

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ CHEMIE



**PŘÍPRAVA KOMPOZITŮ NANOČÁSTIC STRÍBRA S
UHLIČITANEM VÁPENATÝM**

Bakalářská práce

Autor: Lenka Hrabalová

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: 1407R023/00 – 1 Nanomateriálová chemie

Forma studia: Prezenční

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

Olomouc 2015

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

V Olomouci dne Lenka Hrabalová

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Liboru Kvítkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a ochotu při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, PhD. za pořízení snímků z transmisního elektronového mikroskopu a za pomoc při výběru vzorků na testování biologické aktivity. Mgr. Renatě Večeřové za vyhodnocení biologické aktivity vzorků kompozitů. Katedře geologie za pomoc při určování velikosti částic. Ing. Petře Bazgerové za snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu a výsledky z EDS a Mgr. Janu Kolaříkovi za stanovení obsahu stříbra pomocí AAS. Chtěla bych poděkovat celé Katedře fyzikální chemie a v neposlední řadě celé mé rodině za podporu při studiu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Lenka Hrabalová
Název práce:	Příprava kompozitů nanočástic stříbra s uhličitanem vápenatým
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Libor Kvítek, Csc.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	<p>Cílem bakalářské práce bylo připravit definované mikročástice uhličitanu vápenatého, pomocí modifikované srážecí reakce, a následně jejich kompozity s nanočásticemi stříbra. Tyto kompozity byly připravovány dvojitým způsobem: adsorpcí předem připravených nanočástic, nebo jejich přímou přípravou v přítomnosti mikročástic uhličitanu vápenatého. Mikročástice uhličitanu vápenatého i kompozity byly charakterizovány pomocí elektronové mikroskopie (SEM, TEM), prvkové složení bylo ověřeno pomocí metody EDS. U připravených kompozitů byl rovněž stanoven obsah stříbra metodou AAS a následně byla stanovena i jejich antibakteriální aktivita. Výsledky prokázaly, že kompozity připravené redukční metodou obsahovaly větší množství nanočástic stříbra, a také byly účinnější z hlediska antibakteriální aktivity.</p>
Klíčová slova:	Uhličitan vápenatý, nanočástice stříbra, kompozit
Počet stran:	50
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Lenka Hrabalová

Title: Preparation of composites of silver nanoparticles and calcium carbonate

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of physical chemistry

Supervisor: Doc. RNDr. Libor Kvítek, Csc.

The year of presentation: 2015

Abstract: The aim of this thesis was to prepare a defined micro-particles of calcium carbonate, using the modified precipitation reactions and, subsequently, their composites with nanoparticles of silver. These composites were prepared in two ways: by adsorption of the previously prepared nanoparticles, or their direct preparation in the presence of the microparticles of calcium carbonate. Micro-particles of calcium carbonate and composites were characterized using electron microscopy (SEM, TEM), elemental composition was verified using the method of EDS. For the prepared composites was also determined content of silver using the AAS method and subsequently has been determined their antibacterial activity. The results showed that the composites prepared by the reduction method include a greater amount of silver nanoparticles, and also be more efficient from the point of view of antibacterial activity.

Keywords: Calcium carbonate, silver nanoparticles, composite

Number of pages: 50

Language: Czech

Vysoká škola: Univerzita Palackého v Olomouci Fakulta: přírodovědecká
Katedra: Katedra fyzikální chemie Školní rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jméno: **LENKA HRABALOVÁ**

Studijní obor: Nanomateriálová chemie

Název práce: Příprava kompozitů nanočástic stříbra s uhličitanem vápenatým.
česky: Preparation of composites of silver nanoparticles and calcium carbonate.
anglicky:

Zásady pro vypracování:

1. Provedení literární rešerše na téma přípravy koloidních a mikrometrických částic uhličitanu vápenatého včetně přípravy kompozitů uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra.
2. Experimentální studium přípravy koloidních a mikrometrických částic uhličitanu vápenatého včetně přípravy kompozitů uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra se zaměřením na vliv koncentrace a modifikátorů na fyzikální parametry vznikajících částic.
3. Vyhodnocení a interpretace výsledků se zaměřením na zhodnocení vlivu podmínek a použitých modifikátorů na vlastnosti připravených kompozitů.
4. Vypracování bakalářské práce.
5. Příprava a prezentace multimediální prezentace bakalářské práce.

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah původní zprávy: 30-50 stran

Seznam odborné literatury:

- N. N. Greenwood, A. Earnshaw: Chemie prvků, Informatorium, Praha 1993
- M. Takeo: Disperse systems, Wiley-VCH, Weinheim, 1999
- E. D. Ščukin: Koloidní chemie, Academia, Praha 1990
- P. J. van der Put: The Inorganic Chemistry of Materials, Plenum Press 1998
- původní časopisecká sdělení dle vlastní literární rešerše

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

Datum zadání bakalářské práce: 22. 9. 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2015



.....
podpis studenta



.....
podpis školitele



.....
podpis vedoucího katedry

Obsah

ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Úvod k nanotechnologiím	10
1.1.1 Nanočástice	11
1.1.2 Příprava nanočástic stříbra	13
1.1.3 Využití nanočástic stříbra	14
1.2 Charakteristika uhličitanu vápenatého	16
1.2.1 Výskyt uhličitanu vápenatého	17
1.2.2 Využití uhličitanu vápenatého	18
1.2.2.1 Kostní implantáty	19
1.2.3 Příprava mikročástic uhličitanu vápenatého	21
1.2.4 Příprava kompozitu uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra	22
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
2.1 Chemikálie a přístrojové vybavení	23
2.2 Pracovní postupy	24
2.2.1 Příprava uhličitanu vápenatého	24
2.2.2 Příprava nanočástic stříbra	26
2.2.3 Příprava kompozitů nanoAg@CaCO ₃	27
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	29
3.1 Uhličitan vápenatý	29
3.2 Kompozity uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra	35
4 ZÁVĚR	45
5 SUMMARY	46
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47

ÚVOD

Uhličitan vápenatý je biokompatibilní sloučenina, vyskytující se jako opora těla u mnohých organismů. V lidském těle je spolu s fosforečnanem vápenatým hlavní minerální složkou kostní tkáně. Vzhledem k výjimečným vlastnostem, hojnému výskytu na zemi i v podstatě jednoduché těžbě našel uhličitan vápenatý mnohá uplatnění v průmyslu, zemědělství i v medicíně.

V posledních letech se uhličitan vápenatý stal jednou ze složek, které se používají k tvorbě kostních či chrupavkových implantátů. Nejen že tyto implantáty dokonale kopírují stavbu lidské kosti, ale poskytují i mnohé výhody z hlediska resorpce, biokompatibility či pórovitosti.^[1,2]

Nicméně i v případě tohoto biokompatibilního materiálu se během implantací stále objevují problémy s infekcí, která způsobuje vážné pooperační komplikace. Vzhledem k stále se zvyšující odolnosti bakterií a plísní vůči antibiotikům, se tento problém stává kritickým. Tento problém by mohly vyřešit stříbrné nanočástice, které vykazují antibakteriální účinky i vůči těmto rezistentním bakteriím. Kompozit uhličitanu vápenatého a nanočástic stříbra by tak mohl uvedený problém s pooperačními komplikacemi i s rezistencí mikroorganismů vyřešit. Kompozitní materiál by mohl sloučit výhody uhličitanu vápenatého s ohledem na biokompatibilitu s antibakteriální aktivitou nanočástic stříbra. Kompozit by tak mohl nalézt využití právě v oblasti medicíny v souvislosti s vývojem nových generací implantátů.

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu definovaných mikročástic uhličitanu vápenatého z hlediska tvaru a velikosti a následně na přípravu kompozitního materiálu tvořeného mikročásticemi uhličitanu vápenatého a nanočásticemi stříbra. Takto připravený kompozit byl studován pomocí elektronové mikroskopie a otestován na biologickou aktivitu vůči řadě patogenních bakterií.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Úvod k nanotechnologiím

Nanotechnologie je oblast vědy a výzkumu, která se zabývá cílenou manipulací a využitím struktur, jejichž měřítko se pohybuje v oblasti nanometrů. Konkrétně se jedná o oblast 1-100 nm, ve které musí ležet alespoň jeden rozměr struktury. Za prvního průkopníka nanotechnologií je považován americký fyzik Richard Feynman, který tuto oblast nastínil již v 50. letech 20. stol. Bohužel, v této době za svou myšlenku sklídl spíše výsměch. Období miniaturizace přišlo až v následujících desetiletích.

Miniaturizace objektů, či struktur do oblasti nanometrů s sebou však přináší i mnohá úskalí, která je nutno překonat. Mezi ně patří i problém, který se týká studia těchto nanoobjektů. Běžný optický mikroskop rozlišuje objekty o velikostech v řádech mikrometrů, protože k detekci částic využívá světelný paprsek. Toto rozlišení však pro struktury v řádech jednotek, či desítek nanometrů není dostatečné. Proto se vědci věnovali vývoji mikroskopu, který by pracoval na jiném principu. Ve 30. letech 20. stol. byl objeven mikroskop elektronový, který místo světelného paprsku využíval paprsek elektronový a umožnil tak studovat objekty právě o rozměru nanometrů. Velikost nanočástic lze rovněž studovat na základě dynamického rozptylu světla, nebo pomocí metod založených na pohybu částic v silovém poli (např. ultracentrifugy). Obecně se ale objevuje problém s různým tvarem částic, který ztěžuje určení velikosti. Většina nepřímých metod využívá aproximace ekvivalentní koule, která má stejné či podobné vlastnosti jako daná částice. Díky elektronové mikroskopii či mikroskopii se skenující sondou je možné přímo zkoumat objekty s rozlišením několika nanometrů a studovat tak i jejich skutečný tvar (morfologii).

Objekty, nebo částice však nemůžeme zmenšovat do nekonečna. Existují i jistá omezení. Pro částice existuje určitá hranice, kterou nelze překročit. Jedná se o rozměr 0,1 nm. V této oblasti se totiž pohybují velikosti atomů. Jestliže se velikosti blíží k atomovému měřítku, tak se fyzikální zákony navíc mění od klasických ke kvantovým. Vlastnosti materiálů jsou v nanorozměru i z tohoto důvodu odlišné oproti vlastnostem mikrometrických a větších částic. Mimo kvantové jevy za specifické chování nanočástic odpovídá rovněž jejich velký povrch ve srovnání s jejich objemem.

Při zmenšování částic dochází k tomu, že většina atomů pobývá na povrchu částice v porovnání s počtem atomů, které se nachází uvnitř (v objemu) částice. Atomy na povrchu částic jsou ve vyšším energetickém stavu a díky tomu vykazují jisté anomální povrchové vlastnosti. Zmíněné kvantové efekty pak souvisí s jiným uspořádáním elektronů, než je tomu u velkých objektů. Díky tomu získáme částice se specifickými vlastnostmi využitelné v mnoha oblastech vědy a průmyslu.^[3, 4, 5, 6]

1.1.1 Nanočástice

Prvotní zmínka o nanočásticích (koloidních částicích) pochází patrně asi ze 4. století před n. l. z Číny a Egypta, kdy byl používán pigment z nanočástic zlata. Tento objev dokládají tzv. Lykurgovy poháry, které mají neobvyklé optické vlastnosti. V těchto dobách však lidé netušili, co to nanočástice jsou, ani v čem spočívá jejich výjimečnost. Až v polovině 19. století Francesco Selmi připravil a pozoroval vlastnosti malých částíček hmoty, které nazval koloidy. Z té doby pochází i první nanočástice (koloidy) zlata připravené M. Faradayem.

Nanočástice patří do koloidních disperzí, jsou to mikroheterogenní soustavy s rozměry částic od 1 nm až po částice s velikostmi 1 μm . Koloidní soustavy jsou významné zejména díky svým ojedinělým fyzikálně chemickým vlastnostem, které souvisí s velikostí částic, ale i s typem částice.^[7]

Koloidní soustavy jsou tvořené z částic, které mají velkou plochu povrchu. Z toho vyplývá přebytek povrchové energie koloidních soustav, který má vliv na stabilitu výsledné disperze. Koloidní soustavy se tedy nachází v tzv. metastabilním stavu. Tedy ve stavu se zvýšenou povrchovou energií. Aby mohlo dojít k přechodu do stavu s nižší povrchovou energií, musí soustava překonat jistou energetickou bariéru, přičemž dochází ke spojování částic, tedy k agregaci. Z toho důvodu musíme koloidní soustavy stabilizovat, abychom předcházeli agregaci částic. Stabilizaci můžeme provádět několika způsoby. Například pomocí povrchově aktivních látek. Na základě uvedené charakteristiky koloidních soustav lze říci, že nanočástice (resp. disperze nanočástic) jsou jakousi podskupinou koloidních disperzí. Proto nebude v dalším textu rozlišováno mezi koloidními disperzemi a disperzemi nanočástic.

V současné době bylo vyrobeno mnoho druhů nanočástic. Z hlediska prvkového složení se jedná o nanočástice ušlechtilých kovů, až po nanočástice uhlíku, či železa.

S ohledem na tvar rozeznáváme nanočástice sférické, protáhlé, ve tvaru krychle a mnoho dalších. Rozměr a tvar nanočástic souvisí s metodou přípravy a s dalšími faktory jako je teplota, nebo koncentrace reaktantů.

Každý typ nanočástic, má své charakteristické vlastnosti, mezi které patří specifické magnetické, elektrické, nebo optické vlastnosti. S jejich vlastnostmi pak souvisí i jejich případné využití.

Optické vlastnosti nanočástic výrazně souvisí s jejich velikostí. Při interakci světelného paprsku s koloidní soustavou dojde částečně k pravé absorpci a částečně k rozptylu záření. Rozptyl záření umožňuje charakterizovat velikost koloidních částic. Jejich přibližnou velikost však můžeme odhadnout i na základě zbarvení, které ovlivňuje typ nanočástic. Se změnou velikosti tedy souvisí většina optických jevů. Například u kvantových teček pozorujeme luminiscenci, která je také závislá od velikosti teček.

Elektrické vlastnosti koloidních soustav souvisí s elektrickým nábojem na povrchu částic. Elektrický náboj ovlivňuje uspořádání iontů v roztoku do tzv. elektrické dvojvrstvy. Elektrickou dvojvrstvu rozdělujeme na dvě části, mezi nimiž se ustanovuje zeta potenciál. Hodnota elektrokinetického (zeta) potenciálu umožňuje předpovědět a kontrolovat stabilitu koloidních soustav.

