, inkorporaci těchto extraktů do polymerního roztoku, jejich následné zvláknění a charakterizace.

Klíčová slova

Hojení ran, antimikrobiální aktivita, elektrostatické zvláknění, poly-ε-kaprolakton, tymián, přírodní extrakt.

Abstract

This thesis deals with the possibility of creating a nanofibrous substrate containing a natural extract with antimicrobial activity. Further there are presented the possibilities of the current state of use of nanofibers with antiseptic effect in wound healing. There is also explained the process of electrospinning and the influence of parameters on this process. The experimental part is focused on preparation of natural extracts, incorporation of these extracts into the polymer solution, their electrospinning and characterization.

Key words

Wound healing, antimicrobial activity, electrospinning, poly-ε-caprolactone, thyme, natural extract.

Použité zkratky

CF – chloroform (chloroform)

DCM – dichlormethane (dichlormethane)

DSC – diferenciální skenovací kalorimetrie (differential scanning calorimetry)

E. coli - *Escherichia coli*

EtOH – ethanol

MeOH – methanol

PCL – polykaprolakton (polycaprolactone)

PLA – polymléčná kyselina (polylactic acid)

PVA – polyvinylalkohol (polyvinyl alcohol)

RH – relativní vlhkost (relative humidity)

S. gallinarum – *Staphylococcus gallinarum*

SEM – rastrovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope)

THF – tetrahydrofuran (tetrahydrofuran)

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část	11
2.1	Hojení ran.....	11
2.1.1	Buněčný a molekulární mechanismus hojení ran	11
2.1.2	Historie.....	12
2.1.3	Aktuální stav využití nanovláknenných krytí s antiseptickým účinkem v oblasti hojení ran	13
2.2	Elektrostatické zvlákňování.....	16
2.2.1	Historie elektrostatického zvlákňování	17
2.2.2	Proces elektrostatického zvlákňování.....	17
2.2.3	Teorie polymerních roztoků.....	19
2.2.4	Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování.....	21
2.3	Využití nanovláken při hojení ran	24
2.3.1	Výroba nanovláken s antimikrobiální aktivitou.....	25
3	Experimentální část.....	26
3.1	Cíl experimentu	26
3.2	Použitý materiál	26
3.3	Použitá zařízení a metody	27
3.3.1	Metodika přípravy extraktů	27
3.3.2	Laboratorní zařízení pro elektrostatické zvlákňování	27
3.3.3	Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)	28
3.3.4	Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC).....	29
3.3.5	Hmotnostní spektrometrie	29
3.3.6	Měření povrchového napětí.....	30
3.3.7	Testy antimikrobiální aktivity.....	30
3.4	Výsledky a jejich diskuze	31

3.4.1	Příprava a hodnocení přírodních extraktů	31
3.4.2	Vyšetření antimikrobiální účinnosti připravených extraktů.....	32
3.4.3	Analýza suchého tymiánu hmotnostní spektrometrií.....	34
3.4.4	Analýza extraktu hmotnostní spektrometrií	37
3.4.5	Volba rozpouštědlového systému.....	37
3.4.6	Elektrostatické zvláknění roztoků s obsahem extraktu.....	38
3.4.7	Vliv přítomnosti extraktu na morfologii vláken	40
3.4.8	Vyšetření antimikrobiálního účinku nanovláken.....	43
3.4.9	Zvýšení koncentrace extraktů	44
3.4.10	Elektrostatické zvláknění roztoků s koncentrovanými extrakty	44
3.4.11	Morfologie nanovláken z roztoků s koncentrovanými extrakty	45
3.4.12	Hmotnostní spektrometrie připravených nanovláken.....	46
3.4.13	Diferenciální skenovací kalorimetrie připravených nanovláken.....	49
3.4.14	Měření povrchového napětí na připravených nanovláčkách	52
3.4.15	Antimikrobiální aktivita nanovláken obsahujících	54
	koncentrované extrakty	54
4	Závěr.....	56
5	Použité zdroje.....	57

1 Úvod

Moderní medicína si prošla za poslední století revolučním pokrokem, což je částečně následek dostupnosti účinných antibiotik založených na objevu penicilinu Dr. Alexandrem Flemingem, který byl za objev oceněn Nobelovou cenou. Existence antibiotik umožňuje provádět komplikované chirurgické techniky, během nichž jsou vnitřní orgány vystaveny mikrobům, se kterými normálně do styku nepřicházejí. Díky širokému využití lékařských implantátů například umělých kloubů a zdravotnických prostředků, jako jsou kardiostimulátory, se do těla dostávají jemu neznámé povrchy, na kterých mohou být mikroby, zvyšuje se tedy riziko infekce a potřeba léčby antibiotiky. Široké využívání antibiotik a hlavně jejich zneužívání v případech, kdy nejsou účinné například při léčbě chřipky nebo běžného nachlazení, vedlo k tomu, že vznikají bakterie rezistentní vůči nim. Jsou tedy potřebné nové strategie, které zajistí budoucím generacím pokrok v moderní medicíně. Vývoj vědy v oblasti nanotechnologií vyústil ke vzniku nových materiálů, které se mohou používat v biomedicínských aplikacích.

Pouze ve Spojených státech postihují chronické rány 6,5 milionu pacientů. [1] Předpokládá se, že počet chronických ran se bude celosvětově navyšovat v důsledku stárnutí a výskytu cukrovky, obezity a kardiovaskulárních onemocnění. Zatímco současná terapeutická činidla mají obecně nedostatečnou účinnost a počet závažných nežádoucích účinků, léčivé rostliny se používají v medicíně již od starověku a jsou dobře známy svou schopností podporovat hojení ran a zabraňovat infekci bez vážných vedlejších účinků. Bylinná terapie může být alternativní strategií pro léčbu ran. [2]

Řešením otázek a problémů nastíněných výše se bude zabývat i tato bakalářská práce, která si klade za cíl prozkoumání aktuálního stavu využití nanovlákných krytí a nanovláken s antiseptickým účinkem v oblasti hojení ran, vytvoření těchto krytí ve formě polymerních nanovlákných struktur na bázi poly- ϵ -kaprolaktonu s inkorporací přírodního extraktu metodou elektrostatického zvlákňování.

2 Teoretická část

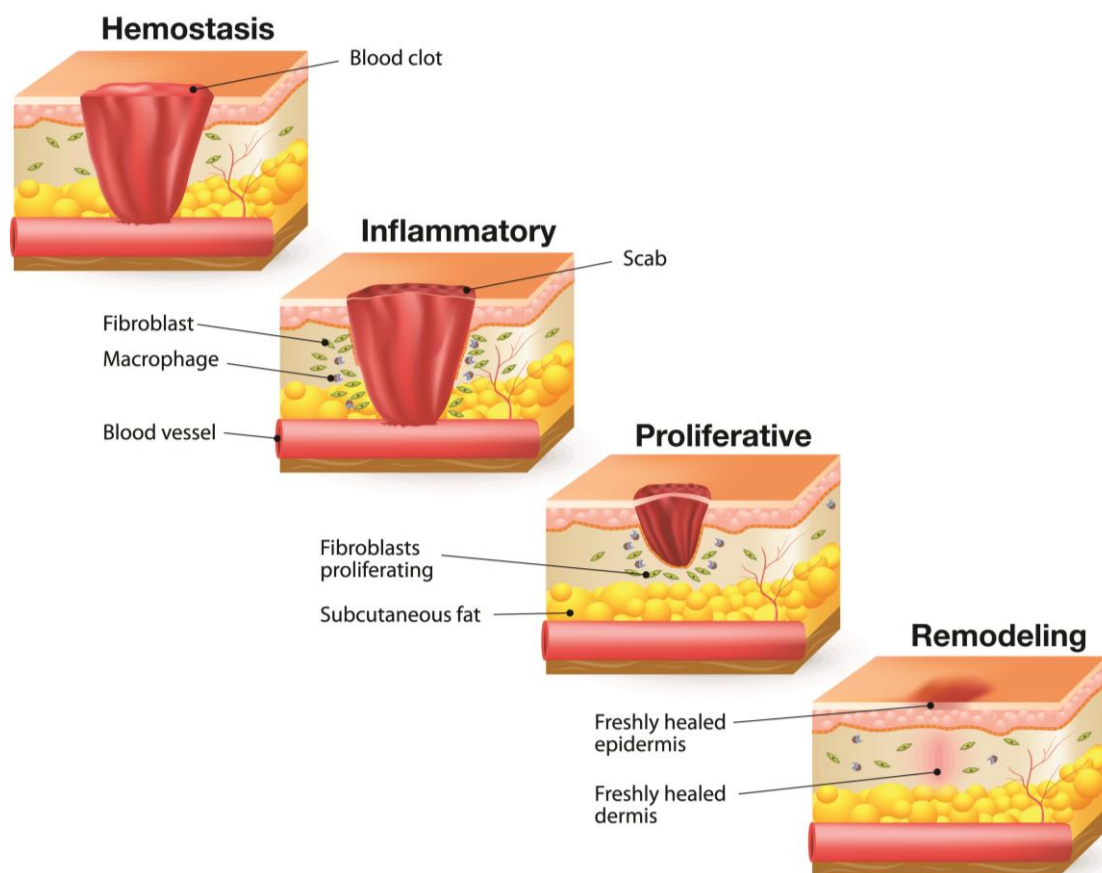
V teoretické části této bakalářské práce je celkový průřez danou problematikou. Řazení textu v teoretické části této práce odpovídá chronologickému postupu získávání znalostí o řešené problematice.

2.1 Hojení ran

2.1.1 Buněčný a molekulární mechanismus hojení ran

Hojení ran je komplexní biologický proces sestávající se ze synchronizovaného řetězce molekulárních událostí zaměřených na obnovení její ochranné bariérové funkce. [1] Nastává téměř ve všech tkáních po vystavení jakémukoliv destruktivnímu stimulu, to je důležité zvláště pro kůži – orgán s ochrannou funkcí, který je napadán a čelí různým zraněním po celý život. K porušení celistvosti kůže může dojít několika způsoby a to fyzicky, chemicky nebo tepelně.

Ve všech orgánech savců se akutní rány léčí velmi uspořádaným a účinným způsobem charakterizovaným čtyřmi odlišnými, avšak překrývajícími se fázemi: homeostází, zánětem, tvorbou nových tkání a remodelováním. [3] Poškození tkáně vede k okamžité aktivaci koagulační kaskády a imunitního systému, aby došlo k zabránění ztráty krve, odstranění mrtvých tkání a neutralizaci napadených patogenů. Během a po vytvoření trombocytové zátky a nanesení fibrinu se infiltrují neutrofilové na místo rány. Po 2-3 dnech se v ráně objeví monocyty a přeměňují se na makrofágy, které koordinují další fázi opravy. Druhý stupeň hojení ran nastává 2-10 dní po poranění a je charakterizován buněčnou proliferací a migrací různých buněčných typů, současně s touto migrací začíná angiogeneze, když nově vznikající kapiláry nahrazují fibrinovou matici a granulační tkáň. Společně s keratinocyty migrují fibroblasty do zóny opravy tkáně a zahajují stimulaci makrofágů, které se změny na myofibroblasty, ty stahují hrany rány k sobě a společně s fibroblasty vytvářejí extracelulární matici, která tvoří tkáň jizvy. Konečná fáze hojení (remodelování) začíná 2-3 týdny po zranění a může trvat rok nebo více. V rámci remodelování je zánětlivá odezva regulována, protože většina buněk, které se podílely na předchozím stadiu hojení, podstupuje apoptózu a mrtvé buňky jsou nahrazeny kolagenem a jinými extracelulárními matricovými proteiny. [1]



Obrázek 1: Fáze hojení. Homeostáze, zánět, proliferace, remodelování. [4]

2.1.2 Historie

Historie hojení ran je v jistém smyslu historie lidstva, jeden z nejstarších rukopisů známý člověku je hliněná deska, která pochází z roku 2200 př. n. l. Tato deska popisuje fáze postupu při léčení a to umytí rány, vytváření náplasti a obvazování rány. Tyto náplasti byly směsí látek zahrnující bahno nebo jíl, rostliny a byliny, často také byly přidávány oleje, které zamezovaly růstu bakterií a přilnutí k ráně. Náplasti byly také využívány kvůli ochraně a absorpci exsudátu. Od dob starověku člověk v oblasti léčení značně pokročil a v současné době existuje více než 5000 produktů používaných k hojení ran. [5] Moderní prostředky k lokální léčbě chronických ran mají různou konzistenci, materiálové složení a z toho rezultující účinek, volba krycích prostředků musí respektovat charakter spodiny rány a intenzitu sekrece a musí směřovat k vytvoření fyziologického prostředí, ve kterém se rozvíjejí reparační procesy. [6]

2.1.3 Aktuální stav využití nanovláknenných krytí s antiseptickým účinkem v oblasti hojení ran

Vláken a polymerů, které se v současné době používají k výrobě produktů využívaných ve zdravotní péči pro hojení ran, je mnoho a to přírodní a modifikovaná celulóza, algináty, chitin/chitosan, kolagen, hydrokoloidy a syntetická vlákna nebo hydrogely. V závislosti na použitých materiálech mohou být rozděleny do tří kategorií tj. přírodních nebo modifikovaných polysacharidů, proteinů a syntetických polymerů. [7] Kromě toho se také omezeně používají anorganické prvky.

2.1.3.1 Celulózová nanovláknna

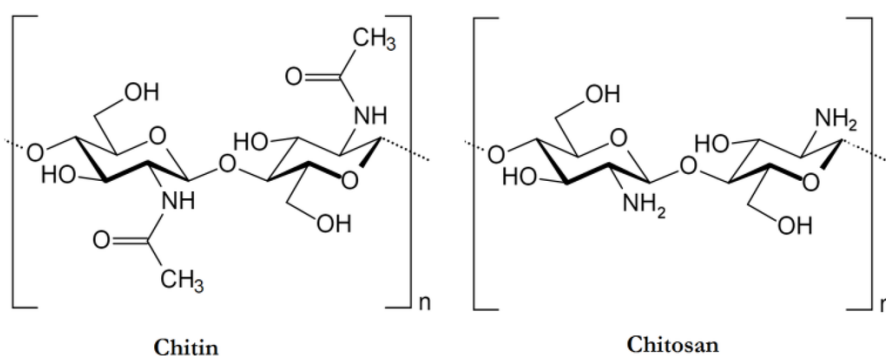
Celulóza je nejhojnějším přírodním polymerem na Zemi s dlouhou historií při výrobě vláken. Nanovláknna vyrobená z celulózy a jejích derivátů se dnes v širokém rozsahu používají v antimikrobiálních aplikacích. Celulóza a její deriváty, ale mikrobiální vlastnosti nemají, do celulózových nanovláken byly úspěšně zabudovány antimikrobiální látky jako kyselina sorbová, benzalkoniumchlorid, nanočástice mědi nebo nanočástice chloridu stříbrného. Kromě toho mohou být antimikrobiální celulózové membrány získány chemicky a to štěpením funkčních skupin na povrchu sítě celulózových nanovláken. Již byla úspěšně připravena celulózová nanovláknna funkcionalizovaná aminoskupinami a aminosilanovými skupinami, které účinně inhibovaly růst *S. aureus* a *E. coli*. [8]

2.1.3.2 Chitosanová nanovláknna

Chitosan je deacetylovaný derivát chitinu, který je přirozeným polysacharidem přítomným v exoskeletu korýšů, hmyzu a některých hub. Acetylové zbytky mohou být odstraněny enzymy nebo alkalickými roztoky. Vzhledem k přítomnosti aminových částí se chitosan stává polykationickým, protože pH prostředí klesá pod $pK_a \sim 6,5$ polymeru. Antimikrobiální funkce vyplývá z elektrostatické interakce mezi polykationickou strukturou chitosanu a aniontovým vnějším povrchem mikroorganismů. Přilnavost bakterií na chitosan vede k narušení buněčné membrány a k úniku intracelulárních složek. Chitosan může také proniknout bakteriální buněčnou membránou a interagovat s DNA, inhibovat DNA transkripci a syntézu proteinů. Antimikrobiální účinnost chitosanu závi-

sí na několika faktorech, včetně pH prostředí, stupni deacetylace a molekulové hmotnosti. [8]

Jako nenákladný přírodní polysacharid má chitosan široké spektrum antimikrobiálních aktivit proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Kromě toho je chitosan netoxický vůči savcím buňkám a je biologicky odbouratelný. Tyto vlastnosti způsobují, že chitosan je žádoucí polymer pro antimikrobiální aplikace a chitosanová nanovlákná byla předmětem mnoha studií v posledních letech. [8]



Obrázek 2: Chemická struktura chitinu a chitosanu [9]

2.1.3.3 Nanovlákná obsahující antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy jsou funkčně definované, jak vyplývá z názvu. Byly izolovány z nejrůznějších zdrojů včetně rostlin, živočichů, bakterií i virů. Navzdory rozmanitosti jejich zdrojů sdílí antimikrobiální peptidy některé společné rysy ve svých strukturách a funkcích. Obvykle mají délku 12 až 50 aminokyselin se dvěma nebo více kationtovými aminokyselinovými zbytky a podstatnou část hydrofobních skupin. Antimikrobiální peptidy jsou klíčovou součástí vrozeného imunitního systému zvířat a hrají důležitou roli v časně obraně proti napadení mikroorganismů. Ve srovnání s běžnými antibiotiky vykazují jedinečné vlastnosti jako je malý sklon k indukci tvorby rezistentních patogenů, schopnost rozlišovat hostitelské a invazivní buňky a vysokou aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů. Pozitivní náboj usnadňuje počáteční asociaci se záporně nabitými buněčnými membránami, zatímco jejich hydrofobicita umožňuje následné zavedení antimikrobiálních peptidů do hydrofobních jader buněčné membrány, což vede k prasknutí membrány a lýze buněk. [8]

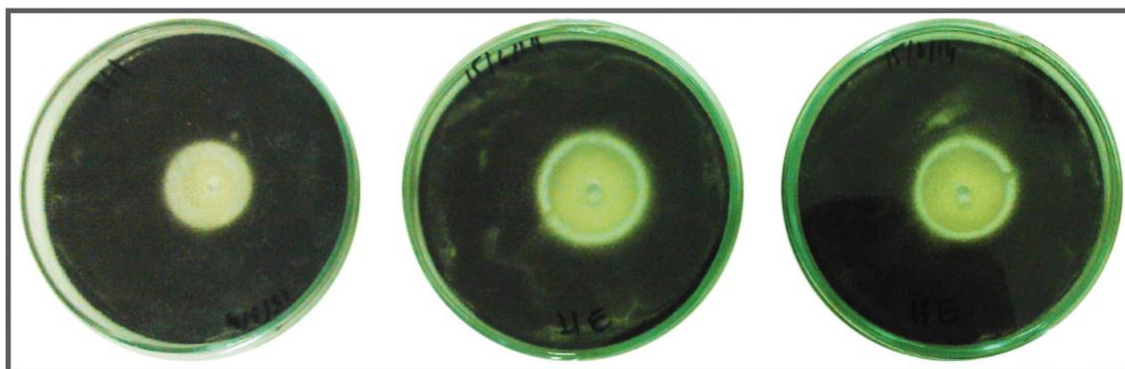
2.1.3.4 Syntetická nanovlákná obsahující rostlinné deriváty s antimikrobiálními účinky

Léčivé rostliny byly v medicíně široce uznávané již od starověku, mnoho starověkých civilizací používalo rostliny pro stimulaci hojení ran. Nedávné studie prokázaly, že antimikrobiální látky pocházející z rostlin, jako jsou esenciální oleje, mohou být také začleněny do nanovláken. [8], [10], [12], [13]

Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou koncentrované hydrofobní kapaliny obsahující těkavé sloučeniny extrahované z rostlin, často se specifickou vůní. Hydrofobní, terpenoidní a fenolické sloučeniny přítomné v esenciálních olejích mohou proniknout do buněčných membrán a vést k vyčerpání protonů, narušení syntézy adenosintrifosfátu a v některých případech k lýze buněk. Po staletí byly esenciální oleje používány k boji proti bakteriálním infekcím a vzhledem k jejich způsobu působení je pro bakterie obtížné vyvinout odolnost proti těmto těkavým antimikrobiálním látkám. Inkorporace esenciálních olejů do nanovláken vyžaduje elektrostatické zvláknění roztoku, do kterého jsou začleněny.

