

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické technologie

**FORMULACE A STUDIUM
PROTIMIKROBNÍHO PŘÍPRAVKU**

Diplomová práce

Hradec Králové 2015

Karolína Valíková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, 2015

.....
Karolína Valíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a přívětivost. Také bych ráda poděkovala všem pracovníkům Katedry farmaceutické technologie za vytvoření příjemné a přátelské pracovní atmosféry při vypracovávání mé diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

Kandidát: Karolína Valíková
Školitel: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.
Název diplomové práce: Formulace a studium protimikrobního přípravku

V předložené diplomové práci je prezentován literární přehled vybraných vlastností nanočástic stříbra. Jsou popsány způsoby měření jejich velikosti, přičemž je značná pozornost věnována foton korelační spektroskopii (PCS), která byla použita v experimentální části této diplomové práce. Jsou nastíněny různé metody syntézy nanočástic stříbra. Další část textu je zaměřena na využití nanočástic stříbra v oblastech týkajících se lidského zdraví – hlavně pro účely medicíny, dezinfekce a jako složka kosmetických přípravků. Jsou rovněž diskutovány možné toxické účinky nanočástic stříbra na lidský organismus.

Těžiště práce je v experimentu. Je studována jednak stabilita mikročástic v suspenzích určených k tvorbě přípravků, jednak možnosti přístroje založeného na metodě PCS měřit distribuci velikosti částic ve vodném prostředí ve velmi polydisperzních systémech a ve velmi zředěných soustavách. Bylo prokázáno, že mikročástice mají spontánní tendenci vytvářet agregáty, neionické tenzidy v koncentraci 0,1% zvyšují tendenci k vytváření shluků. Mikročástice jsou stabilní při teplotách do 60°C, při vyšších teplotách dochází k jejich destrukci. Byla vyzkoušena možnost modifikovat povrch mikročástic v alkalickém prostředí. Byly připraveny modelové směsi mikročástic a odděleně připravených nanočástic s cílem získání informací o možnostech detegovat velikostně značně odlišné složky v malých podílech a koncentracích. Byla testována a v některých případech prokázána kompletní konverze iontového stříbra do kompozitní struktury mikročástic.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Technology

Candidate: Karolína Valíková
Supervisor: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.
Diploma thesis title: Formulation and study of the antimicrobial agent

A literary overview of selected characteristics of silver nanoparticles is presented in the diploma thesis. Size measurement methods are described, while considerable attention is paid to photon correlation spectroscopy (PCS), which was used in the experimental part of this diploma thesis. Various methods of silver nanoparticle synthesis are outlined. Later part of the text is focused on the application of silver nanoparticles in areas concerning human health – mainly for the purposes of medicine, disinfection and as components of cosmetic products. Possible toxic effects of silver nanoparticles on human organism are also discussed.

The focus of the thesis is in the experimental part. Stability of microparticles in suspensions used for product formulation was studied, as well as the PCS instrument's capability to distinguish the size distribution of particles in aqueous medium in highly polydisperse systems and in highly diluted systems. It was proven that microparticles have a spontaneous ability to form flocks, nonionic surfactants in 0.1% concentrations increase the tendency for agglomerate formation. Microparticles are stable in temperatures up to 60°C; they are destroyed in higher temperatures. A possibility to modify the microparticle surface in alkaline medium was tested. Model mixtures of microparticles and separately prepared nanoparticles were made to gain information about the possibilities to detect individual components of very different sizes in small ratios and concentrations. A complete conversion of ionic silver to composite microparticle structures was tested and proven in some cases.

OBSAH

ÚVOD	9
1. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Charakterizace nanočástic	11
2.1.1 Nanočástice	11
2.1.2 Koloidní stříbro	11
2.2 Vybrané vlastnosti nanočástic stříbra.....	12
2.2.1 Velikost	12
2.2.2 Tvar	12
2.2.3 Plasmon	13
2.3 Měření velikosti nanočástic.....	13
2.3.1 Dynamický rozptyl světla	13
2.3.2 Elektronová mikroskopie	15
2.3.3 Difrakce rentgenového záření	16
2.3.4 Chromatografické metody.....	16
2.4 Syntéza nanočástic stříbra	17
2.4.1 Top-down přístup.....	17
2.4.2 Bottom-up přístup	18
2.4.3 Bioprodukce nanočástic stříbra	20
2.5 Využití nanočástic stříbra.....	21
2.5.1 Medicína.....	21
2.5.2 Dezinfekce vody.....	23
2.5.3 Kosmetické přípravky	24
2.6 Toxické působení nanočástic stříbra na lidské tělo	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1 Použité chemikálie, pomůcky a přístroje	26
3.1.1 Chemikálie	26
3.1.2 Pomůcky.....	26
3.1.3 Přístroje	26
3.2 Příprava zásobních roztoků	27

3.3 Další postupy přípravy	28
3.3.1 Vliv teploty disperze na velikostní parametry mikročástic	28
3.3.2 Vliv koncentrace mikročástic v suspenzi na jejich velikostní parametry.....	28
3.3.3 Vliv tenzidu na agregátní stav disperzí mikročástic.....	29
3.3.4 Vliv přečištění a povrchové úpravy mikročástic na jejich velikost.....	29
3.3.5 Vliv tepelného zpracování a změny koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem	31
3.3.6 Vliv koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné.....	32
3.3.7 Testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročástic.....	33
4. VÝSLEDKY	34
4.1 Vliv teploty disperze na velikostní parametry mikročástic	34
4.2 Vliv koncentrace mikročástic v suspenzi na jejich velikostní parametry	41
4.3 Vliv tenzidu na agregátní stav disperzí mikročástic.....	46
4.4 Vliv přečištění a povrchové úpravy mikročástic na jejich velikost.....	49
4.5 Vliv tepelného zpracování a změny koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem	61
4.6 Vliv koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné.....	67
4.7 Testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročástic.....	74
5. DISKUZE.....	84
5.1 K řešenému problému a metodě řešení	84
5.2 K vlivu teploty disperze na velikostní parametry mikročástic	85
5.3 K vlivu koncentrace mikročástic v suspenzi na jejich velikostní parametry	86
5.4 K vlivu tenzidu na agregátní stav disperzí mikročástic.....	86
5.5 K vlivu přečištění a povrchové úpravy mikročástic na jejich velikost.....	87
5.6 K vlivu tepelného zpracování a změny koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem.....	88
5.7 K vlivu koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné.....	89
5.8 K testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročástic.....	90
6. ZÁVĚRY	93
7. LITERATURA.....	94

SEZNAM ZKRATEK

DLS	dynamický rozptyl světla (též PCS)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HDC	hydrodynamická chromatografie
LSP	lokalizovaný povrchový plasmon
NADH	nikotinamidadeninukleotid
PCS	foton korelační spektroskopie (též DLS)
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáčky za minutu
SEC	gelová chromatografie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
UV	ultrafialové záření

ÚVOD

Nanotechnologie je rychle rozvíjejícím se oborem, jelikož poskytuje nanočástice, které se nejen svou velikostí, ale především vlastnostmi dramaticky liší od částic větších. Díky těmto odlišným charakteristikám mají nanočástice rozšířené portfolio uplatnění.

Nanočásticím stříbra se během posledních pár desítek let dostává zvýšené pozornosti v mnoha oblastech lidské činnosti. Tyto nanočástice vynikají nejen svými optickými a elektrickými vlastnostmi, které nacházejí uplatnění v elektronice, chemickém průmyslu a detekci biomolekul. Nejdůležitější využití pro medicínu plyne z protimikrobních a zejména antibakteriálních vlastností stříbra, které jsou lidstvu známy již od starověku. Nabízí se zde řešení rezistencí bakterií na antibiotika a chemoterapeutika. Tyto rezistence komplikují léčbu a zvyšují morbiditu a mortalitu pacientů. Protimikrobní efekt nanočástic stříbra se také používá pro úpravu kosmetických výrobků nebo jejich obalů.

Protože jsou nanočástice stříbra používány stále častěji a ve větším objemu, je nutné se zabývat i jejich potenciální toxicitou nejen pro člověka, ale i pro životní prostředí. Toxické účinky nanočástic stříbra nejsou zatím zcela jasně a přesně definované a bude proto nutné provést mnoho toxikologických studií, které se tímto tématem budou zabývat detailněji.

1. ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Formulace cíle diplomové práce byla specifikována na základě dosud nezveřejněných výsledků experimentů s přípravou mikročástic vhodných jako podklad k vytvoření kompozitních struktur s elementárním stříbrem. Význam systémů tohoto typu je v jejich protimikrobní aktivitě při minimalizaci systémového účinku. Zvýšená biokompatibilita je podmíněna větším rozměrem částicových systémů, který na rozdíl od nanočástic tak zvaného koloidního stříbra neumožňuje překonávání biologických bariér. Bylo zadáno ověřit termickou a hydrolytickou stabilitu mikročástic a vyzkoušet možnost deflokulace suspenzí mikročástic neionickým hydrofilním tenzidem. Dále bylo zadáno otestovat pomocí modelových směsí mikročástic (nosiče) a nanočástic stříbra (nežádoucí příměsi) limity jejich rozlišení v soustavách s velkou polydisperzitou velikostí. Za užitečné bylo pokládáno prozkoumat schopnost přístroje metodou PCS změřit velikost mikročástic a nanočástic v jejich velmi nízkých koncentracích.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakterizace nanočástic

2.1.1 Nanočástice

Ačkoliv se definice pojmu nanočástice může zdát jasná, ve skutečnosti záleží na tom, v jakém oboru chceme nanočástice definovat. Obecně přijímaná velikost nanočástic se pohybuje od 1 nm do 100 nm. V závislosti na oboru, ve kterém tento pojem definujeme, lze považovat za nanočástice i takové částice, jejichž velikost je větší než 1 nm a menší než 1 μm (1, s. 5). Částice větší než 100 nm se nazývají submikronové částice. Nanočástice stříbra většinou mají velikost pod 100 nm, avšak pokud jsou navázány na další látky, jejich velikost nabývá submikronových rozměrů, někdy i větších než tisíce nanometrů.

2.1.2 Koloidní stříbro

V souvislosti s nanočásticemi stříbra se velmi často užívá pojem koloidní stříbro. Koloidní stříbro je disperze pevných nanočástic stříbra (tj. dispergovaná složka) ve vhodném dispergujícím prostředí, kterým je nejčastěji voda. V závislosti na velikosti částic běžně rozlišujeme tzv. koloidní disperze (velikost částic 1-500 nm) a hrubé disperze (velikost částic větší než 500 nm) (2, s. 9). Odtud plyne i název koloidní stříbro.

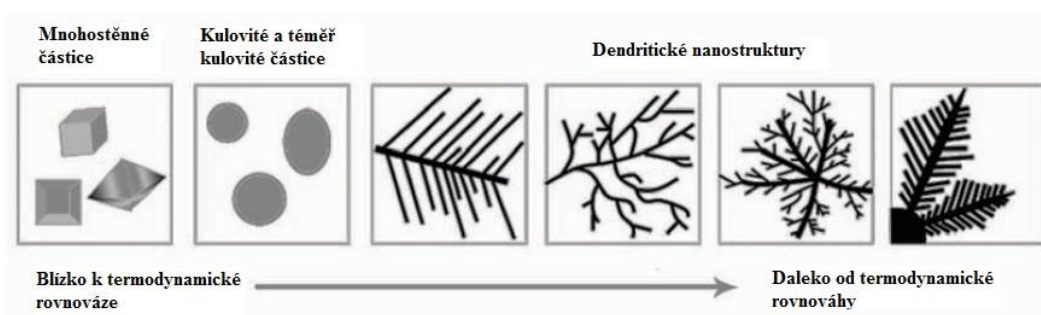
2.2 Vybrané vlastnosti nanočástic stříbra

2.2.1 Velikost

Nanočástice se obecně vyznačují jinými vlastnostmi než částice větších rozměrů. Logicky vyplývá, že čím je částice menších rozměrů, tím se zvětšuje její poměr plochy povrchu k objemu. Jelikož mají atomy na povrchu takových částic vyšší energii než atomy částic větších, tvoří se mezi nimi vazby, které jim udělují rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, které se týkají reaktivity, rozpouštění nebo optických vlastností, ale také i potenciálních vlastností toxických (1, s. 5).

2.2.2 Tvar

Částice stříbra mohou zaujímat mnoho různých tvarů; od sférických, mnohostěnných až po dendritické struktury. Tvar nanočástic je dán především povahou procesu syntézy, tj. závisí na termodynamické rovnováze dané metody nebo na použitých reakčních činidlech. Na tvaru, stejně jako na velikosti nanočástic, závisí jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, například povrchový plasmon, což může ovlivnit i jejich případné využití.



Obrázek 1: Závislost tvarů kovových nanočástic na vzdálenosti od reakční termodynamické rovnováhy; adaptace do českého jazyka (3).

2.2.3 Plasmon

Disperze částic koloidního stříbra jsou velmi často zbarveny nápadnými barvami. Toto zbarvení je způsobeno oscilací plasmy a nazývá se pojmem plasmon.

Plasmon, vyskytující se u nanočástic stříbra a dalších kovů (např. zlata), je způsoben hromadnou excitací a oscilací volných vodivých elektronů na povrchu nanočástic, která je způsobena elektromagnetickým polem, tedy světlem. Tento jev se konkrétně u kovových nanočástic nazývá lokalizovaný povrchový plasmon (LSP – *Localised Surface Plasmon*), jedná se o elektromagnetický úkaz vázaný na fázové rozhraní stříbra a dielektrika (4, 5).

U nanočástic stříbra absorpce a rozptyl světla často spadají do viditelné oblasti spektra, což dává částicím jejich viditelné jasné zbarvení. Jak již bylo naznačeno v předešlé podkapitole, povrchový plasmon je ovlivňován nejen tvarem nanočástice, ale také její velikostí a druhem povrchu. Všechny tyto charakteristiky nanočástic přímo ovlivňují absorpci a rozptyl světla, tedy plasmon, a tím i jejich barvu.

Povrchové plasmony částic stříbra sférického charakteru a jimi způsobený rozptyl světla popisují matematicky Mieho řešení Maxwellových rovnic (6).

2.3 Měření velikosti nanočástic

2.3.1 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS, *Dynamic Light Scattering*) neboli také foton korelační spektroskopie (PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*) je jednou z hlavních technik používaných pro měření velikosti a rovněž i distribuce velikosti nanočástic v roztoku nebo suspenzi. Je to také metoda, která byla použita v experimentální části této diplomové práce.

Jedním ze základních principů a předpokladů této metody je Brownův pohyb částic v kapalném médiu. Protože je Brownův pohyb dynamický jev, při kterém se mění vzdálenosti částic rozptylujících záření, DLS je založeno na záznamu fluktuací intenzity úzkého paprsku rozptýleného světla v čase.

Vzorek je osvětlen z laseru monochromatickým zářením o určité vlnové délce. Částice vzorku vykonávající Brownův pohyb rozptýlí světlo různými intenzitami. Data jsou po průchodu detektorem, který měří intenzitu rozptýleného světla, zpracována tzv. korelátorem napojeného na počítač (7). Korelátor pomocí složitých rovnic a algoritmů měří korelaci změn intenzity rozptýleného světla v závislosti na čase. Se znalostí míry změn je možné stanovit distribuci velikostí částic. Základní distribuce částic měřená pomocí DLS je intenzitní, kterou lze pomocí Mieho teorie převést na objemovou a tu dále na číselnou distribuci (8).

DLS měří hydrodynamický průměr a difúzní koeficient částic. Difúzní koeficient zde technicky zastupuje rychlost pohybu částic pod vlivem Brownova pohybu.

Difúzní koeficient kulatých částic v dostatečně zředěné disperzi je možno vyjádřit pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

kde

D = difúzní koeficient

k_B = Boltzmannova konstanta

T = absolutní teplota

η = viskozita média

r = poloměr částice

Je možno při naměřené hodnotě D , známé viskozitě η a absolutní teplotě T kapalného média vypočítat hydrodynamický průměr částic. Hydrodynamický průměr částic nemajících pravidelný kulatý tvar je tedy analogický průměru koule se stejným difúzním koeficientem za totožných podmínek.

Úskalím této metody je velmi často nemožnost změřit jednotlivé velikosti částic u polydisperzního vzorku. Nanočástice také velmi snadno tvoří aglomeráty, takže DLS následně měří velikost těchto aglomerovaných částic, a nikoliv částic jednotlivých. Odchytky výsledků měření také nastávají v případě, že se prudce zvýší viskozita měřeného vzorku, jelikož Stokes-Einsteinova rovnice platí pouze pro dostatečně zředěné koloidní disperze (1, s. 5). Pochopitelně je také nutné zbavit analyzovaný vzorek veškerých možných nečistot nebo jiných nežádoucích látek, které by mohly nepříznivě ovlivnit výsledky DLS měření.

2.3.2 Elektronová mikroskopie

2.3.2.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) umožňuje změřit jak velikost a distribuci velikosti částic, tak i charakterizovat jejich morfologii, např. tvar. TEM hlavně umožňuje analyzovat vnitřní strukturu částic, nikoli vnější (1, s. 5; 9, s. 54-55). Při této metodě je na vzorek působeno proudem elektronů z elektronového zdroje, které interagují s atomy vzorku. Nevýhodou metody je nutnost přípravy velmi tenké vrstvy vzorku, obvykle maximální tloušťky 100 nm, protože elektrony mají nízkou schopnost průniku materiálem (10, s. 1). Vzorek také musí být stabilní při vysokém vakuu, které se využívá pro eliminaci vody ze vzorku; a paprsku elektronů, které na něj během měření působí. Výhodou TEM při analyzování kovových nanočástic je nepochybně vysoký kontrast mezi jednotlivými kovovými atomy bez interference organických molekul (9, s. 10). Záznam měření lze získat jako fotografii nebo ho lze natočit pomocí speciální kamery.

2.3.2.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) stejně jako TEM umožňuje pozorovat morfologii a mikrostrukturu látky. SEM také využívá elektronového zdroje záření, jen s tím rozdílem, že je detekován odraz signálu primárních elektronů od povrchu vzorku. Na rozdíl od TEM poskytuje trojrozměrný obraz analyzované látky, což je dáno právě odrazem sekundárních elektronů (11). Tento fakt umožňuje analyzovat vnější strukturu a povrch částic (1). Podmínkou měření pomocí SEM je rovněž vysoké vakuum a vzorek musí mít dostatečně elektricky vodivý povrch, což se u biologických vzorků provádí pokrytím tenkou vrstvičkou kovu (12).

SEM mívá obecně menší rozlišení než TEM, ale má výhodu v již zmíněné trojrozměrné podobě částic a možnosti použití objemnějších vzorků než u TEM (9, s. 11).

2.3.3 Difrakce rentgenového záření

Při této metodě je vzorek ozařován rentgenovými paprsky generovanými v rentgenové lampě. Při průchodu paprsků vzorkem nastává jejich ohyb (difrakce) elektrony krystalické látky. Získanými výsledky difrakce jsou směr a intenzita ohybu rentgenového paprsku, které jsou závislé na vnitřní struktuře látky (13). Jednoduše řečeno, pomocí této metody lze s minimální nutnou přípravou vzorku určit krystalovou strukturu, chemické složení a přibližnou velikost částic dané látky (14, 15).

2.3.4 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou zajímavými technikami, protože zjišťují nejen velikost nanočástic, ale také je separují v závislosti na velikosti nebo jiných parametrech. Nejčastěji používané metody jsou gelová chromatografie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) a hydrodynamická chromatografie (HDC, *Hydrodynamic Chromatography*) (15).

Principem SEC je zadržování částic v pórech určité velikosti, které jsou součástí matrice kuliček tvořící náplň kolony. Protože se menší částice zadržují v těchto pórech, větší, které se do pórů nevejdou, jsou eluovány dříve. Takto se částice separují od frakce s největší velikostí částic po frakci s nejmenší velikostí částic. Tímto způsobem lze i nanočástice rozdělit do frakcí o definovaných velikostech a zbavit je případných chemických nečistot (9, s. 55).

HDC je v podstatě obdobou SEC, ovšem s tím rozdílem, že je kolona naplněna nepórovitou stacionární fází (16, s. 248).

2.4 Syntéza nanočástic stříbra

2.4.1 Top-down přístup

K syntéze nanočástic stříbra se v podstatě používají 3 základní přístupy. Tzv. top-down přístup (shora-dolů) znamená přípravu částic o malých rozměrech z větších částic o velkém objemu materiálu. Naproti tomu bottom-up (zdola-nahoru) přístup znamená přípravu nanočástic syntetickou metodou z jednotlivých atomů nebo molekul.

Top-down přístup přípravy nanočástic je přístupem mnohem starším než přístup bottom-up. Mechanickým postupem se zmenšuje velikost částic až na nano- nebo submikronové měřítko. Výhodou top-down přístupu je absence interferujících částic, které se často mohou tvořit během bottom-up syntézy různými vedlejšími chemickými reakcemi (17). Nevýhodou top-down metod může být nechtěné vytvoření povrchových defektů na částicích a zvýšení jejich vnitřního napětí a stresu, což může nepříznivě ovlivnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (18, s. 72-75).

Velmi jednoduchá a stará technika, která se řadí mezi top-down metody, je mechanické rozdrobňování (drcení a mletí) větších částic na menší za pomoci mlýnů a koloidních mlýnů (1, s. 69). Nicméně mletí materiálů na nanočástice má svá omezení. Jednak je to zvyšující se reaktivita částic se zmenšující se velikostí, která zapříčiňuje agregaci a spojování částic, což vede k určitému limitu možné velikosti nanočástic, které lze tímto způsobem vytvořit. U mletí také nelze očekávat vysokou monodisperzitu nanočástic, takže tuto metodu nelze použít v případě syntézy nanočástic o určité definované velikosti (19, s. 11-13). Vzhledem k již zmíněné okamžité agregaci nanočástic při mletí na sucho se častěji používá mokré mletí. Při mokré mletí ihned tekuté médium obklopí částice, což částečně zabrání jejich shlukování (1, s. 69).

Laserová ablace, jakožto zástupce top-down metod, se společně s chemickou redukcí (bottom-up postup) řadí mezi nejčastěji využívané způsoby syntézy nanočástic stříbra (20, 21). Při laserové ablaci jsou pulzní laserové paprsky zaměřeny na povrch materiálu, ze kterého se za velmi vysoké teploty odpařují částice, jež posléze putují nosným plynem a shromažďují se na jednom místě (22). Výhodou laserové ablace je vytvoření toku velkého množství částic najednou bez jakýchkoliv nežádoucích kontaminujících látek. Je to metoda rychlá, snadno kontrolovatelná, poskytuje vysoké procento výtěžnosti (23, s. 217-219).

2.4.2 Bottom-up přístup

Bottom-up přístup, tedy příprava nanočástic z jednotlivých atomů a molekul, se používá k syntéze nanočástic stříbra mnohem častěji než top-down přístup.

Mezi bottom-up patří například chemická redukce, sonochemická syntéza nebo syntéza pomocí mikrovln či gama záření.

Principem bottom-up procesu je disoluce stříbrné soli ve vhodném rozpouštědle a její následná redukce pomocí redukčního činidla. Rozpouštědla a redukující látky, popřípadě také stabilizující látky ovlivňují velikost a velikostní distribuci syntetizovaných částic, stejně jako jejich výsledné fyzikálně-chemické vlastnosti a případné působení na biologické systémy (24). Nejčastěji používaným druhem stříbrné soli je dusičnan stříbrný; v menší míře se také používají octan stříbrný, chloristan stříbrný nebo síran stříbrný. Vzhledem ke své netoxické povaze a ekologické přijatelnosti je voda používána jako nejčastější rozpouštědlo (20).

Jako redukční činidlo lze použít chemickou látku, záření nebo živý organismus, což je diskutováno v následující kapitole. Redukční činidlo redukuje stříbrné ionty soli prekursoru na elementární stříbro, které poté vytvoří nanočástice stříbra. Experimentálně je dokázáno, že silnější redukční činidla poskytují menší nanočástice a slabší redukční činidla větší nanočástice (20, 25). Také je experimentálně dokázáno, že použití dvou redukčních činidel způsobuje tvorbu nanočástic o menší velikosti a užší distribuci monodisperzity (26). Mezi často používaná chemická redukční činidla se řadí tetrahydridoboritan sodný, citrát, aminy nebo kyselina askorbová (21).

Stabilizační činidla, jako například výše zmíněný citrát nebo polyvinylpyrrolidon (PVP), zabraňují stericky nebo elektrostaticky agregaci nanočástic do větších shluků (20).

Velmi malé monodisperzní nanočástice stříbra s dobrou reprodukovatelností výroby lze připravit redukcí pomocí gama záření, kdy už není potřeba další chemické redukční činidlo (27). Redukce stříbrných iontů v tomto případě probíhá pomocí elektronů uvolněných radiolýzou vody gama zářením (19, s. 22-24, 27). Výhodou oproti klasické chemické redukci stříbrných solí má příprava pomocí gama záření tu výhodu, že výsledná reakční směs neobsahuje nečistoty způsobené chemickými redukčními činidly (19).

Redukce pomocí mikrovlnného záření rovněž poskytuje možnost přípravy částic stříbra o definované velikosti. Na rozdíl od redukce gama zářením ovšem tato metoda vyžaduje přítomnost ještě dalšího, chemického redukčního činidla, jako je například formaldehyd nebo ethanol (28, 29). Mikrovlnné záření poskytuje rychlejší a stejnorodější výsledek reakce než tradiční zahřívání, které se používá někdy u chemických redukcí stříbrných solí (30).

Další možnou metodou přípravy nanočástic stříbra je sonochemická syntéza. Princip syntézy nanočástic pomocí ultrazvuku spočívá v tom, že vlny ultrazvuku tvoří v tekutém prostředí místa s nízkým a vysokým tlakem. V těchto místech se tvoří a zanikají mikroskopické bubliny za produkce lokalizovaných vysokých teplot a tlaků. Energie uvolněná těmito procesy urychluje rychlost reakce tvorby nanočástic a nazývá se kavitace (31, s. 106). Ultrazvukové vlny obdobně vyvolávají rozklad molekul vody na radikály vodíkové a hydroxylové, z nichž dříve zmíněné poskytují elektrony nutné k redukci stříbrných iontů (32, s. 133).

2.4.3 Bioprodukce nanočástic stříbra

Biosyntetická produkce nanočástic stříbra se v poslední době jeví jako slibná alternativa k nejvíce používaným chemickým metodám, protože k takovéto výrobě není potřeba žádných nebezpečných nebo toxických chemikálií, ale také je s ní spojeno snížení nákladů na energii potřebnou k produkci.

Nanočástice stříbra mohou syntetizovat různé druhy organismů – bakterie (33), viry (34), houby (35) nebo rostliny, které jsou zároveň nejvíce používaným substrátem pro takovouto biosyntézu (36, 37, 38, 39).

Mechanismus biosyntézy nanočástic stříbra je velmi komplexní. Obecně přijímaným předpokladem pro biosyntézu organismy je přítomnost enzymu nitrátoreduktázy, který katalyzuje pomocí NADH přeměnu dusičnanových iontů na dusitanové (40).

V případě organismů schopných syntetizovat nanočástice stříbra tento enzym katalyzuje redukci stříbrných iontů (Ag^+) na elementární stříbro (Ag^0), čímž se tvoří nanočástice stříbra (41). Tento mechanismus přeměny stříbrných iontů na elementární stříbro je i patrně podkladem již zdokumentované rezistence bakterií na stříbro (42). Jedná se tedy hlavně o obranný mechanismus výše zmíněných organismů, které se produkcí nanočástic stříbra snaží zabránit toxickému působení stříbrných iontů na své buňky a tím pádem i životaschopnost.

2.5 Využití nanočástic stříbra

2.5.1 Medicína

Protimikrobní účinky stříbra jsou známy odedávna. Stříbro působí nejen antibakteriálně, ale také antifungálně, například proti *Candida* spp. (38, 43), a dokonce i antivirotický proti některým typům virů (44).

Antibakteriální vlastnosti jsou přisuzovány jak iontovým částicím stříbra, tak nanočásticím stříbra. Nanočástice stříbra také často stříbrné ionty uvolňují, takže působí ještě účinněji. Jednotný antibakteriální mechanismus účinku nebyl zatím popsán – částice stříbra působí na buňky bakterií mnoha způsoby. Jejich efektivita proti mikrobům záleží na řadě faktorů, například na jejich koncentraci v požadovaném místě působení, velikosti, tvaru a druhu bakterie. Předpokladem pro úspěšné antibakteriální působení je adsorpce, případně také absorpce a kumulace částic v buňce (26). Dříve se považoval za jeden z mechanismů adsorpce na povrch bakterií elektrostatický odpor mezi záporně nabitým bakteriálním povrchem a kladně nabitými částicemi stříbra. Již bylo ale dokázáno, že adsorbovat se mohou i částice se záporným zeta potenciálem (45).

Hlavními mechanismy pak jsou poškození genetické informace (DNA), fosfolipidových membrán, respiračních procesů nebo inaktivace buněčných proteinů vazbou na jejich sulfhydrylové vazby (45, 46). Inaktivace buněčných proteinů prokaryot ionty kovů se označuje jako oligodynamický efekt (47). Protože jsou nanočástice velmi malé, mají velký poměr plochy povrchu k objemu, což jim udílí schopnost protimikrobního působení již ve velmi malých koncentracích, řádově v nM a μ M (45). Částice stříbra jsou účinné nejen na samostatné mikroby, ale i ty vytvářející odolné biofilmy na různých typech povrchů, jako jsou povrchy orgánů, kanyl, katétrů, protéz a podobných (48).

Co se týče antibakteriálního spektra účinku, částice stříbra jsou efektivní proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím. Z Gram-pozitivních lze jmenovat *Staphylococcus aureus* (36, 47, 49, 50) nebo *Bacillus cereus* (38). Z Gram-negativních to jsou *Klebsiella pneumoniae* (49, 50), *Serratia marcescens* (50), *Pseudomonas aeruginosa* (50) nebo *Escherichia coli* (36, 38, 50). Ačkoliv se částice stříbra jeví být účinné jak na Gram-pozitivní, tak i Gram-negativní bakterie, je zajímavé pozorovat, že

jsou Gram-negativní bakterie k těmto částicím citlivější, pravděpodobně kvůli jednoduššímu proniknutí stříbra přes jejich buněčnou stěnu (51).

Velmi zajímavá se také ukazuje kombinace nanočástic stříbra společně s antibiotiky a antibakteriálními chemoterapeutiky. Konkrétně se experimentálně podařilo spojit molekulu ampicilinu s nanočásticemi stříbra a zlata, což se projevilo velmi dobrým antibakteriálním účinkem na řadu bakterií, srovnatelným s minimálními inhibičními koncentracemi jiných, běžně používaných antibiotik (52).

Jelikož se v medicínské péči používají běžně ve větších množstvích různá dezinficiencia, je nasnadě ověřit potenciální interakci nanočástic stříbra s těmito látkami. V jedné takové studii byla použita dezinficiencia typu ozónu, UV světla a chlornanu sodného. Zjistilo se, že nanočástice stříbra se mohou shlukovat, rozkládat nebo tvořit jiné stříbrné sloučeniny vlivem oxidujícího vlivu dezinficiencí uvolňujících kyslík. Pravděpodobně proto není vhodné používat nanočástice stříbra společně s jakýmkoli oxidujícími dezinficiencii (53). Obdobně by se stříbro nemělo používat společně s látkami, které ho mohou vyvázat nebo chelatovat (54).

Pravděpodobně nejrozšířenějším medicínským použitím je aplikace nanočástic stříbra jako součástí krytí na rány. Stříbro se používá k těmto účelům buď v nanočásticové nebo iontové formě impregnované na polymerní sloučeninu (55). Krytí s nanostříbrem je potřeba vyměňovat méně často než ta se stříbrem ve formě soli, mají vhodnější kinetiku uvolňování částic a jsou méně dráždivá pro poškozené místo (56). Tato krytí se používají na rány s velkým rizikem mikrobiální kontaminace, v případech jako jsou popáleniny, bércové vředy nebo diabetické vředy. Nanočástice stříbra mají na takové rány účinek nejen protimikrobní, ale také podle některých zdrojů účinek protizánětlivý (54, 57). Ačkoliv některé studie i reálné použití potvrzují pozitivní vliv stříbra na hojení ran, některé naopak poukazují, že je takovýto účinek velmi omezený (58). Experimentální práce také nabídla možnou aplikaci na povrch implantátů a protéz, které velmi často způsobují sekundární hlubokou infekci okolních tkání (59).

V neposlední řadě se také nanočástice stříbra používají jako antimikrobiální povrch textilu určeného k oblékání nebo obuvi. U textilií, u kterých se předpokládá častá manipulace ve smyslu praní nebo oděru, je výhodnější použití tzv. metody *in situ*, kdy se nanočástice připojí k celulózovým vláknům pomocí chemické redukce. Tato metoda, oproti metodě vnější impregnace sprejováním nebo namáčením vláken do disperze nanočástic, se vyznačuje lepší výdrží, odolností a rozprostřením částic v textilií (60).

2.5.2 Dezinfekce vody

Dalším z mnoha perspektivních využití nanočástic stříbra je dezinfekce vody. Nanočástice stříbra by mohly být využity jako alternativa obvyklého chlorování vody, které jednak může způsobovat vznik toxických produktů, a jednak nemusí být efektivní vůči multirezistentním bakteriím. Stříbro by bylo možné uchytit na materiálech, jako jsou polymerní membrány nebo pěny, sklo, plasty (61), keramika (62) nebo filtrací pomocí nanočástic navázaných na korálcích z oxidu křemičitého (63). Ačkoliv většina experimentálních prací potvrdila protimikrobní účinnost nanočástic stříbra pro účely dezinfekce vody, potenciálním problémem by mohlo být uvolňování stříbra z filtrů do filtrované vody, což by mohlo mít toxické účinky nejen pro člověka, ale i ostatní živočichy (63). Uvolňování stříbra bylo předmětem jedné studie, kde nanočástice byly navázány na povrchu z keramiky. Výsledky ukázaly, že při běžných hodnotách pH a počtu iontů ve vodě je uvolňování stříbra z povrchu minimální, ale při styku se zvýšenou koncentrací chloridu sodného se uvolňování stříbra mnohonásobně zvyšuje (64). Problémem při realizaci dezinfekce vody nanočásticemi stříbra tedy není jejich vlastní dezinfekční schopnost, ale možné riziko jejich uvolnění z filtračního povrchu do pitné vody.