Nanočástice stříbra jsou nejčastěji připravovány jako vodné disperze, jejichž barva je ovlivněna velikostí nanočástic. Zbarvení disperzí se pohybuje od medově žluté, opaleskující zelené až po šedé roztoky. Ke zbarvení dochází díky povrchovému plazmonu, což je oscilace elektronů ve vodivostním pásu při dopadu světelného paprsku o určité vlnové délce. Nanočástice stříbra mají mimo tyto jedinečné optické i další zajímavé vlastnosti - katalytické a hlavně antibakteriální účinky, díky nimž získaly svou popularitu i v běžném životě lidí. Antibakteriální účinky stříbra jsou známy již od pradávna. Lidé využívali stříbro, nebo jeho sloučeniny na přípravu mastí proti popáleninám, vředům, nebo jiným zraněním. Často bylo stříbro používáno v podobě chirurgických nástrojů, nebo jako nádoby na dezinfekci pitné vody.^[8] Nicméně kovové makroskopické stříbro nebylo až tak účinné v porovnání s nanočásticemi stříbra. Zmenšení částic stříbra sebou přineslo i velké zvýšení antibakteriálních účinků.^[7]

1.1.2 Příprava nanočástic stříbra

Z hlediska přípravy nanočástic se obecně rozlišují dva základní principy. První z nich jsou tzv. top-down metody, při kterých se vychází z makroskopického objektu, jenž je dále rozkládán na menší části. Mezi top-down metody přípravy nanočástic patří převážně fyzikální procesy, jako je mletí, nebo drcení vodním paprskem. Naopak u tzv. bottom-up metod jsou výchozí stavební jednotky jednotlivé atomy či molekuly. Objekty nejsou děleny na menší části, nýbrž sdružovány v jednotlivé nanočástice. Využití bottom-up metod je výhodnější, jelikož se snadněji ovlivní výsledná velikost nanočástic pomocí podmínek vhodného fyzikálního či chemického děje.^[6]

Metody přípravy nanočástic se rozdělují i podle jiných kritérií. Jedná se o chemické, fyzikální a biologické metody. Mezi chemické metody patří redukce, elektrochemické metody, pyrolýza, nebo příprava částic za využití UV záření. Do metod fyzikálních patří například kondenzační přípravy, obloukový výboj, nebo mletí v kulových mlýnech. Mezi metody biologické patří zejména přípravy pomocí enzymů.^[9]

Nanočástice stříbra se připravují různými procesy, mezi které řadíme redukci anorganickými látkami, redukci organickými látkami, přípravu pomocí ultrazvuku, UV záření, nebo laserovou ablací.

Mezi nejčastěji používané anorganické redukční činidlo patří tetrahydridoboritan sodný. S jeho pomocí je možné připravit nanočástice o velikosti několika nanometrů, až po větší částice o rozměru několika desítek nanometrů. Vše záleží na konkrétním postupu – hlavní roli hraje zejména teplota a molární poměr redukčního činidla a stříbrných iontů. Další redukční činidla, která je možné využít, jsou hydrazin, vodík, nebo hydroxylamin.

Na přípravu nanočástic stříbra je vhodné využít i organická redukční činidla. Nejčastěji je využíván citrát sodný, kyselina askorbová, hydrochinon, nebo sacharidy, tedy postup známý jako Tollensův proces. Jedná se o metodu, při které dochází k redukci stříbrných iontů pomocí sacharidů (maltosa, glukosa) v přítomnosti amoniaku. Nanočástice připravené touto metodou mohou mít různý tvar i velikost, přičemž velikost ovlivňuje koncentrace amoniaku, který funguje jako komplexotvorné činidlo.^[10]

Kromě redukčních procesů, je možné využít i účinků ultrazvuku. Vlivem ultrazvuku dojde k rozložení vody na radikály. Tyto radikály v přítomnosti organických látek reagují za vzniku stabilnějších organických radikálů. Tyto organické radikály fungují jako redukční činidlo. Obdobné výsledky, poskytuje i metoda přípravy nanočástic stříbra pomocí UV záření.

Jednou z fyzikálních metod přípravy nanočástic stříbra je i laserová ablace. Jedná se o drcení makroskopického stříbra, například fólie, pomocí laseru. Při této metodě jsou získány nanočástice stříbra o velikosti jednotek až desítek nm. Velikost nanočástic souvisí s typem laseru (vlnová délka, výkon), druhem rozpouštědla, ale i s délkou ozařování.

Nanočástice připravované v kapalných disperzích vyžadují přítomnost 3 základních složek: prekursoru nanočástic (AgNO_3), redukčního činidla a stabilizačního činidla. Tyto složky se mění v závislosti na typu připravovaných nanočástic. ^[7, 11]

1.1.3 Využití nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra nacházejí mnohá uplatnění v medicíně, farmaceutickém průmyslu, nebo jako senzory. Škála jejich uplatnění je široká, avšak výrazně souvisí s jejich velikostí.

Nanočástice stříbra se využívají hlavně díky svým antibakteriálním účinkům. Stříbro se používalo jako antibiotikum již dříve, ovšem jeho účinky nebyly zdaleka tak velké a významné, jako v případě nanočástic stříbra. Díky objevu penicilinových antibiotik v roce 1929 Alexandrem Flemingem, došlo k výraznému útlumu využívání stříbra. V současné době se však řeší problém spojený s odolností bakterií vůči klasickým antibiotikům. Objev nanočástic stříbra naskytl novou možnost jak se rezistentním bakteriím bránit. ^[12]

Z hlediska antibakteriálních účinků se nanočástice stříbra využívají v medicíně, farmaceutickém průmyslu, kosmetickém průmyslu, nebo v průmyslu textilním. V běžném životě se setkáváme s různými typy tkanin, na které je nanášena vrstva nanočástic stříbra a působí tak antisepticky. Dále můžeme připomenout deodoranty, krémy, dezinfekční prostředky, obvazy s nanočásticemi stříbra, nebo chirurgické nástroje s touto úpravou.

Nevyužívají se však jen antibakteriální účinky nanočástic stříbra, ale také optické vlastnosti, které souvisí s povrchovou plazmovou rezonancí. Ty jsou využívány pro povrchově zesílenou Ramanovu spektroskopii. Nanočástice stříbra ve svém okolí zesilují dopadající elmg. záření a díky tomu pak dochází k zesílení Ramanova signálu. Další možností jak nanočástice využít je tvorba pigmentů do inkoustových tiskáren pro tisk elektrických obvodů. ^[11]

Spojením nanočástic s vhodným materiálem, který slouží jako podložka či výztuž, je možné dále zvýšit jeho užité vlastnosti. Vytvoří se tak kompozit, který spojí významné vlastnosti nanočástic a použitého nosného materiálu. Díky tomu je možné rozšířit oblast využití původních nanočástic. Mezi významné materiály tvořící kompozity s nanočásticemi stříbra patří například vlákna textilií, titanové zubní náhrady potažené nanoporézním křemíkem s obsahem nanočástic stříbra, grafen s obsahem nanočástic, který je vhodný pro katalýzu, nebo celulóza impregnovaná nanočásticemi stříbra, která je vhodná pro medicínské aplikace. ^[13, 14, 15, 16]

Kompozity s nanočásticemi stříbra jsou zajímavé právě pro antibakteriální účinky, díky nimž jsou schopné ničit bakterie, ale i houby. Jedním z takových materiálů pro kompozit s nanočásticemi stříbra by mohl být i uhličitan vápenatý, který se hojně využívá na přípravu kostních implantátů. Případná vrstva nanočástic na uhličitanu vápenatém, by mohla zabránit šíření infekcí během implantací. Touto myšlenkou se zabývali přední vědci z USA a Chile, přičemž v roce 2014 vyšel článek, který pojednává o akrylovém kostním cementu, na který byla nanesena vrstva nanočástic stříbra. Výsledky testování biologické aktivity tohoto kompozitního materiálu jasně prokázaly úbytek biofilmu, který se běžně tvoří na povrchu kostního cementu v biologickém prostředí. ^[17]

1.2 Charakteristika uhličitanu vápenatého

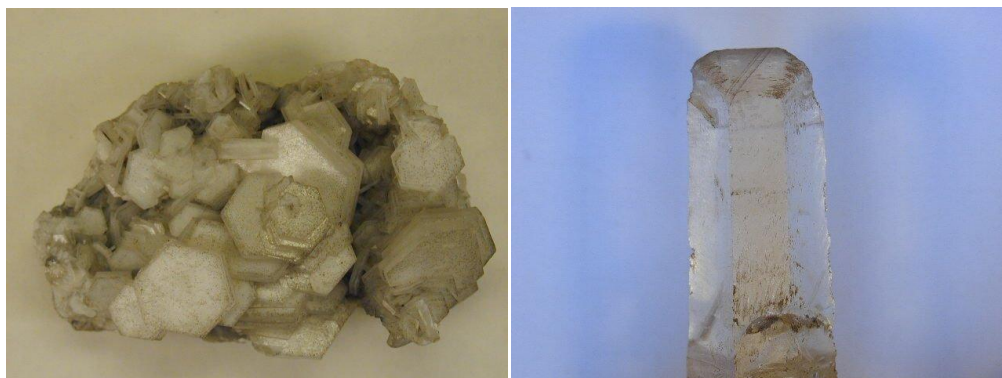
Uhličitan vápenatý je bílý, krystalický prášek, vyskytující se ve třech modifikacích: kalcit, aragonit, vaterit. Nejstabilnější a zároveň nejrozšířenější modifikace je kalcit, krystalizující v klencové soustavě. Barva kalcitu se pohybuje od průhledné až po medovou, nebo hnědou. Barevný odstín závisí na čistotě minerálu a typu příměsí. Je tedy možné najít i kalcit levandulově modrý, nebo růžový. Barvu způsobují defekty v krystalové mřížce, které vedou k odlišné absorpci světla. Na rozdíl od kalcitu, aragonit krystalizuje v kosočtverečné soustavě. Obvykle je aragonit v čisté formě, nebo obsahuje stopy stroncia. Ze všech tří modifikací je aragonit nejtvrdší a má největší hustotu. Na rozpoznání kalcitu od aragonitu je možné použít test na dusičnan kobaltnatý, který je dokáže snadno rozlišit. Vaterit krystalizuje v šesterečné soustavě. Jedná se o nejméně stabilní modifikaci, která byla připravena synteticky.

Tab. 1 Vlastnosti uhličitanu vápenatého

	Kalcit	Aragonit	Vaterit
Krystalická soustava	klencová	kosočtverečná	šesterečná
Dvojlom	0,172	0,156	0,172
Hustota [g/cm³]	2,72	2,94	2,72
Tvrдость	3	3,5-4	3

*Tvrдость je měřena v souladu s Mohsovou stupnicí tvrdosti.

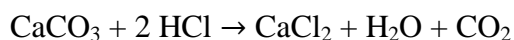
Zdroj: **TEGETHOFF**, F, Johannes **ROHLEDER** a Evelyn **KROKER**. *Calcium carbonate: from the Cretaceous period into the 21st century*. English ed. Boston: Birkhauser Verlag, c2001, ix, 342 p. ISBN 3764364254., upravila: Lenka Hrabalová.^[18]



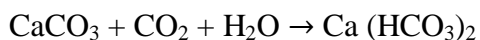
Obr. 1 Typický vzhled kalcitu a aragonitu

Zdroj: *Mineralogie pro školy* [online]. 2014 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/ugmnz/mineral/system.html#uhlicitany>, upravila: Lenka Hrabalová^[19]

Jako všechny uhličitany je i uhličitan vápenatý citlivý na přítomnost kyselin. S kyselinou chlorovodíkovou reaguje okamžitě za uvolnění oxidu uhličitého. Jedná se tedy o jednu z metod analytické chemie, při které můžeme rozpoznat uhličitan vápenatý. Reakce probíhá následně:



S ohledem na rozpustnost je uhličitan vápenatý téměř nerozpustný ve vodě. Rozpustnost se pohybuje přibližně kolem 13 mg/ l. Dá se však ovlivnit několika způsoby. Například přítomnost oxidu uhličitého ve vodě zvýší rozpustnost až 100násobně. Podobně lze rozpustnost ovlivnit i tlakem, nebo teplotou. Tyto procesy se běžně nachází v přírodě. Opačným jevem je srážení, ke kterému dochází odpařováním vody. Znáмым příkladem jsou krasové jevy, kde díky odpařování vznikají krápníky.^[18]



1.2.1 Výskyt uhličitanu vápenatého

Uhličitan vápenatý se v přírodě nachází převážně jako vápenec, mramor, nebo křída. Obsahují ho však i další minerály a horniny, jako například dolomit, nebo travertin. Uhličitan vápenatý je součástí i mnoha organismů, mezi které patří houbovci, měkkýši, členovci, žahavci, ale také lidský organismus.^[18]

Již zmíněné organismy, s výjimkou lidského, žijí převážně ve vodách, nejčastěji v mořích. Jejich tělo je chráněno vnější schránkou s obsahem oxidu křemičitého, chitinu, rohoviny, nebo uhličitanu vápenatého. Vnější schránka je v mnoha případech ve formě ulit, nebo lastur.^[20, 21] Když živý organismus zanikne, schránka se stává součástí sedimentů. Jedná se o takzvanou sedimentaci organogenetickou.^[18]

Lidský organismus, jak již bylo zmíněno, obsahuje uhličitan vápenatý. Vápník je nezbytnou složkou pro chod lidského organismu, ve kterém je ukládán ve formě solí, jako je uhličitan vápenatý, nebo fosforečnan vápenatý, převážně v kostech a zubech.

Kostní tkáň patří mezi nejtvrďší a nejpevnější tkáně v lidském těle. Kost se skládá z okostice, což je vazivová membrána na povrchu kostí, která je bohatě zásobená nervy a je místem kde dochází k přichycení svalů a šlach. Vnitřní část kosti tvoří kost hutná, houbovitá a kostní dřev. Kostní tkáň je tvořena buňkami, které mají za úkol syntetizovat, mineralizovat a resorbovat kostní hmotu. Během života se kost vyvíjí a ukládá minerály, které zajišťují její tvrdost. V konečném stádiu kost obsahuje 25 % oseinu-kolagenní složky, 5 % vody a 70 % anorganických látek, mezi které patří již zmiňovaný uhličitan vápenatý. ^[22, 23]

Zuby jsou tvrdé deriváty ústní sliznice. Zub se skládá z několika vrstev. Na povrchu se nachází sklovina, která obsahuje 97 % anorganických látek. Majoritní část zubu pak tvoří zubovina neboli dentin. Dentin je tvrdší než kostní tkáň a obsahuje 70 % anorganických látek. Uvnitř zubu je zubní dřev, tvořená převážně řídkým vazivem. Jedná se o vrstvu, která je bohatě protkána nervy a cévami. ^[24]

1.2.2 Využití uhličitanu vápenatého

Uhličitan vápenatý se používá v mnoha odvětvích průmyslu. Mezi ně patří papírenský průmysl, farmaceutický průmysl, stavebnictví, sochařství, výroba hnojiv, kosmetický průmysl a mnoho dalších.