[8], [10]



Obrázek 3: Testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů na mikroorganismu *Aspergillus nigeras* [11]

Esenciální oleje jsou typicky extrahovány z aromatických rostlin a jsou to směsi různých chemických sloučenin, jako je linalool, pinen, eugenol a cymen. [12] Bioaktivita esenciálních olejů se využívá v kombinaci s elektrostatickým zvlákněním k vytvoření nanovláken s antimikrobiálními vlastnostmi. Tato nanovlákná mohou obsahovat

esenciální oleje např. ze skořice, eukalyptu, citronové trávy, peprmintu čajovníku, tymiánu nebo třeba levandule. [13], [14], [15]

Lignin

Lignin je fenolický polymer z rostlinných buněčných stěn, který poskytuje podporu, mechanickou bariéru proti rostlinným patogenům a usnadňuje přepravu vody kvůli své hydrofobní povaze. Přesná chemická struktura přirozeného ligninu se mění u různých druhů rostlin. Nativní lignin je znám pro své inhibiční účinky vůči různým mikrobům. Testy ze sedmdesátých let ukázaly, že ligniny byly účinné proti gram-pozitivním bakteriím, ale proti gram-negativním se žádné účinky neprojevíly. [8], [16]

Zein

Zein je prolamin (rostlinný protein s vysokým obsahem aminokyselin) vyskytující se v kukuřici. Zein má vynikající rozpustnost v alkoholech a dobrou elasticitu a schopnost vytvářet film. Připravená kompozitní nanovlákná z polyurethanu, celulózy, acetátu a zeinu se využívají pro obvazy na rány. [8], [17]

Propolis

Propolis je pryskyřičná látka vyráběná včelami a může být považována za komplexní směs obsahující flavonoidní aglykony, fenolové kyseliny, aldehydy, steroidy, aminokyseliny a přírodní pigmenty, jako je chlorofyl a karotenoidy. Antibakteriální aktivita propolisu je připisována fenolickým sloučeninám. Polyurethanová nanovlákná obsahující 30 % propolisu vykazují inhibiční účinky proti *E. coli*. [18] Z brazilského zdroje propolisu byla vytvořena nanovlákná PLA, u kterých byly prokázány antibakteriální účinky v závislosti na koncentraci propolisového extraktu. [8], [19]

2.2 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je široce využívaná technologie, která využívá elektrické síly pro tvorbu polymerních vláken o průměru od jednotek nanometrů až do několika mikrometrů. Tato metoda nabízí jedinečné schopnosti pro tvorbu nanovláken a tkanin z přírodních i syntetických polymerů. [20] V současnosti je tato technika nejvíce využívaná, protože umožňuje zpracování široké škály roztoků, výroba je přenositelná do průmyslového měřítká.

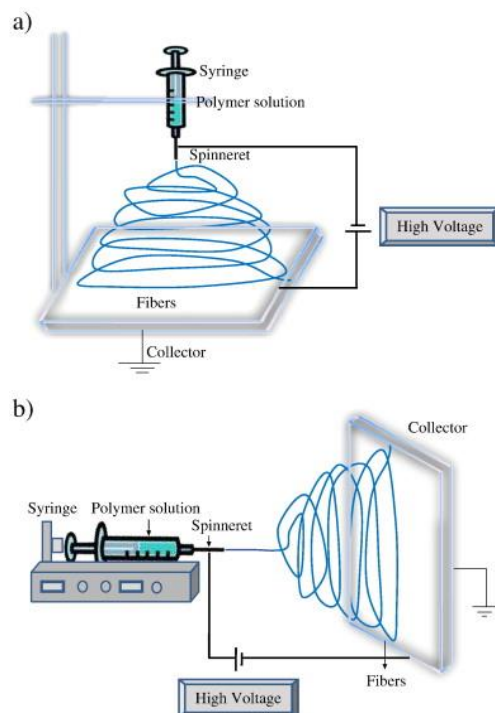
2.2.1 Historie elektrostatického zvlákňování

Termín „electrospinning“ (zkráceně „electrostatic spinning“) byl poprvé použit teprve kolem roku 1994, ale původ této metody sahá až do 19. století. Podstata jevu byla poprvé pozorována už roku 1897 a v roce 1934 si ji nechal Formhals patentovat. Za posledních 60 let bylo podáno přibližně 50 patentů na polymerní taveniny a roztoky, které jsou zvlákňitelné pomocí této metody. Od osmdesátých let, a zejména v posledních letech, postup elektrostatického zvlákňování získal více pozornosti pravděpodobně kvůli rostoucímu zájmu o nanotechnologie. [20]

2.2.2 Proces elektrostatického zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je technikou, která využívá elektrostatické síly k výrobě jemných vláken z polymerních roztoků nebo tavenin. Pro zvlákňování polymerních roztoků nebo tavenin je zapotřebí napětí velikosti několika desítek kV. Při elektrostatickém zvlákňování je roztok polymeru podroben elektrickému poli a elektrický náboj je indukován na povrchu kapaliny v důsledku tohoto elektrického pole. Když elektrické pole dosáhne kritické hodnoty, odpuzující elektrické síly překonávají síly povrchového napětí, dojde k formování části povrchu kapaliny do útvaru, který se nazývá Taylorův kužel. Nakonec se z hrotu Taylorova kužele vytáhne nabitá tryska roztoku a dochází k nestabilnímu a chaotickému pohybu (bičování). Při průchodu atmosférou dochází k odpařování rozpouštědla a tuhnutí polymeru, nanovlákná jsou následně zachycena na opačně nabitém nebo uzemněném kolektoru. [20]

Běžně využívaná aparatura se skládá ze zdroje vysokého napětí, který je připojen ke kapiláře, ve které je zvlákňovaný polymer a kolektoru. Toto může být uspořádáno horizontálně nebo vertikálně. Kromě jehlové aparatury existuje ještě mnoho dalších například aparatura tyčková, která využívá principu zvlákňování z volné hladiny. Tento princip využívá také technologie Nanospider, díky které je možná kontinuální tvorba nanovláknenné textilie ve větším měřítku.



Obrázek 4: Aparatura elektrostatického zvlákňování [20]

Existuje široká škála polymerů, které se využívají při procesu elektrostatického zvlákňování a jsou schopny vytvářet jemná nanovlákna v rámci submikronového rozsahu a používají se pro různé aplikace. V dosavadní době bylo již popsáno více než 200 polymerů, které se podařilo úspěšně elektrostaticky zvláknit, jedná se o polymery přírodní i syntetické. Pozoruhodnou výhodou elektrostatického zvlákňování je, že může být provedena s různými polymery jak v roztoku, tak v tavenině. Elektrostatické zvlákňování taveniny umožňuje nové přístupy k různým aplikacím, překonávat technické omezení, které je dáno akumulací rozpouštědel a jejich toxicitou. Nevýhodou ovšem je, že při elektrostatickém zvlákňování z taveniny místo roztoku se tavenina zavádí do kapilární trubky a je zde nutnost zavedení vakua, vyšší viskozita taveniny má také vliv na morfologii vytvořených vláken a to na velikost průměrů nanovláken, která jsou při elektrostatickém zvlákňování z taveniny širší oproti těm z polymerního roztoku. [21]

2.2.3 Teorie polymerních roztoků

2.2.3.1 Roztoky vysokomolekulárních látek

Molekula lineárního polymeru v roztoku může vlivem tepelného pohybu jednotlivých segmentů nebo působením vnějších sil měnit svůj tvar. Neuspořádaný útvar, který takto vzniká, se nazývá makromolekulární klubko. [22] Ve zředěných roztocích jsou jednotlivé makromolekuly od sebe odděleny spojitou fází rozpouštědla. [23] Svinutí makromolekulárního klubka v roztoku závisí na afinitě segmentu polymeru k rozpouštědlu a také na vzájemných interakcích řetězců a vzájemných interakcích molekul rozpouštědla, pak rozdělujeme rozpouštědla na dobrá, špatná a theta-rozpouštědla. [22] Na konformaci makromolekul a interakci s rozpouštědlem mají vliv další parametry, například povaha polymeru nebo rozpouštěcí teplota.

Povaha polymeru

Amorfni polymery se mísí se špatnými rozpouštědly pouze omezeně, na druhou stranu s dobrými rozpouštědly jsou mísitelné téměř neomezeně. Rozpouštění krystalického polymeru lze rozdělit na dva pochody: 1) tání polymeru při dané teplotě, 2) mísení taveniny s rozpouštědlem při téže teplotě. [23] Vysokomolekulární elektrolyty jsou podle povahy skupin schopných disociace rozdělovány na polyelektrolyty obsahující: 1) kyselá skupiny; 2) zásadité skupiny; 3) kyselá i zásadité skupiny, tyto polyelektrolyty se nazývají amfoterní. [22] Rozpustnost vysokomolekulárních elektrolytů je tedy ovlivněna pH rozpouštědla.

Kosolvence

Kosolvence je jev, který nastává, když se směs dvou špatných rozpouštědel chová k polymeru jako dobré rozpouštědlo, tento jev je závislý na rozpustnostním parametru. Kosolvence je užitečná, není-li k dispozici vhodné jednosložkové rozpouštědlo. [23] Přídavek špatného rozpouštědla do roztoku polymeru může snížit rozpustnost polymeru a způsobit jeho vylučování, koncentrace potřebná k vylučování polymeru klesá s rostoucím stupněm polymerace. [22]

2.2.3.2 Hansenovy parametry rozpustnosti

Široce využívaný přístup k předvídání rozpustnosti polymeru je ten, který navrhuje Hansen s návazností na Hildebranda. Základem těchto tzv. Hansenových parametrů rozpustnosti je to, že celková energie odpařování kapaliny se skládá z jednotlivých částí, a to z atomových disperzních sil, molekulárních permanentních dipólových sil a vodíkových vazeb.

Disperzní interakce, které pocházejí z atomových sil, jsou nejběžnější „nepolární“ interakce. Tento typ přitažlivé síly je součástí všech molekul, protože ty jsou tvořené z atomů. Například pro nasycené alifatické uhlovodíky jsou tyto síly v podstatě jediná soudržná interakce a předpokládá se, že energie odpařování je stejná jako disperzní soudržná energie E_D . Hledání soudržné disperzní energie je výchozím bodem pro výpočet tří Hansenových parametrů pro danou kapalinu.

Permanentní dipólové interakce s trvalým dipólem tvoří druhou část soudržné energie, a to polární soudržnou energii E_P . Jedná se inherentně o molekulární interakce a nacházejí se ve většině molekul. Pro výpočet těchto interakcí je primárně používán moment dipólu.

Třetím hlavním zdrojem soudržnosti jsou vodíkové vazby E_H . Vodíková vazba je molekulární interakce a v tomto ohledu se podobá polárním interakcím. Základem tohoto typu soudržné energie je přitažlivost mezi molekulami právě vodíkovými vazbami.

Základní rovnice, která řídí přiřazení Hansenovým parametrům, je, že celková energie soudržnosti E , se musí rovnat součtu jednotlivých energií.

$$E = E_D + E_P + E_H$$

Vydělením této hodnoty molárním objemem lze získat kvadrát celkového parametru rozpustnosti. [24]

2.2.4 Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování

Vliv na elektrostatické zvlákňování má spoustu parametrů, které se dají rozdělit do dvou základních skupin a to na parametry procesní a systémové. Vlastnosti nanovláken jsou významně ovlivněny těmito procesy. Mají vliv především na průměry vláken, jejich morfologii a různé defekty.

2.2.4.1 Procesní parametry

Mezi procesní parametry patří:

- aplikované napětí;
- vzdálenost kolektoru a trysky;
- rychlost toku polymeru;
- vliv prostředí.

Aplikované napětí

Z experimentů provedených ve 20. století vyplynulo, že změna aplikovaného napětí má vliv na délku a průměry vláken, ale také na četnosti defektů v podobě korálového efektu. [21]

Vzdálenost kolektoru a trysky

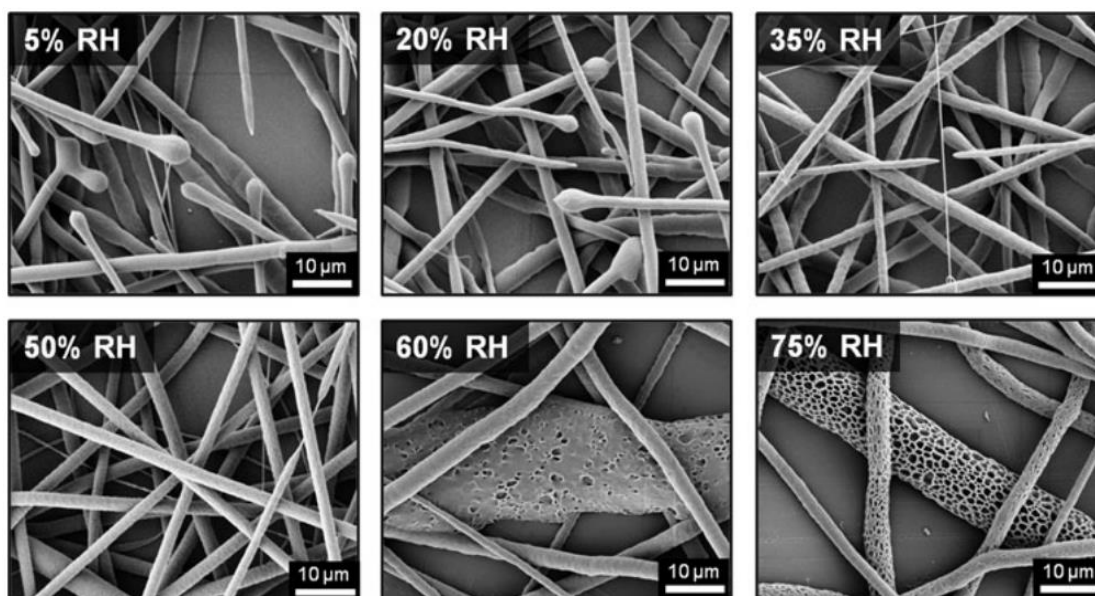
Struktura a morfologie elektrostaticky zvlákněných vláken je snadno ovlivnitelná vzdáleností trysky a kolektoru. Z různých experimentů vyplynulo, že bez ohledu na koncentraci roztoku se při menší vzdálenosti vytváří mokrá vlákna a korálové defekty. [21]

Rychlost toku polymeru

Průtok polymeru ze stříkačky je důležitým parametrem procesu, neboť ovlivňuje rychlost proudění a rychlost přenosu materiálu. Průměry vláken a průměry pórů se zvyšují se zvýšením průtoku polymeru. [21]

Vliv prostředí

Podmínky prostředí okolo zvláknovací trysky jako je okolní vzduch, relativní vlhkost, obklopující plyn atd. ovlivňují strukturu a morfologii elektrostaticky zvlákněných vláken. [21] Relativní vlhkost (RH) má vliv na rychlost odpařování rozpouštědla, což ovlivňuje morfologii vláken a jejich porozitu. [25]



Obrázek 5: Vliv relativní vlhkosti (RH) na elektrostatické zvláknění PCL. [25]

2.2.4.2 Systémové parametry

Systémové parametry mohou být rozděleny na parametry týkající se samotného polymeru a na parametry, které se týkají roztoku, ve kterém je polymer rozpuštěn. Přehled těchto parametrů je uveden níže.

Tabulka 1: Systémové parametry [26]

Vlastnosti polymeru	Vlastnosti polymerního roztoku
molekulová hmotnost	volba rozpouštědla
distribuce molekulové hmotnosti	koncentrace
tvar molekuly	viskozita
	elektrická vodivost
	povrchové napětí
	viskoelasticita
	teplota roztoku

Systémové parametry polymeru

Molekulová hmotnost polymeru má významný vliv na reologické a elektrické vlastnosti jako jsou viskozita, povrchové napětí, vodivost a dielektrická síla. Molekulová hmotnost je důležitý parametr, který ovlivňuje morfologii elektrostaticky zvlákněných vláken a obecně platí, že roztoky o vysoké molekulové hmotnosti jsou používány při elektrostatickém zvláknování, protože poskytují požadovanou viskozitu pro tvorbu vláken. Bylo zjištěno, že roztok s příliš malou molekulovou hmotností má sklon k vytváření korálkového defektu spíše než roztok s vysokou molekulovou hmotností, při kterém se ale naopak tvoří vlákna s větším průměrem. [20]

Systémové parametry polymerního roztoku

Volba rozpouštědla

Rozpouštědlo použité při přípravě polymerních roztoků má významný vliv na jeho zvláknitelnost, protože prvním a zároveň nejdůležitějším krokem při procesu elektrostatického zvláknování je rozpuštění polymeru ve vhodném rozpouštědle. Rozpouštědla by měla mít například dobrou těkavost nebo teplotu varu a měly by udržovat integritu polymerního roztoku. Pro úspěšné elektrostatické zvláknění je tedy nezbytný výběr vhodného rozpouštědlového systému, na kterém závisí intermolekulární interakce v systému polymer-rozpouštědlo. [20]

Zásadní roli při tvorbě nanovláken během separace polymerní trysky na cestě ke kolektoru hraje těkavost rozpouštědla, pro dostatečně rychlé vypařování je nutné volit rozpouštědla s vysokou těkavostí, aby byl zaručen krátký čas k tuhnutí vláken. Vliv na elektrostatické zvláknování má také koncentrace rozpouštědla, kdy se zvyšující se koncentrací klesá povrchové napětí roztoku. [21]

Koncentrace polymeru v roztoku

Při elektrostatickém zvláknování, aby došlo k tvorbě vláken, je nutná minimální koncentrace roztoku, která zajistí dostatečné zapletení řetězců polymeru. Pokud je koncentrace polymeru v roztoku menší dochází pouze k „elektrosprayingu“, tedy k tvorbě kapek a ne vláken. Pokud je zajištěna podmínka minimální koncentrace, tak bylo zjištěno, že při nízké koncentraci polymerního roztoku na vláknech dochází k tvorbě korál-

kového defektu. S postupně se zvyšující koncentrací se tvar korálek mění ze sférických na vřetenovité až k rovnoměrným vláknům se zvýšeným průměrem. [20]

Viskozita

Viskozita roztoku hraje důležitou roli při stanovování velikosti a morfologie vláken během zvláknování polymerů. Bylo zjištěno, že při velmi nízké viskozitě nedochází k souvislé tvorbě vláken a naopak při velmi vysoké viskozitě je obtížné vystřelení trysek z polymerního roztoku, takže je nutné brát při zvláknování na viskozitu zřetel.