2.5.3 Kosmetické přípravky

Nanočástice je možno využít při formulaci kosmetických přípravků nebo jako součást jejich obalového materiálu. Stříbro je stejně jako v medicíně využíváno v kosmetice převážně kvůli svým protimikrobním vlastnostem. Přípravky, které obsahují nanočástice stříbra, jsou například kosmetická mýdla a deodoranty, krémy na obličej nebo vlasová péče (65, 66).

S možnostmi využití nanočástic stříbra v kosmetických přípravcích také souvisí otázka bezpečnosti a potenciální toxicity. Ačkoliv je nepravděpodobné, že by přes neporušenou kůži mohly nanočástice projít (67), je možné, že částice menší než 20 nm jsou schopny procházet i neporušenou kožní bariérou (65). Přes porušenou kůži (ať mechanicky nebo onemocněním) mohou teoreticky projít částice o velikosti i několik tisíc nanometrů (66).

2.6 Toxické působení nanočástic stříbra na lidské tělo

Již dávno popsáním fenoménem po vystavení lidského organismu dlouhodobě většímu množství stříbra (koloidního nebo i v iontové podobě), je argyrie. Je to šedomodré zbarvení kůže a přilehlých adnex, jako jsou vlasové váčky, žlázy, potní žlázy, kapiláry. Zmíněné zbarvení je způsobené ukládáním malých částic stříbra v tkáních. Argyrie není pro lidské tělo nebezpečná, ale ve většině případů je ireverzibilní, neboť se tohoto zbarvení není možné zbavit žádnými známými metodami (68). Ve většině případů se argyrie vyskytla po perorálním dlouhodobém používání koloidního stříbra. Způsobení argyrie topickým použitím stříbra ve formě krytí je málo pravděpodobné (54).

Zatím není zcela jasné, jestli toxické působení nanočástic stříbra je většinou způsobeno nanočásticemi samotnými nebo jestli je způsobeno stříbrnými ionty, které se mohou při určitých podmínkách z nanočástic uvolňovat (69, 70). Potenciální uvolňování stříbrných iontů z nanočástic je ovlivněno mnoha faktory, jak je například velikost a tvar částic, pH, ionizace, povrch a teplota prostředí nebo UV záření (71). Co se týče výsledků experimentální práce na prostup nanočástic kůží, zdá se, že životaschopnost buněk není rozhodujícím faktorem ovlivňujícím absorpci přes kůži. Stejná studie naznačuje schopnost průniku malých nanočástic (okolo 19 nm) do oběhového systému, což se projevuje zvýšením sérových koncentrací stříbra (71). Stříbro má také potvrzenou toxicitu na fibroblasty a keratinocyty, nezávisle na své lékové formě nebo molekulární struktuře (54).

Přesný a podrobný mechanismus toxického působení částic stříbra není znám, ale ve valné většině se odborníci přiklánějí k názoru, že toxicitu způsobuje oxidativní stres vlivem působení reaktivních forem kyslíku (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (72, 73). Mezi ROS patří jak volné radikály kyslíku (např. superoxidový radikál nebo hydroxylový radikál), tak i látky, které charakter volných radikálů nemají (např. peroxid vodíku). Jak už z názvu vypovídá, ROS vykazují vysokou reaktivitu. Oxidují molekuly typu bílkovin, lipidů nebo DNA, což se také jinak nazývá jako oxidativní stres (74). Oxidativní stres se nejvíce projevuje na strukturách buňky, jako jsou mitochondrie, které svým poškozením ještě více zvyšují produkci ROS (55). Podle některých dostupných poznatků je zřejmé, že míra tvorby ROS je přímo úměrná dávce a nepřímo úměrná velikosti nanočástic, což odpovídá všeobecnému předpokladu, že menší nanočástice, zhruba o velikosti méně než 20 nm, mají větší potenciál interagovat s buněčnými strukturami těla, pronikat do nich, a tím pádem působit toxicky (36, 72). Dalšími toxickými účinky nanočástic stříbra jsou nepřiměřená zánětlivá reakce, která vzniká na podkladu oxidativního stresu (75, 76), poškození genetické informace buněk nebo mechanické poškození buněk (69). Všechny jmenované mechanismy pochopitelně mohou vést k buněčné smrti (55).

Ačkoliv je většina studií zkoumajících toxické působení nanočástic prováděna *in vitro* nebo na zvířecích modelech, před několika lety byl zaznamenán případ pacienta s kardiomyopatií po nadměrném častém používání koloidního zlata a stříbra jako potravního doplňku (77).

I když se výsledky studií na toxicitu nanočástic stříbra v mnohých případech liší, společným jmenovatelem, který toxicitu v těchto studiích způsoboval, jsou nanočástice stříbra o velmi malých velikostech (řádově kolem 10 nebo 20 nm). Většina studií se také shoduje v tom, že nanočástice stříbra jsou méně toxické než samotné stříbrné ionty (69, 70, 76).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, pomůcky a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Amoniak p.a., Fluka

Čištěná voda připravená reverzní osmózou, FaF UK

Dusičnan stříbrný Safina, ČR, Lachner, ČR

Hydroxid sodný p.a., Fluka

Polysorbát 20, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové

Usušená šťáva z plodů *Malpighia glabra* (acerola), Chemopharma GmbH

Mikročástice AS, RS – KFT FaF UK, Hradec Králové

3.1.2 Pomůcky

hliníková folie

kádinky

lahvičky

lžičky

lékovky

plastové květy

3.1.3 Přístroje

analytické váhy ABS 220-4 (KERN), max. 220 g, d = 0,1 mg

laboratorní váhy 440-33N (KERN), max. 200 g, d = 0,01 g

horkovzdušná sušárna (MEMMERT)

magnetická míchačka RT 5 power IKAMAG (IKA)

Malvern Zetasizer Nano series, Nano-ZS (MALVERN INSTRUMENTS, UK)

mikrovlonná trouba, výkon 700 W

ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER DIGITAL 10P (BANDELIN)

3.2 Příprava zásobních roztoků

Postupy přípravy zásobních roztoků a základní poměry výchozích látek pro vytvoření reakčního systému pro přípravu mikročástic obalených stříbrem byly adaptovány z postupů vytvořených doc. RNDr. Liborem Kvítkem, CSc. a jeho spolupracovníky z katedry fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Zásobní roztoky byly využity pro přípravu suspenze mikročástic se stříbrem deponovaným na jejich povrchu. Jedná se o zásobní roztoky hydroxidu sodného, amoniaku a dusičnanu stříbrného.

Zásobní roztok hydroxidu sodného byl připraven rozpuštěním 2,4 g hydroxidu sodného ve vodě do celkové hmotnosti roztoku 250 g.

Takto připravený roztok hydroxidu sodného má koncentraci 0,24 mol/l.

Zásobní roztok amoniaku byl připraven zředěním vodného roztoku amoniaku o koncentraci 14,67 mol/l vodou do celkové hmotnosti 250 g.

Takto připravený roztok amoniaku má koncentraci 0,1 mol/l.

Zásobní roztok dusičnanu stříbrného byl připravován každý den čerstvý v množství dle aktuální potřeby. Například pro přípravu roztoku potřebného pro 3 disperze bylo rozpuštěno 0,013 g dusičnanu stříbrného ve vodě do celkové hmotnosti roztoku 15 g.

Takto připravený roztok dusičnanu stříbrného má koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Zásobní roztok dusičnanu stříbrného byl uchováván vždy v tmavé lékovce obalené hliníkovou fólií a uložen na tmavém místě.

3.3 Další postupy přípravy

3.3.1 Vliv teploty disperze na velikostní parametry mikročástic

Byly připraveny suspenze mikročástic AS a RS navážením potřebné hmotnosti a dispergací v čištěné vodě. Vzniklá suspenze byla několikanásobně krátkodobě ponořena do ultrazvukové lázně pro dosažení optimálního rozptýlení mikročástic.

Suspenze mikročástic AS obsahovala jejich 0,01% koncentraci.

Suspenze mikročástic RS obsahovala jejich 0,1% koncentraci.

Suspenze byly následně vystaveny vlivu čtyř různých teplot – 23°C, 50°C, 75°C, 100°C po dobu 30 sekund a 100°C po dobu 10 minut.

K dosažení teplot vyšších než pokojová teplota bylo použito mikrovlnné záření.

Po vychladnutí všech suspenzí na 23°C byla změřena velikost mikročástic (vzorky 1a-1j).

3.3.2 Vliv koncentrace mikročástic v suspenzi na jejich velikostní parametry

Byly připraveny suspenze mikročástic AS a RS navážením potřebné hmotnosti a dispergací v čištěné vodě. Vzniklá suspenze byla několikanásobně krátkodobě ponořena do ultrazvukové lázně pro dosažení optimálního rozptýlení mikročástic.

Suspenze mikročástic AS byly připraveny v koncentracích 0,001%, 0,01%, 0,1% a 1%.

Suspenze mikročástic RS byly rovněž připraveny v koncentracích 0,001%, 0,01%, 0,1% a 1%.

U všech suspenzí byla změřena velikost mikročástic (vzorky 2a – 2h).

3.3.3 Vliv tenzidu na agregátní stav disperzí mikročásteč

Byly připraveny suspenze mikročásteč AS a RS navážením potřebné hmotnosti a dispergací v čištěné vodě. Vzniklá suspenze byla několikanásobně krátkodobě ponořena do ultrazvukové lázně pro dosažení optimálního rozptýlení mikročásteč.

Suspenze mikročásteč AS obsahovala jejich 0,1% koncentraci.

Suspenze mikročásteč rovněž RS obsahovala jejich 0,1% koncentraci.

U všech suspenzí byla změřena velikost mikročásteč (vzorky 3a a 3c).

Následně byly stejným způsobem připraveny nové suspenze, do kterých byl navíc přidán polysorbát 20 v koncentraci 0,1%. U těchto suspenzí byla rovněž změřena velikost mikročásteč (vzorky 3b a 3d).

3.3.4 Vliv přečištění a povrchové úpravy mikročásteč na jejich velikost

Přečištění mikročásteč AS proběhlo následujícím způsobem:

30 g mikročásteč AS bylo dispergováno v 200 g čištěné vody a opakovaně bylo na tuto suspenzi působeno pomocí ultrazvuku. K suspenzi byl následně přidán hydroxid sodný v různých koncentracích (0,25%, 0,35% nebo 0,45%) a celá suspenze byla ponechána po dobu 24 hodin při teplotě 5°C. Po 24 hodinách byla provedena centrifugace po dobu 20 minut při 1500 RPM. Sediment získaný centrifugací byl promyt čištěnou vodou a znovu centrifugován. Tento krok byl zopakován dvakrát. Konečný sediment byl promyt isopropanolem na papírovém filtru a usušen při 35°C do konstantní hmotnosti.

Reakční systém pro přípravu mikročastic obalených stříbrem byl připraven tímto způsobem:

5 g zásobního roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3) bylo smícháno s 1,25 g zásobního roztoku amoniaku (NH_3), 12,75 g čištěné vody a 1 g zásobního roztoku hydroxidu sodného. Jako redukční látka byly přidávány takové navážky přečištěných suchých mikročastic AS, aby jejich koncentrace v reakčním systému byla 0,5%, 1% a 2%.

Reakční systémy po přidání redukční látky byly míchány na elektromagnetické míchačce po dobu 45 minut, aby bylo zaručeno, že redukce iontového stříbra v podobě dusičnanu stříbrného na elementární stříbro a jeho deponace na mikročastice AS proběhla kvantitativně.

Po 45 minutách byl odebrán vzorek z každého reakčního systému. Ke vzorku byl přidán devítinásobek čištěné vody. Tím byl odebraný vzorek 10x zředěn. Byla změřena velikost částic (*vzorky 4a – 4i*).

Po změření velikosti mikročastic byla k 10x zředěnému vzorku přidána acerola v koncentraci 0,5%.

Uzavřené lahvičky se směsí obsahující acerolu byly intenzivně protřepány a uchovávány obalené hliníkovou fólií. Po 30 minutách stání byla změřena velikost částic (*vzorky 4j – 4r*).

Přidáním aceroly se zjišťuje, zda nejsou v suspenzi kromě požadovaných mikročastic obalených elementárním stříbrem přítomny také zbytky iontového stříbra. Ze zbytků iontového stříbra by vlivem aceroly, jako redukčního činidla, vznikly koloidní částice stříbra v nanorozměrech, jejichž přítomnost byla v této práci nežádoucí.

3.3.5 Vliv tepelného zpracování a změny koncentrace mikročastic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem

Byla připravena 5% suspenze mikročastic AS navážením potřebné hmotnosti částic AS a dispergací ve vodě. Vzniklá suspenze byla několikanásobně krátkodobě ponořena do ultrazvukové lázně pro dosažení optimálního rozptýlení mikročastic.

Tato suspenze byla pomocí mikrovlnného záření zahřáta na teplotu 60°C a poté se nechala vychladnout na teplotu 23°C. Z ochladlé suspenze byl odebrán vzorek, který byl zředěn čistou vodou na dvojnásobnou hmotnost. Tím byla připravena suspenze o poloviční koncentraci částic AS – tj. 2,5%.

Následně byl dvakrát připraven reakční systém pro přípravu mikročastic obalených stříbrem tímto způsobem:

5 g zásobního roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3) bylo smícháno s 1,25 g zásobního roztoku amoniaku (NH_3), 12,75 g čisté vody a 1 g zásobního roztoku hydroxidu sodného. Poté bylo přidáno 5 g redukční látky.

K prvnímu reakčnímu systému se jako redukční látka přidala 5% suspenze mikročastic AS. Finální koncentrace mikročastic AS v reakčním systému tedy činila 1%.

K druhému reakčnímu systému se jako redukční látka přidala 2,5% suspenze mikročastic AS. Finální koncentrace mikročastic AS v reakčním systému tedy činila 0,5%.

Oba systémy byly současně míchány po přidání redukující látky na elektromagnetické míchačce po dobu 45 minut, aby bylo zaručeno, že redukce iontového stříbra v podobě dusičnanu stříbrného na elementární stříbro a jeho deponace na mikročastice AS proběhla kvantitativně.

Po 45 minutách byl odebrán vzorek z každého reakčního systému. Ke vzorku byl přidán devítinásobek čisté vody. Tím byl odebraný vzorek 10x zředěn. Poté byla změřena u původního reakčního systému i u zředěného vzorku velikost částic (*vzorokly 5a – 5d*).

Totožný postup byl zopakován pro přípravu suspenze působením teploty 70°C (vzorky 5e – 5h).

Suspenze obsahující mikročástice obalené stříbrem připravené v této experimentální části byly uschovány ve tmě po dobu 24 hodin při teplotě 5°C a použity v experimentální části č. 6 k účelu popsání vlivu aceroly na mikročástice.

Desetkrát zředěné vzorky určené k měření mikročástic uschovány nebyly, protože byly další den připraveny čerstvé opětovným naředěním výše uvedených suspenzí.

3.3.6 Vliv koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné

Bylo připraveno 25 g koloidních částic (nanočástic) stříbra postupem získaným z předešlé práce diplomantky školitele (vzorek č. 53 v diplomové práci Kataríny Vojtkové) (78):

V čisté kádince bylo smícháno 5 g zásobního roztoku dusičnanu stříbrného (AgNO_3) s 1,25 g zásobního roztoku amoniaku (NH_3), 12,75 g čištěné vody a 1 g zásobního roztoku hydroxidu sodného. Nástřík 5 g roztoku redukční látky byl proveden za působení mikrovln po dobu 15 sekund, poté byla reakční nádoba přesunuta na elektromagnetickou míchačku a redukce pokračovala po dobu dalších 45 minut. Redukční látkou v tomto případě byla kombinace vodných roztoků 1,8% maltózy a 0,02% glycerinaldehydu.

Tato suspenze obsahující koloidní částice stříbra byla následně použita k vytvoření koncentrační řady obsahující ředění vodou 1x (tj. hotový vzorek), 10x (přidáním devítinásobku vody), 100x, 1000x a 5000x. U každého ředění byla změřena velikost vzniklých nanočástic (vzorky 6a – 6e).

V dalším kroku byla připravena 1% suspenze mikročastic AS, která byla pomocí mikrovlnného záření zahřívána na 100°C po dobu 10 minut. Po vychladnutí na teplotu 23°C byla suspenze postupně naředěna vodou na suspenze o koncentracích 0,1%, 0,01% a 0,001%.

Ke každému ředění suspenze mikročastic AS se přidaly koloidní částice stříbra v takovém množství, aby výsledná směs obsahovala 3 díly suspenze mikročastic AS v příslušném ředění a 1 díl koloidních částic stříbra o ředění 1x. Konečná směs byla dobře promíchána a změřila se velikost částic (*vzorky 7a – 7d*).

3.3.7 Testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročastic

K mikročasticím se stříbrem z experimentální části č. 5 připraveným při teplotách 60°C a 70°C v koncentracích 1% a 0,5% byl přidán devítinásobek čištěné vody. Tím byly mikročastice 10x zředěny.

Po změření jejich velikosti (*vzorky 8a – 8d*) byla k polovině mikročastic přidána acerola v koncentraci 0,5%.

Uzavřené lahvičky se směsí obsahující acerolu byly intenzivně protřepány a uchovávány obalené hliníkovou fólií. Po 30 minutách stání byly disperze změřeny (*vzorky 8e – 8h*).

Ke zbylé polovině mikročastic byl opět přidán devítinásobek čištěné vody. Tím byly částice 100x zředěny. Zbýlý postup byl totožný s postupem u mikročastic zředěných vodou 10x (*vzorky 8i – 8p*).

4. VÝSLEDKY

Výsledky experimentální práce jsou obsaženy v následujících tabulkách a obrázcích.

S každým vzorkem koresponduje obrázek stejného názvu, např. ke vzorku 1a patří obrázek 1a-1 a 1a-2. Pro zjednodušení orientace ve výsledcích je to i takto označeno. Součástí obrázku označeného příponou -1 jsou grafy intenzitní frekvenční křivky velikostí částic (na stránce vždy vlevo) a příponou -2 jsou grafy objemové frekvenční křivky velikostí částic (na stránce vždy vpravo).

Pozn. v jednom cyklu měření jsou vždy přístrojem ZetaSizer provedena tři měření téhož vzorku.

4.1 Vliv teploty disperze na velikostní parametry mikročástic

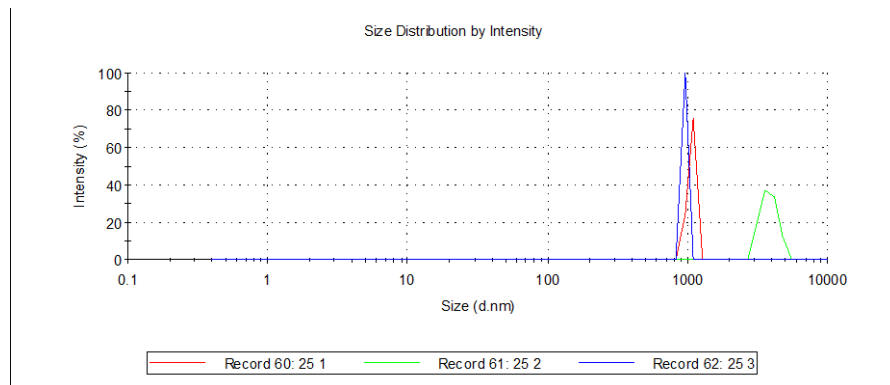
Tab. 1: Přehled vzorků k vlivu teploty disperze na velikostní parametry mikročástic

Vzorek	Související obrázky	Typ mikročástic	Použitá teplota (°C)	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
1a	1a-1, 1a-2	AS	23	25 1	6069	1	1070	0	0	100	0	0
				25 2	4506	0,331	3838	0	0	100	0	0
				25 3	7668	1	955,4	0	0	100	0	0
1b	1b-1, 1b-2	AS	50	24 1	2944	0,366	2454	0	0	100	0	0
				24 2	3476	0,121	3821	0	0	100	0	0
				24 3	4119	0,362	2279	0	0	100	0	0
1c	1c-1, 1c-2	AS	75	16 1	4734	1	1160	0	0	100	0	0
				16 2	5589	0,764	627	0	0	100	0	0
				16 3	4455	1	907,1	0	0	100	0	0
1d	1d-1, 1d-2	AS	100, po dobu 30 sekund	17 1	2636	1	867,5	43,08	0	84,1	15,9	0
				17 2	2724	1	1563	72,86	0	75,1	24,9	0
				17 3	3799	1	96,96	0	0	100	0	0

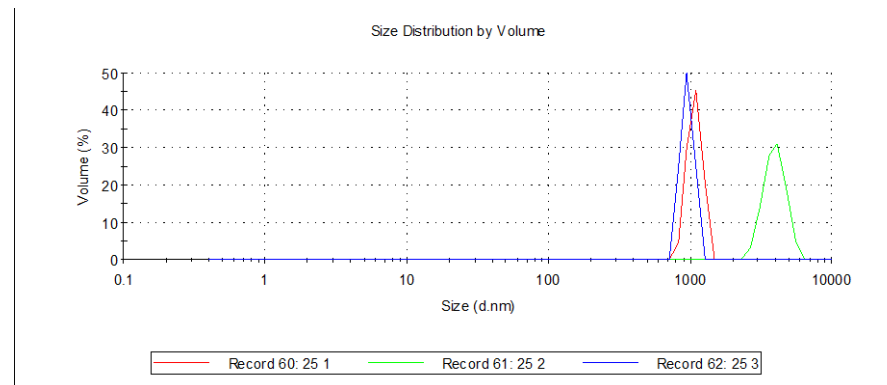
Tab. 1 (pokračování z předchozí strany): Přehled vzorků k vlivu teploty disperze na velikostní parametry mikročastic

Vzorek	Související obrázky	Typ mikročastic	Použitá teplota (°C)	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
1e	1e-1, 1e-2	AS	100, po dobu 10 minut	18 1	2473	1	1154	42,41	0	87,4	12,6	0
				18 2	2871	1	1149	60,48	0	73,3	26,7	0
				18 3	3632	0,519	2116	71,25	0	77,7	22,3	0
1f	1f-1, 1f-2	RS	23	27 1	3984	1	3665	0	0	100	0	0
				27 2	4213	1	3868	0	0	100	0	0
				27 3	5442	1	4785	0	0	100	0	0
1g	1g-1, 1g-2	RS	50	20 1	4133	0,354	2568	0	0	100	0	0
				20 2	4694	0,237	4063	0	0	100	0	0
				20 3	4696	0,357	2371	0	0	100	0	0
1h	1h-1, 1h-2	RS	75	21 1	2,57E+04	1	4447	0	0	100	0	0
				21 2	2,74E+04	1	5457	0	0	100	0	0
				21 3	4,05E+04	1	0	0	0	0	0	0
1i	1i-1, 1i-2	RS	100, po dobu 30 sekund	22 1	1,36E+04	1	4651	0	0	100	0	0
				22 2	1,96E+04	1	5461	0	0	100	0	0
				22 3	2,56E+04	1	0	0	0	0	0	0
1j	1j-1, 1j-2	RS	100, po dobu 10 minut	23 1	1,47E+04	1	4950	0	0	100	0	0
				23 2	2,20E+04	1	5560	0	0	100	0	0
				23 3	2,68E+04	1	0	0	0	0	0	0

