



FUNKCIONALIZACE KŘEMIČITÝCH NANOVLÁKEN PŘIRODNÍMI LÁTKAMI S BIOLOGICKOU AKTIVITOU

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály
Autor práce: **Bc. Michal Šeps**
Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.





THE FUNCTIONALIZATION OF SILICA NANOFIBERS WITH BIOLOGICALLY ACTIVE NATURAL SUBSTANCES

Diploma thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology

Study branch: 3942T002 – Nanomaterials

Author: **Bc. Michal Šeps**

Supervisor: doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michal Šeps**
Osobní číslo: **M13000243**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Funkcionalizace křemičitých nanovláken přírodními látkami s biologickou aktivitou**
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. Seznamte se se základními charakteristikami křemičitých nanovláken a způsobem jejich přípravy
2. Vypracujte řešení týkající možnosti funkcionalizace křemičitých nanovláken přírodními látkami s biologickou účinností
3. Optimalizujte silylaci křemičitých nanovláken za využití silylačního činidla (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) z hlediska doby, teploty, koncentrace
4. Nalezněte vhodnou metodu k určení koncentrace-NH₂ skupin na křemičitých nanovláčkách
5. Nalezněte podmínky pro navázání alespoň jedné látky s biologickou aktivitou, např. tanin - kyselina tříslová; quercetin; curcumin - turmeric; atd. a pokuste se prokázat in vitro biologickou účinnost
6. Výsledky shrňte a diskutujte

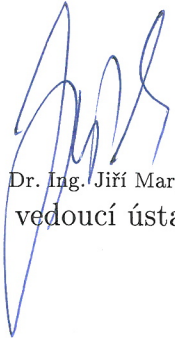
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **40 - 60 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

- [1] Patent US 2011/0274927 A1, Inorganic fiber structure and process for producing same
[2] Patent CZ303911, (2013), Nanovláknenná struktura s imobilizovaným organickým agens a způsob její výroby.
[3] Hermanson G T (2008), Bioconjugate Techniques, 2nd Edition, Silane Coupling Agents, pp. 562-579.
[4] Hagerman A E, The Tannin Handbook,
<http://users.miamioh.edu/hagermae/> - [online 6.10.2014]
[5] Ma Z et al, (2007), Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering, 60, 137-157

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Konzultant diplomové práce: **Ing. Daniela Lubasová, Ph.D.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Datum zadání diplomové práce: **20. října 2014**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2015**


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 20. října 2014

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou 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 diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou 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.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

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

Datum: 15. 5. 2015

Podpis:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. J. J.', written over a horizontal line.

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucí práce doc. Ing. Lence Martinové, CSc. za odborné vedení, užitečné rady a pomoc při řešení diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Dominiku Kadlečikovi za cenné rady a pomoc při řešení biologické části práce a paní Ing. Janě Müllerové, Ph.D. za pomoc se spektroskopickými analýzami. Závěrem bych velice rád poděkoval celé své rodině za podporu, bez které by tato práce nevznikla.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá modifikací povrchu křemičitých nanovláken s cílem imobilizace vybraných přírodních látek.

V teoretické části jsou shrnuty poznatky získané rešerší, zaměřenou na metody používané pro modifikaci povrchů materiálů na bázi oxidu křemičitého s důrazem na využití silylačních činidel s vhodnými funkčními skupinami. V další části rešerše jsou diskutovány možnosti využití přírodních látek a metody jejich imobilizace na povrch těchto materiálů.

Experimentální část se zabývá optimalizací silylační reakce s využitím 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES) jako derivatizačního činidla. Byl sledován vliv koncentrace silylačního činidla, času reakce a reakční teploty na výsledný výtěžek aminoskupin kovalentně navázaných na povrch křemičitých nanovláken. Byly optimalizovány dvě analytické metody sloužící ke kvantitativnímu stanovení aminoskupin na povrchu nanovláken. S ohledem na výtěžnost derivatizace za různých reakčních podmínek byl stanoven optimální postup pro modifikaci křemičitých nanovláken za použití APTES. Následně byly nalezeny podmínky pro imobilizaci kyseliny tříslové a chlorofylinu na povrch křemičitých nanovláken. U připravených materiálů s imobilizovanými přírodními látkami byly provedeny testy jejich antibakteriálního působení na grampozitivní i gramnegativní kmeny bakterií a jejich baktericidní účinky byly prokázány.

Klíčová slova

APTES, silylace, kyselina tříslová, tanin, chlorofyl, imobilizace, antibakteriální účinky, křemičitá nanovláčka,

Abstract

The diploma thesis deals with the surface modifications of silica nanofibers with the goal of obtaining the substrate for immobilization of natural substances. First of all, the thesis provides an overview of silica methods modifications with an emphasis on the use of silylation reagents with suitable functional groups. Secondly, the methods for modification of surfaces of materials based on silicon dioxide are also described. The thesis summarizes the results, which were obtained by the research focusing on the use of natural substances for modification of silica materials and different techniques of their immobilization.

Experimental part deals with the optimization of silanization with the use of 3-aminopropyltri-ethoxysilane as a derivatization agent. In addition, the effect of concentration silylation agent (APTES), reaction time and temperature on the final concentration of covalently bonded amine groups, were also observed. Moreover, the results, which were obtained during the silylation reaction in different conditions were used as an optimal conditions for the modification of silica nanofibers with APTES. There were also optimized two analytical methods for quantitative determination of concentration of amine groups on the surface of silica nanofibers. Finally, the conditions for the immobilization of tannic acid, chlorophylline on the surface of pre-modified silica nanofibers and verified antibacterial properties of these materials were also found.

Key words

APTES, silylation, tannic acid, tannin, chlorophyll, immobilization, antibacterial properties, silica nanofibers

Obsah

Úvod	10
1 Požadavky na obvazové materiály	11
1.1 Aplikace nanovláken v obvazových materiálech a jejich výhody	12
2 Elektrostatické zvlákňování (electrospinning)	14
3 Nanovláčna tvořená oxidem křemičitým	16
3.1 Výroba nanovláčenné struktury	17
4 Povrchová chemie materiálů na bázi oxidu křemičitého	20
4.1 Funkcionalizace křemičitých materiálů	21
4.1.1 Využití v analytické chemii	23
4.1.2 Využití při chemické syntéze	23
4.1.3 Využití v biochemii (imobilizace enzymů a přírodních látek)	23
4.1.4 Využití v průmyslových aplikacích	24
4.2 Chemické metody modifikace tenkých vrstev oxidu křemičitého	24
4.2.1 Metoda Sol-gel	25
4.2.2 Metody využívající vodných rozpouštědel	25
4.2.3 Metody využívající organických rozpouštědel	26
4.2.4 Samoseskupené monovrstvy (self-assembled monolayers (SAMs))	26
4.2.5 Vícekrokové metody	27
4.2.6 Metody modifikace z plynné fáze	28
5 Přírodní látky a jejich využití k modifikaci křemičitých materiálů	29
5.1 Možnosti imobilizace přírodních látek	30
5.1.1 Modifikace pomocí nevazebných interakcí (fyzisorbce)	30
5.1.2 Modifikace pomocí kovalentních vazeb	31
5.1.3 Modifikace využívající afinitní interakce	34
5.1.4 Enkapsulace molekul pomocí metody sol-gel	35
5.2 Taniny	36
5.2.1 Kondenzované taniny	36
5.2.2 Hydrolyzovatelné taniny	37
5.2.3 Vlastnosti taninů	38
5.2.4 Příklady využití taninů	38
5.2.5 Kyselina tříslová	39
5.3 Chlorofyl	41
6 Experimentální část	45
6.1 Použité materiály	45

6.2	Použité metody	46
6.2.1	Elektrostatické zvlákňování nanovláknenné vrstvy	46
6.2.2	Silylace křemičitých nanovláken 3-aminopropyltriethoxysilanem	47
6.2.3	Metody používané ke kvantitativnímu stanovení aminoskupin	48
6.2.4	Metody charakterizace křemičitých nanovláken	50
6.2.5	Imobilizace kyseliny tříslové.....	51
6.2.6	Stanovení relativní koncentrace kyseliny tříslové na povrchu SiO ₂ nanovláken.....	53
6.2.7	Imobilizace chlorofylinu.....	54
6.2.8	Mikrobiologické testy.....	54
7	Výsledky měření a diskuze.....	59
7.1	Morfologie křemičitých nanovláken.....	59
7.2	Specifický povrch nanovláknenné vrstvy tvořené oxidem křemičitým.....	62
7.3	Modifikace křemičitých nanovláken silylačním činidlem APTES.....	62
7.3.1	Vliv koncentrace silylačního činidla (APTES) na koncentraci navázaných aminoskupin	63
7.3.2	Vliv doby silylační reakce na koncentraci navázaných aminoskupin	65
7.3.3	Vliv teploty silylační reakce na koncentraci aminoskupin.....	67
7.3.4	Optimální podmínky silylační reakce.....	69
7.4	Fluorescenční stanovení koncentrace aminoskupin.....	69
7.5	Imobilizace kyseliny tříslové	70
7.6	Stanovení relativní koncentrace imobilizované kyseliny tříslové	72
7.7	Detekce imobilizované kyseliny tříslové infračervenou spektroskopií	73
7.8	Měření smáčivosti.....	Chyba! Záložka není definována.
7.9	Mikrobiologické testy	77
7.9.1	Kvalitativní stanovení antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou	77
7.9.2	Kvantitativní stanovení antibakteriálních účinků nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou	82
7.9.3	Kvalitativní stanovení antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovaným chlorofylinem.....	85
	Závěr.....	86
	Použitá literatura.....	87
	Příloha A – Výsledky kvalitativních testů antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou.....	92
	Příloha B - Výsledky kvantitativních testů antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou	95

Seznam použitých termínů a zkratek

ALE	atomová epitaxe
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
CVD	chemická depozice z plynné fáze
D	průměr vlákna
d	průměr polymerního řetězce
EtOH	ethanol
FITC	fluorescein isothiokyanát
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HHDP	kyselina hexahydroxydifenová
MO	methyloranž
MRSA	methicillin-rezistentní Staphylococcus aureus
M _s	počet funkčních skupin
PGG	1,2,3,4,6-pentagalloyl-β-glukóza
PVD	fyzikální depozice z plynné fáze
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAM	samoseskupené monovrstvy (self-assembled monolayers)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SiO ₂ -APTES	křemičitá nanovlákna po silylaci 3-aminopropyltriethoxysilanem
SiO ₂ -APTES-MO	křemičitá vlákna po reakci s methyloranží
SiO ₂ -APTES-TA	křemičitá nanovlákna po imobilizaci kyseliny tříslové
TEOS	tetraethoxysilan
TSB	tryptone soya broth (bujónový roztok)
VRSA	vankomycin-rezistentní Staphylococcus aureus

Úvod

Modifikace povrchů mnoha různých materiálů je v poslední době stále více zkoumanou oblastí, kde nanomateriály hrají významnou roli. Cílem těchto povrchových úprav je snaha o zlepšení či přizpůsobení vlastností materiálu tak, aby co nejlépe vyhovoval danému použití s tím, že si materiál ponechá své objemové vlastnosti. Využití těchto modifikací je velice široké a dotýká se téměř každého oboru, který využívá nejnovější materiály, tedy od automobilového průmyslu až po medicínu. Povrchové modifikace se tak v posledních letech staly jedním z nejvýznamnějších procesů při návrhu a vývoji nových materiálů a zařízení pro klíčové aplikace v mnoha odvětvích.

Materiály na bázi oxidu křemičitého jsou k těmto povrchovým modifikacím velmi často využívány v různých formách od objemových materiálů až po nanomateriály, jakými jsou nanosféry, nanokuličky či nanovlákná. Výhodou křemičitých materiálů je jejich univerzálnost, dobrá mechanická stabilita a relativně nízká cena. Křemičité nanomateriály jsou nejčastěji využívány jako nosiče pro účinné látky, enzymy apod., které nemají dostatečnou stabilitu a bez jejich imobilizace by bylo jejich použití velmi obtížné či nemožné.

Vzhledem k tomu, že celá řada syntetických látek používaných v medicíně či průmyslu má kromě požadovaných vlastností a účinků, které jsou nutné pro danou aplikaci, také mnoho vedlejších, nežádoucích účinků, je zde snaha o nahrazení těchto látek látkami přírodními, které jsou ve většině případů mnohem šetrnější ke svému okolí. V některých případech je dokonce nemožné syntetizovat látku s obdobnými účinky, a použití přírodní látky je tedy jedinou možností. Uplatnění látek jako jsou enzymy, léčivá agens, protilátky apod. je velice široké a zasahuje do mnoha odvětví od potravinářského průmyslu, přes membránové separační procesy až po medicínu.

1 Požadavky na obvazové materiály

Hlavní funkcí obvazových a krycích materiálů je poskytnutí optimálních podmínek pro hojení rány, zatímco ji chrání před dalším traumatem a invazí patogenů do postiženého místa. Zároveň by měly být propustné pro vlhkost a vzduch. Další důležitou vlastností je jejich atraumatické odstranění bez opětovného poškození místa zranění.

Při interakci biomateriálů („neživé materiály používané k výrobě zdravotnických zařízení, která jsou určena k interakci s biologickými systémy – *Consensus Conference of the European Society for Biomolecules 1986*) s buňkami či biologickým prostředím hostitele je jednou z klíčových vlastností materiálu interakce mezi materiálem a okolním prostředím. Tuto interakci ovlivňují povrchové vlastnosti biomateriálu. Dva hlavní požadavky pro použití materiálů v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně jsou biodegradabilita a bioaktivita. Této problematice je v posledních letech věnována velká pozornost, viz [1] [2] [3] [4] [5].

K interakci mezi biomateriálem a buňkami, respektive prostředím organismu (tělní tekutiny apod.), dochází díky vzniku specifické vazby mezi receptory buněk a odpovídajícími ligandy. Při kontaktu cizího materiálu s tělními tekutinami či buněčným médiem dochází nejprve k adsorpci proteinů na povrch biomateriálu a následně k interakci buněk s touto adsorbovanou vrstvou, která významně ovlivňuje buněčné chování [1].

Bylo vyvinuto mnoho metod sloužících k úpravě povrchu biomateriálu tak, aby nedocházelo k nepřírozeným buněčným interakcím. Tyto metody je možné rozdělit do dvou hlavních strategií [1]:

1. **Úpravy povrchových vlastností** – chemické složení, hydrofilita/hydrofobita, drsnost apod., které jsou modulovány tak, aby zůstala zachována přirozená bioaktivita [1].
2. **Přímá imobilizace** biomolekul na povrch materiálu s cílem indukovat požadovanou buněčnou odpověď [1].

Z těchto důvodů existuje velké množství různých typů obvazových a krycích materiálů, které jsou v současné době v medicíně používány.

1.1 Aplikace nanovláken v obvazových materiálech a jejich výhody

Existuje mnoho různých používaných definic termínu *nanovlákn*. Nanomateriály jsou technicky definovány jako materiály, jejichž rozměry jsou menší než sto nanometrů alespoň v jednom směru. Nanovlákn jsou tedy lineární útvary, které splňují toto tvrzení. Ovšem termín *nanovlákn* je velmi často používán pro všechna vlákna mající průměr menší než 1 μm , případně je někteří autoři označují jako ultra-jemná vlákna [6].

Nanovláknenné materiály vykazují celou řadu unikátních vlastností, které jsou spojeny s jejich rozměry, především malým průměrem a jsou vhodným materiálem pro mnoho aplikací jak v obvazových materiálech, tak ve tkáňovém inženýrství, ale také v elektronice, sanačních technologiích, textilních aplikacích a mnohých dalších aplikacích. Z těchto důvodů je na nanovlákn v posledních letech upírána stále větší pozornost [6].

Výhody nanovláknenných materiálů oproti běžně produkováným textilním materiálům pramení z jejich unikátních vlastností. Těmi jsou jejich výrazně větší specifický povrch, vysoká porozita, lepší mechanické vlastnosti (tuhost, napětí v tahu) a také flexibilita nanovláknenných materiálu k jejich povrchové modifikaci [6][7].

Stanovení počtu funkčních skupin (M_s), které jsou na povrchu nanovlákn, lze provést dle Rovnice 1:

$$M_s = 100 \frac{\pi d}{D} \quad (1)$$

Rovnice 1: Výpočet množství funkčních skupin na povrchu nanovlákn [6]

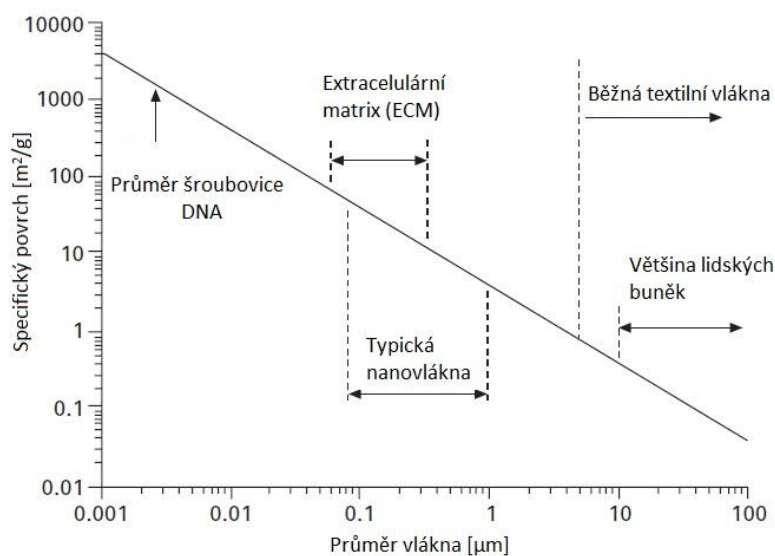
Kde d je průměr polymerního řetězce a D je průměr vlákn.

Z Rovnice 1 vyplývá, že počet funkčních skupin na povrchu vlákn roste s jejich klesajícím průměrem.

Velký specifický povrch nanovlákn přináší výrazně lepší vlastnosti nanovláknenných obvazových materiálů v porovnání s běžnými textiliemi, především:

- **Zlepšení hemostatických vlastností:** malá velikost pórů a velký měrný povrch nanovláknenných obvazových materiálů pomáhá zastavení krvácení [6].
- **Dobrá nasákavost:** vyšší specifický povrch dává těmto materiálům větší absorpční kapacitu, než mají běžné obvazové materiály, což je výhodou jak při zachycení exsudátu u secernujících ran, tak i k udržení optimální vlhkosti v okolí rány [6].

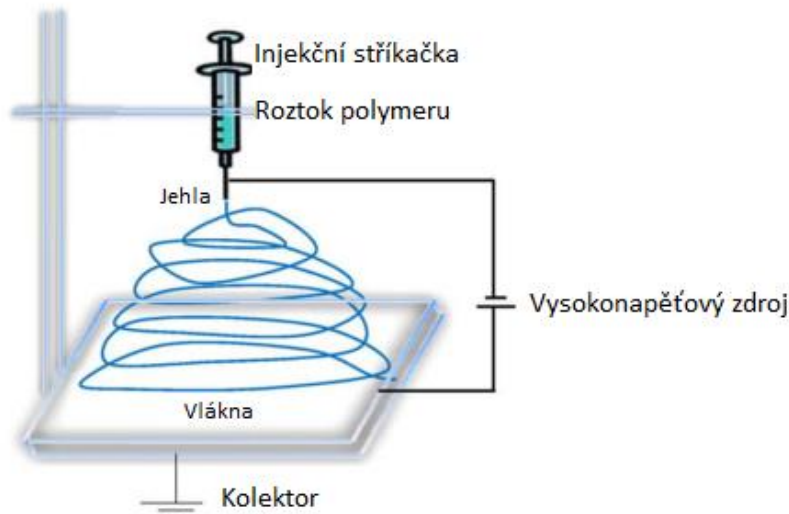
- **Polopropustnost (semi-permeabilita):** porézní struktura nanovláknenné textilie s póry o velikosti $< 1 \mu\text{m}$ je ideální pro respiraci buněk, která ale nesmí vést k vysušování rány. Malá velikost póru také efektivně brání vzniku bakteriální infekce [6].
- **Vynikající přizpůsobivost:** jemná nanovláknna mají výrazně lepší tvarovou přizpůsobivost než běžné textilní materiály, což umožňuje lepší krytí ran a jejich ochranu před případnou infekcí [6].
- **Efektivní a řízené dávkování léčiv (drug delivery):** umožněno velkým specifickým povrchem nanovláken a krátkou difuzní vzdáleností [6].



Obrázek 1: Závislost specifického povrchu různých vláknenných materiálů na průměru vlákna [6]

2 Elektrostatické zvlákňování (electrospinning)

Elektrostatické zvlákňování je univerzální a jednoduchý proces používaný k výrobě netkaných vláknenných materiálů (organických i anorganických) s průměrem vláken od několika desítek nanometrů až po mikrometry. První patent Antona Formhalse týkající se elektrostatického zvlákňování je již z roku 1934[8], avšak k velkému rozvoji této techniky došlo až v nedávné době [9][10]. Princip elektrostatického zvlákňování spočívá v aplikaci vysokého napětí (10 – 30 kV) mezi spinner a kolektor. Vysoké napětí působící na kapku polymerního roztoku, která vzniká na konci spinneru vytlačováním zásobního roztoku, indukuje elektrostatické odpuzování náboje kumulovaného v kapce roztoku polymeru. Jakmile síla elektrostatického odpuzování překoná povrchové napětí, dojde ke vzniku rychle se pohybující trysky polymeru směrem ke kolektoru. Vlivem prodlužování elektricky nabitě polymeru trysky a odpařování rozpouštědla při letu elektrickým polem dochází k tvorbě polymerních nanovláken a ke zmenšování jejich průměrů. Vzniklá nanovláknina jsou následně zachycena na kolektor, který je uzemněn. Kolektor může být vyroben z mnoha materiálů s libovolnou morfologií, ale musí být vodivý [6].



Obrázek 2: Jednoduché schéma vertikálního uspořádání elektrostatického zvlákňování [7]

Pomocí elektrostatického zvlákňování je v současné době možné připravit nanovláknenné materiály z několika set odlišných materiálů, a to jak organických, tak i anorganických a díky různým modifikacím aparatury je možné vyrobit nanovláknenné materiály (membrány, orientované nitě, multi-komponentní nanovláknina a mnohé další) s požadovanými vlastnostmi pro konkrétní aplikaci. Velkou výhodou elektrostatického

zvlákňování je také relativně malá finanční náročnost a schopnost produkovat nanovláknenné materiály v průmyslovém měřítku, což u mnohých technik výroby nanovláken možné není [6]. V nedávné době vzniklo několik společností zaměřujících se na průmyslovou výrobu nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování [11], přičemž výroba obvazových materiálů je jednou z hlavních potenciálních aplikací nanovláken. Elektrostatickým zvlákňováním je možné vyrobit vícefunkční nanovláknenné vrstvy, které mohou obsahovat různé terapeutické látky jako farmaceuticky účinné látky (antiseptika, antifungika), růstové faktory apod. [7].

Elektrostaticky vyrobená nanovláknna vykazují dva zásadní rozdíly oproti běžným obvazovým materiálům. První z nich je biomimetický efekt, nanovláknenné materiály se strukturně podobají extracelulární matrix. Nanovláknna tedy plní roli scaffoldu (nosiče), který podporuje a usnadňuje růst buněk a regeneraci nové tkáně v místě zranění. Druhý rozdíl je dán jejich velikostí, díky průměru v řádech desítek až stovek nanometrů mají nanovláknenné materiály mnohem větší povrch [7].

Materiály připravené pomocí electrospinningu je možné dále povrchově funkcionalizovat bioaktivními molekulami. Případně je možné inkorporovat účinné látky přímo do struktury vláken jejich zakomponováním do zvlákňovaného roztoku [7][12].

3 Nanovlákná tvořená oxidem křemičitým

V současné době se v medicínských či biotechnologických aplikacích ve většině případů aplikují organické látky – léčiva, enzymy, antibiotika, kortikoidy, analgetika, antifungika, dezinfekční látky apod. přímo *in situ* (v místě působení či biochemickém reaktoru). Při těchto aplikacích dochází velmi často ke ztrátám účinné látky z místa působení ať už vlivem vyplavování tělními tekutinami, nebo odplavováním krevním řečištěm do dalších částí organismu. To vede primárně k značnému předimenzování aplikované dávky s cílem dosáhnout požadované biologické odpovědi v místě aplikace či k opakované aplikaci organické látky. Průnik léčivých látek do dalších částí organismu, které nesouvisí s místem aplikace, je další nevýhodou, která je příčinou nežádoucích reakcí organismu, které mohou vést až k nemožnosti použití dané látky. V případě biochemických aplikací se již nepodaří organické látky z reaktoru izolovat a enzymy se dostávají do produktů, což je nežádoucí stejně tak jako rostoucí ekonomická nákladnost procesu (vlivem nutnosti aplikace nové dávky) [13][14][15].

Z těchto důvodů je snaha tyto účinné látky imobilizovat na vhodné nosiče (substráty) s cílem zamezit jejich ztrátám z místa aplikace či je zcela eliminovat. Pro praktické použití je nutná stabilita vazby mezi substrátem a účinnou látkou, zachování původní funkčnosti organické látky i po imobilizaci na daný nosič a dostatečná koncentrace účinné látky. V současnosti je studováno mnoho křemičitých nanomateriálů za účelem jejich medicínského využití v drug delivery systémech, kontrastních látkách pro diagnostické metody, ablativní terapii, scaffoldech pro tkáňové inženýrství, membránách pro separaci a dalších aplikacích. Anorganické materiály jsou často kritizovány, nebo dokonce odmítány pro jejich nízkou toleranci organismem. Studium křemičitých nanomateriálů ukázalo, že tyto materiály jsou velmi dobře tolerovány a v některých případech dokonce biodegradovány organismem. Důvody pro použití křemičitých nanomateriálů v biomedicínských aplikacích jsou především tyto:

- Prodloužení *in vivo* působení léčiv a účinných agens.
- Cílené dodání terapeuticky účinných látek do místa určení.
- Teranostické (kombinace terapie a diagnostiky) a multimodální aplikace nad rámec jednotlivých molekul.
- Vývoj nových terapií a diagnostických metod.

-
- Snížení ceny produktů.
 - Zkrácení doby léčení.

Tyto materiály je možné připravit dle požadavků konkrétní aplikace včetně požadované velikosti částic, pórů, porozity, krystalinity a tvaru. Další výhodou křemičitých materiálů jsou široké možnosti modifikace povrchu, které umožňují optimální navázání účinných molekul, krevní cirkulaci a možnost specifického cílení látek. Všechny tyto vlastnosti dělají tyto materiály velice žádanými pro mnohé biomedicínské aplikace. Jedním z potenciálně vhodných materiálů k imobilizaci účinných látek jsou nanovlákná a nanovláknenné struktury [14][15][16].

Tyto materiály mají velký specifický povrch, díky čemuž je možné dosáhnout požadovaných koncentrací účinných agens. Další výhodou je možnost vyrobit nejružnější nanovláknenné struktury dle požadavků konkrétní aplikace [13][14][15].

Jedním ze zkoumaných nanovláknenných materiálů jsou křemičitá nanovlákná, která jsou vysoce stabilní při biochemických reakcích a lze řídit dobu jejich degradace pomocí tepelného zpracování, jsou rozpustné v tělních tekutinách (nanovlákná jsou rozpuštěna na kyselinu křemičitou, která je vyloučena močí během 1 – 2 týdnů), mají vynikající smáčivost a jsou především netoxická. Navíc křemičitá nanovlákná obsahují na svém povrchu velké množství hydroxylových skupin (Si–OH), které lze využít pro jejich modifikaci a navázání účinných látek [1][13][14][15][1][17].

Jednou z možných modifikací přípravy křemičitých nanovláken je inkorporace kovových částic do jejich struktury. Tyto materiály jsou vyvíjeny s cílem připravit novou generaci katalyzátorů, která díky nanovláknenné struktuře má velký specifický povrch a nízkou hmotnost v porovnání s běžně používanými katalyzátory. Této problematice se věnuje několik výzkumných skupin (viz [18][19]). Další příklady využití křemičitých nanovláken a jejich kompozitů s polymery jsou uvedeny v [16][20][21][22][23][24].

3.1 Výroba nanovláknenné struktury

Výroba nanovláknenného materiálů tvořeného vlákny oxidu křemičitého spočívá v několika krocích:

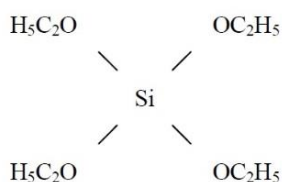
Příprava výchozího solu – pomocí metody sol-gel z tetraalkoxysilanu (tetraethoxyorthosilikátu) [13][16]

3.1.1.1 Metoda sol – gel

Metoda sol-gel je nejvíce studovanou, a tedy také zdokumentovanou technikou k přípravě křemičitých materiálů. Tuto metodu a její modifikace je možné využít pro přípravu křemičitých gelů, ale také k syntéze keramických materiálů od tenkých filmů a povlaků přes porézní nanovláknenné membrány až po kompozitní materiály [25].

Velké možnosti ve využití této metody jsou spojeny s její schopností vytvářet čisté a homogenní produkty při nízkých reakčních teplotách. Metoda sol-gel je „mokrou“ chemickou metodou, která zahrnuje hydrolyzu a kondenzaci alkoxidů kovů a anorganických solí. Detailní informace o této metodě jsou uvedeny v několika publikacích [25][26][27].

Principem procesu sol-gel je řízená kondenzace jednotek $\text{Si}(\text{OH})_4$, které mohou být vytvořeny hydrolyzou alkoxyilanů nebo křemičitanů alkalických kovů. Běžně používanými sloučeninami jsou sodné silikáty či tetraethylorthosilikát (TEOS). V obou případech jsou reakce řízeny pomocí specifických parametrů (pH, koncentrace).



Obrázek 3: Chemická struktura tetraethylorthosilikátu (TEOS)

Celý proces je tvořen:

1. **Hydrolyzou alkoxyilanů** – obecný vzorec (SiOR), kde R je nejčastěji methyl či ethyl. Hydrolyza a kondenzace probíhají současně, přičemž relativní rychlosti obou reakcí jsou dány strukturou solu [25].
2. **Gelací** – dochází k přeměně solu na gel vlivem polymerizace. Rychlost gelace ovlivňuje výslednou velikost pórů v materiálu [25].
3. **Sušením** – získaný hydrogel je přeměněn na xerogel [25].
4. **Stabilizací** – poslední krok přípravy křemičitých materiálů se provádí pomocí tepelného zpracování, kdy dochází k dehydrogenaci a dehydroxylaci vzniklého gelu a případně k jeho slinutí a zhutnění v případě objemových materiálů [25].

Dalšími výhodami této metody jsou:

- lepší homogenita výsledného materiálu,

-
- nižší procesní teplota,
 - možnost přípravy nových krystalických fází a speciálních produktů (filmů apod.),
 - možnost další modifikace materiálu s využitím hydroxylových skupin na povrchu.

Nevýhodou je:

- vyšší cena vstupních surovin,
- velké smršťování materiálů během výroby,
- zdravotní rizika spojená s používáním organických rozpouštědel či prodloužení doby výroby.

Materiály vyrobené touto metodou mohou být ve formě filmů, vláken, monolitů, prášků, kompozitů nebo porézních médií. Nejúspěšnějšími aplikacemi těchto materiálů jsou ty, které využívají přednosti procesu sol – gel, především jeho čistotu, homogenitu a řízenou porozitu vzniklých materiálů [25].

Elektrostatické zvlákňování solu (postup viz výše), který musí mít odpovídající viskozitu, aby nedocházelo ke sprejování (electrosprayingu) a nehomogenitám v materiálu. Výslednou strukturu ovlivňuje viskozita zvlákňovaného solu, aplikované napětí, vzdálenost mezi spinnerem a kolektorem a rychlost toku polymeru [13][16].

Finálním krokem procesu je **tepelné zpracování nanovláknenné struktury**. Výsledkem celého procesu je nanovláknenná struktura tvořená křemičitými nanovláknami s Si-OH skupinami na povrchu, které lze dále využít pro imobilizaci účinných látek. Takto připravená křemičitá nanovláknna mají průměr od 150 nm do 600 nm a velký měrný povrch ($1 - 10 \text{ m}^2/\text{g}$). Výsledné vlastnosti křemičitých nanovláken lze významně ovlivnit pomocí dodatečné tepelné úpravy. S rostoucí teplotou tepelného zpracování klesá počet hydroxylových skupin na povrchu nanovláken a klesá jejich rozpustnost, zatímco morfologie zůstává zachována až do teplot kolem $850 \text{ }^\circ\text{C}$. Proto je nutné optimalizovat teplotu tak, aby zůstal zachován dostatečný počet hydroxylových skupin spolu s dostatečnou rozpustností vzhledem k prokázané karcinogenitě úlomků při dlouhodobém kontaktu (déle než 40 dní) [13].

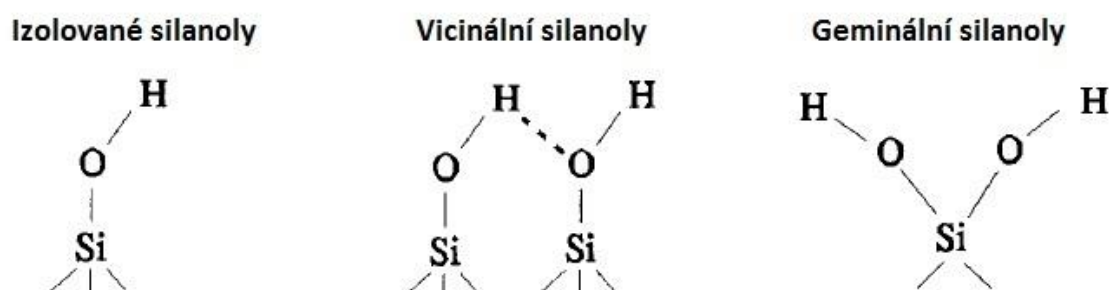
Nanovláknna stabilizovaná při nízkých teplotách (do $180 \text{ }^\circ\text{C}$) jsou zcela rozpuštěna během sedmi dní, lze je tedy považovat za bezpečná pro manipulaci s nimi i pro případné vdechnutí. S rostoucími teplotami však rozpustnost křemičitých nanovláken klesá, pak je lze považovat za potenciálně karcinogenní a podle toho je nutné s nimi i nakládat [13].