[20]

Elektrická vodivost roztoku

Polymery jsou většinou vodivé a nabitě ionty v roztoku polymeru mají velký vliv na tvorbu trysek. Vodivost roztoku je určena hlavně typem polymeru, použitým rozpouštědlem a dostupností ionizovatelných solí. Bylo zjištěno, že s nárůstem elektrické vodivosti roztoku dochází k významnému poklesu průměrů elektrostaticky zvlákněných nanovláken. Obecně platí, že vlákna vzniklá elektrostatickým zvlákněním s nejmenšími průměry lze získat z roztoků s nejvyšší elektrickou vodivostí. [20]

Povrchové napětí

Povrchové napětí, které je funkcí rozpouštědlových složek roztoku, hraje rozhodující úlohu v procesu elektrostatického zvláknování. Různá rozpouštědla mohou přispět k různému povrchovému napětí. Obecně platí, že vysoké povrchové napětí roztoku inhibuje proces elektrostatického zvláknování kvůli nestabilitě trysek a tvorbě rozstříkovaných kapiček. Nižší povrchové napětí zvláknovacího roztoku pomáhá k tomu, aby docházelo ke zvláknění již při nižším elektrickém napětí. [20]

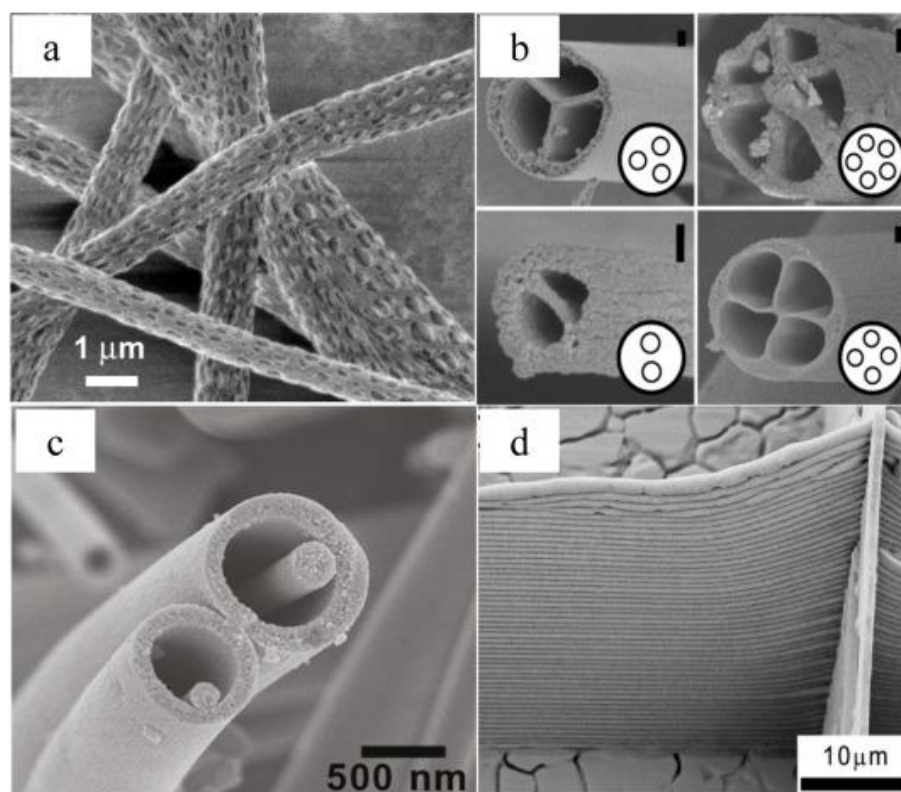
2.3 Využití nanovláken při hojení ran

Obvazy na rány byly původně vyráběny pouze z přírodních materiálů, jako jsou rostlinná vlákna a živočišné tuky, aby došlo jen k pokrytí rány. Do dnešního dne se vyvinulo spousta pokročilých technologií, které poskytují různé postupy k vytvoření multifunkčních obvazů. Na moderní obvazy k hojení ran jsou kladeny dva základní požadavky a to rychlou homeostázu a dobré antibakteriální vlastnosti, aby se zabránilo bakteriální infekci z okolí. [2]

Elektrostatické zvlákňování přitahuje velký zájem o svou všestrannost při výrobě nanovláknenných membrán na obvazy pro krytí ran, protože mohou vytvořit vlhké prostředí kolem oblasti rány a podpořit tím hojení. [2]

2.3.1 Výroba nanovláken s antimikrobiální aktivitou

Nanovláknna s antimikrobiálními účinky se obvykle vyrábějí zabudováním aktivních složek do polymerů několika způsoby a to zabudováním aktivních činidel do polymerního roztoku ještě před zvlákňením, výrobou koaxiálních vláken nebo funkcionalizací již vyrobených vláken. Polymery používané při výrobě nanovláken s antimikrobiálními účinky mají obvykle vlastní schopnosti, jako jsou netoxicity, dobré mechanické vlastnosti, biologická kompatibilita a biologická odbouratelnost. Běžně se používají polymery jako polykaprolakton (PCL), polymléčná kyselina (PLA), polyvinylalkohol (PVA) a chitosan. [2]



Obrázek 6: SEM snímky různých struktur vláken (a) porézní (b) dutá (c) nanovláknna v dutých mikrovláknech (d) 3D vlákenné nosiče [2]

3 Experimentální část

Experimentální část bakalářské práce navazuje na teoretickou část a řazení textu odpovídá chronologickému postupu práce.

3.1 *Cíl experimentu*

Cílem experimentu této bakalářské práce je ověření možnosti vytvoření nanovláknenného substrátu obsahujícího přírodní extrakt ze zvolené byliny a vykazujícího antimikrobiální účinky, aby mohl být použit jako krycí materiál pro hojení ran.

Dílčí úkoly, které jsou probírány v experimentální části této práce, jsou:

- Výběr byliny a extrakčního činidla, které by zároveň umožnilo inkorporaci extraktu do zvlákňovacího roztoku;
- ověření možných rozpouštědlových systémů pro PCL a volba systému umožňujícího inkorporaci extraktu v co nejvyšším množství;
- příprava nanovláken s obsahem extraktu;
- charakterizace nanovláknenného substrátu obsahujícího extrakt a následné vyhodnocení morfologie nanovláken;
- analýza připravených nanovláken, vyšetření přítomnosti účinných látek;
- vyšetření antimikrobiálních účinků nanovláken.

3.2 *Použitý materiál*

Poly- ϵ -kaprolakton (PCL)

Polykaprolakton je biokompatibilní syntetický polyester vyráběný radikálovou polymerací za otevření kruhu. Tento polymer byl využíván v této bakalářské práci k přípravě nanovláken z důvodu jeho biokompatibility a snadného zpracování metodou elektrostatického zvlákňování. Polykaprolakton použitý v tomto experimentu byl od firmy Sigma – Aldrich. Molekulová hmotnost byla M_n 45 000.

Rozpouštědla

Chloroform nebo také trichlormethan je těkavá kapalina s charakteristickým nasládlým zápachem. V tomto experimentu byl používán pro rozpuštění polymeru chloroform od firmy PENTA.

Methanol nebo také methylalkohol je nejjednodušší alkohol. Jedná se o těkavou bezbarvou a silně jedovatou kapalinu. V tomto experimentu byl používán pro extrakci methanol od firmy PENTA.

Ethanol nebo také ethylalkohol je druhý nejjednodušší alkohol. Jedná se o bezbarvou hořlavou kapalinu. V tomto experimentu byl používán pro extrakci ethanol od firmy PENTA.

Rostliny

Tymián obecný je rostlina z čeledi hluchavkovitých, jde o nízký polokeř, který dorůstá výšky asi 20 – 30 cm. Jedná se o rostlinu se silnými antiseptickými účinky proti bakteriím, plísním, střevním prvokům a parazitům. V tomto experimentu byl použit tymián obecný (*thymus vulgaris*) od firmy Ex Herbis.

Eukalyptus (*eucalyptus*), česky také blahovičnick, je rod rostlin z čeledi myrtovité. Jedná se o aromatické stromy nebo keře antibakteriálními účinky. V tomto experimentu byl použit eukalyptus od firmy Ex Herbis.

3.3 Použitá zařízení a metody

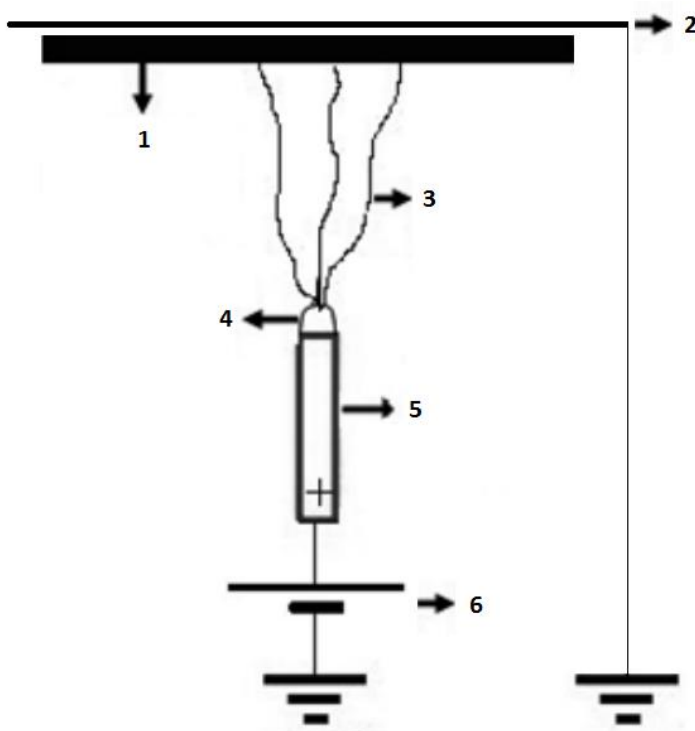
3.3.1 Metodika přípravy extraktů

Extrakty byly připravovány z vysušených bylin, které byly ještě rozemlety na prášek. Extrakce probíhala v rozpouštědle v uzavřené nádobě za neustálé rotace. Po uplynutí určité doby (24 h, 48 h, 72 h) byly extrakty přefiltrovány přes filtrační papír pro kvalitativní analýzu (KA_1, Fisher Scientific) a následně uskladněny v lednici.

3.3.2 Laboratorní zařízení pro elektrostatické zvlákňování

K elektrostatickému zvlákňování polymerních roztoků byla využita tzv. tyčková aparatura, tedy laboratorní zařízení umožňující bezjehlové zvlákňování (tzv. volné hladiny). Při této technice není polymerní roztok vytlačován z jehly, ale je pouze umístěný

na povrchu elektrody. K tvorbě Taylorova kuželu a následné polymerní trysky dochází při překročení kritického napětí. Polymerní roztok byl zvlákňován z kruhové plochy o průměru 2,5 cm. Při experimentech byla udržována konstantní vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem 11 cm, měněno bylo pouze aplikované napětí a použit byl stejnosměrný proud.



Obrázek 7: Schéma tzv. tyčkové aparatury. 1 – podklad pro nanovlákná; 2 – uzemněný kolektor; 3 – polymerní trysky směřující ke kolektoru; 4 – polymerní roztok; 5 – elektroda (tyčka); 6 – zdroj vysokého napětí. [28]

3.3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Morfologie připravených nanovláken byla zkoumána prostřednictvím rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). K získávání snímků nanovláken byl využíván rastrovací elektronový mikroskop VEGA 3 SBU. TESCAN Vega-3 SBU je elektronový mikroskop s proměnlivým tlakem, který je vhodný jak pro biologické, tak i materiálové aplikace. [29] K pořízení a vyhodnocení snímků nanovláken byl použit software Vega.

Před SEM analýzou byla nanovláknenná vrstva pokryta vodivou vrstvou zlatého prášku o tloušťce 6 – 8 nm. Byl k tomu využit přístroj SC7620 Mini Sputter Coater.

3.3.4 Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

Diferenciální skenovací kalorimetrie byla použita k analýze vlivu příměsi extraktu na tepelné charakteristiky nanovláken, například k ověření vlivu teploty tání a krystalinitu vláken. Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je nejpůvodnější technikou tepelné analýzy. Jedná se relativně o novou techniku, její jméno existuje od roku 1963, kdy Perkin – Elmer prodával své první DSC. Při této metodě je měřen elektrický příkon potřebný k udržení izotermických podmínek mezi testovaným vzorkem a referenčním standardem. Množství elektrické energie spotřebované k zahřátí vzorku je přímo úměrné množství uvolněného tepla. Pro zabránění oxidaci nebo vzplanutí vzorku je při měření využívána inertní atmosféra. [30] Touto metodou mohou být sledovány endotermické nebo exotermické reakce, fázové přeměny, jako je tání nebo tuhnutí, případně další energetické změny sledovaného materiálu.

Pro měření byl použit DSC 6 od firmy Perkin Elmer a pro analýzu software Pyris. Vzorky vážící (10 ± 2) mg byly testovány v hliníkových kapslích typu 0219-0041. Jako referenční standard byla použita prázdná hliníková kapsle, což pro měřené rozsahy teplot bylo dostačující. Měření probíhalo v inertní atmosféře dusíku při průtoku plynu 20 ml/min a rychlosti ohřevu i chlazení 10 °C/min.

3.3.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie byla použita k analýze čistých bylin, extraktů i výsledných nanovláken, aby došlo ke zjištění, zda se nějaké látky v průběhu extrakce nebo zvláknování nevytrácí. Pro měření byl využit plynový chromatograf Thermo Trace 1310 s hmotnostním spektrometrem Thermo TSQ 8000 Triple quadrupole MS. Vzorky k analýzám byly nadávkovány do 20 ml vialek opatřených magnetickým víčkem s PTFE septem. Pro separaci byla použita chromatografická kolona DB-5MS s parametry: délka: 30 m, průměr 0,25 mm a tloušťkou filmu 0,25 μm . Pro nástřík bylo zvoleno 100 μm PDMS vlákno (od firmy Supelco) v nástříkovém režimu headspace-SPME. Automatické dávkování vzorku zajistil autosampler PAL LHX-xt. Teplotní režim pece plynového chromatografu byl následující: počáteční teplota 60 °C, poté teplotní gradient 7 °C/min na teplotu 300 °C, která byla ustálena po dobu 5 minut. Hmotnostní detektor byl použit v režimu fullscan, kdy byly sledovány hmoty v rozmezí od 40 do 500.

Parametry měřicí metody:

Teplota iontového zdroje: 200 °C

Teplota transfer liny: 250 °C

Teplota v nástřiku: 250 °C

Průtok nosného plynu (helium): 1 ml/min

Vzhledem k tomu, že byliny, nanovlákná s čistým methanolem a nanovlákná s extrakty byly měřeny v jinou dobu a hmotnostní spektrometr byl mezi těmito měřeními čištěn a došlo ke zkrácení kolony, při porovnání těchto vzorků se retenční časy liší.

3.3.6 Měření povrchového napětí

Vzhledem k tomu, že při hojení je potřeba v okolí rány vytvořit vlhké prostředí, ale zároveň zajistit přístup vzduchu k ráně, jsou nanovlákná vhodná jako membrány na obvazy pro krytí ran. Z tohoto důvodu bylo na připravených nanovlákných měřeno jejich povrchové napětí. Měření povrchového napětí připravených nanovláken probíhalo, tak že se na pás široký cca 1 cm vystřižených nanovláken umístila kapka vody a 1 s po ustálení byly změřeny úhly smáčení. Na všechna nanovlákná byly umístěny vždy 3 kapky kvůli určení střední hodnoty úhlů smáčení. Měření povrchového napětí bylo prováděno na přístroji od firmy Krüss model DSA30E.

3.3.7 Testy antimikrobiální aktivity

Testy antimikrobiální aktivity byly zkoumány na kmenu *S. gallinarum* a *E. coli*. Antimikrobiální aktivita byla hodnocena tzv. difuzním testem, který spočívá v tom, že účinné látky difundují z disku položeného na povrch naočkované agarové půdy. Přítomné bakterie se množí, poblíž disku se časem v důsledku přílivu účinné látky množství přestávají. V určitém okamžiku a vzdálenosti od disku však účinné látky nedokáží množení bakterií zastavit, tím se zakládá okraj inhibiční zóny.

K růstu *S. gallinarum* byl využit chromogenní substrát Bird Parker medium, na kterém jsou formovány kolonie černé barvy. K růstu *E. coli* byl využit chromogenní substrát McConkey medium, na kterém jsou formovány kolonie červené barvy. Na každý substrát byl vyočkován v čase t_0 1 ml suspenze, která obsahovala přibližně 10^4 bakterií, po vsáknutí byly přiloženy vzorky. Po 48h inkubaci (37 °C) byly substráty vyjmuty a byla vyhodnocena antimikrobiální účinnost daných vzorků.

Tyto testy byly provedeny ve dvou fázích. V první fázi byla ověřena antimikrobiální aktivita samotných extraktů. Pro tento test byly použity výseky filtračního papíru o průměru 1 cm, na které bylo sorbováno definované množství extraktu. Po odstranění rozpouštědla sušením byly tyto výseky přiloženy na agar s vyočkovanou bakteriální suspenzí a byl proveden difuzní test. Jako standardy byly použity výseky filtračního papíru s nánosem čistého rozpouštědla.