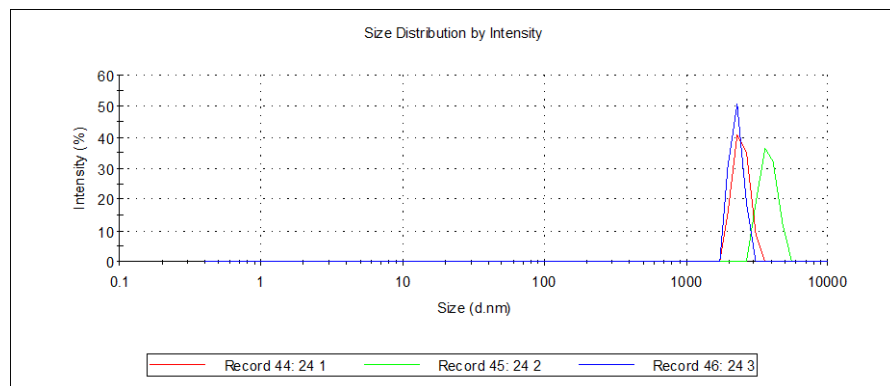
Obr. 1a-1



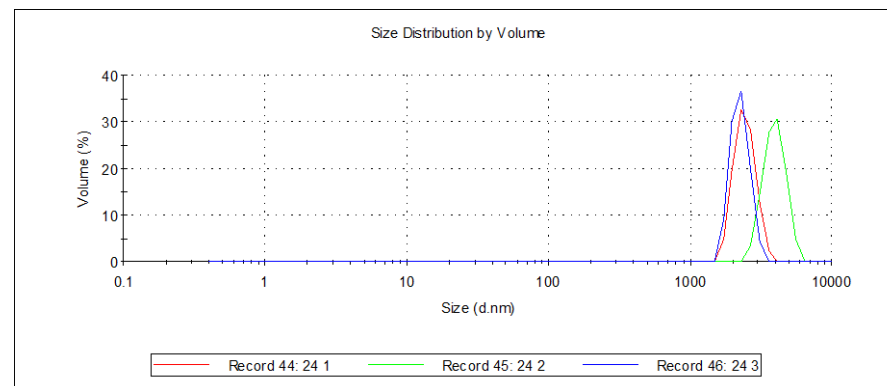
Obr. 1a-2



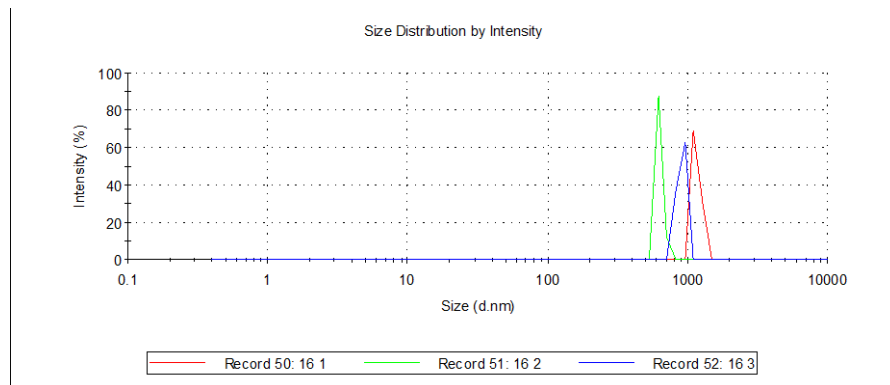
Obr. 1b-1



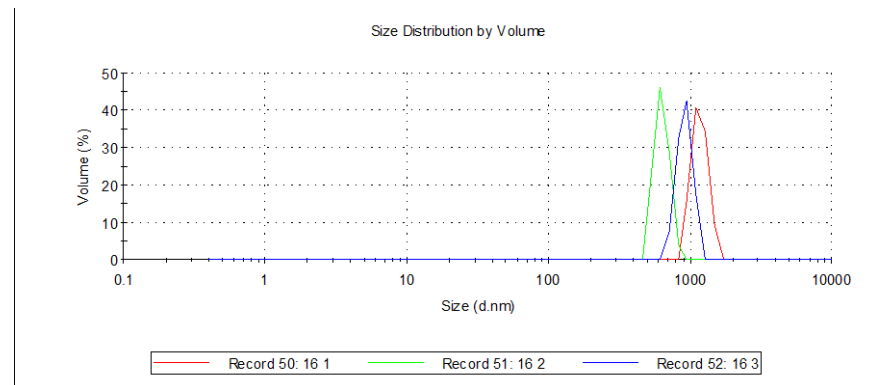
Obr.1b-2



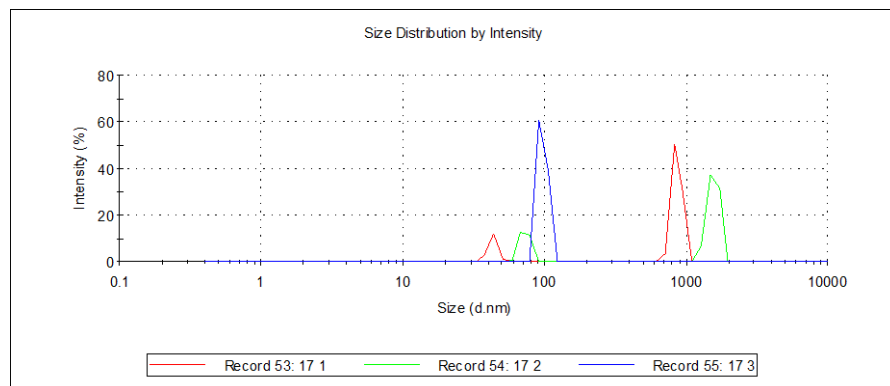
Obr. 1c-1



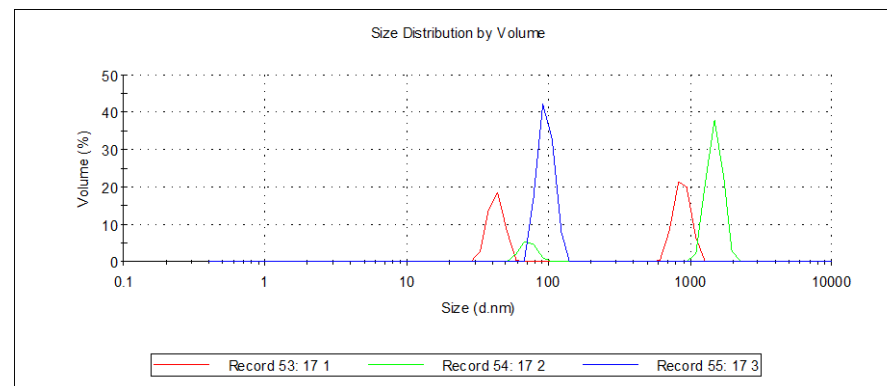
Obr. 1c-2



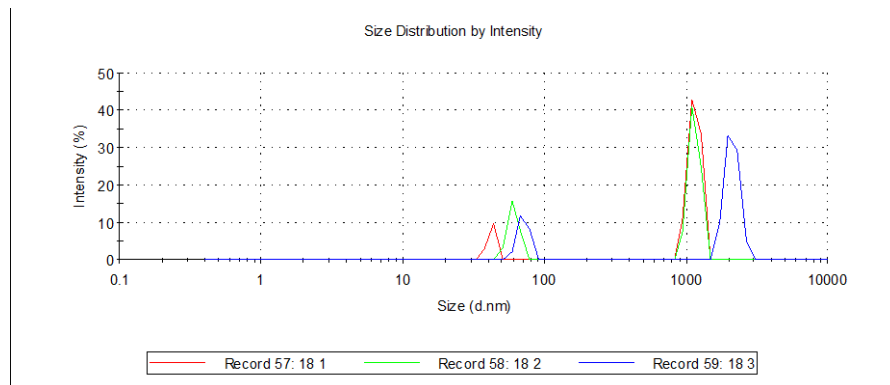
Obr. 1d-1



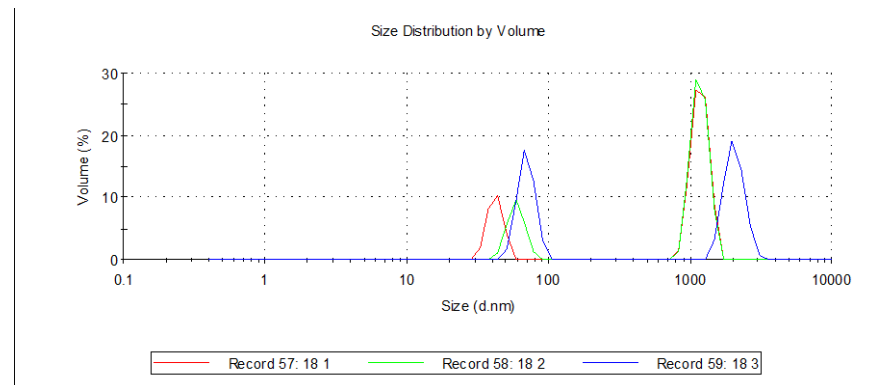
Obr. 1d-2



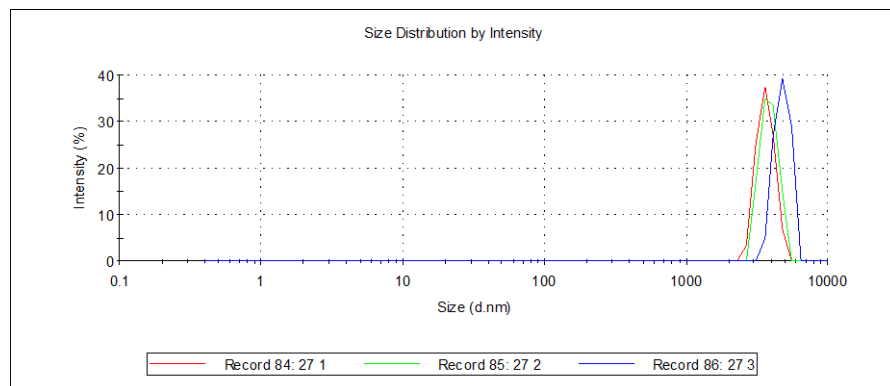
Obr. 1e-1



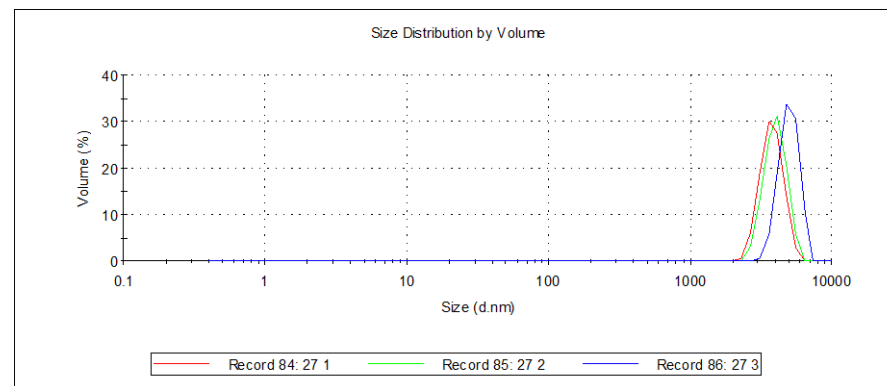
Obr. 1e-2



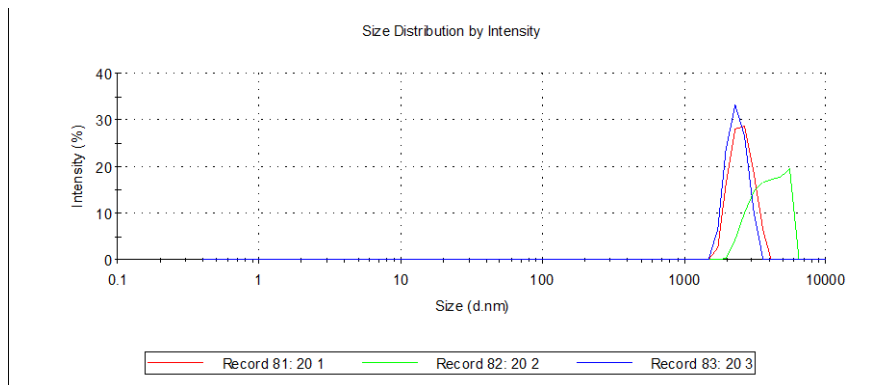
Obr. 1f-1



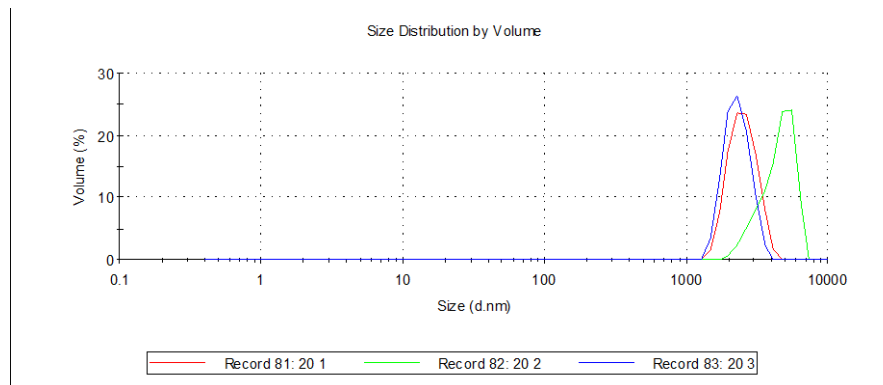
Obr. 1f-2



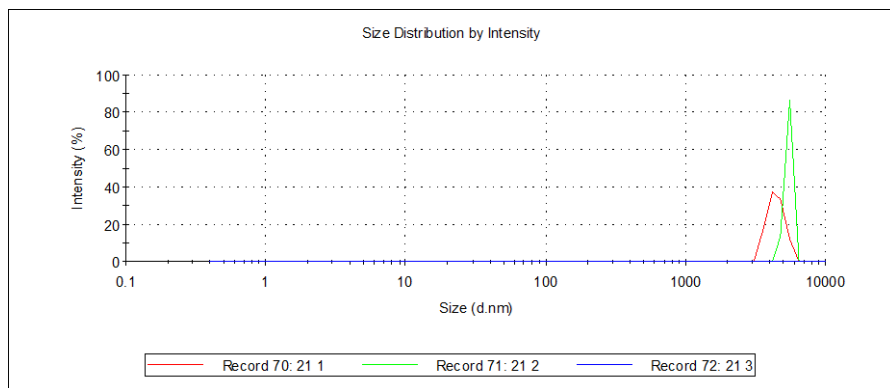
Obr. 1g-1



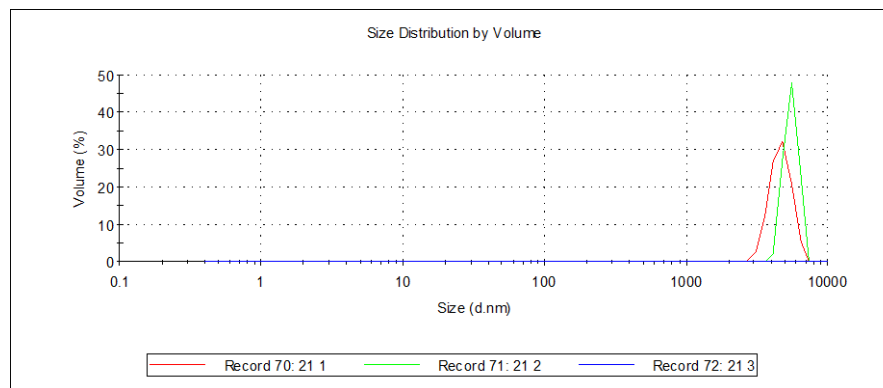
Obr. 1g-2



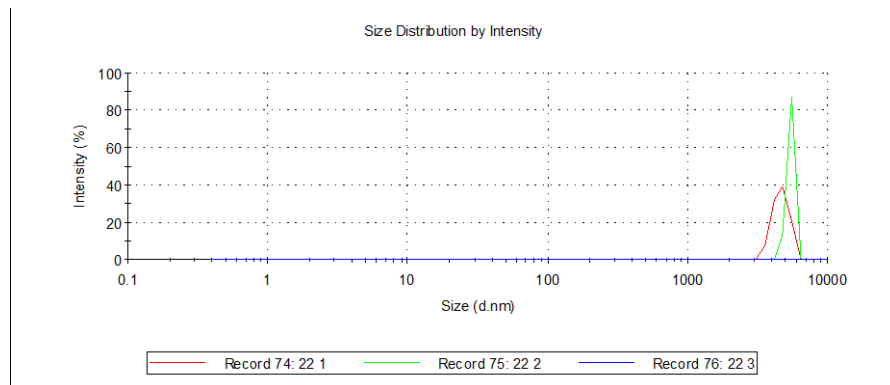
Obr. 1h-1



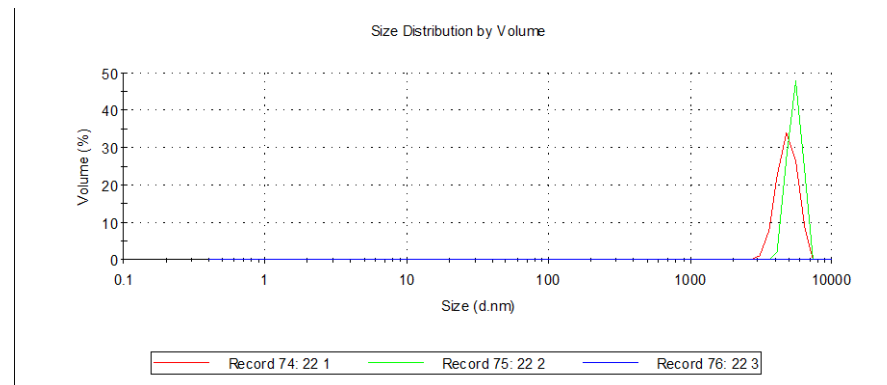
Obr. 1h-2



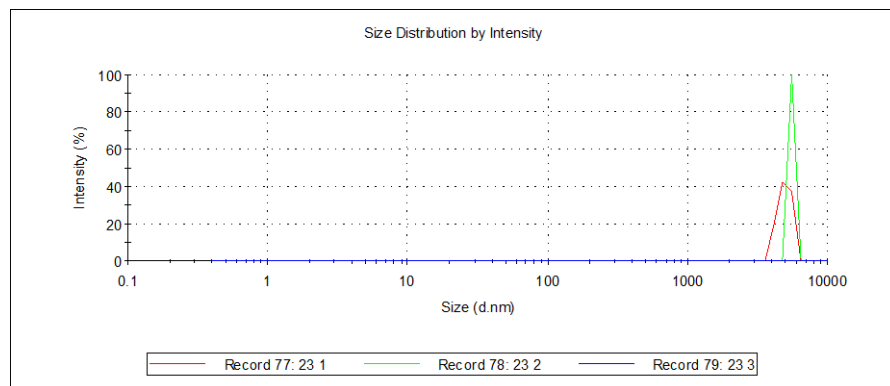
Obr. 1i-1



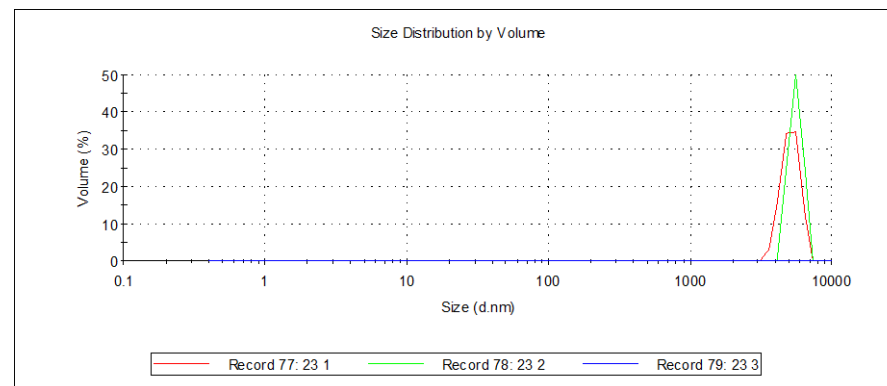
Obr. 1i-2



Obr. 1j-1



Obr. 1j-2

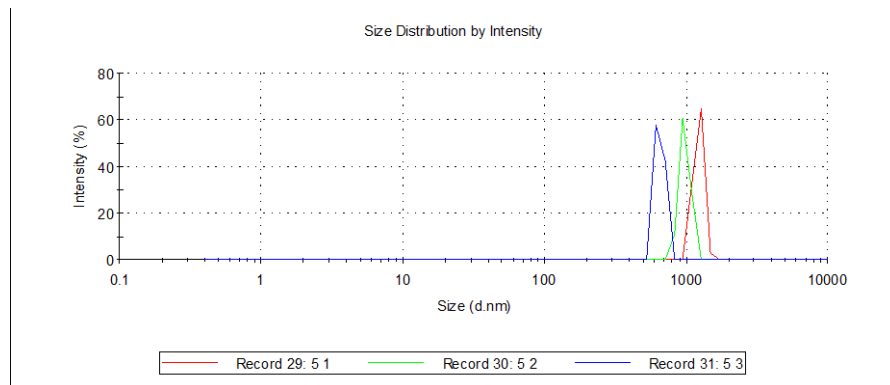


4.2 Vliv koncentrace mikročastic v suspenzi na jejich velikostní parametry

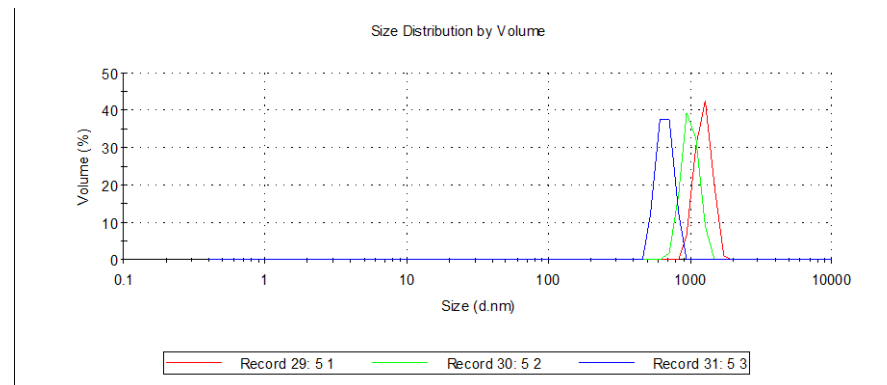
Tab. 2: Přehled vzorků k vlivu koncentrace mikročastic v suspenzi na jejich velikostní parametry

Vzorek	Související obrázky	Typ mikročastic	Koncentrace mikročastic (%)	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
2a	2a-1, 2a-2	AS	0,001	5 1	3834	0,392	1230	0	0	100	0	0
				5 2	4056	0,667	984,2	0	0	100	0	0
				5 3	3767	0,76	656,3	0	0	100	0	0
2b	2b-1, 2b-2	AS	0,01	6 1	4181	0,524	2162	0	0	100	0	0
				6 2	4665	0,55	1961	0	0	100	0	0
				6 3	3334	0,925	949,4	0	0	100	0	0
2c	2c-1, 2c-2	AS	0,1	7 1	2137	0,305	1758	4874	0	82,4	17,6	0
				7 2	2181	0,436	4027	1183	0	55,7	44,3	0
				7 3	2293	0,361	1738	5384	0	91,8	8,2	0
2d	2d-1, 2d-2	AS	1	8 1	3093	0,18	3274	0	0	100	0	0
				8 2	3004	0,243	2579	5281	0	95,2	4,8	0
				8 3	2981	0,213	2619	0	0	100	0	0
2e	2e-1, 2e-2	RS	0,001	9 1	4551	0,957	295,4	0	0	100	0	0
				9 2	1649	1	247,8	0	0	100	0	0
				9 3	2083	1	179,8	0	0	100	0	0
2f	2f-1, 2f-2	RS	0,01	10 1	6464	1	0	0	0	0	0	0
				10 2	4283	1	396,1	0	0	100	0	0
				10 3	2839	1	381,5	0	0	100	0	0
2g	2g-1, 2g-2	RS	0,1	13 1	3677	0,24	4155	0	0	100	0	0
				13 2	4180	0,291	4496	0	0	100	0	0
				13 3	6141	0,475	656,1	117,5	0	65,8	34,2	0
2h	2h-1, 2h-2	RS	1	12 1	6413	0,253	5343	0	0	100	0	0
				12 2	6276	0,008	5384	0	0	100	0	0
				12 3	6596	0,141	5452	0	0	100	0	0

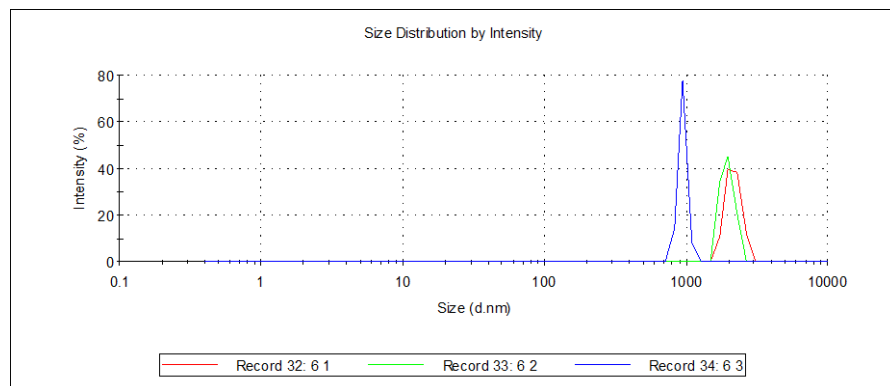
Obr. 2a-1



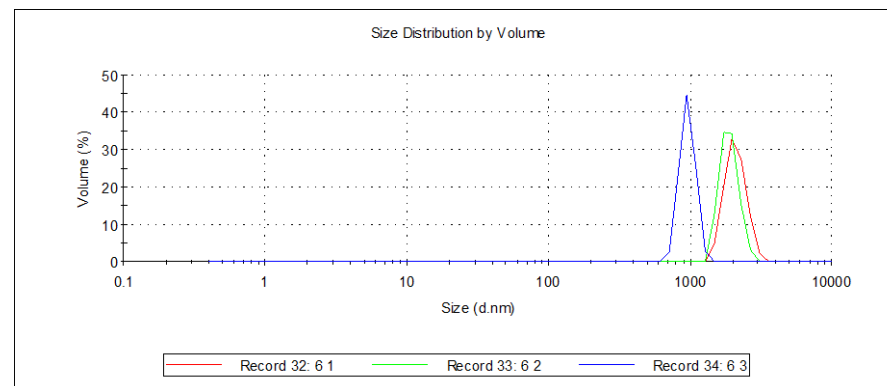
Obr. 2a-2



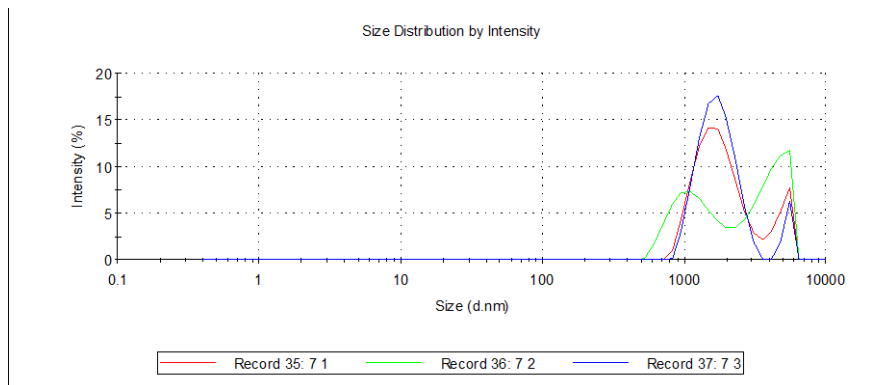
Obr. 2b-1



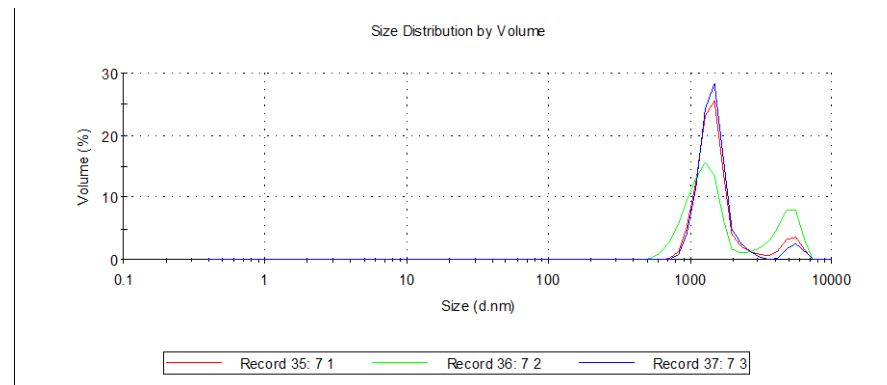
Obr. 2b-2



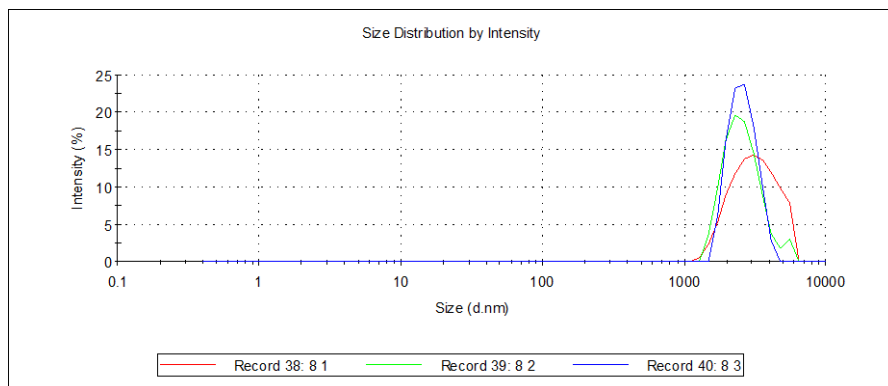
Obr. 2c-1



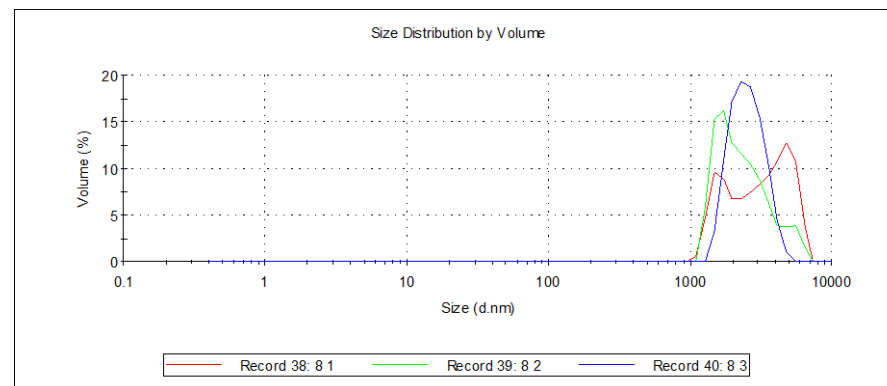
Obr. 2c-2



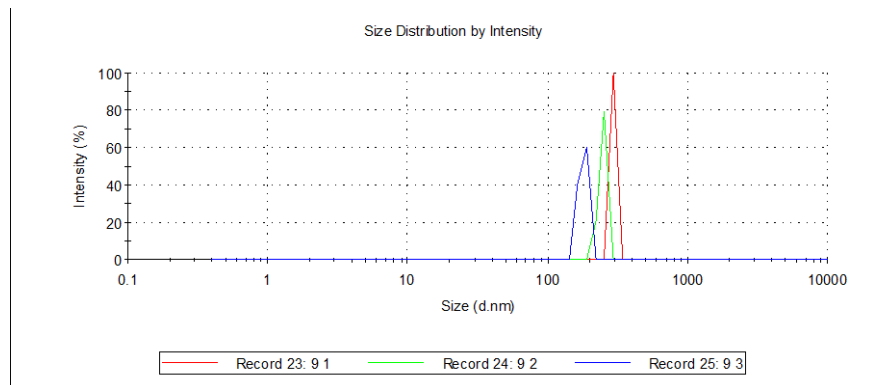
Obr. 2d-1



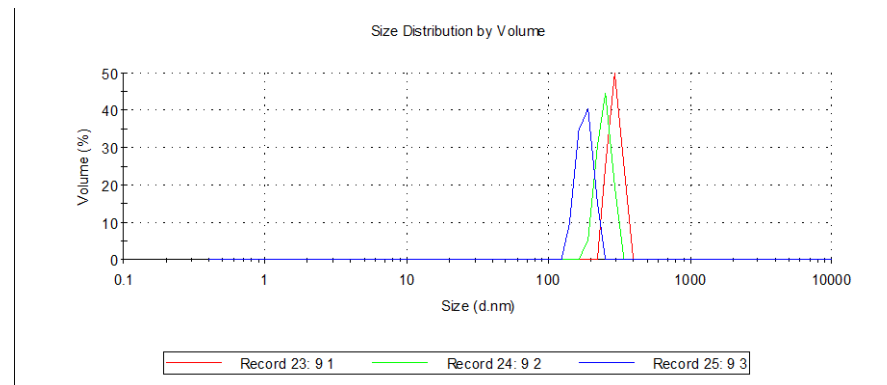
Obr. 2d-2



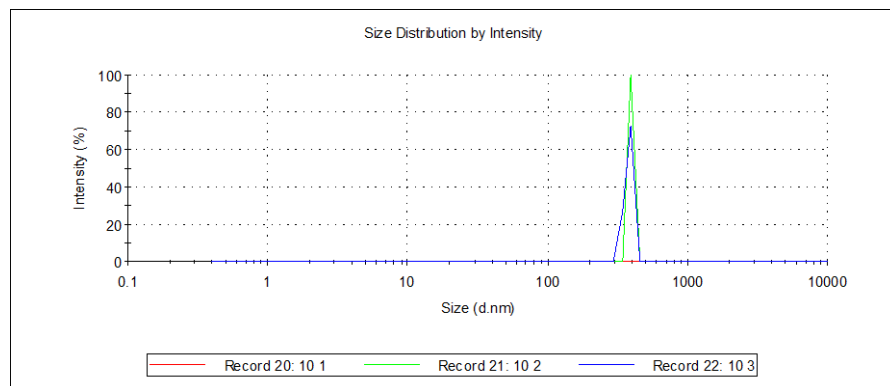
Obr. 2e-1



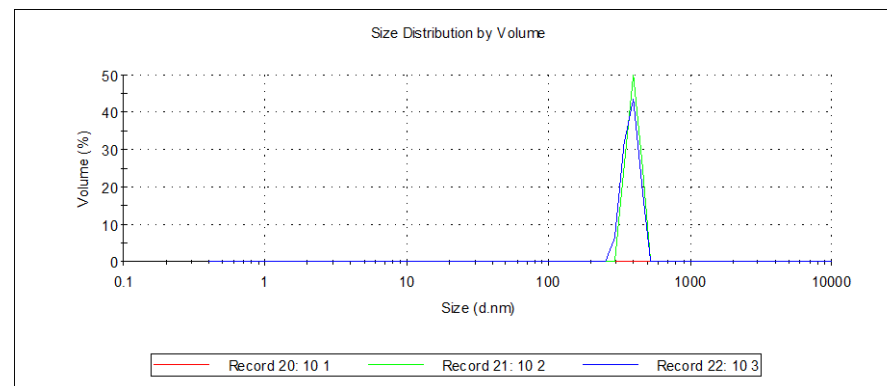
Obr. 2e-2



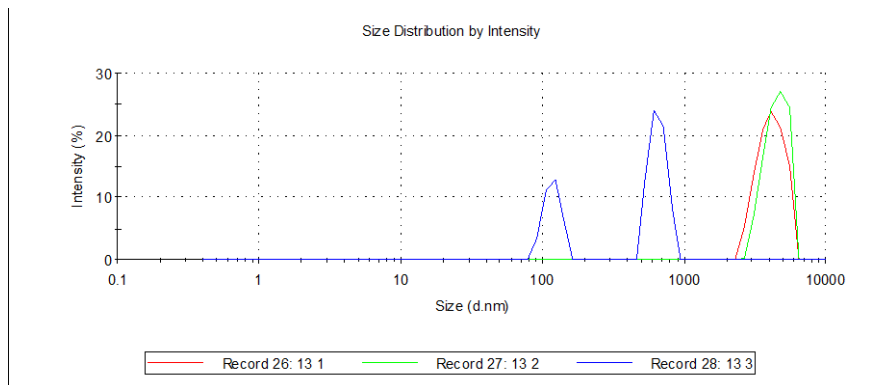
Obr. 2f-1



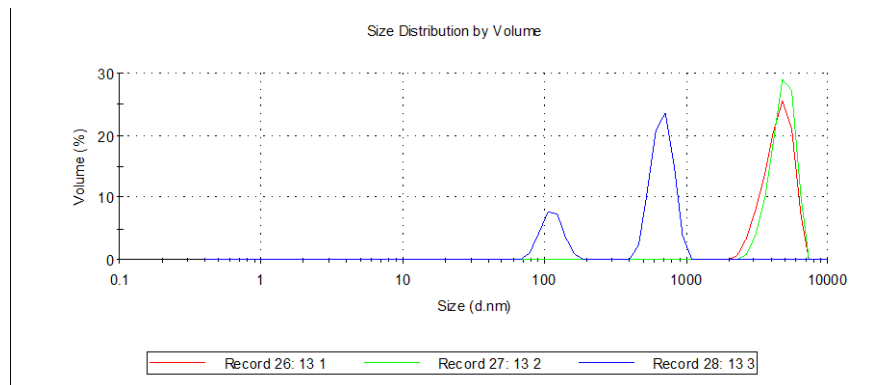
Obr. 2f-2



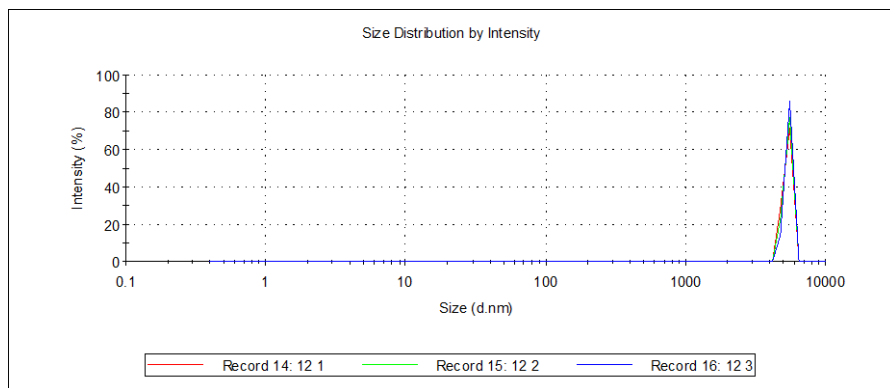
Obr. 2g-1



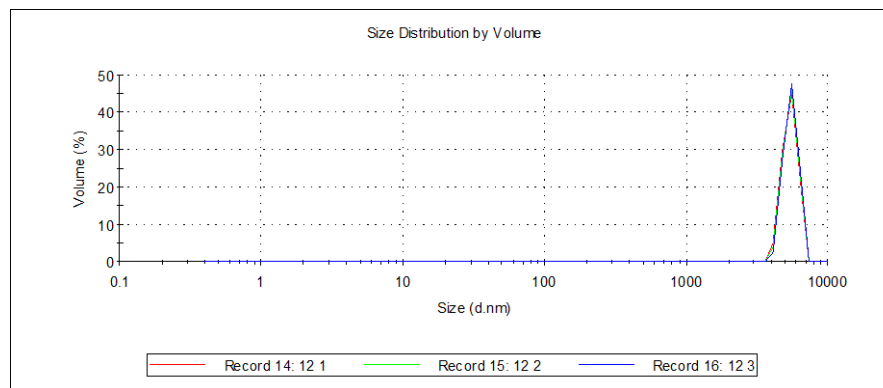
Obr. 2g-2



Obr. 2h-1



Obr. 2h-2

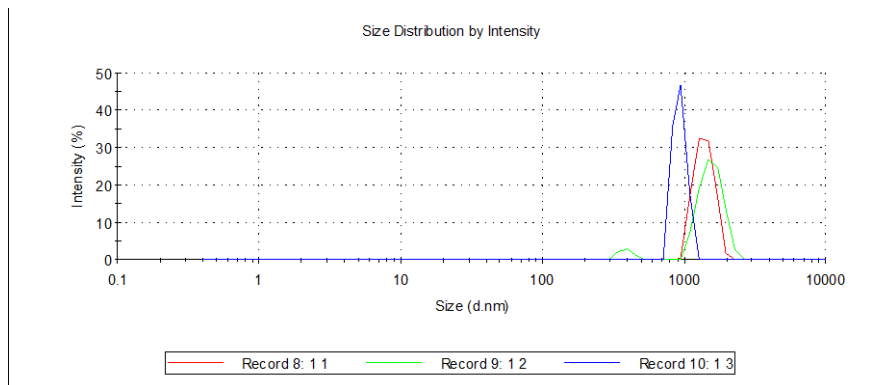


4.3 Vliv tenzidu na agregátní stav disperzí mikročastic

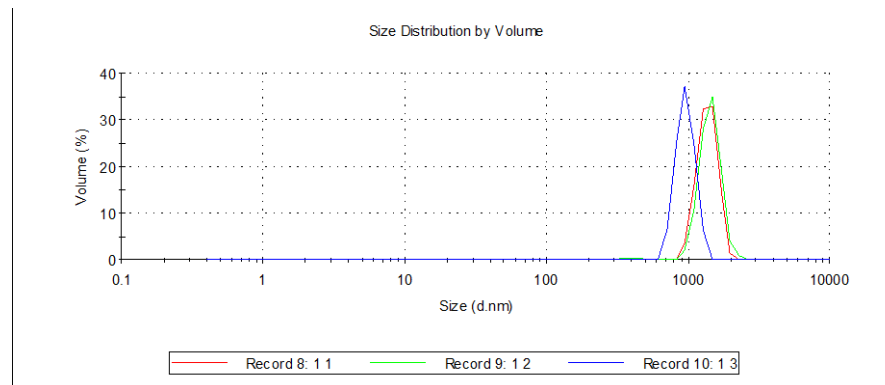
Tab. 3: Přehled vzorků k vlivu tenzidu na agregátní stav disperzí mikročastic

Vzorek	Související obrázky	Typ mikročastic	Koncentrace mikročastic (%)	Použití polysorbátu 20 v koncentraci 0,1%	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
3a	3a-1, 3a-2	AS	0,1	ne	1 1	3696	0,513	1398	0	0	100	0	0
					1 2	4303	0,503	1571	388,7	0	94,1	5,9	0
					1 3	4537	0,686	935,3	0	0	100	0	0
3b	3b-1, 3b-2	AS	0,1	ano	2 1	2158	0,337	1686	5235	0	88,2	11,8	0
					2 2	2225	0,39	1441	5393	0	90,6	9,4	0
					2 3	2247	0,454	1374	5560	0	94,7	5,3	0
3c	3c-1, 3c-2	RS	0,1	ne	3 1	4149	0,251	4262	0	0	100	0	0
					3 2	4686	0,462	4464	0	0	100	0	0
					3 3	4893	0,041	4744	0	0	100	0	0
3d	3d-1, 3d-2	RS	0,1	ano	4 1	2490	0,009	2790	0	0	100	0	0
					4 2	4344	1	4000	0	0	100	0	0
					4 3	3532	0,322	3524	0	0	100	0	0