V papírenském průmyslu se využívá jako plnivo, které má vliv na výsledné vlastnosti papíru. Díky uhličitanu jsou pozorovány změny v mechanických, nebo optických vlastnostech, jako je například tvrdost, pórovitost, zářivost, neprůsvitnost, nebo lesk. Hojně se využívá i jeho vliv na výslednou odolnost papíru vůči kyselinám, která se při jeho použití zvyšuje.

Odkyselování pomocí vápenců se využívá i v zemědělství, nebo jako ochrana proti kyselým dešťům v lesích, kde se používá uhličitan vápenatý ve formě prášku.

Z hlediska ochrany životního prostředí se uhličitan vápenatý využívá nejenom na odkyselování, ale i na sanaci odpadních vod nebo na odsiřování elektráren, tepláren, či spaloven. Po odsiřování je výsledný materiál - dihydrát síranu vápenatého dále využíván například na výrobu sádry, nebo cementu.

V kosmetickém průmyslu se využívá na přípravu pudrů, nebo zubních past. Bývá využíván i jako přísada do léčivých přípravků na žaludeční vředy.

V současné době se začal využívat i na přípravu kostních implantátů. Zde se využívá hlavně jeho biokompatibilita, pórovitost a jeho snadná resorpce v lidském těle. [18, 25]

1.2.2.1 Kostní implantáty

Implantace, či transplantace materiálů, nebo tkání s sebou nesou určitá úskalí, spojená především s nepřijetím nového implantátu, nebo s infekcí. Snaha zabránit těmto problémům, a vytvořit vhodný materiál k implantacím, přivedla vědce k myšlence nahradit stávající biologický materiál syntetickým.

V minulých letech se kostní implantáty navrhovaly především tak, aby byly bioinertní. Jedná se především o kovy typu tantal, či titan. Tyto materiály, nevykazovaly resorpci, takže v tělech zůstávaly dlouhou dobu. Výhodou těchto materiálů je hlavně odolnost vůči korozi a kompatibilita s lidským tělem. [1, 26]

V současné době se však od těchto materiálů ustupuje a začínají se vyvíjet a používat biomateriály, které skýtají nové možnosti z hlediska resorpce, biokompatibility i menší náročnosti na operace pacientů. Materiály musí splňovat určitá kritéria, aby mohly být pro kostní implantáty využitelné. Mezi ně patří:

- obdobné mechanické vlastnosti jako mají okolní tkáň
- pórovitost, aby mohlo docházet k prorůstání cévních tkání a kostních buněk
- povrch musí být uzpůsobený k srůstu s okolní tkání
- kompatibilita s organismem
- odbouratelnost materiálu, při které nesmí vznikat toxické látky

Látky, které splňují výše uvedená kritéria a jsou schopny vytvořit matrice pro kostní tkáň, mohou být současně využitelné i například k doručení léku, nebo růstového hormonu do organismu.

Mezi materiály, využívané na kostní implantáty patří polymery, kompozitní materiály, bioaktivní keramika, nebo kovy. Každý z uvedených materiálů, má charakteristické vlastnosti, které se hodí pro různé typy kostních náhrad, nebo výplní.

- **Polymery:** Obecně se polymery rozlišují na syntetické a přírodní. Mezi přírodní polymery patří například kyselina hyaluronová nebo kolagen, a do skupiny

syntetických je možné zařadit například polylaktid. Nevýhodou těchto polymerů je jejich nižší mechanická odolnost. Nicméně i tyto materiály našly uplatnění v oblastech, kde nejsou kladeny tak vysoké nároky na mechanické vlastnosti. Využívají se k tvorbě chrupavek, nebo jako výplně.

- **Kovy:** Jedná se především o porézní titan, či tantal. Jak už bylo uvedeno výše, tyto materiály mají řadu výhod z hlediska korozní odolnosti nebo kompatibility s lidským tělem. Existuje i řada kompozitů kovů s keramikou nebo jinými materiály, které pozitivně ovlivňují jejich vlastnosti.
- **Bioaktivní keramika:** Za keramiku je považován anorganický, nekovový materiál s krystalickou strukturou. Mezi typické vlastnosti keramiky patří tvrdost, odolnost vůči deformaci, ale i křehkost. Velkou výhodou těchto materiálů je jejich podobnost s minerální fází kostní tkáně. Do této skupiny materiálů se zařazují například fosforečnan vápenatý, uhličitan vápenatý, bioaktivní skla, nebo jejich kombinace. Bioaktivní skla nevykazují tak rychlé vstřebávání jako u uhličitanu nebo fosforečnanu vápenatého, jedná se o dobu několika let. Jsou tedy vhodné jako dlouhodobé náhrady. ^[27, 28, 29]

Z hlediska zpracování, je možné získat materiál na bázi gelu, který je vhodný pro využití na místech, kde nedošlo k poškození opory kosti, hodí se tedy jako výplňový materiál. Obrovská výhoda takto připraveného materiálu je v jeho možnosti vstříknutí do postiženého místa, aniž by došlo k většímu chirurgickému zákroku. Nebo je obdržen materiál ve formě bloků, granulí, či prášku s pórovitou strukturou, který je vhodný do míst, kde je již před chirurgickým zákrokem znám potřebný tvar implantátu.

V posledních letech se začaly vyvíjet a testovat materiály z uhličitanu a fosforečnanu vápenatého, které odpovídají minerálnímu složení kostní tkáně. Výhoda těchto materiálů tkví hlavně v jejich rychlé resorpci, pórovitosti, kompatibilitě s lidským tělem a schopnosti regenerace kostní tkáně. ^[30]

Kompozity byly testovány v letech 1996 na krysách a v roce 2009 na paviánech. Testy prokázaly růst nové kostní tkáně a značně rychlou resorpci. Byly testovány i materiály obsahující pouze uhličitan, nebo fosforečnan vápenatý. Výsledky dokázaly, že

uhličitan vápenatý má v mnoha ohledech lepší vlastnosti než fosforečnan vápenatý, za zmínku stojí například jeho rychlejší resorpce.

V letech 2013 se objevily články o implantaci nového typu materiálu složeného z 98 % z uhličitanu vápenatého. Uhličitan vápenatý pocházel z kostry korálů, šlo tedy převážně o aragonit. Jedná se tedy o materiál přírodního původu. Implantát s pórovitou strukturou byl obohacen o kyselinu hyaluronovou. Tento materiál dovoluje prorůstání kostních buněk, cévních svazků a dokonce celkově napomáhá obnově kostní tkáně. Po čase došlo k jeho úplnému rozložení a přeměnění v novou kost a chrupavku. Z hlediska složení se jednalo o výjimečný materiál, dokonale kopírující stavbu lidské kosti. [2, 31]

S výhledem do budoucnosti skýtá uhličitan vápenatý mnoho možností využití z hlediska kostních i chrupavkových náhrad, ať už jde o materiál složený pouze z uhličitanu vápenatého, nebo o jeho kompozity s dalšími látkami. [32]

1.2.3 Příprava mikročástic uhličitanu vápenatého

Uhličitan vápenatý se připravuje klasickou srážecí metodou pomocí chloridu vápenatého a uhličitanu sodného. Avšak tato příprava je vhodná pouze za situace, kdy nepotřebujeme definované částice z hlediska tvaru, nebo velikosti.

Jednou z mnoha možností jak připravit definované částice je například příprava ve viskózním prostředí, které může být tvořeno etylenglykolem, glycerolem, polyakrylovou kyselinou, nebo jiným rozpouštědlem. [131]

Další možností jak připravit mikročástice uhličitanu vápenatého je příprava za pomoci uhličitanu amonného a chloridu vápenatého, v prostředí n-hexanu a Tweenu 85 (emulgátor). Takto připravená emulze obsahuje mikročástice uhličitanu vápenatého o velikosti zhruba 2–10 μm . [33]

Vhodně zvolenou metodou je možné připravit mikročástice uhličitanu vápenatého v rozmanitých tvarech i velikostech.

1.2.4 Příprava kompozitu uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra

Kompozit uhličitanu vápenatého a nanočástic stříbra je možné připravit různým způsobem. Jednou z metod jak tento kompozit připravit je využití procesu, původně určenému pro přípravu stříbrného zrcátka. Jedná se o metodu, při které připravené mikročástice uhličitanu vápenatého vložíme do Tollensova činidla (AgNO_3 , NH_4OH) a jako redukční činidlo použijeme acetaldehyd. ^[13]

Další možností přípravy je metoda sorpce. Vodný roztok uhličitanu vápenatého je smíchán s nanočásticemi stříbra o vhodném množství. Po určité době dojde k adsorpci nanočástic stříbra na uhličitan vápenatý za vytvoření kompozitu.

Vhodným způsobem je také redukční metoda, při které dochází k vytvoření nanočástic přímo na uhličitanu vápenatém. Jedná se o proces, při kterém vodnou disperzi uhličitanu vápenatého zařadíme přímo do přípravy nanočástic stříbra. Například u Tollensova procesu destilovanou vodu nahradíme roztokem uhličitanu vápenatého.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Chemikálie

K přípravě částic uhličitanu vápenatého byly použity následující chemikálie: chlorid vápenatý (Lachema p.a.) a uhličitan sodný (Penta). Jelikož byly tyto částice připravovány v různých prostředích, využila jsem tři rozpouštědel: etylenglykolu (Sigma Aldrich), acetonu (Lachner) a glycerolu (Lachner).

Na přípravu nanočástic stříbra modifikovanou Tollensovou metodou byly použity tyto látky: dusičnan stříbrný (Sigma Aldrich), amoniak (Sigma Aldrich), hydroxid sodný (Lachner, p. a.) a redukční činidlo D+maltosa monohydrát (Sigma Aldrich).

Přístrojové vybavení

Velikost částic uhličitanu vápenatého byla měřena na laserovém granulometru Analysette 22 MicroTec plus (Fritsch) s rozsahem měření 0,08–2000 μm . Částice uhličitanu vápenatého byly analyzovány z hlediska tvaru na transmisním elektronovém mikroskopu JEM 2010 (Jeol, Japan) s urychlovacím napětím 160 kV a pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Hitachi SU6600. Kvalitativní analýza byla provedena pomocí energiově-disperzního spektrometru Thermo Scientific NORAN System 7.

Disperze stříbrných nanočástic byla analyzována pomocí UV/VIS spektroskopie na přístroji Specord S 600 firmy Analytic Jena (Germany). Velikost nanočástic byla změřena pomocí přístroje, který pracuje na principu dynamického rozptylu světla Zeta Potential Analyzer Zeta Plus od firmy Brookhaven Instruments Corporation (USA).

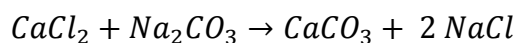
Připravené kompozity byly snímkovány na transmisním elektronovém mikroskopu JEM 2010 (Jeol Ltd., Japan) a na skenovacím elektronovém mikroskopu Hitachi SU6600. U připravených kompozitů byla otestována antibakteriální aktivita vůči standardní sadě patogenních bakterií na Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc. Obsah stříbra v kompozitech byl stanoven po rozkladu v kyselině dusičné zředěné 1:1

pomocí atomové absorpční spektroskopie. K tomuto účelu byl využit spektrofotometr ContrAA 300 (Analytik Jena, Germany). Kvalitativní analýza byla provedena pomocí energiově-disperzního spektrometru Thermo Scientific NORAN System 7 v rámci snímkování na skenovacím elektronovém mikroskopu.

2.2 Pracovní postupy

2.2.1 Příprava uhličitanu vápenatého

Uhličitan vápenatý byl připraven na základě strážení roztoku uhličitanu sodného a chloridu vápenatého podle postupu publikovaného Parakhonskiy a spol. (2014).^[13] Tento původní postup byl s cílem snahy o řízení velikosti a morfologie připravených částic uhličitanu modifikován. Nově tak srážení proběhlo v prostředí tří rozpouštědel s odlišnou viskozitou: acetonu, etylenglykolu a glycerolu (původní postup využíval pouze etylenglykol).



Disperze uhličitanu vápenatého byly připraveny nejprve v objemu 24 ml a následně byla testována jejich velikost a tvar. Každá disperze uhličitanu vápenatého byla připravena následujícím způsobem. Vodný roztok chloridu vápenatého o koncentraci 0,33 mol/dm³ byl smíchán s rozpouštědlem (etylenglykol, acetonu, glycerol) v poměrech: 10:2, 8:4, 6:6, 4:8 a 2:10. Vodný roztok uhličitanu sodného o koncentraci 0,33 mol/dm³ byl připraven stejným způsobem a taktéž smíchán s rozpouštědlem v poměrech 10:2, 8:4, 6:6, 4:8 a 2:10. Následně byly oba roztoky smíchány za intenzivního míchání na elektromagnetické míchačce (500 rpm) a dále pak míchány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut.^[13]

Takto získané částice uhličitanu vápenatého byly přečištěny dekantací, několikanásobným promytím destilovanou vodou a odstředěním. Přečištěný uhličitan vápenatý byl redispergován v destilované vodě do objemu 25 ml. Výsledné disperze byly tímto způsobem zbaveny chloridových iontů, které by ovlivňovaly následnou přípravu kompozitů.

V tabulce 2 je zapsán přesný popis složení připravených disperzí uhličitanu vápenatého.

Tab. 2 Přehled realizovaných experimentů přípravy mikročástic uhličitanu vápenatého

Roztok	Rozpouštědlo	Poměr	Objem $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ [ml]	Objem rozpouštědla [ml]
1	EG	10:02	10	2
2	EG	8:04	8	4
3	EG	6:06	6	6
4	EG	4:08	4	8
5	EG	2:10	2	10
6	Aceton	10:02	10	2
7	Aceton	8:04	8	4
8	Aceton	6:06	6	6
9	Aceton	4:08	4	8
10	Aceton	2:10	2	10
11	Gly	10:02	10	2
12	Gly	8:04	8	4
13	Gly	6:06	6	6
14	Gly	4:08	4	8
15	Gly	2:10	2	10

*EG- etylenglykol

*Gly-glycerol

Na základě testování byly z disperzí 1–15 vybrány vzorky 1, 3 a 5, které byly dále použity pro přípravu kompozitů. Tyto disperze byly připraveny o stejném složení v objemu 500 ml.

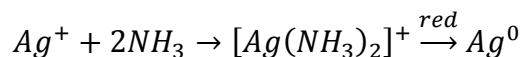
Tab. 3 Příprava disperzí uhličitanu vápenatého v objemu 500 ml

Roztok (V=500 ml)	1	3	5
Objem $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ [ml]	208,3	125,0	41,6
Objem etylenglykolu pro $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ [ml]	41,6	125,0	208,3

Disperze v objemu 500 ml jsem přečistila dekantací, promytím destilovanou vodou a odstředěním. Následně jsem částice uhličitanu vápenatého zfiltrovala na Büchnerově nálevce a vysušila při 100 °C.