V druhé fázi byla testována již nanovláknina s obsahem bylinného extraktu. I v tomto případě byl proveden difuzní test. Průměr výseků nanovláknin byl 1 cm, jako standard byla použita nanovláknina připravená ze stejného rozpouštědlového systému ovšem bez obsahu extraktu.

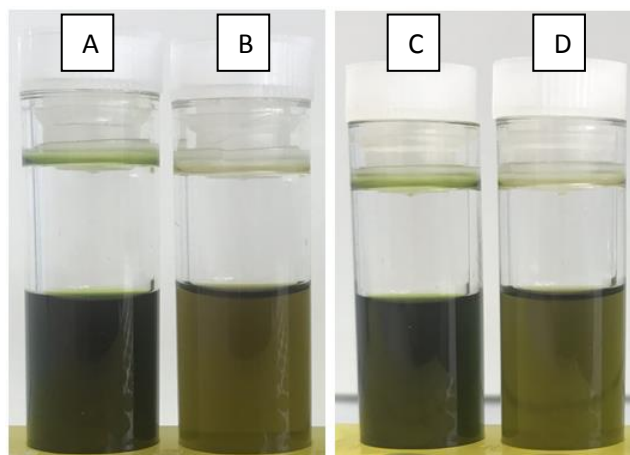
3.4 Výsledky a jejich diskuze

3.4.1 Příprava a hodnocení přírodních extraktů

Dle teoretické části byly vybrány rostliny, obsahující esenciální oleje s vhodnými látkami, které mají antimikrobiální účinnost. Dle [31] byly k extrakci esenciálních olejů z rostlin vybrány alkoholy, konkrétně methanol a ethanol. K extrakci byly vybrány různé poměry rostlin a rozpouštědel a také časy uvolňování. Extrakce probíhala za laboratorních podmínek. Přehled připravených extraktů je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Přehled připravených extraktů

Rostlina	Extrakční činidlo	Koncentrace [g/100 ml]	Doba extrakce		
			24 h	48 h	72 h
Tymián	MeOH	4	ANO	ANO	ANO
	EtOH	4	ANO	ANO	ANO
Eukalyptus	MeOH	4	ANO	ANO	ANO
	EtOH	4	ANO	ANO	ANO
Tymián	MeOH	12	ANO	ANO	ANO
	EtOH	12	ANO	ANO	ANO
Eukalyptus	MeOH	12	ANO	ANO	ANO
	EtOH	12	ANO	ANO	ANO
Tymián	MeOH	16	NE	NE	NE
	EtOH	16	NE	NE	NE
Eukalyptus	MeOH	16	ANO	ANO	ANO
	EtOH	16	ANO	ANO	ANO

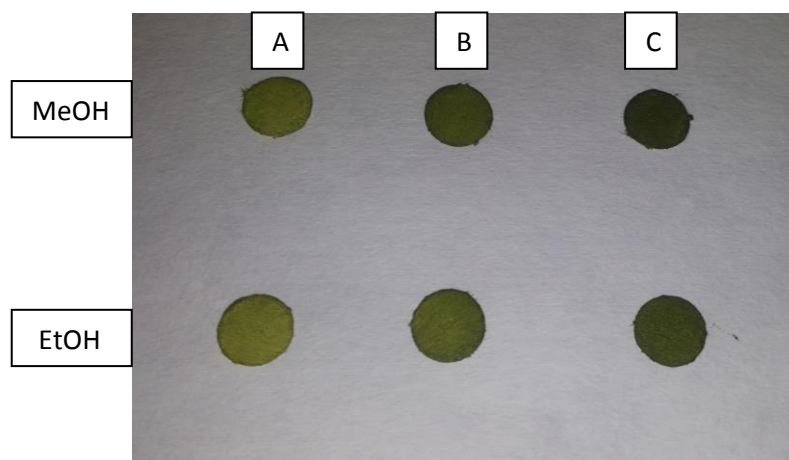


Obrázek 8: Vzorky extraktů. (A) tymián v MeOH (12 g/100 ml) doba extrakce 72 h (B) eukalyptus v MeOH (12 g/100 ml) doba extrakce 72 h (C) tymián v EtOH (12 g/100 ml) doba extrakce 72 h (D) eukalyptus v EtOH (12 g/100 ml) doba extrakce 72 h.

U extraktů s koncentrací 16 g/100 ml bylo při filtrování pozorováno nedokonalé promíchání rozpouštědla, tudíž s těmito extrakty se již dále npracovalo. U zbylých extraktů se dále vyšetřovala antimikrobiální účinnost a byly přidány do polymerních roztoků k elektrostatickému zvláknění.

3.4.2 Vyšetření antimikrobiální účinnosti připravených extraktů

Z připravených extraktů byly vybrány ty nejkonzentrovanejší vzorky pro zkoumání jejich antimikrobiální účinnosti. Extrakty byly kápnuty na kolečka o průměru 1 cm vytvořená z filtračního papíru, pro vyšetření byly použity různé objemy a to 20, 40 a 80 μ l, filtrační papíry byly následně ponechány volně na vzduchu, aby došlo k vysušení. Následně se vyšetřila jejich antimikrobiální aktivita.



Obrázek 9: Terčíky z filtračního papíru s různými objemy extraktů tymiánu (12 g/100 ml) 72 h. (A) 20 μ l (B) 40 μ l (C) 80 μ l

Tabulka 3: Antimikrobiální aktivita extraktů

Vzorek	Objem [μl]	Redukce bakterií	
		<i>S. gallinarum</i>	<i>E. coli</i>
Eukalyptus v MeOH (12 g/100 ml) 72 h	20	ANO	ANO
	40	ANO	ANO
	80	ANO	ANO
Eukalyptus v EtOH (12 g/100 ml) 72 h	20	NE	NE
	40	ANO	částečně ANO (8)
	80	ANO	částečně ANO (8)
Tymián v MeOH (12 g/100 ml) 72 h	20	ANO (inhibiční zóna 0,3 cm)	ANO
	40	ANO (inhibiční zóna 0,6 cm)	ANO
	80	ANO (inhibiční zóna 0,6 cm)	ANO
Tymián v EtOH (12 g/100 ml) 72 h	20	ANO (inhibiční zóna 0,2 cm)	ANO
	40	ANO (inhibiční zóna 0,4 cm)	ANO
	80	ANO (inhibiční zóna 0,4 cm)	ANO
Standard MeOH	20	NE	NE
	40	NE	NE
	80	NE	NE
Standard EtOH	20	NE	NE
	40	NE	NE
	80	NE	NE

ANO – redukce bakterií v přímém kontaktu; inhibiční zóna uvedená v závorce je měřena od hrany vzorku
Částečně ANO – redukce bakterií v přímém kontaktu, číslo v závorce je počet kolonií, které rostly pod vzorkem

NE – žádná redukce bakterií

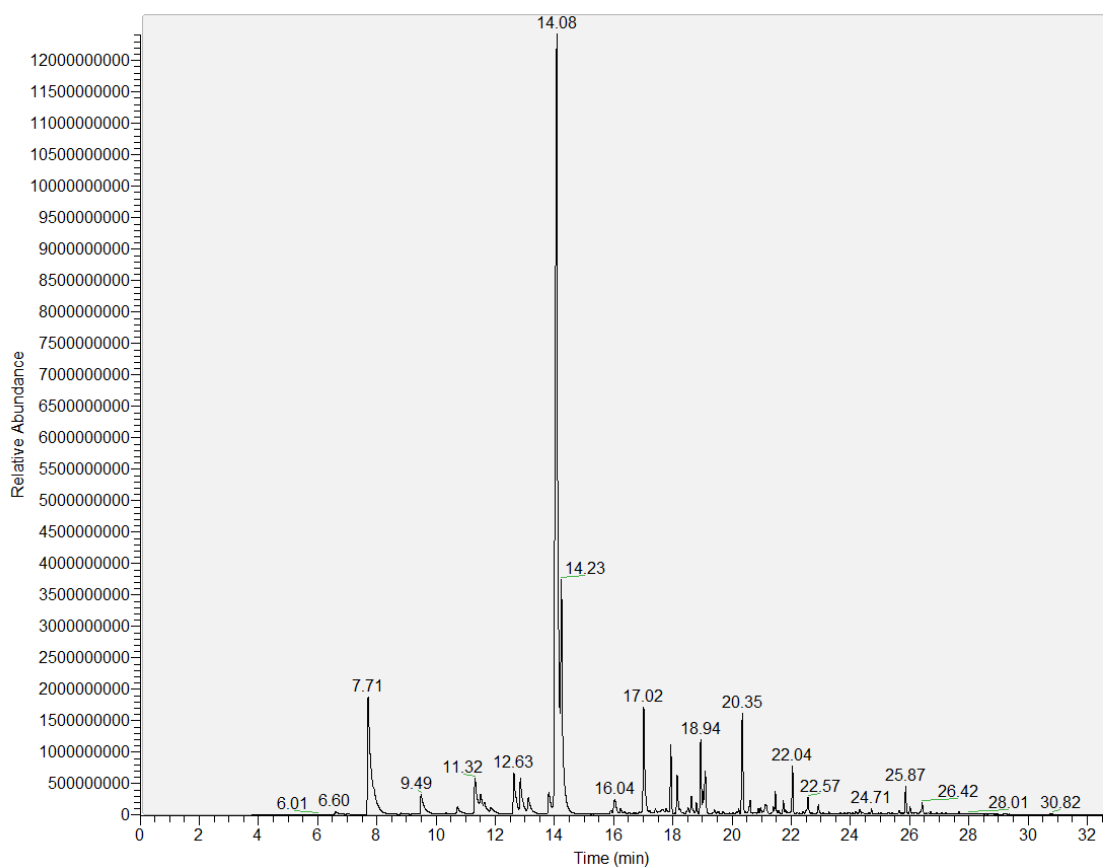
Diskuze výsledků

Z výsledků uvedených v tabulce č. 3 je zřejmé, že účinnější rozpouštědlo pro uvolnění látek s antimikrobiálními účinky z daných rostlin je methanol, u extraktů z tymiánu i eukalyptu vykazuje lepší výsledky. U extraktů z eukalyptu je patrné, že menší objem extraktu nestačí k redukci bakterií, naopak u tymiánu dochází u methanolových extraktů k tvorbě větší inhibiční zóny než u ethanolových. Na druhou stranu

při porovnání eukalyptových a tymiánových extraktů vychází lépe tymián. U eukalyptových extraktů sice dochází k redukci bakterií pod terčíky z filtračních papírů, ale nedochází k tvorbě inhibiční zóny v okolí terčíku, zatímco u tymiánového extraktu ano, i když jen na kmenu *S. gallinarum*. Tymiánový extrakt z methanolu se tedy jeví jako neúčinnější, bude s ním tedy pracováno i nadále.

3.4.3 Analýza suchého tymiánu hmotnostní spektrometrií

Hmotnostní spektrum, které vzejde z analýzy hmotnostním spektrometrem, je ukázáno v grafu č. 1. Každé maximum je záznamem jednotlivých látek, které byly zaznamenány v určitém retenčním čase. Plocha každého vrcholu odpovídá množství dané složky ve vzorku. Dle [32] by tymián měl obsahovat látky uvedené v tabulce č. 4.



Graf 1: Hmotnostní spektrum tymiánu.

Tabulka 4: Podíl vybraných látek v tymiánu. [32]

	R.T.	%
Tricyclene	8.16	0.64
Alpha-thyjene	8.34	0.46
Alpha pinene	8.48	9.35
Camphene	8.844	17.19
Beta pinene	9.46	4.23
Myrcene	9.83	3.21
Alpha terpinen	10.32	0.27
Para cymene	10.49	1.19
1,8-cineole	10.60	5.45
Trans Beta ocimene	10.96	0.09
Gama terpinene	11.14	0.55
Cis-sabinene hydrate	11.31	0.46
Camphenilone	11.60	0.31
Alpha-terpinolene	11.68	0.11
Linalol	11.93	0.14
Alpha-thyjone	12.19	0.29
Unknown	12.36	1.07
Nealloocimene	12.42	0.53
Camphor	12.75	38.54
Borneol	13.05	4.92
Terpinene-4-ol	13.22	2.21
Para-cymen-8-ol	13.33	0.28
Alpha terpineol	13.41	0.57
Verbenone	13.71	0.13
Carveol 1	13.86	0.22
Unknown	13.98	0.11
Carvarcrol metyl ethyl	14.20	0.53
Unknown	14.66	0.11
Bornyl acetate	14.82	0.40
Thymol	15.08	0.24
Alpha-copaene	16.10	0.30
Beta-bourbonene	16.24	0.12
Alpha-Gurjunene	16.57	0.66
Beta-caryophyllene	16.71	0.09
Aromadendrene	17.25	0.11
Alpha-elemene	17.44	0.22
Germacrene-d	17.49	0.23
Bicyclogermacrene	17.68	0.13
Delta-cadinene	17.98	-
Spathulenol	18.69	0.73
Caryophellene oxide	18.77	0.56
Viridiflorol	18.87	-
Beta-oplepenone	19.05	0.07

Z tabulky č. 4 je patrné, že tymián obsahuje velké množství různých látek, jejich přítomnost byla vyšetřena i ve vzorku použitém při experimentu. V tabulce č. 5 je uvedeno jedenáct látek, které byly v největší míře zastoupeny v tymiánu, který se používal k přípravě extraktů.

Tabulka 5: Přehled nejvýznamnějších látek ve vzorku tymiánu.

Látka	Retenční čas [min]
Para cymene	7,71
Linalool	9,49
Borneol	11,32
Terpinene-4-ol	11,51
Thymol methyl ether	12,63
Isothymol methyl ether	12,86
Thymoquinone	13,12
Thymol	14,08
Carvacrol	14,23
β -Caryophyllene	17,02
Caryophyllene oxid	20,35

Diskuze výsledků

Důvodem toho, že počet látek v tabulce č. 4 neodpovídá počtu látek z tabulky č. 5, je, že při analýze byly vybrány pouze ty látky, které se vyskytovaly ve vzorku tymiánu v nejhojnější míře. Při detailnějším pohledu na tyto dvě tabulky je také patrné, že látky, které se vyskytují ve zkoumaném vzorku (thymol methyl ether, isothymol methyl ether a thymoquinone), neobsahoval vzorek zkoumaný v experimentu [32]. Složení esenciálních olejů z určitého druhu rostliny se může lišit mezi obdobími sklizně a mezi geografickým původem těchto rostlin. [12] Rozdíl tedy mezi těmito dvěma analýzami může být způsoben tím, že tymián zkoumaný v [32] pocházel z východu Maroka, zatímco tymián zkoumaný v tomto experimentu pravděpodobně pochází z jiné oblasti. Distributor použitého tymiánu neuvádí původ této rostliny, ale je málo pravděpodobné, že by pocházel také z východu Maroka. Další rozdíl je v retenčních časech, ve kterých byly dané látky zaznamenány, tyto rozdíly jsou pouze důsledkem zvolené metody měření. Na látky z tabulky č. 5 bude dán důraz v následujících kapitolách při zkoumání extraktů a nanovláken obsahujících extrakty právě z tohoto tymiánu.

3.4.4 Analýza extraktu hmotnostní spektrometrií

Je možné, že v procesu přípravy extraktů nebo při zvláknování dojde ke ztrátě účinných látek. Proto byly zkoumány všechny fáze přípravy, aby došlo k odhalení okamžiku, kdy se dané látky vytrácí. Přehled látek, které obsahoval extrakt, je uveden v tabulce č. 6.

Tabulka 6: Přehled látek ve vzorku extraktu.

Látka	Retenční čas [min]
Para cymen	7,70
Linalool	9,50
Borneol	11,32
Terpinen-4-ol	11,51
Thymol methyl ether	12,63
Isothymol methyl ether	12,85
Thymoquinone	---
Thymol	14,01
Carvacrol	14,20
β -Caryophyllene	17,01
Caryophyllene oxid	20,39

Diskuze výsledků

Z tabulky č. 6 lze vidět, že látky obsažené v extraktu methanolu obsahují téměř stejné látky jako tymián samostatně. Jediná látka, která se s čistým tymiánem neshoduje je thymoquinone. Toto může být způsobeno chybou při měření nebo tím, že vrchol thymoquinonu nebyl tak výrazný a skryl se za některou z blízkých látek.

3.4.5 Volba rozpouštědlového systému

Vzhledem k tomu, že nejlepší antimikrobiální účinky z připravených extraktů měl extrakt tymiánu v methanolu, bylo potřeba tomuto přizpůsobit i rozpouštědlový systém, do kterého je potřeba zakomponovat právě zmiňovaný methanol.

Na začátku bylo ovšem potřeba vybrat vhodné rozpouštědlo, se kterým by byl methanol mísitelný. Z dostupné literatury vyplývá, že nejlepšími rozpouštědly pro PCL jsou dichlormethan (DCM), chloroform (CF) a tetrahydrofuran (THF). [27] Vzhledem k dobré mísitelnosti s methanolem a vzhledem k lepší biokompatibilitě byl pro experiment vybrán chloroform.

Po zvolení vhodného rozpouštědla bylo nutné určit vyhovující koncentraci polymeru v roztoku, při které bude roztok zvláknitelný. Z prostudované literatury vyplynulo, že nejčastěji se pro elektrostatické zvláknění polykprolaktonu používá koncentrace hm. 14 – 20 %. Na základě primárních ověřovacích experimentů byla pro další práci zvolena koncentrace 17 %.

Pro elektrostatické zvláknění bylo ještě potřeba zvolit vhodný poměr chloroformu a methanolu. Ze začátku bylo tedy PCL rozpouštěno v CF a čistém MeOH, právě z důvodu určení vyhovujícího poměru těchto rozpouštědel, aby nedocházelo ke zbytečným ztrátám připravených extraktů. Zvlákněné roztoky jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Podmínky při elektrostatickém zvláknění:

- Teplota: 23,2 °C
- Vzdušná vlhkost: 32,3 %
- Vzdálenost tyčka – kolektor: 11 cm

Tabulka 7: Zvláknitelnost roztoků s různými poměry rozpouštědel

Poměr rozpouštědel (hm.)		Zvláknitelnost	Aplikované napětí [kV]
CF	MeOH		
4	1	ANO	38,1
3	1	ANO	39,0
2	1	ANO	40,5
1	1	NE	---

Diskuze výsledků

Aby elektrostaticky zvlákněná nanovláknina obsahovala co nejvíce účinných antimikrobiálních látek, je potřeba pracovat s roztoky, ve kterých je obsaženo maximální množství extraktu. Z tabulky č. 7 je patrné, že nejkonzentrovější roztok, který lze zvláknit, obsahuje rozpouštědla v poměru 2:1 (CF:MeOH). Na druhou stranu nebylo zřejmé, jaký dopad bude mít na elektrostatické zvláknění přidání extraktu do polymerního roztoku, takže dále bylo pracováno se všemi testovanými rozpouštědlovými systémy, které se podařilo zvláknit.