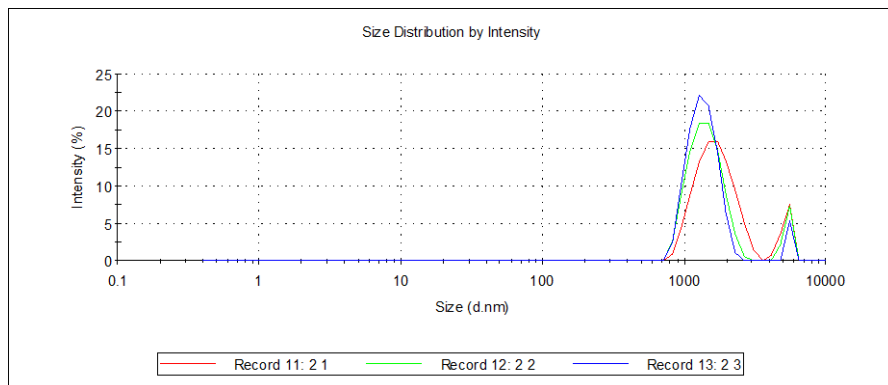
Obr. 3a-1



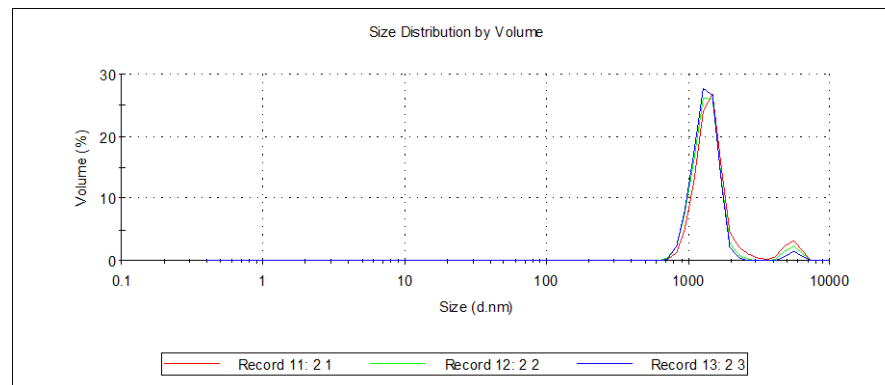
Obr. 3a-2



Obr. 3b-1



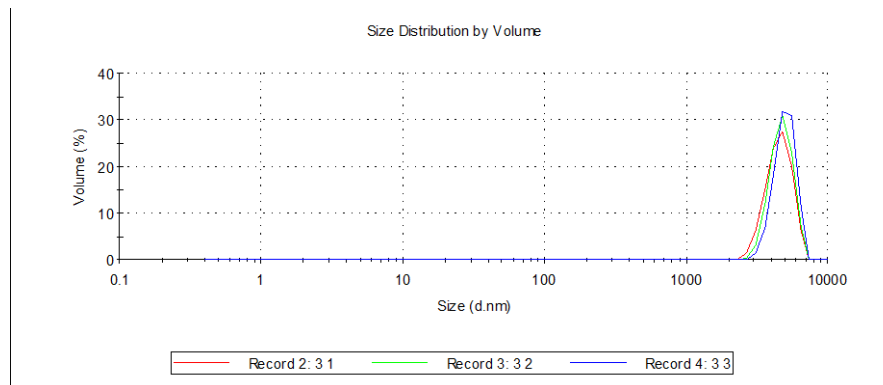
Obr. 3b-2



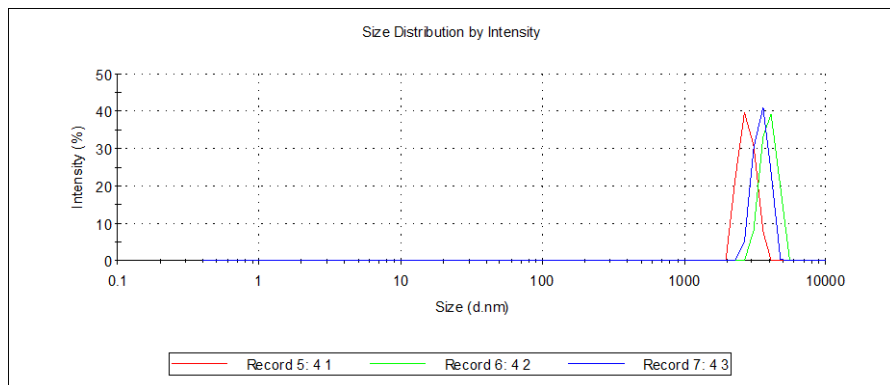
Obr. 3c-1



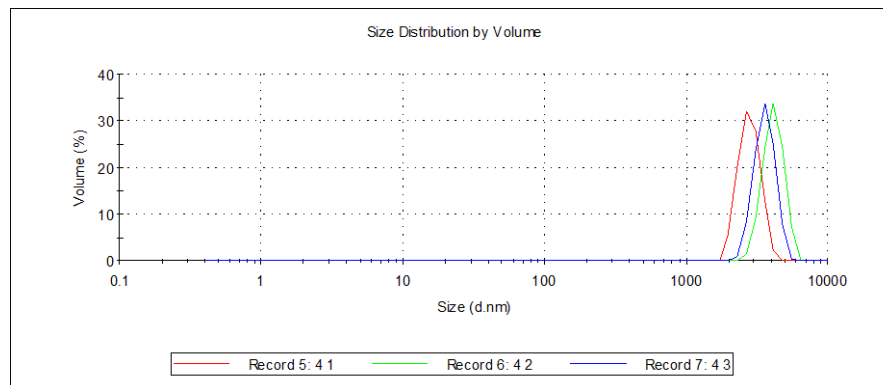
Obr. 3c-2



Obr. 3d-1



Obr. 3d-2



4.4 Vliv přečištění a povrchové úpravy mikročastic na jejich velikost

Tab. 4: Přehled vzorků k vlivu přečištění a povrchové úpravy mikročastic na jejich velikost

Vzorek	Související obrázky	Koncentrace mikročastic AS (%)	Typ přečištění	Použití aceroly v koncentraci 0,5%	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
4a	4a-1, 4a-2	0,5	0,25% NaOH	ne	73 1	2036	0,259	1764	5394	0	96	4	0
					73 2	2060	0,256	1740	5359	0	94,1	5,9	0
					73 3	2014	0,195	2253	0	0	100	0	0
4b	4b-1, 4b-2	1	0,25% NaOH	ne	74 1	1766	0,23	2189	0	0	100	0	0
					74 2	1823	0,258	1779	4997	0	92	8	0
					74 3	1824	0,23	2323	0	0	100	0	0
4c	4c-1, 4c-2	2	0,25% NaOH	ne	75 1	1506	0,238	1376	5519	0	98,5	1,5	0
					75 2	1577	0,223	2081	0	0	100	0	0
					75 3	1558	0,154	1860	0	0	100	0	0
4d	4d-1, 4d-2	0,5	0,35% NaOH	ne	76 1	1633	1	1389	0	0	100	0	0
					76 2	1701	0,739	1566	0	0	100	0	0
					76 3	1764	0,089	1881	0	0	100	0	0
4e	4e-1, 4e-2	1	0,35% NaOH	ne	77 1	2144	0,324	2161	4882	594,1	78,9	14,6	6,4
					77 2	2209	0,314	1707	5368	0	92,2	7,8	0
					77 3	2423	0,399	1683	5411	0	91,5	8,5	0
4f	4f-1, 4f-2	2	0,35% NaOH	ne	78 1	2058	0,295	1664	5491	0	96,9	3,1	0
					78 2	1861	0,28	1488	5134	0	87,3	12,7	0
					78 3	1808	0,27	1674	5532	0	98,4	1,6	0

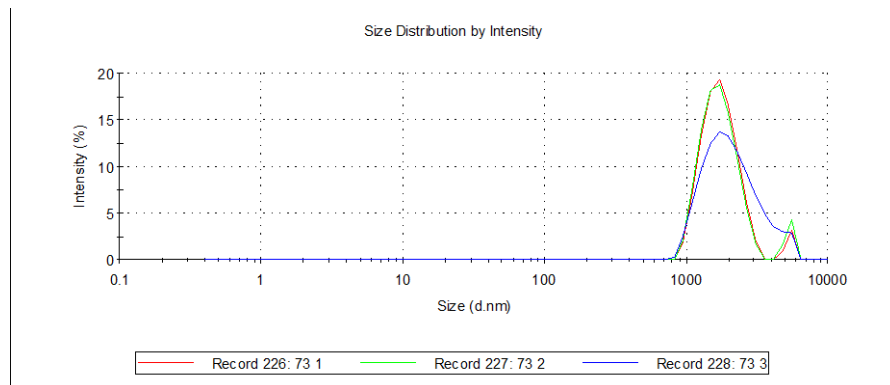
Tab. 4 (pokračování z předchozí strany): Přehled vzorků k vlivu přechištění a povrchové úpravy mikročastic na jejich velikost

Vzorek	Související obrázky	Koncentrace mikročastic AS (%)	Typ přechištění	Použití aceroly v koncentraci 0,5%	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
4g	4g-1, 4g-2	0,5	0,45% NaOH	ne	85 1	2002	1	1632	0	0	100	0	0
					85 2	2041	0,923	1846	0	0	100	0	0
					85 3	2200	0,117	2458	0	0	100	0	0
4h	4h-1, 4h-2	1	0,45% NaOH	ne	86 1	2863	0,375	1813	5366	0	85,8	14,2	0
					86 2	2668	0,286	3006	0	0	100	0	0
					86 3	2805	0,369	1711	5380	0	87,4	12,6	0
4i	4i-1, 4i-2	2	0,45% NaOH	ne	87 1	2320	0,294	2083	4574	0	73,3	26,7	0
					87 2	2449	0,47	4600	1102	0	55,4	44,6	0
					87 3	2446	0,418	4210	1130	0	64,4	35,6	0
4j	4j-1, 4j-2	0,5	0,25% NaOH	ano	79 1	1517	0,461	1421	131,9	5404	87,2	7,2	5,6
					79 2	1378	0,565	1511	4640	130,8	74,7	18,3	7
					79 3	1365	0,569	2481	156,7	0	94,2	5,8	0
4k	4k-1, 4k-2	1	0,25% NaOH	ano	80 1	1988	0,293	2653	0	0	100	0	0
					80 2	2039	0,341	2128	4889	0	84,4	15,6	0
					80 3	2201	0,326	1663	5414	0	94,2	5,8	0
4l	4l-1, 4l-2	2	0,25% NaOH	ano	81 1	2663	0,312	1938	4352	0	59,5	40,5	0
					81 2	2623	0,316	1925	5560	0	96,6	3,4	0
					81 3	2575	0,17	3068	0	0	100	0	0
4m	4m-1, 4m-2	0,5	0,35% NaOH	ano	82 1	1365	0,378	1636	145,6	5394	89,7	7,7	2,6
					82 2	1414	0,551	2531	364	0	90,9	9,1	0
					82 3	1432	0,446	2135	161,5	0	92,6	7,4	0
4n	4n-1, 4n-2	1	0,35% NaOH	ano	83 1	2048	0,331	1766	5276	0	91,6	8,4	0
					83 2	2135	0,479	1379	5381	0	87,7	12,3	0
					83 3	2108	0,361	1839	4699	0	77,2	22,8	0
4o	4o-1, 4o-2	2	0,35% NaOH	ano	84 1	2759	0,316	2047	4777	0	74,5	25,5	0
					84 2	2922	0,403	1634	5519	0	92,5	7,5	0
					84 3	3368	0,47	1422	5098	0	54,9	45,1	0

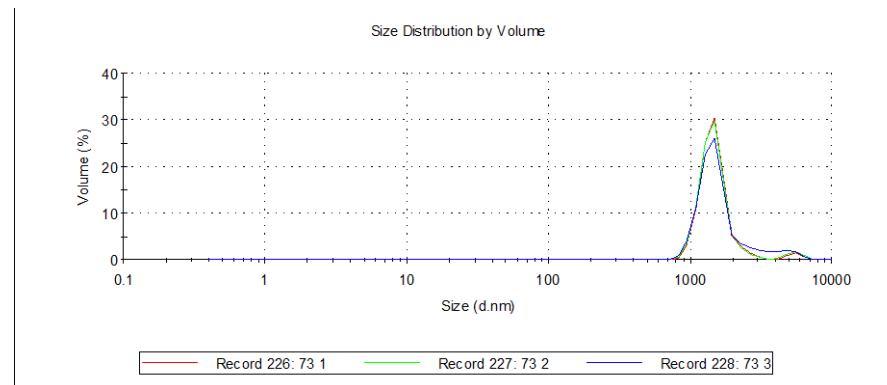
Tab. 4 (pokračování z předchozí strany): Přehled vzorků k vlivu přečištění a povrchové úpravy mikročástic na jejich velikost

Vzorek	Související obrázky	Koncentrace mikročástic AS (%)	Typ přečištění	Použití aceroly v koncentraci 0,5%	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
4p	4p-1, 4p-2	0,5	0,45% NaOH	ano	88 1	642,8	1	2444	191,9	0	76,2	23,8	0
					88 2	828,3	0,756	1225	4567	132,1	60,5	23,9	15,6
					88 3	834,2	0,888	1587	197,7	5231	63,3	26,7	10
4q	4q-1, 4q-2	1	0,45% NaOH	ano	89 1	1499	0,469	1561	4905	184,7	79,8	14,5	5,7
					89 2	1560	0,342	2233	175,6	0	94	6	0
					89 3	1430	0,434	2305	301,5	0	91,9	8,1	0
4r	4r-1, 4r-2	2	0,45% NaOH	ano	90 1	2841	0,327	3397	761,3	0	89,7	10,3	0
					90 2	2595	0,31	1986	4737	0	72,8	27,2	0
					90 3	2360	0,285	2051	4558	0	71,5	28,5	0