2.2.2 Příprava nanočástic stříbra

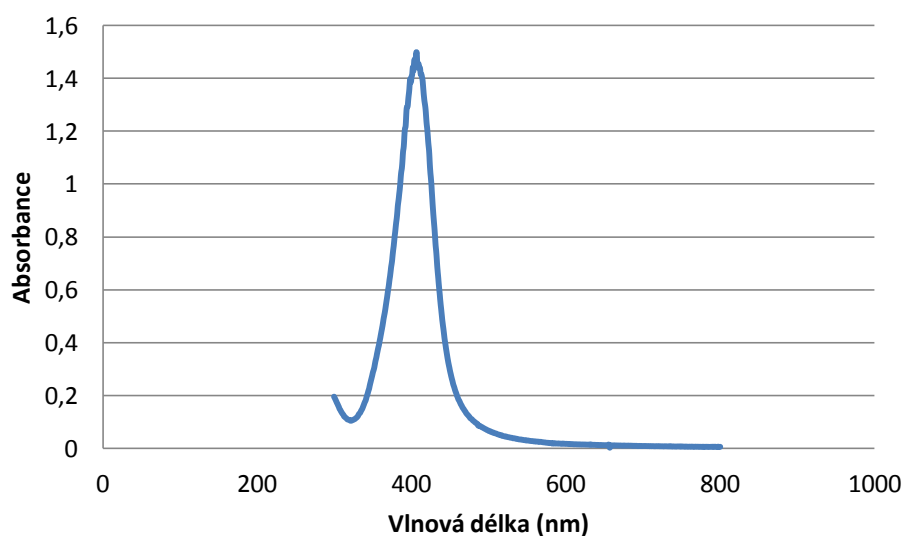
Disperze nanočástic stříbra byla připravena Tollensovou metodou. Jedná se o metodu, která využívá maltosu, případně i jiný cukr, k redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů.



Disperze nanočástic stříbra byla připravena smísením roztoků v následujícím pořadí.

- 5 ml $AgNO_3$ o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³
- 1,25 ml NH_3 o koncentraci 0,1 mol/dm³
- 12,75 ml destilované vody
- 1 ml NaOH o koncentraci 0,25 mol/dm³
- 5 ml maltosy o koncentraci 0,05 mol/dm³

Výsledná koloidní disperze nanočástic stříbra měla medově žlutou barvu. Velikost nanočástic stříbra byla stanovena na 28 nm, k tomuto účelu byla využita metoda DLS. Následně bylo proměřeno UV/Vis spektrum dokazující přítomnost nanočástic stříbra. Disperze nanočástic stříbra byla pro měření UV/Vis spektra a velikosti částic 10x naředěna. ^[11]



Obr. 2 UV/Vis spektrum vodné disperze nanočástic stříbra o velikosti 28 nm, připravené modifikovanou Tollensovou metodou, redukcí maltósou

2.2.3 Příprava kompozitů nanoAg@CaCO₃

Kompozity uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra byly připraveny dvěma způsoby. Jednalo se o přípravu sorpcí předem připravených nanočástic stříbra na uhličitan vápenatý a ve druhém případě o redukci nanočástic stříbra v prostředí s obsahem mikročástic uhličitanu vápenatého.

Každý ze tří vzorků (1, 3, 5) poskytl 8 kompozitů. Konkrétně se jedná o 4 kompozity připravené sorpcí a 4 kompozity připravené redukcí.

Příprava kompozitů sorpcí probíhala následovně: Připravila jsem si nanočástice stříbra Tollensovou metodou (viz kapitola příprava nanočástic stříbra) a poté jsem je vnášela do disperze mikročástic uhličitanu vápenatého, kterou jsem si připravila disperzací 1g vysušených mikročástic CaCO₃ ze vzorků 1/ 3/ 5 ve 100 ml destilované vody. Byly připraveny čtyři kompozity, přičemž při přípravě byly použity rozdílné objemy nanočástic stříbra. Přesné množství nanočástic stříbra a disperze uhličitanu vápenatého použité při přípravě kompozitů je uvedeno v tabulce 3.

Příprava kompozitů redukcí probíhala téměř stejně jako u přípravy nanočástic stříbra. Destilovanou vodu jsem ale vyměnila za stejný objem disperze uhličitanu vápenatého, kterou jsem připravila stejně jako u metody sorpce. Při této metodě jsem změnila objem dusičnanu stříbrného přidávaného do reakčního systému a připravila jsem tak 4 kompozity, lišící se obsahem stříbra. Přesné množství reakčních látek použitých v jednotlivých případech je uvedeno v tabulce 4.

Tab. 3 Rozpis postupů použitých při přípravě kompozitů nanoAg@CaCO₃ pomocí sorpce nanočástic stříbra na mikročástice uhličitanu vápenatého

Kompozit	Vzorek CaCO ₃	CaCO ₃ [ml]	Nano Ag [ml]
A	1	10	10
B	1	10	5
C	1	10	2,5
D	1	10	1,25
E	3	10	10
F	3	10	5
G	3	10	2,5
H	3	10	1,25
J	5	10	10
K	5	10	5
L	5	10	2,5
M	5	10	1,25

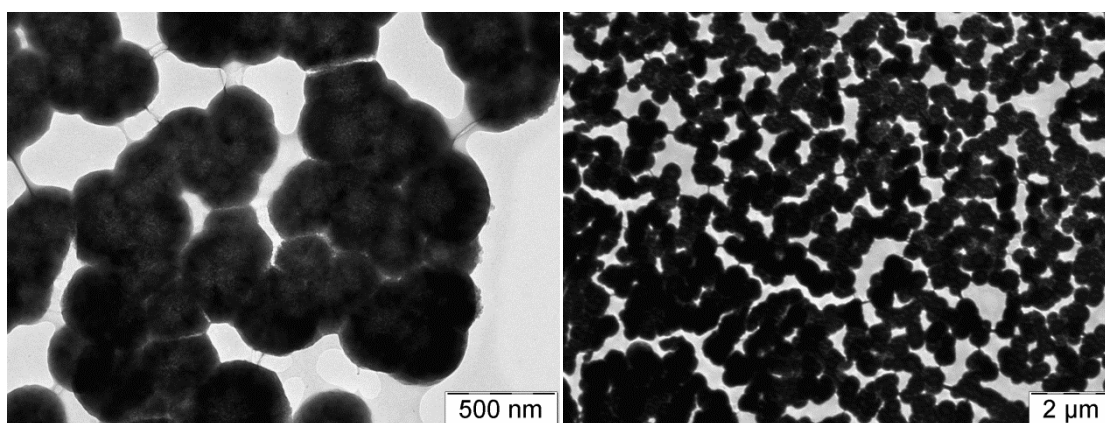
Tab. 4 Rozpis postupů použitých při přípravě kompozitů nanoAg@CaCO₃ pomocí redukce stříbrných iontů v systému s mikročásticemi CaCO₃

Kompozit	Vzorek CaCO ₃	AgNO ₃ [ml]	NH ₃ [ml]	CaCO ₃ [ml]	NaOH [ml]	Maltosa [ml]
N	1	5	1,25	12,75	1	5
O	1	2,5	1,25	12,75	1	5
P	1	1,25	1,25	12,75	1	5
Q	1	0,75	1,25	12,75	1	5
R	3	5	1,25	12,75	1	5
S	3	2,5	1,25	12,75	1	5
T	3	1,25	1,25	12,75	1	5
U	3	0,75	1,25	12,75	1	5
V	5	5	1,25	12,75	1	5
W	5	2,5	1,25	12,75	1	5
X	5	1,25	1,25	12,75	1	5
Z	5	0,75	1,25	12,75	1	5

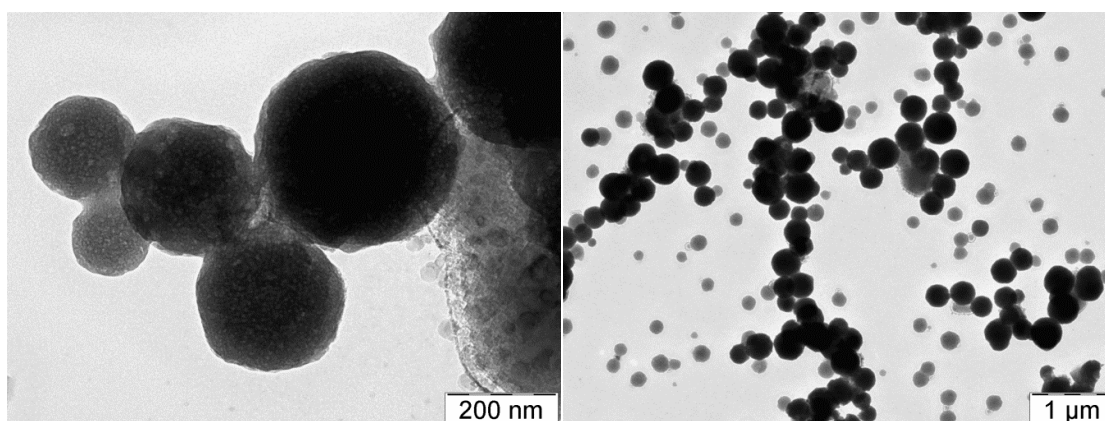
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Uhličitan vápenatý

Připravené mikročástice uhličitanu vápenatého byly primárně charakterizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Na základě vyhodnocení snímků byla ze vzorků 1–15 vybrána série roztoků s etylenglykolem 1, 3 a 5, které obsahovaly symetrické částice uhličitanu vápenatého vhodné pro přípravu kompozitů s nanočásticemi stříbra. Vzorek 3 a 5 obsahoval kulovité částice, zatímco u vzorku 1 byly částice příliš velké pro transmisní elektronový mikroskop, kde se jejich tvar při pozorování jevil jako krychlový.

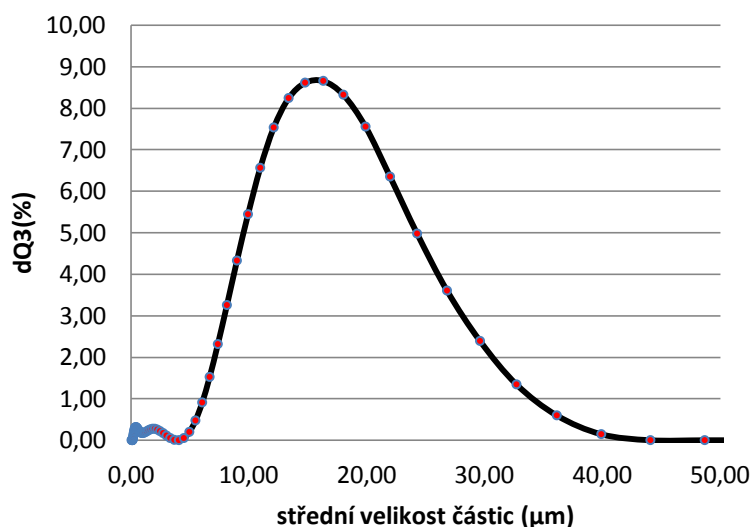
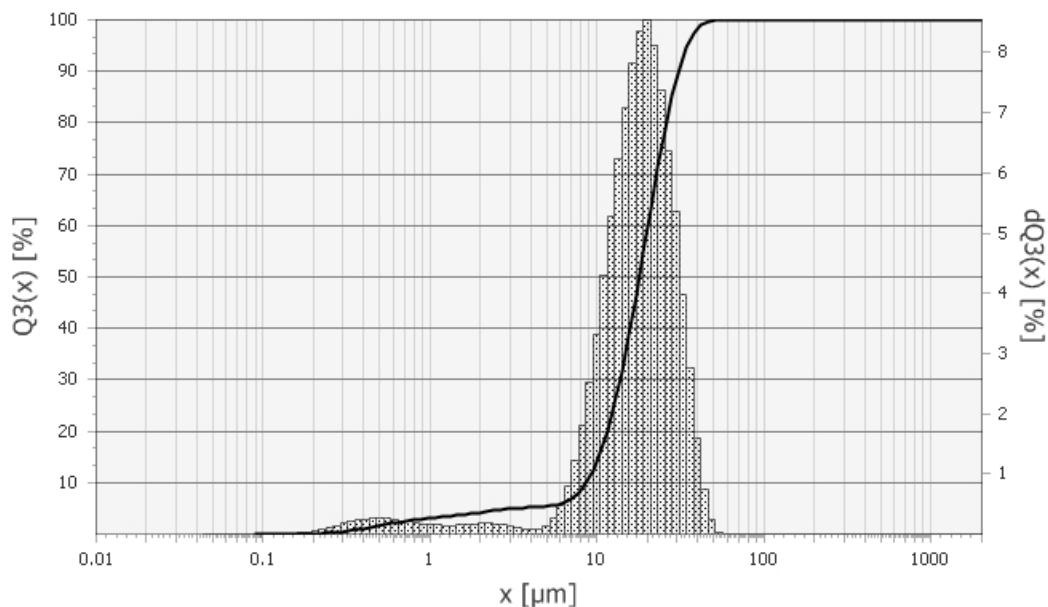


Obr. 3 Fotografie z transmisního elektronového mikroskopu zobrazující tvar a velikost částic uhličitanu vápenatého z disperze 3