4 Povrchová chemie materiálů na bázi oxidu křemičitého

Povrchová funkcionalizace se v posledních letech stala jednou z nejdůležitějších oblastí pro návrh a vývoj mnoha nových materiálů, zařízení a systémů pro klíčové technologie v biomedicíně, biotechnologii a environmentálních aplikacích. Povrch materiálů významně ovlivňuje celkové vlastnosti, které jsou nutné pro konkrétní aplikace materiálu a poskytuje jedinečnou možnost k řízení interakcí a reakcí s materiálem. Úprava povrchu materiálu je možností, jak odstranit některé nežádoucí vlastnosti původního materiálu se zachováním jeho objemových vlastností. V současné době je komerčně dostupné velké množství povrchově funkcionalizovaných materiálů a jejich použití v technických oblastech je takřka neomezené [28].

Křemičité částice tvořené oxidem křemičitým (SiO_2) lze považovat za polymery kyseliny křemičité tvořené z navzájem propojených čtyřstěnů SiO_4 . Povrch materiálu může být zakončen siloxanovými skupinami (Si-O-Si) s atomem kyslíku na povrchu nebo jednou z několika forem silanolových skupin (Si-OH) [25].

Silylalkoholy lze rozdělit na *izolované* (volné), kdy povrchový atom křemíku má tři vazby s objemovou strukturou materiálu a čtvrtá vazba je spojena s hydroxylovou skupinou. Dalším typem jsou *vicinální* (můstkové) silylalkoholy, kde dvě hydroxylové skupiny navázané k dvěma různými atomům jsou dostatečně blízko a dochází ke vzniku vodíkové vazby mezi nimi. Posledním typem jsou *geminální* silanoly, kde jsou dvě hydroxylové skupiny navázány ke stejnému atomu Si (příliš blízko pro vytvoření vodíkové můstku) [25].



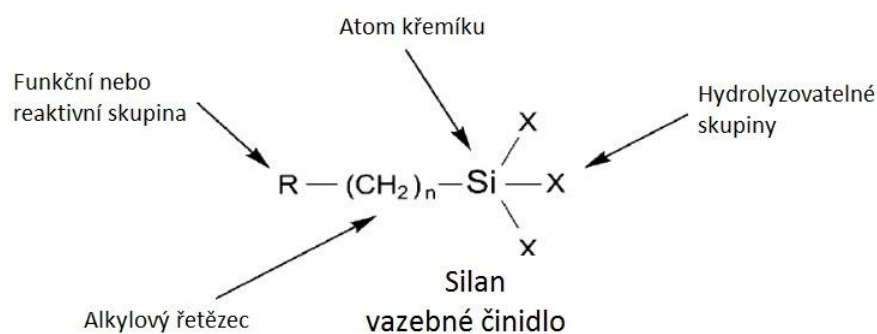
Obrázek 4: Typy silanolových skupin zleva: izolované, vicinální a geminální silanoly [25]

4.1 Funkcionalizace křemičitých materiálů

V posledních několika dekádách je věnováno značné úsilí chemické modifikaci povrchů nejrůznějších materiálů, což vede k velkému nárůstu aplikací v laboratorním či průmyslovém měřítku. Modifikace povrchů na bázi oxidu křemičitého jsou široce využívány v mnoha odvětvích: analytické chemii (zaměřuje se především na imobilizaci např. kovových komplexů pro katalyzátory), separaci kapalin a plynů, katalýze, bioinženýrských aplikacích (imobilizace enzymů a léčivých látek), elektronice atd [29]. Ve většině případů jsou křemičité materiály využívány jako substráty či nosiče pro účinné látky. Přehled využití křemičitých materiálů shrnul Mottola [30].

Chemická modifikace vyžaduje zdánlivě paradoxní požadavky na křemičitý materiál. Nosič by měl být hydrofilní, ale zároveň nerozpustný ve vodných a polárních rozpouštědlech, dále mechanicky a chemicky stabilní, ale zároveň snadno modifikovatelný [25].

Nejvhodnějšími chemickými sloučeninami k modifikaci povrchů křemičitých materiálů se zdají být organofunkční silany. Silany jsou monomerní molekuly tvořeny křemíkem jako centrálním atomem a čtyřmi konstituenty, které obsahují alespoň jednu vazbu Si–C (Obrázek 5). Jejich výhoda oproti podobným organickým sloučeninám je schopnost vytvářet vazby s povrchem oxidu křemičitého pomocí několika různých mechanismů. V reakcích se silylalkoholy se mohou potenciálně vyskytovat elektrostatické síly (Van der Waalsovy síly), vodíkové a kovalentní vazby. Unikátní kombinace těchto sil v jediné molekule silylalkoholu jim dává možnost soupeřit s molekulami vody o hydroxylové skupiny na povrchu křemičitých materiálů. Přehled nejčastěji používaných silanů k modifikaci křemičitých materiálů je uveden [25].

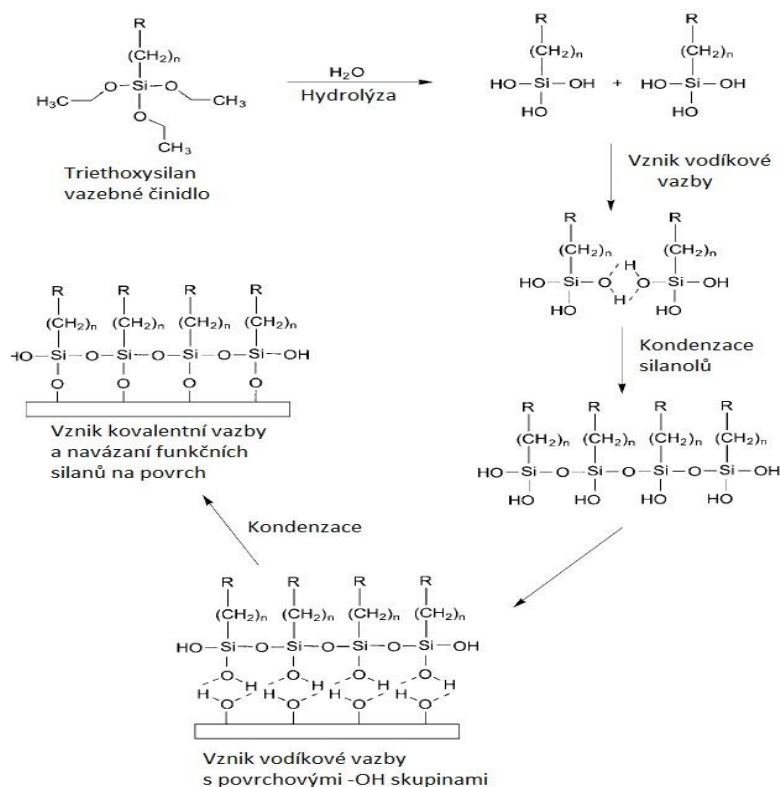


Obrázek 5: Struktura funkčního silanu, která je na konci alkylového řetězce připojeného k atomu Si

Reakce silanu s anorganickým substrátem je zobrazena na Obrázek 6. Nejprve probíhá hydrolyza a vzniká reaktivní intermediát, který následně reaguje se substrátem. Hydrolyzou alkoxyasilanů vzniká vysoce reaktivní silanol pro reakci s povrchovými hydroxylovými skupinami. Následně dochází ke kondenzaci silanu v blízkosti povrchu substrátu a k vytvoření polymerní sítě, která je tvořená vazbami Si-O-Si. Tato vznikající polymerní síť interaguje se substrátem pomocí vodíkových vazeb s hydroxyly [31].

V případě, že kondenzace probíhá za zvýšené teploty nebo reakcí z plynné za vakua, dojde ke vzniku kovalentních vazeb mezi organosilany a povrchem, které jsou tvořeny siloxanovými můstky. Tloušťka takto připravených vrstev je závislá na koncentraci silylačního činidla a množství vody přítomné v roztoku [31].

Z těchto důvodů je častější použití alkoxyasilanů, kdy dochází ke spojení každého alkoxyasilanu se substrátem za vzniku siloxanové vazby. Navíc jsou alkoxyasilany mnohem stabilnější než organosilany, které spontánně tvoří vodíkové vazby a spojují se již v roztoku. V současné době existuje velké množství komerčně dostupných alkoxyasilanů, které ve své struktuře obsahují funkční nebo reaktivní skupiny využitelné ke kovalentnímu navázání biomolekul (proteinů, oligonukleotidů, protilátek atd.) nebo jiných chemických sloučenin s vhodnými funkčními skupinami k anorganickému substrátu[31].



Obrázek 6: Schéma reakce tetraethoxysilanu (TEOS) s hydroxylovými skupinami na povrchu SiO₂ nanovláken [31]

4.1.1 Využití v analytické chemii

Modifikace křemičitých materiálů se v analytické chemii provádí především za účelem dosažení selektivní adsorpce plynů, kapalin a iontů kovů křemičitém materiálem. Modifikované křemičité materiály jsou široce využívány v mnoha typech chromatografií (vysoce účinné kapalinové, iontově výměnné, vylučovací, plynové). Další využití modifikovaného SiO₂ je při analýzách stopového množství kovů (především ve vodných systémech) – modifikace SiO₂ chelatačními skupinami. Materiály s navázanými chelátačními skupinami na anorganické substráty mají hned několik výhod oproti funkčním polymerům – především větší mechanickou pevnost, což umožňuje vyšší průtok přes membránu. Další výhody jsou: lokalizace funkčních skupin pouze na povrchu materiálu (tzn. lokální koncentrace reaktantů), vyšší rychlost chelatační reakce (tzn. proces není limitován difuzí) a nižší cena anorganických materiálů [25].

4.1.2 Využití při chemické syntéze

Většina aplikací v chemické syntéze je založena na vícekrokové modifikaci křemičitých materiálů, při které je depozice samotného silanu (často aminosilanu) doprovázena následnou modifikací molekulami s potřebným reakčním centrem. Jednou z mnoha aplikací jsou heterogenní katalyzátory – jedná se o tzv. třetí generaci katalyzátorů, kdy jsou na předem modifikovaný povrch SiO₂ imobilizovány komplexní ionty kovů. Tyto systémy v sobě kombinují výhody aktivity a selektivity homogenních katalyzátorů s jednoduchou separací heterogenní katalýzy. Dalšími výhodami anorganických nosičů pro průmyslové aplikace jsou mechanická stabilita a netečnost vůči většině rozpouštědel [25].

4.1.3 Využití v biochemii (imobilizace enzymů a přírodních látek)

Enzymy jsou ve svém přirozeném stavu velmi citlivé na výkyvy teplot, organické látky a změny pH [32]. Všechny tyto faktory vedou k jejich nestabilitě a následně ztrátě aktivity (dochází k denaturaci enzymů). K odstranění těchto problémů bylo vyzkoušeno mnoho metod a jako nejúspěšnější se zdá být imobilizace enzymů na pevné substráty. Imobilizace enzymů přináší kromě zvýšené stability izolovaných enzymů také snadnější manipulaci, větší specifickou jejich funkce a snadnější předvídatelnost jejich aktivity. Výhody křemičitých materiálů, speciálně pak křemičitých nanovláčkových membrán, jsou: velký specifický povrch, tepelná a mechanická stabilita a odolnost vůči kyselému prostředí [25].

Stejně jako u většiny chemických aplikací také modifikace křemičitých materiálů v biochemii vyžaduje vícezkrové modifikace. Nejčastěji je materiál tvořený SiO₂ modifikován za pomoci jednoduchého silanu, např. 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES). Následně je na takto modifikovaný povrch, který obsahuje aminoskupiny, zavedena molekula spaceru, která tvoří spojnici mezi aktivní skupinou na povrchu křemičitého substrátu a imobilizovanou molekulou. Použití spaceru se provádí především za účelem minimalizace sterických zábran pro koncovou reakci a zachování aktivity imobilizované látky. Přehled nejčastěji používaných spacerů je uveden v [25].

Scouten a kol. [33] popsali kritéria, která musí být uvažována při imobilizaci enzymů a přírodních látek. Těmi jsou: úroveň modifikace (aktivace – maximální neznamena optimální), pevnost vazby mezi imobilizovanou látkou a substrátem a optimální doba působení. Aminové skupiny jsou nejčastěji využívány pro navázání enzymů a přírodních látek na povrch křemičitých materiálů.

4.1.4 Využití v průmyslových aplikacích

V průmyslových aplikacích je modifikovaný SiO₂ využíván především k výrobě pokročilých povlaků a také jako plnivo (vlákna, kuličky, prášky apod.) pro nové typy kompozitních materiálů. Chemie k modifikaci těchto materiálů je stejná jako u ostatních křemičitých materiálů viz níže.

4.2 Chemické metody modifikace tenkých vrstev oxidu křemičitého

Tenké vrstvy a monomolekulární filmy oxidu křemičitého jsou využívány pro výrobu high-tech materiálů s novými vlastnostmi – jedná se o materiály pro elektroniku, medicínu, chemické senzory apod. Povrchová chemie těchto vrstev je obdobná s reakcemi využívanými k modifikacím práškové formy SiO₂, avšak některé vrstvy se mohou lišit, a to například absencí pórů [25] [34].

Možnosti modifikace tenkých vrstev ovlivňují dvě kritéria:

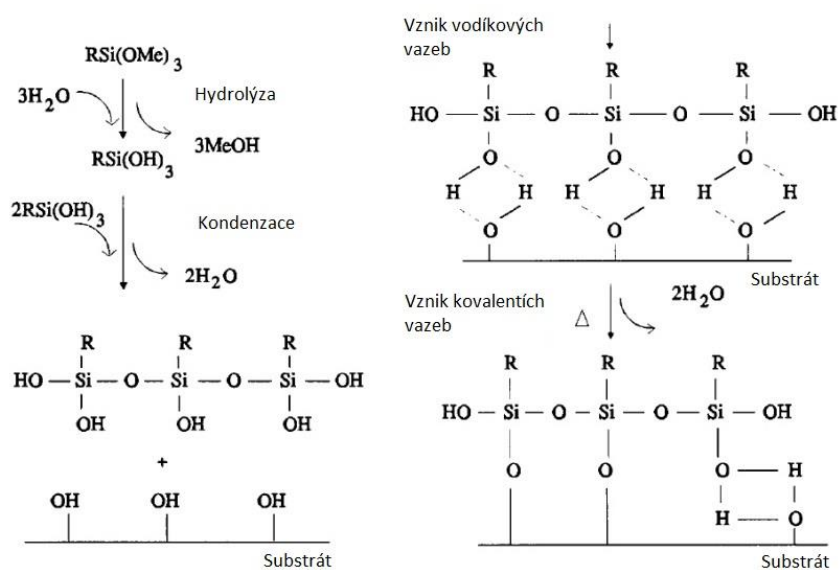
1. **Požadavky na výslednou morfologii povrchu** – tloušťka vrstvy (mono- nebo multi-vrstva), hustotu modifikace (počet molekul na nanometr čtvereční), orientaci molekul, typ interakce mezi vrstvou a povrchem (fyzisorpce, chemisorpce).
2. **Zamýšlené použití** – laboratorní nebo průmyslová.

4.2.1 Metoda Sol-gel

Inkorporaci funkčních skupin na povrch materiálu tvořeného oxidem křemičitým je možné provést již při jeho výrobě přidáním organofunkčních alkoxy-silanů k roztoku tetraethylorthosilikátu (TEOS). Výsledkem je funkcionalizovaný silikagel. Nevýhodou této techniky je nemožnost důsledné kontroly morfologie povrchu (jedinou proměnou je relativní množství TEOSu a silanu). Technologie sol-gel je využívána k přípravě oxidických nebo organofunkčních siloxanových vrstev na nosné materiály. Vzhledem k tomu, že základní schéma metody sol-gel umožňuje výrobu tenkých vrstev pouze na symetrické materiály, bylo vyvinuto několik modifikací spojujících metodu sol-gel se sprejováním, ultrazvukem, elektroforézou, termoforézou či elektrostatickým zvlákňováním [25] [35] [36].

4.2.2 Metody využívající vodných rozpouštědel

Příprava organofunkčních křemičitých vrstev je v průmyslovém měřítku založena na reakcích v kapalně fázi. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je voda a její směs s ethanolem nebo acetonem. Pro tento typ reakcí jsou využívány především chlorsilany a alkoxy-silany. Malé množství vody ve směsi s organickým rozpouštědlem zajišťuje hydrolyzu alkoxy skupin a formování reaktivních silanolů. Ve vodných roztocích silany podléhají hydrolyze a kondenzaci před vlastní deposicí na povrch (Obrázek 7). Ke kontaktu substrátu se silylačním roztokem může dojít pomocí namáčení, zvlákňování nebo sprejování připraveného roztoku [25] [31].

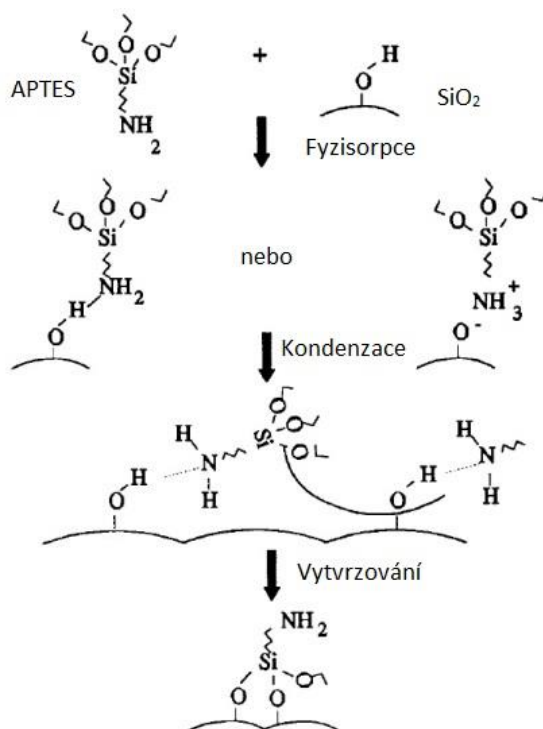


Obrázek 7: Mechanismus deposice silanu z roztoků vodných rozpouštědel [25]

4.2.3 Metody využívající organických rozpouštědel

V případě, že je modifikace chlorsilany či alkoxysilany prováděna v bezvodém prostředí (organická rozpouštědla), hydrolyza nenastává. Vzniklá chemická vazba mezi substrátem by měla být výsledkem přímé kondenzace chloro- či alkoxy-silanových skupin a povrchem silanolů. Provedené experimenty však ukázaly, že k přímé kondenzaci nejspíše nedochází (viz [37]). Alkoxysilany se mohou navázat na povrch SiO_2 pouze za přítomnosti vodního rozhraní na povrchu SiO_2 (adsorbovaná voda na povrchu), adsorbované molekuly silanů jsou hydrolyzovány před reakcí s povrchem, avšak hydrolyza způsobuje také polymerizaci, je tedy obtížné takto připravit pouze monovrstvy [25] [31].

Jiná cesta k přímé kondenzaci je za použití amoniaku jako katalyzátoru, případně za použití aminosilanů, které již obsahují aminovou skupinu ve své struktuře. Reakce aminosilanů s SiO_2 v bezvodém prostředí je tedy autokatalytická [25] [31].

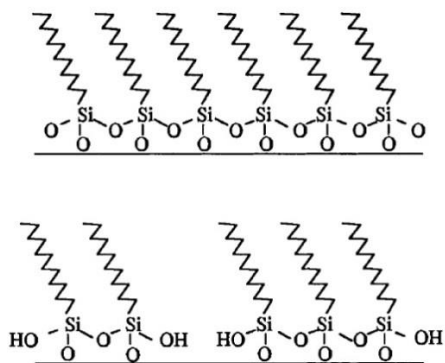


Obrázek 8: Reakční mechanismus 3-aminopropyltriethoxysilanu s povrchem SiO_2 v bezvodém prostředí [25]

4.2.4 Samoseskupené monovrstvy (self-assembled monolayers (SAMs))

Samoseskupené monovrstvy (SAM) představují speciální typ kapalných adsorpčních procesů. Tato technologie je rozšířením přípravy filmů technologií Langmuir-Blodgett. Principem této metody je depozice vysoce uspořádaných polárních molekul na vhodné substráty. Polární molekuly jsou nejprve uspořádány na vodní hladině díky svým

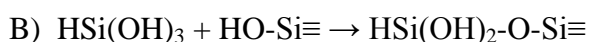
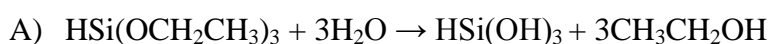
hydrofobním vlastnostem a následně přeneseny na substrát ponořením do vodného roztoku. Výhodou této metody je výborná kontrola polymerizace a příprava přesně definovaných monovrstev s velmi hustě pokrytým povrchem alkylovými řetězci bez ohledu na počet hydroxylových skupin. Rozdíl mezi SAM a konvenční polymerní vrstvou ukazuje Obrázek 9 [25].



Obrázek 9: Srovnání samoseskupené monovrstvy (nahore) a konvenčně připravené polymerní vrstvy (dole) [25]

4.2.5 Vícekrokové metody

Alternativní metodu k modifikaci pomocí alkylsilanů je využití hydridového intermediátu, kterou vyvinuli Sandoval a Pešek [30]. Principem této metody je nahrazení jednokrokové alkylsilanové modifikace dvoukrokovým silanizačně-alkylačním procesem. Přes ztrátu jednoduchosti přináší tato metoda několik výhod – hustější obsazení povrchu modifikovanými molekulami (odstranění sférických zábran silylační reakce použitím nejmenších možných molekul – triethoxy silanu) a zvýšenou stabilitu povrchu [25].



Při reakci (B) se vytváří mezimolekulární můstky a následně dojde k depozici alkylových řetězců na povrch s využitím heterogenní hydrosilylace koncových nesaturovaných uhlovodíků (viz reakce (C) [25].



Při reakci vzniká vazba mezi křemíkem a uhlíkem (Si-C), která je stabilnější než běžná vazba $\equiv\text{Si-O-Si-C}$ [25].

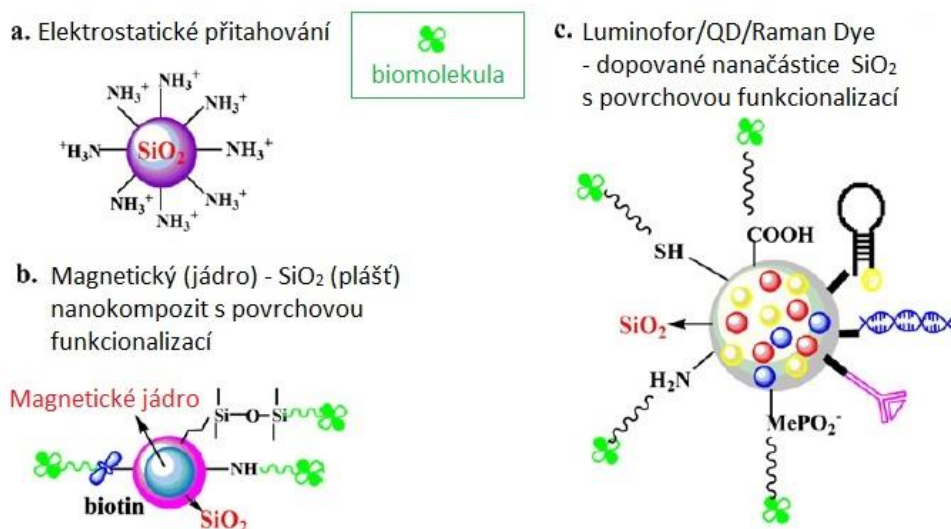
4.2.6 Metody modifikace z plynné fáze

Tyto metody jsou založeny na modifikaci SiO_2 těkavými nebo plynnými reaktanty, patří sem např. chemická a fyzikální depozice z plynné fáze (CVD, PVD), atomová epitaxe (ALE) apod. Výhodou těchto metod je lepší kontrola reakčních podmínek než při reakcích z kapalné fáze, a tedy příprava reprodukovatelných monovrstev a také malá spotřeba výchozích reaktantů [25] [31].

5 Přírodní látky a jejich využití k modifikaci křemičitých materiálů

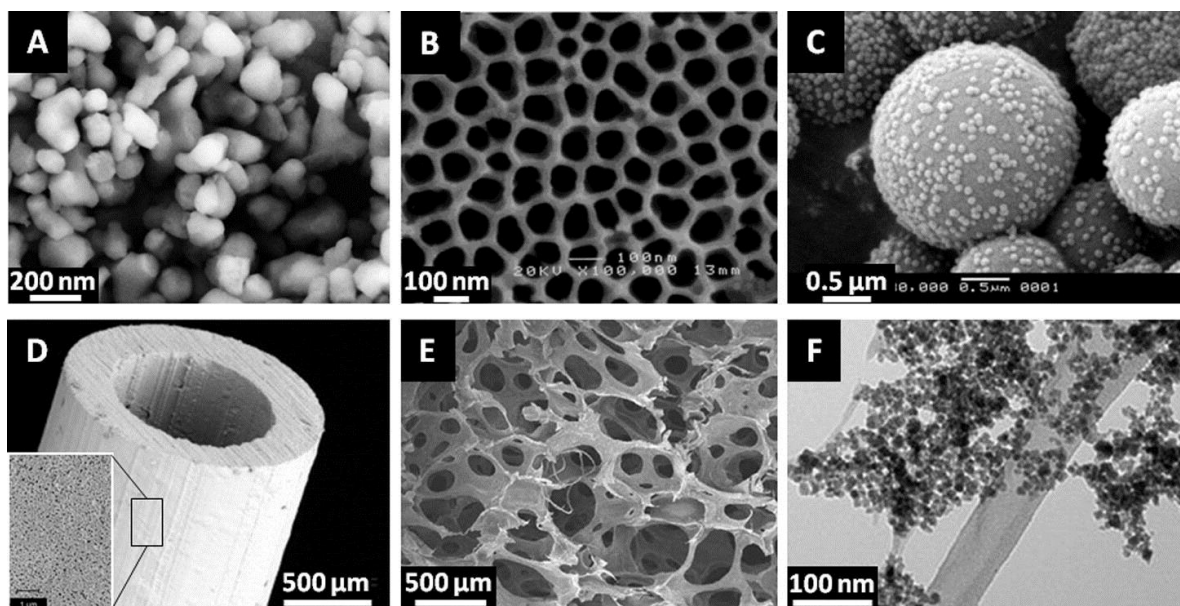
Jednou z velkých skupin využívaných pro imobilizace na křemičité substráty jsou přírodní látky. Přírodní materiály a biomolekuly jako jsou enzymy, protilátky, proteiny a léčivá agens všech typů byly imobilizovány na povrchy biomateriálů pro aplikace v terapii, diagnostice, tkáňové regeneraci, separaci a dalších odvětvích. Přírodní látky mají mnoho zajímavých vlastností, avšak bez chemické či fyzikální imobilizace jsou jejich aplikace často velice obtížné [12].

Běžnými strategiemi k funkcionalizaci povrchu křemičitých nanomateriálů (nanovláken, nanočástic atd.) je povlakování a modifikace povrchů různými funkčními skupinami. Alternativou k následné modifikaci je přímá syntéza již funkcionalizovaných materiálů se zabudovanými funkčními skupinami. V obou případech zůstává příprava takovýchto materiálů výzvou. K přípravě těchto materiálů bylo vyvinuto a vyzkoušeno několik metod s cílem modifikace a imobilizace účinných látek na povrch. Volba konkrétní techniky modifikace je dána především zamýšleným použitím funkcionalizovaného materiálu a typem substrátu. Výběr metody záleží především na vlastnostech povrchu, charakteru imobilizovaných molekul a typu aplikace. Nejkritičnějším aspektem imobilizace biomolekul na povrch nosičů je zachování aktivity a stability biomolekul i po imobilizaci. Tyto metody mohou být založeny na: fyzisorpci, afinitní interakci, vzniku kovalentních vazeb, inkorporaci v sol-gel matici a dalších [28] [38].



Obrázek 10: Schématická ilustrace možných způsobů biokunjugace křemičitých nanočástic s různými ligandy [38]

V současné době je k povrchové funkcionalizaci využíváno velké množství různých materiálů (Obrázek 11).



Obrázek 11: Ukázka některých typů křemičitých materiálů používaných k funkcionalizaci – A) koloidní částice, B) mezoporézní membrány, C) mezoporézní sféry, D) dutá vlákna, E) 3D-scaffoldy, F) nanočástice [28]

5.1 Možnosti imobilizace přírodních látek

5.1.1 Modifikace pomocí nevazebných interakcí (fyzisorbce)

Imobilizaci molekul založenou na fyzikálních interakcích lze považovat za nejjednodušší techniku využívanou k modifikacím povrchů. Tento přístup je vhodný především pro vysoce porézní materiály. Fyzikální imobilizace může být založena na elektrostatické interakci, Van der Waalsových silách, vodíkových vazbách či hydrofilních interakcích [28].

Výhodou fyzisorpce je především její univerzálnost, lze ji využívat pro většinu povrchů a nutně nevyžaduje předúpravu povrchu před vlastní imobilizací. Fyzisorpce je obecně nedestruktivní technikou, a je tedy velice vhodná pro zachování biologické aktivity imobilizovaných molekul, je tedy užitečnou metodou například pro imobilizaci léčiv na vhodné substráty u kterých se předpokládá krátkodobý až střednědobý účinek. Hlavní nevýhodou této imobilizační techniky je relativně malá stabilita adsorbovaných molekul, na kterou má významný vliv okolní prostředí (pH, iontová síla, koncentrace biomolekul) [28].

5.1.2 Modifikace pomocí kovalentních vazeb

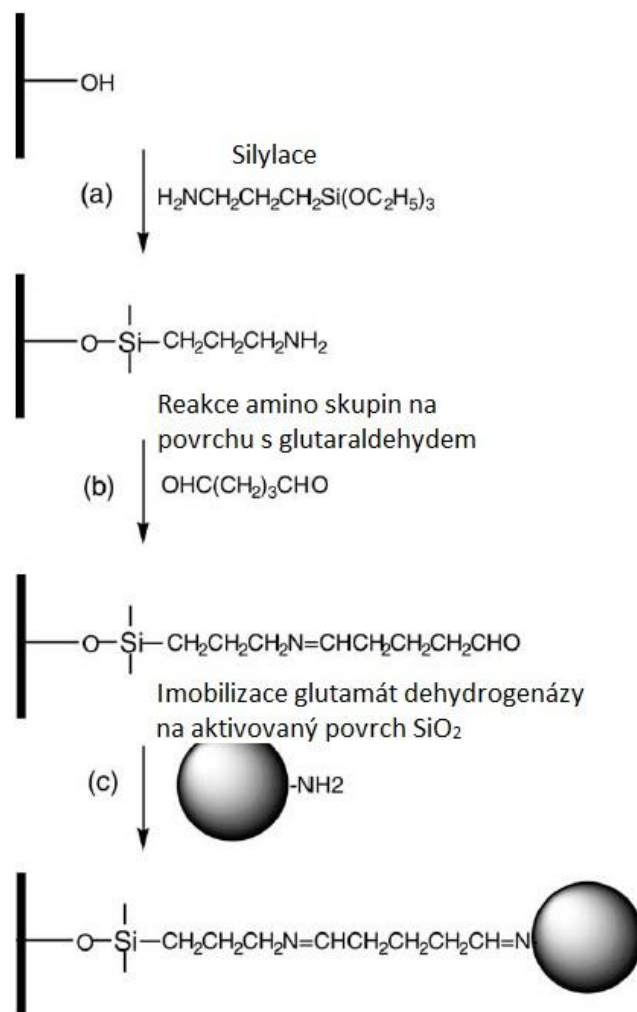
Jedním z prvních příkladů modifikací povrchu biologicky aktivní látkou byla imobilizace heparinu na povrch polymeru, kterou provedl Gott se svými spolupracovníky, když modifikovali povrch grafitu [39].

Unikátní vlastnosti mezoporézních křemičitých materiálů jsou vhodné také pro použití jako substráty sloužící k imobilizaci enzymů a biologicky aktivních agens. Většina dosud publikovaných studií ukazuje, že enzymy imobilizované s využitím mezoporézních částic si zachovávají svojí biokatalytickou aktivitu a jsou stabilnější v porovnání s volnými enzymy v roztocích. Výzkum se v současné době zaměřuje především na vývoj různých typů mezoporézních částic s odlišnou morfologií, viz [40][41][42][43].

Imobilizací enzymů se zabýval také Qhobosheane [44], který demonstroval biochemickou modifikaci povrchu křemičitých nanočástic enzymy a biokompatibilními chemickými látkami, které plní funkci biosenzorů a biomarkerů. Nanočástice tvořené čistým SiO₂ byly modifikovány dvěma enzymy – glutamátem dehydrogenázou a laktátem dehydrogenázou a také biokompatibilním agens pro barvení buněčné membrány. Výsledky ukázaly, že SiO₂ nanočástice jsou biokompatibilním pevným nosičem pro imobilizaci enzymů. Imobilizované enzymy na povrchu křemičitých nanočástic vykazovaly excelentní enzymatickou aktivitu a vynikající detekční schopnosti [44].

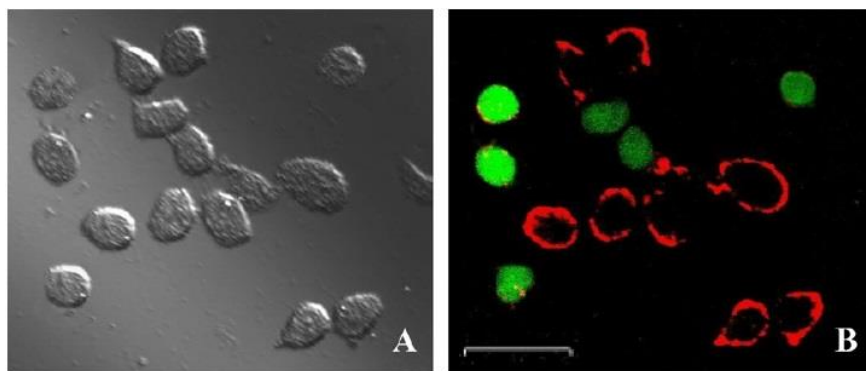
Imobilizací enzymů se zabýval také Blasi [45], který testoval dvě odlišné více krokové (3 a 4) reakce k imobilizaci glutamát dehydrogenázy na nosiče tvořené oxidem křemičitým. Výsledky ukázaly, že tříkrokový proces (Obrázek 12) nemá zásadní vliv na konformaci (strukturu) a aktivitu enzymů a je vhodný pro přípravu vysoce uspořádaných planárních vrstev enzymů pro detekční pole.

Na rozdíl od tříkrokové reakce vedla čtyřkroková k redukci hustoty povrchové vrstvy a inaktivaci enzymu způsobenou nepříznivými podmínkami během silylace. Při reakci thionylchloridu s primární amino (NH₂) nebo thiolovou (-SH) skupinou za vzniku amido a thioesterové vazby. Blízkost cysteinového rezidua a α -ketoglutarátu způsobí následnou reakci mezi thionyl-chloridovými skupinami na povrchu a enzymem, která vede k zablokování katalytických míst enzymu a inaktivaci enzymu [45].