3.4.6 Elektrostatické zvláknění roztoků s obsahem extraktu

Jak již bylo řečeno, dopředu nebylo jasné, jak polymerní roztoky při elektrostatickém zvláknění zareagují na přidání extraktu. Od každého poměru byly tedy připrave-

ny čtyři roztoky, do kterých byly přidány extrakty, z nichž některé byly zředěné čistým methanolem. Směsi extraktu a methanolu byly nakonec připraveny tak, že koncentrace extraktu v těchto směsích odpovídala 25, 50, 75 a 100 %.

Pro elektrostatické zvlákňování byly tedy připraveny roztoky PCL o hmotnostní koncentraci 17 %. Rozpuštění polymeru probíhalo za stálého míchání po dobu 24 hodin.

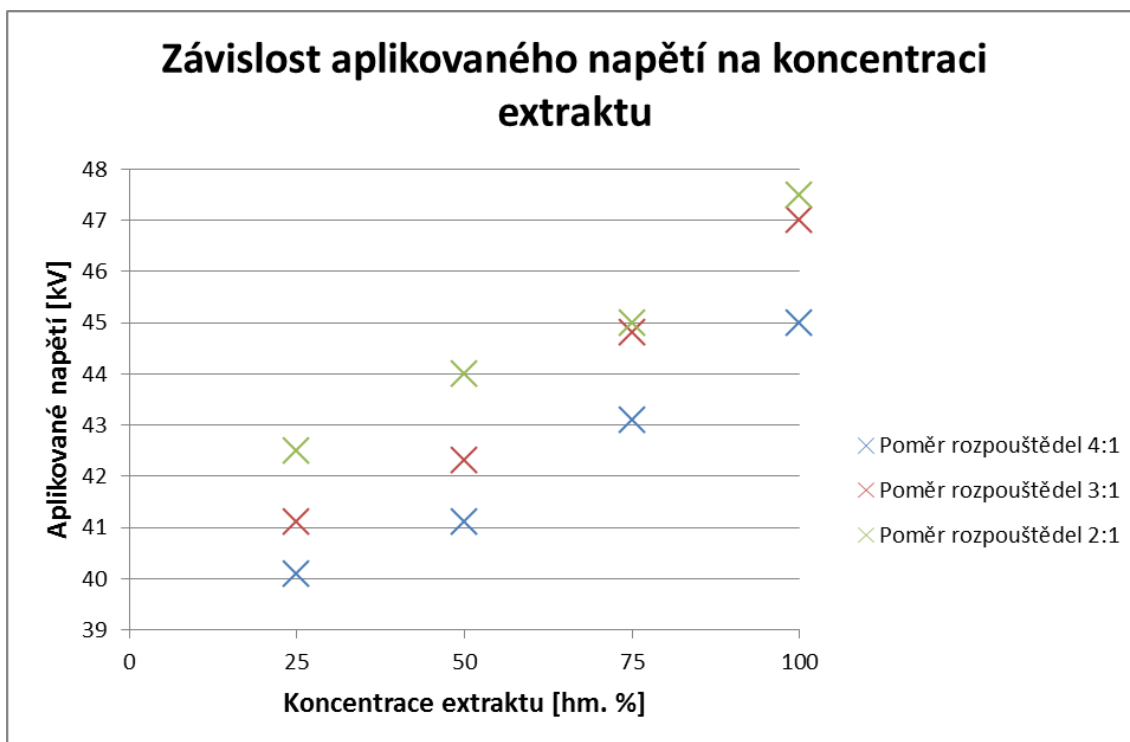
Při elektrostatickém zvlákňování byla využita tyčková aparatura, polymerní roztoky byly vystaveny elektrostatickému poli a vzdálenost mezi tyčkou a kolektorem byla vždy 11 cm. Hodnota aplikovaného napětí, kterému byly vystaveny polymerní roztoky, se měnila. S rostoucí koncentrací extraktu v roztoku bylo potřeba zvýšit i aplikované napětí, přehled je uveden v tabulce č. 8.

Podmínky při elektrostatickém zvlákňování:

- Teplota: 23,2 °C
- Vzdušná vlhkost: 32,3 %
- Vzdálenost tyčka – kolektor: 11 cm

Tabulka 8: Přehled aplikovaného napětí na jednotlivé polymerní roztoky

Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Zvlákňovací napětí [kV]
Chloroform	MeOH/extrakt		
4	1	25	40,1
4	1	50	41,1
4	1	75	43,1
4	1	100	45,0
3	1	25	41,1
3	1	50	42,3
3	1	75	44,8
3	1	100	47,0
2	1	25	42,5
2	1	50	44,0
2	1	75	45,0
2	1	100	47,5



Graf 2: Závislost aplikovaného napětí na koncentraci extraktu

Diskuze výsledků

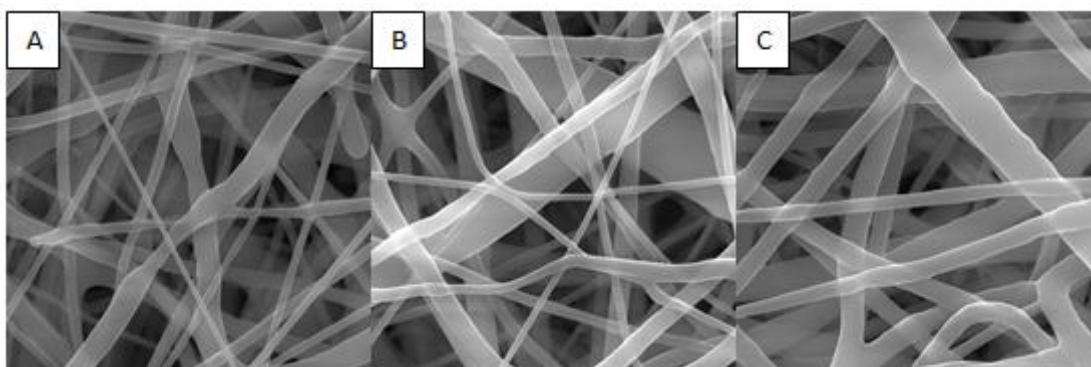
Z tabulky č. 8 je patrné, že přítomnost extraktu v polymerním roztoku nemá vliv na zvláknitelnost tohoto roztoku, všechny připravené roztoky se podařilo zvláknit. Na druhou stranu z přehledu závislosti aplikovaného napětí na koncentraci extraktu vyplývá, že vyšší koncentrace extraktu vede k vyššímu napětí nutnému pro zvláknění polymerního roztoku. Při zvyšující se koncentraci extraktu bylo také pozorováno, že se při zvláknování kromě nanovláken přenášely ke kolektoru i drobné kapičky polymerního roztoku.

3.4.7 Vliv přítomnosti extraktu na morfologii vláken

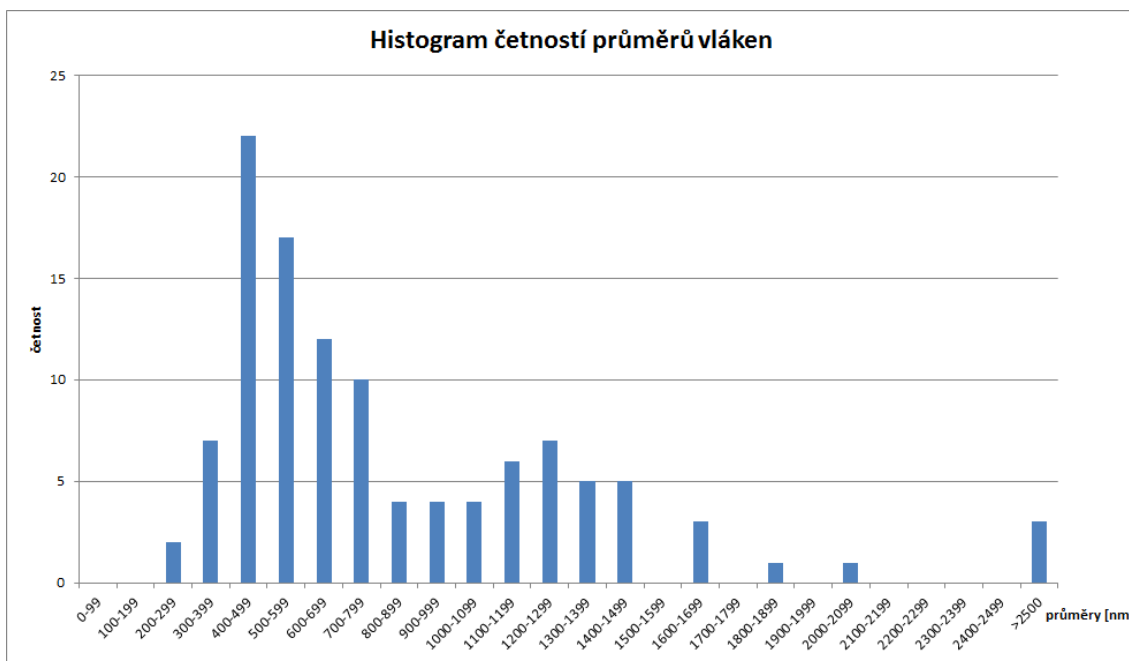
Pokud má přítomnost extraktu v polymerním roztoku vliv na velikost aplikovaného zvláknovacího napětí, lze předpokládat, že bude mít vliv i na morfologii vzniklých vláken, proto byla nanovláknina zkoumána na rastrovacím elektronovém mikroskopu. Srovnání jejich průměrů je v tabulce č. 9 a na obrázku č. 10 je porovnání nanovláken, která obsahují 100% extrakty, o různých poměrech rozpouštědel, zbylé obrázky těchto nanovláken se z důvodu velkého množství a větší přehlednosti nacházejí v příloze.

Tabulka 9: Srovnání průměrů elektrostaticky zvlákněných nanovláken

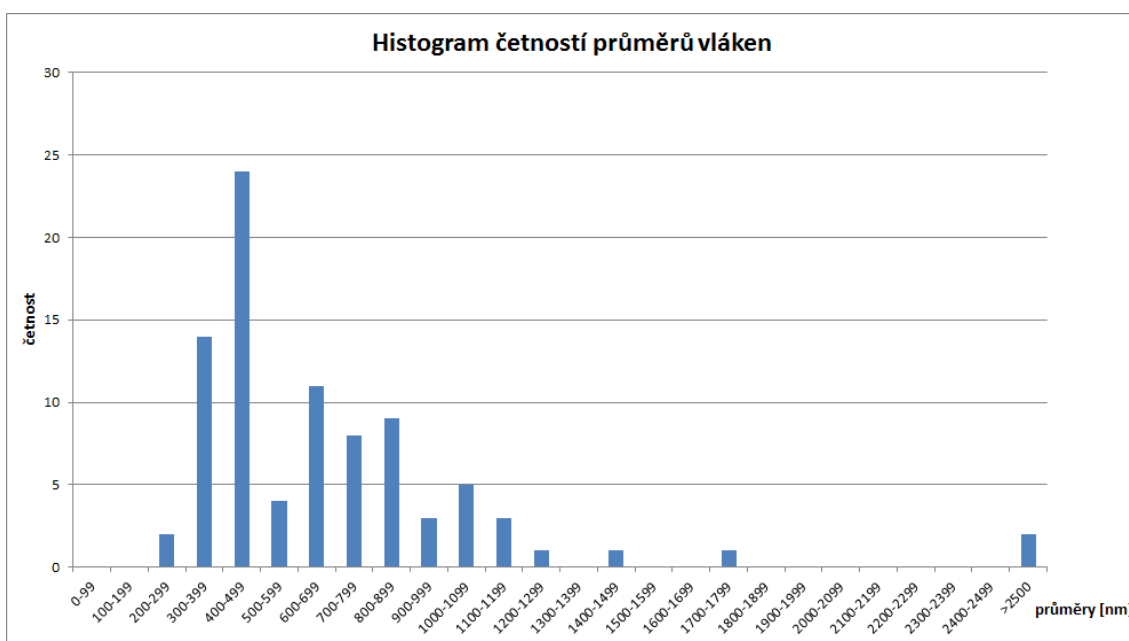
Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Střední hodnota průměru vláken [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
Chloroform	MeOH/extrakt			
4	1	25	982	623
4	1	50	691	505
4	1	75	919	786
4	1	100	859	560
3	1	25	598	352
3	1	50	670	367
3	1	75	627	310
3	1	100	707	492
2	1	25	847	340
2	1	50	714	374
2	1	75	907	389
2	1	100	1064	390



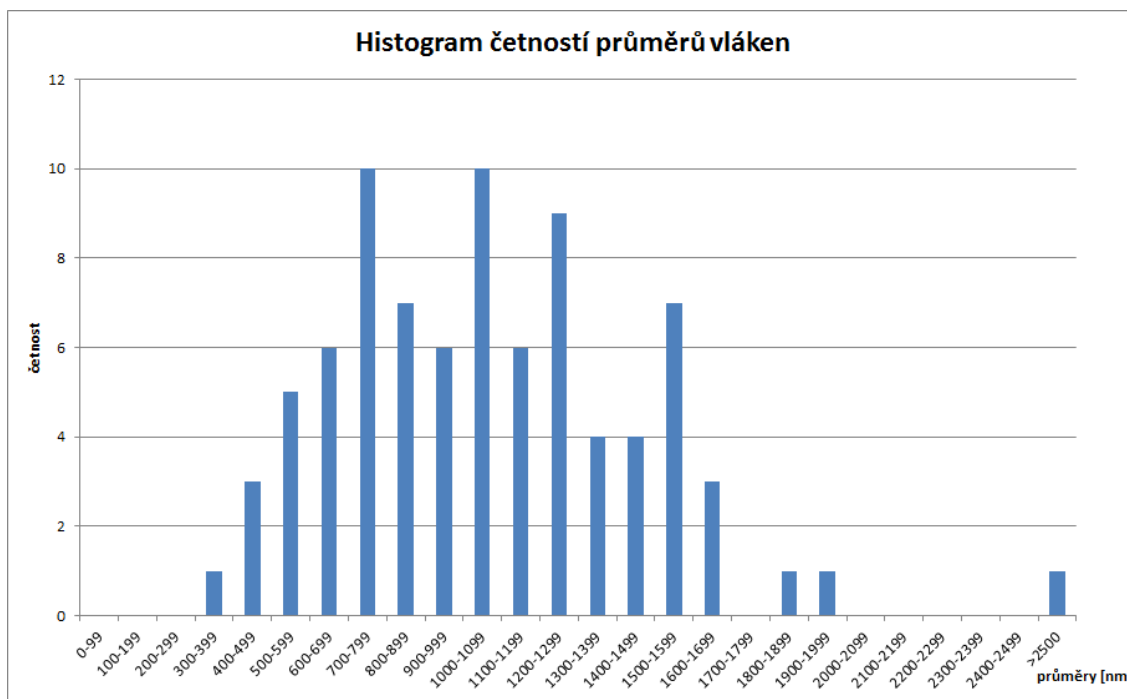
Obrázek 10: SEM snímky nanovláken obsahujících 100% extrakty, zvětšeno 10 000x (A) poměr CF:Extrakt 4:1 (B) poměr CF:Extrakt 3:1 (C) poměr CF:Extrakt 2:1.



Graf 3: Histogram četností průměrů vláken. Vzorek s poměrem 4:1 (CF:Extrakt) se 100% extraktem. (Obrázek 10A)



Graf 4: Histogram četností průměrů vláken. Vzorek s poměrem 3:1 (CF:Extrakt) se 100% extraktem. (Obrázek 10B)



Graf 5: Histogram četností průměrů vláken. Vzorek s poměrem 2:1 (CF:Extrakt) se 100% extraktem. (Obrázek 10C)

Diskuze výsledků

Mezi střední hodnotou průměrů všech nanovláken nejsou po započítání chyby téměř rozdíly, není viditelný ani žádný trend závislosti průměru nanovláken na koncentraci extraktů. Na obrázku č. 10 také nejsou viditelné významné rozdíly v morfologii mezi jednotlivými nanovláknými. Naopak při porovnání grafů č. 3, 4 a 5 je viditelné, že s rostoucí koncentrací extraktu v polymerním roztoku roste i četnost vláken s průměry většími než jeden mikrometr. Lze tedy konstatovat, že koncentrace extraktu v polymerním roztoku má vliv na proces elektrostatického zvlákňování a na morfologii výsledných vláken a vede ke zvyšování průměru nanovláken.

3.4.8 Vyšetření antimikrobiálního účinku nanovláken

Všechna připravená nanovlákná byla vyšetřována pro jejich antimikrobiální účinnost. Z každého připraveného vzorku byly udělány dva výseky o průměru 1 cm, kvůli porovnání. Antimikrobiální aktivita byla zkoumána na kmenu *S. gallinarum* a *E. coli*. U žádného vzorku nebyly prokázány antimikrobiální účinky proti žádnému z kmenů.

3.4.9 Zvýšení koncentrace extraktů

Vzhledem k tomu, že všechny vzorky nanovláken neprojevily žádnou antimikrobiální účinnost, bylo potřeba zvýšit koncentraci připravených extraktů. Zvýšení koncentrace extraktů probíhalo tak, že zkumavky obsahující extrakt byly vloženy do inkubátoru o teplotě 40 °C, při které se odpařoval methanol a při které účinné látky nemohly degradovat.

Pro zjištění výsledné koncentrace byl zkoumán obsah sušiny ve 100% extraktech. Do šesti zkumavek byl pipetován vždy 1 ml extraktu, zkumavky byly zváženy prázdné a poté po sušení, kdy obsahovaly pouze sušinu z extraktu. Střední hodnota hmotností zbylé sušiny byla $(19,0 \pm 4,6)$ mg na 1 ml.

K odpařování byly použity dva 100% extrakty o objemech 27 a 30 ml. Po uplynutí 24 hodin v inkubátoru byly zkumavky vyjmuty a bylo zjištěno, že objem se snížil na třetinu, tedy na 9 a 10 ml, obsah sušiny v těchto extraktech ale odpovídal extraktu 100%. Koncentrace těchto extraktů byla tedy 57 mg na 1 ml, což odpovídá 300 % původní koncentrace. Jeden extrakt byl ponechán s touto koncentrací a do druhého byl přilít čistý methanol na dvojnásobek objemu, tento extrakt tedy obsahoval 38 mg na 1 ml, což odpovídá 200 % původní koncentrace.