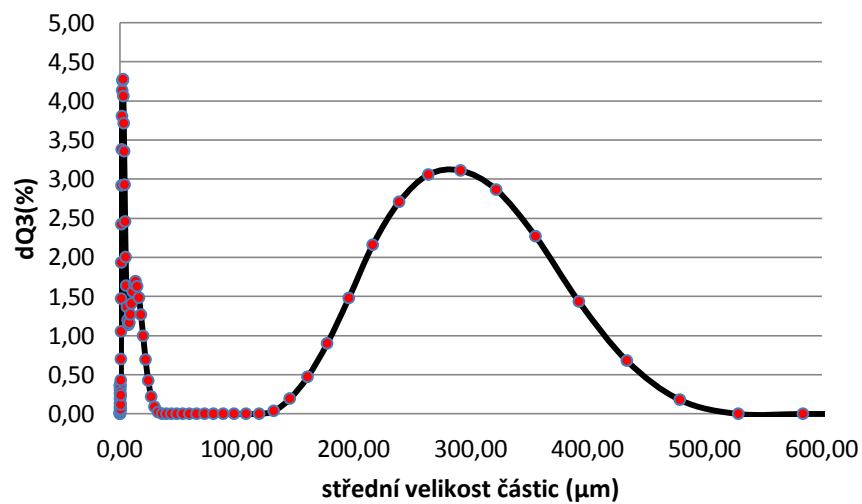
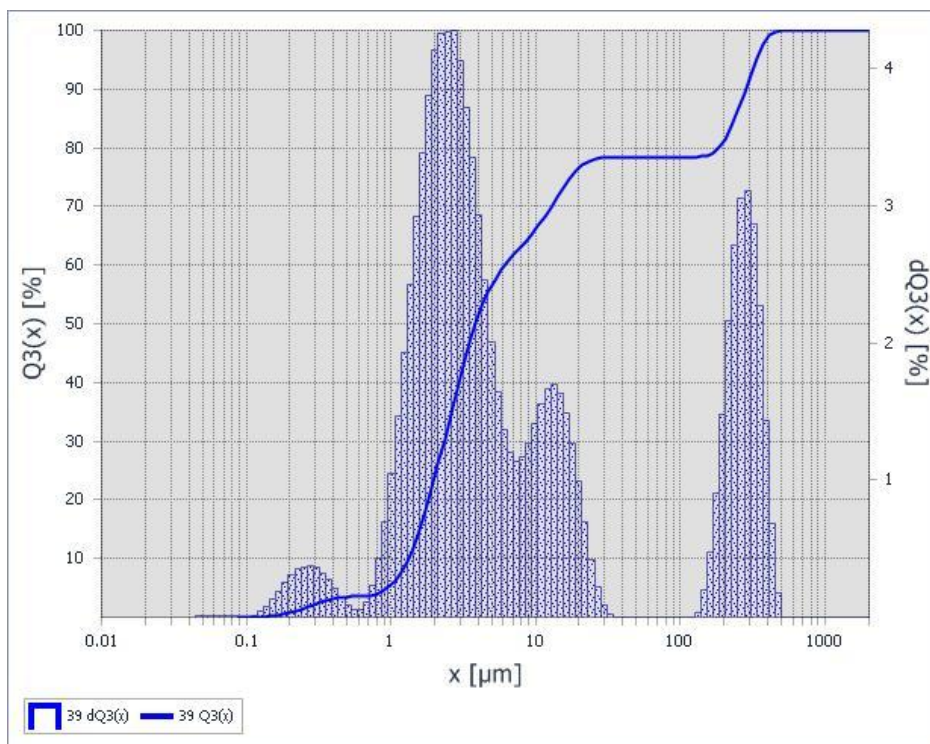


Obr. 4 Fotografie z transmisního elektronového mikroskopu zobrazující tvar a velikost částic uhličitanu vápenatého z disperze 5

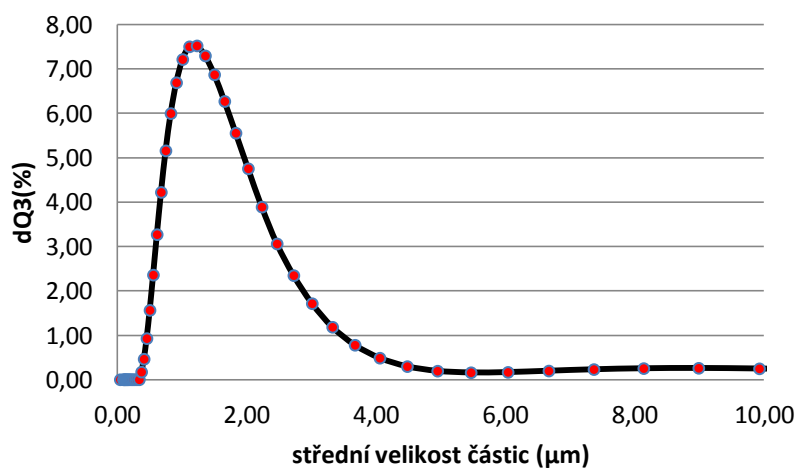
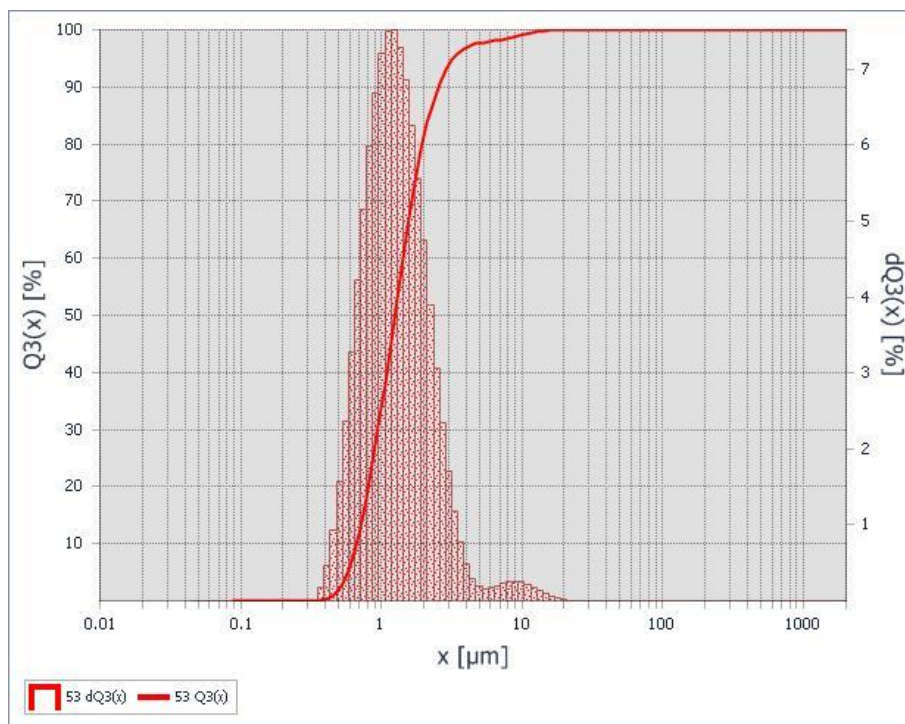
Velikost částic uhličitanu vápenatého byla proměřena pomocí laserového granulometru na Katedře geologie. Průměrná velikost částic se lišila v závislosti na způsobu jejich přípravy. Disperze 1 obsahovala částice o rozměru 14,4 μm , disperze 3 měla částice o velikosti 3,8 μm a disperze 5 obsahovala částice nejmenší o rozměru 1,25 μm . S úbytkem etylenglykolu výrazně rostla velikost částic. Tato tendence se opakovala i u glycerolu a acetonu.



Obr. 5 Distribuce velikosti částic uhličitanu vápenatého v disperzi 1 podle grafického výstupu použitého granulometru a distribuce velikosti částic uhličitanu vápenatého pro stejný vzorek zkonstruovaná na základě tabulky hodnot frekvencí výskytu jednotlivých tříd velikosti částic podle měření na použitém granulometru

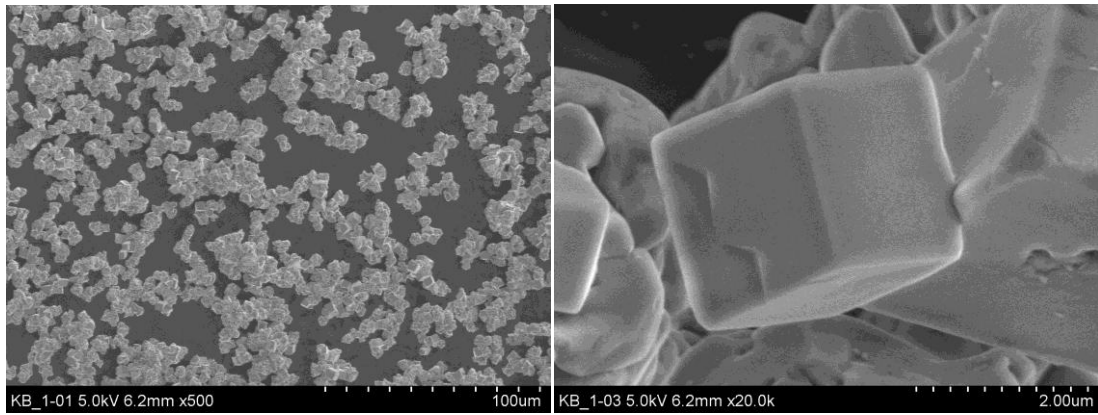


Obr. 6 Distribuce velikosti částic uhličitanu vápenatého v disperzi 3 podle grafického výstupu použitého granulometru a distribuce velikosti částic uhličitanu vápenatého pro stejný vzorek zkonstruovaná na základě tabulky hodnot frekvencí výskytu jednotlivých tříd velikosti částic podle měření na použitém granulometru

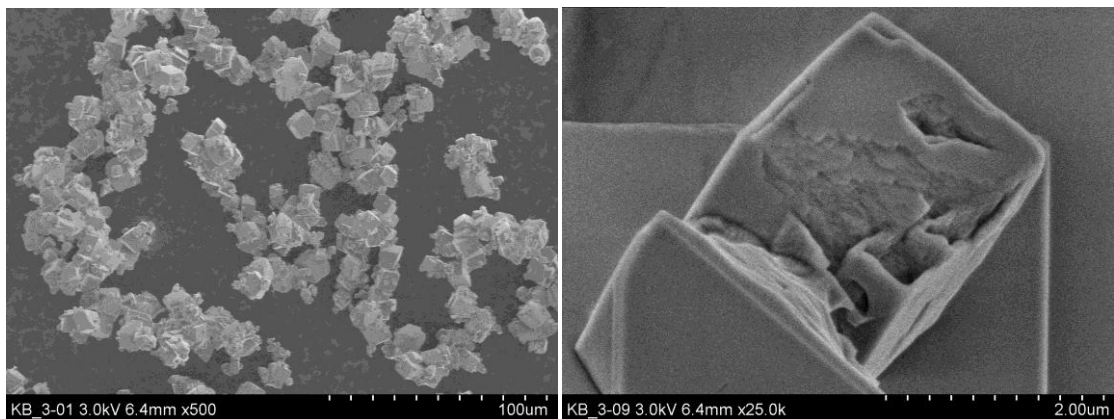


Obr. 7 Distribuce velikosti částic uhličitanu vápenatého v disperzi 5 podle grafického výstupu použitého granulometru a distribuce velikosti částic uhličitanu vápenatého pro stejný vzorek zkonstruovaná na základě tabulky hodnot frekvencí výskytu jednotlivých tříd velikosti částic podle měření na použitém granulometru

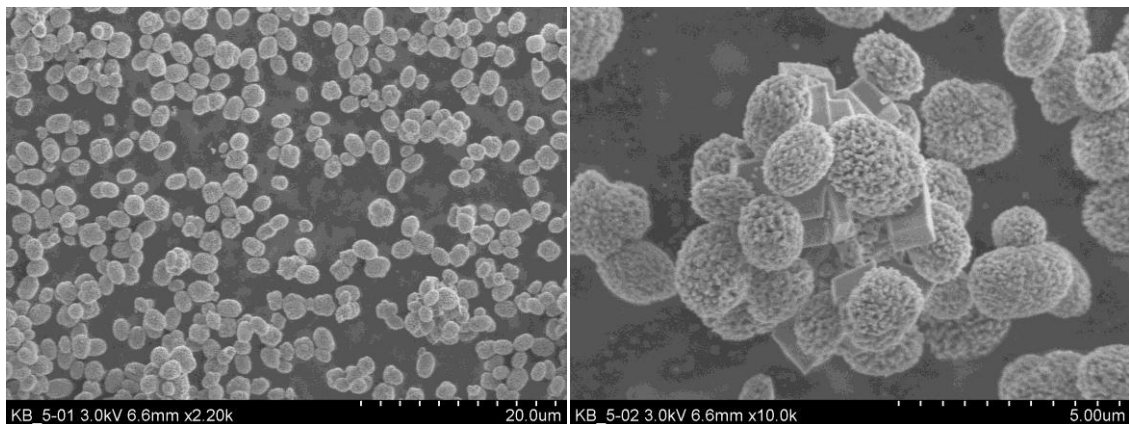
Vzorky 1, 3 a 5 byly následně připraveny ve větším množství a vysušeny. Poté byly charakterizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Jejich tvar se vysušením částečně změnil. Změna je nejvíce patrná na vzorku číslo 3, kde se z kulovitých částic staly krychle.



Obr. 8 Fotografie vzorku mikročásteček uhličitanu vápenatého připraveného podle postupu 1 ze skenovacího elektronového mikroskopu



Obr. 9 Fotografie vzorku mikročásteček uhličitanu vápenatého připraveného podle postupu 3 ze skenovacího elektronového mikroskopu



Obr. 10 Fotografie vzorku mikročásteček uhličitanu vápenatého připraveného podle postupu 5 ze skenovacího elektronového mikroskopu

Kvalitativní analýza vzorků uhličitanu vápenatého byla provedena pomocí energiově-disperzního spektrometru, který pracuje na principu detekce rtg záření. Jedná se o tzv. charakteristické rtg záření, které je příznačné pro daný prvek.

Vzorové vyhodnocení EDS spektra pro vzorek 5

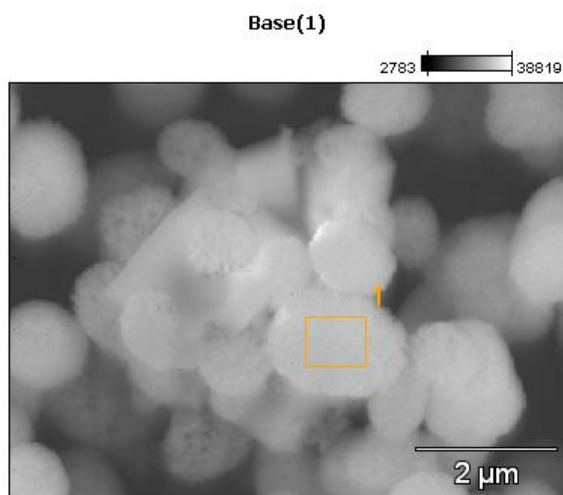
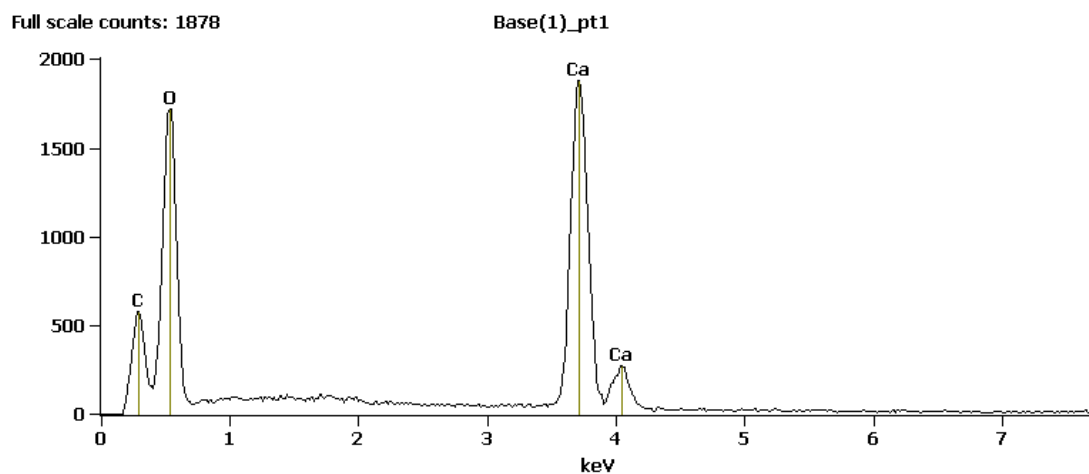


Image Resolution: 512 by 384

Image Pixel Size: 0.02 μm

Acc. Voltage: 15.0 kV

Magnification: 12000



3.2 Kompozity uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra

Obsah stříbra v připravených kompozitech uhličitanu vápenatého s nanočásticemi stříbra byl stanoven metodou atomové absorpční spektroskopie. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

Tab. 5 Obsah stříbra v kompozitech s uhličitanem vápenatým připravené pomocí sorpce

	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
Objem nano Ag (ml)	10	5	2,5	1,25	10	5	2,5	1,25	10	5	2,5	1,25
koncentrace Ag (mg/l)	51,2	16,4	9,8	9,7	21,6	11,3	14,0	8,0	56,2	20,6	13,9	6,9

$$*c_{(\text{AgNO}_3)}=5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$$

Tab. 6 Obsah stříbra v kompozitech s uhličitanem vápenatým připravené pomocí redukce

	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Z
Objem AgNO ₃ (ml)	5	2,5	1,25	0,75	5	2,5	1,25	0,75	5	2,5	1,25	0,75
koncentrace Ag (mg/l)	79,3	37,9	22,5	11,3	99,3	31,3	17,1	14,5	88,7	26,2	20,4	12,8

$$*c_{(\text{AgNO}_3)}=5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$$

Z výše uvedených výsledků je patrné, že kompozity připravené pomocí redukce obsahují větší množství stříbrných nanočástic. Z hlediska obsahu stříbra v kompozitech je vidět jeho zjevný pokles se snižujícím se objemem AgNO₃, případně disperze nanočástic stříbra, použitých při přípravě kompozitu.