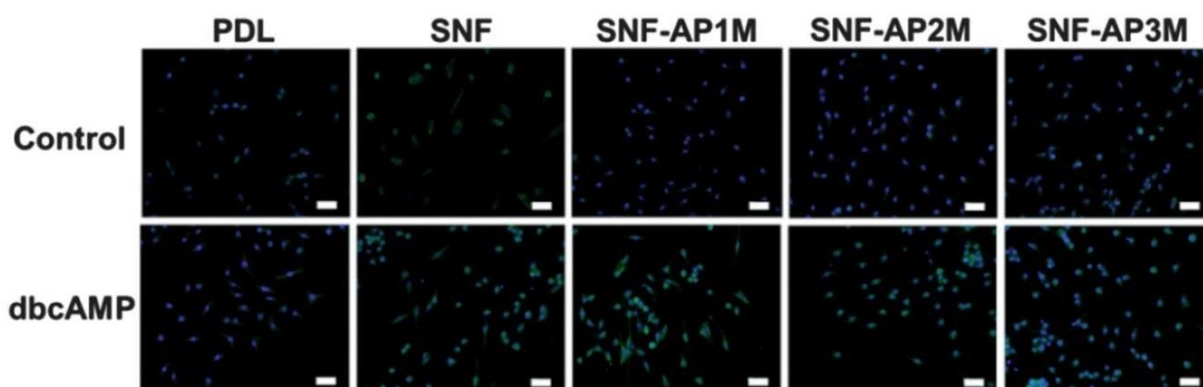
Obrázek 12: Tříkroková chemická procedura k imobilizaci glutamát dehydrogenázy na povrch SiO_2 [45]

Peng [46] připravil biofunkcionalizované fluorescenční křemičité nanočástice pro značení buněk a buněčné diferenciaci, které jsou velkým příslibem pro medicínské zobrazovací techniky jako nové fluorescenční sondy. Fluorescenční nanočástice byly získány spojením aminomodifikovaných křemičitých nanočástic a kyseliny laktobionové za pomoci 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimidu jako linkeru. Takto připravené nanočástice vykazují vynikající biologickou aktivitu a lze je využít k imunofluorescenčním stanovením. Navíc tyto nanočástice efektivně rozpoznávaly cílové buňky ve smíšeném buněčném systému (Obrázek 13). Jejich výborná fotostabilita, dobrá biokompatibilita a signifikantní zesílení signálu je předurčuje k použití pro identifikaci buněk s vysokou citlivostí pro mnoho biomedicínských aplikací, jako je cílené značení rakovinných metastáz či kmenových buněk *in vivo* [46].



Obrázek 13: Rozpoznání jaterních rakovinných buněk v heterogenním buněčném systému pomocí galaktózou modifikovaných SiO_2 nanočástic [46]

Chen a kol. [47] syntetizovali křemičitá nanovlákná pomocí kombinace metody sol-gel a elektrostatického zvlákňování. Takto připravená nanovlákná byla následně modifikována 3-aminopropyltriethoxy silanem (APTES) za účelem jejich použití jako substrát pro nervové buňky v tkáňovém inženýrství. Měřením bylo zjištěno, že hydrofilita povrchů křemičitých nanovláken klesala se zvyšujícím se počtem amino-alkylových skupin na jejich povrchu. Snímky z elektronového mikroskopu ukázaly, že modifikace křemičitých nanovláken pomocí APTES vedla ke zvýšené proliferaci buněk. Takto modifikovaný materiál je tedy potenciálně vhodný k růstu a diferenciaci nervových buněk pro tkáňové inženýrství.



Obrázek 14: Rostoucí diferenciace (zleva) nervových buněk po pěti dnech na amino-funkcionalizovaném povrchu SiO_2 nanovláken [47]

Kranz a kol. [48] využili cirkulární dichroismus (rozdílnou absorpci levo a pravotočivě kruhově polarizovaného záření u opticky aktivní látky v oblasti jejího absorpčního pásu) k charakterizaci sekundární struktury penicillin G acylázy před a po kovalentní imobilizaci na povrch křemičitých nanočástic. Funkcionalizace křemičitých nanočástic byla provedena s využitím reakce s glutaraldehydem a následnou reakcí s aminoskupinou enzymu. Překvapivě se ukázalo, že sekundární struktura imobilizovaného enzymu byla velice podobná se strukturou volného enzymu a téměř konstantní pro všechny

experimenty, na rozdíl od specifické aktivity, která s rostoucím množstvím imobilizovaného enzymu na povrchu SiO₂ nanočástic klesala. Vzhledem ke stále struktuře enzymu bylo zjištěno, že hlavním omezením specifické aktivity je pokles difuzivity s narůstajícím počtem imobilizovaných molekul enzymu [48].

Biokompatibilní a uniformní rozhraní založené na nanočásticích oxidu křemičitého s funkcionalizovaným povrchem s amino skupinami bylo připraveno Zhangem [50] s cílem efektivní imobilizace a citlivé sekvenční detekce DNA z telecího brzlíku. Výsledky kvantitativní analýzy ukázaly, že vylepšení imobilizace jednořetězcové DNA lze docílit díky velkému měrnému povrchu a speciálním vlastnostem nanočástic oxidu křemičitého. Hybridizační experimenty navíc ukázaly, že imobilizovaná DNA může specificky interagovat s komplementární DNA v roztocích, čehož lze dále využívat v bioanalytických experimentech apod.

Huang a kol. [51] připravili nový adsorbent imobilizací taninu na mezoporézní kuličky oxidu křemičitého. Mezoporézní kuličky SiO₂ obsahující aminoskupiny ve své struktuře byly připraveny postupem, který popsal Cheng v [52]. Následně byl na jejich povrch navázán tanin za použití glutaraldehydu jako síťovacího činidla. U takto připraveného materiálu byly ověřeny absorpční schopnosti pro ionty Cr³⁺. Výsledky ukázaly závislost absorpční kapacity na pH prostředí, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při pH 5,5, kdy naměřená koncentrace Cr³⁺ byla 1,3 mmol/g při původní koncentraci 2,0 mol/l. Tato studie poskytuje novou strategii k přípravě adsorbentů s imobilizovaným taninem na povrchu s vysokou stabilitou a efektivním odstraňováním těžkých kovů z vodných roztoků [51].

5.1.3 Modifikace využívající afinitní interakce

Popularita reakcí založených na interakci avidin/streptavidinem – biotin k imobilizaci bioaktivních látek na povrch oxidu křemičitého stále stoupá. Vzhledem k tomu, že streptavidin má mnohem nižší izoelektrický bod než avidin, je redukováno nespecifické navázání molekul. Tato interakce je nejsilnější známou nekovalentní (receptor-ligand) interakcí. Vznik vazby mezi biotinem a avidin/streptavidinem je velmi rychlý a po jejím vzniku odolává většině extrémních pH, teplotám a většině denaturačních činidel. Velké množství biomolekul je možno biotinylovat pro následnou interakci s avidin/streptavidin značenými molekulami [53][54].

Imobilizace avidin/streptavidinu na křemičitý povrch je založena na elektrostatické interakci, kdy pozitivně nabitý komplex (avidin/streptavidin) je přitahován negativně nabitým povrchem SiO₂. Tuto proteinovou adsorpci lze dále podpořit použitím glutaraldehydu. Takto povlakovaný povrch křemičitých materiálů lze dále funkcionalizovat biotinylizovanými molekulami [53][54].

Walker a jeho spolupracovníci [55] využili interakce mezi avidinem a biotinem k přípravě materiálů pro cílené dodávání léků a značení buněk. Výsledky ukázaly, že izolované lidské a myší karcinogenní buňky mají schopnost kumulace biotinu, což by potenciálně umožnilo cílenou léčbu rakovinných nádorů a jejich specifické značení v různých tělních tkáních.

5.1.4 Enkapsulace molekul pomocí metody sol-gel

Kromě fyzisorpce a chemické modifikace je využití enkapsulace či zachycení biomolekul v porézní matici často využívanou metodou pro některé speciální biotechnologické, bioanalytické a biomedicínské aplikace (biosenzory, biokatalyzátory, terapeutika). Výhody v použití křemičitých nanomateriálů oproti konvenčním polymerům jsou především velký specifický povrch a velikost, které je možno měnit dle požadavků konkrétní aplikace. Navíc je oxid křemičitý chemicky velmi stabilní, nebotná ve vodných roztocích, je opticky transparentní mikrobiologicky inertní a svými vlastnostmi zvyšuje stabilitu inkorporovaných molekul a chrání je před výkyvy pH a teploty [38].

Jain a spol. [56] připravili nové injektovatelné a sprejovatelné hybridní nanočástice oxidu křemičitého, do kterých inkorporovali molekuly s vysokou molekulovou hmotností (tyramivyilinolin, FITC-dextran a avidin-peroxidáza) s velikostí částic menší než 100 nm s 80% účinností enkapsulace. Takto inkorporované enzymy vykazovaly kinetiku Michealis-Mentenové a katalyzovaly reakce při difuzi substrátů do pórů SiO₂ matrice, navíc vykazovaly vyšší stabilitu při změně pH a teploty než volné enzymy [56].

Enkapsulace bioaktivních makromolekul do magneticky povlakovaných nanočástic oxidu křemičitého, kterou provedl Yang [57], je dalším příkladem využití této metody. Výhodou takto připravených nanočástic kromě vlastností spojených s inkorporací bioaktivní látky je jejich snadná separace využitím vnějšího magnetického pole.

Tsagkogeorgas [58] použil inkorporaci anti-diclofenac protilátek do nanočástic oxidu křemičitého. Biologická aktivita enkapsulovaných protilátek byla hodnocena

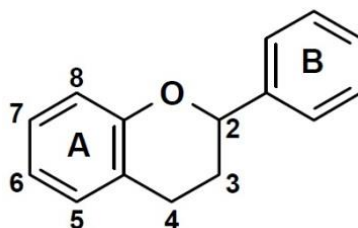
inkubací nanočástic v standardním roztoku. Výsledky ukázaly, že pouze 6 % přidaného diclofenacu bylo nespecificky zadrženo, zatímco 66 % zreagovalo s inkorporovanými protilátkami.

5.2 Taniny

Taniny jsou přírodní polyfenolické sloučeniny, které jsou rozpustné ve vodě s molekulovou hmotností 500 – 5000 g/mol nebo vyšší. Rostlinné taniny lze rozdělit do dvou velkých skupin - hydrolyzovatelných a kondenzovaných taninů [59].

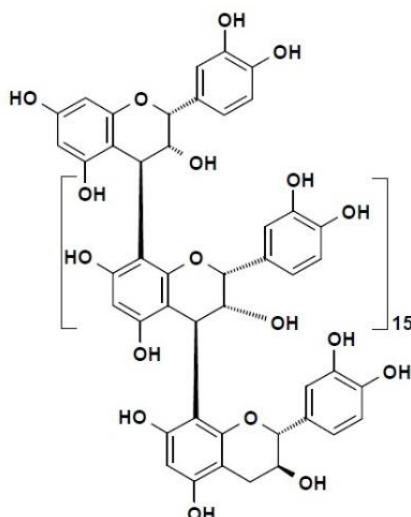
5.2.1 Kondenzované taniny

Kondenzované taniny, též proanthokyanidiny, jsou polymerní flavonoidy tvořené základním heterocyklickým systémem biosynteticky odvozeným z fenylalaninu (B) a polyketidu (A), (Obrázek 15). Proanthokyanidiny tvoří jednu z velkých skupin kondenzovaných taninů. Přestože cesta k biosyntéze těchto látek je již známa, kroky zahrnující kondenzaci a polymerizaci flavonových jednotek zatím nebyly dokonale objasněny [59].



Obrázek 15: Základní strukturální jednotka kondenzovaných taninů [59]

Nejvíce studované kondenzované taniny jsou tvořeny flavan-3-oly – epikatechin, katechin, které jsou spojeny pomocí vazby C–C mezi uhlíky C₈ koncové a C₄ navazují jednotky. Další polymerizace může poskytnout lineární 4,8 polymery, jako je širokový prokvanidin, (Obrázek 16). Méně běžnými jsou lineární polymery, strukturálně odvozené z 4,6 dimerů, případně větvené polymery s vazbami mezi uhlíky 4,8 a 4,6 [59].



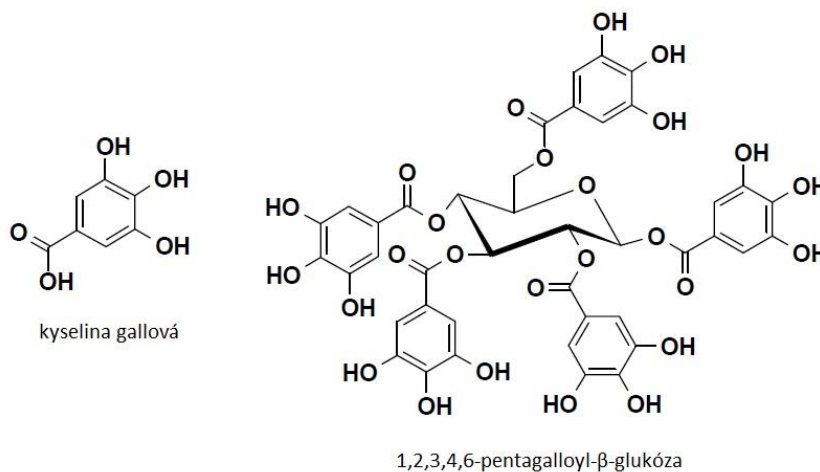
Obrázek 16: Chemická struktura širokého taninu [59]

5.2.2 Hydrolyzovatelné taniny

Hydrolyzovatelné taniny jsou estery fenolických kyselin a polyolu, obvykle glukózy. Fenolickou kyselinou je v případě gallotaninů kyselina gallová a u ellagitaninů pak kyselina ellagová. Tyto jednotky mohou být dále esterifikovány nebo oxidačně zesíťovány za vzniku komplexních hydrolyzovatelných taninů [59].

5.2.2.1 Gallotaniny

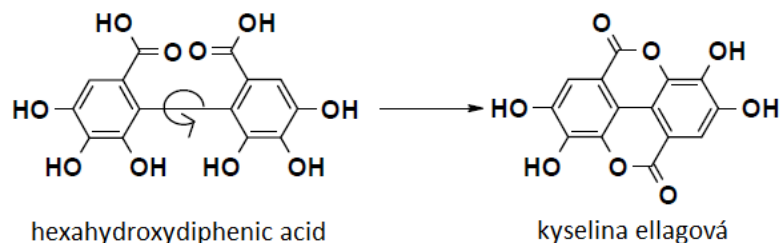
Gallotaniny jsou nejjednoduššími hydrolyzovatelnými taniny, které jsou tvořeny poly(estery kyseliny gallové a glukózy). Prototypem gallotaninů je pentagalloyl- β -glukóza (1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -glukóza) (PGG), která má pět identických esterových vazeb, které obsahují alifatické hydroxylové skupiny centrální glukózové jednotky (Obrázek 17) [59].



Obrázek 17: Chemická struktura kyseliny gallové (vlevo) a 1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -glukózy (vpravo)[59]

5.2.2.2 Ellagitaniny

Ellagitaniny vznikají při oxidaci galloylových skupin, jednoduché ellagitaniny jsou estery kyseliny hexahydroxydifenová (HHDP), která ve vodných roztocích spontánně laktonizuje na kyselinu ellagovou (Obrázek 18) [59].



Obrázek 18: Chemická struktura hexahydroxydifenové kyseliny a její laktonizace na kyselinu ellagovou [59]

5.2.3 Vlastnosti taninů

Taniny mají mnoho specifických vlastností, kterými mohou působit na biologické systémy. Jsou to především chelatační schopnosti k iontům kovů (při vhodných podmínkách – pH), antimikrobiologické a antimykotické účinky, srážlivé účinky (enzymy) a antioxidační vlastnosti. U mnoha taninů byly prokázány také bakteriostatické a baktericidní účinky proti mnoha bakteriím, např. *Staphylococcus aureus* nebo MRSA či virům herpes simplex virus, HIV apod. [60][61][62][75].

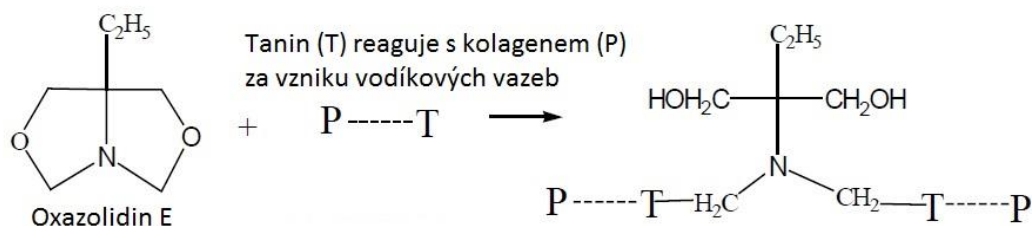
Vzhledem k velice různorodým vlastnostem taninů a enormní strukturní diverzitě je velice obtížné vyvinout přesný model pro předpověď účinků konkrétní molekuly taninu v závislosti na jeho struktuře [59].

5.2.4 Příklady využití taninů

Thayyah [63] využil tanin imobilizovaný na povrch kalcinovaného hydrotalcitu k přípravě adsorbentu pro ionty těžkých kovů (Cu(II), Zn(II) a Cd(II)) z průmyslových odpadních vod. Princip funkce modifikovaného adsorbentu spočíval v iontové výměně. Provedené experimenty ukázaly, že adsorpce kovových iontů je selektivní v pořadí Cu(II) > Zn(II) > Cd(II). Proces adsorpce probíhal velkou rychlostí, kdy maximálního naadsorbovaného množství bylo dosaženo po třech hodinách, přičemž adsorbční kapacita klesala s rostoucí iontovou silou.

Adsorbent s imobilizovaným taninem vyvinuli také Lia a Shi [64], kteří imobilizovali tanin na vlákna kolagenu. K imobilizaci využili reakci s glutaraldehydem,

který kovalentně propojil nukleofilní místa taninů s aminoskupinami kolagenu (Obrázek 19).



Obrázek 19. Schématické znázornění interakce taninu s kolagenem resp. $-NH_2$ skupinami v jeho struktuře [64]

V [65] bylo potvrzeno, že vazba mezi aminoskupinami substrátu a taninem je založena především na tvorbě vodíkových můstků a na tom že aldehydické sloučeniny (glutaraldehyd, oxazolidin) reagují s taniny za vhodných podmínek s uhlíky C_6 nebo C_8 vzhledem k jejich vysoké nukleofilitě. Takto imobilizované taniny efektivně adsorbovaly ionty Th(IV), Cr(II), Pt(II), Cd(II), Hg(II) z vodných roztoků [64]. Podobně využil Liao [67] imobilizaci taninu na vlákna kolagenu k adsorbci iontů thoria. Další možnosti využití taninů imobilizovaných na různých substrátech jsou popsány v literatuře [66][68][69].

Gulcin a spol. pomocí několika různých technik ([70]) dokázali antioxidační účinky (antioxidanty jsou sloučeniny, které inhibují nebo zpožďují oxidaci jiných molekul a chrání lidský organismus před volnými radikály a reaktivními formami kyslíku) kyseliny tříslové, která patří do skupiny hydrolyzovatelných taninů. Výsledky ukázaly, že kyselina tříslová při koncentraci $15 \mu\text{ml}$ inhibuje peroxidaci lipidů (proces degradace lipidů, při kterém dochází k poškození buněčných membrán) v emulzi kyseliny linolové z 97,7 %. Výsledky tedy naznačují, že kyselina tříslová je efektivní přírodní antioxidant, který je vhodný například pro použití jako konzervační činidlo.

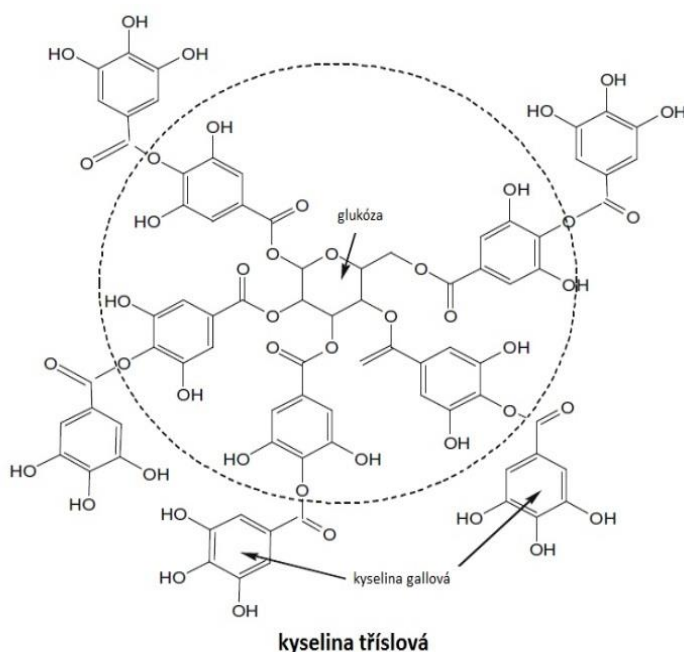
Využitím taninů k léčbě periodontálních onemocnění se zabýval Ho [71], který izoloval několik taninů z listů Brusnice brusinky a dokázal jejich antimikrobiální účinky a potenciál pro použití k léčbě onemocnění dásní.

5.2.5 Kyselina tříslová

Kyselina tříslová též tanin či tannic acid (Obrázek 20), je přírodní polyfenolická sloučenina patřící do skupiny hydrolyzovatelných taninů. Je tvořena centrální molekulou glukózy s derivatizovanými hydroxylovými skupinami obsahující jeden či více galloylových zbytků, patří do skupiny hydrolyzovatelných taninů, které jsou schopné

hydrolyzy za mírných podmínek v kyselém či alkalickém prostředí a poskytují sacharid (glukóza) a kyselinu (především kyselina gallová). Kyselina tříslová je obsažena v mnoha přírodních látkách – víně, kávě čaji, ovoci, zelenině a mnohých dalších, je také důležitou součástí při procesu činění kůží a používá se jako komponenta při zpracování dřeva. Její schopnost interakce se sacharidy a proteiny se využívá při procesu čištění vín.

Nejvíce zkoumanými vlastnosti kyseliny tříslové jsou její chelatační, antioxidační, antimikrobiální, antienzymatické, adstringentní a antibakteriální účinky. Může být použita k léčbě průjemových onemocnění a v hemostatických a protihemoroidových přípravcích. Nedávné studie na zvířatech ukázaly také její protirakovinné účinky. Neměla by však být užívána ve velkém množství, protože inhibuje vstřebávání železa v organismu. Externě je pak kyselina tříslová používána k léčbě kožních vředů, poranění kůže a bolestí zubů [72].



Obrázek 20: Chemická struktura kyseliny tříslové – tvořená centrální molekulou glukózy s pěti esterifikovanými hydroxyly dvěma molekulami kyseliny gallové, čárkovaně je vyznačena základní struktura kyseliny tříslové

Mechanismus antioxidačního působení kyseliny tříslové není dosud zcela pochopen, například v přítomnosti iontů mědi může působit jako prooxidant podporující poškození DNA nebo jako antioxidant potlačující hydroxylové radikály. Bylo zjištěno, že antioxidační účinky kyseliny tříslové jsou dány její strukturou, která je tvořena hydrofobickým jádrem a hydrofilním pláštěm [70].

Chung a kol. [73] se zabývali inhibičními účinky kyseliny tříslové na bakterie vyskytující se v zažívacím traktu a prokázali, že kyselina tříslová inhibuje růst několika střevních bakterií – *Backeriodes fragilis*, *Clostridium clostridiiforme*, *C. perfringens*, *C.*

paraputrificum, Escherichia Coli, Enterobacter Clocaea a Salmonella tryphimurium při koncentracích 100 – 1000 µg/ml. Inhibiční efekt kyseliny tříslové je dán nejspíše silnou schopností kyseliny tříslové navázat se k železitým iontům. Mikroorganismy obsažené v trávicím traktu mohou být příčinou celé řady onemocnění včetně rakoviny. Interakce kyseliny tříslové se střevní mikroflórou a její ovlivnění metabolismu vzhledem ke svým antinutričním, protirakovinným a protimutagenním vlastnostem může hrát klíčovou roli u mnohých onemocnění [74]. Navíc se ukázalo, že kyselina tříslová nepůsobí na bakterie mléčného kvašení, které jsou obecně považovány za zdraví prospěšné [73].

Akiyama a kol. potvrdili [75], že kyselina tříslová má inhibiční účinky na kmeny bakterií Staphylococcus aureus. Provedené experimenty ukázaly, že přidavkem kyseliny tříslové k dvěma různým antibiotikům (oxacilin, cefdinir) došlo k výraznému poklesu minimální inhibiční koncentrace u všech osmnácti testovaných kmenů Staphylococcus aureus (Tabulka 1).

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace oxacillinu a cefdiniru bez a s přidavkem kyseliny tříslové [75]

	No. of strains with MIC (mg/L)												Total
	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	≥128	
Oxacillin alone			6			1		2		5		4	18
Oxacillin + tannic acid (100 mg/L)	18												18
Cefdinir alone			3	4	2	2	1	2	1	3			18
Cefdinir + tannic acid (100 mg/L)	18												18

Aelenei [72] vytvořil kompozitní mikročástice obsahující kyselinu tříslovou v chitosanové matici s cílem využít tyto mikročástice v přípravcích pro léčbu bolesti zubů a poranění kůže.

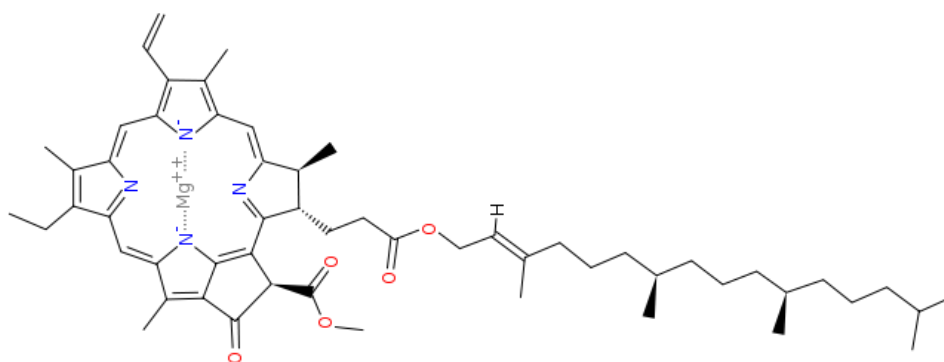
Vzhledem k rozvoji stále nových odolných kmenů bakterií je v současné době snaha o vývoj a aplikaci nových látek s antibakteriálními a antiseptickými účinky je kyselina tříslová jednou z potenciálně vhodných možností s širokým okruhem aplikací.

5.3 Chlorofyl

Chlorofyl je zelený pigment, který je obsažen v zelených rostlinách, sinicích a některých řasách. Název *chlorofyl* označoval původně pouze skupinu zelených pigmentů účastnících se fotosyntézy u vyšších rostlin. Poté se toto označení rozšířilo na všechny pigmenty patřící do skupiny porfyrinů, které se účastní fotosyntézy [76].

Nejčastěji vyskytujícím se typem chlorofylu je chlorofyl A (Obrázek 21). Chlorofyl se účastní fotosyntézy v zelených rostlinách, kde absorbuje energetická kvanta světelného

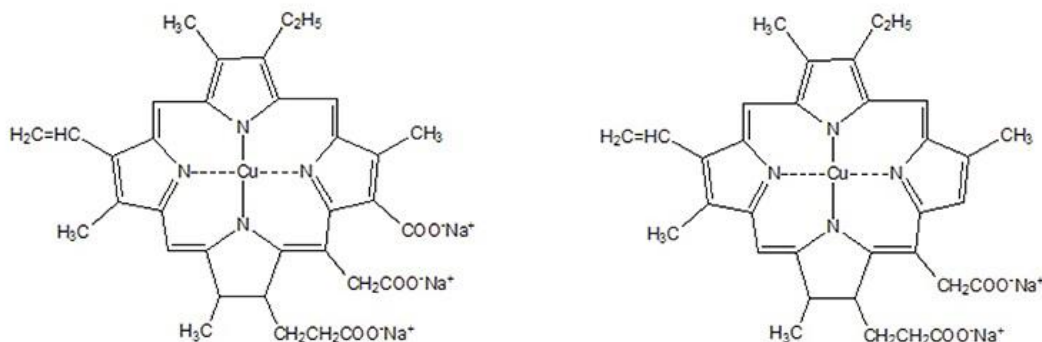
záření a následně je tato energie rostlinami využívána k syntéze sacharidů z oxidu uhličitého a vody. Chlorofyly patří do skupiny porfyrinů (organické cyklické sloučeniny, které jsou schopné vytvářet komplexy s kovovými ionty – nejznámějším metaloporfyrinem je hemoglobin, který umožňuje přenos kyslíku červenými krvinkami), které obsahují hořčík jako centrální atom uprostřed pyrolových kruhů [77]. Všechny v přírodě se vyskytující porfyriny mají ve své struktuře zbytek kyseliny propionové na pozici číslo sedm. V případě chlorofylů je tato pozice esterifikována pomocí dlouhého alkoholu. Díky tomuto uhlovodíkovému řetězci jsou chlorofyly nerozpustné ve vodě a rozpustné v tucích.



Obrázek 21: Chemická struktura v přírodě nejvíce zastoupeného chlorofylu typu A [78]

Strukturu chlorofylu lze modifikovat například s využitím tvorby kovových komplexů. Při těchto reakcích je atom hořčíku poměrně snadno odstraněn, avšak jeho náhrada je již obtížná. Jednou z možných modifikací je náhrada atomu hořčíku atomem mědi, která se provádí zahříváním chlorofylu s octanem měďnatým [76].

Chlorofylin je semisyntetická směs sodno-měďnaté soli získaná substitucí atomu hořčíku u chlorofylu za atom mědi. Při syntéze chlorofylinu je hořčíkový atom ve středu porfyrinového kruhu nahrazen atomem mědi a také je odstraněn fytolový řetězec, proto je chlorofylin na rozdíl od přírodního chlorofylu rozpustný ve vodě a má vyšší stabilitu než chlorofyl [79].



Obrázek 22: Dvě základní sloučeniny tvořící sodnou sůl měďnatého komplexu chlorofylinu [79]

Chlorofyl i chlorofylin mají mnoho zajímavých vlastností. Pro využití v obvazových materiálech jsou významné především jejich antibakteriální a dezinfekční vlastnosti. Existuje mnoho publikací zabývajících se aplikací chlorofylu pro léčbu infekcí. Mnoho výsledků ukázalo pozitivní vliv chlorofylu na léčbu dlouhodobě nehojících se poranění, na které nepůsobila konvenčně používaná antimikrobiální agens [80].

Bowers [81] využil chlorofylin k léčbě 400 různých ran po chirurgických zraněních a výsledky ukázaly, že infekce při použití chlorofylu zmizela během 2 – 3 dní. Combes a kol. [82] prokázali obdobné účinky chlorofylu při léčbě sekundárně infikovaných vředů, kontaktní dermatidy a pemhigu. Carpenter [83] prokázal léčivé účinky chlorofylu při léčbě 127 případů hnisavé osteomyelitidy a chronických vředů. Vzhledem k tomu, že chlorofyl je považován za promotéra tvorby nové zdravé granulační tkáně, některé klinické studie ukazují, že má také antibakteriální vlastnosti. Smith [84] a Nevin [85] prokázali bakteriostatické vlastnosti chlorofylu na kmeny staphylococci, streptococci a anaerobních spór [80]. Další příklady využití antibakteriálních účinků chlorofylu je možné nalézt v [86][87].

Mezi jejich další vlastnosti patří například podpora krvetvorby a zlepšení schopnosti krve přenášet kyslík, zabraňuje gastrointestinální absorpci škodlivých toxinů (aflatoxiny) v těle, antioxidantní účinky – ochrana před volnými radikály, zpomaluje stárnutí, posiluje imunitu, pomáhá udržovat hormonální rovnováhu či redukuje tvorbu ledvinových kamenů [88].

Shrnutí teoretické části

V teoretické části práce je uvedena problematika křemičitých nanomateriálů se zaměřením na křemičitá nanovlákná, jejich modifikace a jejich využití především v oblasti medicíny a tkáňového inženýrství. Zde je přehled vybraných diskutovaných témat:

- Výhody použití nanovláknenných materiálu v obvazových materiálech
- Elektrostatické zvlákňování křemičitých nanovláken
- Modifikace křemičitých nanomateriálů a jejich využití v analytické chemii, syntéze, biochemii, imobilizaci účinných agens a průmyslových aplikacích
- Nejčastěji využívané metody modifikace křemičitých materiálu
- Přínosy imobilizace přírodních látek na povrch nanovláknenných materiálu, zejména pak taninů

6 Experimentální část

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek silylačního procesu křemičitých nanovláken s využitím 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES) jako silylačního činidla. Především byl zkoumán vliv podmínek silylační reakce na výslednou koncentraci kovalentně navázaných aminoskupin ($-NH_2$) na povrch modifikovaných křemičitých nanovláken. Sledovanými parametry, které ovlivňovaly silylační reakci, byly: doba silylace, teplota při které reakce probíhala a koncentrace použitého silylačního činidla (APTES).

Druhá část experimentů byla zaměřena na nalezení a přizpůsobení vhodné metody ke stanovení koncentrace aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláken po jejich silylaci s cílem stanovit optimální podmínky silylační reakce.

Další část práce se věnovala imobilizaci vybraných přírodních látek, tj. kyseliny tříslové a chlorofylinu (sodno-měďnatého komplexu chlorofylinu) na povrch modifikovaných nanovláken z oxidu křemičitého, která plní funkci nosného substrátu.

V poslední části se experimenty zaměřily na ověření funkčnosti připravených materiálů s imobilizovanými přírodními agens, především na jejich antibakteriální vlastnosti.

Mikrobiologické testy byly zaměřeny jednak na potvrzení antibakteriálního (baktericidního) účinku připravených materiálů (nanovláčenné vrstvy s imobilizovaným chlorofylinem a kyselinou tříslovou) a dále na stanovení velikosti antibakteriálního účinku v závislosti na délce působení. K objektivnímu posouzení těchto účinků byly k testování použity grampozitivní i gramnegativní kmeny, a to jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní mikrobiologická měření.