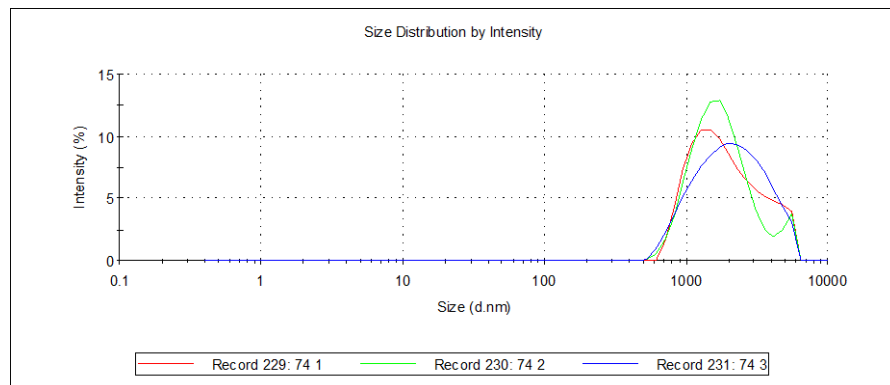
Obr. 4a-1



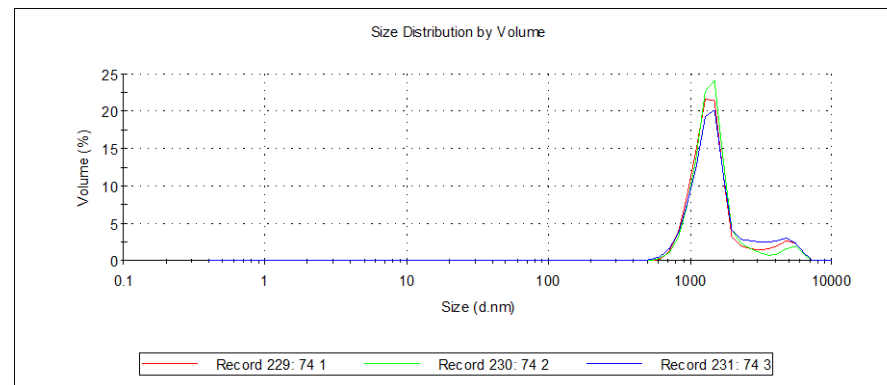
Obr. 4a-2



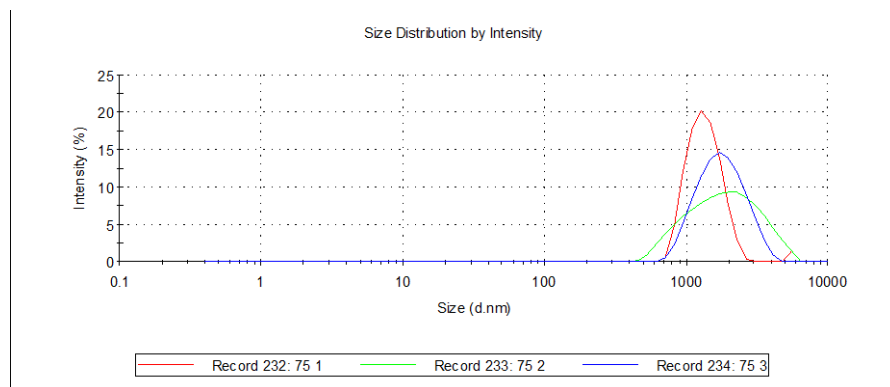
Obr. 4b-1



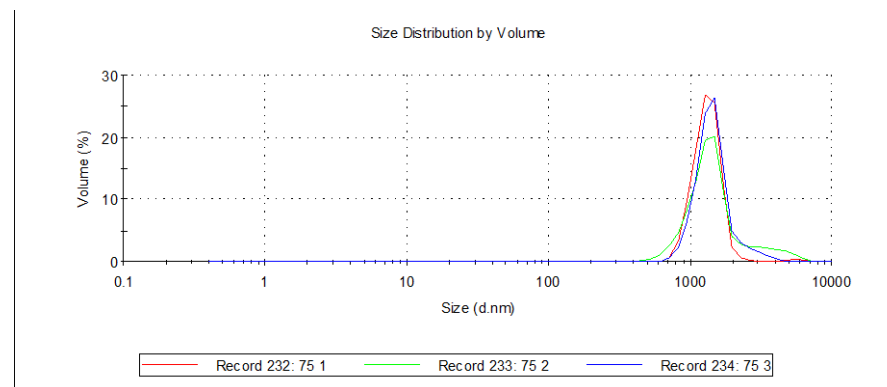
Obr. 4b-2



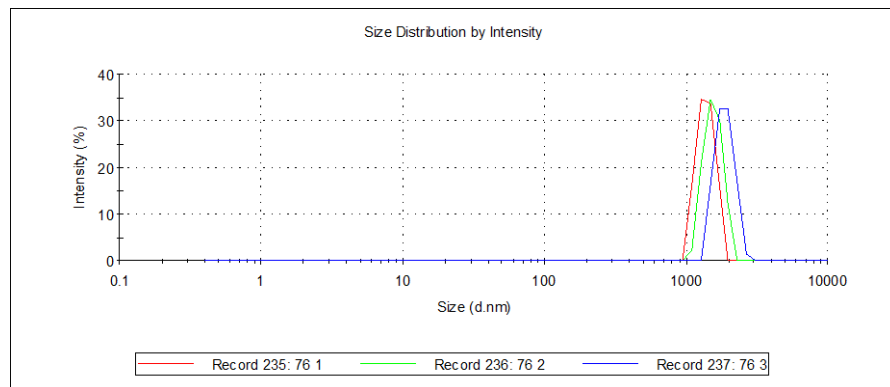
Obr. 4c-1



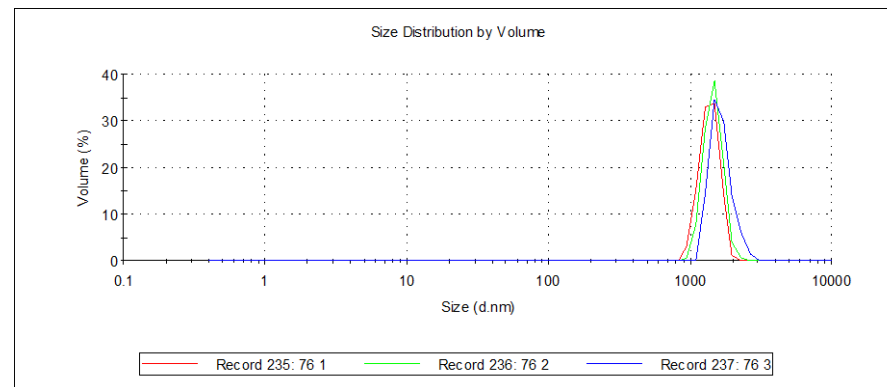
Obr. 4c-2



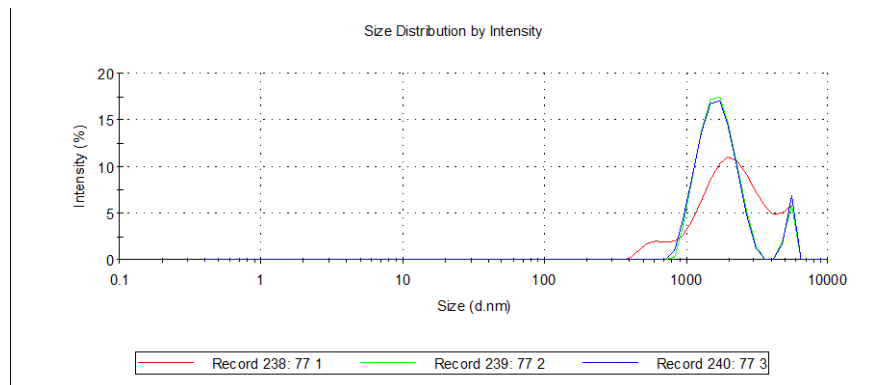
Obr. 4d-1



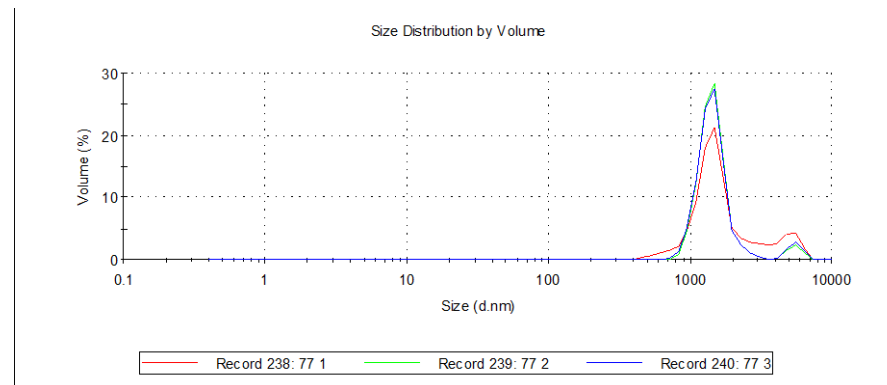
Obr. 4d-2



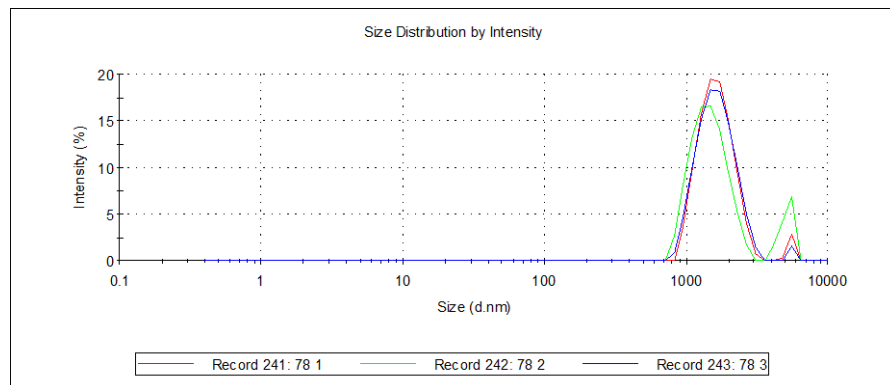
Obr. 4e-1



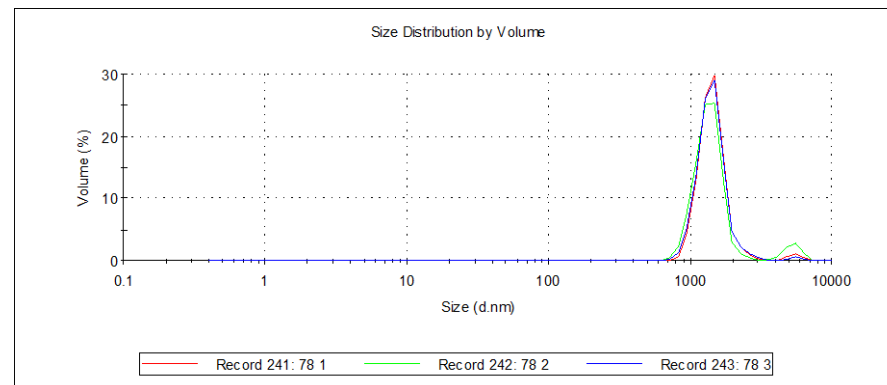
Obr. 4e-2



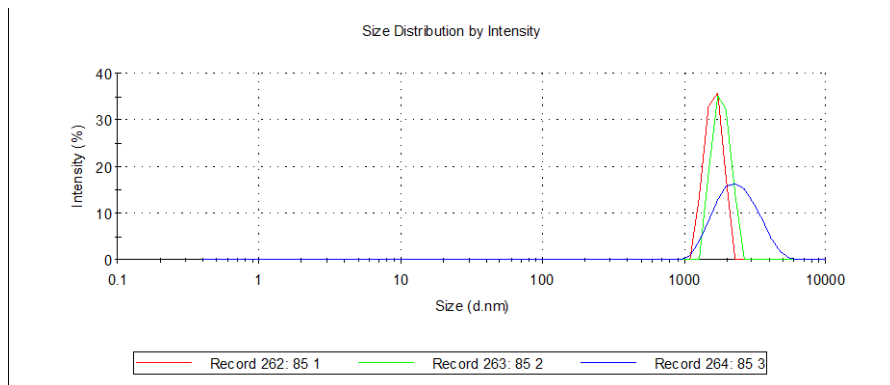
Obr. 4f-1



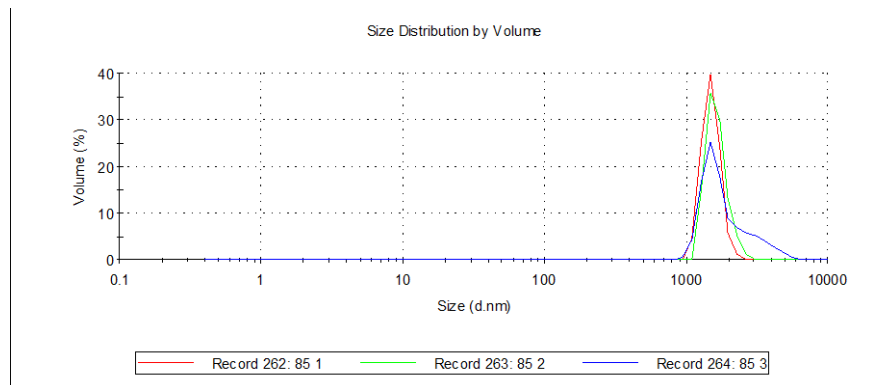
Obr. 4f-2



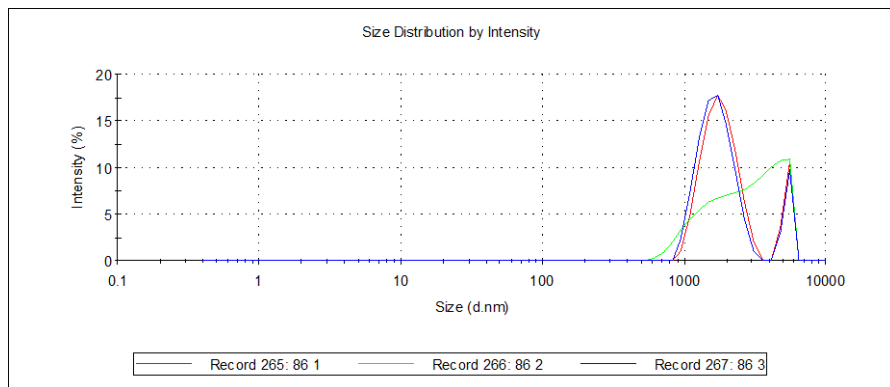
Obr. 4g-1



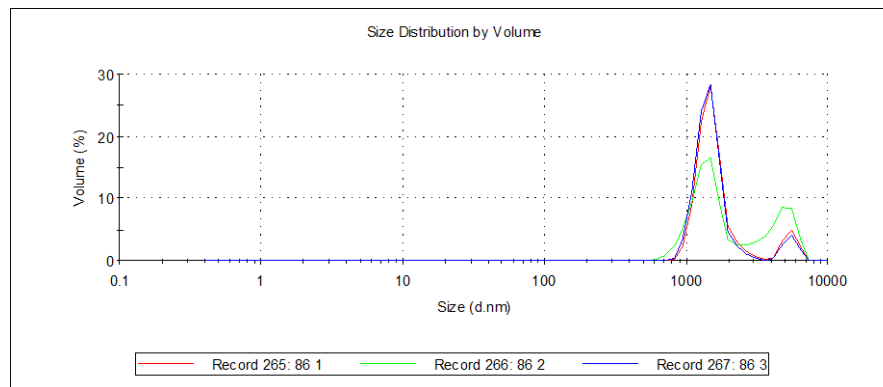
Obr. 4g-2



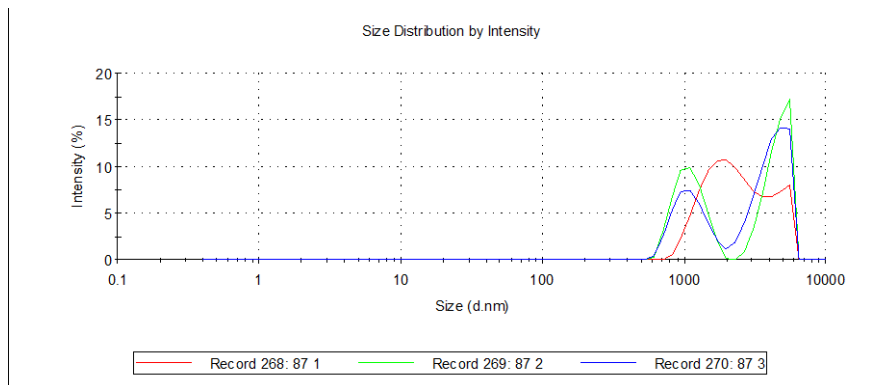
Obr. 4h-1



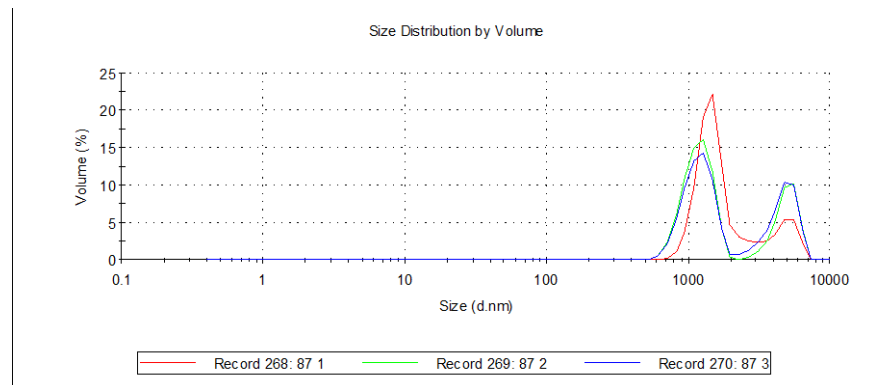
Obr. 4h-2



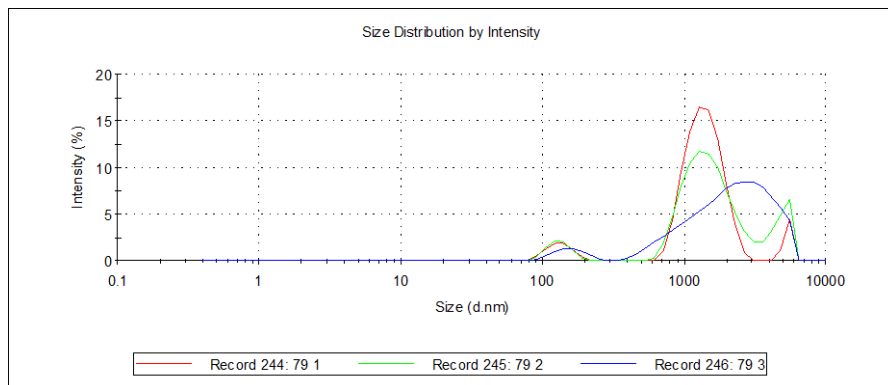
Obr. 4i-1



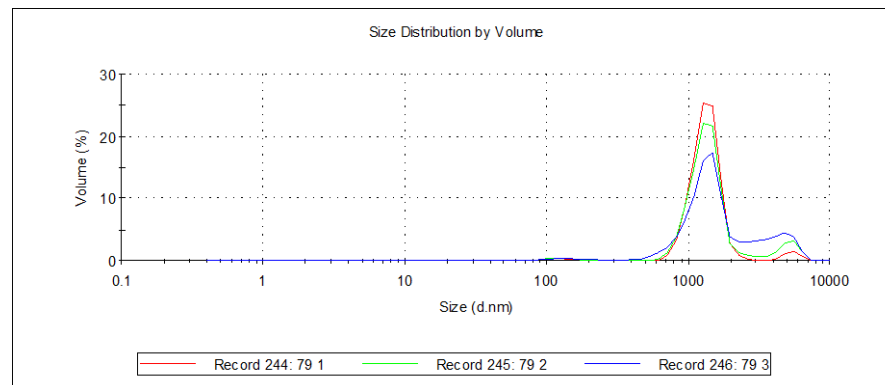
Obr. 4i-2



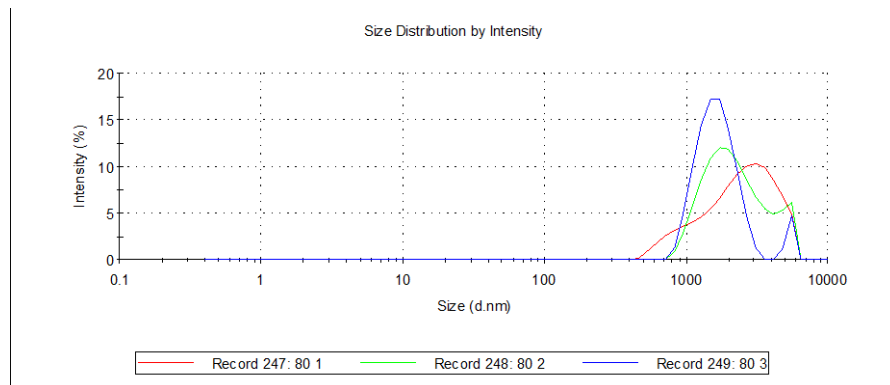
Obr. 4j-1



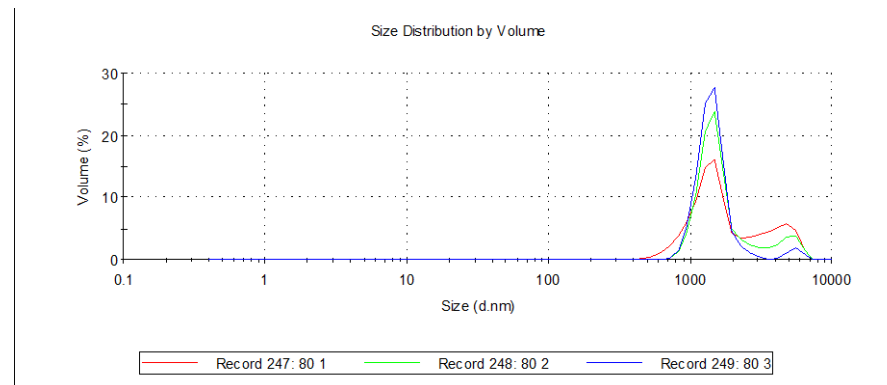
Obr. 4j-2



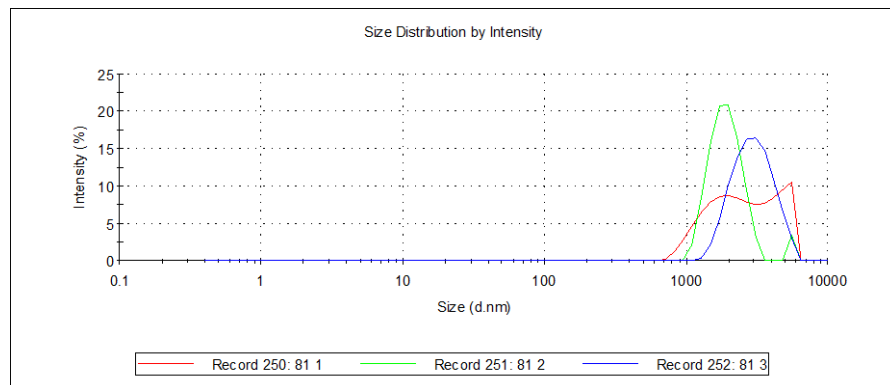
Obr. 4k-1



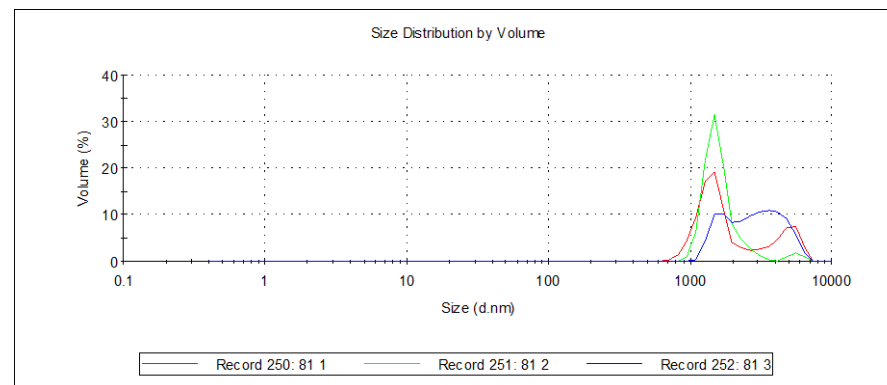
Obr. 4k-2



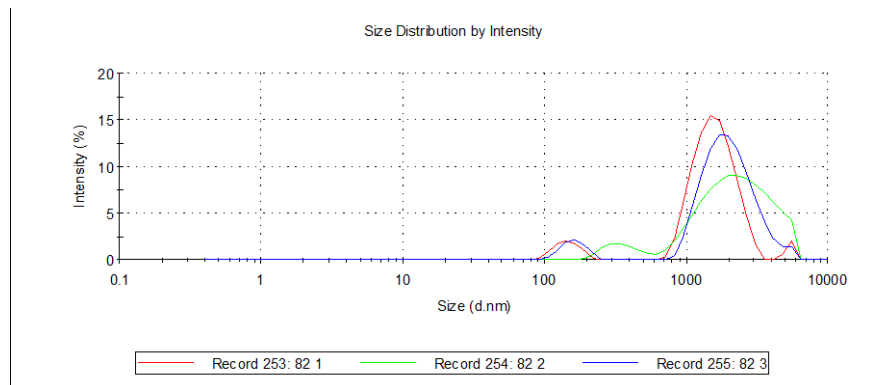
Obr. 4l-1



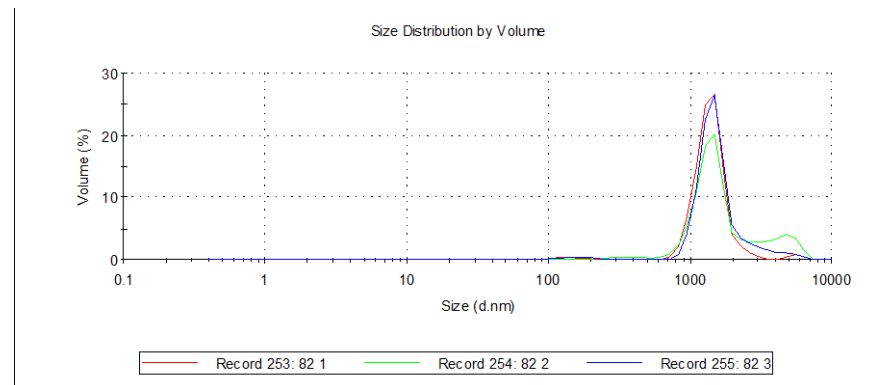
Obr. 4l-2



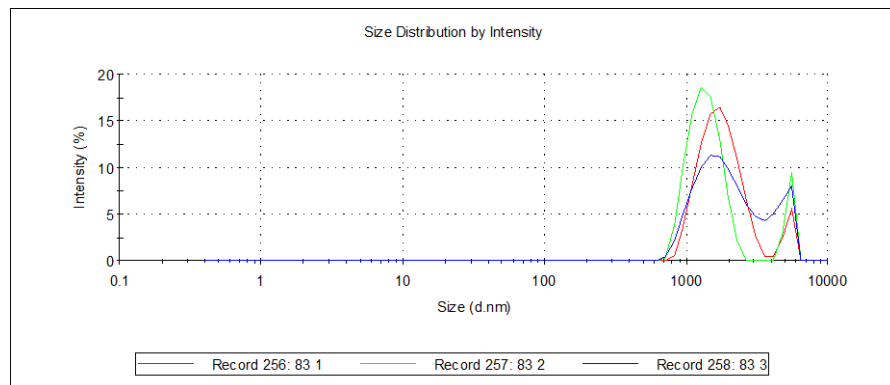
Obr. 4m-1



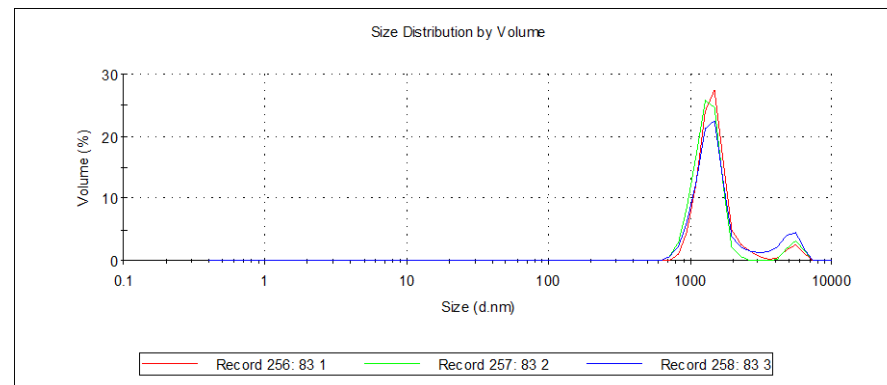
Obr. 4m-2



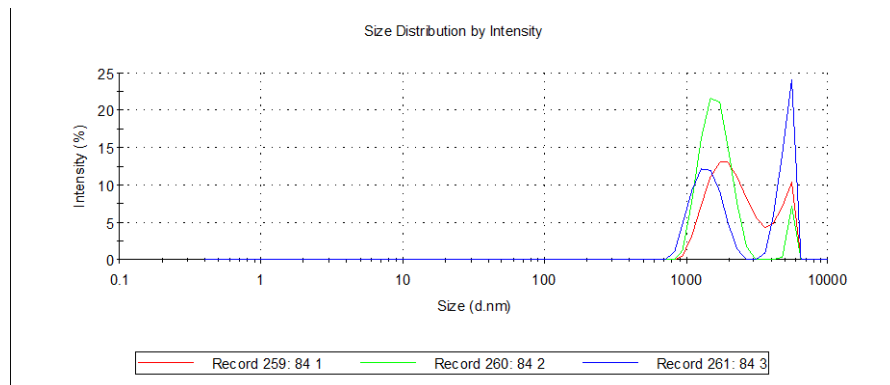
Obr. 4n-1



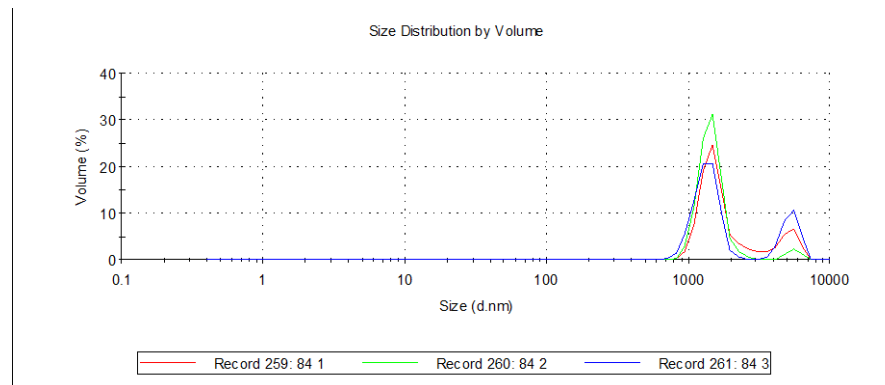
Obr. 4n-2



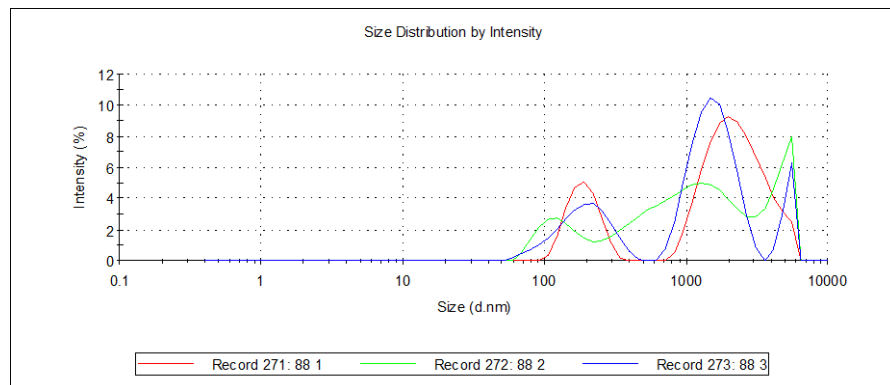
Obr. 4o-1



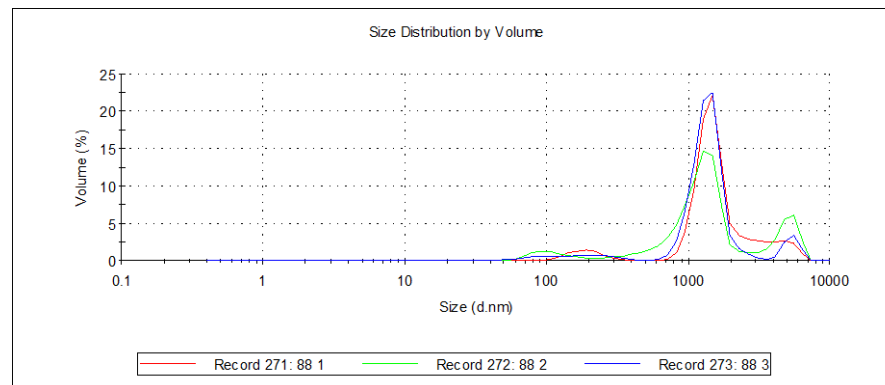
Obr. 4o-2



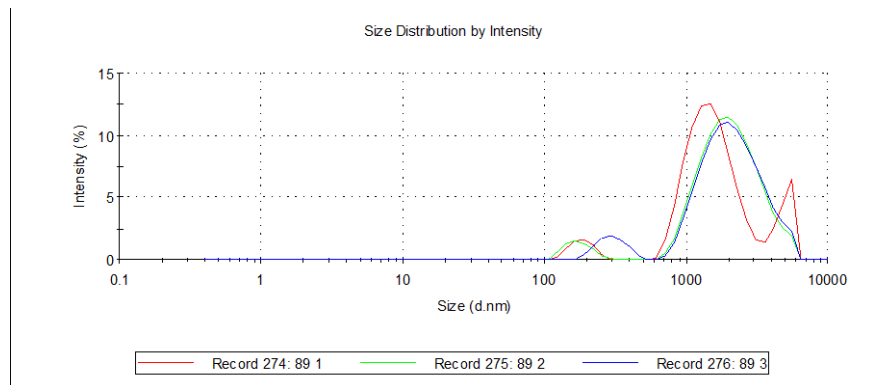
Obr. 4p-1



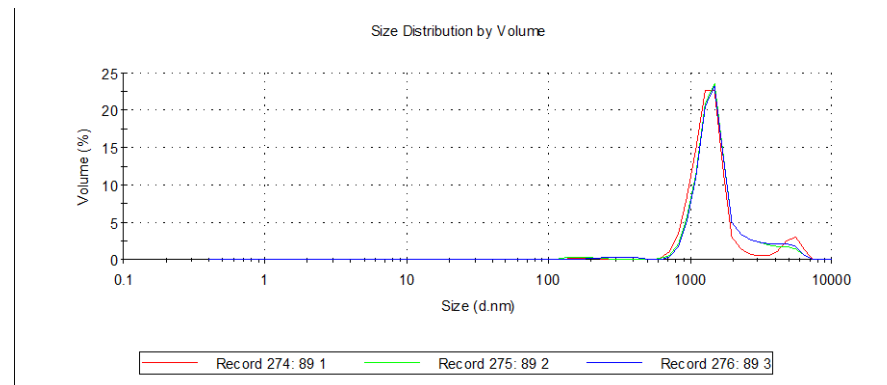
Obr. 4p-2



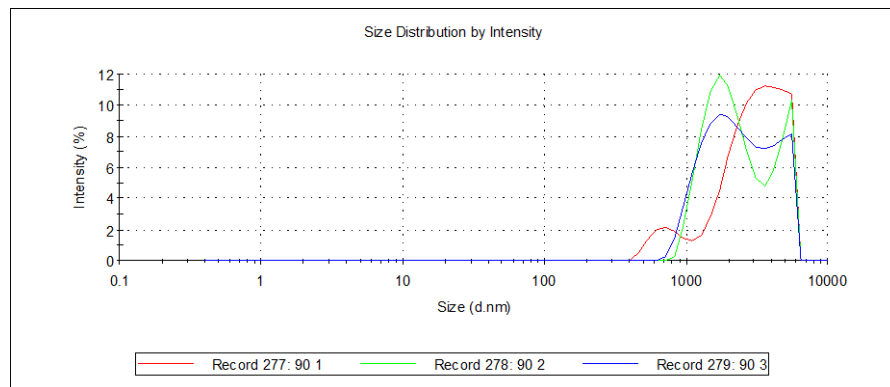
Obr. 4q-1



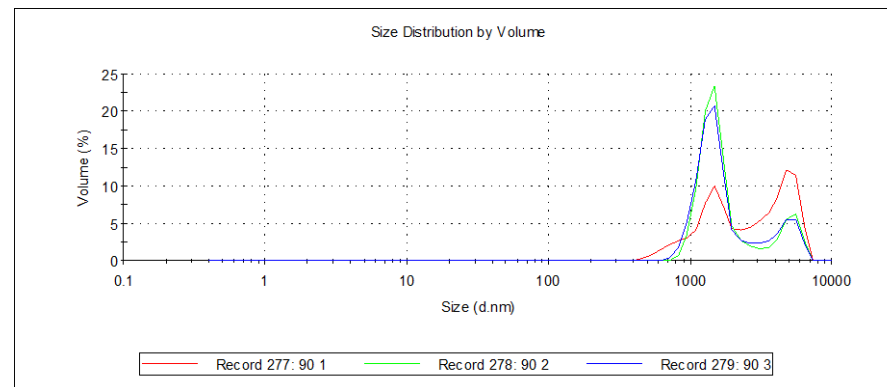
Obr. 4q-2



Obr. 4r-1



Obr. 4r-2



4.5 Vliv tepelného zpracování a změny koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem

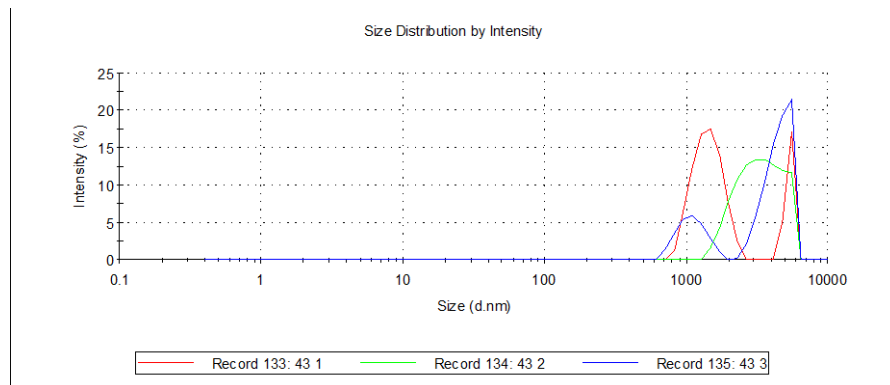
Tab. 5: Přehled vzorků k vlivu tepelného zpracování a změny koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem

Vzorek	Související obrázky	Koncentrace mikročástic AS (%)	Použitá teplota (°C)	Ředění použité k měření velikosti částic	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
5a	5a-1, 5a-2	1	60	1x	43 1	3274	0,494	1447	5390	0	78	22	0
					43 2	3489	0,23	3477	0	0	100	0	0
					43 3	3340	0,424	4507	1115	0	74,9	25,1	0
5b	5b-1, 5b-2	0,5	60	1x	44 1	3105	0,369	1750	5283	0	78,9	21,1	0
					44 2	3370	0,485	4989	1291	0	52,8	47,2	0
					44 3	3547	0,547	1175	5264	0	56,5	43,5	0
5c	5c-1, 5c-2	1	60	10x	45 1	3517	0,493	1605	5560	0	97,9	2,1	0
					45 2	3222	0,412	1657	5560	0	96,4	3,6	0
					45 3	3491	0,407	1886	5560	0	93,9	6,1	0
5d	5d-1, 5d-2	0,5	60	10x	46 1	4261	1	3678	0	0	100	0	0
					46 2	3797	0,163	3845	0	0	100	0	0
					46 3	4067	0,173	4336	0	0	100	0	0

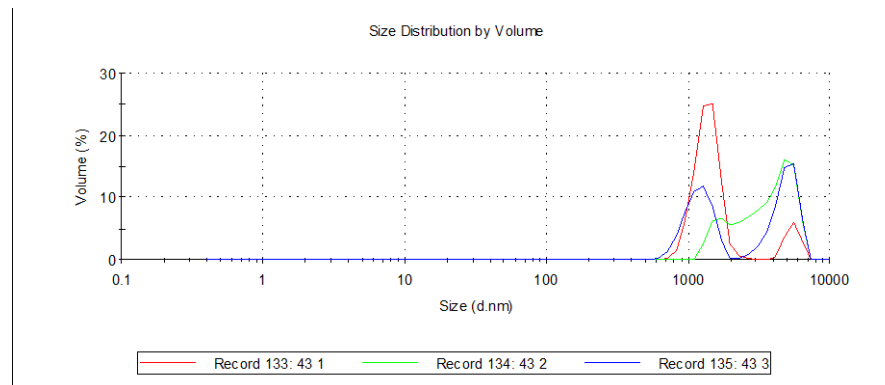
Tab. 5 (pokračování z předchozí strany): Přehled vzorků k vlivu tepelného zpracování a změny koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem

Vzorek	Související obrázky	Koncentrace mikročástic AS (%)	Použitá teplota (°C)	Ředění použité k měření velikosti částic	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
5e	5e-1, 5e-2	1	70	1x	47 1	3812	1	53,23	0	0	100	0	0
					47 2	4429	1	49,95	0	0	100	0	0
					47 3	3678	1	55,66	0	0	100	0	0
5f	5f-1, 5f-2	0,5	70	1x	48 1	4591	0,118	5106	57,85	0	92,7	7,3	0
					48 2	5369	0,292	5560	77,02	0	63,6	36,4	0
					48 3	4638	0,23	5226	58,11	0	91,2	8,8	0
5g	5g-1, 5g-2	1	70	10x	49 1	1,20E+04	0,572	8,878	0	0	100	0	0
					49 2	1,57E+04	1	0	0	0	0	0	0
					49 3	1,27E+04	1	6,333	0	0	100	0	0
5h	5h-1, 5h-2	0,5	70	10x	50 1	1,22E+04	0,717	21,32	0	0	100	0	0
					50 2	7059	0,275	33,35	5560	0	80,1	19,9	0
					50 3	7339	0,437	3587	42,69	0	50,7	49,3	0

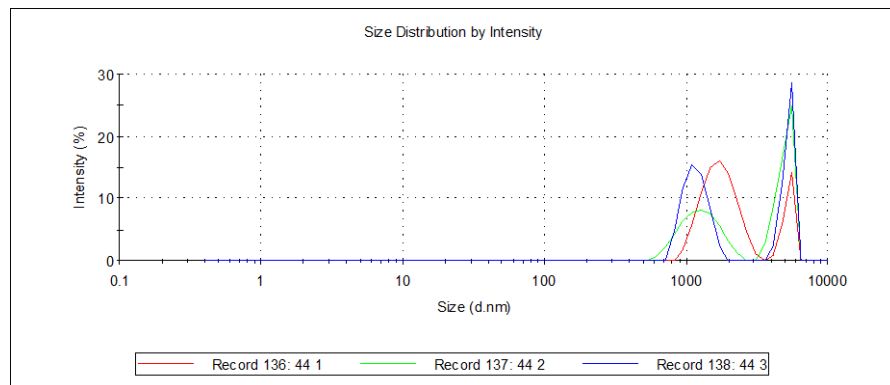
Obr. 5a-1



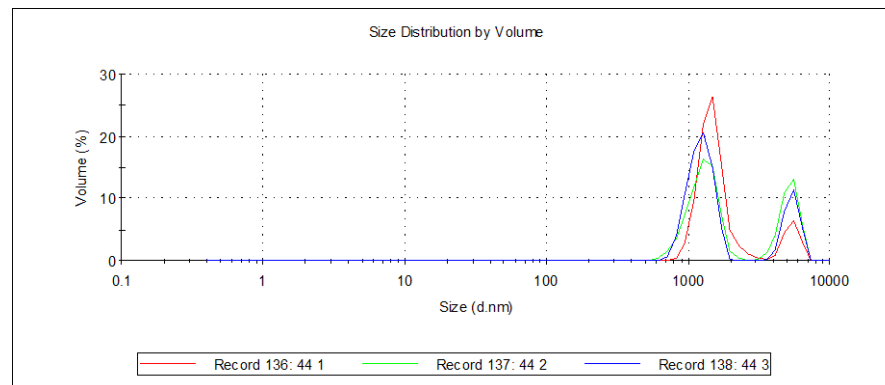
Obr. 5a-2



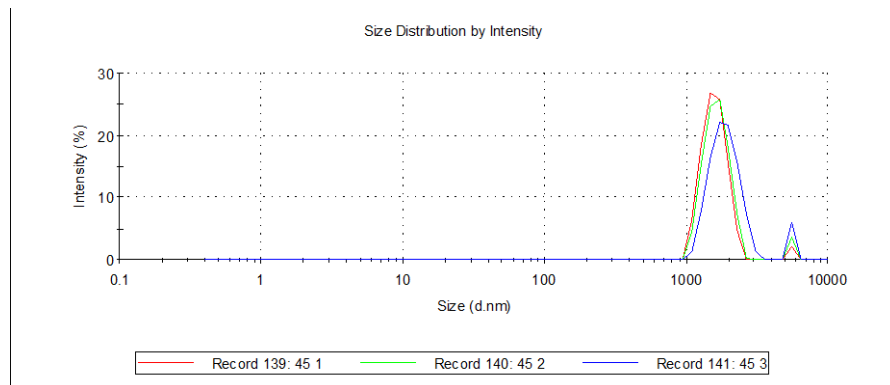
Obr. 5b-1



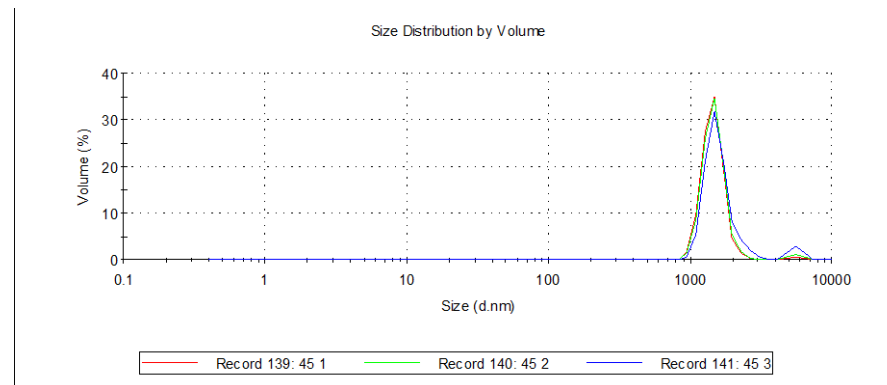
Obr. 5b-2



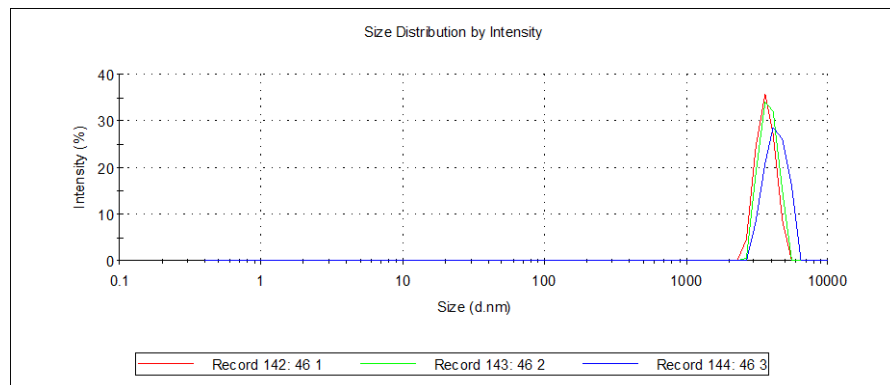
Obr. 5c-1



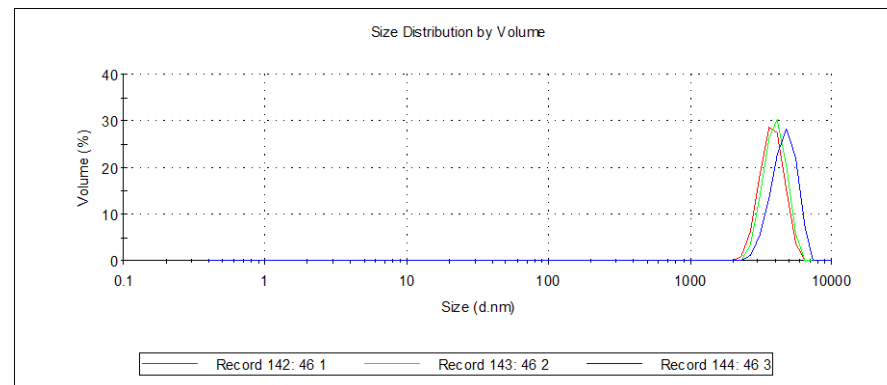
Obr. 5c-2



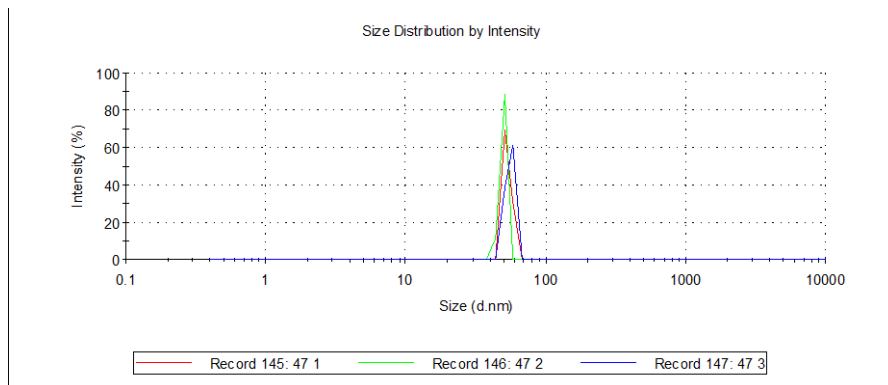
Obr. 5d-1



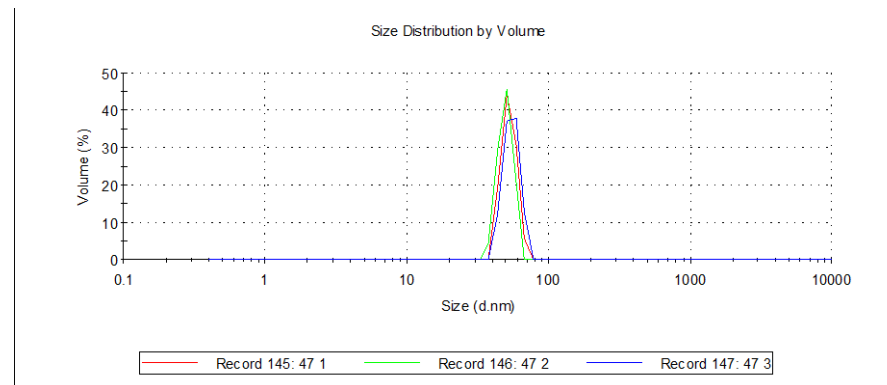
Obr. 5d-2



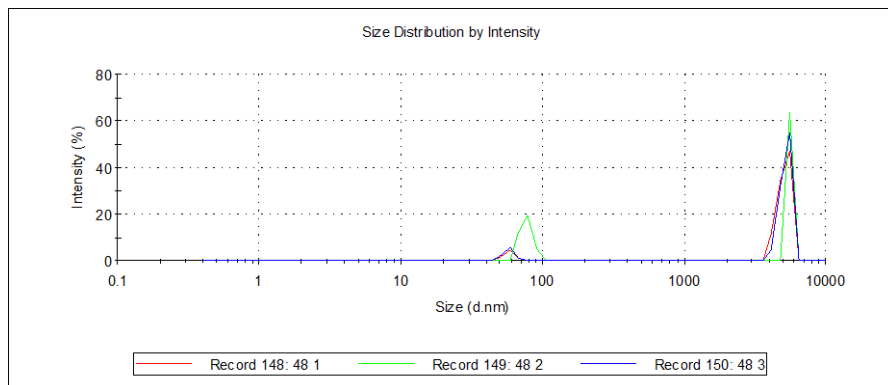
Obr. 5e-1



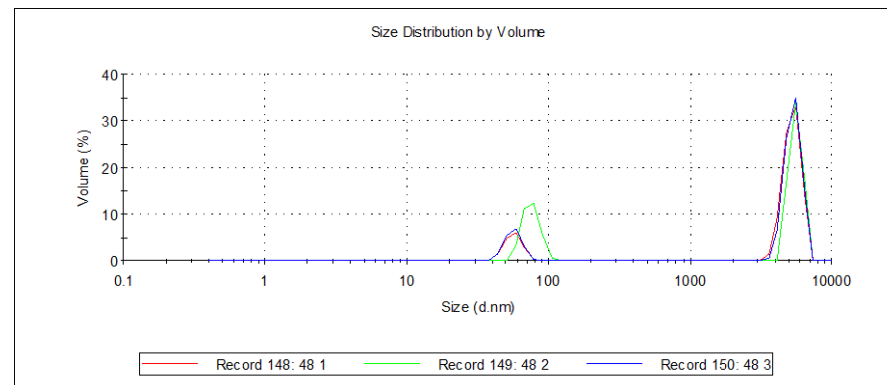
Obr. 5e-2



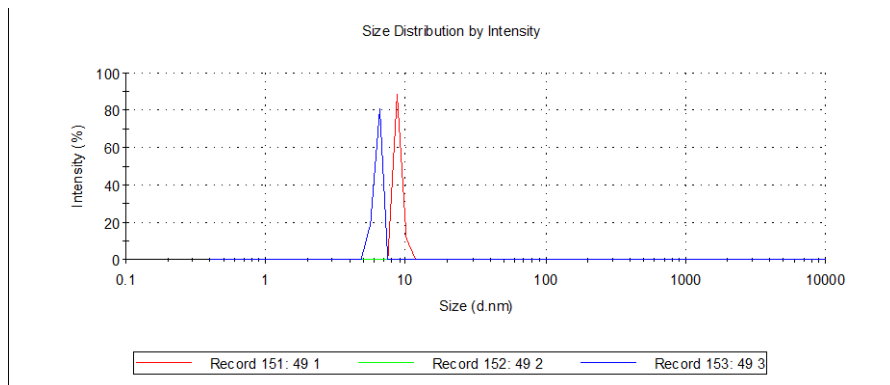
Obr. 5f-1



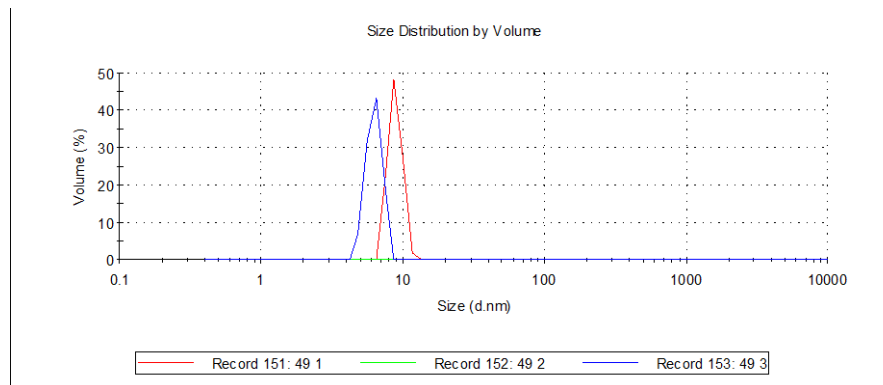
Obr. 5f-2



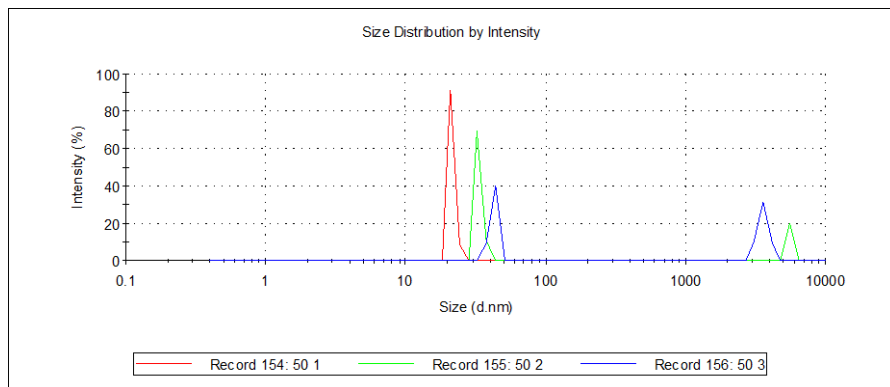
Obr. 5g-1



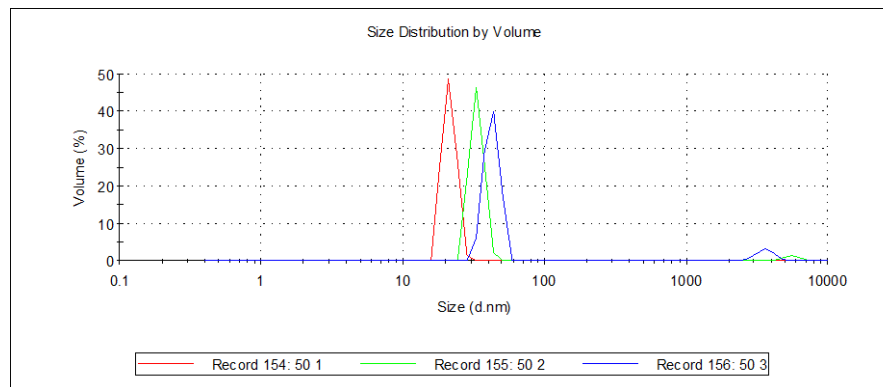
Obr. 5g-2



Obr. 5h-1



Obr. 5h-2

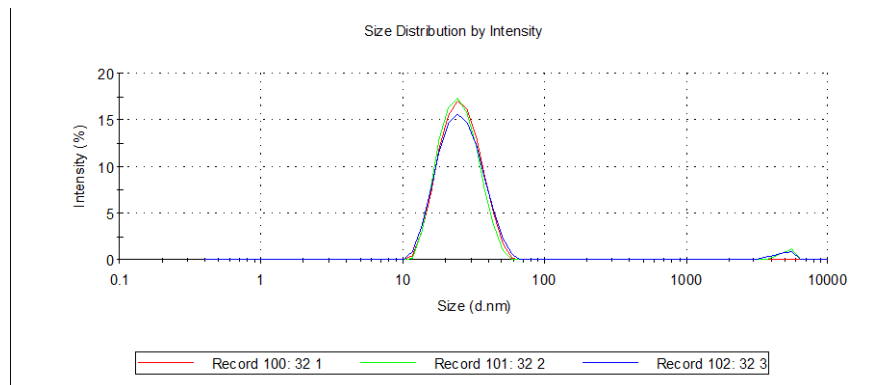


4.6 Vliv koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné

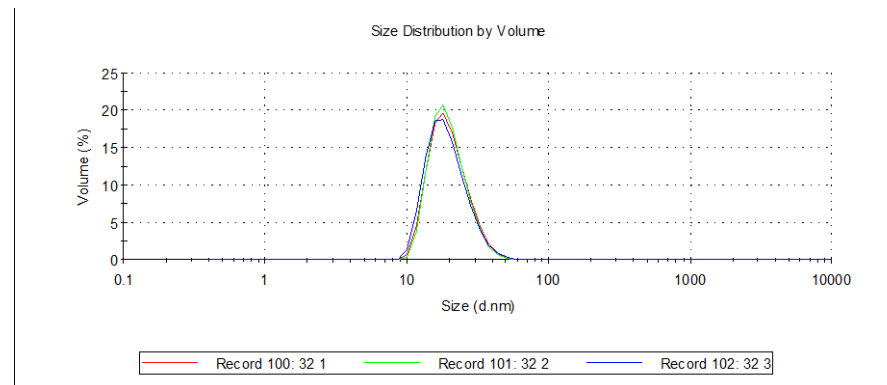
Tab. 6: Přehled vzorků k vlivu koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné

Vzorek	Související obrázky	Ředění koloidních částic stříbra	Ředění koloidních částic stříbra (ppm)	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
6a	6a-1, 6a-2	1x	108	32 1	25,03	0,19	26,54	0	0	100	0	0
				32 2	24,72	0,206	25,67	5118	0	97,9	2,1	0
				32 3	24,67	0,187	26,67	4784	0	97,8	2,2	0
6b	6b-1, 6b-2	10x	10,8	33 1	90,92	0,19	119,8	23,38	0	56,1	43,9	0
				33 2	70,95	0,235	136,3	25,84	0	52,5	47,5	0
				33 3	58,15	0,47	130,4	23,81	0	57,8	42,2	0
6c	6c-1, 6c-2	100x	1,08	34 1	351,1	0,516	50,84	15,69	0	64,3	35,7	0
				34 2	818,6	0,751	29,24	5,898	0	94,8	5,2	0
				34 3	437,3	0,418	50,63	15,56	0	65,9	34,1	0
6d	6d-1, 6d-2	1000x	0,108	35 1	1562	1	58,71	8,743	0	89,5	10,5	0
				35 2	589,2	0,532	125,1	20,34	0	69	31	0
				35 3	355,1	0,403	167,1	24,14	0	68	32	0
6e	6e-1, 6e-2	5000x	0,022	37 1	323,3	0,439	143,9	31,25	0	93	7	0
				37 2	237,8	0,328	161,8	28,83	0	93,8	6,2	0
				37 3	224,4	0,304	183,1	0	0	100	0	0

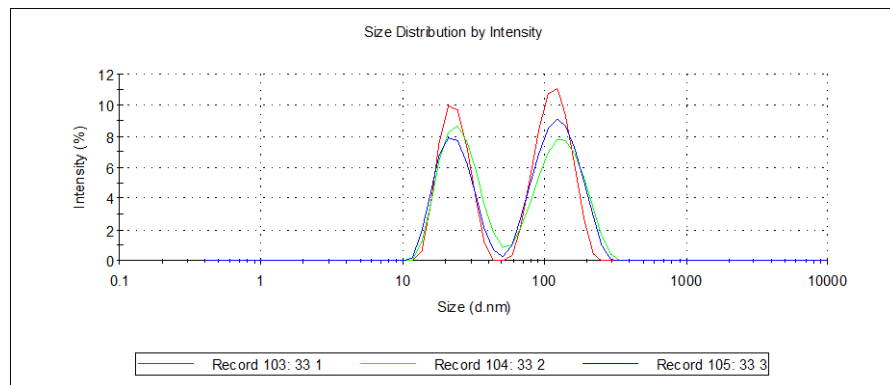
Obr. 6a-1



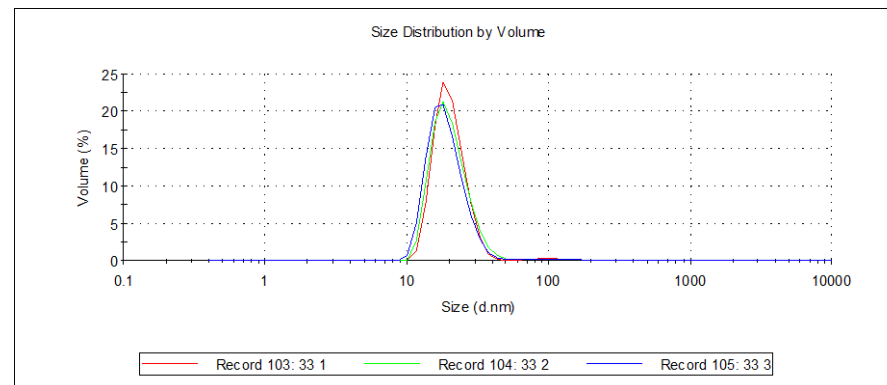
Obr. 6a-2



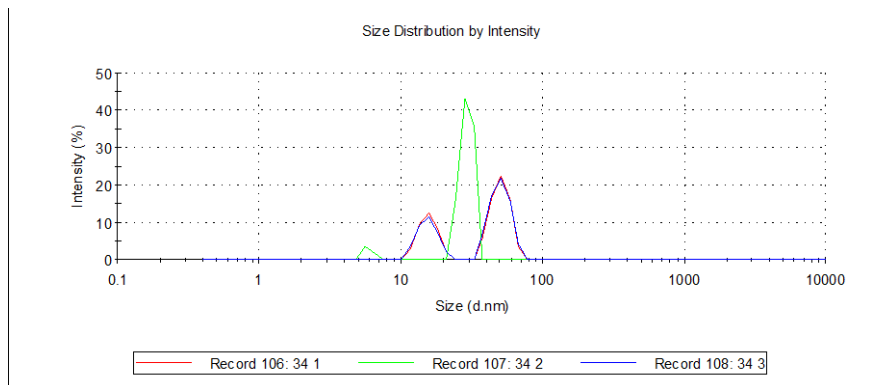
Obr. 6b-1



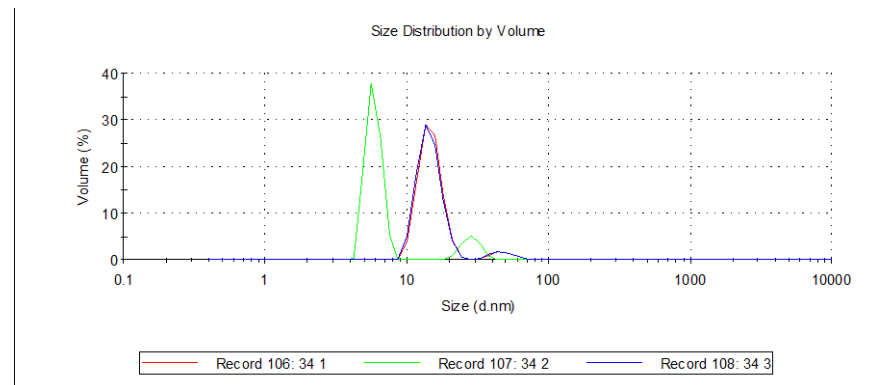
Obr. 6b-2



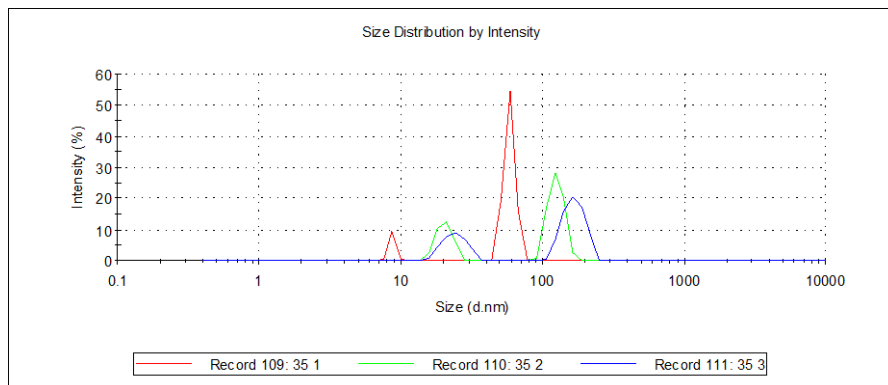
Obr. 6c-1



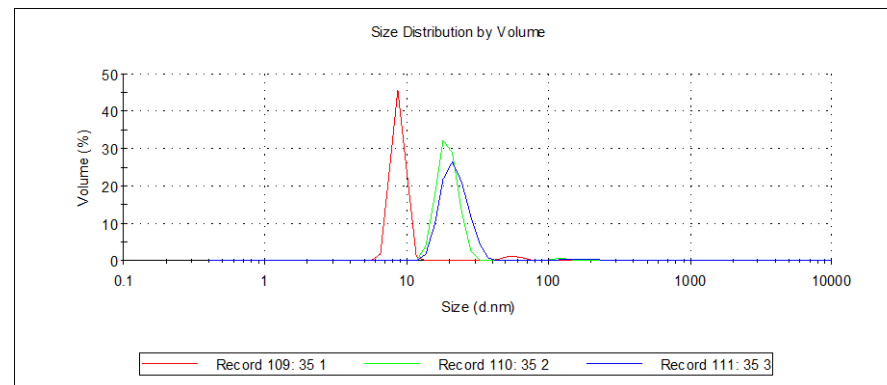
Obr. 6c-2



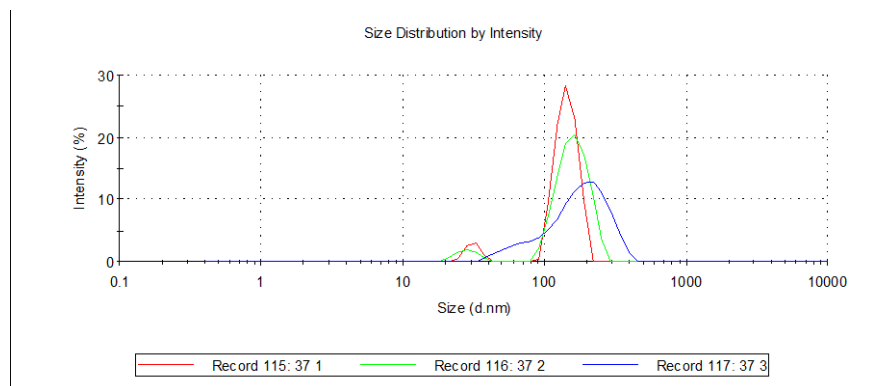
Obr. 6d-1



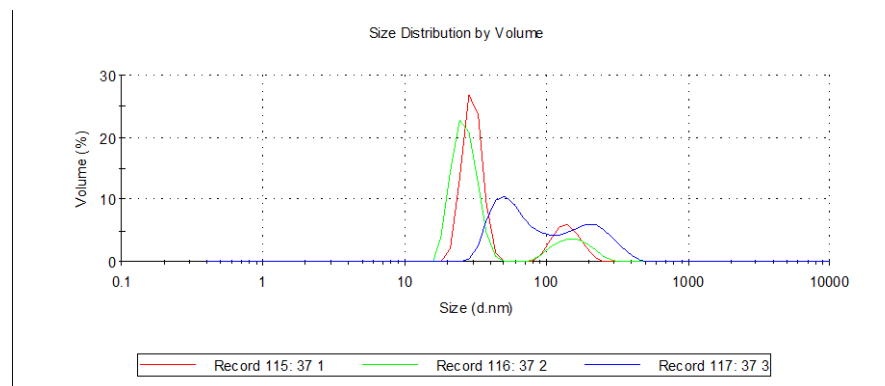
Obr. 6d-2



Obr. 6e-1



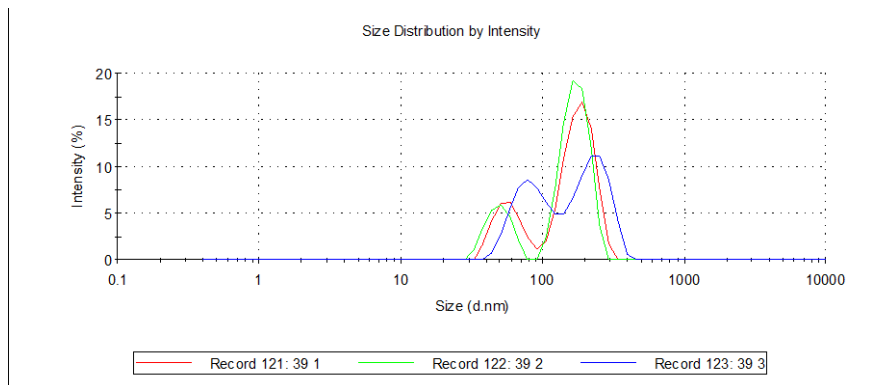
Obr. 6e-2



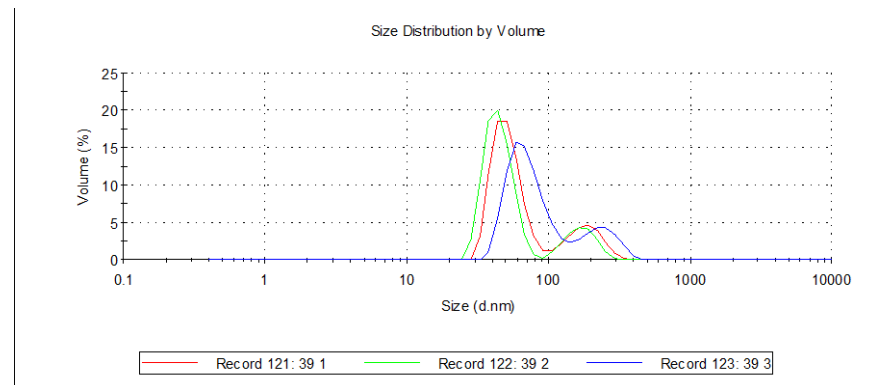
Tab. 7: Přehled vzorků k vlivu koncentrace mikročásteček v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné

Vzorek	Související obrázky	3 díly suspenze mikročásteček AS o koncentraci (%)	1 díl koloidních částic stříbra o ředění	Koncentrace mikročásteček AS ve směsi (%)	Koncentrace mikročásteček AS ve směsi (ppm)	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
7a	7a-1, 7a-2	1	1x	0,75	7500	39 1	474,5	0,884	183,8	58,18	0	74,4	25,6	0
						39 2	507,2	0,943	172,9	49,61	0	77,8	22,2	0
						39 3	458	0,852	222,3	83,03	0	58	42	0
7b	7b-1, 7b-2	0,1	1x	0,075	750	40 1	5732	0,512	34,95	0	0	100	0	0
						40 2	2559	1	34,43	0	0	100	0	0
						40 3	2250	1	32,78	0	0	100	0	0
7c	7c-1, 7c-2	0,01	1x	0,0075	75	41 1	240,9	0,37	23,92	156,9	0	80,5	19,5	0
						41 2	328,7	0,39	21,83	86,56	0	75,7	24,3	0
						41 3	130	0,263	25,09	156,2	405,8	76,2	18	4,5
7d	7d-1, 7d-2	0,001	1x	0,00075	7,5	42 1	57,64	0,125	24,37	117,3	0	97,5	2,5	0
						42 2	27,55	0,302	26,24	302,9	5423	95,5	3	1,4
						42 3	26,8	0,27	27,17	4739	531,8	92,6	4	3,4

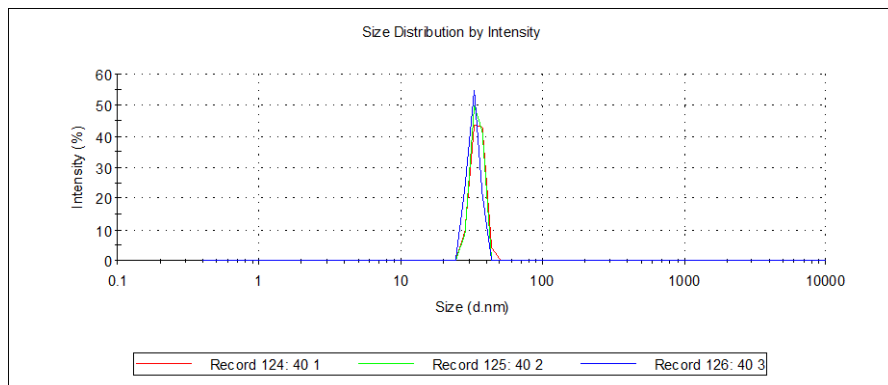
Obr. 7a-1



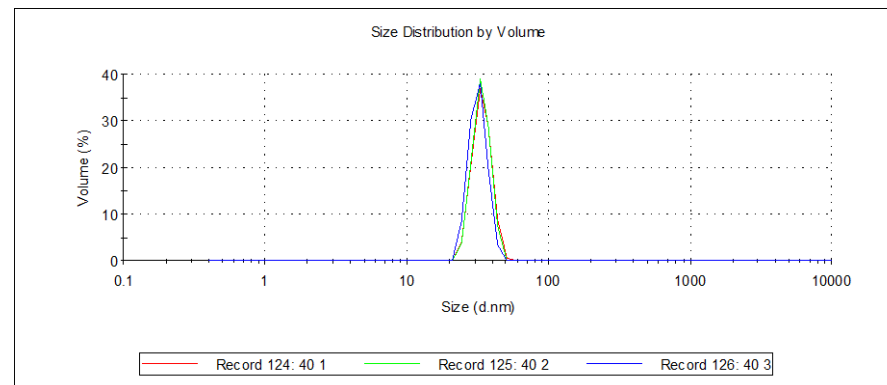
Obr. 7a-2



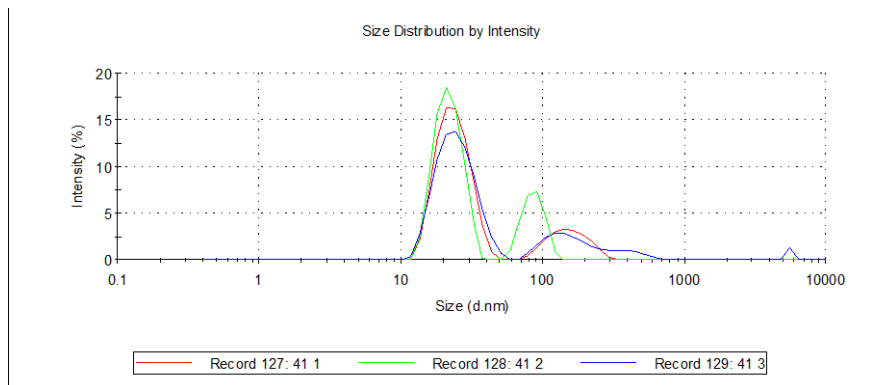
Obr. 7b-1



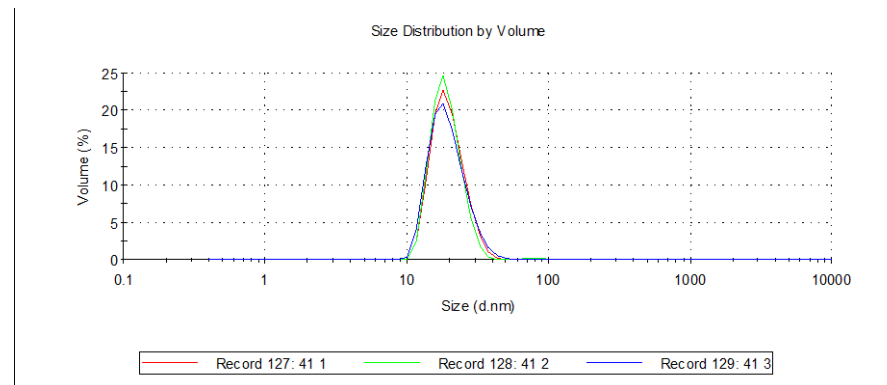
Obr. 7b-2



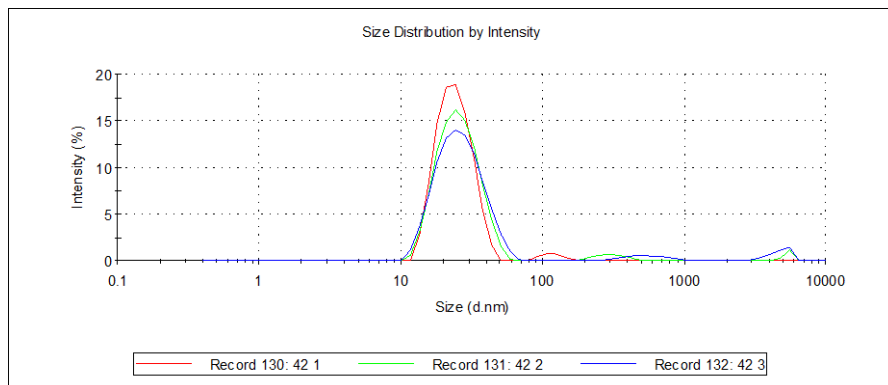
Obr. 7c-1



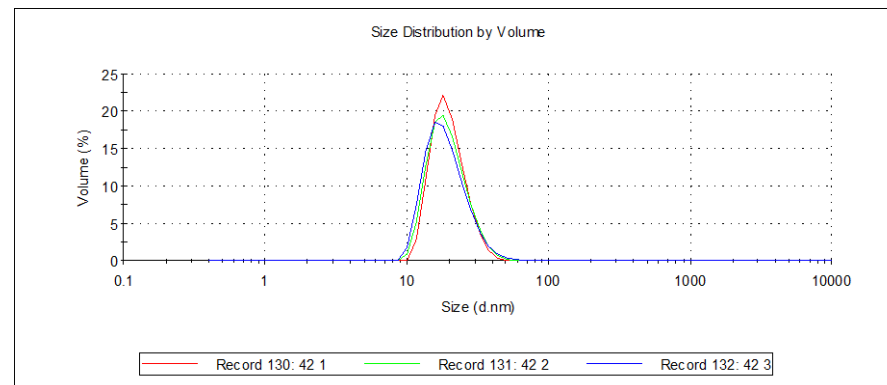
Obr. 7c-2



Obr. 7d-1



Obr. 7d-2



4.7 Testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročastic

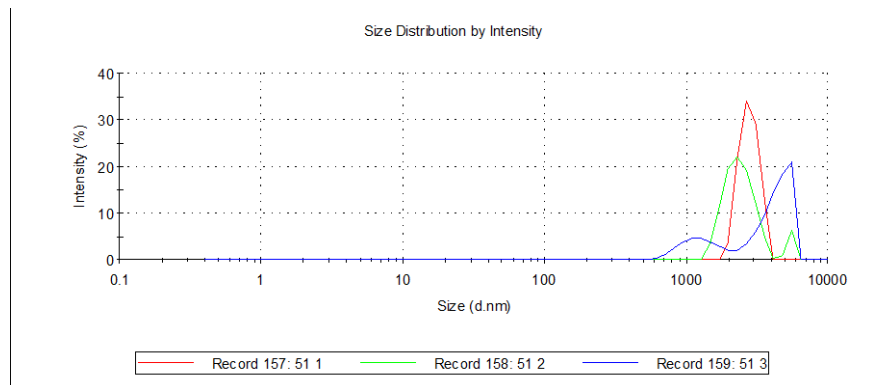
Tab. 8: Přehled vzorků k testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročastic

Vzorek	Související obrázky	Typ použitých mikročastic	Zředění mikročastic	Použití aceroly v koncentraci 0,5%	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
8a	8a-1, 8a-2	1% suspenze, 60°C	10x	ne	51 1	2764	0,13	2800	0	0	100	0	0
					51 2	3281	0,287	2372	5435	0	92,5	7,5	0
					51 3	3421	0,337	4366	1250	0	75,1	24,9	0
8b	8b-1, 8b-2	0,5% suspenze, 60°C	10x	ne	52 1	825,3	0,552	778,8	83,37	0	89,3	10,7	0
					52 2	748,2	0,621	830	109,5	0	86,8	13,2	0
					52 3	671,7	0,799	950,9	249,4	57,5	70,5	18,2	6,6
8c	8c-1, 8c-2	1% suspenze, 70°C	10x	ne	53 1	3401	0,564	5113	81,77	0	85,5	14,5	0
					53 2	1818	1	109,3	13,23	0	94,1	5,9	0
					53 3	1802	1	108,6	9,298	0	94,7	5,3	0
8d	8d-1, 8d-2	0,5% suspenze, 70°C	10x	ne	54 1	3799	0,333	4995	70,35	0	89,9	10,1	0
					54 2	4573	0,495	5560	91,14	0	54	46	0
					54 3	4171	0,933	111,4	15,32	0	92,5	7,5	0
8e	8e-1, 8e-2	1% suspenze, 60°C	10x	ano	55 1	2279	0,493	1477	0	0	100	0	0
					55 2	2293	0,308	2705	0	0	100	0	0
					55 3	2357	0,359	1622	4983	0	77	23	0
8f	8f-1, 8f-2	0,5% suspenze, 60°C	10x	ano	56 1	1393	0,755	499,1	0	0	100	0	0
					56 2	1259	0,654	624,3	0	0	100	0	0
					56 3	1207	0,585	796,3	101,9	0	95	5	0
8g	8g-1, 8g-2	1% suspenze, 70°C	10x	ano	57 1	482	0,676	493	5009	122,6	67,2	18	14,8
					57 2	428,1	0,826	298,2	3562	0	55,8	44,2	0
					57 3	398,3	0,879	446,5	4746	95,43	64,2	23,1	12,7
8h	8h-1, 8h-2	0,5% suspenze, 70°C	10x	ano	58 1	2868	1	169,2	0	0	100	0	0
					58 2	1634	1	1098	160	0	56,1	43,9	0
					58 3	1690	0,922	626	135,4	0	65,9	34,1	0

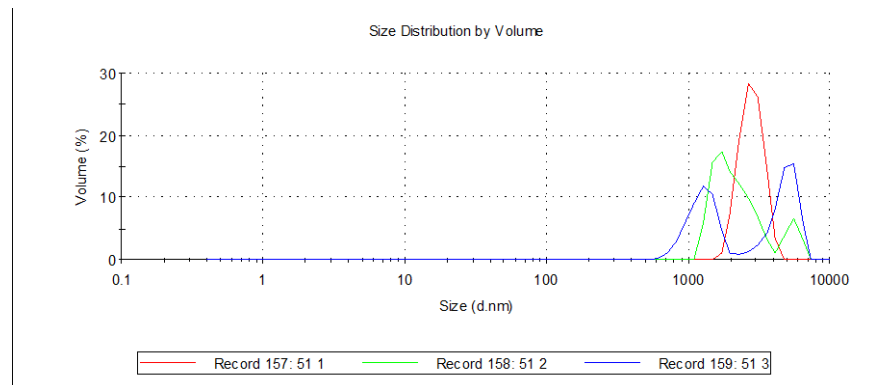
Tab. 8 (pokračování z předchozí strany): Přehled vzorků k testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročastic

Vzorek	Související obrázky	Typ použitých mikročastic	Zředění mikročastic	Použití aceroly v koncentraci 0,5%	Číslo měření	Z-Ave (d.nm)	PdI	Pk 1 Mean Int (d.nm)	Pk 2 Mean Int (d.nm)	Pk 3 Mean Int (d.nm)	Pk 1 Area Int (%)	Pk 2 Area Int (%)	Pk 3 Area Int (%)
8i	8i-1, 8i-2	1% suspenze, 60°C	100x	ne	59 1	3364	0,393	2211	0	0	100	0	0
					59 2	3305	0,569	915,6	5450	0	74,6	25,4	0
					59 3	3285	0,733	824,4	0	0	100	0	0
8j	8j-1, 8j-2	0,5% suspenze, 60°C	100x	ne	60 1	1463	0,969	316	27,09	0	91,8	8,2	0
					60 2	1226	0,84	381,9	39,33	0	88	12	0
					60 3	1100	0,75	484,3	50,13	0	86	14	0
8k	8k-1, 8k-2	1% suspenze, 70°C	100x	ne	61 1	1064	0,784	1049	110,9	0	61,1	38,9	0
					61 2	1057	0,786	985,9	123,3	22,88	54,3	39,9	5,8
					61 3	707,6	1	1284	140,7	38,21	49,4	42,5	8,1
8l	8l-1, 8l-2	0,5% suspenze, 70°C	100x	ne	62 1	1808	1	134,7	13,26	0	92,6	7,4	0
					62 2	1313	0,986	328,5	67,42	0	68,1	31,9	0
					62 3	1199	0,902	441,1	80,83	0	60,9	39,1	0
8m	8m-1, 8m-2	1% suspenze, 60°C	100x	ano	63 1	1479	0,878	716,1	83,77	0	86,7	13,3	0
					63 2	1327	0,807	743,1	97,07	0	86,1	13,9	0
					63 3	1151	0,891	633,8	105,6	0	81,7	18,3	0
8n	8n-1, 8n-2	0,5% suspenze, 60°C	100x	ano	64 1	654,7	0,589	595,4	107,9	0	74	26	0
					64 2	482,7	0,642	545,8	118,9	14,5	68,3	25,8	5,9
					64 3	335,5	0,752	844,9	105,1	15,6	57,4	33,2	6
8o	8o-1, 8o-2	1% suspenze, 70°C	100x	ano	65 1	644,9	0,603	775,2	157,4	18,49	52,7	40	5,8
					65 2	534,3	0,722	710,7	149,7	23,08	56,1	36,9	4
					65 3	552,1	0,634	858,1	169	20,08	50,8	42,3	6,9
8p	8p-1, 8p-2	0,5% suspenze, 70°C	100x	ano	66 1	1545	0,957	152,4	11,01	0	91,4	8,6	0
					66 2	760,8	0,713	510	105,8	0	61,9	38,1	0
					66 3	783,6	0,742	324,4	73,29	0	75	25	0