U kompozitů, které byly připravené metodou sorpce, měly nejlepší výsledky z pohledu obsahu stříbra kompozity přichystané z uhličitanu vápenatého 1 a 5. Zatímco u kompozitů, které byly připraveny redukční metodou, nejvíce stříbra bylo zachyceno v kompozitech z uhličitanu vápenatého připraveného podle postupu 3.

U všech připravených kompozitů bylo provedeno testování antibakteriální aktivity, které je shrnuto v tabulkách 4 a 5.

Tab. 7 Antimikrobiální účinnost kompozitů při přípravě sorpcí vyjádřená v hodnotách MIC pro maximální zředění testované disperze kompozitu nanoAg@CaCO₃

vzorky	testování	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.
1		3,4	1,7	3,4	1,7	≥ 0,8	1,7	≥ 0,8	3,4	3,4	3,4
2		27	1,7	1,7	3,4	1,7	6,8	6,8	6,8	27	54
A	1	25,6	-	-	-	25,6	12,8	6,4	-	25,6	-
	2	-	12,8	25,6	-	-	6,4	N	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-	4,1	2,1	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	4,1	4,1	-	-	-
C	1	4,9	-	-	-	4,9	2,5	8	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	2,5	2,5	-	-	-
D	1	-	-	-	-	-	2,4	2,4	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	0,6	0,6	-	-	-
E	1	-	10,8	-	-	10,8	2,7	2,7	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	1,4	2,7	-	-	-
F	1	-	-	-	-	5,7	1,4	0,7	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	0,7	1,4	-	-	-
G	1	7	-	-	-	7	1,8	1,8	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	0,9	1,8	-	-	-
H	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	0,5	1	-	-	-
J	1	28,1	28,1	-	28,1	1,8	1,8	1,8	-	14,1	-
	2	-	-	-	-	3,5	1,8	3,5	-	-	-
K	1	-	-	-	-	10,3	1,3	2,6	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	0,6	2,6	-	-	-
L	1	3,5	7	-	-	-	N	3,5	7	-	-
	2	-	-	-	-	-	0,9	1,7	-	-	-
M	1	-	-	-	-	-	0,9	0,9	-	-	-
	2	-	-	-	-	3,5	0,4	1,7	-	-	-

„-“ inhibice růstu neprokázána

„c/x“ inhibice růstu při koncentraci dodaných vzorků naředěných x krát

„N“ nelze hodnotit

I- *Enterococcus faecalis* CCM 4224; II. - *Staphylococcus aureus* CCM 3953; III. - *Escherichia coli* CCM 3954; IV. - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955; V. - *Pseudomonas aeruginosa*; VI. - *Staphylococcus epidermidis* 1; VII. - *Staphylococcus epidermidis* 2; VIII. - *Staphylococcus aureus* (MRSA); IX. - *Enterococcus faecium* (VRE); X - *lebsiella pneumoniae* (ESBL)

Tab. 8 Antimikrobiální účinnost kompozitů při přípravě redukcí vyjádřená v hodnotách MIC pro maximální zředění testované disperze kompozitu nanoAg@CaCO₃

vzorky	testování	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.
1		3,4	1,7	3,4	1,7	≥ 0,8	1,7	≥ 0,8	3,4	3,4	3,4
2		27	1,7	1,7	3,4	1,7	6,8	6,8	6,8	27	54
N	1	39,7	4,95	19,8	4,95	4,95	N	2,5	19,8	9,9	39,7
	2	-	9,9	19,8	9,9	9,9	4,95	4,95	39,7	19,8	19,8
O	1	-	-	-	-	18,95	9,5	4,5	-	-	-
	2	-	-	-	-	18,95	4,7	18,95	-	-	-
P	1	-	5,6	11,3	11,3	2,8	N	1,4	11,3	2,8	-
	2	-	11,3	-	-	5,6	2,8	1,4	-	5,6	-
Q	1	-	-	-	-	5,7	2,8	5,7	-	-	-
	2	-	-	-	-	5,7	1,4	-	-	-	-
R	1	-	24,8	-	49,7	12,4	N	6,2	49,7	12,4	-
	2	-	24,8	-	-	24,8	6,2	12,4	49,7	24,8	-
S	1	-	-	-	-	15,6	7,8	N	-	-	-
	2	-	-	-	-	15,6	3,9	-	-	-	-
T	1	-	8,6	5,3	8,6	8,6	N	2,2	8,6	-	-
	2	-	-	8,6	-	8,6	2,2	4,3	-	-	-
U	1	-	-	-	-	5,7	2,9	N	-	-	-
	2	-	-	-	-	5,7	1,4	-	-	-	-
V	1	44,4	1,4	1,4	5,5	1,4	N	1,4	22,2	22,2	5,5
	2	22,2	2,8	1,4	2,8	2,8	11,1	2,8	11,1	11,1	-
W	1	-	-	-	-	13,1	-	N	-	-	-
	2	-	4	-	13,1	6,6	6,6	N	6,6	-	-
X	1	-	5,1	10,2	5,1	5,1	N	1,3	10,2	10,2	-
	2	-	5,1	-	10,2	5,1	5,1	N	5,1	-	-
Z	1	-	-	-	-	6,4	6,4	N	-	-	-
	2	-	3,2	-	6,4	3,2	3,2	N	3,2	-	-

„-“ inhibice růstu neprokázána

„c/x“ inhibice růstu při koncentraci dodaných vzorků naředěných x krát

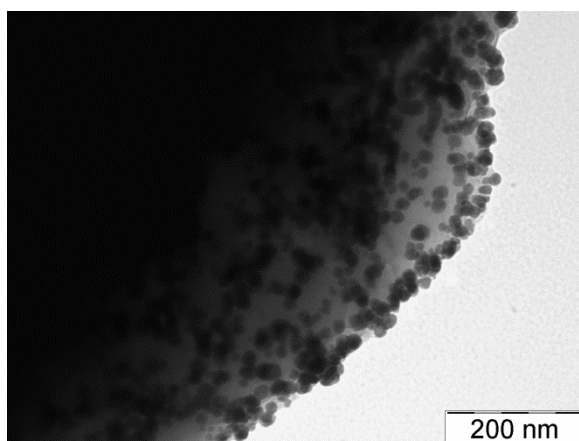
„N“ nelze hodnotit

I. - *Enterococcus faecalis* CCM 4224; II. - *Staphylococcus aureus* CCM 3953; III. - *Escherichia coli* CCM 3954; IV. - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955; V. - *Pseudomonas aeruginosa*; VI. - *Staphylococcus epidermidis* 1; VII. - *Staphylococcus epidermidis* 2; VIII. - *Staphylococcus aureus* (MRSA); IX. - *Enterococcus faecium* (VRE); X - *lebsiella pneumoniae* (ESBL)

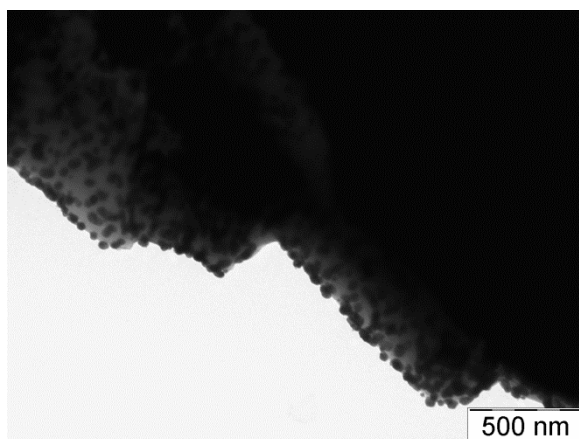
Kompozity N, R a V, které se ukázaly, jako nejefektivnější v boji proti bakteriím byly otestovány ještě potřetí. Výsledek se shodoval s výše uvedenými hodnotami. Kompozity N, R a V připravené redukční metodou a kompozity A, E, J s největším obsahem stříbra u sorpční metody, byly následně charakterizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu.

Z výsledků získaných snímků z transmisního elektronového mikroskopu je zjevný nižší obsah nanočástic stříbra u kompozitů A, E, J, které byly připraveny sorpční metodou oproti kompozitům připraveným redukční metodou. Také jsou u těchto vzorků vidět agregáty nanočástic vyskytující se mimo uhličitan vápenatý. U vzorků N, R a V je viditelný větší obsah nanočástic stříbra. Nanočástice stříbra prorůstají uhličitan vápenatý a nezůstávají pouze v okrajových částech jako je vidět u vzorků A, E, J..

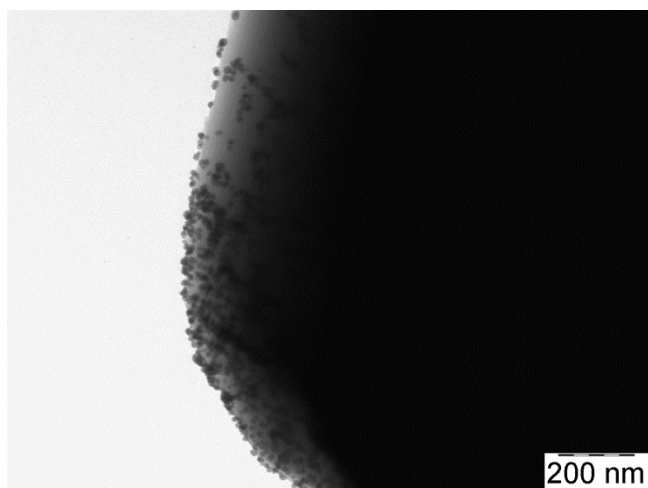
Po vysušení vzorků N, R a V bylo provedeno snímkování i na skenovacím elektronovém mikroskopu a byla provedena kvalitativní analýza pomocí energiově-disperzního spektrometru, která prokázala přítomnost stříbra v kompozitech.



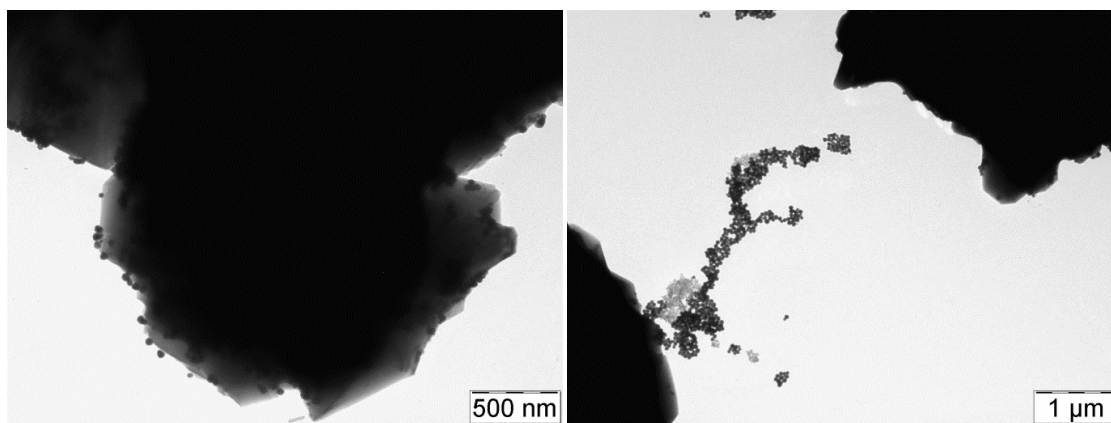
Obr. 11 Snímek kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku N z transmisního elektronového mikroskopu. Na fotografii je patrný uhličitan vápenatý obklopený nanočásticemi stříbra



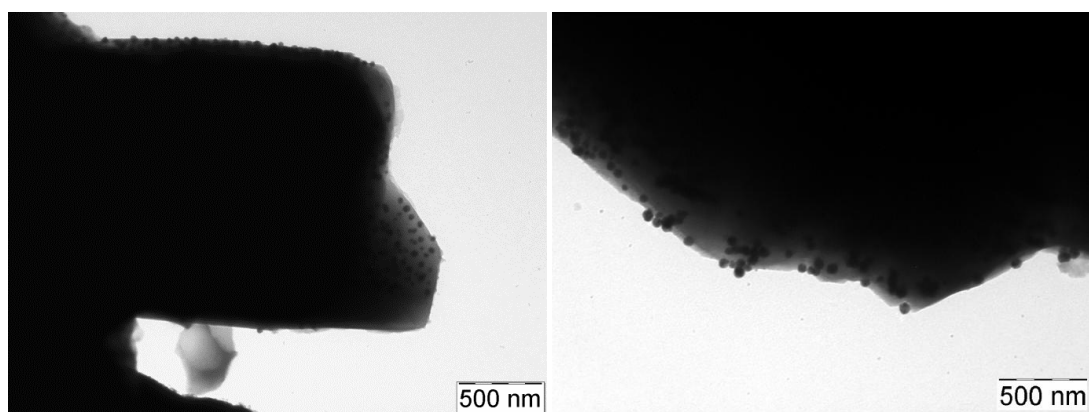
Obr. 12 Snímek kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vrorku R z transmisního elektronového mikroskopu. Na fotografii je patrný uhličitán vápenatý obklopený nanočásticemi stříbra