6.1 Použité materiály

- Tetraethylorthosilikát (TEOS) 99%, CAS: 78-10-4, Merc Milipore
- 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES) 99%, CAS: 919-30-2, Sigma-Aldrich
- Ethanol bezvodý, CAS: 64-17-5, Penta
- Ethanol 96% p.a., CAS: 111-42-2, Penta
- Deionizovaná voda, TUL
- Methyloranž, CAS: 547-58-0, Penta
- Uhličitan draselný bezvodý p. a., CAS: 584-08-7, Penta

-
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a., CAS: 13472-35-0, Penta
 - Kyselina tříslivá ACS grade, CAS: 1401-55-4, Sigma-Aldrich
 - Chlorofylin (vodný roztok sodno-měďnatý komplex) de Souzas, Beaumont, USA
 - Kyselina chlorovodíková 35%, CAS: 7647-01-0, Penta
 - Křemičitá nanovlákná, Si-J32/24-1, 32/21-1, 32-22-1(2), TUL
 - Isopropylalkohol 98,5% p. a., CAS: 67-63-0, Penta
 - Kultivační médium Tryptone soya agar, šarže BO03519351N, Oxoid
 - Bakteriální kmen Staphylococcus gallinarum, CCM 3572, ITEST Kryobanka B
 - Bakteriální kmen Escherichia coli, CCM 2024, ITEST Kryobanka B
 - Fluorescein isothiokyanát isomer $\geq 90\%$, CAS: 3326-32-7, Sigma Aldrich
 - Hydroxid sodný p. a., CAS: 1310-73-2, Penta
 - Fyziologický roztok, Krajská nemocnice Liberec

6.2 Použité metody

6.2.1 Elektrostatické zvlákňování nanovláknenné vrstvy

Příprava nanovláknenné membrány tvořené oxidem křemičitým

Výchozí sol tvořený tetraethoxysilanem v isopropylalkoholu (s přidavkem deionizované vody a kyseliny chlorovodíkové) byl zvlákněn z volné hladiny pomocí zařízení Nanospider NS line 1WS500U (Elmarco, Liberec, Česká republika) (Obrázek 23).

Podmínky elektrostatického zvlákňování byly následující:

- vzdálenost elektrod: 175 nm,
- rychlost pojezdu struny: 0,2 mm/s,
- rychlost pojezdu hlavy: 250-300 mm/s na 450 mm,
- podkladový materiál: pečící papír bez silikonu,
- průměr průvlaku: 0,6 cm,
- napětí na elektrodách: kolektor -10 kV, spinner (struna) 60 kV,
- dvě převrstevní podkladového materiálu zvlákněvanými nanovláknny SiO₂.



Obrázek 23: Zařízení pro elektrostatické zvláknování - Nanospider NS

6.2.2 Silylace křemičitých nanovláken 3-aminopropyltriethoxysilanem

Silylační reakce, tj. modifikace povrchu křemičitých nanovláken pomocí 3-aminopropyltriethoxysilanu, byla provedena dle níže uvedeného postupu.

Do Petriho misky o průměru 85 mm byla vložena elektrostaticky zvlákněná nanovlákněná vrstva tvořená oxidem křemičitým (o rozměrech 3×3 , $2,5 \times 5$ a 16×14 cm), která byla stabilizována při teplotě $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 hodin. K nanovlákněné vrstvě v Petriho misce bylo pipetou přidáno 15 ml silylačního roztoku APTES o koncentraci 3 % obj. ze zásobního roztoku. Zásobní roztok APTES o koncentraci 3 % obj. byl připraven odpipetováním 7,5 ml APTES do zásobní plastové lahve o objemu 250 ml a doplněním 96% ethanolem na objem 250 ml. Ostatní koncentrace byly připraveny obdobně s tím, že se měnil poměr APTES a ethanolu.

Uzavřená Petriho miska obsahující křemičitá nanovlákněná spolu se silylačním činidlem (pH 5-6) byla umístěna na třepačku Heidolph Hei-Tec (Heidolph Instruments, Německo) s rychlostí třepání 350 ot/min. Při experimentech za konstantní teploty byly vzorky ponechány na třepačce po dobu 120 minut při zvolené teplotě. Při experimentech s krátkým zahřátím byla na počátku reakce zahřáta reakční směs na zvolenou teplotu a ta

byla udržována 15 minut. Následně byla Petriho miska s reakční směsí ponechána za samovolného ochlazování na třepačce dalších třicet minut (celkový čas reakce byl 45 minut). Schéma reakce je uvedeno výše (Obrázek 8).

Po skončení reakce byl pipetou odtažen reakční roztok a ke vzorkům bylo přidáno 3×10 ml bezvodého ethanolu za účelem promytí vzorků a odstranění zbylého reakčního činidla z nanovlákněné vrstvy. Následně byla nanovlákněná pinzetou přenesena na vrstvu netkané polypropylenové textilie typu spunbond, na které byla vysušena při laboratorní teplotě. Takto připravené vzorky byly uloženy do vzduchotěsných polyethylenových sáčků, kde byly uchovány pro další použití.

6.2.3 Metody používané ke kvantitativnímu stanovení aminoskupin

6.2.3.1 Metoda založená na reakci s methylovaním

Tuto metodu popsal Hartwigem [89] při stanovení koncentrace aminoskupin na povrchu polyakrylonitrilových vláken. Metoda je založená na spektrofotrickém stanovení methylovaní, která reaguje s přítomnými aminoskupinami. Postup byl adaptován pro stanovení počtu aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláken po silylaci.

K modifikované nanovlákněné vrstvě tvořené křemičitými nanovláknami (po silylační reakci) umístěné v Petriho misce bylo přidáno 15 ml zásobního roztoku methylovaní (MO). Zásobní roztok methylovaní o objemu 500 ml byl připraven takto – do plastové zásobní lahve o objemu 500 ml bylo na analytických vahách Kern ew 620-3NM (Kern & Sohn, Německo) odváženo 0,252 g methylovaní, která byla rozpuštěna v 500 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH_2PO_4) o koncentraci 0,1 mol/l, který byl předem připraven rozpuštěním 7,816 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml deionizované vody. Takto připravený 0,05% roztok methylovaní (MO) s $\text{pH} \approx 5$ byl použit ke stanovení koncentrace aminoskupin.

Nanovlákněný materiál byl v roztoku methylovaní ponechán 1 hodinu při laboratorních podmínkách a poté byl roztok methylovaní odtažen pomocí pipety a materiál byl promyt 3×10 ml destilované vody, čímž došlo k odstranění nenavázané methylovaní.

Takto připravený materiál (SiO_2 -APTES-MO) byl následně vložen do 15 ml roztoku uhličitanu draselného, který byl odpipetován ze zásobního roztoku o koncentraci

0,1 mol/l připraveného odvážením 6,91 g K_2CO_3 a následným rozpuštěním v 500 ml destilované vody. Po 30 minutách byl získán roztok MO v 0,1 M roztoku K_2CO_3 . Výsledný roztok byl pipetou přenesen do zkumavek o objemu 10 ml pro následné spektrofotometrické stanovení.

Koncentrace methyloranže ve výsledném roztoku byla stanovena pomocí UV/VIS spektrofotometru GBC Cintra 202 (GBC Scientific Equipment, Australia). K analýze byla použita jednocentimetrová kyveta, do které byl umístěn roztok MO a do referenční kyvety byl předložen zásobní roztok K_2CO_3 . Naměřené hodnoty absorpce při vlnové délce 465 nm byly následně vyhodnoceny a použity k vypočtení koncentrace aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláken (Rovnice 2):

$$C' = 1300 \cdot \frac{Abs}{F} \quad (2)$$

Rovnice 2: Výpočet koncentrace amino skupin na povrchu nanovlákněné vrstvy [89]

Kde C' je počet aminoskupin [$1/nm^2$], F je plocha povrchu [cm^2] a Abs značí naměřenou absorbanci.

6.2.3.2 Metoda založená na reakci s fluorescein-isothiokyanátem

Alternativní stanovení aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláken po předchozí silylaci bylo provedeno metodou založenou na značení aminoskupin pomocí fluorescein-isothiokyanátu [90]. Adaptovaný postup je uveden níže.

Ke stanovení byl připraven zásobní roztok fluorescein-isothiokyanátu (FITC) o koncentraci 130 μM , který byl připraven odpipetováním 0,4 ml výchozího roztoku fluorescein-isothiokyanátu o koncentraci 3,239 mM do 10 ml odměrné baňky a doplněním ethanolom.

Nanovlákněná vrstva s rozměry 1×2 cm byla vložena do mikrozkušavky Eppendorf o objemu 5 ml, do které byly následně přidány 2 ml zásobního roztoku fluorescein-isothiokyanátu. Zkušavka byla uzavřena a k vyloučení fotochemického rozkladu zabalena do hliníkové fólie a umístěna na třepačku (150 ot/min.) po dobu 24 hodin.

Poté byl roztok fluorescein-isothiokyanátu pipetou odtažen a nanovlákněná vrstva byla promyta 4×3 ml ethanolu. Ke vzorkům byly přidány 3 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného připraveného rozpuštěním 0,4 g NaOH v 50 ml destilované vody. Zkušavka byla

opět zabalena do fólie a umístěna na kývačku na 1 hodinu, během které došlo k rozpuštění nanovlákně vrstvy s navázaným FITC.

Z výsledného roztoku vzniklého rozpuštěním křemičitých nanovláken značených FITC bylo přeneseno 200 μL na mikrofiltrační destičku a byla změřena výsledná fluorescence.

6.2.4 Metody charakterizace křemičitých nanovláken

6.2.4.1 Studium morfologie – skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Morfologie nanovlákně vrstvy tvořené oxidem křemičitým byla pozorována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Tescan Vega 3 (Tescan Orsay Holding, Česká republika) při použití urychlovacím napětí 20 kV. Před vlastní analýzou byly vzorky křemičitých nanovláken zvodivěny nanosením vrstvy zlata o tloušťce 3 nm v přístroji Quorum Q150RES (Quorum Technologies, Ashford, UK), takto připravený materiál byl následně použit pro vlastní analýzu.

6.2.4.2 Stanovení specifického povrchu – teoretický výpočet

Teoretický výpočet specifického povrchu byl založen na teorii popsané v [91] s využitím Rovnice 3:

$$P_{spec} = \frac{P}{M} = \frac{\pi \cdot D \cdot L}{\frac{\pi \cdot D^2}{4 \cdot L \cdot \rho}} \quad (3)$$

Rovnice 3: Rovnice pro výpočet specifického povrchu [91]

Kde P je povrch nanovláken [m^2], M je hmotnost [kg], D je průměr vlákna [m], L je délka vlákna [m], ρ je hustota zvlákněvaného roztoku [kg/m^3] a P_{spec} je specifický povrch [m^2/kg]. Rovnici lze upravit na následující tvar:

$$P_{spec} = \frac{4}{D \cdot \rho} \quad (4)$$

Rovnice 4: Rovnice pro výpočet specifického povrchu po zjednodušení [91]

6.2.4.3 Stanovení specifického povrchu pomocí dusíkové adsorpce BET

Specifický povrch křemičitých nanovláken byl stanoven pomocí adsorpce kryptonu s využitím sorpčního analyzátoru Autosorb iQ-KR/MP (Quantachrome Instruments, Florida, Spojené státy americké), který je určen k měření měrného povrchu a charakterizaci mikropórů a adsorpční BET izotermy. Křemičitá nanovláknena byla před vlastní adsorpcí

dusíku stabilizována odplyněním při teplotě 800 °C za účelem desorpce plynů sorbovaných v materiálu.

6.2.4.4 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie byla použita k prokázání imobilizace kyseliny tříslové na povrch křemičitých nanovláken.

K měření byl použit infračervený spektrometer Nicolet iZ10 (Thermo Scientific, Germany). Měření probíhalo za laboratorních podmínek, kdy byly zvlášť analyzovány vzorky křemičitých nanovláken bez předchozí modifikace (SiO₂), vzorky křemičitých nanovláken po provedené silylaci s 3-aminopropyltriethoxysilanem (SiO₂-APTES), vzorky křemičitých nanovláken modifikovaných 3% kyselinou tříslovou (SiO₂-APTES-TA) a vzorky samotné kyseliny tříslové. Měření bylo získáno infračervená absorpční spektra, která byla následně vyhodnocena.

6.2.4.5 Měření smáčivosti

Měření bylo provedeno s využitím přístroje See System E (Advex Instruments, Česká republika) a softwaru See Systém 6.0 k měření kontaktního úhlu. Testovanou kapalinou byla destilovaná voda, která byla ve formě kapky pipetou nanášena na povrch testovaného materiálu o rozměrech 3 × 3 cm. Testovaným materiálem byla křemičitá nanovláčka před a po silylační reakci a po imobilizaci kyseliny tříslové.

6.2.5 Imobilizace kyseliny tříslové

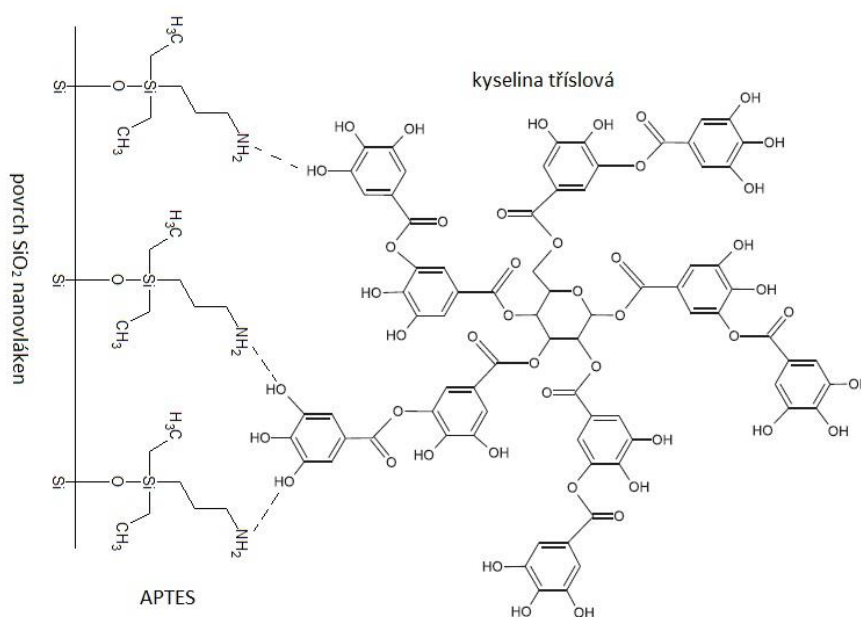
Byl připraven zásobní roztok kyseliny tříslové v požadované koncentraci (1 – 15 % hm.) rozpuštěním kyseliny tříslové v bezvodém ethanolu. Např. 1% hm. roztok kyseliny tříslové byl připraven rozpuštěním 0,500 g kyseliny tříslové v 49,5 g ethanolu.

Ke vzorkům o velikosti 2,5 × 5, 3 × 3 a 16 × 14 cm umístěným v Petriho miskách bylo přidáno 15 ml zásobního roztoku kyseliny tříslové. Petriho misky byly uzavřeny a uloženy do plastové misky, která byla následně upevněna k třepačce, jejíž rychlost byla nastavena na 350 ot/min (obrázek 26). Imobilizační reakce kyseliny tříslové (obrázek 25) probíhala za laboratorních podmínek (teploty a tlaku) při pH 5,5 – 6 po dobu 24 hodin.



Obrázek 24: Třepačka se vzorky při probíhající imobilizaci kyseliny tříslové

Reakční roztok kyseliny tříslové byl po 24 hodinách pipetou odtažen a vzorky byly promyty 3×10 ml bezvodého ethanolu. Nanovlákná s imobilizovanou kyselinou tříslovou (SiO_2 -APTES-TA) byla pinzetou přenesena na netkanou polypropylenovou textílie typu spunbond, na níž byly vzorky usušeny při laboratorní teplotě. Takto připravený materiál byl následně použit k mikrobiologickému testování, respektive k ověření antibakteriálních účinků imobilizované kyseliny tříslové.

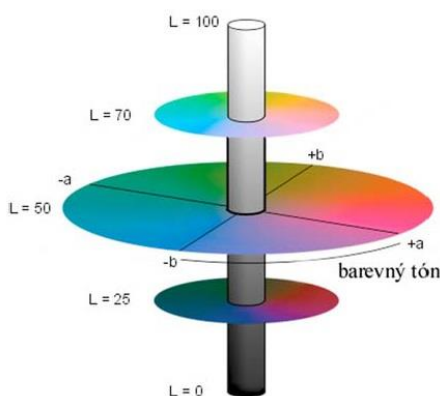


Obrázek 25: Schéma imobilizační reakce kyseliny tříslové s modifikovanými nanovláknky SiO_2 -APTES a vodíkové vazby mezi aminoskupinami na povrchu vláken a hydroxylovými skupinami kyseliny tříslové

6.2.6 Stanovení relativní koncentrace kyseliny tříslové na povrchu SiO₂ nanovláken

Vzhledem k poměrně obtížné detekovatelnosti (velmi malému množství imobilizované látky na povrchu nanovláčenného materiálu o rozměrech 3 × 3 cm a tedy zatížení velkou chybou při měření hmotnostních přírůstků) bylo stanovení koncentrace imobilizované kyseliny tříslové v nanovláčenném materiálu provedeno relativně.

Spektrofotometrické stanovení reflektance probíhalo v souřadnicovém systému CIE L* a* b* (Obrázek 26), kde parametr L* určuje světlost materiálu (jde-li o látku světlou či tmavou) a a* a b* jsou osy barevnosti, osa a* obsahuje barvy od zelené po červenou a osa b* barvy od modré po žlutou.



Obrázek 26: Model souřadnicového prostoru CIE L* a* b* [92]

Každé barvě lze přiřadit konkrétní prostorové souřadnice, čehož bylo využito ke stanovení nárůstu množství kyseliny tříslové imobilizované na povrch křemičitých nanovláčken. Vzhledem k tomu, že s narůstající koncentrací dochází k prohlubování barvy vzorku, byl sledovaným parametrem parametr L, tedy světlost materiálu. Parametry a a b nebyly sledovány, protože barevný tón se neměnil (dochází ke změně pouze v sytosti zbarvení). Detailnější informace ohledně této koloristické techniky uvádí literatura [92].

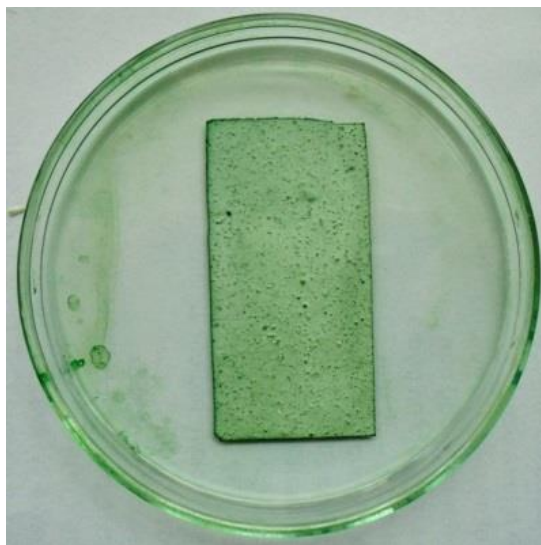
K tomuto experimentu byl použit spektrofotometr UV/VIS GBC Cintra 202 (GBC Scientific Equipment, Austrálie) a software Cintral, který byl nastaven do reflektančního režimu za použití integrační koule pro měření barevnosti pevných vzorků, kterými byla křemičitá nanovláčena s imobilizovanou kyselinou tříslovou v různých koncentracích.

6.2.7 Imobilizace chlorofylinu

K navázání chlorofylinu (sodno-měďnatého komplexu) byl použit komerčně dostupný roztok chlorofylinu (liquid chlorophyll) ve vodě o koncentraci 6,7 g/l (de Souza, Beaumont, USA).

Modifikace křemičitých nanovláken po silylaci (SiO_2 -APTES) založená na reakci mezi karboxylátovými skupinami chlorofylinu a aminoskupinami křemičitých nanovláken byla provedena v jednorázové Petriho misce následovně – do Petriho misky byla pinzetou vložena vrstva křemičitých nanovláken o velikosti $2,5 \times 5$ cm. Následně bylo pipetou přidáno 15 ml zásobního roztoku chlorofylinu a uzavřená Petriho miska byla umístěna na třepačku (350 ot/min) po dobu 60 minut při laboratorních podmínkách.

Následně byl pipetou odstraněn reakční roztok chlorofylinu a přidáno 3×10 ml ethanolu, čímž došlo k vymytí nenavázaného chlorofylu. Takto upravená nanovláčenná vrstva byla uložena na netkanou polypropylenovou textílii typu spunbond k vysušení. Připravený materiál byl použit ke kvalitativním testům antibakteriálních účinků.



Obrázek 27: Křemičitá nanovláčna po imobilizaci chlorofylinu

6.2.8 Mikrobiologické testy

6.2.8.1 Kvalitativní stanovení antibakteriálních účinků kyseliny tříslové a chlorofylinu

Ke kvalitativnímu stanovení antibakteriálních účinků nanovláčenných membrán z oxidu křemičitého s imobilizovanou kyselinou tříslovou a imobilizovaným chlorofylinem byla použita metoda: „*AATCC Test Method 147-2004 Antibacterial Activity Assesment of*

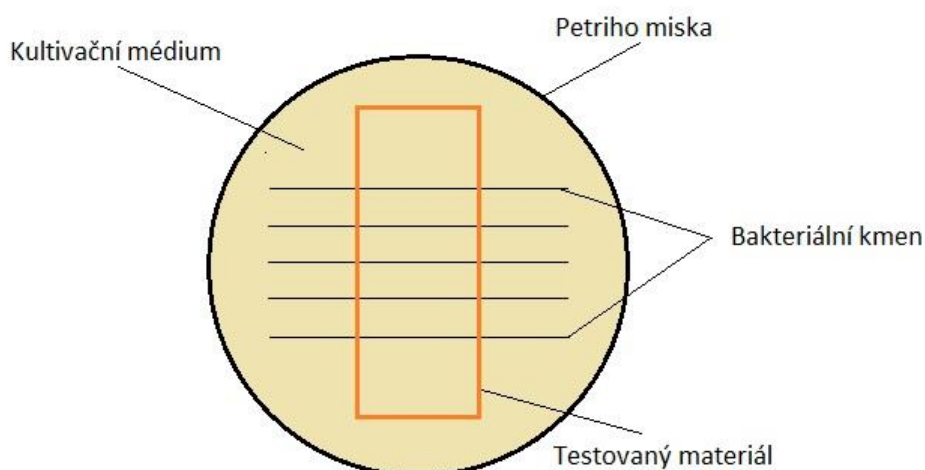
Textile Materials: Parallel Streak Method“ [93]. Tato metoda slouží k relativně rychlému stanovení antibakteriální aktivity antimikrobiálních agens imobilizovaných na textilním materiálu a je možné ji využít pro oba typy bakterií – grampozitivní i gramnegativní bakterie.

Postup

K testům byly použity dva bakteriální kmeny – grampozitivní (*Staphylococcus gallinarum*) a gramnegativní (*Escherichia coli*), které byly resuscitovány ze zmraženého stavu. Pomocí sterilní bakteriologické kličky byla přenesena jedna kulička bakteriálního kmene (použitého k testování) do lahvičky s předem teplotně stabilizovanými 100 ml bujónu. Následně bylo takto připravené médium vloženo do inkubátoru a kultivováno přes noc při teplotě 37 °C.

Tato bujónová kultura byla následně ředěna v poměru 1:10. K ředění kmene *Staphylococcus gallinarum* byl použit TSB ředěný 1:300 fyziologickým roztokem, kmen *Escherichia coli* K-12 byl ředěn pouze fyziologickým roztokem

Bakteriální kmeny byly vyočkovány na živné médium Tryptone Soya Agar (TSA) v Petriho miskách pomocí bakteriologické kličky, do které byl nabrán připravený testovací roztok bakterií (inokulum) tak, aby vytvořily pět rovnoběžných linií délky 60 mm s mezerami 10 mm uprostřed Petriho misky bez opakovaného doplňování bakteriologické kličky testovaným roztokem (Obrázek 28). Vzorky testovaného materiálu (křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou o koncentraci 1 – 15 % hm. a chlorofylinem spolu s kontrolními vzorky - křemičitá nanovlákná bez navázané kyseliny tříslové o rozměrech 50 × 25 mm) byly přiloženy do Petriho misek obsahující živné médium TSA s naočkováním bakteriálním kmenem – *Staphylococcus gallinarum* pro ověření vlivu na grampozitivní bakterie nebo *Escherichia coli* v případě gramnegativních bakterií tak, že delší strana obdélníku směřovala kolmo k rovnoběžným liniím inokula, přičemž byla umístěna přibližně do středu jednotlivých linií a nanovláknenné vzorky byly jemně přitisknuty tak, aby došlo k úplnému kontaktu s médiem.



Obrázek 28: Schematické znázornění uspořádání mikrobiologického testu pro hodnocení antibakteriálních účinků

Po 24 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C byla vyhodnocena inhibiční zóna testovacího kmene pod testovaným materiálem a v jeho okolí, která indikuje antibakteriální účinky materiálu. Následně byla vypočtena průměrná šířka inhibiční zóny dle (Rovnice 5):

$$W = \frac{(T - D)}{2} \quad (5)$$

Rovnice 5: Rovnice pro výpočet šířky inhibiční zóny pro kvalitativní test AATCC 147-2004

Kde W je inhibiční zóna [mm], T je průměr šířky inhibiční zóny včetně šířky testovaného vzorku [mm] a D je průměr šířky nanovláčenného vzorku [mm].

6.2.8.2 Kvantitativní stanovení antibakteriálních účinků kyseliny tříslové

Kvantitativní stanovení antibakteriálních účinků nanovláčenných vrstev modifikovaných kyselinou tříslovou bylo provedeno dle metody *Cornell Test (ASTM) EL2149-01 Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions* [93]. Tato testovací metoda poskytuje kvantitativní hodnocení antibakteriálního účinku testovaného materiálu na vybrané bakteriální kmeny, kterými byly v tomto případě *Staphylococcus gallinarum* a *Escherichia coli*.

Postup

1. Příprava sterilních nanovláčenných vzorků

Vzorky křemičitých nanovláčien o rozměrech 16 × 14 cm byly nastříhány na proužky o velikosti 2 × 8 cm. Bez předchozí modifikace byly vloženy do skleněných Petriho misek o průměru 20 cm a následně vloženy do sušárny Memmert VO 400

(Memmert, Německo), vytemperované na teplotu 180 °C po dobu 2 h, čímž došlo ke sterilizaci a stabilizaci nanovlákněného materiálu.

Poté byl připraven roztok 3% 3-aminopropyltriethoxysilanu, viz kapitola 6.2.2, který byl před silylační reakcí sterilizován pomocí filtrace přes membránový filtr o průměru pórů 0,1 μm za použití kompresoru KNF N838 (KNF, Německo). Bylo asepticky přidáno 30 ml sterilního roztoku APTES (sterilizováno filtrací viz výše) pomocí pipety a Petriho misky byly umístěny na třepačku Heidolph Hei-Tec (Heidolph Instruments, Německo) a ponechány po dobu 2 h při 350 ot/min. Po proběhnutí reakce byl silylační roztok pipetou odtažen a materiál promyt 3 × 10 ml ethanolu.

Připravené roztoky kyseliny tríslové o koncentraci 1 a 15 % hm. byly sterilizovány filtrací a následně odpipetovány (30 ml) do sterilních Petriho misek, do kterých byly přidány vzorky křemičitých nanovláken po silylaci. Petriho misky byly upevněny na třepačku a ponechány 24 h při rychlosti otáček 150 ot/min.

Po skončení reakce byly vzorky sterilní pinzetou přeneseny do předem vysterylizovaných Petriho misek s pečícím papírem na jejich dně. Takto připravené Petriho misky byly vloženy do sušárny vytemperované na teplotu 60 °C, ve které byly vzorky ponechány po dobu 30 minut, než došlo k jejich úplnému vysušení.

2. Testování antibakteriálního účinku

Příprava bakteriálních kmenů ze zmražených kultur *Staphylococcus gallinarum* a *Escherichia coli* je uvedena výše v kapitole 6.2.8.1. Z oživených bakteriálních kmenů byly připraveny pracovní ředění (10^5) bakteriálních kmenů *Staphylococcus gallinarum* a *Escherichia coli* dvěma na sobě navazujícími kroky. Nejdříve byla připravena koncentrace 10^8 (hodnota 1 dle McFarlanda) a následně byla tato koncentrace naředěna (10^{-3}), čímž byl získán roztok o koncentraci 10^5 . K ředění kmene *Staphylococcus gallinarum* byl použit TSB, který byl ředěn fyziologickým roztokem (1 díl TSB + 300 dílů fyziologického roztoku). Kmen *Escherichia coli* byl naředěn pomocí fyziologického roztoku.

Ředění 10^5 obou kmenů, tj. *Staphylococcus gallinarum* a *Escherichia coli*, bylo připraveno v množství 200 ml. Následně byla zkontrolována skutečná koncentrace bakteriálních kmenů tím, že byl vyočkován 1 ml na TSA v ředění (10^5), 10^5 1:10 a 10^5 1:200.

Roztok kmene *Staphylococcus gallinarum* v pracovní ředění tj. 10^5 byl asepticky pipetován sterilní pipetou po 50 ml do tří sterilních plastových uzavíratelných nádob. Do

první nádoby byla předložena nanovlákná bez navázané kyseliny tříslové, do druhé nanovlákná imobilizovaná v 1% kyselině tříslové a do třetí nanovlákná imobilizovaná v 15% kyselině tříslové. Každá nádoba byla třepána po dobu jedné minuty a následně byl vyočkován 1 ml z každé nádoby a to neředěné suspenze, suspenze v ředění 1:10 a suspenze v ředění 1:200 na TSA. V třepání suspenze bylo pokračováno po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C a rychlostí kývání 60 ot/min. Suspenze bakteriálního kmene *Staphylococcus gallinarum* byla vyočkována na TSA v intervalech po 1, 3 a 24 hodinách. Opět byl vyočkován 1ml neředěné suspenze, suspenze v ředění 1:10 a 1:200. Stejný postup byl použit pro kmen *Escherichia coli*.

Při stanovení koncentrace bakterií v suspenzi při vyočkování 1 ml suspenze na TSA byla suspenze kolébavým pohybem rovnoměrně rozprostřena po povrchu agaru. Petriho misky byly obráceny dnem vzhůru a kultivovány v kultivačním boxu přes noc při teplotě 37 °C.

Po uplynutí této doby byl odečten počet kolonií, které vytvořili přeživší bakterie. Tímto způsobem bylo možné vyhodnotit úbytek bakterií v závislosti na době působení nanovláknenného materiálu na pracovní roztok (koncentrace 10^5) bakterií.

7 Výsledky měření a diskuze

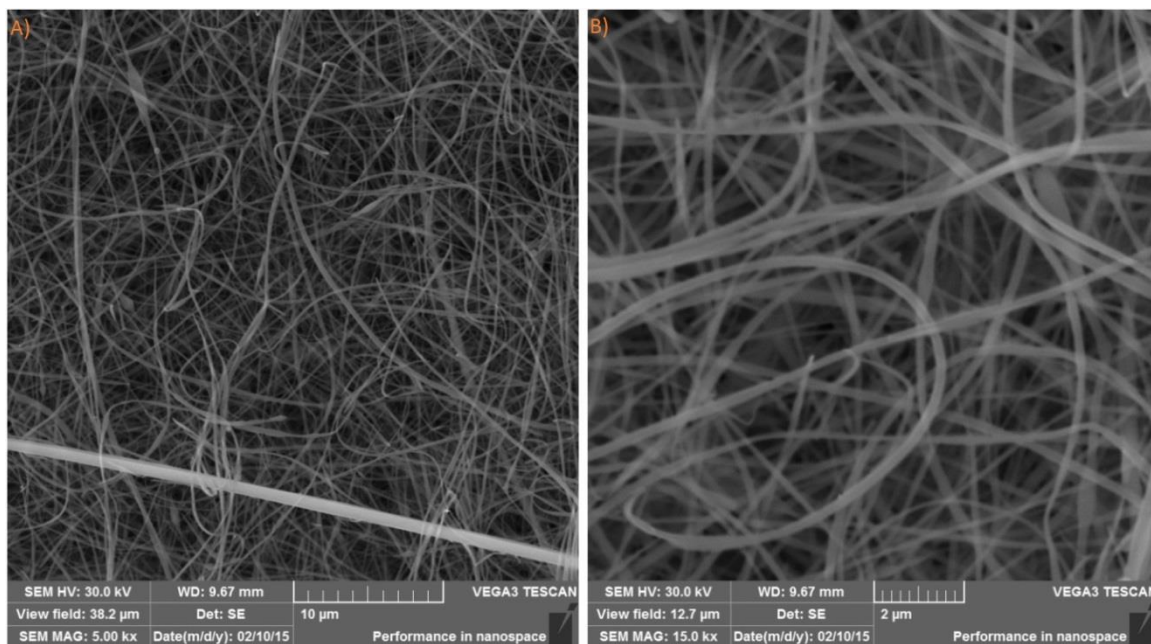
7.1 Morfologie křemičitých nanovláken

Snímky nanovláknenných vzorků tvořených křemičitými nanovláknny před modifikací APTES z elektronového mikroskopu (Obrázek 29) dokazují uniformitu nanovláknenného materiálu připraveného elektrostatickým zvlákňováním. Problémy při výrobě a následný vznik nehomogenit ve zvlákňovaném materiálu jsou dány vysokou citlivostí výchozího solu na vzdušnou vlhkost a pracovní teplotu. Jak se ukázalo při prováděných silylačních reakcích, kvalita vzorku zásadně ovlivňuje výtěžnost silylační reakce (dochází k rozdílů v počtu navázaných aminoskupin při použití materiálu z okrajů a ze středu použité tkaniny), a proto je nutné s ohledem na srovnatelnost výsledků provádět veškerá stanovení se stejnou šarží materiálu (tzn. vybírat stejné místo pro odběr vzorku pro všechny testy, nepoužívat okraje materiálu). Problémy s výskytem nehomogenit ve zvlákňovaném materiálu by bylo možné částečně odstranit použitím klimatizační jednotky, která zajistí konstantní pracovní podmínky po celou dobu výroby nanovláknenného materiálu. Dalším problémem výrobního procesu je také stárnutí či zrání výchozího solu, což může také ovlivňovat kvalitu vyrobené nanovláknenné vrstvy.

Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu (Obrázek 29) ukazuje morfologii nanovláknenné membrány, která je tvořena nanovláknny SiO₂ kruhového průřezu s průměrem 200 ± 30 nm. Vlastnosti tohoto materiálu se částečně podobají vlastnostem silikagelu, tzn. nanovláknna jsou odolná vůči teplotě až do teploty jejich stabilizace (180 °C) bez ovlivnění jejich charakteristik. Struktura materiálu po provedené silylaci pomocí APTES (Obrázek 30) se téměř nezměnila, zůstala tedy zachována nanovláknenná struktura materiálu s průměrem vláken 200 ± 70 nm a došlo jen k velmi malé degradaci nanovláknenné vrstvy. Toto zjištění je zásadní pro další použití nanovláknenného materiálu jako nosného média pro imobilizaci účinných agens, v tomto případě pro imobilizaci přírodních látek, tj. kyseliny tříslové a chlorofylinu, vzhledem k zachování velkého specifického povrchu nanovláknenného materiálu.

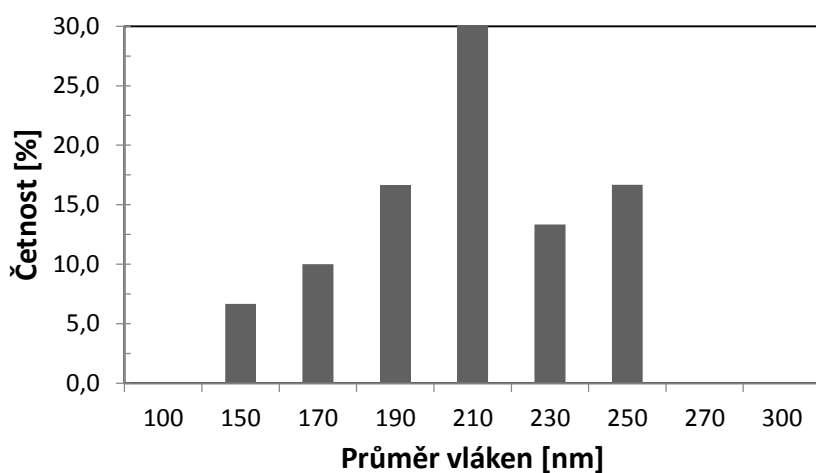
Výsledky po provedené imobilizaci kyseliny tříslové (Obrázek 31) rovněž potvrdily, že nedošlo k téměř žádným změnám morfologie nanovláknenné vrstvy, přičemž průměr vláken zůstal zachován 200 ± 60 nm. Zachování nanovláknenné struktury křemičitých nanovláken během celého procesu modifikace je dáno především díky použití

bezvodých rozpouštědel či rozpouštědel s velmi malým obsahem vody (absolutní ethanol a 96% ethanol), čímž bylo vyloučeno hydrolytické působení vody, která by mohla způsobit degradaci nanovláken. Bylo tak prokázáno, že žádná z provedených modifikací (silylace či imobilizace) zásadně neovlivňuje morfologii křemičitých nanovláken a původní charakteristiky nanovláčenného materiálu jako jsou průměr vláken, specifický povrch a porozita zůstávají zachovány.

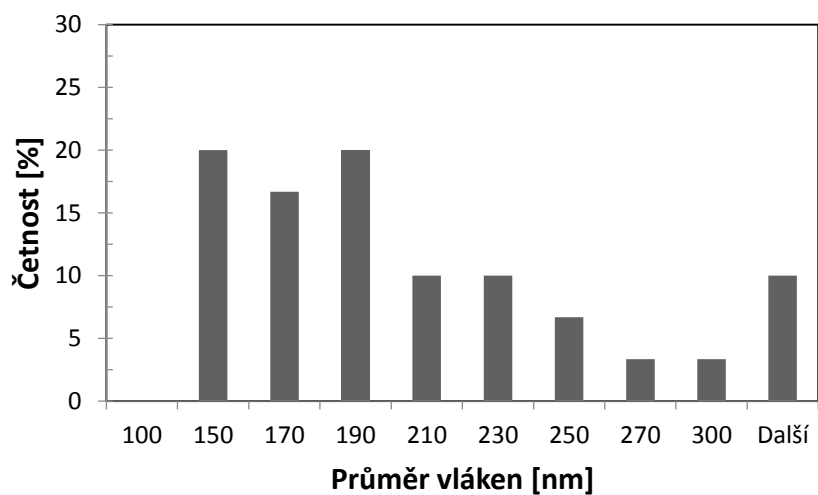


Obrázek 29: Nanovláčka SiO_2 připravená pomocí elektrostatického zvlákňování, snímky ze SEM zvětšení 5kx (A) a 15kx (B)

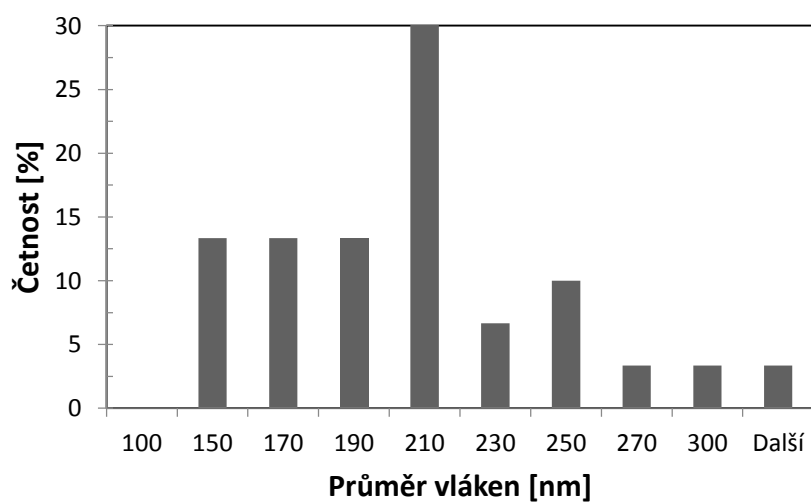
Histogramy zobrazující zastoupení jednotlivých průměrů nanovláken ve vzorcích před, po silylační reakci a po imobilizaci kyseliny tříslové jsou zobrazeny níže (Graf 1, Graf 2 a Graf 3). Jednotlivá zastoupení průměrů ve vzorcích se mírně odlišují četností jednotlivých průměrů ve vzorku, což je způsobeno ne zcela homogenní vrstvou nanovláčenného materiálu použitého k testování. Tato nehomogenita se projeví i při měření totožného vzorku na více místech, čímž lze vysvětlit, že procentuální zastoupení se spolu se změnou místa měření částečně liší. Změny ve všech případech jsou však pouze minimální jak u křemičitých nanovláken před a po silylaci, tak i po imobilizaci kyseliny tříslové nedošlo k výraznému posunu hodnot s maximálním zastoupením průměrů ve vzorku – nejvyšší zastoupení v křemičité vrstvě mají vlákna s průměrem 190 – 210 nm.



Graf 1: Zastoupení jednotlivých průměrů nanovláken ve vzorku křemičitých nanovláken bez povrchové úpravy



Graf 2: Zastoupení průměrů nanovláken ve vzorku křemičitých nanovláken po provedené silylaci pomocí 3-aminopropyltriethoxysilanu



Graf 3: Zastoupení průměrů ve vzorku křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslvou po předchozí modifikaci APTES

7.2 Specifický povrch nanovláknenné vrstvy tvořené oxidem křemičitým

Specifický povrch křemičitých nanovláken byl vypočten dle rovnice Rovnice 3, do které byly dosazeny hodnoty pro průměr nanovláken (D) 200 nm a za hustotu křemičitého nanovlákn (ρ) byla dosazena hodnota $2\,300\text{ kg/m}^3$, která je udána u komerčně dostupných křemičitých nanovláken vyráběných společností Mempro (USA), viz [94].

$$P_{spec} = \frac{4}{200 \cdot 10^{-9} \cdot 2000} = 10\text{ m}^2/\text{g}$$

Hodnota takto vypočteného specifického povrchu nanovláknenné vrstvy křemičitých nanovlákn byla $10\text{ m}^2/\text{g}$.

Hodnota takto vypočteného specifického povrchu nanovláknenné vrstvy křemičitých nanovlákn byla $10\text{ m}^2/\text{g}$. Vzhledem k nemožnosti změřit specifický povrch křemičitých nanovláken pomocí dusíkové adsorpce do teploty stabilizace $180\text{ }^\circ\text{C}$, nemožnost odplynění), byla stabilizace a odplynění provedeno při teplotě $800\text{ }^\circ\text{C}$, čímž mohlo dojít ke změnám struktury křemičitých nanovláken, především ke změnám povrchových vrstev – snížení koncentrace hydroxylových skupin na povrchu a s tím také snížení hydrofility materiálu. Nicméně, výsledný specifický povrch získaný dusíkovou adsorpcí s využitím BET izotermy měl po zprůměrování dvou měření hodnotu $9,9\text{ m}^2/\text{g}$, což velmi dobře koresponduje s vypočtenou hodnotou.

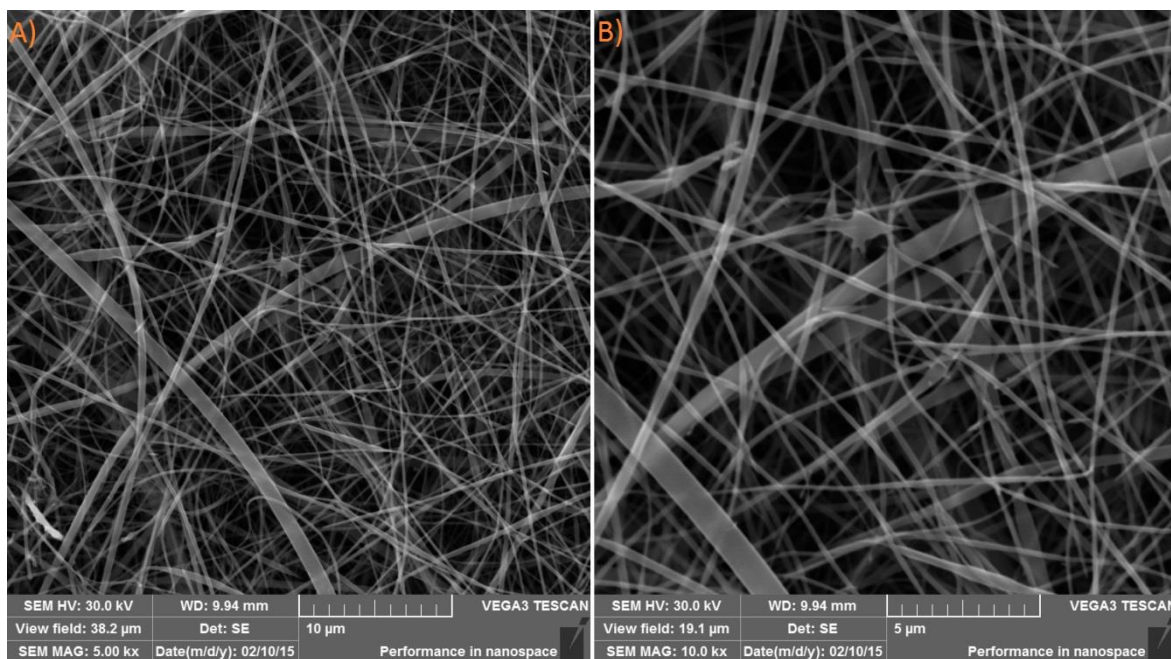
7.3 Modifikace křemičitých nanovláken silylačním činidlem APTES

Modifikace povrchu SiO_2 nanovláken byla provedena za účelem navázání vhodných funkčních skupin ($-\text{NH}_2$), které by mohly být dále využity pro imobilizaci přírodních látek. K modifikační reakci byl vybrán 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES), který je pro silylační reakce jedním z nejčastěji využívaných. Při silylační reakci bylo sledováno několik reakčních parametrů, které mohou reakci výrazně ovlivňovat. Jedná se o koncentraci silylačního činidla APTES, dobu silylační reakce a teplotu, při které reakce probíhala. Tyto parametry ovlivňovaly výslednou koncentraci aminoskupin kovalentně navázaných na povrch křemičitých nanovláken. Detailní přehled získaných výsledků je uveden v následujících kapitolách.

7.3.1 Vliv koncentrace silylačního činidla (APTES) na koncentraci navázaných aminoskupin

Sledována byla koncentrace kovalentně navázaných aminoskupin na povrch vrstvy nanovláken oxidu křemičitého po provedené reakci s APTES v závislosti na koncentraci silylačního činidla použitého k modifikaci. Dle dostupných publikací, které se zabývaly modifikací křemičitých povrchů, byla zvolena koncentrační škála v rozmezí koncentrací 1 - 10 % obj. APTES v ethanolu. Konkrétně byly k modifikaci křemičitých nanovláken připraveny roztoky APTES o koncentracích 1, 3, 5, 8 a 10 %. Postup provedení silylační reakce je popsán v kapitole 6.2.2.

Obrázek 30 dokumentuje strukturu křemičitých nanovláken po silylaci. Nejsou zde patrné žádné výrazné změny v morfologii, což potvrzuje stabilitu materiálu v bezvodém prostředí, viz kapitola 7.1.



Obrázek 30: Nanovláknina SiO₂ připravená elektrostatickým zvlákněním po reakci APTES, snímky ze SEM, zvětšení 5kx (A) a 10kx (B)

Vzhledem ke specifickým vlastnostem nanovláčenného materiálu tvořeného křemičitými nanovláčky neexistuje mnoho dostatečně citlivých reakcí – většina popsanych analytických metod vhodných ke stanovení aminoskupin je pouze kvalitativních, což je pro účely stanovení koncentrace nedostatečné. Z těchto důvodů byly k zjištění koncentrace aminoskupin adaptovány analytické metody založené na stanovení koncentrace organických barviv, která se vážou na aminoskupiny na povrchu materiálu a jejichž postup

je s určitými omezeními aplikovatelný také pro nanovláknenné materiály. Byly vybrány dvě spektrofotometrické metody – metoda popsaná Hartwigem [89] založená na stanovení koncentrace methyloranže a metoda využívající reakce s fluorescein-isothiokyanátem [90]. Nevýhodou těchto metod je omezení počtu detekovatelných aminoskupin na povrchu, které je dáno maximální hustotou obsazení povrchu nanovláken molekulami methyloranže či fluorescein-isothiokyanátu.

Postup měření je popsán v kapitole 6.2.3.1 a naměřené výsledky absorbance methyloranže při vlnové délce 465 nm v závislosti na koncentraci silylačního činidla uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Vliv koncentrace silylačního činidla APTES na výsledný počet aminoskupin na povrchu SiO₂ nanovláken (pozn. naměřené hodnoty absorbance byly získány měřením roztoků MO, které byly 10×zředěny)

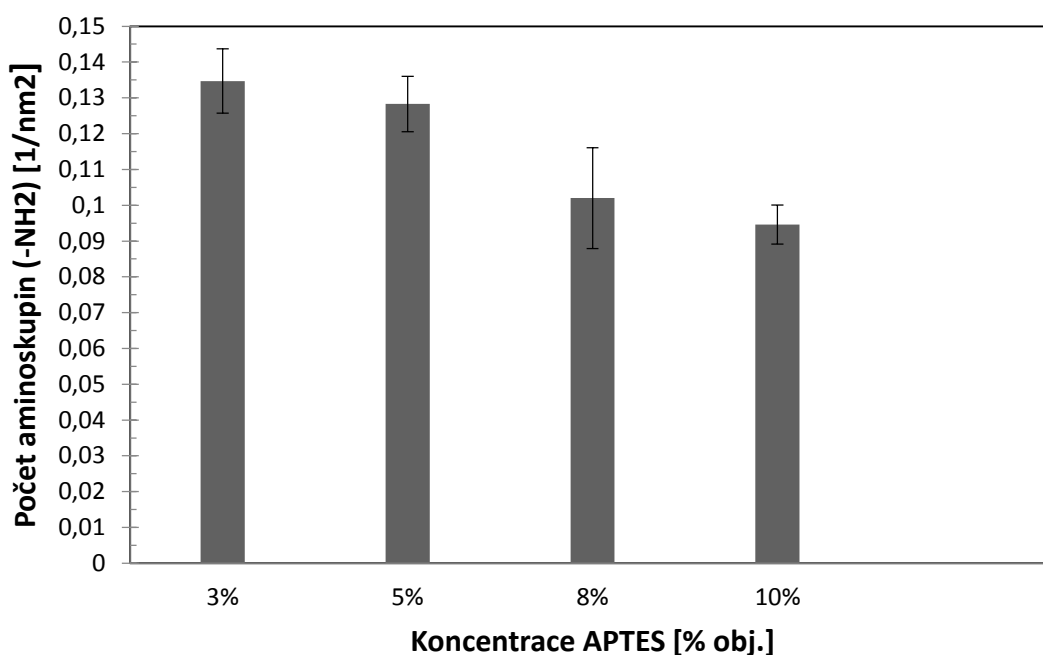
Koncentrace APTES [% obj.]	Naměřená absorbance ($\lambda=465$ nm)						Počet aminoskupin [1/nm ²]
	Číslo měření					Průměr	
	1	2	3	4	5		
0	0,1487	0,1398	0,1289	0,1377	0,1157	0,13 ± 0,01	-
1	0,4245	0,5734	0,3924	0,4293	0,5127	0,47 ± 0,07	0,04 ± 0,01
3	1,151	1,2044	1,0782	1,2647	1,1532	1,17 ± 0,06	0,14 ± 0,01
5	1,1116	1,3107	0,96318	1,1021	1,118	1,12 ± 0,11	0,13 ± 0,01
8	0,873	0,9914	0,9275	0,9253	0,8766	0,92 ± 0,04	0,10 ± 0,01
10	0,7634	0,8013	0,9784	0,9998	0,7667	0,86 ± 0,10	0,10 ± 0,01

Z výsledků je patrné, že nejvyšší koncentrace aminoskupin, která je úměrná koncentraci methyloranže navázané na povrch nanovláknenného materiálu, bylo dosaženo při použití APTES o koncentracích 3 a 5 %.

Výpočet koncentrace aminoskupin byl proveden dle Rovnice 2 s tím, že od naměřené absorbance byla nejprve odečtena absorbance slepého vzorku (vzorek bez modifikace APTES) a následně byla tato absorbance vynásobena deseti (byly měřeny 10 × zředěné roztoky MO).

Z výsledků je patrné (Graf 4), že existuje mezní koncentrace silylačního činidla (5 %), nad kterou již nedochází ke zvýšení počtu detekovatelných aminoskupin. Příčiny pozorování tohoto limitu mohou být dvě. Při reakci s APTES v koncentraci od 3 % výše již zreagují veškeré dostupné hydroxylové skupiny na povrchu a další nárůst koncentrace silylačního činidla se již neprojevívá. Druhou možností je, že se zvyšující se koncentrací APTES dojde k navázání takového množství aminoskupin na povrch křemičitých

nanovláken, že metoda založená na reakci s methyloranží již není schopná tyto skupiny detekovat vzhledem k omezení počtu navázané methyloranže dané sterickými nároky molekuly barviva. Mírný pokles naměřené absorbance u nanovláken, modifikovaných z roztoku o různé koncentraci APTES, je nejspíše dán rozdíly v morfologii (homogenitě) nanovláčenného materiálu použitého k testování.



Graf 4: Závislost počtu aminoskupin na koncentraci silylačního činidla APTES

7.3.2 Vliv doby silylační reakce na koncentraci navázaných aminoskupin

Na základě výsledků měření počtu navázaných aminoskupin v závislosti na koncentraci silylačního činidla (viz výše) bylo pro další experimenty zvoleno použití 3-aminopropyltriethoxysilanu v koncentraci 3 %.

Silylační reakce s 3% roztokem APTES byla sledována v intervalech 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 a 150 minut, kdy byl pro každý časový interval připraven jeden vzorek křemičitých nanovláken, u kterého byl následně spektrofotometricky (MO) stanoven počet aminoskupin. Přehled naměřených hodnot absorbance a výsledné koncentrace aminoskupin na povrchu modifikovaných nanovláken uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Závislost počtu aminoskupin na době silylační reakce pomocí 3% roztoku APTES

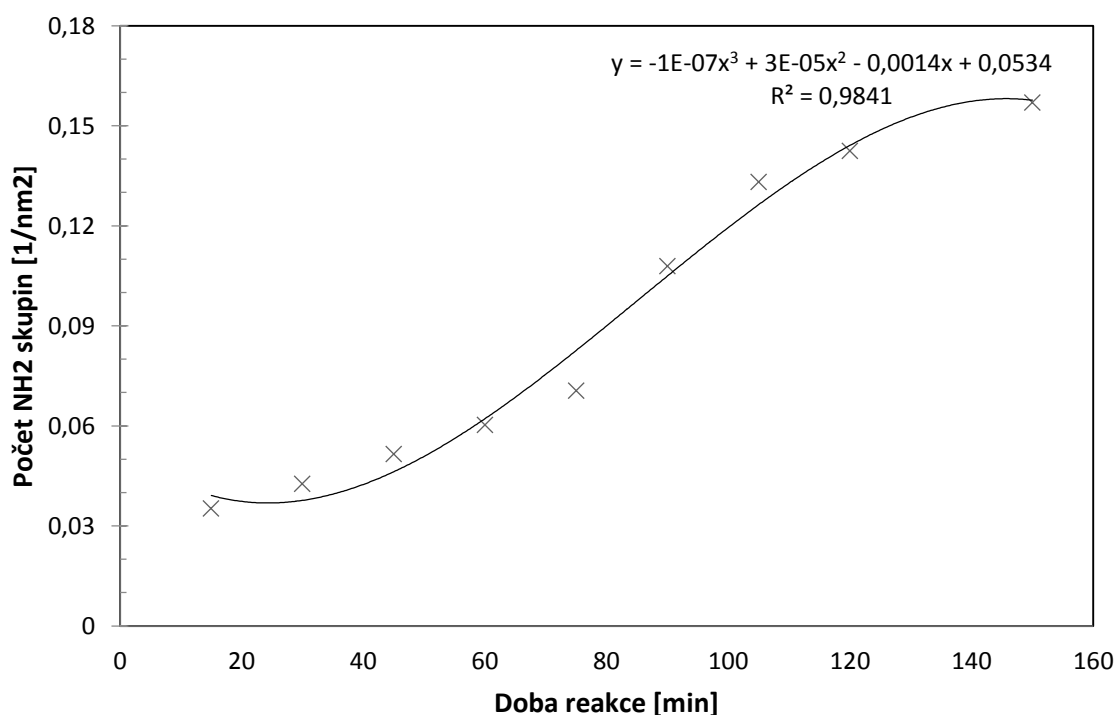
pozn. naměřené hodnoty absorbancí byly získány měřením roztoků MO, které byly 10× zředěny

Číslo měření	Naměřená absorbance / Čas reakce [min]								
	15	30	45	60	75	90	105	120	150
1	– *	0,3463	– *	0,5832	– *	0,742	– *	0,9616	– *
2	0,2232	0,3146	0,4254	0,5979	0,3283 **	0,819	– *	1,1497	1,197
3	0,3188	0,3235	0,3684	0,2109 **	0,7576	0,9301	1,0246	1,1759	1,2178
Průměr	0,27 ± 0,05	0,33 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,46 ± 0,18	0,54 ± 0,21	0,83 ± 0,08	1,02 ± 0	1,10 ± 0,10	1,21 ± 0,01
Počet aminoskupin [1/nm ²]	0,036 ± 0,006	0,043 ± 0,002	0,052 ± 0,004	0,061 ± 0,024	0,071 ± 0,028	0,109 ± 0,010	0,135 ± 0	0,144 ± 0,014	0,158 ± 0,001

Vysvětlivky: *...nebylo měřeno, **...výrazná odchylka od ostatních hodnot, která je nejspíše dána nehomogenitami v nanovlákně vrstvě SiO₂ (vzorky připravené z okrajů materiálů získaných elektrostatickým zvlákňováním)

Graf 5 znázorňuje nárůst počtu aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláken s prodlužující se dobou silylační reakce. Z grafu je možno odečíst, že počet aminoskupin nejprve pozvolna narůstá (doba reakce 0 – 60 minut) a následně dojde k výraznějšímu nárůstu aminoskupin (doba reakce mezi 60 – 120 minut), nakonec dochází ke zpomalování nárůstu koncentrace kovalentně navázaných aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláken (doba reakce 120 – 150 minut).

Zpomalování derivatizační reakce je dáno především obsazením nejsnáze přístupných hydroxylových skupin pro modifikaci APTES vzhledem k jejich omezenému počtu. Počet hydroxylových skupin je určen především teplotou a dobou stabilizace nanovláčenného materiálu. Vzhledem k tomu, že s nárůstajícím časem již nárůst koncentrace pro potřeby imobilizace kyseliny tříslové nebo chlorofylinu na povrch nanovláčenné struktury není zásadní, byla pro následující experimenty prováděna derivatizace při době reakce 120 minut.



Graf 5: Závislost koncentrace aminoskupin na době silylační reakce pomocí 3% roztoku APTES

7.3.3 Vliv teploty silylační reakce na koncentraci aminoskupin

Dalším sledovaným parametrem při silylační reakci křemičitých nanovláken s APTES byla teplota. Byly vyzkoušeny dva odlišné postupy derivatizace se sledováním vlivu teplotního režimu na reakci. První – zahřívání reakční směsi po celou dobu silylační

reakce (120 minut) a druhý – krátké zahřátí reakční směsi (15 minut) s následným chlazením při laboratorní teplotě.

Silylace za konstantní teploty probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.2 při dvou vybraných teplotách 22,5 °C a 40 °C. Počet navázaných aminoskupin byl stanoven reakcí s methyloranží postupem uvedeným v kapitole 6.2.3.1. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách. Naměřené hodnoty při reakci za konstantní teploty uvádí Tabulka 4, výsledky při reakci s počátečním zahřátím a následným samovolným ochlazováním reakční směsi uvádí Tabulka 5.

Tabulka 4: Naměřená absorbance při silylačních reakcích probíhající při dvou různých teplotách ¹

Teplota reakce [° C]	Číslo měření/Absorbance		Průměrná hodnota absorbance	Počet aminoskupin [1/nm ²]
	1.	2.		
22,5	1,1543	1,0895	1,12 ± 0,03	0,147 ± 0,004
40,0	0,08275	0,0785	0,081 ± 0,002	0,011 ± 0,001

Tabulka 5: Naměřená absorbance pro silylační reakci, která probíhala s patnáctiminutovým zahřevem ¹

Teplota [°C]	Číslo měření/Absorbance		Průměrná hodnota absorbance	Počet aminoskupin [1/nm ²]
	1.	2.		
30	0,420099	0,401275	0,411 ± 0,009	0,53 ± 0,01
45	0,3127	0,3271	0,320 ± 0,007	0,42 ± 0,01
60	0,3248	0,3098	0,317 ± 0,008	0,41 ± 0,01

Z výsledků získaných při reakci za konstantní teploty (Tabulka 4) je zcela zřejmé, že zvyšování teploty při modifikaci křemičitých nanovláken silylačním činidlem APTES není, vzhledem k velmi nízké výsledné koncentraci aminoskupin v modifikovaném materiálu, vhodné. Počet aminoskupin v modifikované nanovláčenné vrstvě křemičitých nanovláken byl při laboratorní teplotě více než čtrnáctkrát vyšší než při reakci, která probíhala za zvýšené teploty.

K obdobnému závěru vedou i výsledky silylační reakce prováděné s počátečním zahřátím reakční směsi na 30, 45 nebo 60 °C. V těchto případech není pokles kovalentně navázaných aminoskupin tak výrazný jako u postupu se 120 minutovým zahříváním.

Možnou příčinou tohoto chování při vzrůstající teplotě silylační reakce může být hydrolyza 3-aminopropyltriethoxysilanu, která probíhá za zvýšené teploty rychleji než při laboratorní teplotě. Činidlo po hydrolyze již nemůže reagovat s hydroxylovými skupinami

¹ naměřené hodnoty absorbancí byly získány měřením roztoků MO, které byly 10× zředěny

na povrchu SiO₂ nanovláken, což vede k poklesu počtu modifikovaných hydroxylových skupin na povrchu křemičitých nanovláken.

7.3.4 Optimální podmínky silylační reakce

V souladu s daty získanými za různých reakčních podmínek (viz kapitola 7.3.1 až 7.3.3), které jak se ukázalo, výrazně ovlivňují průběh reakce křemičitých nanovláken se silylačním činidlem APTES, byly stanoveny optimální podmínky reakce s cílem maximalizovat koncentrační výtěžek aminoskupin po silylaci.

Jako optimální bylo vybráno použití silylačního činidla o koncentraci 3 % obj. APTES v ethanolu, kdy byl zjištěn (obdobně jako při reakci s 5% roztokem) nejvyšší počet aminoskupin po reakci. Optimální délka reakce byla stanovena na dvě hodiny, a to vzhledem k tomu, že poté již nedocházelo k výraznému nárůstu koncentrace aminoskupin. Teplota byla zásadním reakčním parametrem, nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při laboratorní teplotě (bez zahřívání reakční směsi) pouze s nepřetržitým mícháním reakční směsi.

7.4 Fluorescenční stanovení koncentrace aminoskupin

Výsledky získané metodou značení pomocí fluorescein-isothiokyanátu (postup viz kapitola 6.2.3.2) a následným měřením fluorescence uvádí Tabulka 6.

Tabulka 6: Výsledky fluorescence a koncentrace aminoskupin v závislosti na použité koncentraci silylačního činidla

Koncentrace APTES	Fluorescence	Koncentrace -NH ₂ [μM/L]	Koncentrace -NH ₂ [μM/g]
1%	1064 ± 0	4,90	4,08
3%	1156 ± 7	5,74	4,78
5%	1033 ± 31	4,62	3,85
8%	1323 ± 1	7,27	6,06
10%	1226 ± 6	6,33	5,28

Získané výsledky nekorespondují s výsledky získanými metodou založenou na reakci aminoskupin s methyloranží, z dat nelze nalézt vztah mezi koncentrací APTES a počtem kovalentně navázaných aminoskupin. Měření bylo provedeno pouze jedenkrát s každým vzorkem, čímž může být dána poměrně velká nepřesnost vlivem nehomogenit ve vzorcích. Pro přesnější stanovení by bylo nutné zopakovat měření s většími navážkami nanovláken z různých míst zvlákněného materiálu. Vzhledem k vysoké citlivosti

fluorescenčního měření bude nutné věnovat větší pozornost promytí vzorku, aby se zabránilo zkreslení výsledků fluorescencí pocházející z fluorescein-isothiokyanátu nenavázaného chemicky na nanovláknový materiál.

7.5 Imobilizace kyseliny tříslové

Kyselina tříslová byla imobilizována na předem modifikovaná křemičitá nanovláknina (SiO_2 -APTES) dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.5. Pro imobilizaci byly použity roztoky kyseliny tříslové v koncentracích 1, 3, 5, 10 a 15 % hmotnostních. Kyselina tříslová byla imobilizována na vzorky o rozměrech 3×3 cm, které byly použity pro kvalitativní testy antibakteriálních účinků, a na vzorky s rozměry 16×14 cm, které byly použity ke kvantitativním testům. U vzorků připravených pro kvantitativní testy antibakteriálních účinků kyseliny tříslové byla vážkově stanovena koncentrace imobilizované kyseliny po modifikaci 1 a 15% roztokem v ethanolu (Tabulka 7, Tabulka 8).

Stanovení množství imobilizované kyseliny tříslové u vzorků připravených pro antibakteriální testy bylo provedeno diferenčním vážením materiálu před a po navázání kyseliny tříslové. Toto bylo možné vzhledem k tomu, že velikost vzorku pro antibakteriální testy byla mnohem větší, tj. 16×12 cm, a naměřené hodnoty tedy nebyly zatíženy velkou chybou měření.

Tabulka 7: Výsledky měření hmotnosti nanovláken před silylací (SiO_2), po silylací (SiO_2 -APTES) a po imobilizaci kyseliny tříslové (SiO_2 -APTES-TA) z 1% roztoku kyseliny tříslové

Měření	SiO_2 [g]	SiO_2 -APTES [g]	SiO_2 -APTES-TA [g]
1.	0,3888	0,4051	0,4542
2.	0,4079	0,4892	0,5615
Průměrná hodnota	0,3984	0,4472	0,5079
Nárůst hmotnosti Δm	-	0,0488	0,0607
Koncentrace kyseliny tříslové [mg/cm ²]	-	-	0,2710

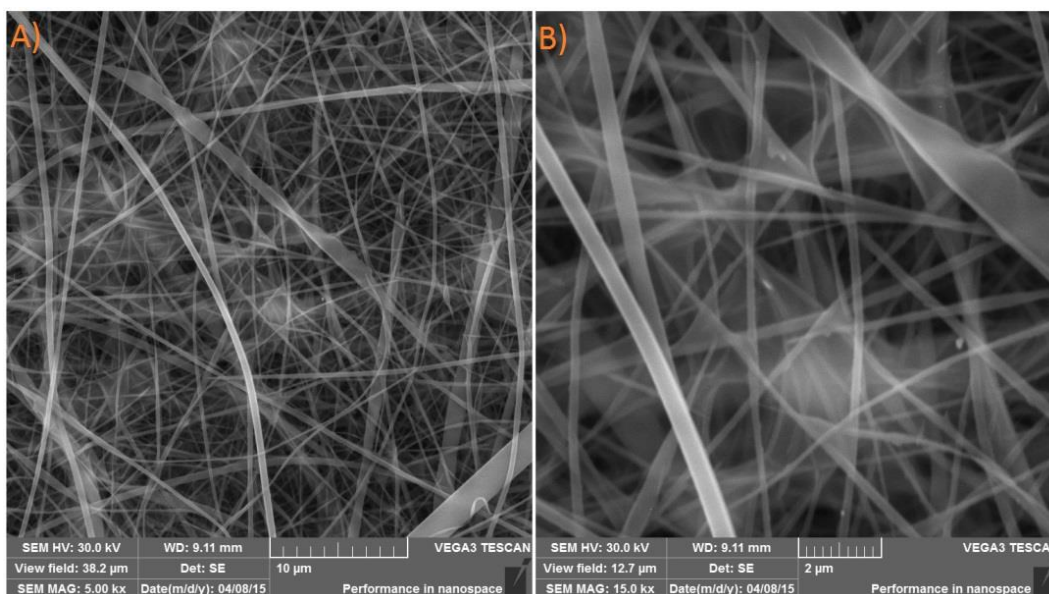
Tabulka 8: Výsledky měření hmotnosti nanovláken před silylací (SiO_2), po silylací ($\text{SiO}_2\text{-APTES}$) a po imobilizaci kyseliny tříslové ($\text{SiO}_2\text{-APTES-TA}$) z 15% roztoku kyseliny tříslové

Měření	SiO_2 [g]	$\text{SiO}_2\text{-APTES}$ [g]	$\text{SiO}_2\text{-APTES-TA}$ [g]
1.	0,3970	0,4282	0,9073
2.	0,3852	0,4073	0,7256
Průměrná hodnota	0,3911	0,4178	0,8165
Nárůst hmotnosti Δm	-	0,0267	0,3987
Koncentrace kyseliny tříslové [mg/cm ²]	-	-	1,7799

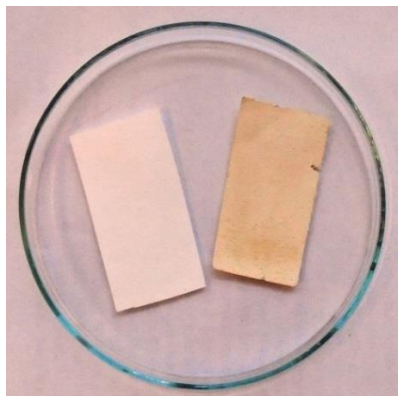
pozn. Záměrně nebyla vypočtena směrodatná odchylka a provedeno zaokrouhlení vzhledem k velmi malým odchýlkám hodnot

Výsledky ukazují, že množství navázané kyseliny tříslové na povrchu křemičitých nanovláken vzrůstá s rostoucí koncentrací roztoku kyseliny tříslové použitého k imobilizaci. Množství ve vzorku po imobilizaci kyseliny tříslové z 15% roztoku více než 6,5× větší než při použití 1% roztoku.