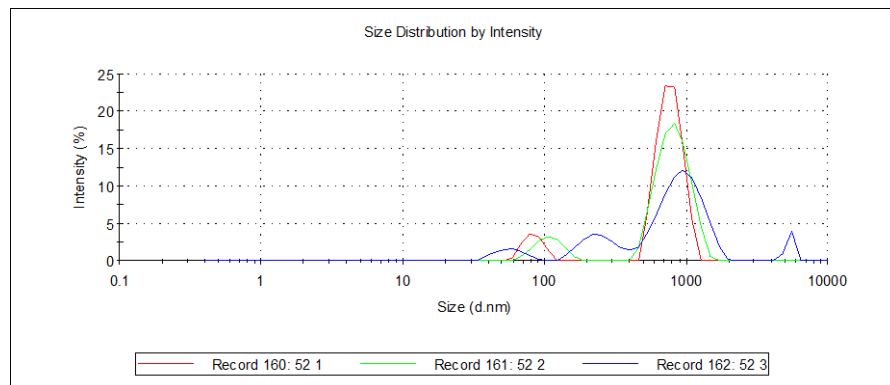
Obr. 8a-1



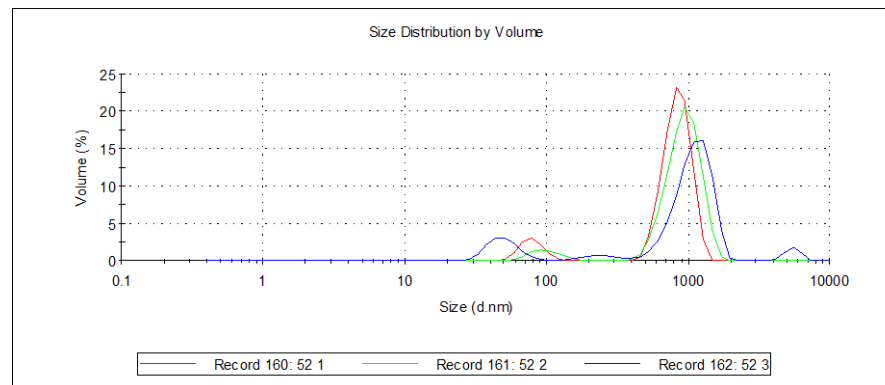
Obr. 8a-2



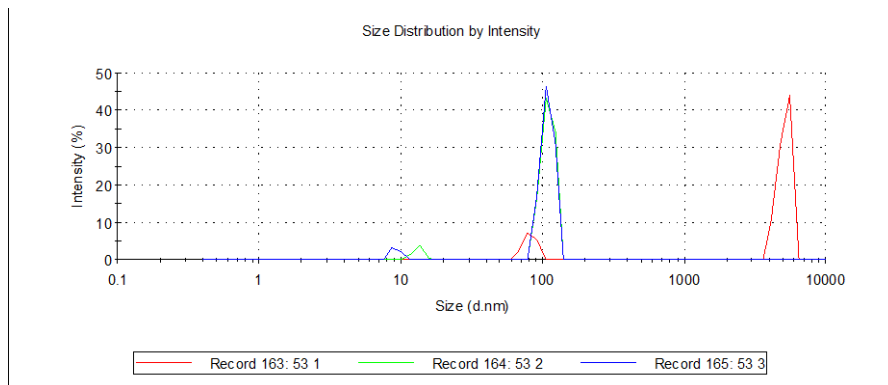
Obr. 8b-1



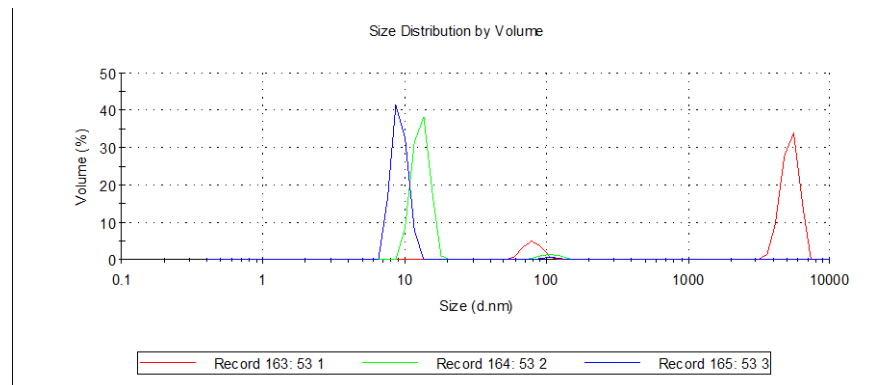
Obr. 8b-2



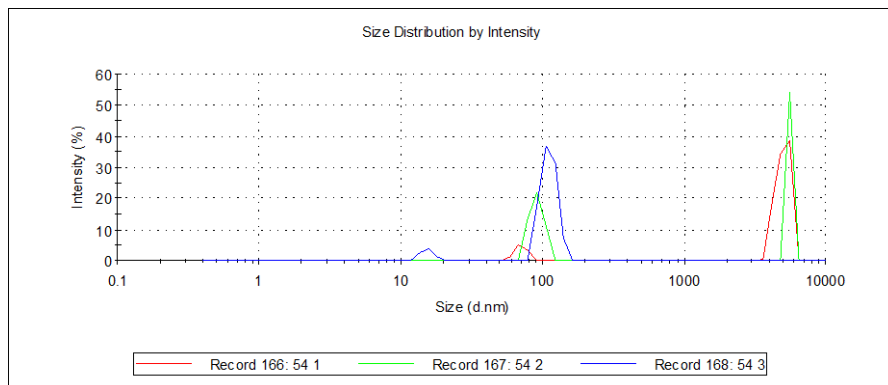
Obr. 8c-1



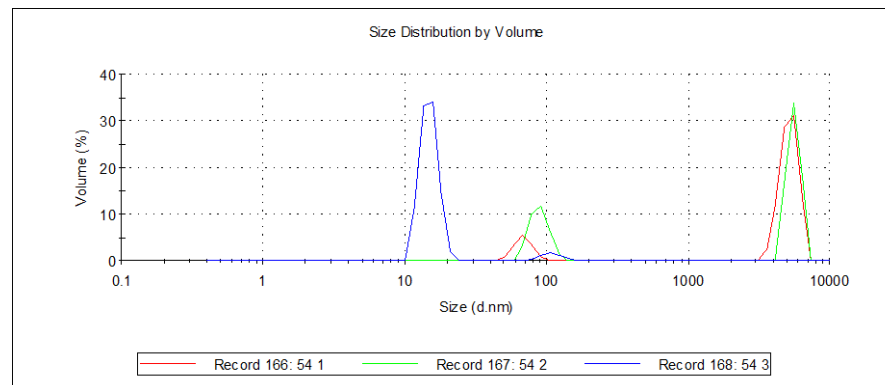
Obr. 8c-2



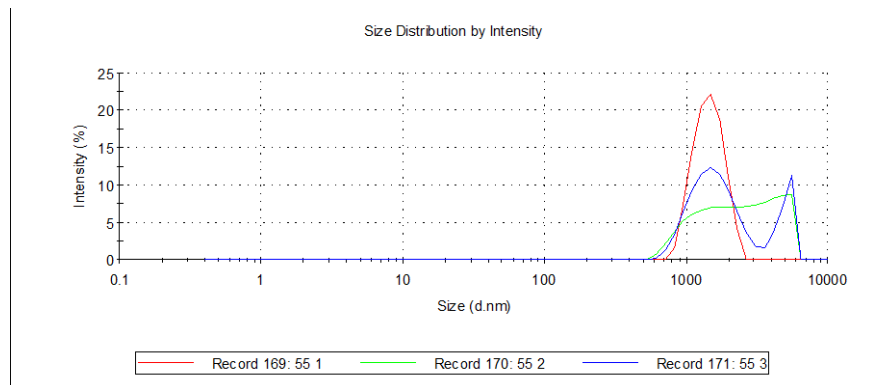
Obr. 8d-1



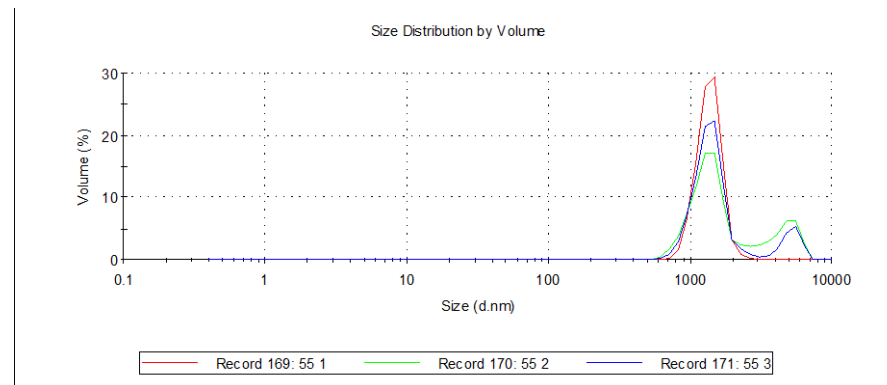
Obr. 8d-2



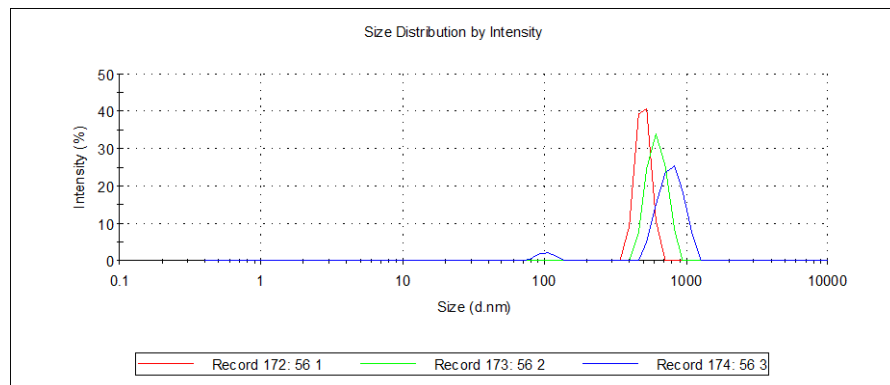
Obr. 8e-1



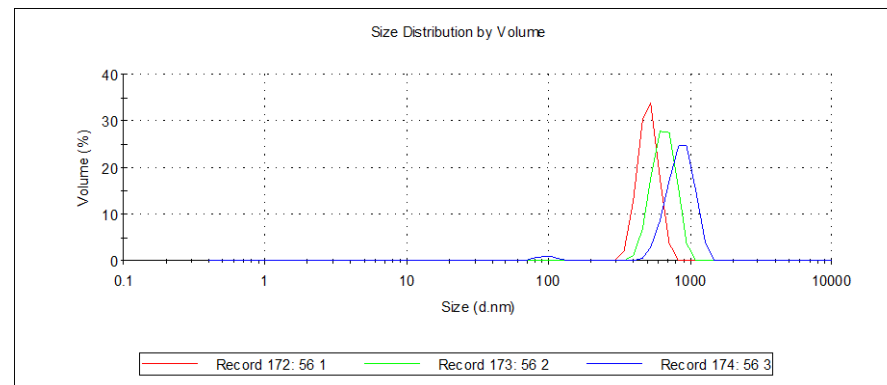
Obr. 8e-2



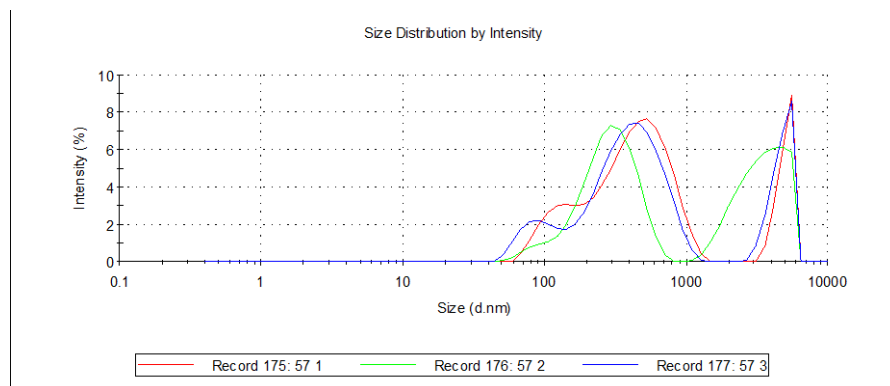
Obr. 8f-1



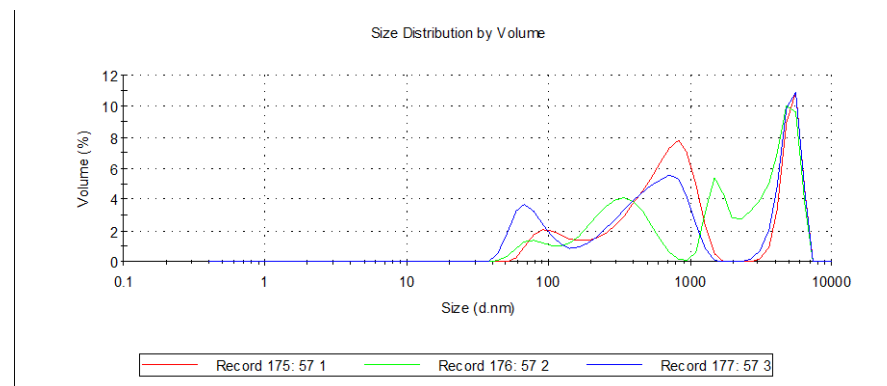
Obr. 8f-2



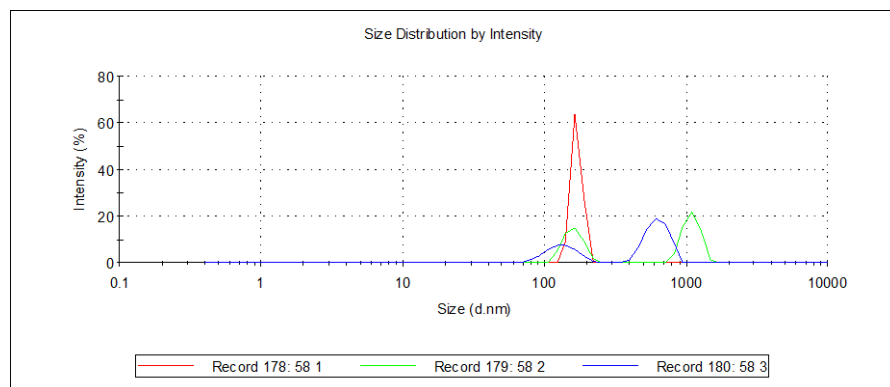
Obr. 8g-1



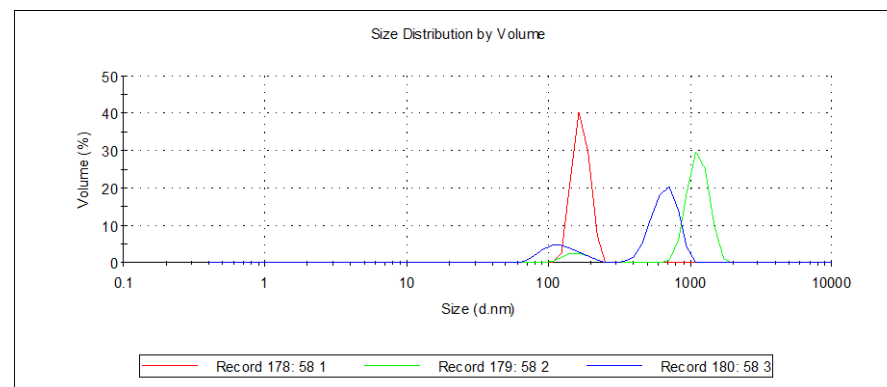
Obr. 8g-2



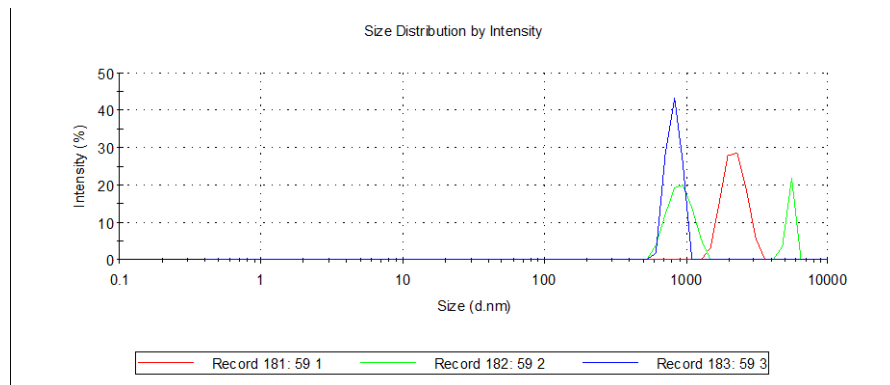
Obr. 8h-1



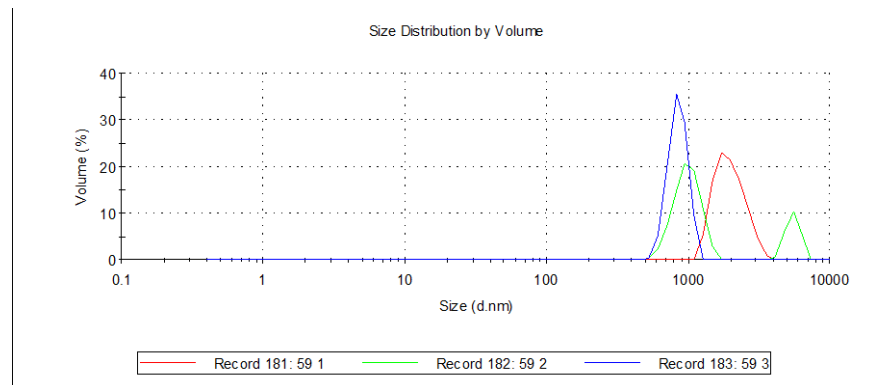
Obr. 8h-2



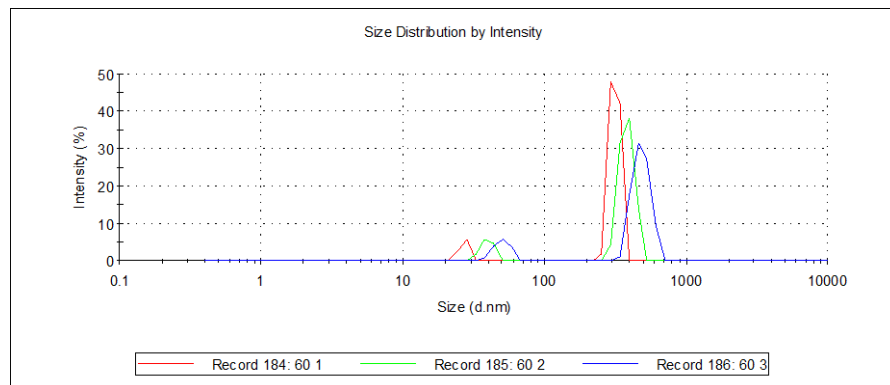
Obr. 8i-1



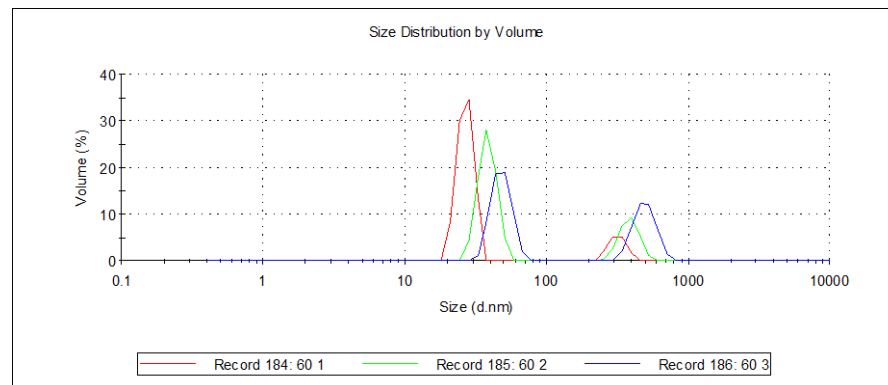
Obr. 8i-2



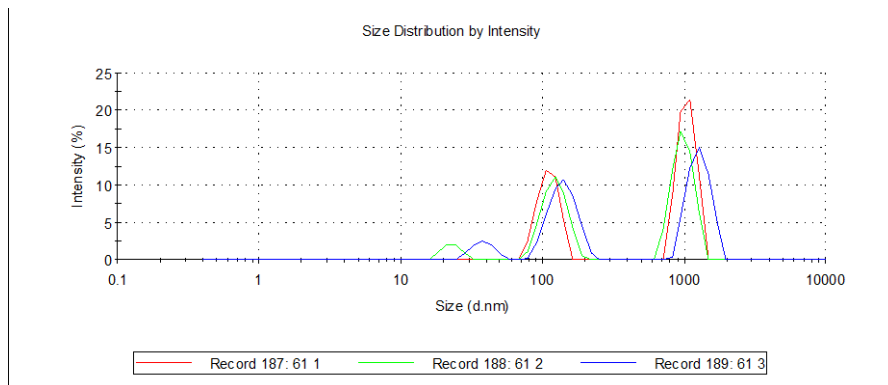
Obr. 8j-1



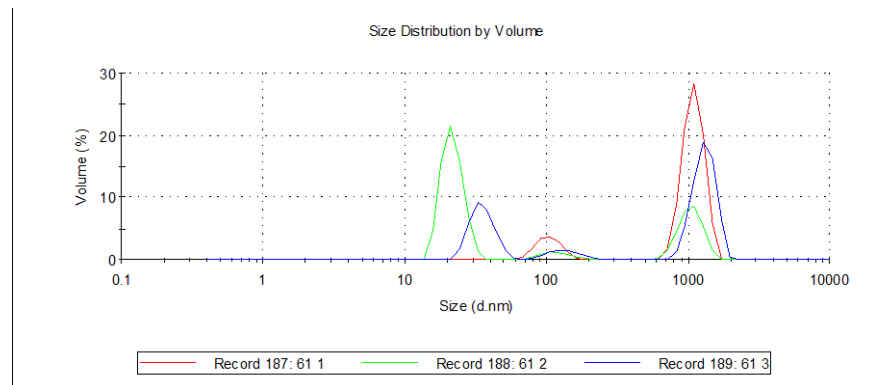
Obr. 8j-2



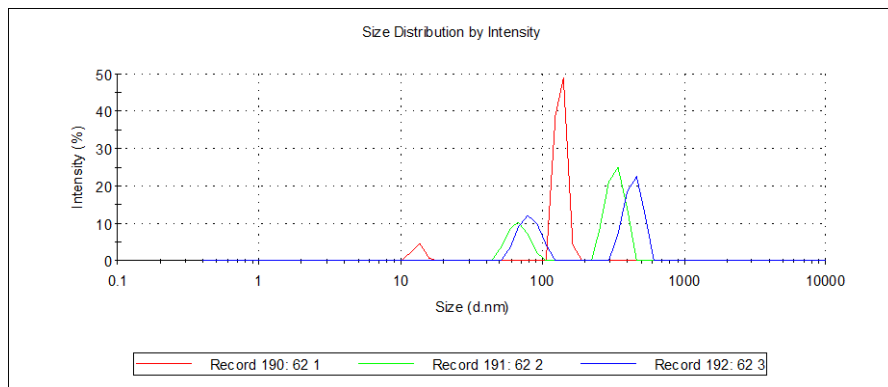
Obr. 8k-1



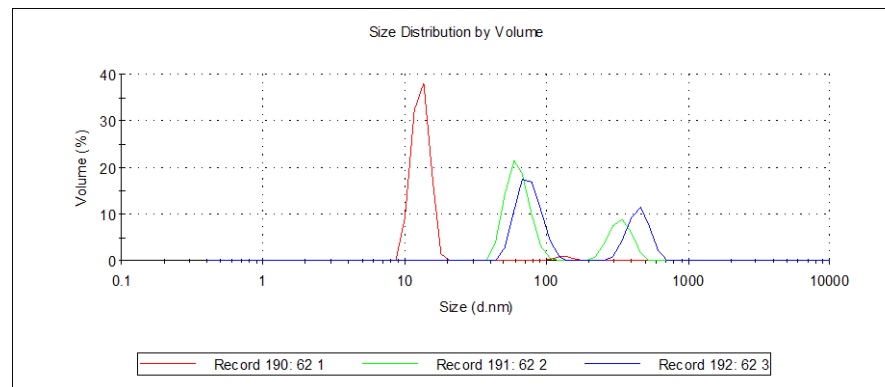
Obr. 8k-2



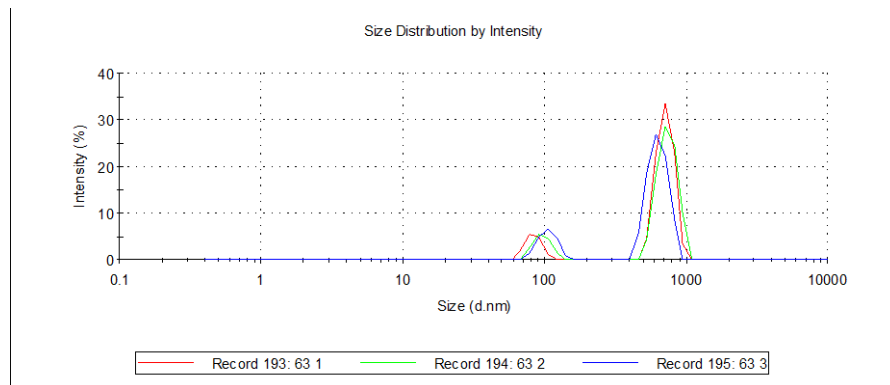
Obr. 8l-1



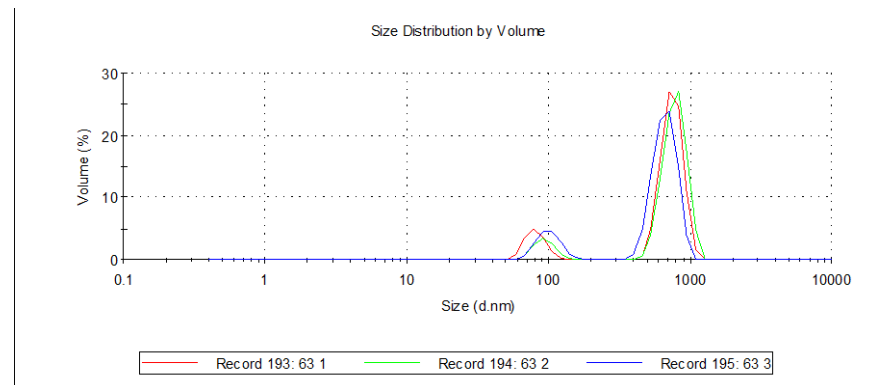
Obr. 8l-2



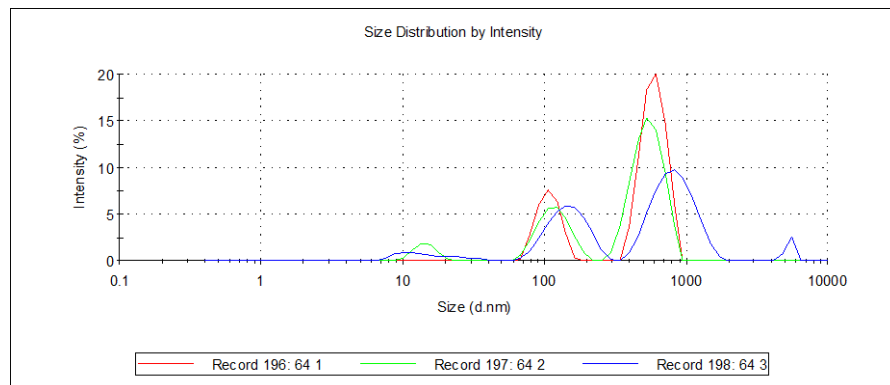
Obr. 8m-1



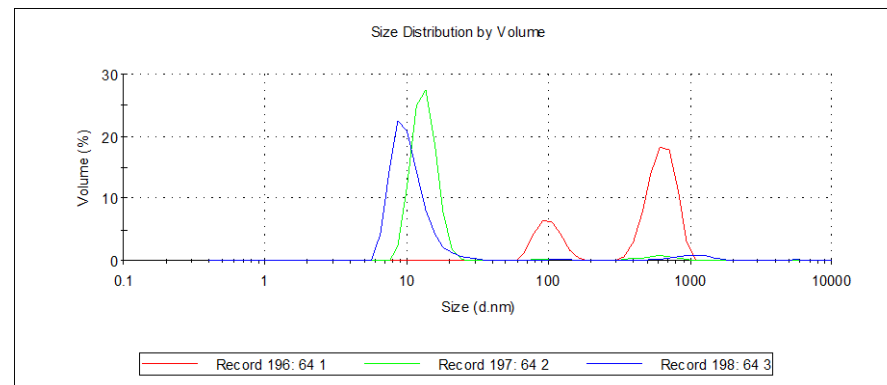
Obr. 8m-2



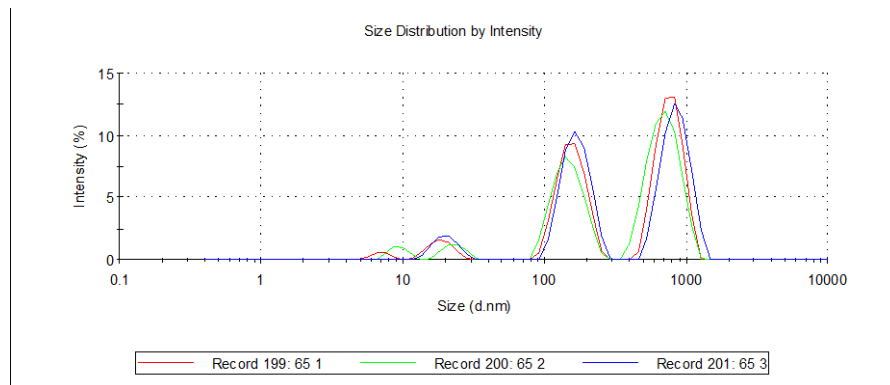
Obr. 8n-1



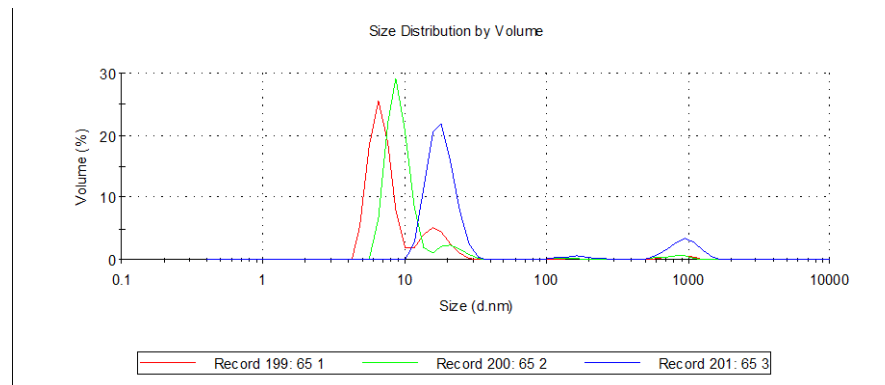
Obr. 8n-2



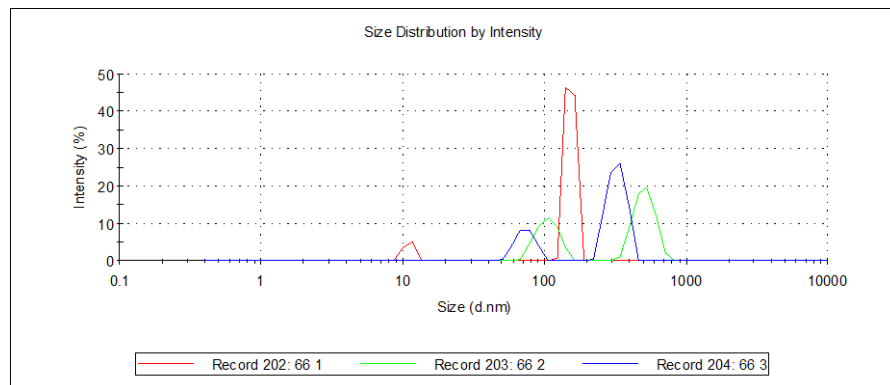
Obr. 8o-1



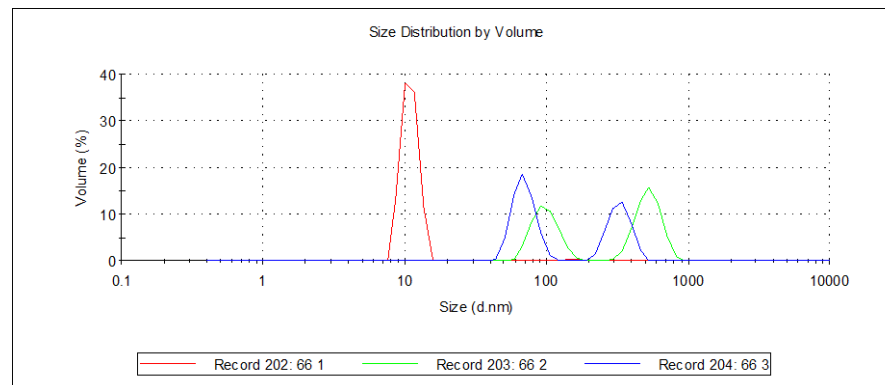
Obr. 8o-2



Obr. 8p-1



Obr. 8p-2



5. DISKUZE

5.1 K řešenému problému a metodě řešení

Předložená práce je příspěvkem k řešení nového typu protimikrobních preparátů s širokým spektrem účinku a dostatečnou mírou biokompatibility. Řešená problematika navazuje na dosud nepublikované výzkumné práce realizované na pracovišti školitele před více než 10 lety. Charakteristickým rysem protimikrobních agens je depozice tenké vrstvy elementárního stříbra na biodegradabilních mikročasticích vhodné velikosti a vhodných povrchových parametrů.

Mezi hlavní výhody medikovaných mikročastic ve srovnání s běžně používanými nanočasticemi by měl patřit především jejich značně větší rozměr, který nedovoluje překonávání biologických bariér. Vyšší míra biokompatibility by také mohla souviset se snadno regulovatelnou, a tedy optimalizovanou koncentrací aktivní složky v částicovém systému.

Diplomová práce je zaměřena na granulometrickou charakteristiku mikročastic měřenou ve vodné disperzi pomocí metody fotonové korelační spektroskopie (PCS). Pozornost je věnována jejich vstupní velikosti, termické odolnosti, dále jejich chování v přítomnosti neionického tenzidu. Od testování suspenzí s různou koncentrací vnitřní fáze bylo očekáváno získání informace o vhodném rozmezí koncentrací pro věrohodné výsledky měření. Modelové směsi mikročastic s odděleně připravenými nanočasticemi sloužily k vyzkoušení citlivosti měření přístroje z hlediska možností detekce nežádoucí příměsi nanočastic. K indikaci případného podílu nezreagovaného iontového stříbra mělo sloužit přidání šťávy z rostliny *Malpighia glabra* (acerola), obsahující kyselinu askorbovou a flavonoidy, k medikovaným mikročasticím sekundárně po procesu předpokládané depozice elementárního stříbra jako aktivní složky.

Některé informace podstatné z hlediska realizace předběžných úvah o možnosti podání přihlášky vynálezu nejsou v této práci záměrně uvedeny.

5.2 K vlivu teploty disperze na velikostní parametry mikročástic

Byla sledována granulometrická charakteristika mikročástic dispergovaných ve vodě bez přítomnosti stříbra. Byly použity speciálně připravené mikročástice kulovitěho tvaru dvou velikostních tříd. Menší, označené symbolem AS, měly střední průměr při pozorování ve světelném mikroskopu přibližně 1 μm , větší měly průměr přibližně 5 μm s malými odchylkami a byly označeny písmeny RS. Suspenze menších měla koncentraci 0,01%, koncentrace větších byla 0,10%. Mikročástice byly podrobeny pěti teplotním režimům pro získání informace o jejich termické odolnosti.

V tabulce č. 1 (vzorky 1a až 1e) a na obrázcích 1a-1 až 1e-2 jsou příslušné výsledky měření granulometrických charakteristik týkajících se mikročástic AS. S výjimkou vzorku zpracovaného při 50°C byla prokázána menší polydisperzita hodnot intenzitního i objemového průměru. Při 23°C dochází v průběhu měření k aglomeraci částic patrně v důsledku zahřívání vzorku při měření. Při 50°C je aglomerace mikročástic výraznější. Při 75°C došlo překvapivě ke zmenšení částic na velikost blízkou velikosti při 23°C s jejich termickou desagregací. Pozoruhodné je chování disperzí při teplotě varu vody. Vznikla nová frakce nanočástic pravděpodobně v důsledku rozpadu mikročástic. Velikost této frakce malých částic souvisí s dobou působení tepelné zátěže.