3.4.10 Elektrostatické zvláknění roztoků s koncentrovanými extrakty

Při elektrostatickém zvláknění byla využita tyčková aparatura. S rostoucí koncentrací extraktu v roztoku bylo potřeba zvýšit i aplikované napětí, přehled je uveden v tabulce č. 10.

Podmínky při elektrostatickém zvláknění:

- Teplota: 22,5 °C
- Vzdušná vlhkost: 36,0 %
- Vzdálenost tyčka – kolektor: 11 cm

Tabulka 10: Přehled aplikovaných napětí na roztoky s koncentrovanými extrakty

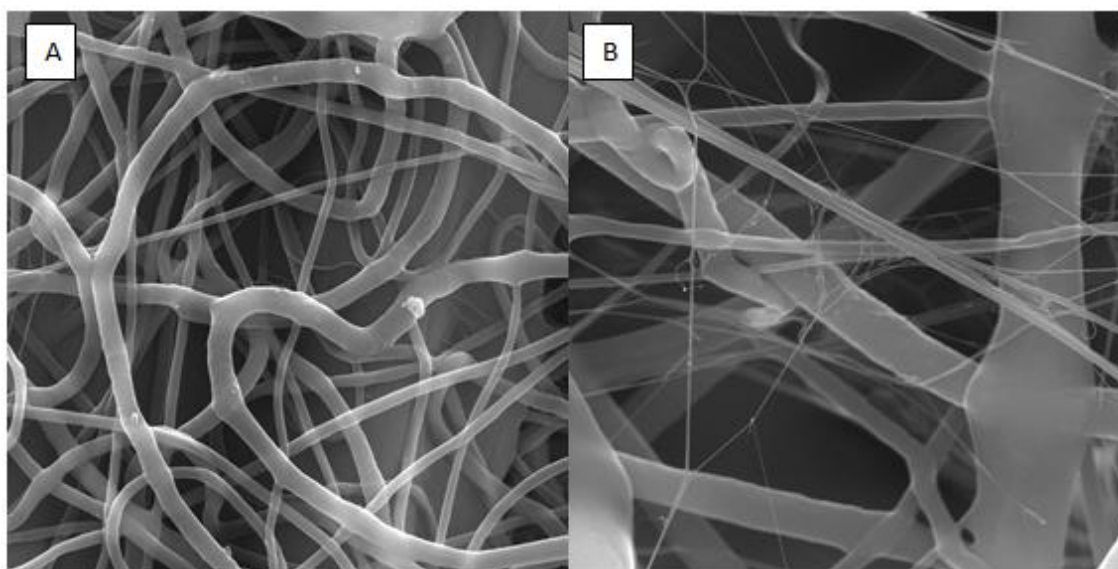
Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Zvláknovací napětí [kV]
Chloroform	MeOH/extrakt		
2	1	200	55
2	1	300	60

Diskuze výsledků

Z tabulky č. 10 je patrné, že zvýšení koncentrace extraktů nemá vliv na zvláknitelnost polymerního roztoku, oba připravené roztoky se podařilo zvláknit. Na druhou stranu z přehledu aplikovaného napětí vyplývá, že právě toto napětí bylo nutné ještě zvýšit oproti hodnotám, které byly použity u polymerních roztoků se 100% extrakty. Při zvyšující se koncentraci se kromě nanovláken přenášely ke kolektoru i drobné kapičky polymerního roztoku, které byly vidět v ještě větší míře než u předchozích roztoků.

3.4.11 Morfologie nanovláken z roztoků s koncentrovanými extrakty

Vzhledem k tomu, že polymerní roztoky potřebovaly ke zvláknění vyšší elektrostatické napětí a při zvláknění docházelo méně ke tvorbě vláken než v předchozích případech, je možné, že to má vliv i na morfologii nanovláken, proto byla vlákna zkoumána na rastrovacím elektronovém mikroskopu a srovnání jejich velikostí je uvedeno na obrázku č. 11 a v tabulce č. 11.



Obrázek 11: SEM snímky (A) Nanovláknina z 200% extraktu (B) Nanovláknina z 300% extraktu. Zvětšení 5000x.

Tabulka 11: Srovnání průměrů elektrostaticky zvlákněných nanovláken

Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Střední hodnota průměru vláken [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
Chloroform	MeOH/extrakt			
2	1	200	906	381
2	1	300	467	352

Diskuze výsledků

Jak lze vidět na obrázku č. 11, nanovlákná vytvořená z 300% extraktu jsou oproti nanovláknům z 200% extraktu značně nehomogenní, což má za následek snížení aritmetického průměru šířky těchto nanovláken.

3.4.12 Hmotnostní spektrometrie připravených nanovláken

Vzorky byly měřené v duplikátu, všechny zkoumané vzorky nanovláken vážily $(10,0 \pm 0,5)$ mg, takže je možné porovnávat obsažené látky v jednotlivých vzorcích mezi sebou. Z naměřených hodnot pro dva různé vzorky ze stejných nanovláken byl vždy vypočten aritmetický průměr. Vzhledem k tomu, že čísla popisující množství jednotlivých látek jsou v řádech $10^7 - 10^{10}$, byla tato čísla vydělena vždy hodnotou odpovídající nanovláknům obsahujícím nejmenší koncentraci extraktu (CF:MeOH 4:1, 25% extr.) a v tabulkách je uváděn pouze poměr a ne skutečné množství těchto látek ve vzorku. Kvůli větší přehlednosti je zde uvedena pouze tabulka s retenčními časy a tabulka porovnávací přítomnost thymolu v jednotlivých nanovlákněch, ostatní látky jsou uvedeny v příloze. Thymol byl vybrán právě proto, že se v nanovlákněch vyskytuje v nejhojnější míře. V grafu č. 6 je porovnání hmotnostních spekter nanovláken s poměrem 2:1 (CF:Extrakt/MeOH).

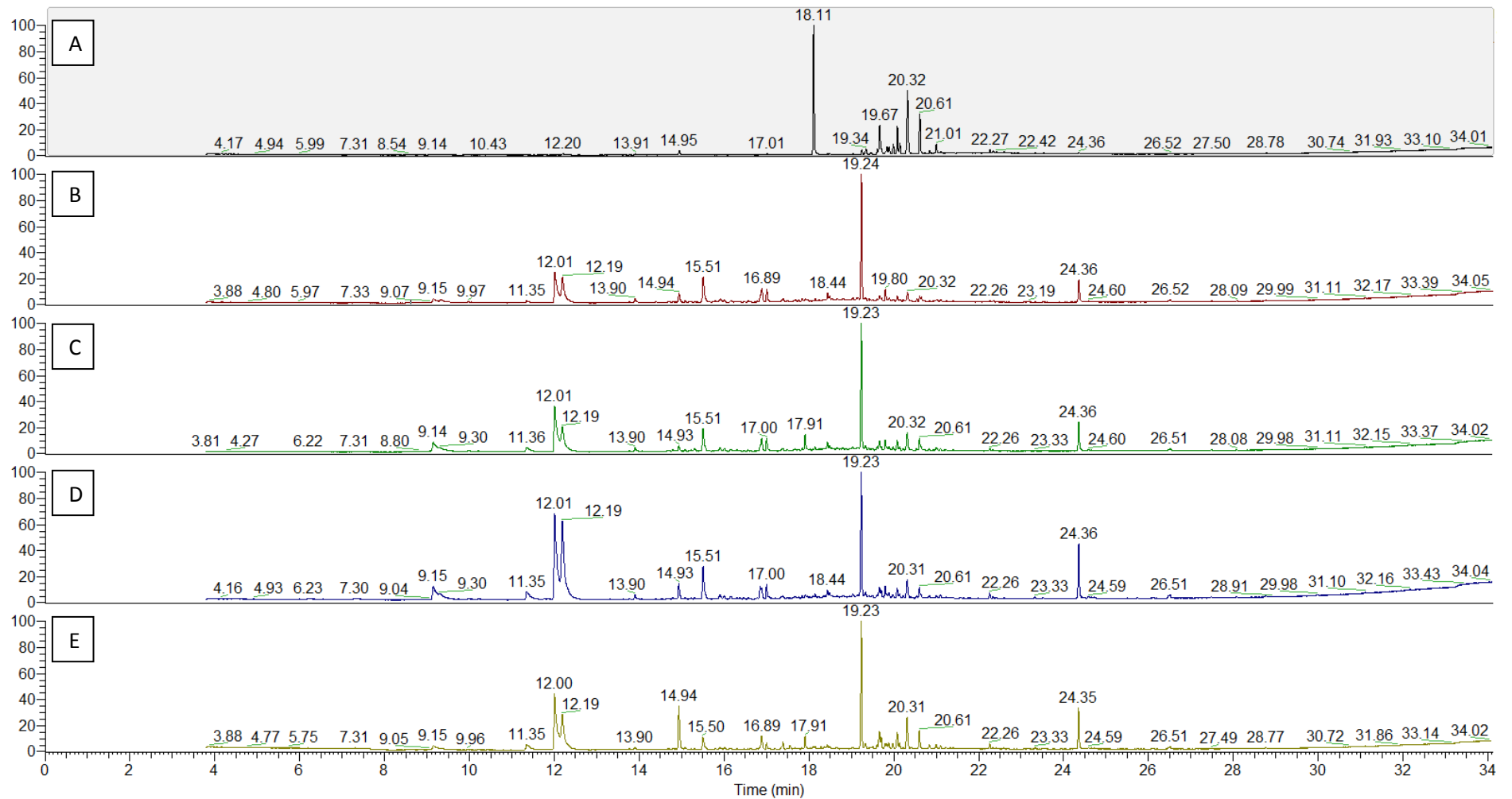
Tabulka 12: Přehled nejvýznamnějších látek ve vzorcích nanovláken.

Látka	Retenční čas [min]
Thymoquinone	11,35
Thymol	12,01
Carvacrol	12,10
Caryophyllene oxid	16,89

Tabulka 13: Porovnání výskytu thymolu v jednotlivých vzorcích nanovláken.

Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Zastoupení Thymolu ^o
Chloroform	MeOH/extrakt		
4	1	25	1,0
4	1	50	1,3
4	1	75	2,5
4	1	100	2,0
3	1	25	1,4
3	1	50	2,1
3	1	75	3,6
3	1	100	3,0
2	1	25	3,3
2	1	50	5,4
2	1	75	4,3
2	1	100	8,5
2	1	200	47,7*
2	1	300	344,0*

^o Vyjádřeno jako násobek množství látky (plochy vrcholu) obsažené ve vzorku s nejnižší hodnotou (CF:MeOH 4:1, 25% extr.)



Graf 6: Porovnání hmotnostních spekter nanovláken s poměrem 2:1 (CF:Extrakt).
 (A) MeOH (B) 25% extrakt (C) 50% extrakt (D) 75% extrakt (E) 100% extrakt

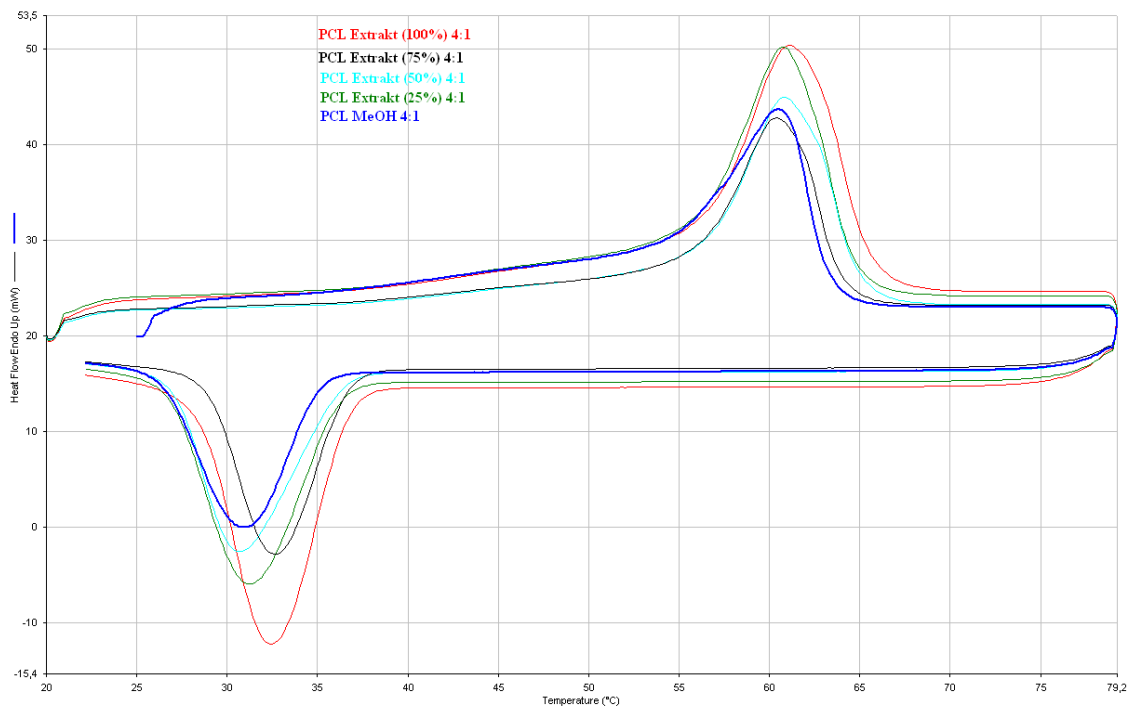
Diskuze výsledků

Z tabulky č. 13 je zřetelná vzrůstající tendence vybraných vrcholů s rostoucí koncentrací extraktu v nanovláknách. Hodnoty maxim retenčních časů vybraných látek jsou uvedeny v tabulce 12. Až na některé výjimky je u nanovláken se stejným poměrem rozpouštědel vždy patrný alespoň mírný nárůst plochy daného vrcholu od 25% extraktů po ty 100%. I když není takový, jaký by se očekával - tedy čtyřnásobný. V grafu č. 6 lze vidět porovnání spekter všech nanovláken připravených s poměry rozpouštědel 2:1. Bohužel při měření vzorku (A) musela být upravena rychlost průtoku plynu a to vedlo k posunu retenčních časů. Tudíž je oproti ostatním čtyřem vzorkům lehce posunutý a vrchol v retenčním čase 18,11 odpovídá vrcholům s retenčními časy 19,23 nebo 19,24 u zbylých spekter. U spekter nanovláken obsahující extrakty je vidět s rostoucí koncentrací extraktů nárůst v retenčních časech 12,00 a 12,19.

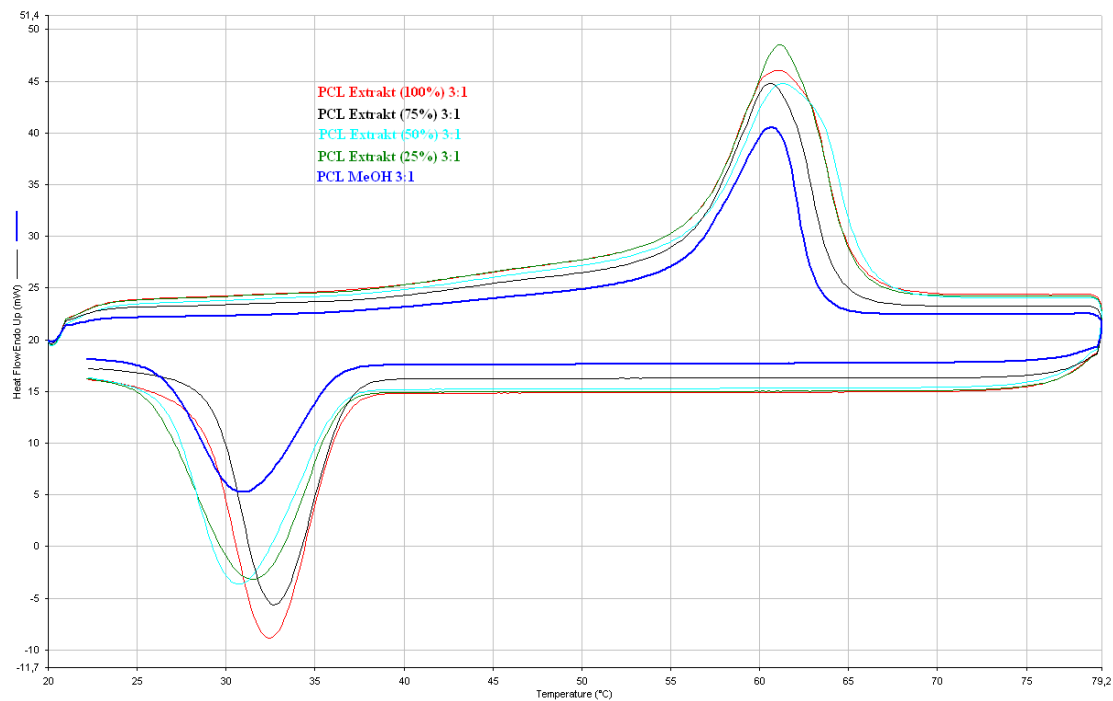
U nanovláken s 200% extraktem se spektrum výrazně odlišuje od ostatních vzorků, u kterých byly v retenčních časech 9,97 – 19,29 průkazné a oddělené vrcholy pro thymol nebo carvacrol. U vzorku s 200% extraktem nebyly jednotlivé vrcholy tak definované a došlo k jejich spojení. Byla tedy změřena plocha v rozmezí těchto retenčních časů a vypočtena molekulová hmotnost. U nanovláken s 300% extraktem vyšlo obdobné spektrum, pouze retenční časy byly jiné (9,26 – 20,81). V tabulce 13 je uvedeno srovnání množství thymolu zjištěného v testovaných nanovláknách. Nanovlákná zkoumaná na hmotnostním spektrometru obsahovala ještě další látky a to thymoquinone, carvacrol, a caryophyllene oxid. Zjištěná množství těchto látek jsou z důvodu přehlednosti shrnuta v tabulkách v přílohové části - příloze 2. Hodnoty uvedené v tabulkách neodpovídají v případě 200% a 300% extraktu skutečnosti, protože nebylo zřejmé, které retenční časy odpovídají thymolu a které carvacrolu, a jsou tedy součtem obsahu více látek.