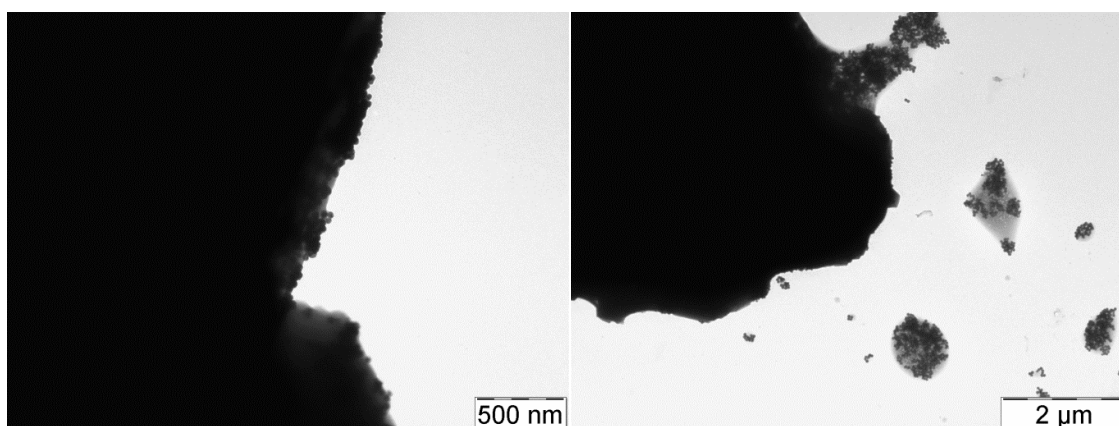
Obr. 13 Snímek kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku V z transmisního elektronového mikroskopu. Na fotografii je patrný uhličitán vápenatý obklopený nanočásticemi stříbra



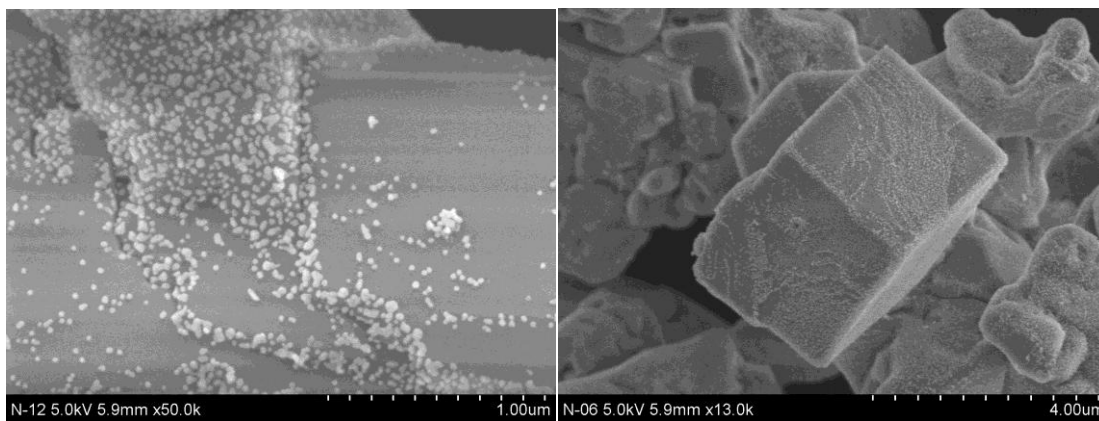
Obr. 14 Snímky kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku A z transmisního elektronového mikroskopu. Na snímku vpravo jsou patrné agregáty nanočástic stříbra



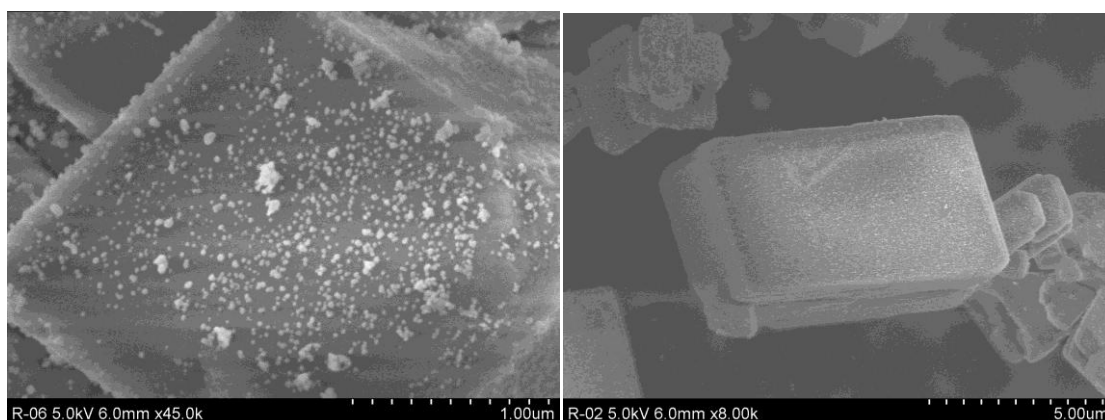
Obr. 15 Snímky kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku E z transmisního elektronového mikroskopu



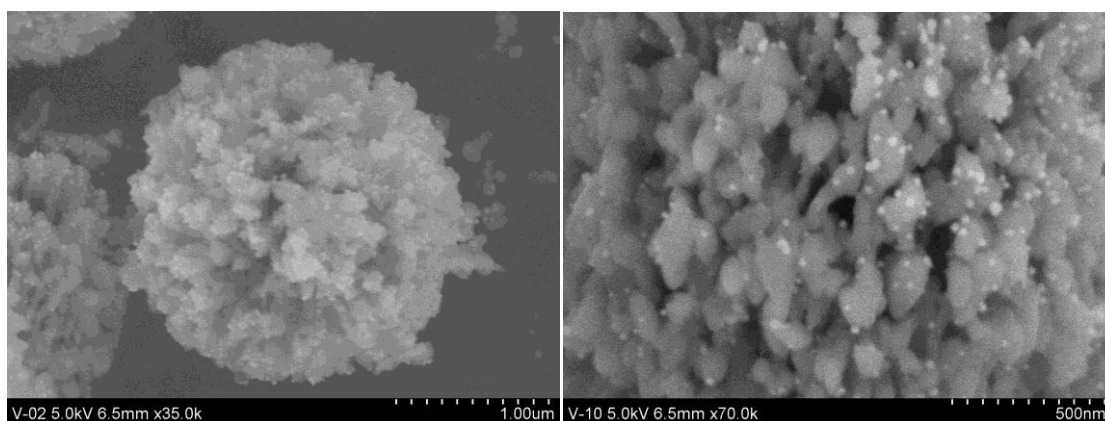
Obr. 16 Snímky kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku J z transmisního elektronového mikroskopu. Na snímku vpravo jsou patrné agregáty nanočástic stříbra



Obr. 17 Snímky kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku N ze skenovacího elektronového mikroskopu



Obr. 18 Snímky kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku R ze skenovacího elektronového mikroskopu



Obr. 19 Snímky kompozitu nanoAg@CaCO₃ ze vzorku V ze skenovacího elektronového mikroskopu

Vyhodnocení EDS pro kompozit N

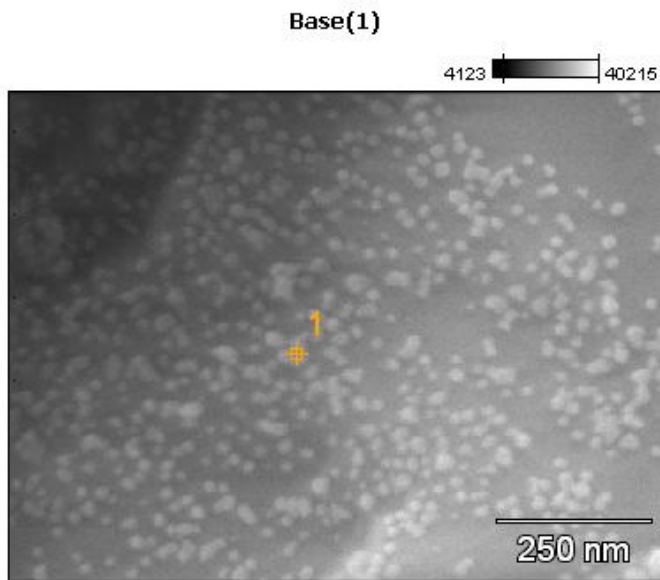
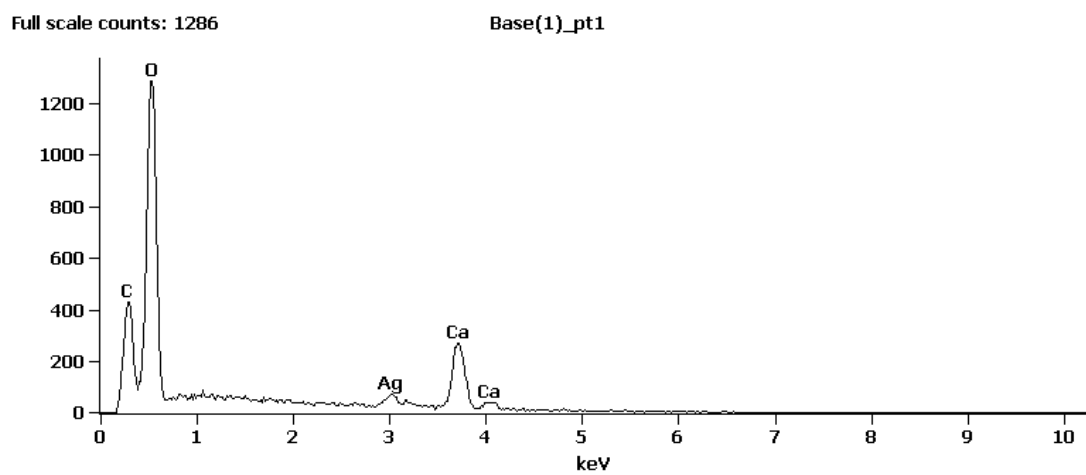


Image Resolution: 512 by 384

Image Pixel Size: 0.00 μm

Acc. Voltage: 7.0 kV

Magnification: 90100



Vyhodnocení EDS pro kompozit R

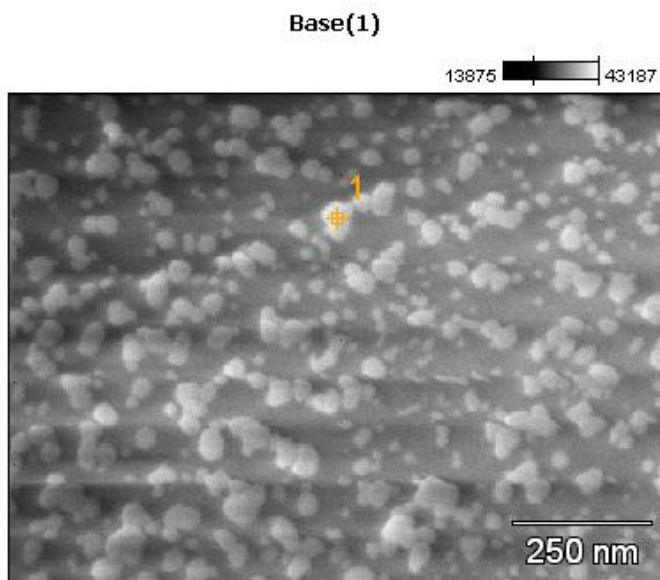
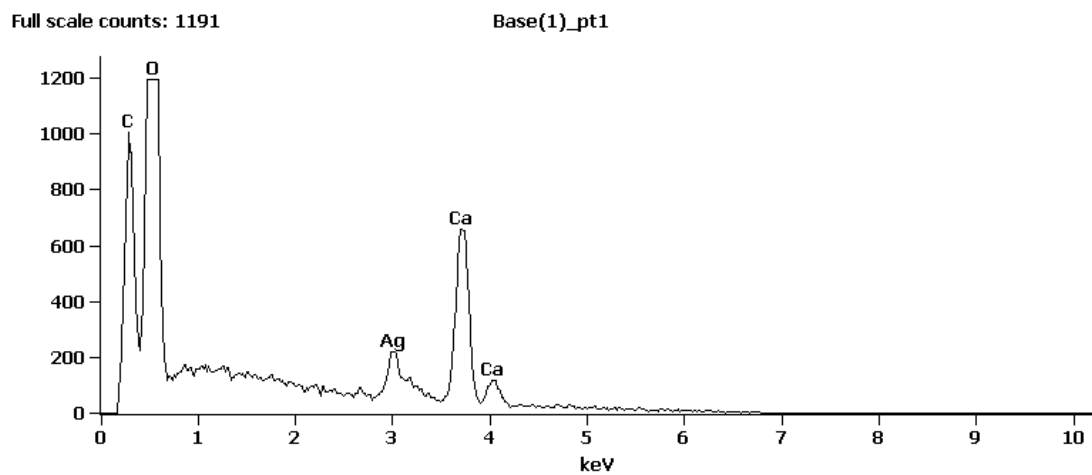


Image Resolution: 512 by 384

Image Pixel Size: 0.00 μm

Acc. Voltage: 7.0 kV

Magnification: 80100



Vyhodnocení EDS pro kompozit V

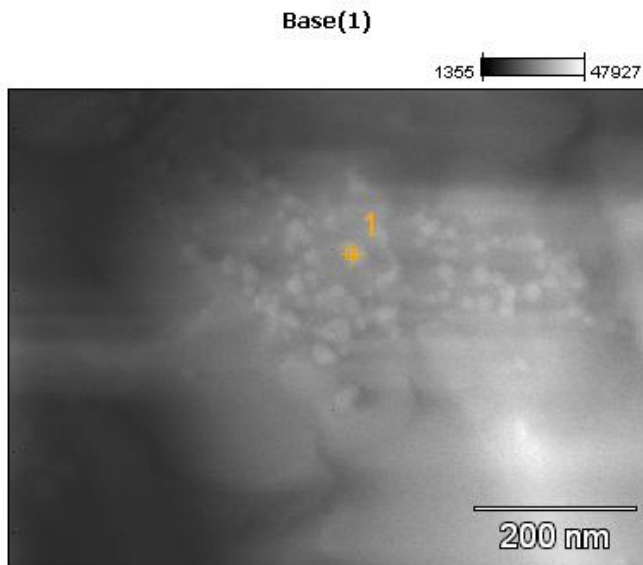
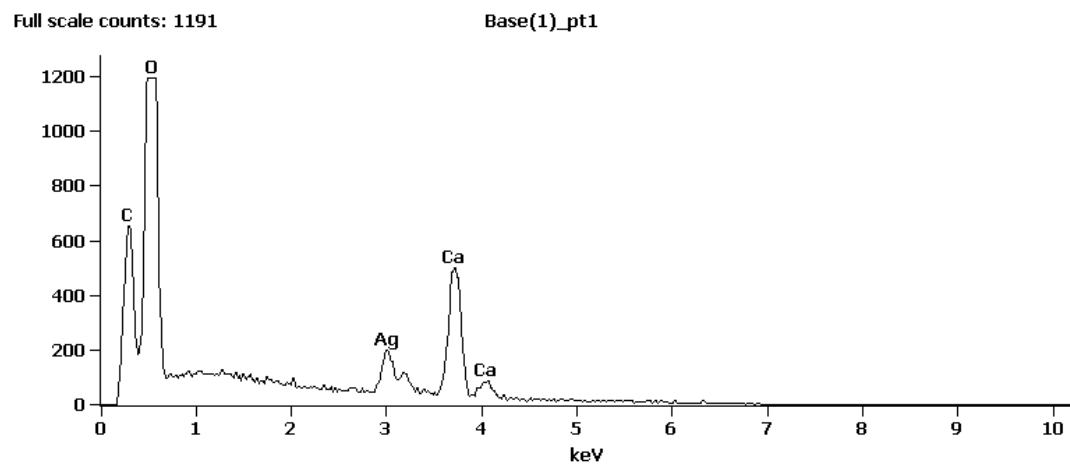