Nanovláknenná struktura materiálu zůstala nezměněna i po provedené imobilizační reakci, což je patrné při srovnání snímků z elektronového mikroskopu (Obrázek 30, Obrázek 31). Vzhledem k tomu, že imobilizace probíhala v bezvodém ethanolu, nedocházelo k nežádoucí hydrolyze nanovláknenné vrstvy, která u imobilizačních reakcí s křemičitými nanovláknem bývá častým problémem.



Obrázek 31: Nanovláknenná vrstva tvořená křemičitými nanovláknem po imobilizaci kyseliny tříslové ($\text{SiO}_2\text{-APTES-TA}$), snímky ze SEM při zvětšení 10kx (A) a 15kx (B)

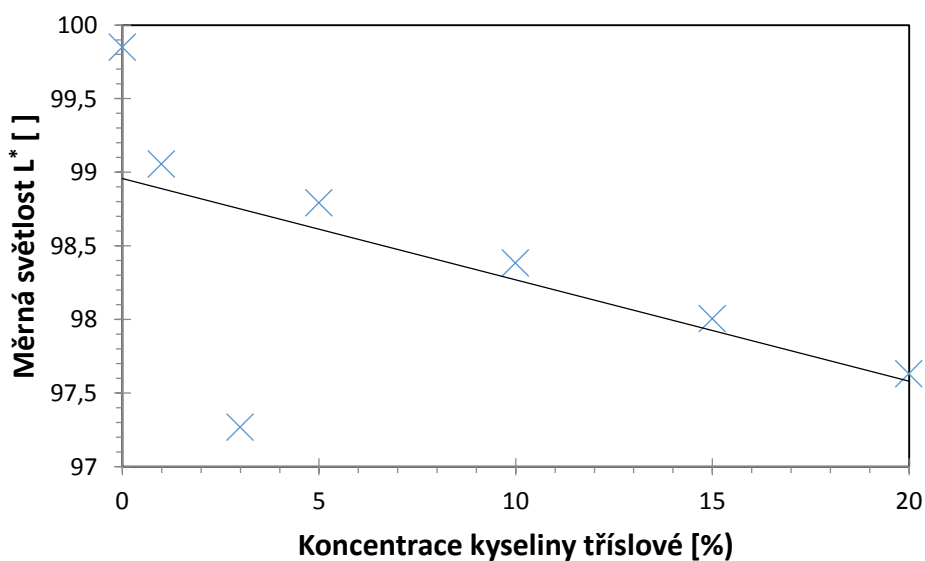


Obrázek 32: Snímek křemičitých nanovláken po provedené silylační reakci (vlevo) a po immobilizaci kyseliny tříslové (vpravo)

Po immobilizační reakci s kyselinou tříslovou dojde k zabarvení materiálu (Obrázek 32) do světle žluté až hnědé barvy (barva roztoku kyseliny tříslové), čehož bylo využito ke stanovení relativního množství navázaného taninu na nanovláčném nosiči v závislosti na koncentraci roztoku kyseliny tříslové použité k immobilizaci, viz níže.

7.6 Stanovení relativní koncentrace immobilizované kyseliny tříslové

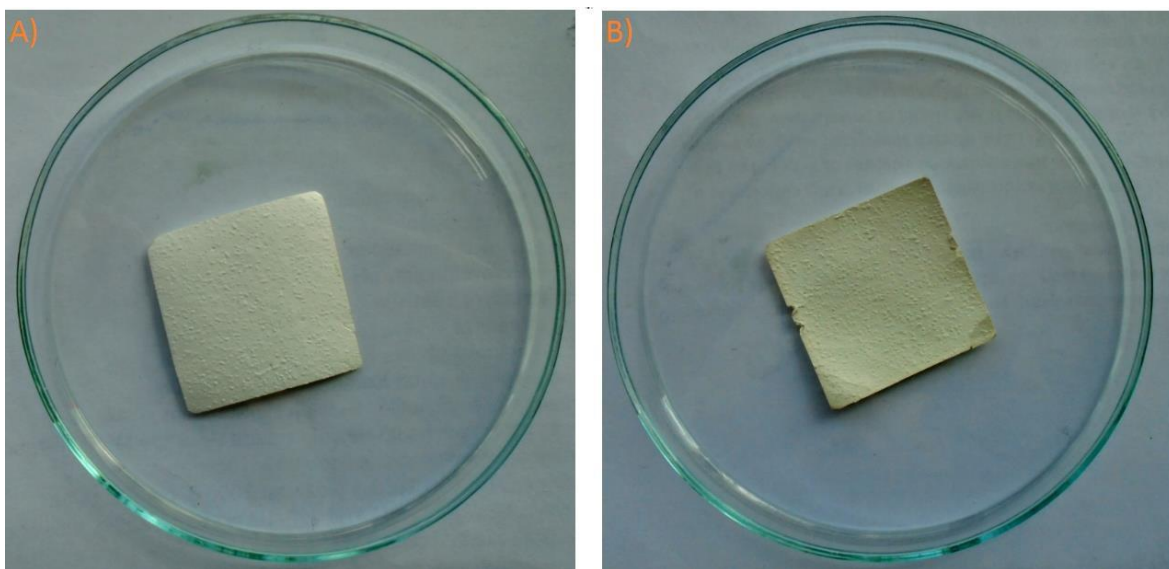
Byla proměřena řada vzorků křemičitých nanovláken získaných immobilizací v roztocích kyseliny tříslové o koncentracích 0 – 20 % hm. Výsledky získané měřením barevnosti pomocí reflektance v souřadnicovém systému CIE $L^*a^*b^*$ jsou znázorněny v následujícím grafu.



Graf 6: Závislost světlosti materiálu na koncentraci roztoku kyseliny tříslové použitého k její immobilizaci na povrch křemičitých nanovláken upravených 3-aminopropyltriethoxysilanem

Z grafu je patrný lineární pokles světlosti, kde hodnota 100 na ose měrné světlosti znázorňuje absolutně bílou barvu. Odchyłka počáteční hodnoty (0 %) od ostatních je nejspíše dána tím, že se jedná o vzorek bez navázané kyseliny tříslové (křemičitá nanovlákná po silylaci). Imobilizační reakce mohla způsobit drobné změny v morfologii nanovláken, a tím také změnu reflektance materiálu, což mohlo být příčinou odchyłky světlosti vzorků bez imobilizované kyseliny tříslové. Odlehlost hodnoty světlosti pro vzorek 3 % lze vysvětlit možnou nehomogenitou materiálu.

Z naměřených hodnot je patrné, že úbytek světlosti je přímo úměrný koncentraci roztoků kyseliny tříslové použitých při imobilizaci. Změna hloubky zabarvení v závislosti na koncentraci použitého roztoku kyseliny tříslové je patrná z Obrázek 33.



Obrázek 33: Srovnání nanovláknenné vrstvy tvořené nanovláknny SiO_2 po imobilizaci kyseliny tříslové z roztoku o koncentraci 1 % (A) a 20 % hm. (B)

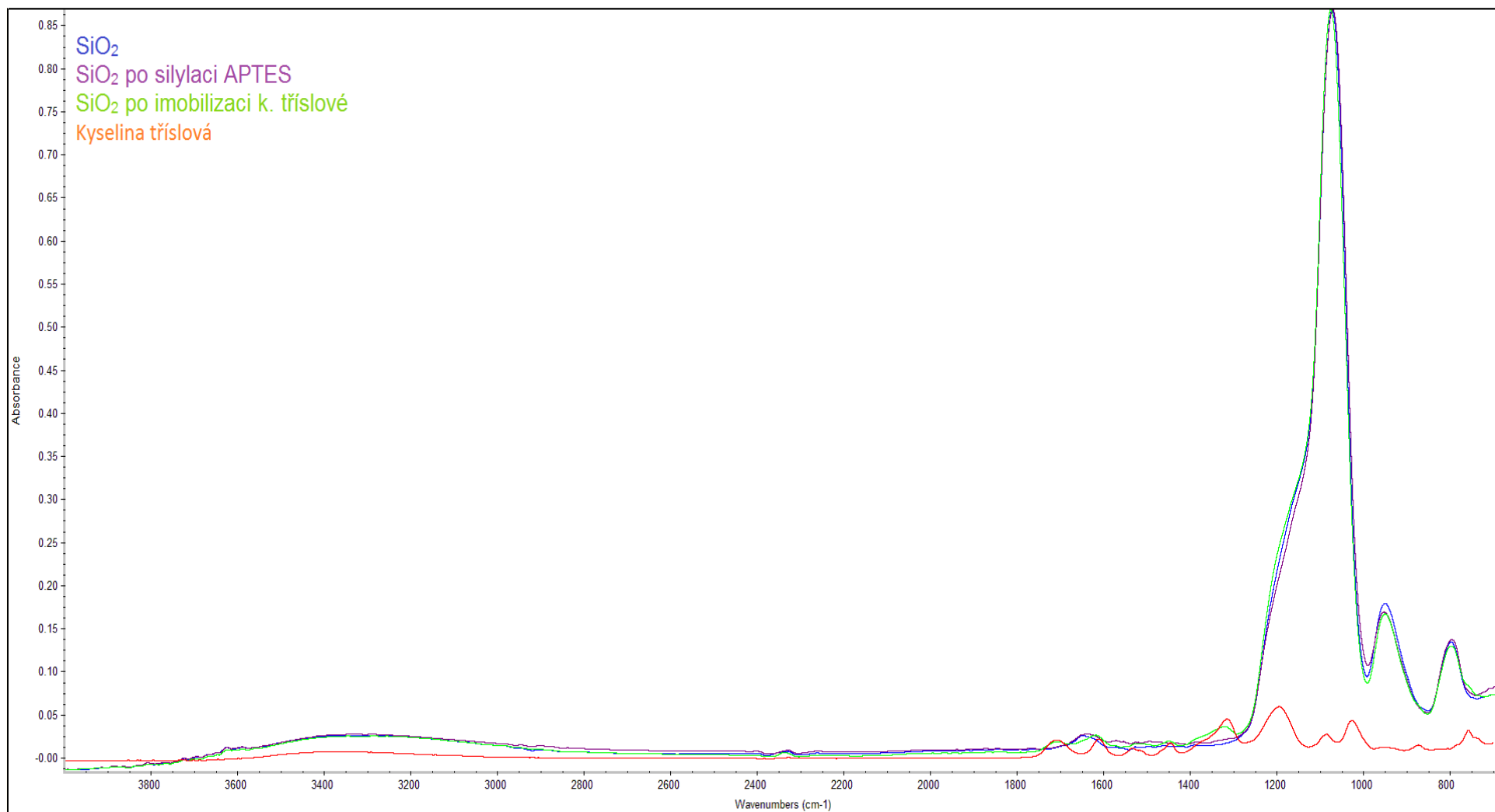
Na snímku je vidět tmavší zabarvení vzorku, který byl připraven navázáním kyseliny tříslové z koncentrovanějšího roztoku (20 % hm.) a obsahuje tedy větší množství imobilizované látky.

7.7 Detekce imobilizované kyseliny tříslové infračervenou spektroskopií

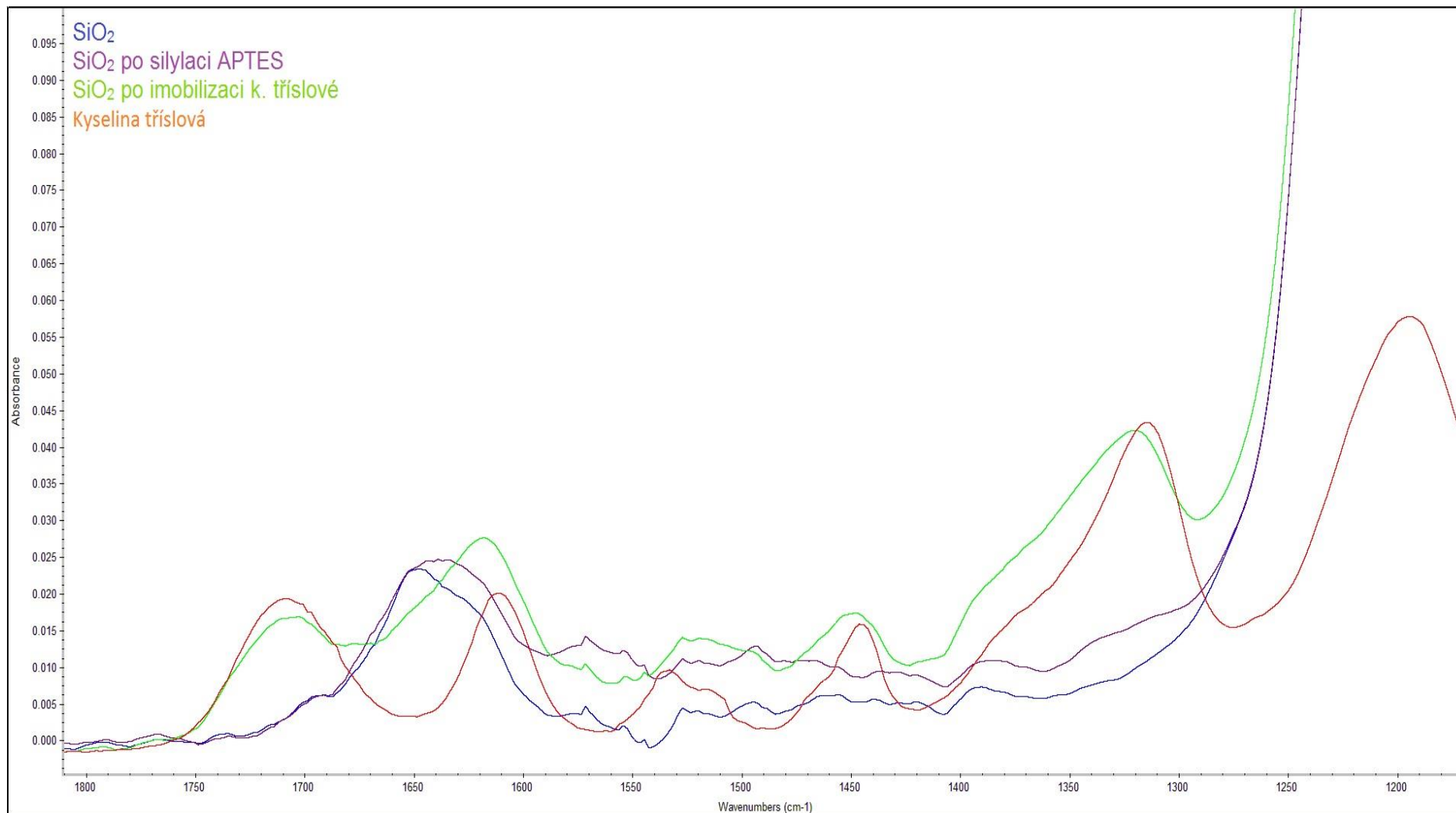
K prokázání úspěšné imobilizace kyseliny tříslové na povrch křemičitých nanovláken modifikovaných 3-aminopropyltriethoxysilanem byla použita infračervená spektroskopie, což je vzhledem k velmi malé koncentraci imobilizované kyseliny tříslové velice vhodná metoda k tomuto stanovení.

Infračervenou spektroskopií byly analyzovány vzorky čistých křemičitých nanovláken (SiO_2), křemičitých nanovláken po silylaci pomocí APTES (SiO_2 -APTES) a materiál s imobilizovanou kyselinou tříslovou (SiO_2 -APTES-TA).

Problémem tohoto stanovení je vysoká koncentrace hydroxylových skupin na povrchu nanovláčenného materiálu, čímž může dojít k zamaskování některých charakteristických píků kyseliny tříslové. Nicméně po imobilizaci kyseliny na povrch křemičitých nanovláken se ve spektru (Obrázek 34) objevuje několik nových píků (vazeb mezi hydroxylovými skupinami kyseliny tříslové a aminoskupinami na povrchu křemičitých nanovláken) v oblasti mezi 1750 nm až 1200 nm (zelená křivka), které se u samotných křemičitých nanovláken či po provedení silylace nevyskytovaly. Při detailnějším pohledu (Obrázek 35) je zřetelně vidět, že píky, které se objevily při měření vzorku křemičitých nanovláken s imobilizovaným taninem v oblasti mezi 1700 – 1200 nm velmi dobře kopírují spektrum získané při měření samotné kyseliny tříslové. Tato shoda je důkazem přítomnosti kyseliny tříslové ve vzorku, a tedy její imobilizace na nanovláčenný substrát.



Obrázek 34: Spektra získaná pomocí infračervené spektroskopie: křemičitá nanovlákná před silylaci (modrá), křemičitá nanovlákná po silylaci APTES (fialová), křemičitá nanovlákná po imobilizaci kyseliny tříslové (zelená), kyselina tříslová (červená)



Obrázek 35: Spektra získaná pomocí infračervené spektroskopie – detail oblasti mezi 1 800 – 1 200 nm, která dokládají přítomnost taninu ve vzorku: křemičitá nanovláknna po imobilizaci kyseliny tříslové (zelená), kyselina tříslová (červená), křemičitá nanovláknna (modrá) a křemičitá nanovláknna po silylaci pomocí APTES (fialová)

7.8 Měření smáčivosti

Měření smáčivosti vzorků SiO₂ nanovláken před silylací, po silylaci a po konečné modifikaci kyselinou tříslovou bylo prováděno za účelem zjištění vlivu modifikace na smáčivé vlastnosti materiálu, respektive hydrofilitu/hydrofobitu materiálu s ohledem na použití jako obvazový materiál, které vyžadují hydrofilní charakter materiálu.

Měření smáčivosti křemičité nanovláčenné vrstvy před a po silylaci a po následné imobilizaci kyseliny tříslové neprokázalo žádné zásadní změny ve smáčivosti nanovláčenného materiálu po provedení modifikace povrchu křemičitých nanovláčken. Ve všech případech došlo k úplnému vsáknutí kapky destilové vody do objemu materiálu, a proto nebylo možné změřit kontaktní úhel. Z toho je patrné, že materiál vykazuje hydrofilní chování a že tedy silylační reakce i reakce vedoucí k imobilizaci kyseliny křemičité na povrch nanovláčken nemají zásadní vliv na smáčivost materiálu. Toto je důležité především s ohledem na zamýšlené použití takto připravených materiálu jako obvazových materiálů.

7.9 Mikrobiologické testy

7.9.1 Kvalitativní stanovení antibakteriálních účinků křemičitých nanovláčken s imobilizovanou kyselinou tříslovou

Kvalitativní testy antibakteriálních účinků kyseliny tříslové po její imobilizaci na povrch křemičitých nanovláčken měly za cíl ověření funkčnosti antibakteriálních účinků těchto materiálů. K testování byly použity vzorky připravené imobilizací kyseliny tříslové z různě koncentrovaných roztoků. Jako kontrola byl použit nanovláčenný vzorek bez imobilizované kyseliny tříslové.

Při hodnocení antibakteriálního účinku kyseliny tříslové na grampozitivní bakterie (*Staphylococcus gallinarum*) bylo prokázáno (Tabulka 9 a Tabulka 10), že antibakteriální účinek byl přímo úměrný koncentraci imobilizované kyseliny tříslové. Uvedeným kvalitativním testem se prokázala 0% inhibice (evidentní růst kolonii testovaného kmene nejen v blízkosti, ale také v bezprostředním kontaktu, tj. přímo pod testovaným vzorkem) u křemičitých nanovláčenných membrán bez imobilizované kyseliny tříslové. Naopak při kvalitativním testování antibakteriálního účinku se prokázal inhibiční účinek (evidentní zábrana růstu pod testovaným vzorkem křemičitých nanovláčken) pokud byla kyselina

tříslová imobilizována na povrch křemičitých nanovláken v koncentraci 1 - 15% (Obrázek 36 a Příloha A Obrázek 41, Obrázek 42 a Obrázek 43).

Výsledky testů s gramnegativními bakteriemi *Escherichia coli* (Tabulka 11, Tabulka 12), rovněž potvrzují antibakteriální účinky nanovláken modifikovaných kyselinou tříslovou. Nicméně v porovnání s účinky na grampozitivní bakterie jsou účinky na bakterie gramnegativní méně zřetelné – u vzorku připraveného z roztoku kyseliny tříslové s nejvyšší koncentrací (15 %) přibližně o 10 %. Antibakteriální účinky jsou patrné především v místech, kde dochází ke kontaktu substrátu naočkovaným bakteriálním kmenem *Escherichia coli* a vzorku s imobilizovanou kyselinou tříslovou (Obrázek 37). Přerušení některých linií, např. linie č. 2 u vzorku s 15% kyselinou tříslovou, není dáno baktericidními účinky materiálu, ale nanášením bakteriálního kmene, při kterém nejspíše nedošlo k úplnému přenesení bakteriálního kmene z očkovací kličky na povrch kultivačního media.

Kvalitativní testy tedy potvrdily antibakteriální účinky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou v obou případech.

Vzhledem k těmto pozitivním výsledkům bylo následně přistoupeno ke kvantitativním testům k získání detailnějších informací o antibakteriálním působení tohoto materiálu.

Tabulka 9: Výsledky kvalitativních antibakteriálních testů křemičitých nanovláken s kyselinou tříslovou imobilizovanou z ethanolových roztoků o koncentraci 0, 1 a 3 % hm. na kmen *Staphylococcus gallinarum* 3572

Vzorek	0% kyselina tříslová				1% kyselina tříslová				3% kyselina tříslová			
Číslo linie	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice
1	62	62	0	0	60	33	27	45,00	63	37	26	41,27
2	59	59	0	0	64	38	26	40,63	60	34	26	43,33
3	58	58	0	0	59	30	29	49,15	60	33	27	45,00
4	60	60	0	0	60	35	25	41,67	60	32	28	46,67
5	61	61	0	0	63	38	25	39,68	61	33	28	45,90
Celkem	300	300	0	0	306	174	132	43,14	304	169	135	44,41

Tabulka 10: Výsledky kvalitativních antibakteriálních testů křemičitých nanovláken s kyselinou tříslovou imobilizovanou z ethanolových roztoků o koncentraci 5, 10 a 15 % hm. na kmen *Staphylococcus gallinarum* CCM 3572

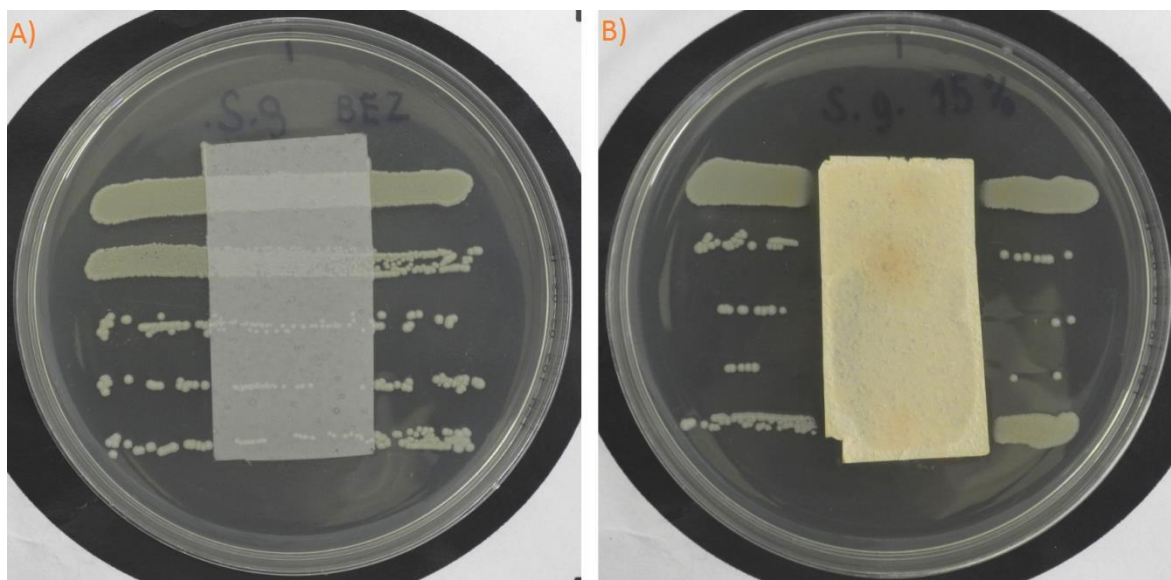
Vzorek	5% kyselina tříslová				10% kyselina tříslová				15% kyselina tříslová			
Číslo linie	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice
1	62	36	26	41,94	63	37	26	41,27	65	37	28	43,08
2	60	31	29	48,33	60	30	30	50,00	60	27	33	55,00
3	56	23	33	58,93	57	25	32	56,14	61	15	46	75,41
4	60	28	32	53,33	60	25	35	58,33	53	14	39	73,58
5	57	26	31	54,39	57	22	35	61,40	62	34	28	45,16
Celkem	295	144	151	51,19	297	139	158	53,20	301	127	174	57,81

Tabulka 11: Výsledky kvalitativních antibakteriálních testů křemičitých nanovláken s kyselinou tříslovou imobilizovanou z ethanolových roztoků o koncentraci 0, 1 a 3 % hm. na kmen *Escherichia coli* K-12 CCM 7929

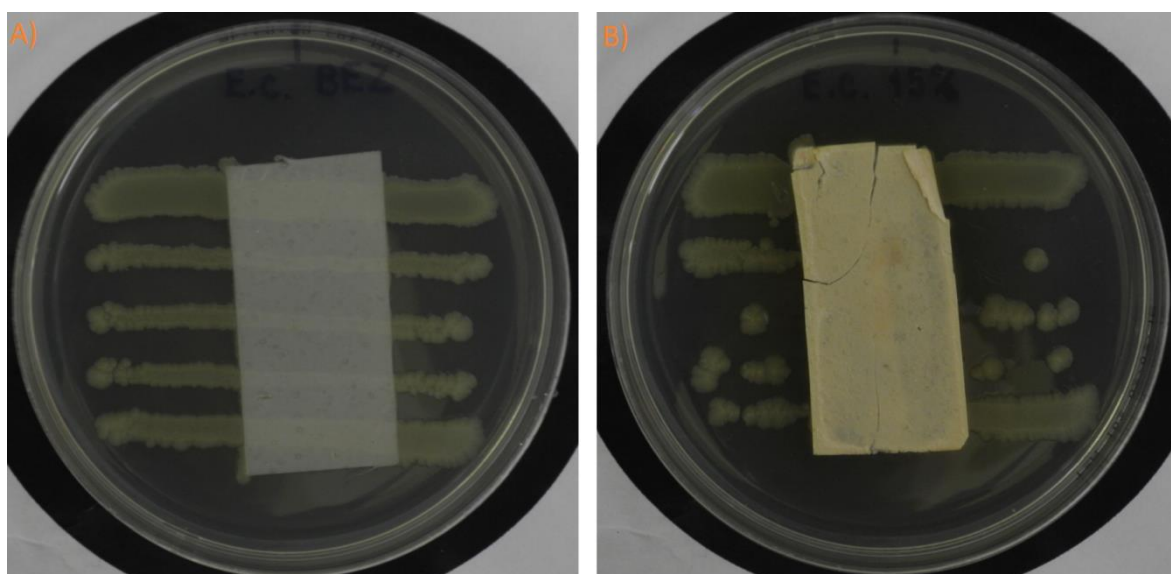
Vzorek	0% kyselina tříslová				1% kyselina tříslová				3% kyselina tříslová			
Číslo linie	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice
1	68	68	0	0	66	36	30	45,45	66	42	24	36,36
2	63	63	0	0	62	37	25	40,32	62	37	25	40,32
3	61	61	0	0	62	35	27	43,55	62	38	24	38,71
4	62	62	0	0	55	35	20	36,36	56	29	27	48,21
5	65	65	0	0	64	40	24	37,50	64	36	28	43,75
Celkem	319	319	0	0	309	183	126	40,78	310	182	128	41,29

Tabulka 12: Výsledky kvalitativních antibakteriálních testů křemičitých nanovláken s kyselinou tříslovou imobilizovanou z ethanolových roztoků o koncentraci 5, 10 a 15 % hm. na kmen *Escherichia coli* K-12 CCM 7929

Vzorek	5% kyselina tříslová				10% kyselina tříslová				15% kyselina tříslová			
Číslo linie	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice
1	56	31	25	44,64	62	38	24	38,71	64	43	21	32,81
2	64	37	27	42,19	61	37	24	39,34	59	24	35	59,32
3	59	34	25	42,37	63	38	25	39,68	54	21	33	61,11
4	62	36	26	41,94	62	37	25	40,32	60	32	28	46,67
5	62	37	25	40,32	67	41	26	38,81	63	37	26	41,27
Celkem	303	175	128	42,24	315	191	124	39,37	300	157	143	47,67



Obrázek 36: Snímky křemičitých nanovláken po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Staphylococcus gallinarum* s povrchovou úpravou 0% (A) a 15% (B) kyselinou tříslovou



Obrázek 37: Snímky křemičitých nanovláken po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Escherichia coli* s povrchovou úpravou 0% (A) a 15% (B) kyselinou tříslovou

7.9.2 Kvantitativní stanovení antibakteriálních účinků nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou

Kvantitativní testy antibakteriálních účinků byly provedeny se vzorky SiO₂ nanovláken modifikovanými v roztocích kyseliny tříslové o koncentracích 1 a 15 % hm. s výslednou koncentrací kyseliny tříslové 0,3 mg/cm² (Tabulka 7) a 1,8 mg/cm² (Tabulka 8) na nanovláčkách.

Tabulka 13: Ověření skutečné koncentrace použitých bakteriálních kmenů

Ředění bakteriálního kmene	10 ⁵ ředění (1:200)		10 ⁵ ředění (1:10)		10 ⁵	
	Počet kolonií		Počet kolonií		Počet kolonií	
Použitý bakteriální kmen	Odečtený	Absolutní	Odečtený	Absolutní	Odečtený	Absolutní
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	29	5800	863	8630	> 2000	> 2000
<i>Escherichia coli</i>	123	24600	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000

Výsledky získané při ověření koncentrace použitých bakteriálních kmenů *Staphylococcus gallinarum* a *Escherichia coli* potvrdily množství bakterií, které odpovídá na McFarlandově stupnici hustoty číslu 1, tedy přibližně 10⁸ bakterií v připraveném ředění (Tabulka 13), které bylo následně použito k testování. Nepotvrdil se tak úbytek bakterií, bakterie přežívaly ve fyziologickém roztoku bez problémů.

Výsledky kvantitativních testů antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken bez imobilizované kyseliny tříslové a s kyselinou tříslovou imobilizovanou z 1% a z 15% roztoků jsou uvedeny v **Chyba! Chybný odkaz na záložku.** a Tabulka 15.

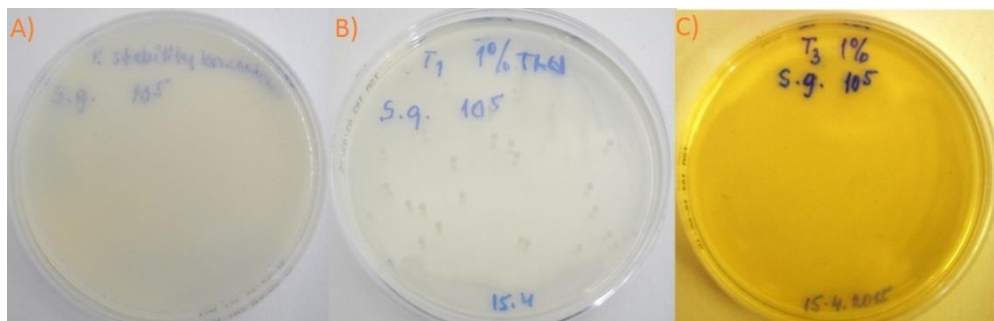
Jak při působení na gramnegativní, tak i na grampozitivní bakterie výsledky potvrzují silné antibakteriální účinky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou. To je patrné především u testů s kmeny *Staphylococcus gallinarum*, kde došlo u vzorku materiálu připraveného imobilizací v 1% roztoku kyselinou tříslovou k úplnému usmrcení bakterií, tedy k poklesu o 10⁵ bakterií již po 3 hodinách (Obrázek 38). U stejného materiálu v případě *Escherichia coli* došlo k úplné redukci bakterií až po 24 hodinách, ale k výraznému úbytku bakterií dochází již po třech hodinách působení.

Testy také ukázaly, že baktericidní účinky nanovláčkových vzorků se projeví také u materiálu připraveného bez imobilizace kyseliny tříslové, tedy u materiálu tvořeného pouze křemičitými nanovláčkami (Příloha B Obrázek 48 a Obrázek 50 pro kmen *Escherichia coli* a Obrázek 53, Obrázek 55 a Obrázek 57 pro kmen *Staphylococcus gallinarum*). Účinky tohoto materiálu jsou srovnatelné s těmi, které má nanovláčkový materiál

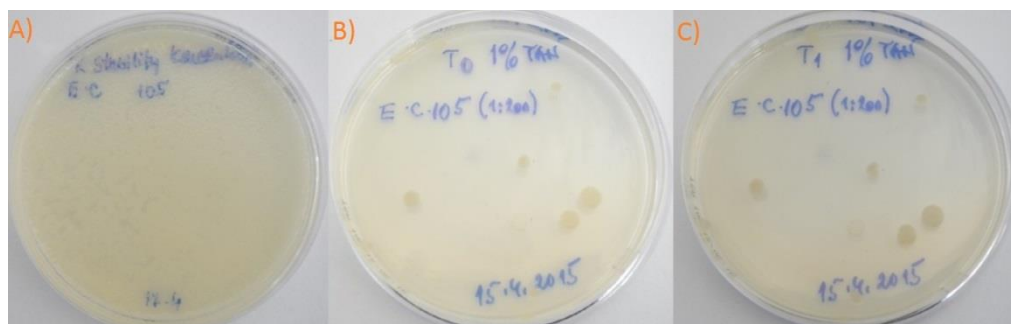
imobilizovaný v 1% kyselině tříslové. Toto zjištění nebylo prokázáno při kvalitativních testech, při kterých vzorky bez navázané kyseliny tříslové antibakteriální účinky neměly.