3.4.13 Diferenciální skenovací kalorimetrie připravených nanovláken

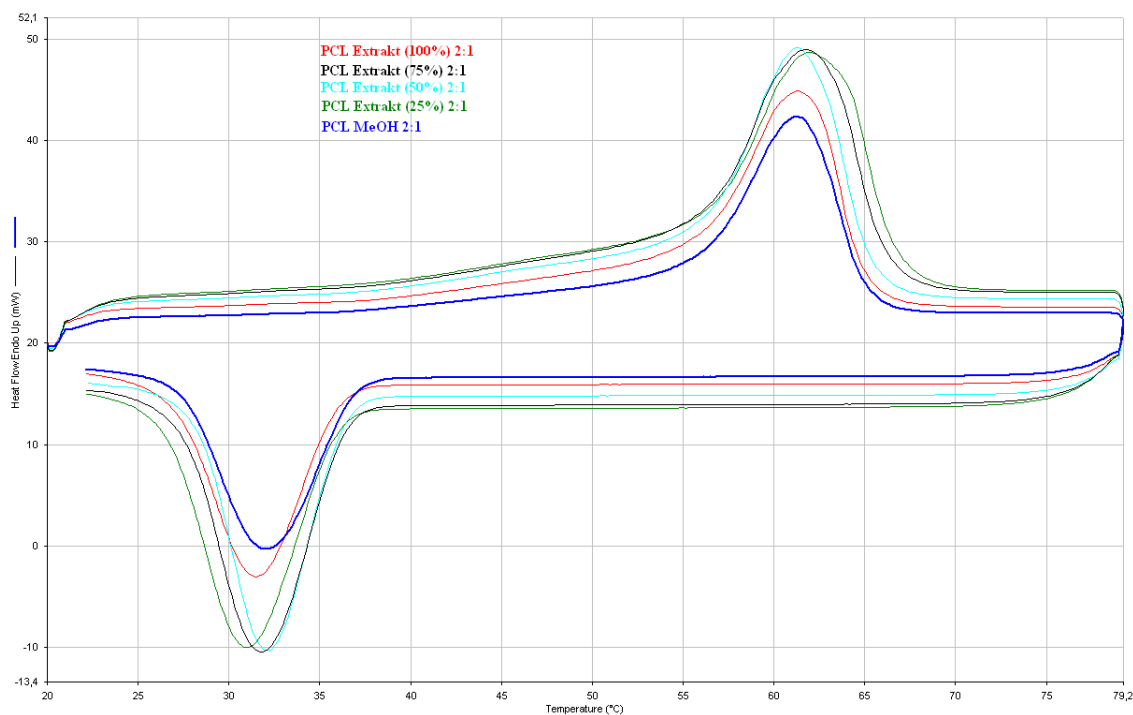
Na DSC byla testována všechna připravená nanovlákná včetně nanovláken připravených bez extraktu pouze s čistým methanolem, právě kvůli zjištění, zda přítomnost extraktu ovlivňuje krystalinitu PCL. Měření probíhalo v rozsahu 20 – 80 °C, vzhledem k teplotě tání PCL 60 °C.



Graf 7: Diferenciální skenovací kalorimetrie nanovláken s poměrem rozpouštědel 4:1.



Graf 8: Diferenciální skenovací kalorimetrie nanovláken s poměrem rozpouštědel 3:1.



Graf 9: Diferenciální skenovací kalorimetrie nanovláken s poměrem rozpouštědel 2:1.

Diskuze výsledků

Z DSC křivek je patrné, že testované vzorky vykázaly v měřeném teplotním rozsahu vždy dva vrcholy, jeden endotermní, který se objevuje při tání, a druhý exotermní, který odpovídá rekrystalizaci, toto chování potvrzuje semikrystalický charakter PCL. Některé vzorky kromě toho vykazovaly mírný nárůst (onset) v oblasti 57 °C, což bylo odhaleno až po derivaci křivky, tento nárůst mohl být způsoben přítomností nějaké nečistoty nebo táním nějaké látky z extraktu.

Z výše uvedených grafů je patrné, že teplota tání se pohybuje u všech vzorků v rozmezí 60 – 62 °C, což odpovídá teplotě tání polykaprolaktonu. U většiny testovaných vzorků byl pozorován trend, kdy rostoucí koncentrace extraktu vedla k posunu vrcholu k vyšší teplotě. V případě poměru 4:1 byla u čistých PCL nanovláken zaznamenána teplota 60,5 °C, zatímco u 100% extraktu bylo maximum posunuto na 61,2 °C. Kromě toho vedl přídavek 100% extraktu k nárůstu plochy vrcholu (dodané energie) z 657 mJ na 955,5 mJ. Podobný trend byl pozorován i u poměru 3:1. U vzorku 2:1 nebyl pozorován jasný trend související s koncentrací extraktu. Mírný posun maxima k vyšším teplotám a nárůst energie byl pozorován také u rekrystalizace vzorků

s extraktem. Rekrystalizace u všech vzorků proběhla v rozsahu 30 – 33°C. Přídavek extraktu však ve všech případech vedl k výraznému nárůstu plochy vrcholu. Například u poměru 4:1 vedl přídavek 100% extraktu k posunu teploty rekrystalizace z 30,9 °C na 32,4 °C a nárůstu energie z 698,5 mJ na 1033,3 mJ. To lze připisovat přítomnosti složek extraktu i v nízkém množství. Jeho hlavní složkami jsou hlavně thymol (51,5 °C) [33], carvacrol (3,5 °C) [34], thymoquinone (44 – 45 °C) [35] a caryophyllene oxide (63,5 – 64 °C) [36]. Zvýšení teploty tání by mohlo být způsobeno také přítomností chlorofylu, který má vysokou teplotu tání (117 – 120 °C) [37] v extraktu.

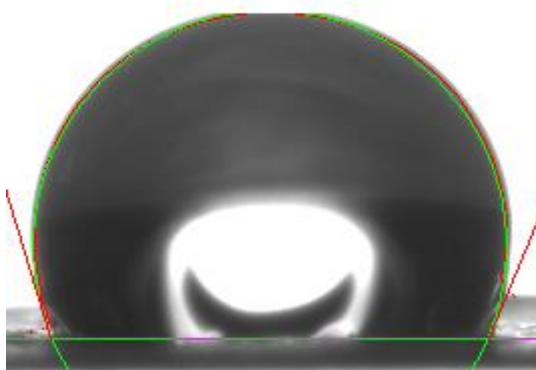
3.4.14 Měření povrchového napětí na připravených nanovlákních

Na připravených nanovlákních bylo měřeno povrchové napětí, z důvodu ověření vlivu přítomnosti extraktu v připravených nanovlákních na výslednou hydrofobicitu těchto nanovláken.

Tabulka 14: Úhly smáčení jednotlivých vzorků nanovláken

Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Střední hodnota úhlu smáčení [°]	Směrodatná odchylka [°]
Chloroform	MeOH/extrakt			
4	1	0	87,6	7,1
4	1	25	112,3	1,6
4	1	50	112,2	0,7
4	1	75	108,6	3,7
4	1	100	116,8	4,3
3	1	0	95,3	4,2
3	1	25	107,2	2,9
3	1	50	112,4	5,1
3	1	75	116,5	2,4
3	1	100	115,2	0,6
2	1	0	105,3	5,7
2	1	25	112,8	2,5
2	1	50	114,0	2,1
2	1	75	114,6	4,1
2	1	100	104,5	7,3
2	1	200	109,5	7,0
2	1	300	95,0	2,1

CA [L] 112.7
CA [R] 112.7



Obrázek 12: Úhly smáčení nanovláken, vzorek s poměry 2:1 se 75% extraktem



Obrázek 13: Kapky na povrchu nanovláken, vzorek 3:1 s čistým MeOH

Diskuze výsledků

Z tabulky č. 14 je viditelné, že přítomnost extraktu v nanovláčkách má vliv na jejich povrchové napětí. U nanovláken bez přidaného extraktu byl naměřen úhel smáčení nižší než u nanovláken s extraktem. Tento jev byl patrný především u nanovláken s poměrem 4:1 a 3:1, kde například u poměru 4:1 vedl i přidavek nejméně koncentrovaného extraktu (25%) k hydrofobizaci povrchu a změně úhlu smáčení z $(87,6 \pm 7,1)^\circ$ na

(116,8 ± 4,3)°. U nanovláken s poměrem rozpouštědel 2:1 nebyl tento trend patrný a všechny nanovláknenné vrstvy byly hydrofobní (> 90°). Na druhou stranu nanovláknena obsahující extrakt s maximální koncentrací (300%) vykazují nižší hydrofobicitu a jsou srovnatelná s nanovláknem bez extraktu. To mohlo být způsobeno nehomogenitou morfologie nanovláken, která je patrná z obrázku 11B.

3.4.15 Antimikrobiální aktivita nanovláken obsahujících

koncentrované extrakty

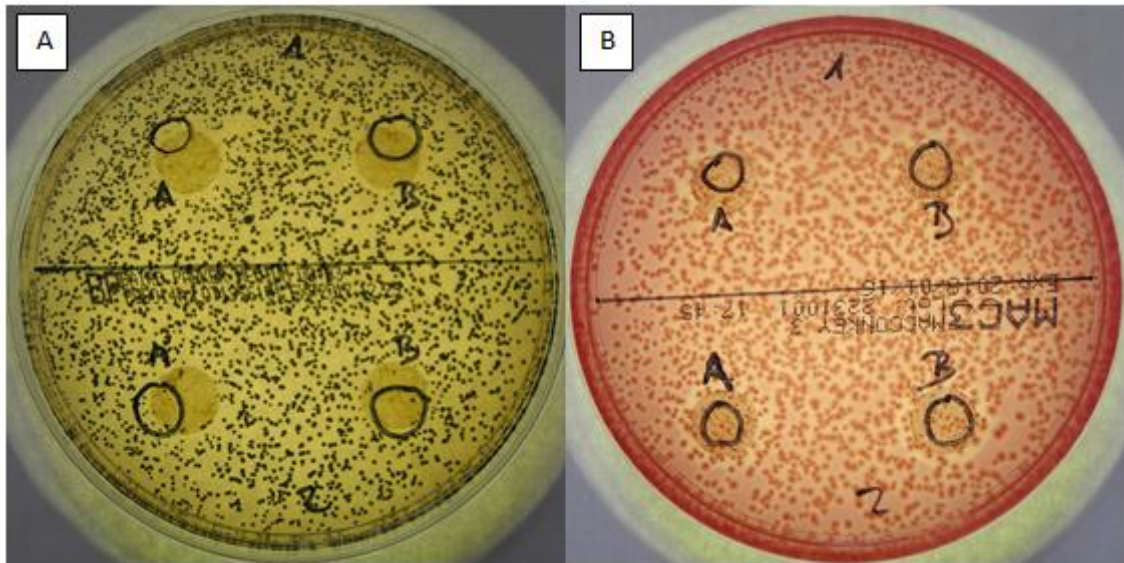
Nanovláknena s koncentrovanými extrakty, stejně jako v případě nanovláken s extrakty nižší koncentrace, byla vyšetřována na antibakteriální aktivitu difúzním testem na kmenech *S. gallinarum* a *E. coli*. Pro test byla použita dvě kolečka o průměru 1 cm pro každý kmen. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Antimikrobiální účinnost nanovláken z koncentrovaných extraktů

Vzorek	Redukce bakterií	
	<i>S. gallinarum</i>	<i>E. coli</i>
PCL v CF + 200% extraktu	částečně ANO (6)	NE
PCL v CF + 300% extraktu	ANO (inhibiční zóna 0,1 cm)	NE

ANO – redukce bakterií v přímém kontaktu; inhibiční zóna uvedená v závorce je měřena od hrany vzorku
 Částečně ANO – redukce bakterií v přímém kontaktu, číslo v závorce je počet kolonií, které rostly pod vzorkem

NE – žádná redukce bakterií



Obrázek 14: Redukce bakterií (A) *S. gallinarum* (B) *E. coli*. V horní polovině vždy duplikát vzorku s 300% extraktem, ve spodní polovině vždy duplikát vzorku s 200% extraktem.

Diskuze výsledků

Z tabulky č. 15 je patrné, že koncentrovanější extrakty mají pozitivní vliv na antimikrobiální účinnost při inkorporaci do nanovláken. Zatímco v kapitole 3.4.8 všechna nanovlákná měla negativní výsledek na inhibici růstu bakterií a nebyla tedy prokázána antimikrobiální účinnost těchto nanovláken, tak nanovlákná obsahující koncentrované extrakty vykazovala alespoň redukci u *S. gallinarum*, ať už částečnou (v přímém kontaktu) u 200% nebo úplnou s tvorbou mírné inhibiční zóny (0,1 cm) u 300% extraktu. Redukce bakterií a výsledek testů na antimikrobiální účinnost je znázorněn také na obrázku č. 14.

Už z výsledků v kapitole 3.4.2 a tabulky č. 3 je patrné, že methanolové extrakty z *thymus vulgaris* vykazují větší redukci bakterií *S. gallinarum* než *E. coli*. Z výsledků vyplývá, že maximální zvlákněná koncentrace extraktu není dostačující k inhibici *E. coli* alespoň v přímém kontaktu. Pro dosažení antibakteriální aktivity vůči *E. coli* by bylo vhodné další zvyšování koncentrace extraktu.

4 Závěr

Teoretická část této bakalářské práce poskytla úvod k medicínským aplikacím nanovláken v oblasti hojení ran a nanovláken s antibakteriálními vlastnostmi. Dále se také zabývala procesem elektrostatického zvláknění, vlastnostmi polymerních roztoků.

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo ověření možnosti vytvoření nanovláknenného substrátu obsahujícího přírodní extrakt ze zvolené byliny a vykazujícího antimikrobiální aktivitu, což se v průběhu této práce podařilo a tento substrát by mohl být použit jako krycí materiál pro hojení ran.

V průběhu práce byly připraveny extrakty rostlin, u kterých lze předpokládat antimikrobiální aktivitu. Připravené extrakty byly testovány na jejich antimikrobiální aktivitu s pozitivním výsledkem. Díky těmto testům bylo možné vybrat vhodný extrakt, se kterým se dále pracovalo. Poté byl zvolen rozpouštědlový systém umožňující elektrostatické zvláknění PCL, do kterého byl přimíchán připravený extrakt. Tento roztok byl úspěšně zvlákněn a výsledný produkt byl dále charakterizován.

Z hmotnostní spektrometrie byly určeny látky nejčastěji se vyskytující v suchém tymiánu, připravených extraktech i výsledných nanovlákních. U připravených extraktů byla potvrzena antibakteriální aktivita – a to zejména proti *S. gallinarum*. Antibakteriální účinnost těchto extraktů byla zachována i po zvláknění. U vzorků připravených elektrostatickým zvlákněním s PCL jako nosným polymerem byla potvrzena přítomnost vláken. Na DSC byl zjištěn vliv přítomnosti extraktu na teplotu tání připravených nanovláken. Vyšší koncentrace extraktu vedla k mírnému zvýšení teploty tání a plochy vrcholů. Měření povrchového napětí prokázalo, že přítomnost extraktu v nanovlákních také vede k jejich vyšší hydrofobicitě.

Nanovlákná s nejvyšší koncentrací extraktu vykazovala antibakteriální účinnost proti *S. gallinarum*, ale ne proti *E. coli*. Pro dosažení antibakteriální účinnosti i vůči *E. coli* by bylo vhodné ještě zvýšit koncentraci extraktu *thymus vulgaris* inkorporovaného do nanovláken. Pro dosažení lepší homogenity nanovláken by bylo vhodné upravit podmínky zvláknění (např. klimatické).

5 Použité zdroje

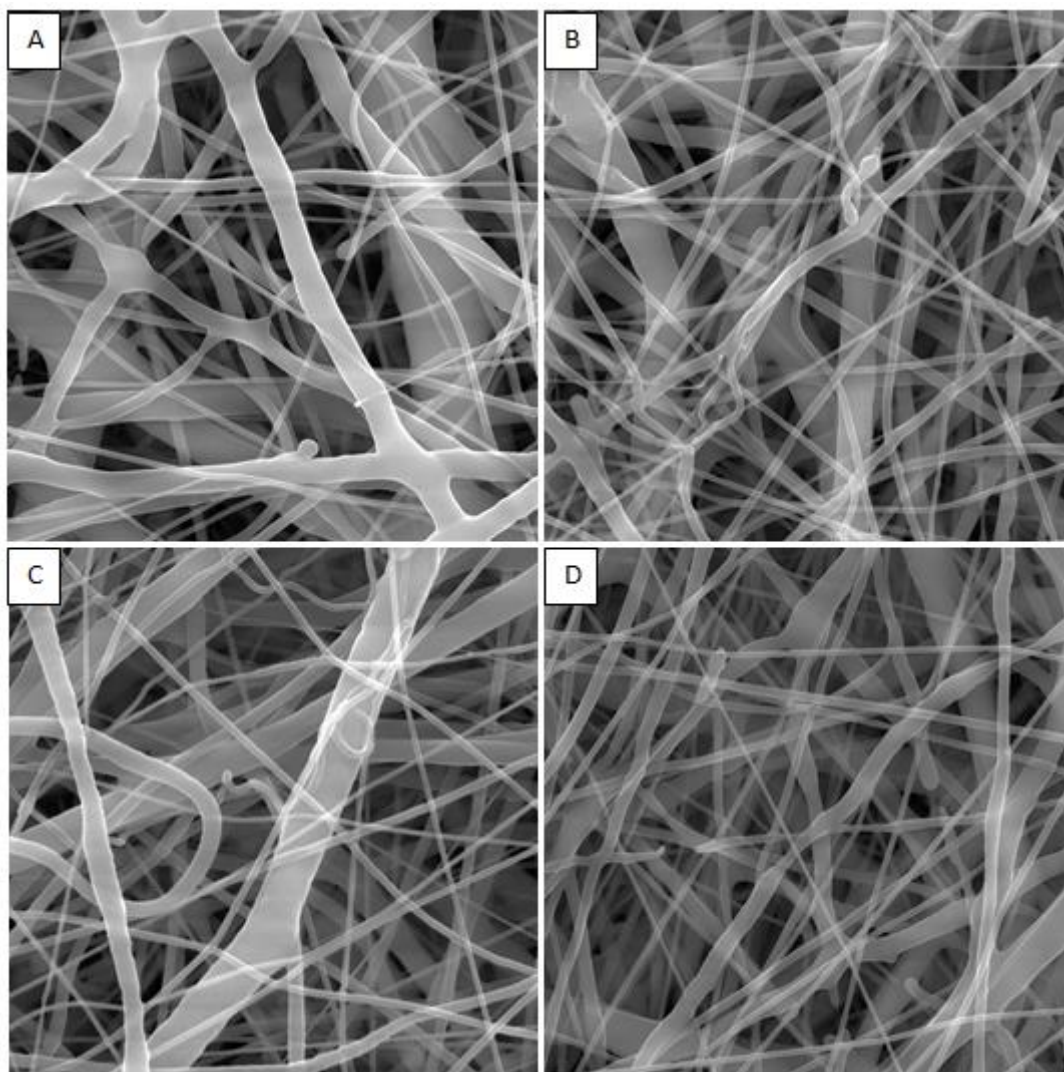
- [1] Arie Budovsky, Ludmila Yarmolinsky, a Shimon Ben-Shabat, „Effect of Medicinal Plants on Wound Healing: Effect of Medicinal Plants", *Wound Repair and Regeneration* 23, č. 2 (březen 2015): 171–83. Dostupné z: doi: 10.1111/wrr.12274.
- [2] Liu, Minghuan, Xiao-Peng Duan, Ye-Ming Li, Da-Peng Yang, a Yun-Ze Long. „Electrospun Nanofibers for Wound Healing". *Materials Science and Engineering: C* 76 (červenec 2017): 1413–23. Dostupné z: doi: 10.1016/j.msec.2017.03.034.
- [3] Robert Diegelmann F., „Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing", *Frontiers in Bioscience* 9, č. 1–3 (2004): 283. Dostupné z: doi: 10.2741/1184.
- [4] How Wounds Heal: The 4 Main Phases of Wound Healing [online]. Shield HealthCare; Valencie, Španělsko [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://www.shieldhealthcare.com/community/wound/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/>
- [5] Shah, Jayesh B. „The History of Wound Care". *The Journal of the American College of Certified Wound Specialists* 3, č. 3 (září 2011): 65–66. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jcws.2012.04.002.
- [6] Pospíšilová, Alena. Léčba chronických ran moderními krycími prostředky. *Praktické lékařství*. Dermatovenerologická klinika LF MU a FN Brno, 2010, 276 – 281. ISSN 1803-5329.
- [7] Le Y., Anand S. C., a Horrocks A. R. Recent developments in fibres and materials for wound management. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*. 1997, 22, 337-347. ISSN 0975-1025.
- [8] Wang, Ji, a Wilfred Vermerris. „Antimicrobial Nanomaterials Derived from Natural Products—A Review". *Materials* 9, č. 4 (30. březen 2016): 255. Dostupné z: doi: 10.3390/ma9040255.
- [9] Younes, Islem, a Marguerite Rinaudo. „Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications". *Marine Drugs* 13, č. 3 (2. březen 2015): 1133–74. Dostupné z: doi: 10.3390/md13031133.
- [10] Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, a M. Idaomar. „Biological Effects of Essential Oils – A Review". *Food and Chemical Toxicology* 46, č. 2 (únor 2008): 446–75. Dostupné z: doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [11] Balouiri, Mounyr, Moulay Sadiki, a Saad Koraichi Ibsouda. „Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review". *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, č. 2 (duben 2016): 71–79. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [12] Burt, Sara. „Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review". *International Journal of Food Microbiology* 94, č. 3 (srpen 2004): 223–53. Dostupné z DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