Image Resolution: 512 by 384

Image Pixel Size: 0.00 μm

Acc. Voltage: 7.0 kV

Magnification: 120000



4 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo připravit definované mikročástice uhličitanu vápenatého z hlediska jejich tvaru a velikosti. Pro přípravu mikročástic uhličitanu vápenatého byl zvolen postup, který publikoval v roce 2014 B. V. Parakhonskiy. Jedná se o modifikovanou srážecí metodu, při které se využívá viskózní rozpouštědlo etylenglykol, které slouží jako stabilizátor velikosti mikročástic. Tato metoda byla pozměněna a pro přípravu mikročástic uhličitanu vápenatého byl využit také aceton a glycerol. Připravené disperze mikročástic uhličitanu vápenatého byly charakterizovány pomocí elektronové mikroskopie, kvalitativní analýza byla provedena pomocí energiově-disperzního spektrometru. Na základě vyhodnocení snímků z transmisního elektronového mikroskopu byla vybrána série vzorků uhličitanu vápenatého připravená v etylenglykolu lišících se velikostí částic v rozsahu 1 až 15 μm .

Vybrané vzorky uhličitanu vápenatého byly využity k přípravě kompozitů s nanočásticemi stříbra. Kompozity s různým obsahem stříbra byly připraveny pomocí sorpční a redukční metody na základě změny přídavku dusičnanu stříbrného (při redukční metodě), případně disperze nanočástic stříbra u sorpční metody. Nanočástice stříbra pro sorpční metodu byly připraveny pomocí modifikované Tollensovy metody, která byla použita i při redukční metodě přípravy kompozitu. Na základě těchto metod bylo připraveno celkem 24 kompozitů, u kterých byl stanoven obsah stříbra pomocí atomové absorpční spektroskopie, a následně byla otestována antibakteriální aktivita. Vybrané kompozity byly rovněž studovány pomocí elektronové mikroskopie a energiově-disperzní spektrometrie.

Z výsledků je patrné, že kompozity připravené pomocí redukční metody obsahovaly větší množství stříbra a také vykazovaly vyšší antibakteriální aktivitu. U kompozitů připravených pomocí sorpční metody se na povrch uhličitanu vápenatého nenaadsorbovalo dostatečné množství nanočástic stříbra, navíc docházelo k agregaci nanočástic stříbra i mimo uhličitan vápenatý. Díky nižšímu obsahu stříbra byla u těchto kompozitů pozorována velmi nízká nebo dokonce i žádná antibakteriální aktivita. Naopak kompozity připravené redukční metodou vykazovaly vysokou antibakteriální aktivitu a představují tak potenciálně vhodný materiál pro vývoj nových implantačních postupů v medicíně.

5 SUMMARY

The aim of this thesis was to prepare a defined micro-particles of calcium carbonate in terms of their shape and size. For the preparation of microparticles of calcium carbonate was elected to the procedure published in 2014 B. In. Parakhonskiy. This is a modified precipitation method in which uses a viscous solvent ethylenglykol, which serves as a stabilizer the size of the microparticles. This method was modified and for the preparation of microparticles of calcium carbonate was also used acetone and glycerol. The prepared dispersion of micro-particles of calcium carbonate were characterized using electron microscopy, a qualitative analysis was performed using the energy-dispersive spectrometer. On the basis of the evaluation of the images from the transmission electron microscope has been selected a series of samples of calcium carbonate prepared in ethylenglykol of differing particle sizes in the range of 1 to 15 μm .

Selected samples of calcium carbonate were used to prepare composites with nanoparticles of silver. Composites with different contents of silver were prepared using the sorption and reduction methods on the basis of the change of the addition of silver nitrate (in the reduction method), or the dispersion of silver nanoparticles by sorption methods. Silver nanoparticles for the sorption method were prepared using a modified Tollens method, which have also been used in the reduction method of preparation of the composite. On the basis of these methods was prepared, a total of 24 composites, which was determined by the content of silver by atomic absorption spectroscopy, and subsequently was tested antibacterial activity. The selected composites were also studied using electron microscopy and energy-dispersive spectrometry.

From the results it is evident that the composites prepared using the reduction method to contain a greater amount of silver and also showed a higher antibacterial activity. For composites prepared using the sorption method on the surface of the calcium carbonate not adsorb a sufficient amount of silver nanoparticles, moreover, took place to the aggregation of silver nanoparticles and out of calcium carbonate. Because of lower content of silver was for these composites observed very low or even no antibacterial activity. On the contrary, composites prepared by the reduction method showed a high antibacterial activity and are thus potentially suitable material for the development of new implant procedures in medicine.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BOHNER, Marc. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Materials Today* [online]. 2010, vol. 13, 1-2, s. 24-30 [cit. 2015-03-04]. ISSN: 1369-7021. DOI: 10.1016/s1369-7021(10)70014-6.
- [2] WIESNEROVÁ, Ema. Ortopedická klinika testuje novou náhradu chrupavky. *Věda.muni.cz* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2005–2015. Poslední aktualizace 9. 3. 2013. [cit. 2015-01-25]. ISSN 1805-9759. Dostupné z: <http://www.veda.muni.cz/veda-a-vyzkum/3481-ortopedicka-klinika-testuje-novou-nahradu-chrupavky#.VPcfnGdARdh>
- [3] Nanotechnologie. *Nanotechnologie na VŠB-TUO* [online]. Ostrava: VŠB-TU Ostrava, © 2007. [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://nanotechnologie.vsb.cz/>
- [4] Co je to nanotechnologie. *Nanoconcept* [online]. 2014 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.nano-concept.cz/co-je-to-nanotechnologie/>
- [5] GERLA, Václav. *Nanotechnologie v medicíně: fyzikální metody v medicíně II* [online]. Vytvořeno 15. 12. 2002 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://nanomedicina.sweb.cz/>
- [6] TUČEK, Jiří. *Fyzikální základy nanotechnologií, pro obory Aplikovaná fyzika a nanotechnologie* [přednášky]. Olomouc: Univerzita Palackého, Katedra experimentální fyziky, 2011
- [7] KVÍTEK, Libor, PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 70 s. Skripta. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [8] KLASSEN, Henk J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* [online]. 2000, vol. 26, issue 2, s. 131-138 [cit. 2015-03-08]. ISSN:0305-4179. DOI: 10.1016/s0305-4179(99)00116-3.
- [9] WEI, Liuya, LU, Jingran, XU, Huizhong, PATEL, Atish, CHEN, Zhe-Sheng, CHEN, Guofang, PRABHAWATHI, Veluchamy, SIVAKUMAR, Ponnurengam Malliappan, DOBLE, Mukesh. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today* [online]. 2014, s. 1090-1107 [cit. 2015-03-08]. ISSN: 1359-6446. DOI: 10.4018/978-1-4666-5125-8.ch050.
- [10] KVÍTEK, Libor, PRUCEK, Robert, PANÁČEK, Aleš, NOVOTNÝ, Radko, HRBÁČ, Jan, ZBOŘIL, Radek. The influence of complexing agent concentration

- on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *The Royal Society of Chemistry*. 2005, vol 15, s. 1099–1105. DOI: 10.1039/b417007e
- [11] PRUCEK, Robert, KILIANOVÁ, Martina. *Cvičení ze základů nanomateriálové chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. 71 s. Skripta. ISBN 978-80-244-3752-1.
- [12] RAI, Mahendra, ALKA YADAV, GADE, Aniket. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, vol. 27, issue 1, s. 76-83 [cit. 2015-03-08]. ISSN: 0734-9750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [13] PARAKHONSKIY, B.V., Yu.I. SVENSKAYA, A.M. YASHCHENOK, H.A. FATTAH, O.A. INOZEMTSEVA, F. TESSAROLO, R. ANTOLINI a D.A. GORIN. Size controlled hydroxyapatite and calcium carbonate particles: Synthesis and their application as templates for SERS platform. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, vol. 118, s. 243-248 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.03.053.
- [14] MASSA, Miguel A., COVARRUBIAS, Cristian, BITTNER, Mauricio, FUENTEVILLA, Ignacio Andrés, CAPETILLO, Pavel, VON MARTTTENS, Alfredo, CARVAJAL, Juan Carlos. Synthesi sof new antibacterial composite rating for titanium based on highly ordered nanoporus silica and silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering*. 2014, s. 146-153 [cit. 2015-03-31]. ISSN: 0928-4931. DOI: 10.1016/j.msec. 2014.08.057.
- [15] WU, Jian, ZHENG, Yudong, SONG, Wenhui, LUAN , Jiabin, WEN, Xiaoxiao, WU, Zhigu, CHEN, Xiaohua, WANG, Qi, GUO, Shaolin. In situ synthesi sof silver-nanoparticles/bacterial celuloze composites for slow- released antimicrobial wound dressing. *Carbonate polymers*. 2014, vol. 102, s. 762-771 [cit. 2015-03-31]. ISSN: 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.10.093.
- [16] PRUNEANU, Stela, POGACEAN, Florina, R. BIRIS, Alexandru, COROS, Maria, WATANABE, Fumiya, DERVISHI, Enkeleda, S. BIRIS, Alexandru. Electro-catalytic properties of graphene composites containing gold and silver nanoparticles. *ElectrochimicaActa*. 2013, vol. 89, s. 246-252 [cit. 2015-03-31]. ISSN: 0013-4686. DOI: 10.1016/j.electacta.2012.10.163.
- [17] SLANE, Josh, VIVANCO, Juan, ROSE, Warren, PLOEG, Heidi-Lynn, SQUIRE, Matthew. Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles. *Materials Science and*

- Engineering: C* [online]. 2015, vol. 48, s. 188-196 [cit. 2015-03-08]. ISSN: 0928-4931. DOI: 10.1016/j.msec.2014.11.068.
- [18] TEGETHOFF, Wolfgang F., ROHLER, Johannes, KROKER, Evelyn. *Calcium carbonate: from the Cretaceous period into the 21st century*. English ed. Boston: Birkhauser Verlag, c2001, ix, 342 p. ISBN 3764364254.
- [19] Mineralogický systém: uhličitany. *Mineralogie pro školy* [online]. Praha: Přírodovědecká fakulta UK v Praze.[cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/ugmnz/mineral/system.html#uhlicitany>
- [20] SMRŽ, Jaroslav. *Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů*. Vyd.1. V Praze: Karolinum, 2013. 192 s. ISBN 978-80-246-2258-3.
- [21] LANGROVÁ, Iva et al. *Zoologie bezobratlých*. Vyd.1. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2010. 160 s. ISBN 978-80-213-2111-3.
- [22] Kosti (ossa) – kosterní soustava (systema skeletale). *Katedra mechaniky* [online]. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 2004 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.kme.zcu.cz/kmet/bio/kosti.php>
- [23] LUNGOVÁ, Vlasta, HLAVÁČEK, Lukáš, FELLNEROVÁ, Ivana. *Anatomie kosterní soustavy člověka - praktická cvičení*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. 105 s. ISBN 978-80-244-4013-2.
- [24] DOKLÁDAL, Milan. *Anatomie zubů a chrupu*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1994. 121 s. ISBN 80-210-0999-3.
- [25] *Těhlík Uplatnění Svaz výrobců cementu ČR* [online]. 2002 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.svcement.cz/includes/dokumenty/seminar-2011/22-uplatneni-vapencove-suroviny-z-hlediska-kvality-v-ruznych-prumyslovych-odvetvych.pdf>
- [26] RIPAMONTI,Ugo, CROOKS, Jean, KHOALI, Lerato, RODEN, Laura. The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite construct. *Biomaterials* [online]. 2009, vol. 30, s. 1428-1439. ISSN: 0142-9612 doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.065
- [27] HE, Fupo, ZHANG, Jing , YANG, Fanwen , ZHU, Jixiang, TIAN, Xiumei, CHEN, Xiaoming. In vitro degradation and cell response of calcium carbonate composite ceramic in comparison with other synthetic bone substitute materials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2015, vol. 50, s. 257-265 [cit. 2015-03-04]. ISSN: 0928-4931. DOI: 10.1007/springerreference_207929.

- [28] BARTOVSKÁ, Lidmila, ŠIŠKOVÁ, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. 262 s. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [29] VUOLA, Jyrki, GÖRANSSON, Harry, BÖHLING, Tom, ASKO-SELJAVAARA, Sirpa. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. *Biomaterials* [online]. 1996, vol. 17, issue 18, s. 1761-1766 [cit. 2015-01-12]. ISSN: 0142-9612 doi:10.1016/0142-9612(95)00351-7
- [30] COMBES, Christèle, MIAO, Baoji, BAREILLE, Reine, REY, Christian. Preparation, physical–chemical characterisation and cytocompatibility of calcium carbonate cements. *Biomaterials* [online]. 2006, vol. 27, issue 9, s. 1945-1954 [cit. 2015-03-04]. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.09.026.
- [31] FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO. Bez bolesti a bez potíží. *Fakultní nemocnice Brno* [online]. ©2015. Poslední aktualizace 7. 3. 2013. [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://www.fnbrno.cz/bez-bolesti-a-bez-potizi/t4485>
- [32] STEVENS, Molly M.. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materialstoday*. 2008, vol. 11, issue 5. ISSN: 1369-7021.
- [33] Masahiro Fujiwara, Kumi Shiokawa, Takayuki Kubota, Kenichi Morigaki. Preparation of calcium carbonate microparticles containing organic fluorescent molecules from laterite. *Advanced powder technology*. 2014, vol 25, s. 1147-1154 [cit. 2015-04-21]. ISSN: 0921-8831. DOI: 10.1016/j.appt.2014.02.022.