Důvod antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken bez imobilizované kyseliny tříslové není tedy přesně prokázán. Jednou z možností je, že při hydrolyze nanovláčenného materiálu během kultivace v roztoku bakterií může dojít k uvolnění některých chemikálií používaných při výrobě či modifikaci nanovláken, které mohou mít bakteriostatické účinky, či dokonce účinky baktericidní. Možným vysvětlením by mohly být antibakteriální účinky křemičitých nanovláken s navázaným APTES, protože antibakteriální účinky samotných křemičitých nanovláken (před modifikací APTES) výsledky kvalitativních testů vyloučily. Také ověření koncentrace bakterií neprokázalo samovolnou redukci testovaných bakteriálních kmenů, z toho je zřejmé, že k redukci dochází pouze v přítomnosti křemičitých nanovláken.

Výsledky antibakteriálních účinků vzorků křemičitých nanovláken s vyšší koncentrací imobilizované kyseliny tříslové (1,8 mg/cm²) se nepodařilo vyhodnotit vzhledem ke koaguačním účinkům kyseliny tříslové na proteiny přítomné v kultivačním médiu, které zastínily účinky antibakteriální, a nebylo tak možné odečíst počet přeživších kolonií.



Obrázek 38: Srovnání počtu kolonií bakterií kmenu *Staphylococcus gallinarum* před (A) a po inkubaci SiO₂ nanovláken modifikovaných 1% kyselinou tříslovou v bakteriologickém roztoku - po 1 hodině (B) a po 3 hodinách působení (C) při koncentraci bakterií 1·10⁵



Obrázek 39: Srovnání počtu kolonií bakterií kmene *Escherichia coli* před (A) a po inkubaci SiO₂ nanovláken modifikovaných 1% kyselinou tříslovou v bakteriologickém roztoku - po 1 minutě (B) a po 1 hodině působení (C) při koncentraci bakterií 1·10⁵ a zředění (1:200)

Tabulka 14: Výsledky kvantitativních testů antibakteriálních účinků nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou pro kmen *Staphylococcus gallinarum*²

Ředění	Počet kolonií SiO ₂ bez modifikace						Počet kolonií 1% kyselina tříslová						Počet kolonií 15% kyselina tříslová					
	10 ⁵ (1:200)		10 ⁵ (1:10)		10 ⁵		10 ⁵ (1:200)		10 ⁵ (1:10)		10 ⁵		10 ⁵ (1:200)		10 ⁵ (1:10)		10 ⁵	
Čas	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.
T ₀	21	4200	254	2540	> 2000	> 2000	17	3400	244	2440	> 2000	> 2000	28	5600	NH	NH	NH	NH
T ₁	0	0	0	0	50	50	0	0	1	10	37	37	NH	NH	NH	NH	NH	NH
T ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NH	NH	NH	NH	NH
T ₂₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NH	NH	NH	NH	NH

Tabulka 15: Výsledky kvantitativních testů antibakteriálních účinků nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou pro kmen *Escherichia coli*²

Ředění	Počet kolonií SiO ₂ bez modifikace						Počet kolonií 1% kyselina tříslová						Počet kolonií 15% kyselina tříslová					
	10 ⁵ (1:200)		10 ⁵ (1:10)		10 ⁵		10 ⁵ (1:200)		10 ⁵ (1:10)		10 ⁵		10 ⁵ (1:200)		10 ⁵ (1:10)		10 ⁵	
Čas	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.	odečet	absol.
T ₀	82	16400	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	12	2400	91	910	> 2000	> 2000	112	22400	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
T ₁	0	0	3	30	11	11	10	2000	80	800	> 2000	> 2000	NH	NH	NH	NH	NH	NH
T ₃	0	0	3	30	67	67	0	0	4	40	19	19	NH	NH	NH	NH	NH	NH
T ₂₄	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NH	NH	NH	NH	NH

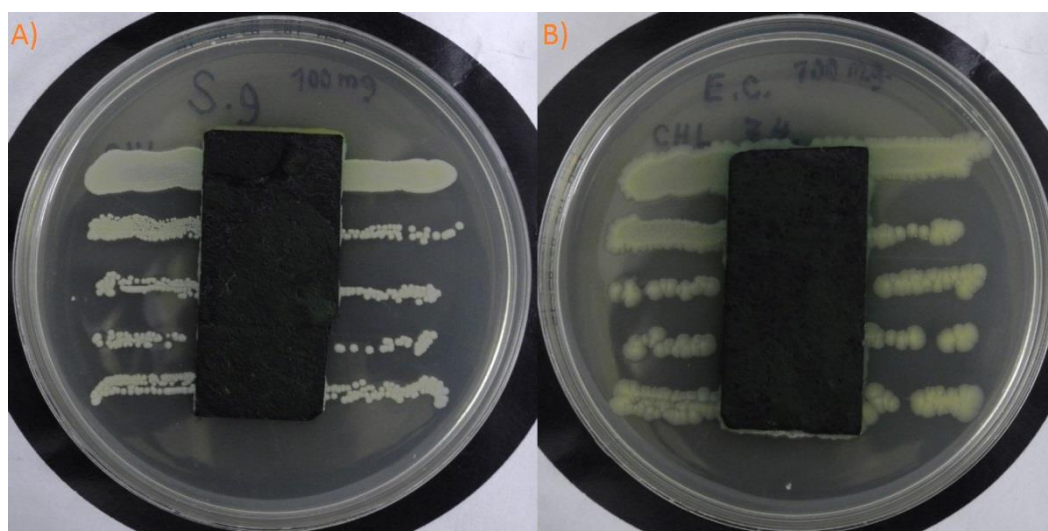
² T₀ – čas po 1 min., T₁ – čas po 1 h, T₃ – čas po 3 h a T₂₄ – čas po 24 h, NH - nehodnocena

7.9.3 Kvalitativní stanovení antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovaným chlorofylinem

Testy materiálu s imobilizovaným chlorofylinem na povrchu křemičitých nanovláken prokázaly antibakteriální účinky pro grampozitivní i gramnegativní bakteriální kmene (Tabulka 16). Ukázalo se, že antibakteriální účinky byly u gramnegativního (*Escherichia coli*) i grampozitivního (*Staphylococcus gallinarum*) kmene obdobné (41,29 % a 37,79 %). Vzhledem k tomu, že již nebylo možné zvyšovat koncentraci chlorofylinu ve vzorku a k menším antibakteriálním účinkům než u materiálů připravených imobilizací kyseliny tríslové, nebylo dále přistoupeno ke kvantitativnímu testování těchto materiálů.

Tabulka 16: Výsledky kvalitativních antibakteriálních testů křemičitých nanovláken s imobilizovaným chlorofylinem na bakteriálních kmenech *Staphylococcus gallinarum* (vlevo) a *Escherichia coli* (vpravo)

Bakt. kmen	Staphylococcus gallinarum				Escherichia coli			
	Číslo linie	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice	% inhibice	Celková délka linie [mm]	Délka viditelného růstu [mm]	Zóna absolutní inhibice
1	64	41	23	35,94	66	42	24	36,36
2	63	41	22	34,92	62	37	25	40,32
3	60	36	24	40,00	62	38	24	38,71
4	60	34	26	43,33	56	29	27	48,21
5	60	39	21	35,00	64	36	28	43,75
Celkem	307	191	116	37,79	310	182	128	41,29



Obrázek 40: Snímky křemičitých nanovláken po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Staphylococcus gallinarum* (A) a *Escherichia coli* (B) s imobilizovaným chlorofylinem na povrchu

Závěr

V rámci experimentální části práce byla provedena optimalizace derivatizační reakce s využitím 3-aminopropyltriethoxysilanu jako silylačního činidla. Optimalizace byla provedena s ohledem na maximální koncentrační výtěžek kovalentně navázaných aminoskupin na povrch křemičitých nanovláken. Sledovanými parametry byly: koncentrace silylačního činidla, doba derivatizační reakce a teplota reakce. Pro zhodnocení experimentů byla využita adaptovaná metoda založená na reakci methylované s aminoskupinami na povrchu křemičitých nanovláken. Z naměřených výsledků byly následně vyvozeny optimální reakční podmínky silylace, tedy 3% roztok APTES v ethanolu, který reaguje s křemičitými nanovláčky za laboratorní teploty po dobu dvou hodin. Výsledky experimentů jsou podrobně diskutovány v kapitole 7.3.

Byly nalezeny podmínky pro imobilizaci dvou přírodních látek – kyseliny tříslové a chlorofylinu na povrch modifikovaných nanovláken a následně ověřeny jejich antibakteriální účinky pomocí kvalitativních a kvantitativních testů s gram pozitivními a gram negativními bakteriálními kmeny. Výsledky antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou křemičitou potvrdily vynikající antibakteriální účinky těchto materiálů pro oba testované kmeny. Kvantitativní testy ukázaly, že v případě gram pozitivního kmene *Staphylococcus gallinarum* došlo k úplné redukci bakteriálního kmene již po třech hodinách, což je vynikajícím předpokladem pro využití připravených materiálů pro aplikace v oblasti medicíny, jejichž cílem je urychlit hojení ran potlačením vzniku infekce v místě rány.

Předmětem dalšího studia by mohla být optimalizace imobilizační reakce přírodních látek na povrch modifikovaných křemičitých nanovláken s cílem dosáhnout maximálního antibakteriálního účinku při minimálním imobilizovaném množství. Dalším krokem, který by měl následovat, by mělo být ověření antibakteriálních účinků těchto materiálů *in vivo*.

Použitá literatura

- [1] MA Z. et. al., *Surface modifications and property analysis of biomedic polymers used for tissue engineering*, Colloids and Surface B: Biointerfaces, 2007, Vol. 60, pp. 137 – 157
- [2] IKEDA Y. et. al., *Surface modifications of polymers for medical applications*, Biomaterials, 1994, Vol. 15, pp. 725 – 736
- [3] ELBERT I. D., et. al., *Surface treatment of polymers for biokompatibility*, Annual Review of Materials Science, 1996, Vol. 26, pp. 365 – 394
- [4] VOGLER A. E. et. al., *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces*, Advances. In Colloid and Interface Science, 1998, Vol. 74, pp. 69 – 117
- [5] KOSEMO B. et. al., *Biological surface science*, Surface Science, 2002, Vol. 500, pp. 656 – 677
- [6] BOSWORTH A. L., DOWNES S., *Electrospinning for tissue regeneration*, Woodhead Publishing, Philadelphia, 2011, pp. 317 – 339, ISBN: 978-1-114-569-741-9
- [7] FANG J. et. al., *Application of electrospun nanofibers*, Chinese Science Bulletin, 2008, Vol. 53, pp. 2265 – 2286
- [8] FORMHALS A., *Process and apparatus for preparing artificial threads*, US Patent 1975504, 1934
- [9] DOSHI J. et. al., *Electrospinning proces and applications of electrospun fibers*, Journal of Electrostatics., 1995, Vol. 32, pp. 151 – 160
- [10] RENEKER D. H. et. al., *Nanometer diameter fibers of polymers, produced by electrospinning*, Nanotechnology, 1996, Vol. 7, pp. 216 – 223
- [11] LUKÁŠ D. et. al., *Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a Nano-scale technology of the twenty-first century)*, Textile Progress, 2009, Vol. 41:2, pp. 59 – 140
- [12] RATNER B. et. al., *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, 2013, ISBN: 978-0-12-374626-9
- [13] ŠLAMBOROVÁ I. et. al., *Nanovláknenná struktura s imobilizovaným organickým agens a způsob její výroby*, 19, Česká republika, B6, 303911, 19. 6. 2013
- [14] LIBERMAN A. et. al., *Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine*, Surface Science Reports, Vol. 69, pp. 132 – 158
- [15] CHOI S. et. al., *Silica nanofibers from electrospinning/sol-gel proces*, Journal of Materials Science Letters, 2003, Vol. 22, pp. 891 – 893
- [16] WATANABE R. et. al., *Inorganic fiber structure and proces for producing same*, Japan, A1, US 20110274927, 10. 11. 2011
- [17] ŠLAMBOROVÁ I., EXNAR P., *Biomedicínské aplikace anorganických nanovláken na bázi oxidu křemičitého*, 2014, [online], 1. 2. 2014, URL: <http://www.kch.tul.cz/publications/sb35.pdf>
- [18] PATEL C. et. al., *Electrospinning of Porous Silica Nanofibers Containing Silver Nanoparticles for Catalytic Applications*, Chemistry of Materials., 2007, Vol. 19, pp. 1231 – 1238
- [19] PANELS J. et. al., *Incorporation of Vanadium Oxide in Silica Nanofibers Mats via Electrospinning and Sol-Gel Synthesis*, Journal of Nanomaterials, 2006, Vol. 6, pp. 3 – 4
- [20] PIRZADE T. et. al., *Hybrid Silica-PVA Nanofibers via Sol-Gel Electrospinning*, Langmuir, 2012, Vol. 28, pp. 5834 – 5844
- [21] SASIPRIYA K. et. al., *Synthesis and characterization of polymeric nanofibers poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl alcohol)/silica using indigeneous electrospinning set up*, Materials Research, 2013, Vol. 16, pp. 824 – 830

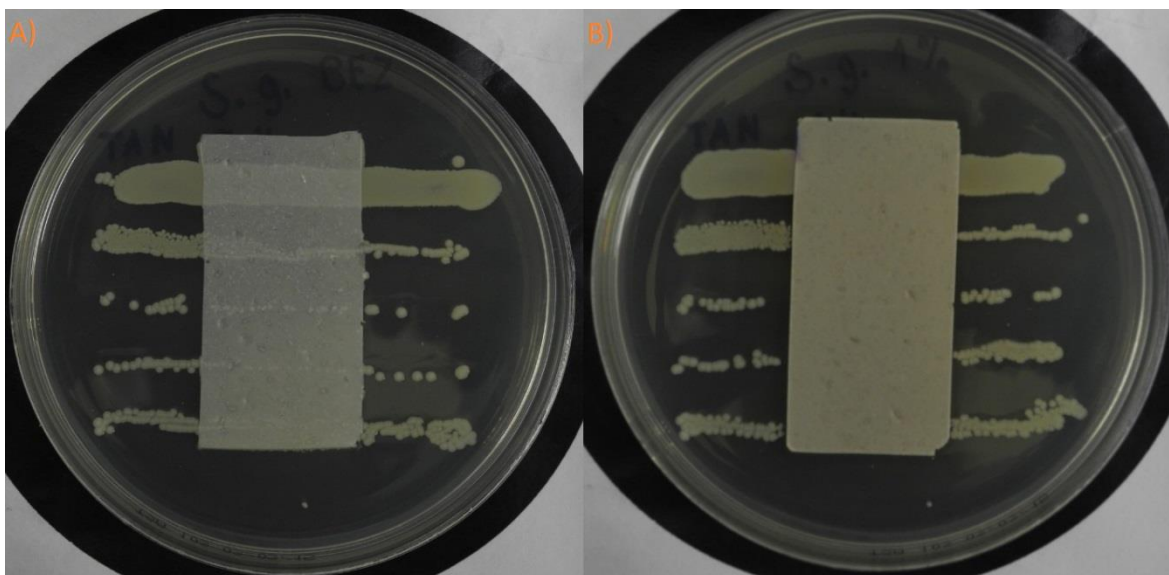
-
- [22] JIANG Y. et. al., *Facile Synthesis via Electrospinning of Tetraethoxysilane/Polyvinylpyrrolidone Sol and Characterization of Ultrafine Crystalline SiO₂ Nanofibers*, Journal of Macromolecular Science, Vol. 53, pp. 383 – 390
- [23] BOSE S. et. al., *Sol-Gel Preparation of Silica-Based Nano-Filers for Biomedical Applications*, Biomolecular Science, Vol. 45, pp. 436 – 440
- [24] TSOU H. P. et. al., *The fabrication and testing of electrospun silica nanofiber membrane for the dections of proteins*, Nanotechnology, 2008, Vol. 44
- [25] VANSANT E. F., *Characterization and Chemical Modification of Silica Surface*, Elsevier, Amsterdam, 1995, ISBN: 978-0-444-81928-4
- [26] BEINLER J. C., SCHERER W. G., *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, New York, 1989, ISBN: 13-978-0-12—134970-7
- [27] HENCH L. L, WEST K. J., *The Sol-Gel Process*, Chem. Rev., 1990, Vol. 90, pp. 33 – 72
- [28] TRECANNI L., *Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications*, Acta Biomateria, 2013, Vol. 9, pp. 7115 – 7150
- [29] PAVLOVIC E. et. al., *Surface functionalization of Silicon Oxide at Room Temperature and Atmospheric Pressure*, Journal of Colloid and Interface Science, 2002, Vol. 254, pp. 200 – 203
- [30] MOTTOLA A. H., *Chemically Modified Surfaces*, Elsevier, Amsterdam, 1992, 1, ISBN: 978-0447-8930-55
- [31] HERMANSON T. G. et. al., *Bioconjugate Techniques*, 2nd Edition, Academic Press, 2008, ISBN: 978-0-12-370501-3
- [32] GIANFREDA L., SCARFI M. R., *Enzyme stabilization: state of art*, Molecular Cell Biochemistry, 1991, Vol. 100, pp. 97 – 128
- [33] SCOUTEN W. et. al., *Chemically Modified Surfaces in Science and Industry*, Gordon and Breach Science Pub., New York, 1988, ISBN: 978-2881242212
- [34] HASHIM A., *Nanowires – Implementation and Applications*, InteCh, 2011, ISBN: 978-953-307-318-7
- [35] MARAGE P. et. al., *A new route for deposition of SiO₂ Sol-Gel coatings*, Thin Solid Films, 1994, Vol. 238, pp. 218
- [36] LEE W. S. et. al., *Preparation of SiO₂/TiO₂ composite fibers by sol-gel reaction and electrospinning*, Materials Letters, 2007, Vol. 61, pp. 889 – 893
- [37] BLITZ P. J. et. al., *Studies of silylation of Cab-O-Sil with methoxymethylsilanes by diffuse reflectance FTIR spectroscopy*, Journal of Colloid and Interface Science, 1988, Vol. 121, pp. 63 – 69
- [38] KNOPP D. et. al., *Bioanalytical applications of biomolekule-functionalized nanometer-sized doped silica particles*, Analytica Chimica Acta, Vol. 647, pp. 14 - 30
- [39] GOTT L. V., *Heparin bonding on colloidal graphite surfaces*, Science, 1963, Vol. 142, pp. 1297 – 1298
- [40] WANG Y., CARUSO F., *Enzyme encapsulation in nanoporous silica spheres*, Chemical Communications, 2004, Vol. 13, pp. 1528 – 1529
- [41] WANG Y., CARUSO F., *Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation*, Chemical Communications, 2005, Vol. 17, pp. 953 – 961
- [42] IPPE O. et. al., *Function of Membrane Protein in Silica Nanopores: Incorporation of Photosynthetic Light-Harvesting Protein LH2 into FSH*, Journal of Physical Chemistry B, 2006, Vol. 110, pp. 3301 – 3305
-

-
- [43] TAKAHASHI H. et. al., *Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristic of Mesoporous Silica*, Chemistry of Materials, 2000, Vol. 12, pp. 3301 – 3305
- [44] QHOBOSHEANE M. et. al., *Biochemically functionalized silica nanoparticles*, The Analyst, 2001, Vol. 126, pp. 1274 – 1278
- [45] BLASI L. et. al., *Formation and characterization of glutamate dehydrogenase monolayers on silicon support*, Biosensors and Bioelectronics, 2005, Vol. 21, pp. 30 – 40
- [46] PENG J., *Identification of live liver cancer cells in a mixed cell systém using galactose-conjugated fluorescent nanoparticles*, Talanta, Vol. 71, pp. 833 – 840
- [47] CHEN S. W. et. al., *Chemically modified electrospun silica nanofibers for promoting growth and differentiation of neural stem cells*, Journal of Material Chemistry B, 2014, Vol. 2, pp. 1205 – 1215
- [48] KRANZ B. et. al., *Circular dichroism analysis of penicillin G acylase covalently immobilized on silica nanoparticles*, Journal of Colloid and Interface Science, 2007, Vol. 316, pp. 413 – 419
- [49] VANČUROVÁ K., *Vliv pyridoxalisonikotinoylhydrazonu na spektrální vlastnosti alaninaminotransferázy*, Hradec Králové, 2008, Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd
- [50] ZHANG D. et. al., *Silica-nanoparticle-based interface for the enhanced immobilization and sequence-specific detection of DNA*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, Vol. 379, pp. 1025 – 1030
- [51] HUANG X. et. al., *Tannin-immobilized mesoporous silica bead (BT-SiO₂) as an effective adsorbent of Cr (III) in aqueous solutions*, Journal of Hazardous Materials, 2010, Vo. 173, pp. 33 – 39
- [52] CHENG F. L. et. al., *Immobilization and stabilization of papain on SiO₂ particles containing amino groups*, Chin. J. Biotechnol., 2004, Vol. 20, pp. 287 – 290
- [53] KNOPP D. et. al., *Bioanalytical applications of biomolekule-functionalized nanometer-sized doped silica particles*, Analytica Chimica Acta, Vol. 647, pp. 14 - 30
- [54] AIRENNE J. K. et. al., *Recombinant avidin and avidin-fusion proteins*, Biomolecular Engineering, 1999, Vol. 16, pp. 87 – 96
- [55] WALKER et. al., *Development of drug targeting based on recombinant expression of the chicken avidin gene*, Journal of Drug Targeting, 1995, Vol. 4, pp. 41 – 49
- [56] JAIN T. et. al., *Nanometer Silica Particles Encapsulating Active Compound: A Novel Ceramic Drug Carrier*, Journal of Chemical Society, 1998, Vol. 120, pp. 11092 – 11095
- [57] YANG H. et. al., *Magnetite-containing sphere silica nanoparticles for biocatalysis*, Analytical Chemistry, 2005, Vol. 77, pp. 1316 – 1321
- [58] TSAKOGORGAS F. et. al., *Encapsulation of biomolecules for biomedical purposes: Preparation of diclofenac antibody-doped nanometer-sized silica particles By reverse micelle and sol-gel processing*, Analytica Chimca Acta, 2006 Vol. 373, pp. 133 – 137
- [59] HAGERMAN E. A., *The Tannin Handbook*, 2011, [online], 23. 3. 2015, URL: <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/tannin.pdf>
- [60] CHUNG T. K. et. al., *Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds*, Letters in Applied Microbiology, 1993, Vol. 17, pp. 29 – 32
-

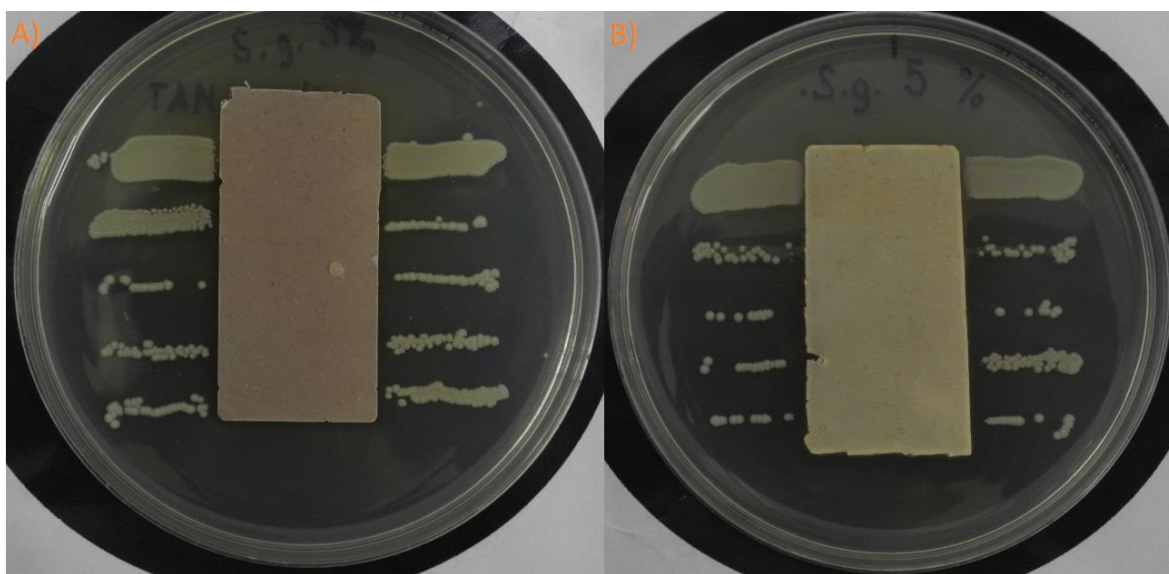
-
- [61] TAKAHASHI O. et. al., *Appearance of antibacterial activity of oxacillin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, Journal of Japan Association for Infectious Disease, 1995, Vol. 69, pp. 1126 – 1134
- [62] BUZZINI P. et. al., *Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins*, Mini-Reviews in Medical Chemistry, 2008, Vol. 8, pp.1179 – 1187
- [63] THAYYAH S. et. al., *Synthesis and characterization of tannin-immobilized hydrotalcite as a potential adsorbent of heavy metal ions in effluent treatments*, Applied Clay Science, 2008, Vol. 42, pp. 214 – 223
- [64] LIA X., *Preparation mechanism of collagen fiber immobilized tannins and their adsorption behaviours for heavy metal ions*, Journal of Membrane Science, 2004, Vol. 243, pp. 235 – 241
- [65] SHI B. et. al., Journal of the American Leather Chemists Association, 1994, Vol. 89, pp. 96 – 102
- [66] LIMA L. et. al., *Use of immobilized tannin adsorbent for removal of Cr(VI) from water*, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1998, Vol. 231, pp. 35 – 40
- [67] LIAO X. et. al., *Adsorption recovery of thorium (IV) by Myrica rubra tannin and larch tannin immobilized onto collagen fibers*, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2004, Vol. 260, pp. 619 – 625
- [68] LIAO X. et. al., *Collagen Fiber Immobilized Myrica rubra Tannin and Its Adsorption to UO_2^{2+}* , Environmental Science Technology, 2004, Vol. 38, pp. 324 – 328
- [69] WANG R. et. al., *Adsorption Behaviours of Pt(II) and Pd(II) on Collagen Fiber Immobilized Bayberry Tannin*, Indian Journal of Chemistry., 2005, Vol. 44, pp. 4221 – 4226
- [70] GULCIN I. et. al., *Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid*, Arabian Journal of Chemistry, 2010, Vol. 3, pp. 43 – 53
- [71] HO Y. K. et. al., *Antimicrobial Activity of Tannin components from Vaccinium vitis-idaea L.*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001, Vol. 53, pp. 187 – 191
- [72] AELENEI N. et. al., *Tannin acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release*, Journal of Material Science, 2009, Vol. 20, pp. 1095 – 1102
- [73] CHUNG T. K. et. al., *Mechanism of Inhibition of Tannic Acid and Related Compounds on the Growth of Intestinal Bacteria*, Food and Chemical Toxicology, 1998, Vol. 36, pp. 1053 – 1060
- [74] BUTLER G. L., ROGLER C. J., *Biochemical Mechanism of the Antinutritional Effects of Tannins*, Phenolic Compounds and Their Effect on Health I, Vol. 506, pp. 298 – 304, ISBN: 9780841213623
- [75] AKIYAMA H. et. al., *Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, Vol.48, pp. 487 – 491
- [76] VERNON P. L. et. al., *The Chlorophylls*, Academic Press, New York, 1963, ISBN: 9781483232898
- [77] TALWAR P. G., SRIVASTAVA M. L., *Textbook of Biochemistry and Human Biology*, Prentice-Hall of India Pvt.Ltd, 2004, ISBN: 978-8120319653
- [78] Wikipedie, Chlorofyl, [online], 22. 3. 2015,
URL: http://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorofyl#/media/File:Chlorophyll_a_b_d.svg
- [79] Oregon State University, Chlorophyll and Chlorophyllin, [online], 11. 4. 2015,
URL: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/chlorophyll-chlorophyllin>
-

-
- [80] MAWBY S., *The Antibacterial Activity of Chlorophyll*, British Medical Journal, 1957, Vol. 2., pp. 268 – 276
- [81] BOWERS W. F., *Chlorophyll in wound healing and suppurative disease*, The American Journal of Surgery, 1947, Vol. 73, pp. 37 – 50
- [82] COMBES F. C. et. al., *Chlorophyll in topical therapy*, N.Y. State Journal of Medicine, 1952, Vol. 52, pp. 1025 – 1026
- [83] CARPENTER E., *Clinical experiences with chlorophyll therapy preparations with a particular reference to chronic osteomyelitis and chronic ulcers*, American Journal of Surgery, 1949
- [84] SMITH L., *Chlorophyll: an experimental study of its water-soluble derivatives. Remarks on the history, chemistry, toxicity and anti-bacterial properties of water soluble chlorophyll derivatives as therapeutic agents*, American Journal of the Medical Sciences, 1944, Vol. 207, pp. 647 – 654
- [85] NEVIN T. A., BIBBY B. G., *The effect of sodium copper chlorophyllin on pure cultures of oral-type organisms*, Journal of Dental Research, 1954, Vol. 33, pp. 571 – 579
- [86] CADY B. J., *Treatment of chronic ulcers with chlorophyll: Review of a series of fifty cases*, The American Journal of Surgery, Vol. 75, pp. 562 – 564
- [87] CAMAD K. L. et. al., *Chlorophyll and woundhealing, Experimental and clinical study*, 1956, Vol. 80, pp. 204 – 210
- [88] Organic Facts, *Health Benefits of Chlorophyll*, [online], 23. 2. 2015,
URL: <https://www.organicfacts.net/health-benefits/other/health-benefits-of-chlorophyll.html>
- [89] HARTWIG A. et. al., *Surface amination of Poly(acrylonitrile)*, Advances in Colloid and Interface Science, 1994, Vol. 52, pp. 65 – 78
- [90] RITTER H. et. al., *Accessibility of Amino Groups in Postsynthetically Modified Mesoporous Silica*, Journal of Physical Chemistry, 2009, Vol. 113, pp. 10667 – 10674
- [91] MARTINOVÁ L. and LUBASOVÁ D., *Nanofiber sheets with the Superabsorbent Properties*, Advanced Materials Research, 2011, Vol. 354, pp. 210 – 215
- [92] ZMEŠKAL O. et. al., *Barevné prostory a správa barev*, [online], 24. 4. 2015,
URL: http://www.fch.vutbr.cz/lectures/imagesci/download/stud06_rozn02.pdf
- [93] AATCC Technical Manual, Vol. 85, 2010, American Association of Textile Chemist and Colorist
- [94] Mempro Materials, *Silicon Dioxide Nanofiber Materials*, [online], 26. 4. 2015,
URL: <http://mempro.com/products/ceramic-nanofiber-materials/silicon-dioxide-nanofiber-material/>

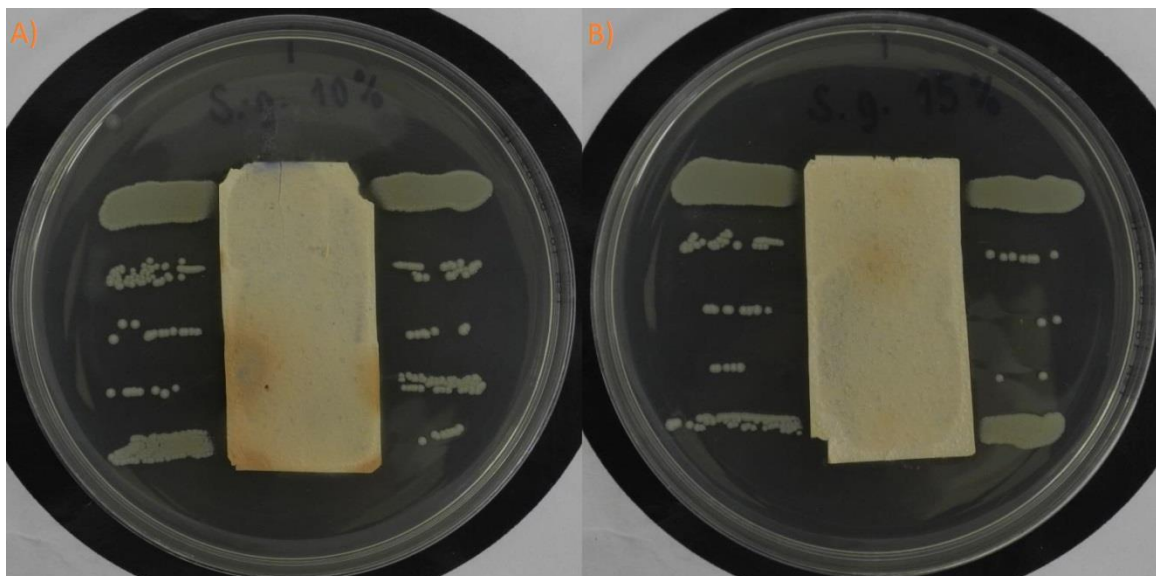
Příloha A – Výsledky kvalitativních testů antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou



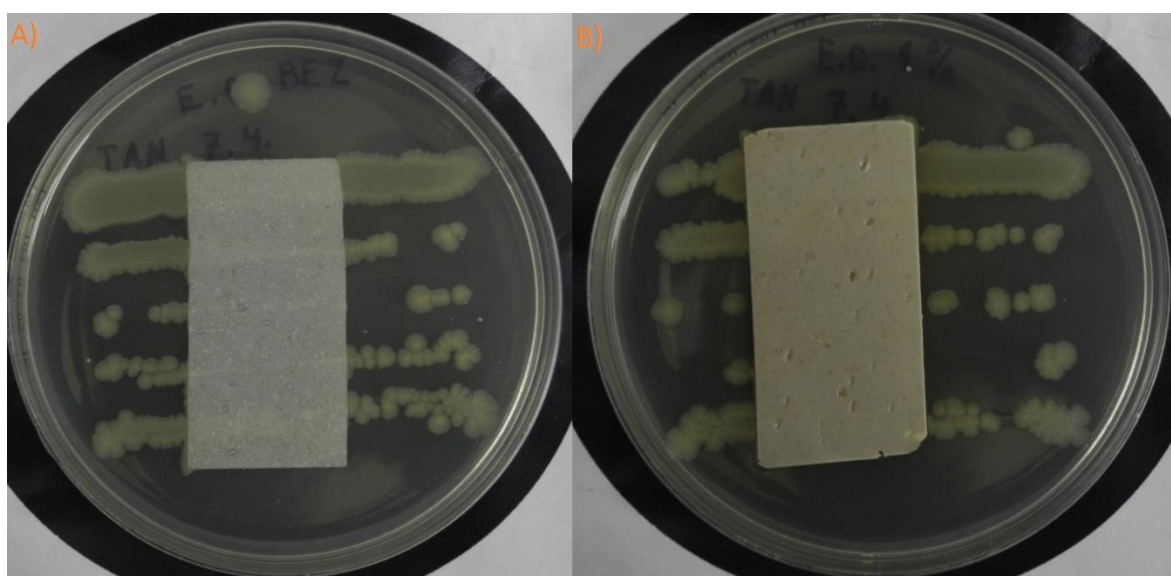
Obrázek 41: Snímky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou 0% (A) a 1% (B) po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Staphylococcus gallinarum*