Mikročástice označené jako RS byly měřitelné pouze v případě jejich dispergace při 23°C

a při 50°C, jak je možno posoudit z dat v tabulce č. 1 (vzorky 1f až 1j) a z obrázků 1f-1 až 1j-2. Při vyšších teplotách dochází k jejich aglomeraci. Stejně jako u mikročástic AS byla nejmenší polydisperzita u mikročástic zahřátých na 50°C.

5.3 K vlivu koncentrace mikročastic v suspenzi na jejich velikostní parametry

Mikročastice dvou výše uvedených typů byly dispergovány ve vodě v koncentracích měnících se v dekadické řadě od 1% po 0,001%. Výsledky měření mikročastic AS jsou v tabulce č. 2 (vzorky 2a až 2d) a na obr. 2a-1 až 2d-2. Z prezentovaných výsledků je zřejmé, že u většiny vzorků dochází k agregaci částic se vzrůstající koncentrací. Realistické výsledky byly dosaženy při koncentraci částic 0,001%, tedy 10 ppm.

Mikročastice označené jako RS při jejich nejnižší koncentraci daly nerealisticky nejnižší hodnoty velikosti při velké polydisperzitě. Nízkou polydisperzitu je možno sledovat v případě vysokých koncentrací mikročastic. Realistický výsledek byl dosažen v případě 1% koncentrace mikročastic.

Výsledkům bude nutno věnovat další pozornost. V případě jejich potvrzení bude nutno hledat vysvětlení.

5.4 K vlivu tenzidu na agregátní stav disperzí mikročastic

Jako tenzid s potenciálem ovlivnění struktury suspenzí mikročastic byl vybrán polysorbát 20 v koncentraci 0,1%. Tato koncentrace je dostatečná k případné deflokulaci mikročastic. V tabulce č. 3 (vzorky 3a až 3b) a na obr. 3a-1 až 3b-2 jsou výsledky měření velikosti částic AS. Je zřejmé, že vybraný tenzid ve zvolené koncentraci má vliv na částečnou agregaci mikročastic. Polydisperzita velikosti částic v suspenzi s tenzidem je však nižší, což je možno vysvětlit jako falešný výsledek způsobený omezením metody neměřitelností částic větších než 6 μm .

V případě mikročastic RS (tabulka č. 3 – vzorky 3c až 3d, obr. 3c-1 až 3d-2) není možno na základě prezentovaných výsledků učinit žádný závěr o jejich agregaci ze stejných důvodů jako v případě mikročastic AS. Extrémně kolísající polydisperzita v rámci třikrát opakovaných měření je nepřímým svědectvím o existenci větších neměřitelných agregátů mikročastic.

5.5 K vlivu přečištění a povrchové úpravy mikročásteček na jejich velikost

Na základě výše popsané tendence k agregaci mikročásteček se přikročilo k jejich hydrofilizaci 24-hodinovým působením alkalického média ve vodné disperzi. Rozmezí tří koncentrací vodného roztoku hydroxidu sodného bylo zvoleno na základě dřívějších zkušeností na pracovišti školitele. Po promytí vodou byly mikročástečky usušeny. Byly připraveny tři různé suspenze lišící se koncentrací takto upravených mikročásteček ve vodě. Mikročástečky byly výše popsaným postupem využity k interakci s iontovým stříbrem. Celkem se tedy jednalo o devět vzorků mikročásteček se stříbrem, prezentovaných z granulometrického aspektu v tabulce č. 4 (vzorky 4a až 4i). Příslušné záznamy měření metodou PCS jsou na obr. 4a-1 až 4i-2.

V řadě s nejnižší, 0,25% koncentrací hydroxidu je možno pozorovat tendenci k nižší agregaci se zvyšující se koncentrací dispergovaných mikročásteček. Hodnoty průměrné velikosti označené jako Z-Ave tuto tendenci potvrzují poklesem v řadě koncentrace mikročásteček: 0,5%/2040 nm – 1,0%/1800 nm – 2,0%/1545 nm. Mírně zvýšený intenzitní průměr primárních mikročásteček ve srovnání s mikročástečkami neovlivněných alkalickým médiem je možno vysvětlit jejich bobtnáním.

Po zvýšení koncentrace hydroxidu na 0,35% nebyla tato tendence snižování agregace se zvyšující se koncentrací mikročásteček potvrzena, trend změny velikosti a agregace byl spíše opačný. Totéž platí ještě výrazněji i o disperzích mikročásteček v 0,45% roztoku hydroxidu sodného. V tomto případě je možno vyšší koncentrace mikročásteček ve výše koncentrovaném hydroxidu pokládat za nevhodné.

Přidání 0,5% sušené šťávy z plodů rostliny *Malpighia glabra* (acerola), jako relativně silně účinné redukující látky do suspenze mikročásteček s deponovaným stříbrem na povrchu, bylo provedeno s cílem odhalit případné iontové stříbro v disperzi. Výsledky jsou v tabulce č. 4 (vzorky 4j až 4r) a na obr. 4j-1 až 4r-2. U všech vzorků byl patrný vzrůst hodnot velikostní charakteristiky Z-Ave s koncentrací suspenze. Vysvětlením může být vyšší schopnost bobtnat při menším pokrytí vrstvou elementárního stříbra. V řadě zvyšující se koncentrace roztoku NaOH při povrchové úpravě mikročásteček bylo prokázáno snižování hodnot parametru Z-Ave. Nabízí se vysvětlení ve zvyšování sorpční kapacity mikročásteček nebo kapacity k interakci.

Prokázání frakce nanočástic převážně v rozmezí intenzitního průměru od 130 nm do 200 nm u suspenzí s nejnižší koncentrací mikročástic s největší pravděpodobností souvisí s kapacitou povrchu mikročástic k interakci. V případě 0,5% suspenzí byla tato kapacita překročena a v soustavě zůstal nezanedbatelný podíl nezreagovaného iontového stříbra prokázaného jako stříbro koloidní na základě jeho redukce fyto komplexem kyseliny askorbové a flavonoidů. Jako zajímavý výsledek hodnotíme podíl iontového stříbra i v případě 1% suspenze zpracované s nejvíce koncentrovaným roztokem hydroxidu. To je v rozporu s výše uvedeným předpokladem o zvyšování povrchu nebo kapacity k interakci se stříbrem s koncentrací hydroxidu použitého k úpravě povrchu. Nabízí se alternativní vysvětlení ve změně kvality povrchu. K řešení tohoto problému by přispělo detailní prostudování vlastností povrchu mikročástic nezpracovaných, zpracovaných v alkalickém médiu a po jejich interakci se stříbrem.

5.6 K vlivu tepelného zpracování a změny koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikost po interakci s iontovým stříbrem

V tomto úseku byl sledován vliv krátkodobého zahřátí suspenze mikročástic a změny jejich koncentrace při jejich interakci se stříbrem a také vliv desetinasobného zředění výsledných disperzí na jejich granulometrické parametry. Celkový počet vzorků byl 8 při dvou tepelných zátěžích, dvou koncentracích suspenzí medikovaných mikročástic a jejich dvou ředěních.

Výsledky měření velikosti částic zahřátých krátkodobě na nižší teplotu 60°C před jejich dalším zpracováním jsou v tabulce č. 5 (vzorky 5a až 5d) a na obr. 5a-1 až 5d-2. V případě měření vzorků, které nebyly před měřením zředěny, je možno konstatovat jednak poměrně nízkou polydisperzitu při vysoké míře agregace; nižší míra agregace v 0,5% disperzích může být jednak náhodná v rámci menší standardnosti dodržení podmínek, může být také ovlivněna neměřitelnou frakcí nadlimitních agregátů.

Po desetinasobném zředění 1% disperze těsně před měřením byly získány mikročástice s překvapivě malým podílem agregátů. Překvapivý je výsledek měření po zředění 0,5% disperze, který poskytl informaci o agregaci disperze bez podílu primárních částic.

K ověření tohoto výsledku a vyloučení vlivu nestandardního postupu je nutné provést další experimenty.

Pro studium stejných vzorků zahřátých na teplotu 70°C (tabulka č. 5 – vzorky 5e až 5h, obr. 5e-1 až 5h-2) jsou nejvýraznějším rysem velmi variabilní výsledky výrazně ovlivněné oběma faktory danými koncentrací mikročástic. Přesto je možno naměřená data hodnotit z kvalitativního hlediska. Zásadní změnou je vysoký podíl nanočástic ve vzorcích, prokázaných bez ohledu na koncentraci a ředění suspenzí. Jedná se o důsledky fragmentace mikročástic s výraznou změnou parametrů takto nově vzniklých povrchů. Jako pozoruhodný výsledek je možno hodnotit podobnost v záznamech rozložení velikosti částic původně 1% a 0,5% suspenze. To je důkazem neovlivnění disperzního stavu soustavy její koncentrací v daném rozmezí, i když s polovičními koncentracemi obsahovaly určitý podíl aglomerátů.

5.7 K vlivu koncentrace mikročástic v disperzi na jejich velikostní parametry přístrojové a skutečné

Cílem bylo vyzkoušet možnosti přístroje poskytnout věrohodné výsledky měření velikosti částic s velkou polydisperzitou metodou PCS. Jednalo se jednak o disperze koloidního stříbra a také o směsi konstantní koncentrace koloidního stříbra s proměnlivou koncentrací mikročástic s deponovaným stříbrem.

Výsledky měření velikosti částic koloidního stříbra jsou v tabulce č. 6 (vzorky 6a až 6e) a na obr. 6a-1 až 6e-2. Pokud jde o charakteristiku celkového průměru intenzitní rozměrové charakteristiky, je možno vysledovat postupný markantní vzrůst hodnot s ředěním nanodisperze. Měření neřaděných nanočástic byly získány prakticky hodnoty monodisperzní směsi se středním rozměrem 26 nm. Po desetinásobném zředění byla charakteristika významně ovlivněna tak, že byla prokázána přibližně polovina submikronových částic s průměrným rozměrem Z-Ave téměř trojnásobným, frakce větších částic měla rozměr kolem 130 nm. Dalším stonásobným zředěním se zvýšila hodnota Z-ave na více než 500 nm při značné polydisperzitě. Vysoká polydisperzita a velké kolísání hodnot v rámci opakovaných měření je potvrzením o podlimitní měřitelné koncentraci nanočástic. Věrohodné výsledky měření velikosti nanočástic byly

u neřaděného vzorku, jehož koncentrace byla 108 ppm. U nejvíce řaděného vzorku byly měřeny prakticky pouze kontaminující částice prachu. Potvrzením jsou hodnoty záznamů opakovaných měření na příslušných obrázcích.

Druhá řada (tabulka č. 7 – vzorky 7a až 7d, obr. 7a-1 až 7d-2) se týká snižující se koncentrace tepelně zpracovaných mikročástic při konstantní koncentraci nanočástic stříbra. Celkový intenzitní průměr Z-Ave je v neřaděné soustavě negativně ovlivněn vysokou polydisperzitou. Ve vzorku byly prokázány dva druhy submikronových částic. Frakce větších částic obsahovala jejich přibližně 70% podíl s intenzitním průměrem kolem 170 nm, zbytek byly částice s rozměrem kolem 50 nm. Vzorek, ve kterém byly mikročástice desetkrát zřaděny, měl tak velkou polydisperzitu, že jej přístroj neměřil. Dalším zřaděním (100 x) se polydisperzita snížila natolik, že výsledky měření je možno pokládat za věrohodné. Došlo k jednoznačnému odlišení nanočástic stříbra a větších částic pocházejících z destrukce mikročástic AS. U vzorku s tisícinásobným zřaděním bylo toto tvrzení podpořeno snížením podílu větších částic zahrnujících také kontaminanty.

5.8 K testování přítomnosti nezreagovaného iontového stříbra v disperzi medikovaných mikročástic

Byly porovnány parametry velikosti mikročástic lišících se teplotou přípravy a jejich koncentrací při depozici stříbra. Po přípravě disperze medikovaných mikročástic byla její část zřaděna desetkrát a k ní byla přidána šťáva z rostliny *Malpighia glabra* (acerola) pro případné prokázání nezreagovaného iontového stříbra. Stejný test prokazující molekulárně rozpustné stříbro byl vykonán i v případě analogických vzorků stonásobně zřaděných.

V tabulce č. 8 (vzorky 8a až 8d) a na obr. 8a-1 až 8d-2 jsou výsledky, které se týkají medikovaných disperzí mikročástic. Mikročástice byly připraveny krátkodobým zahřátím na 60°C a na 70°C. V případě vzorků částic zahřátých na 60°C je značný rozdíl v distribuci velikosti částic zpracovaných v 1% suspenzi a v 0,5% suspenzi. V případě poloviční koncentrace suspenze je dostupný poloviční povrch. Tento povrch je za daných podmínek podlimitní z hlediska kapacity elementárního stříbra k jeho

nasycení. Stříbro, které je v dané soustavě navíc, bylo prokázáno v roztoku v nezměněné kationtové formě. Velká polydisperzita je nepřímým důkazem existence nanočástic v relativně vysoké koncentraci.

Po přidání aceroly (tabulka č. 8 – vzorky 8e až 8f, obr. 8e-1 až 8f-2) se distribuce velikosti částic výrazně nezměnila, vzorky z 1% suspenze neobsahovaly žádné nanočástice, vzorky z 0,5% suspenze je obsahovaly ve velmi malém množství, protože jejich povrch je na hranici nasycení. Uvedené výsledky pokládáme za důkaz kompletní depozice elementárního stříbra na povrchu mikročástic.

Pokud jde o vzorky připravené interakcí mikročástic zpracovaných při 70°C, koncentrace mikročástic při jejich interakci se stříbrem neovlivnila výrazně distribuci velikosti. Značný rozdíl je v polydisperzitě, při nižší koncentraci mikročástic je vyšší podíl koloidního stříbra, což je v souladu s výše uvedeným jevem nasycení povrchu. Přítomnost nanočástic stříbra i ve výše koncentrované suspenzi svědčí o částečné destrukci mikročástic zpracovaných při vyšší teplotě.

Po přidání aceroly došlo ke změnám, které je možno pokládat za komplexní (tab. 8 - vzorky 8g až 8h, obr. 8g-1 až 8h-2). Mohou souviset s bobtnáním destruovaných mikročástic, jejich agregací, změnou pH apod.

Po stonásobném zředění výsledných disperzí mikročástic, a případně také nanočástic, nedošlo k významným změnám v granulometrických charakteristikách, jak je patrné z tab. 8 (vzorky 8i až 8l) a z obr. 8i-1 až 8l-2. Potvrdila se limitní hodnota nasycenosti povrchu elementárním stříbrem u mikročástic zpracovaných při 60°C a destrukce mikročástic při 70°C ovlivňujících vznik nanočástic konkurenčně ke vzniku modifikovaných mikročástic. Za významný poznatek z hlediska měřitelnosti disperzí je možno označit lepší rozlišovací schopnost přístroje pro koloidní částice vedle mikročástic, jak je patrné z tab. 8 (vzorky 8k a 8l) a příslušných obrázků.

K těmto stonásobně zředěným disperzím byla přidána acerola v koncentraci 0,5%. Na základě této změny složení média došlo i u výše koncentrované suspenze k prokázání nezanedbatelného podílu koloidních částic (tabulka č. 8 – vzorek 8m, obr. 8m-1 a 8m-2). Dalším pozoruhodným poznatkem je snížení velikosti mikročástic do submikronové oblasti. V této fázi není prokazatelná ani destrukce mikročástic nebo jejich povrchové vrstvy, ani desorpce nanočástic z povrchu mikročástic. V případě nižší

koncentrace suspenze byl prokázán značně vyšší podíl nanočástic. Důležitým poznatkem je snížení intenzitního průměru píku 1 jako velikostního parametru téměř na polovinu. To znamená, že zajištění dostatečného povrchu mikročástic a jejich modifikaci, případně také integritě bude nutno věnovat dostatečnou pozornost.

Také v případě mikročástic předběžně zpracovaných při teplotě 70°C je značný podíl koloidních částic malých rozměrů. Vzorky jsou velmi polydisperzní, částice patří do tří velikostních tříd lišících se velikostí podle měnící se koncentrace mikročástic v suspenzi (tabulka č. 8 – vzorky 8o až 8p, obr. 8o-1 až 8p-2).

6. ZÁVĚRY

V návaznosti na dříve dosažené výsledky byly v problematice výzkumu a vývoje nových širokospektrých protimikrobně aktivních přípravků se zvýšenou biokompatibilitou dosaženy následující nové poznatky:

- A) Vodné disperze mikročastic jsou stabilní do 60°C, při vyšších teplotách dochází k jejich destrukci, případně k aglomeraci.
- B) Přítomnost 0,1% roztoku polysorbátu 20 jako neionického tenzidu ve vodné vnější fázi suspenze vede k aglomeraci mikročastic.
- C) Úprava povrchu mikročastic je důležitou součástí vývoje medikovaných mikročastic, jedná se o velmi komplexní problematiku vyžadující zvýšenou pozornost.
- D) Pro přípravu mikročastic s deponovaným stříbrem je nutné, aby nebyla překročena hraniční hodnota povrchu dostupného k interakci a pokrytí.
- E) Při měření velikosti částic s vysokou polydisperzitou metodou PCS je nutné optimální zředění vzorků.

7. LITERATURA

- (1) HOSOKAWA, M., NOGI, K., NAITO, M., YOKOYAMA, T. (ed.). *Nanoparticle Technology Handbook*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-044-4563-361.
- (2) KOMÁREK, P., RABIŠKOVÁ, M. *Technologie léků: galenika*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2423-7.
- (3) MENG, X. K., TANG, S. C., VONGEHR, S. A Review on Diverse Silver Nanostructures. *Journal of Materials Science & Technology*. 2010, vol. 26, issue 6, s. 487-522. DOI: 10.1016/S1005-0302(10)60078-3.
- (4) SCHASFOORT, R., TUDOS, A. (ed.). *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Royal Society of Chemistry, 2008. ISBN 978-0-85404-267-8.
- (5) MAIER, S. A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer, 2007. ISBN 978-0387-33150-8.
- (6) SCHWARZ, J. A., CONTESCU, C. I., PUTYERA, K. (ed.). *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. CRC Press, 2004. ISBN 978-0-8247-5055-8.
- (7) PECORA, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. 2000, vol. 2, issue 2, s. 123-131. DOI: 10.1023/A:1010067107182.
- (8) LTD, MALVERN INSTRUMENTS. *Zetasizer Nano Series: User Manual*. 2004.
- (9) JOHNSTON, R. L., WILCOXON, J. (ed.). *Metal Nanoparticles and Nanoalloys*. Elsevier, 2012. ISBN 978-008-0963-570.
- (10) REIMER, L., KOHL, H. *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation*. Springer, 2008. ISBN 978-0-387-40093-8.
- (11) STADTLÄNDER, C. Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy of Mollicutes: Challenges and Opportunities. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. 2007, vol. 1, s. 122-131.
- (12) KHURSHEED, A. *Scanning Electron Microscope Optics and Spectrometers*. World Scientific, 2011. ISBN 978-981-283-667-0.
- (13) SMITH, F. H., SMITH, D. K. (ed.). *Industrial Applications of X-ray Diffraction*. CRC Press, 2000. ISBN 0-8247-1992-1.

- (14) DOROFEEV, G. A., STRELETSKII, A. N., POVSTUGAR I. V., PROTASOV, A. V., ELSUKOV, E. P. Determination of Nanoparticle Sizes by X-ray Diffraction. *Colloid Journal*. 2012, vol. 74, issue 6, s. 675-685. DOI: 10.1134/S1061933X12060051.
- (15) HUANG, Q. (ed.). *Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. Elsevier, 2012. ISBN 978-1-84569-739-6.
- (16) HUNT, B. J., HOLDING, S. R. *Size Exclusion Chromatography*. Blackie. Chapman and Hall, 1989. ISBN 978-1-4615-7863-5.
- (17) AMENDOLA, V., POLIZZI, S., MENEGHETTI, M. Free Silver Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Organic Solvents and Their Easy Functionalization. *Langmuir*. 2007, vol. 23, issue 12, s. 6766-6770. DOI: 10.1021/la0637061.
- (18) VARADAN, V. K., PILLAI, A. S., MUKHERJI, D., DWIVEDI, M., CHEN, L. *Nanoscience and Nanotechnology in Engineering*. World Scientific, 2010. ISBN 978-981-4227-92-1.
- (19) KLABUNDE, K. J., SERGEEV, G. B. *Nanochemistry*. Newnes, 2013. ISBN 978-0-444-59409-9.
- (20) TOLAYMAT, T. M., EL BADAWEY, A. M., GENAIDY, A., SCHECKEL, K. G., LUXTON, T. P., SUIDAN, M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*. 2010, vol. 408, issue 5, s. 999-1006. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.11.003.
- (21) RAVINDRAN, A., CHANDRAN, P., KHAN, S. S. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, vol. 105, s. 342-352. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.036.
- (22) LU, K. *Nanoparticulate Materials: Synthesis, Characterization, and Processing*. John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-111-8291-429.
- (23) WANG, Z. L., LIU, Y., ZHANG, Z. (ed.). *Handbook of Nanophase and Nanostructured Materials: Synthesis/Characterization/Materials Systems and Applications I/Materials Systems and Applications II*. Springer, 2003. ISBN 03064674024.

- (24) GHORBANI, H. R., SAFEKORDI, A. A., ATTAR, H., REZAYAT SORKHABADI, S. M. Biological and Non-biological Methods for Silver Nanoparticles Synthesis. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2011, vol. 25, issue 3, s. 317-326.
- (25) HE, B., TAN, J. J., LIEW K. Y., LIU, H. Synthesis of size controlled Ag nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2004, vol. 221, issue 1-2, s. 121-126. DOI: 10.1016/j.molcata.2004.06.025.
- (26) GUZMAN, M., DILLE, J., GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012, vol. 8, issue 1, s. 37-45. DOI: 10.1016/j.nano.2011.05.007.
- (27) LIU, Y., CHEN, S., ZHONG, L., WU, G. Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 2009, vol. 78, issue 4, s. 251-255. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2009.01.003.
- (28) YIN, H., YAMAMOTO, T., WADA, Y., YANAGIDA, S. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. *Materials Chemistry and Physics*. 2004, vol. 83, issue 1, s. 66-70. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2003.09.006.
- (29) PAL, A., SHAH, S., DEVI, S. Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using ethanol as a reducing agent. *Materials Chemistry and Physics*. 2009, vol. 114, 2-3, s. 530-532. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2008.11.056.
- (30) NADAGOUDA, M. N., SPETH, T. F., VARMA, R. S. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanostructures. *Accounts of Chemical Research*, 2011, vol. 44, issue 7, s. 469-478. DOI: 10.1021/ar1001457.
- (31) CHEN, D., SHARMA, S. K., MUDHOO, A. (ed.). *Handbook on Applications of Ultrasound: Sonochemistry for Sustainability*. CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4398-4206-5.
- (32) PANKAJ, ASHOKKUMAR, M. *Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems*. Springer, 2011. ISBN 978-90-481-3886-9.
- (33) MORSY, F. M. Hydrogen production by Escherichia coli without nitrogen sparging and subsequent use of the waste culture for fast mass scale one-pot

- green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014, vol. 39, issue 23, s. 11902-11912. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.06.007.
- (34) YANG, C., JUNG, S., YI, H. A biofabrication approach for controlled synthesis of silver nanoparticles with high catalytic and antibacterial activities. *Biochemical Engineering Journal*. 2014, vol. 89, s. 10-20. DOI: 10.1016/j.bej.2013.12.008.
- (35) AHLUWALIA, V., KUMAR, J., SISODIA, R., SHAKIL, N. A., WALIA, S. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Industrial Crops and Products*. 2014, vol. 55, s. 202-206. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.01.026.
- (36) BARUA, S., KONWARH, R., BHATTACHARYA, S. S., DAS, P., DEVI, K. S. P., MAITI, T. K., MANDAL, M., KARAK, N. Non-hazardous anticancerous and antibacterial colloidal 'green' silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, vol. 105, s. 37-42. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.12.015.
- (37) KUMAR, S., SINGH, M., HALDER, D., MITRA, A. Mechanistic study of antibacterial activity of biologically synthesized silver nanocolloids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, vol. 449, s. 82-86. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.02.027.
- (38) PUIŠO, J., JONKUVIENE, D., MAČIONIENE, I., ŠALOMSKIENE, J., JASUTIENE, I., KONDROTAS, R. Biosynthesis of silver nanoparticles using lingonberry and cranberry juices and their antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, vol. 121, s. 214-221. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.05.001.
- (39) MITTAL, A. K., BHAUMIK, J., KUMAR, S., BANERJEE, U. C. Biosynthesis of silver nanoparticles: elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014, vol. 415, s. 39-47. DOI: 10.1016/j.jcis.2013.10.018.
- (40) CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Biology*. 1999, vol. 50, issue 1, s. 277-303. DOI 10.1146/annurev.arplant.50.1.277.

- (41) WANG, Z. L., LIU, Y., ZHANG, Z. *Metal Nanoparticles in Microbiology: Synthesis, Characterization, and Processing*. New York: Springer, 2011. ISBN 978-364-2183-119.
- (42) SILVER, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003, vol. 27, issue 2-3, s. 341-353. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00047-0.
- (43) SANJENBAM, P., GOPAL, J. V., KANNABIRAN, K. Anticandidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Streptomyces* sp. VITPK1. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. 2014, vol. 24, issue 3, s. 211-219. DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.03.004.
- (44) CHEN, N., ZHENG, Y., YIN, J., LI, X., ZHENG, C. Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro. *Journal of Virological Methods*. 2013, vol. 193, issue 2, s. 470-477. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.07.020.
- (45) DROR-EHRE, A., MAMANE, H., BELENKOVA, T., MARKOVICH, G., ADIN, A. Silver nanoparticle – *E. coli* colloidal interaction in water and effect on *E. coli* survival. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009, vol. 339, issue 2, s. 521-526. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.07.052.
- (46) PETICA, A., GAVRILIU, S., LUNGU, M., BURUNTEA, N., PANZARU, C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering: B*. 2008, vol. 152, 1-3, s. 22-27. DOI: 10.1016/j.mseb.2008.06.021.
- (47) TIEN, D. C., TSENG, K. H., LIAO, C. Y., TSUNG, T. T. Colloidal silver fabrication using the spark discharge system and its antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus*. *Medical Engineering & Physics*. 2008, vol. 30, issue 8, s. 948-952. DOI: 10.1016/j.medengphy.2007.10.007.
- (48) RADZIG, M. A., NADTOCHENKO, V. A., KOKSHAROVA, O. A., KIWI, J., LIPASOVA, V. A., KHMEL, I. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, vol. 102, s. 300-306. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.039.
- (49) LEE, H. J., LEE, S. G., OH, E. J., CHUNG, H. Y., HAN, S. I., KIM, E. J., SEO, S. Y., GHIM, H. D., YEUM, J. H., CHOI, J. H. Antimicrobial

- polyethyleneimine-silver nanoparticles in a stable colloidal dispersion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, vol. 88, issue 1, s. 505-511. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.07.041.
- (50) MATHEW, T. V., KURIAKOSE, S.. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, vol. 101, s. 14-18. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.05.017.
- (51) TAMBOLI, D. P., LEE, D. S. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, vol. 260, s. 878-884. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.06.003.
- (52) HUR, Y. E., KIM, S., KIM, J. H., CHA, S. H., CHOI, M. J., CHO, S., PARK, Y. One-step functionalization of gold and silver nanoparticles by ampicillin. *Materials Letters*. 2014, vol. 129, s. 185-190. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.05.032.
- (53) YUAN, Z., CHEN, Y., LI, T., YU, C. P. Reaction of silver nanoparticles in the disinfection process. *Chemosphere*. 2013, vol. 93, issue 4, s. 619-625. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.010.
- (54) ATIYEH, B. S., COSTAGLIOLA, M., HAYEK, S. N., DIBO, S. A. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*. 2007, vol. 33, issue 2, s. 139-148. DOI: 10.1016/j.burns.2006.06.010.
- (55) KUMAR, A., MANSOUR, H. M., FRIEDMAN, A., BLOUGH, E. R. (ed.). *Nanomedicine in Drug Delivery*. CRC Press, 2013. 469 p. ISBN 978-1-4665-0616-9.
- (56) RIGO, C., ROMAN, M., MUNIVRANA, I., VINDIGNI, V., AZZENA, B., BARBANTE, C., CAIRNS, W. R. L. Characterization and evaluation of silver release from four different dressings used in burns care. *Burns*. 2012, vol. 38, issue 8, s. 1131-1142. DOI: 10.1016/j.burns.2012.06.013.
- (57) HEBEISH, A., EL-RAFIE, M. H., EL-SHEIKH, M. A., SELEEM, A. A., EL-NAGGAR, M. E. Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, vol. 65, issue 8, s. 509-515. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.071.

- (58) AZIZ, Z., ABU, S. F., CHONG, N. J. A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. *Burns*. 2012, vol. 38, issue 3, s. 307-318. DOI: 10.1016/j.burns.2011.09.020.
- (59) FORDHAM, W. R., REDMOND, S., WESTERLAND, A., CORTES, E. G., WALKER, C., GALLAGHER, C., MEDINA, C. J., WAECTHER, F., LUNK, C., OSTRUM, R. F., CAPUTO, G. A., HETTINGER, J. D., KRCHNAVEK, R. R. Silver as a Bactericidal Coating for Biomedical Implants. *Surface and Coatings Technology*. 2014, vol. 253, issue 3, s. 52-57. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2014.05.013.
- (60) PERERA, S., BHUSHAN, B., BANDARA, R., RAJAPAKSE, G., RAJAPAKSE, S., BANDARA, C. Morphological, antimicrobial, durability, and physical properties of untreated and treated textiles using silver-nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, vol. 436, issue 3, s. 975-989. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.08.038.
- (61) LALLEY, J., DIONYSIOU, D. D., VARMA, R. S., SHANKARA, S., YANG, D. J., NADAGOUDA, M. N. Silver-based antibacterial surfaces for drinking water disinfection — an overview. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2014, vol. 3, issue 3, s. 25-29. DOI: 10.1016/j.coche.2013.09.004.
- (62) VAN HALEM, D., VAN DER LAAN, H., HEIJMAN, S. G. J., VAN DIJK, J. C., AMY, G. L. Assessing the sustainability of the silver-impregnated ceramic pot filter for low-cost household drinking water treatment. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*. 2009, vol. 34, issue 1-2, s. 36-42. DOI: 10.1016/j.pce.2008.01.005.
- (63) QUANG, D. V., SARAWADE, P. B., JEON, S. J., KIM, S. H., KIM, J. K., CHAI, Y. G., KIM, H. T. Effective water disinfection using silver nanoparticle containing silica beads. *Applied Surface Science*. 2013, vol. 266, 1-2, s. 280-287. DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.11.168.
- (64) BIELEFELDT, A. R., STEWART, M. W., MANSFIELD, E., SUMMERS, R. S., RYAN, J. N. Effects of chlorine and other water quality parameters on the release of silver nanoparticles from a ceramic surface. *Water*

- Research*. 2013, vol. 47, issue 12, s. 4032-4039. DOI: 10.1016/j.watres.2013.01.058.
- (65) MIHRANYAN, A., FERRAZ, N., STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*. 2012, vol. 57, issue 5, s. 875-910. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2011.10.001.
- (66) RAJ, S., JOSE, S., SUMOD, U. S., SABITHA, M. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2012, vol. 4, issue 3, s. 186-193. DOI: 10.4103/0975-7406.99016.
- (67) KOKURA, S., HANDA, O., TAKAGI, T., ISHIKAWA, T., NAITO, Y., YOSHIKAWA, T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010, vol. 6, issue 4, s. 570-574. DOI: 10.1016/j.nano.2009.12.002.
- (68) LANSDOWN, A. B. G. *Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010, 280 p. Issues in Toxicology, no. 6. ISBN 978-1849730068.
- (69) HADRUP, N., LAM, H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2014, vol. 68, issue 1, s. 1-7. DOI: 10.1016/j.yrtph.2013.11.002.
- (70) KIM, M. J., SHIN, S. Toxic effects of silver nanoparticles and nanowires on erythrocyte rheology. *Food and Chemical Toxicology*. 2014, vol. 67, issue 1, s. 80-86. DOI: 10.1016/j.fct.2014.02.006.
- (71) BIANCO, C., ADAMI, G., CROSERI, M., LARESE, F., CASARIN, S., CASTAGNOLI, C., STELLA, M., MAINA, G. Silver percutaneous absorption after exposure to silver nanoparticles: A comparison study of three human skin graft samples used for clinical applications. *Burns*. 2014, vol. 40, issue 7, s. 1390-1396. DOI: 10.1016/j.burns.2014.02.003.
- (72) MIETHLING-GRAFF, R., RUMPKER, R., RICHTER, M., VERANO-BRAGA, T., KJELDSEN, F., BREWER, J., HOYLAND, J., RUBAHN, H. G., ERDMANN, H. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2014, vol. 28, issue 7, s. 1280-1289. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.06.005.

- (73) PAUKSCH, L., HARTMANN, S., ROHNKE, M., SZALAY, G., ALT, V., SCHNETTLER, R., LIPS, K. S. Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomaterialia*. 2014, vol. 10, issue 1, s. 439-449. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.09.037.
- (74) LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN J. *Biochemie pro studující medicíny*. 2nd ed. Praha: Karolinum, 2009, 269 s. ISBN 978-802-4614-144.
- (75) EBABE ELLE, R., GAILLET, S., VIDÉ, J., ROMAIN, C., LAURET, C., RUGANI, N., CRISTOL, J. P., ROUANET, J. M. Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague–Dawley rats: Effects on oxidative stress and inflammation. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, vol. 60, issue 1, s. 297-301. DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.071.
- (76) SHARMA, V. K., SISKOVA, K. M., ZBORIL, R., GARDEA-TORRESDEY, J. L. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2014, vol. 204, issue 1, s. 15-34. DOI: 10.1016/j.cis.2013.12.002.
- (77) ARCHER, S. L. Dilated cardiomyopathy and left bundle branch block associated with ingestion of colloidal gold and silver is reversed by British antiLewisite and vitamin E: The potential toxicity of metals used as health supplements. *Canadian Journal of Cardiology*. 2008, vol. 24, issue 5, s. 397-399. DOI: 10.1016/S0828-282X(08)70604-4.
- (78) VOJTKOVÁ, K. *Vliv redukčního agens na granulometrické parametry nanočástic stříbra*. Hradec Králové, 2012. 76 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.