- [13] Zhang, Wanwei, Sara Ronca, a Elisa Mele. „Electrospun Nanofibres Containing Antimicrobial Plant Extracts". *Nanomaterials* 7, č. 2 (15. únor 2017): 42. Dostupné z: doi: 10.3390/nano7020042.
- [14] Hammer, K. A., C. F. Carson, a T. V. Riley. „Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts". *Journal of Applied Microbiology* 86, č. 6 (červen 1999): 985–90. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x.
- [15] Georgescu, Mihaela, Oana Marinas, Marcela Popa, Teodora Stan, Veronica Lazar, Serban Vifor Bertesteanu, a Mariana Carmen Chifiriuc. „Natural Compounds for Wound Healing". In *Worldwide Wound Healing - Innovation in Natural and Conventional Methods*, editoval Cesar Joao Vicente da Fonseca. InTech, 2016. Dostupné z: doi: 10.5772/65652.
- [16] Nada, A. M. A., A. I. El-Diwany, a A. M. Elshafei. „Infrared and antimicrobial studies on different lignins". *Acta Biotechnologica* 9, č. 3 (1989): 295–98. Dostupné z: doi: 10.1002/abio.370090322.
- [17] Unnithan, Afeesh Rajan, Gopalsamy Gnanasekaran, Yesupatham Sathishkumar, Yang Soo Lee, a Cheol Sang Kim. „Electrospun Antibacterial Polyurethane–cellulose Acetate–zein Composite Mats for Wound Dressing". *Carbohydrate Polymers* 102 (únor 2014): 884–92. Dostupné z: doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.070.
- [18] Kim, Jeong In, Hem Raj Pant, Hyun-Jaung Sim, Kang Min Lee, a Cheol Sang Kim. „Electrospun Propolis/Polyurethane Composite Nanofibers for Biomedical Applications". *Materials Science and Engineering: C* 44 (listopad 2014): 52–57. Dostupné z: doi: 10.1016/j.msec.2014.07.062.
- [19] Sutjarittangtham, Krit, Sirikarn Sanpa, Tawee Tunkasiri, Panuwan Chantawanakul, Uraivan Intatha, a Sukum Eitssayeam. „Bactericidal Effects of Propolis/Poly(lactic Acid) (PLA) Nanofibres Obtained via Electrospinning". *Journal of Apicultural Research* 53, č. 1 (leden 2014): 109–15. Dostupné z: doi: 10.3896/IBRA.1.53.1.11.
- [20] Bhardwaj, Nandana, a Subhas C. Kundu. „Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique". *Biotechnology Advances* 28, č. 3 (květen 2010): 325–47. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [21] Subbiah, Thandavamoorthy, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, a S. S. Ramkumar. „Electrospinning of Nanofibers". *Journal of Applied Polymer Science* 96, č. 2 (15. duben 2005): 557–69. Dostupné z: doi: 10.1002/app.21481.
- [22] Bartovská, Lidmila, a Marie Šišková. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-X
- [23] Pouchlý, Julius, a Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [24] Hansen, Charles M. *Hansen solubility parameters: a user's handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 9780849372483

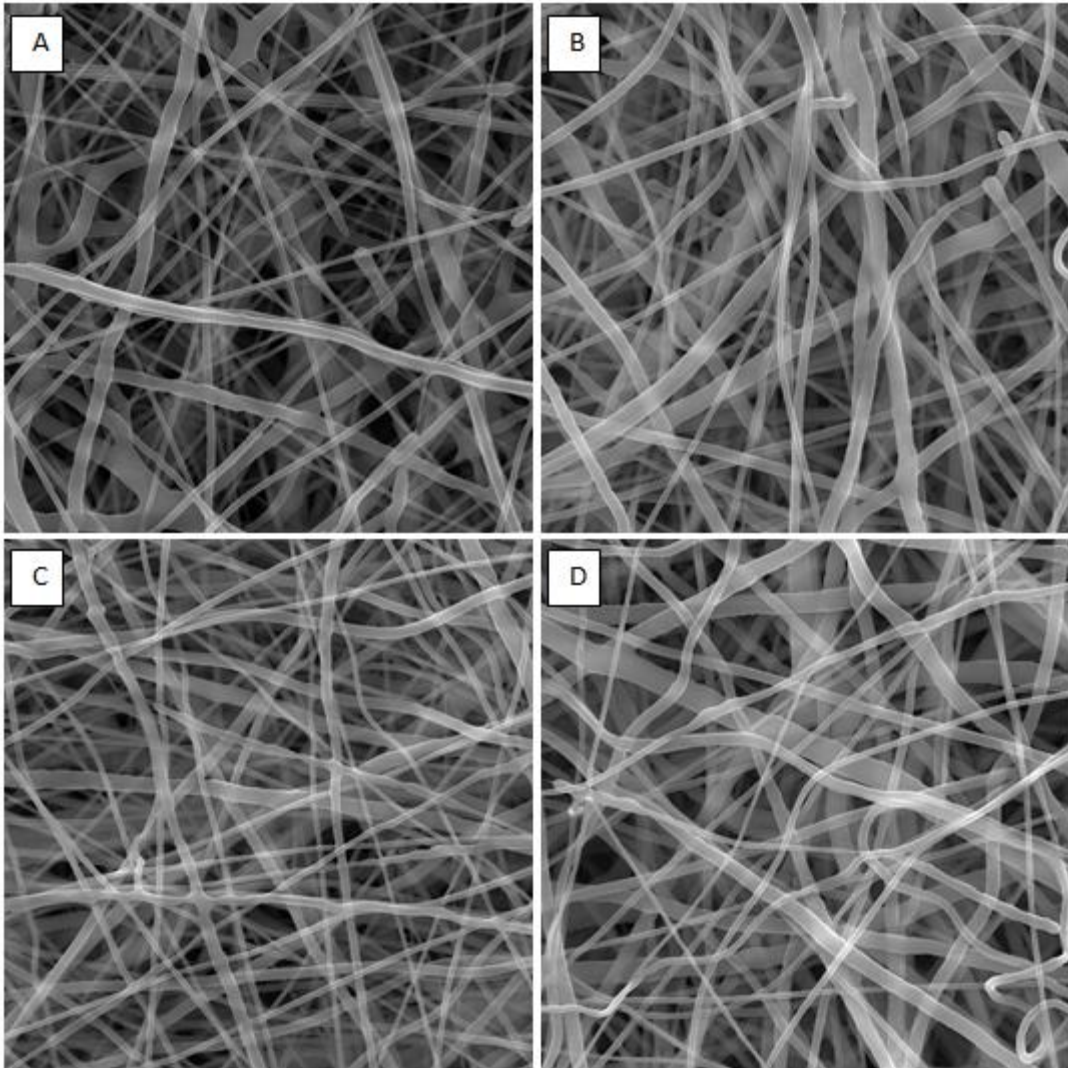
- [25] Nezarati, Roya M., Michelle B. Eifert, a Elizabeth Cosgriff-Hernandez. „Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology". *Tissue Engineering Part C: Methods* 19, č. 10 (říjen 2013): 810–19. Dostupné z: doi: 10.1089/ten.tec.2012.0671.
- [26] Ramakrishna, Seeram. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. Singapore; Hackensack, NJ: World Scientific, 2005. Dostupné z: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=244559>.
- [27] Qin, Xiaohong, a Dequn Wu. „Effect of Different Solvents on Poly(Caprolactone) (PCL) Electrospun Nonwoven Membranes". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 107, č. 3 (březen 2012): 1007–13. Dostupné z: doi: 10.1007/s10973-011-1640-4.
- [28] Cengiz-Çallioğlu, Funda, Oldrich Jirsak, a Mehmet Dayik. „Electric Current in Polymer Solution Jet and Spinnability in the Needleless Electrospinning Process". *Fibers and Polymers* 13, č. 10 (prosinec 2012): 1266–71. Dostupné z: doi: 10.1007/s12221-012-1266-6.
- [29] *Tescan Vega3 SBU Variable Pressure SEM* [online]. The Electron Microscopy Center; College of Arts & Sciences; University of South Carolina [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://www.emc.sc.edu/tescan-vega3-sbu-variable-pressure-sem>
- [30] MENCZEL, Joseph D., et al. Differential scanning calorimetry (DSC). *Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications*, 2009, 7-239.
- [31] Safaei-Ghomi, Javad, a AtefehAbbasi Ahd. „Antimicrobial and Antifungal Properties of the Essential Oil and Methanol Extracts of Eucalyptus Largiflorens and Eucalyptus Intertexta". *Pharmacognosy Magazine* 6, č. 23 (2010): 172. Dostupné z: doi: 10.4103/0973-1296.66930.
- [32] IMELOUANE, B., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int. J. Agric. Biol*, 2009, 11.2: 205-208.
- [33] *The Human Metabolome Database* [online]. Kanada. [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0001878>
- [34] *The Human Metabolome Database* [online]. Kanada. [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0035770>
- [35] *The Human Metabolome Database* [online]. Kanada. [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0034732>
- [36] *The Human Metabolome Database* [online]. Kanada. [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0036789>
- [37] *The Human Metabolome Database* [online]. Kanada. [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0038578>

Přílohová část

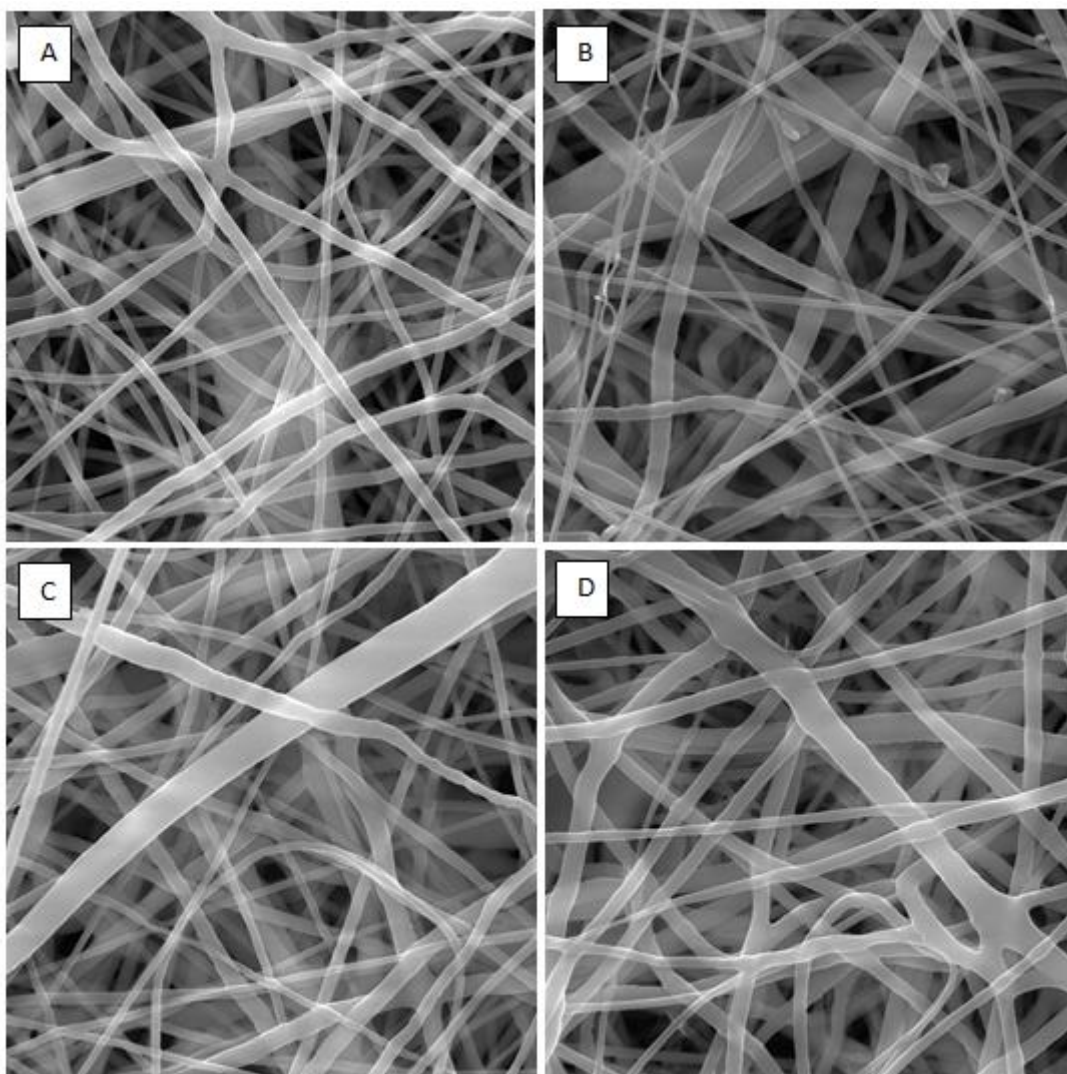
Příloha 1: Snímky nanovláken ze SEM



Obrázek p1: SEM snímky nanovláken s obsahem rozpouštědel v poměru 4:1 (CF:Extrakt), zvětšeno 5 000x. (A) 25% extrakt (B) 50% extrakt (C) 75% extrakt (D) 100% extrakt.



Obrázek p2: SEM snímky nanovláken s obsahem rozpouštědel v poměru 3:1 (CF:Extrakt), zvětšeno 5 000x. (A) 25% extrakt (B) 50% extrakt (C) 75% extrakt (D) 100% extrakt.



Obrázek p3: SEM snímky nanovláken s obsahem rozpouštědel v poměru 2:1 (CF:Extrakt), zvětšeno 5 000x. (A) 25% extrakt (B) 50% extrakt (C) 75% extrakt (D) 100% extrakt.

Příloha 2: Analýza hmotnostní spektrometrie

Tabulka p1: Porovnání výskytu thymoquinonu v jednotlivých vzorcích nanovláken.

Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Zastoupení
Chloroform	MeOH/extrakt		Thymoquinonu*
4	1	25	1,0
4	1	50	1,1
4	1	75	2,6
4	1	100	2,7
3	1	25	4,2
3	1	50	1,8
3	1	75	6,0
3	1	100	4,8
2	1	25	3,2
2	1	50	10,8
2	1	75	11,8
2	1	100	22,2
2	1	200	---
2	1	300	---

*Vyjádřeno jako násobek množství látky (plochy vrcholu) obsažené ve vzorku s nejnižší hodnotou (CF:MeOH 4:1, 25% extr.)

Tabulka p2: Porovnání výskytu carvacrolu v jednotlivých vzorcích nanovláken.

Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Zastoupení
Chloroform	MeOH/extrakt		Carvacrolu*
4	1	25	1,0
4	1	50	2,0
4	1	75	2,3
4	1	100	1,5
3	1	25	3,2
3	1	50	1,7
3	1	75	2,4
3	1	100	8,2
2	1	25	6,0
2	1	50	6,7
2	1	75	9,7
2	1	100	20,4
2	1	200	---
2	1	300	---

*Vyjádřeno jako násobek množství látky (plochy vrcholu) obsažené ve vzorku s nejnižší hodnotou (CF:MeOH 4:1, 25% extr.)

Tabulka p3: Porovnání výskytu caryophyllene oxidu v jednotlivých nanovláčkách.

Poměr rozpouštědel		Koncentrace extraktu [hm. %]	Zastoupení Caryophyllene oxidu*
Chloroform	MeOH/extrakt		
4	1	25	1,0
4	1	50	1,2
4	1	75	1,1
4	1	100	1,2
3	1	25	0,6
3	1	50	1,5
3	1	75	2,4
3	1	100	1,3
2	1	25	4,3
2	1	50	5,3
2	1	75	3,0
2	1	100	2,8
2	1	200	---
2	1	300	---

*Vyjádřeno jako násobek množství látky (plochy vrcholu) obsažené ve vzorku s nejnižší hodnotou (CF:MeOH 4:1, 25% extr.)