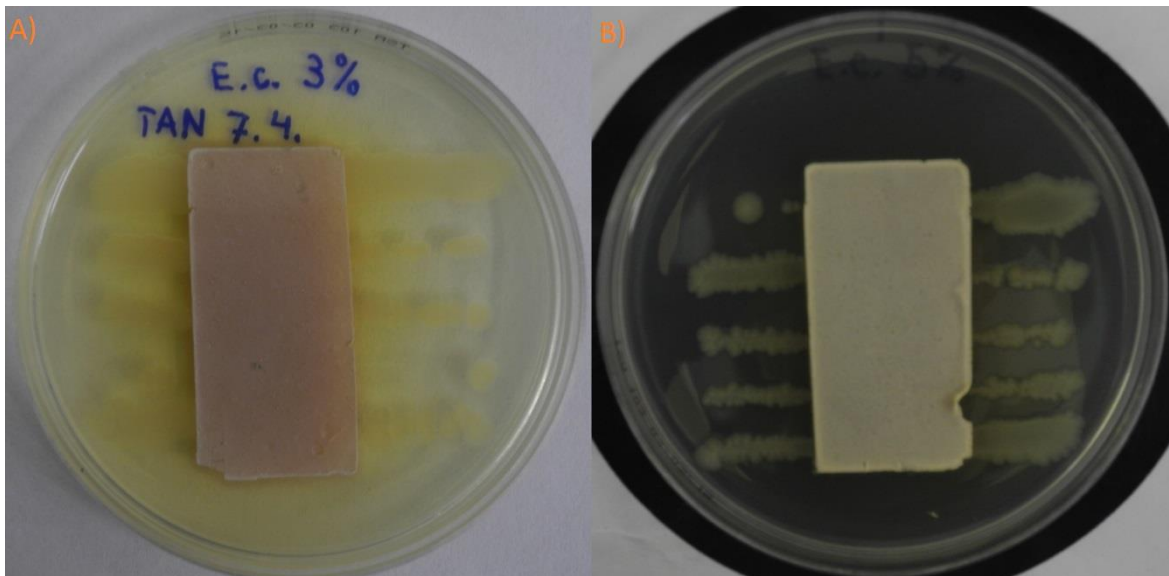
Obrázek 42: Snímky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou 3% (A) a 5% (B) po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Staphylococcus gallinarum*



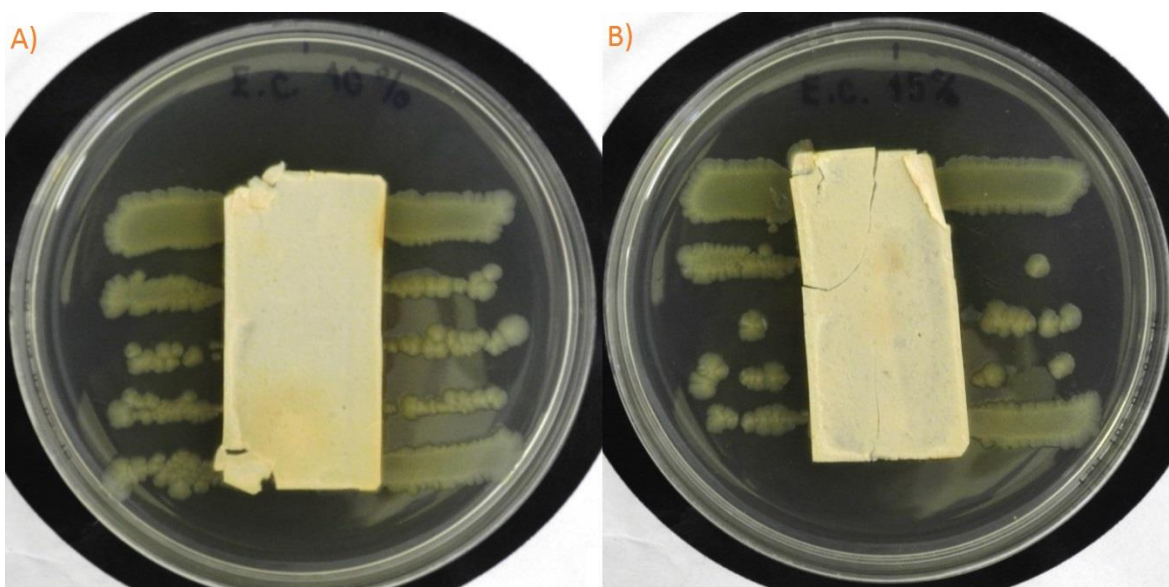
Obrázek 43: Snímky křemičitých nanovláken s immobilizovanou kyselinou tříslovou 10% (A) a 15% (B) po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Staphylococcus gallinarum*



Obrázek 44: Snímky křemičitých nanovláken s immobilizovanou kyselinou tříslovou 0% (A) a 1% (B) po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Escherichia coli*

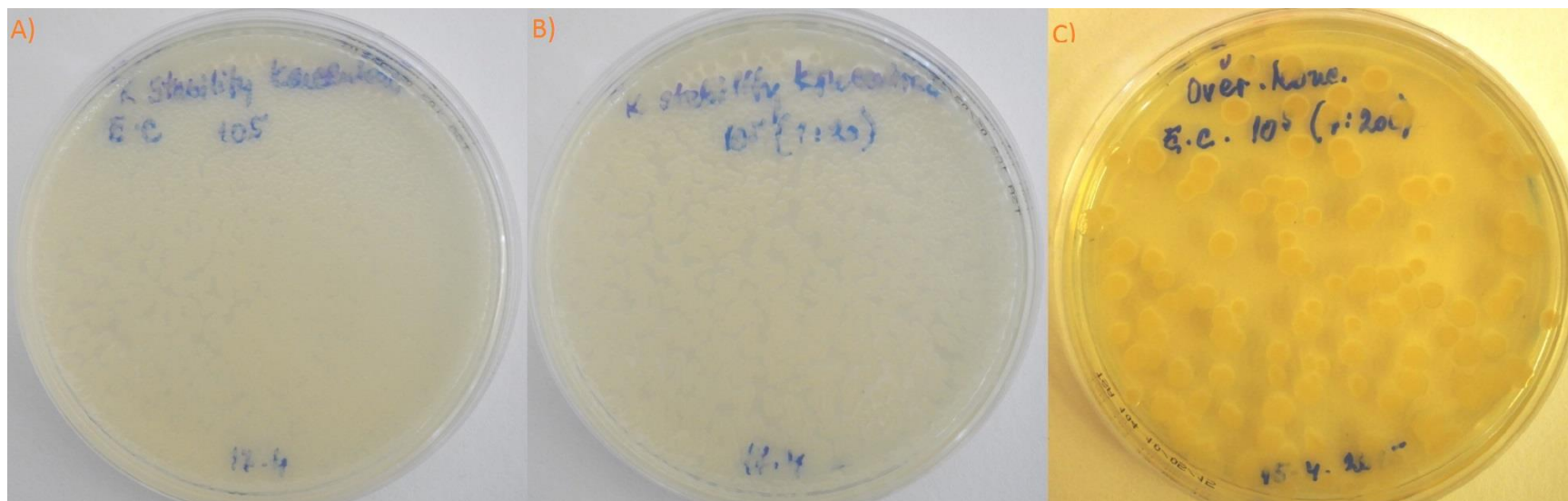


Obrázek 45: Snímky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslou 3% (A) a 5% (B) po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Escherichia coli*

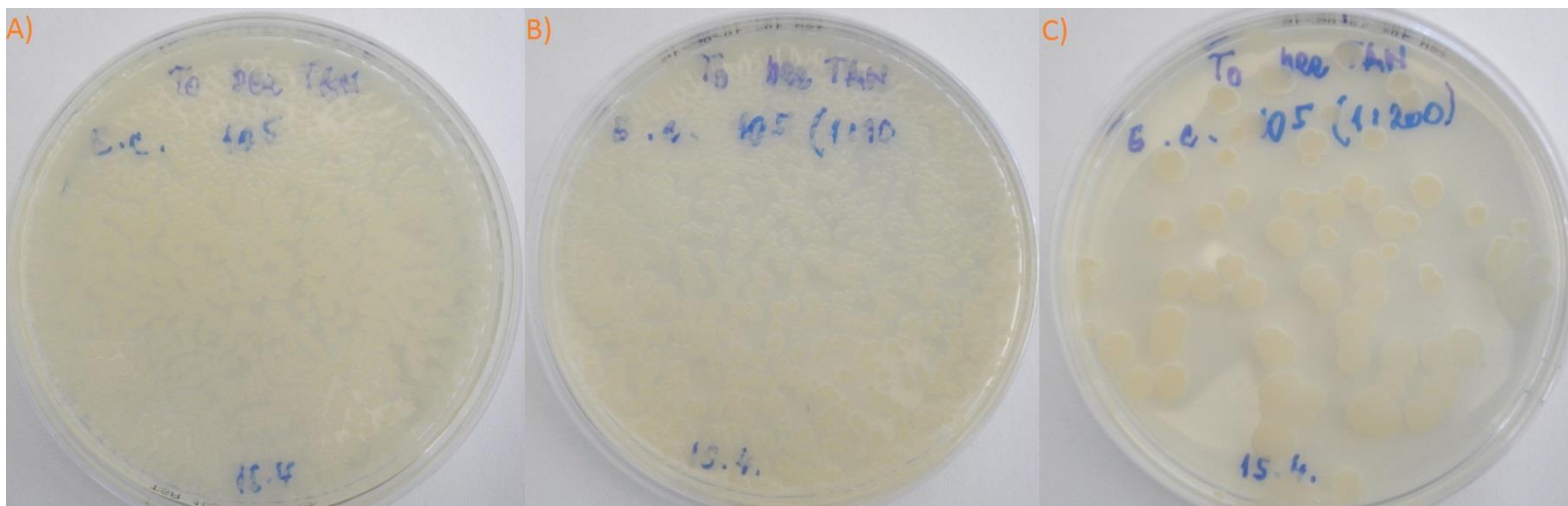


Obrázek 46: Snímky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslou 10% (A) a 15% (B) po inkubaci v přítomnosti bakteriálního kmene *Escherichia coli*

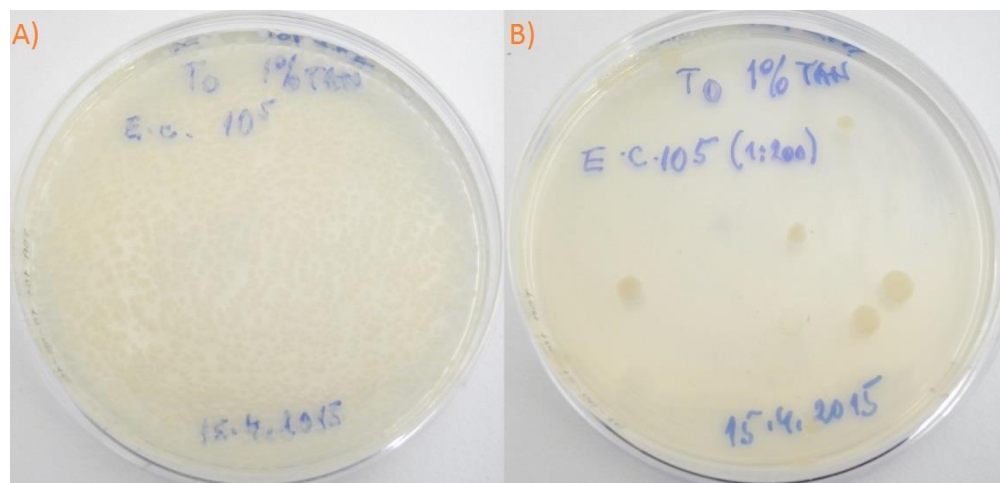
Příloha B - Výsledky kvantitativních testů antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou



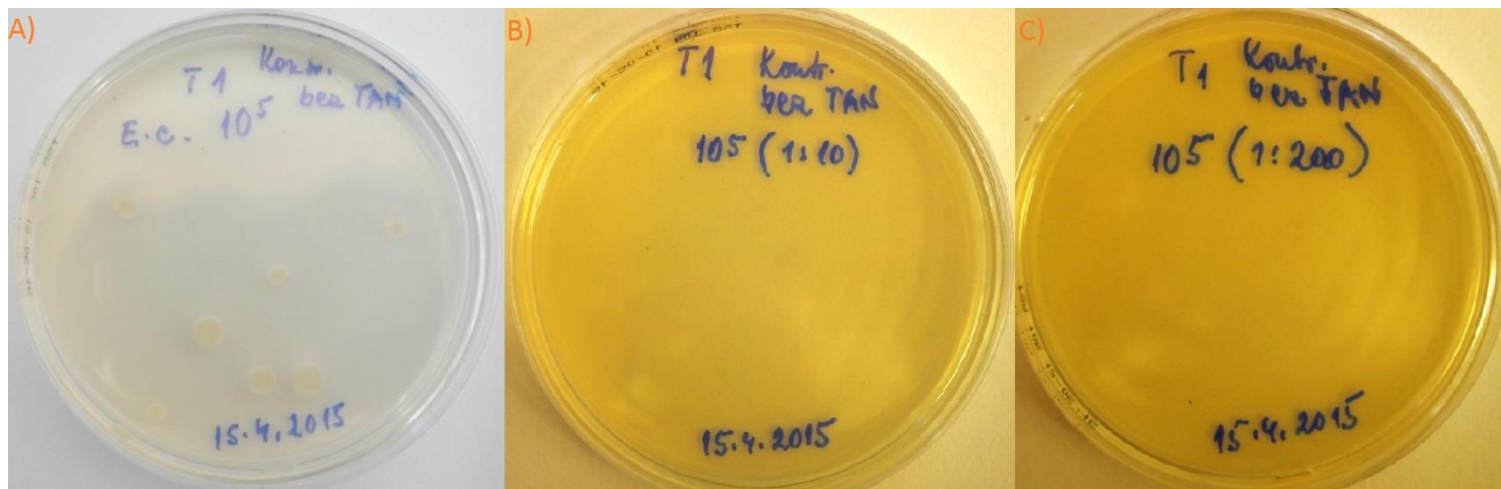
Obrázek 47: Snímky kolonií *Escherichia coli* – ověření koncentrace bakteriálního kmene použitého k testování v ředění: 10^5 (A), 10^5 (1:10) (B) a 10^5 (1:200) (C)



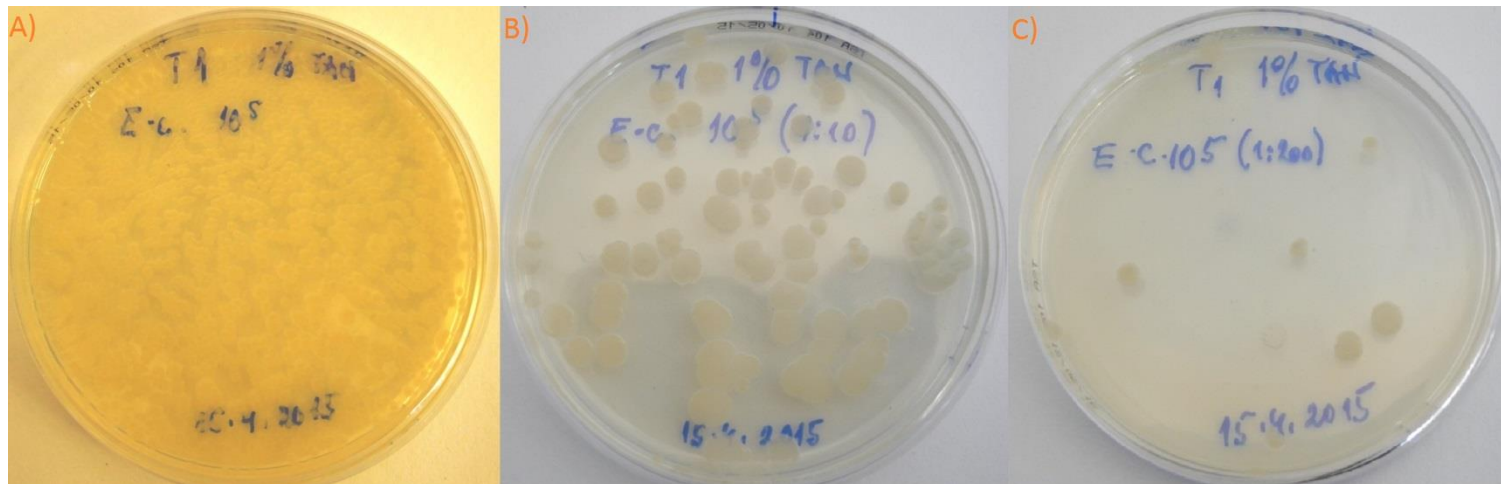
Obrázek 48: Snímky kolonií *Escherichia coli* v čase T_0 , pro vzorky křemičitých nanovláken bez imobilizované kyseliny tříslové, použita ředění: 10^5 (A), 10^5 (1:10 (B)) a 10^5 (1:200) (C)



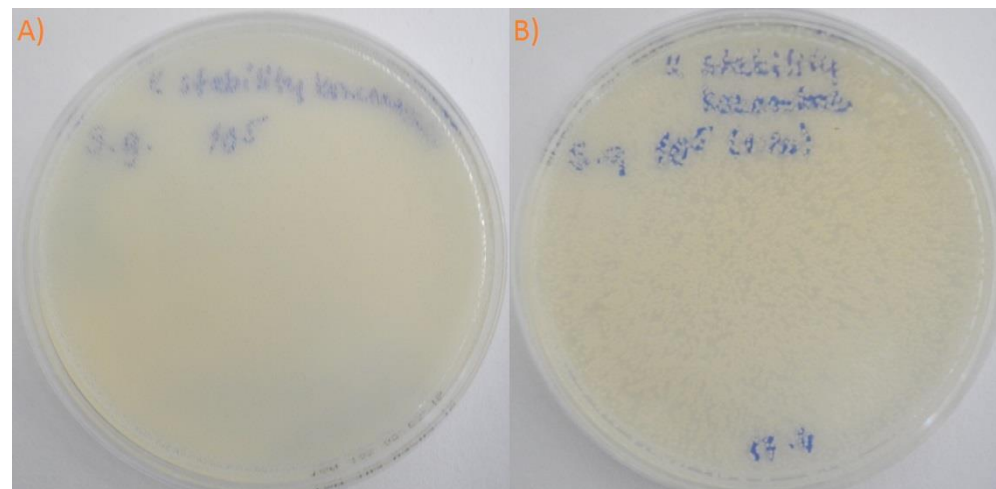
Obrázek 49: Snímky kolonií *Escherichia coli* v čase T_0 , pro vzorky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou (1%), použita ředění: 10^5 (A) a 10^5 (1:200) (B)



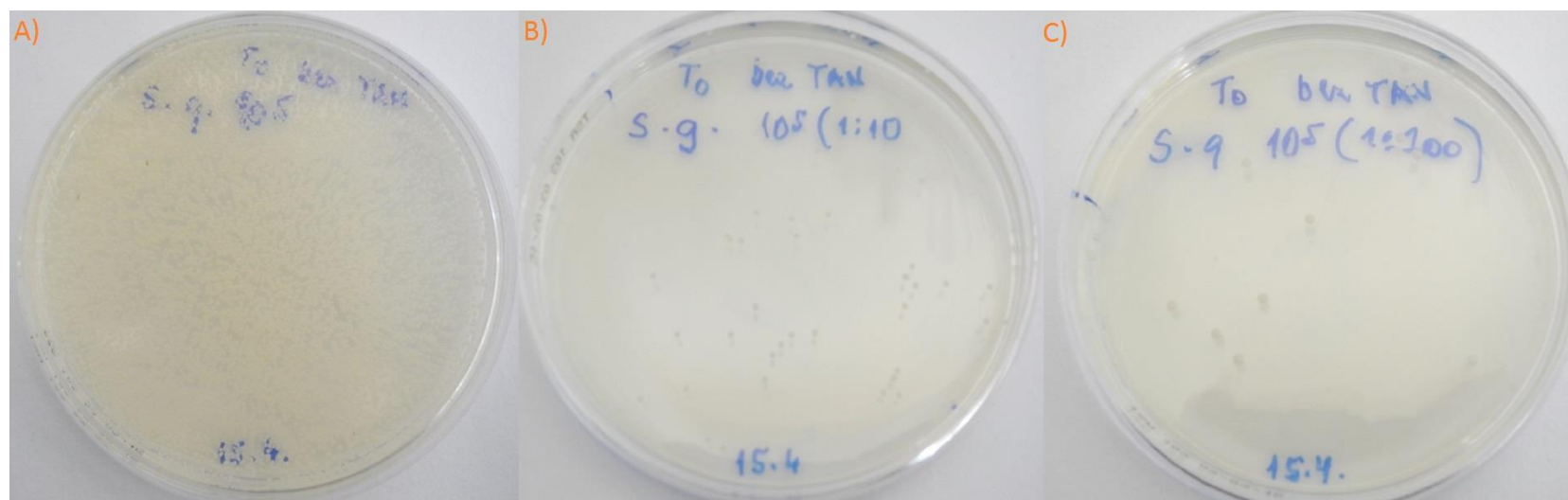
Obrázek 50: Snímky kolonií *Escherichia coli* v čase T_1 , pro vzorky křemičitých nanovláken bez imobilizované kyseliny tříslové, použitá ředění: 10^5 (A), 10^5 (1:10) (B) a 10^5 (1:200) (C)



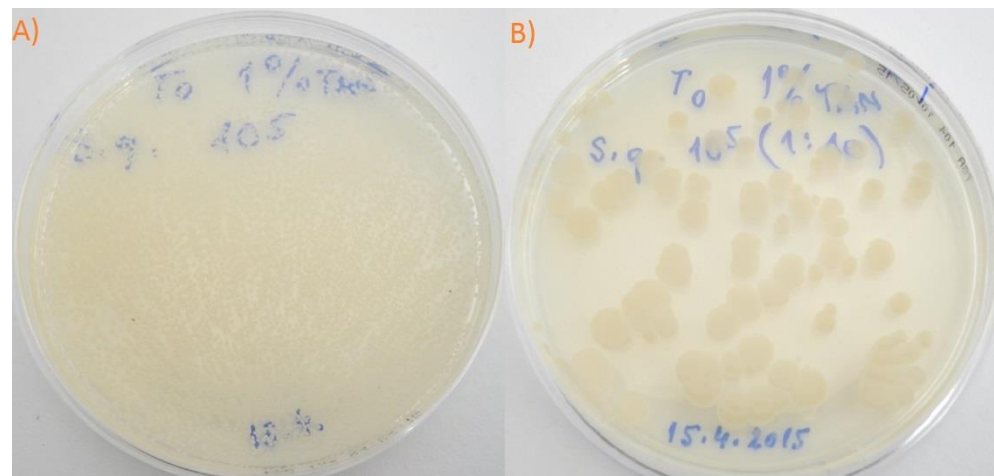
Obrázek 51: Snímky kolonií *Escherichia coli* v čase T_1 pro vzorky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou (1%), použitá ředění: 10^5 (A), 10^5 (1:10) (B) a 10^5 (1:200) (C)



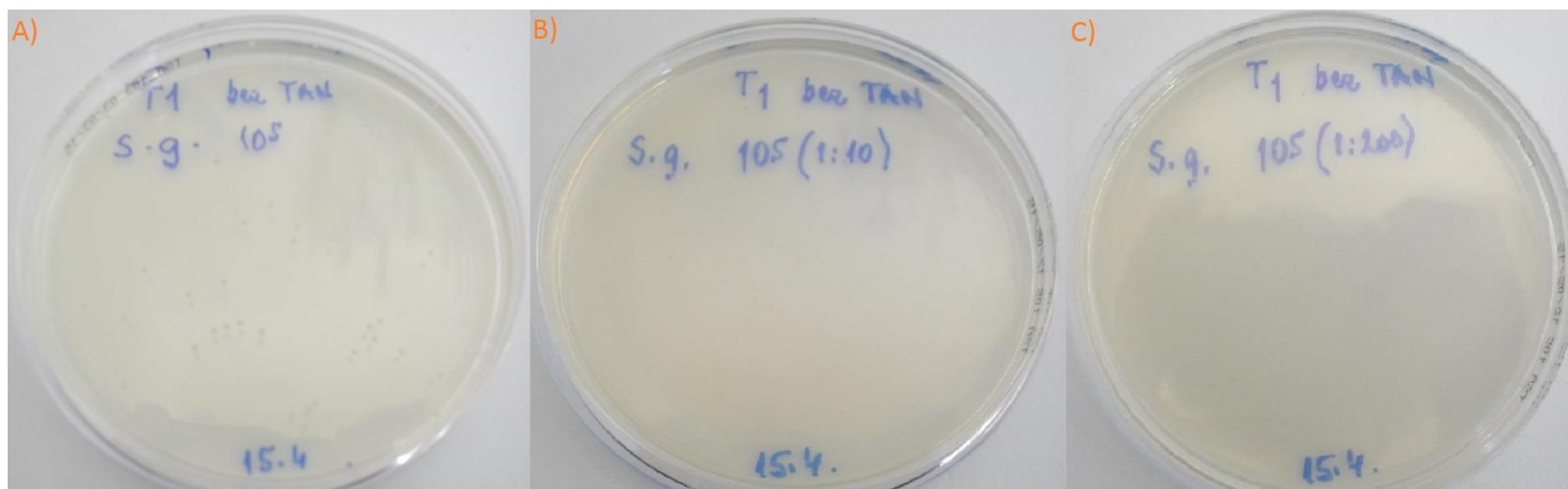
Obrázek 52: Snímky kolonií *Staphylococcus gallinarum* – ověření koncentrace bakteriálního kmene použitého k testování v ředění: 10^5 (A) a 10^5 (1:200) (B)



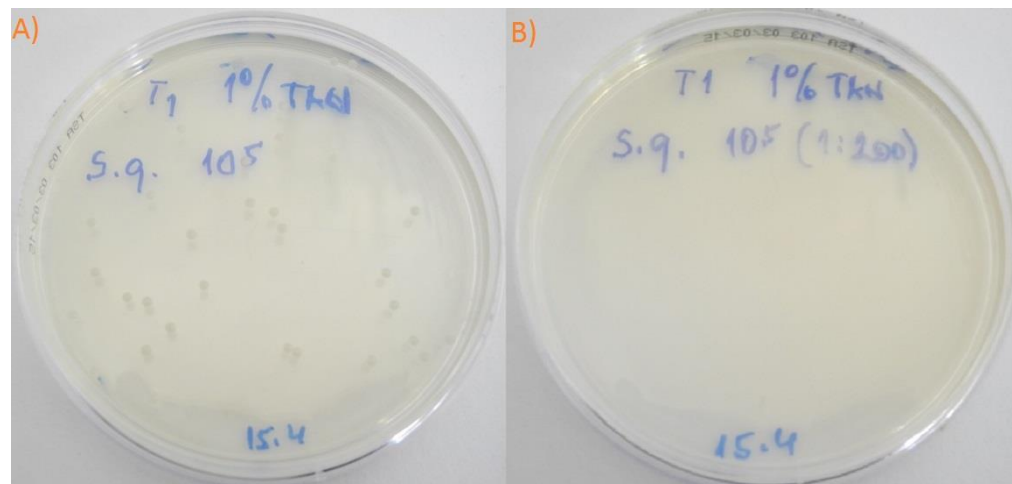
Obrázek 53: Snímky kolonií *Staphylococcus gallinarum* v čase T_0 , pro vzorky křemičitých nanovláken bez imobilizované kyseliny tříslové, použitá ředění: 10^5 (A), 10^5 (1:10) (B) a 10^5 (1:200) (C)



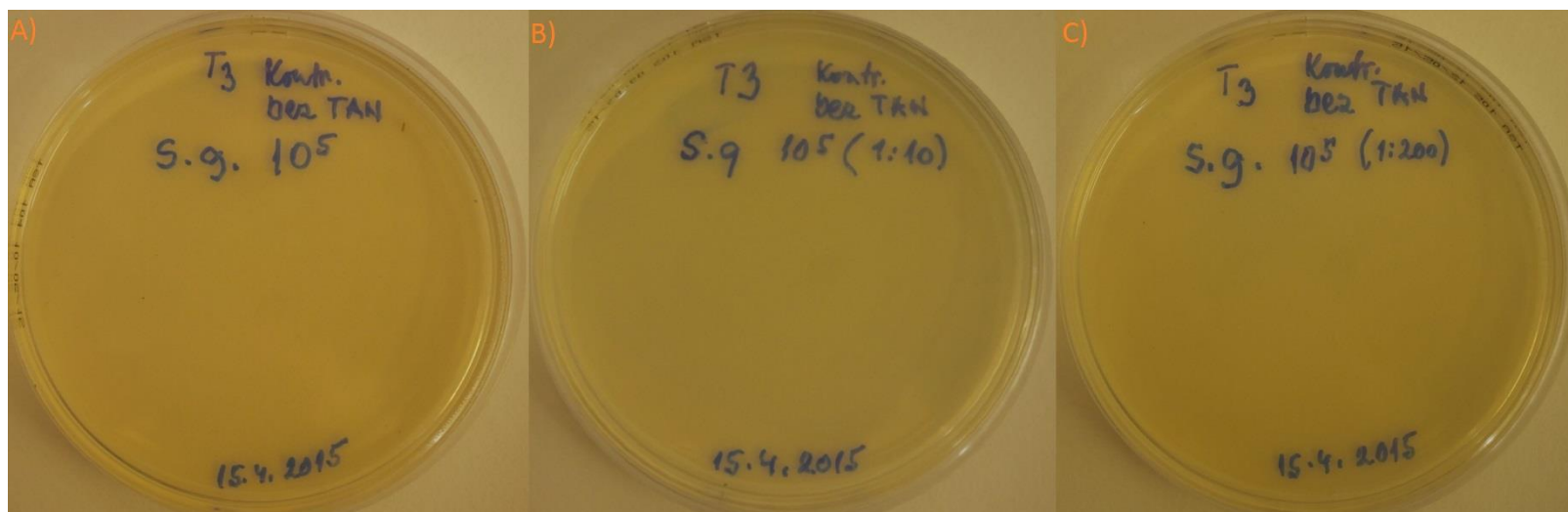
Obrázek 54: Snímky kolonií *Staphylococcus gallinarum* v čase T_0 , pro vzorky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou (1%), použitá ředění: 10^5 (A) a 10^5 (1:10) (B)



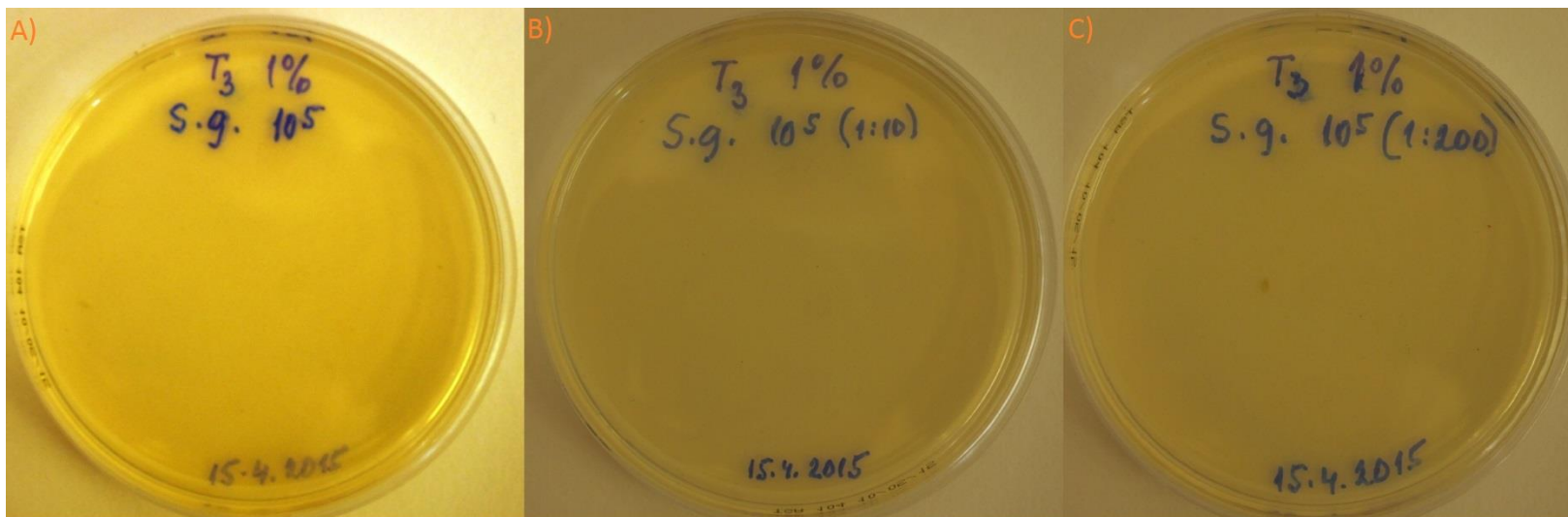
Obrázek 55: Snímky kolonií *Staphylococcus gallinarum* v čase T_1 , pro vzorky křemičitých nanovláken bez imobilizované kyseliny tříslové, použitá ředění: 10^5 (A), 10^5 (1:10) (B) a 10^5 (1:200) (C)



Obrázek 56: Snímky kolonií *Staphylococcus gallinarum* v čase T_1 pro vzorky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou (1%), použité ředění: 10^5 (A) a 10^5 (1:200) (B)



Obrázek 57: Snímky kolonií *Staphylococcus gallinarum* v čase T_3 , pro vzorky křemičitých nanovláken bez imobilizované kyseliny tříslové, použité ředění zleva: 10^5 (A), 10^5 (1:10) (B) a 10^5 (1:200) (C)



Obrázek 58: Snímky kolonií *Staphylococcus gallinarum* v čase T_3 pro vzorky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou (1%), použitá ředění: 10^5 (A), 10^5 (1:10) (B) a 10^5 (1:200) (C)