

Funkcionalizace křemičitých nanovláken přírodními látkami s biologickou aktivitou

Bc. Michal Šeps, doc. Ing. Lenka Martinová, CSc.

Abstrakt

Povrchové modifikace materiálů jsou v poslední době stále častěji využívány v mnoha různých odvětvích a stávají se jedním z nejvýznamnějších procesů při návrhu a vývoji nových materiálů a zařízení pro klíčové aplikace. Předkládaná práce se zaměřuje na modifikaci povrchu křemičitých nanovláken s využitím 3-aminopropyltriethoxysilanu a následné využití takto upraveného materiálu k imobilizaci kyseliny tříslové a chlorofylinu. V experimentální části práce byly nalezeny optimální podmínky silylační reakce s cílem maximalizovat koncentrační výtěžek aminoskupin na modifikovaném povrchu a následně ověřeny antibakteriální vlastnosti křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslovou a chlorofylinem.

Úvod

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

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

Předkládaná práce se zaměřuje na přípravu nanovláknenných materiálů na bázi oxidu křemičitého s imobilizovanými biologicky aktivními přírodními látkami. Tyto látky jsou imobilizovány na povrch křemičitých nanovláken po jejich předchozí modifikaci s využitím silylačního činidla 3-aminopropyltriethoxysilanu.

Cílem diplomové práce je podrobně seznámení se s možnostmi imobilizace přírodních látek na povrch křemičitých materiálů s využitím vazebných i nevazebných interakcí. Experimentální část je zaměřena na optimalizaci podmínek silylační reakce s ohledem na koncentrační výtěžnost kovalentně navázaných aminoskupin. V druhé části se pak experimenty zaměřují na imobilizaci vybraných přírodních látek a ověření jejich účinnosti.

Experiment a metody

Silylace křemičitých nanovláken 3-aminopropyltriethoxysilanem

Modifikace povrchu SiO₂ nanovláken byla provedena za účelem navázání vhodných funkčních skupin (-NH₂), které by mohly být dále využity pro imobilizaci přírodních látek. K modifikační reakci byl vybrán 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES), který je pro silylační reakce jedním z nejčastěji využívaných činidel. Při silylační reakci bylo sledováno několik reakčních parametrů, které mohou reakci výrazně ovlivňovat. Jedná se o koncentraci silylačního činidla APTES,

Rozšířený Abstrakt

dobu silylační reakce a teplotu, při které reakce probíhala. Tyto parametry ovlivňovaly výslednou koncentraci aminoskupin kovalentně navázaných na povrch křemičitých nanovláken.

Imobilizace kyseliny tříslivé

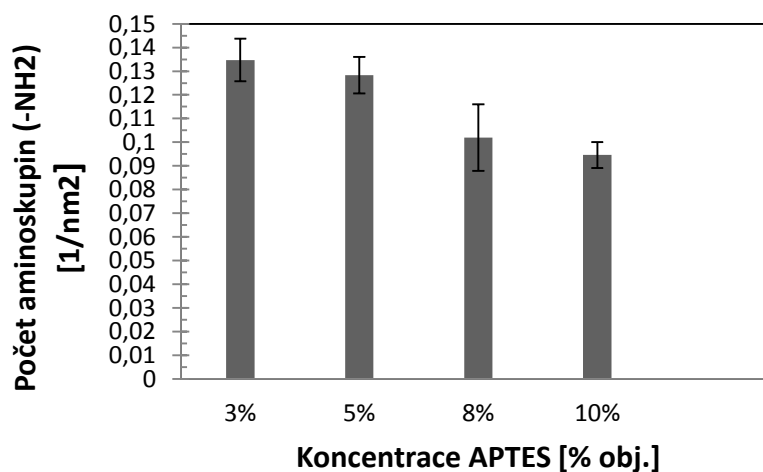
Kyselina tříslivá byla imobilizována na předem modifikovaná křemičitá nanovlákná (SiO_2 -APTES) z jejího roztoku v ethanolu. Pro imobilizaci byly použity roztoky kyseliny tříslivé v koncentracích 1, 3, 5, 10 a 15 % hmotnostních. Kyselina tříslivá byla imobilizována na vzorky o rozměrech 3×3 cm, které byly použity pro kvalitativní testy antibakteriálních účinků, a na vzorky s rozměry 16×14 cm, které byly použity ke kvantitativním testům.

Výsledky a diskuze

Vliv koncentrace silylačního činidla (APTES) na koncentraci navázaných aminoskupin

Sledována byla koncentrace kovalentně navázaných aminoskupin na povrch vrstvy nanovláken oxidu křemičitého po provedené reakci s APTES v závislosti na koncentraci silylačního činidla použitého k modifikaci

Z výsledků je patrné (graf 1), že existuje mezní koncentrace silylačního činidla (5 %), nad kterou již nedochází ke zvýšení počtu detekovatelných aminoskupin. Příčiny pozorování tohoto limitu mohou být dvě. Při reakci s APTES v koncentraci 3 % již zreagují veškeré dostupné hydroxylové skupiny na povrchu a další nárůst koncentrace silylačního činidla se již neprojeví. Druhou možností je, že se zvyšující se koncentrací APTES dojde k navázání takového množství aminoskupin na povrch křemičitých nanovláken, že metoda založená na reakci s methyloranží již není schopná tyto skupiny detekovat vzhledem k omezení počtu navázané methyloranže dané sterickými nároky molekuly barviva. Mírný pokles naměřené absorpance je nejspíše dán rozdíly v morfologii (homogenitě) nanovláknenného materiálu použitého k testování.

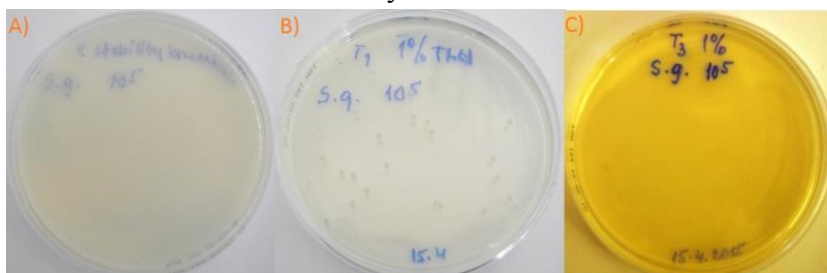


Graf 1: Závislost počtu aminoskupin na koncentraci silylačního činidla APTES

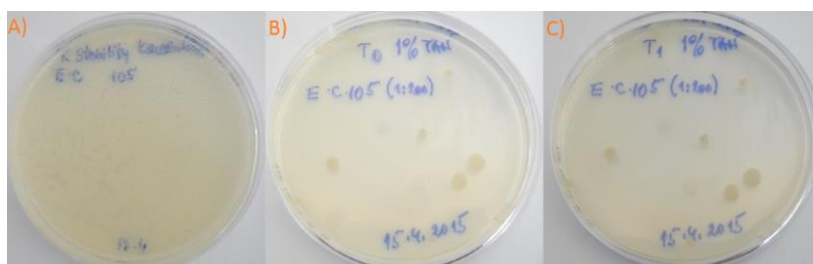
Kvantitativní stanovení antibakteriálních účinků křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslivou

Jak při působení na gramnegativní, tak i na grampozitivní bakterie výsledky potvrzují silné antibakteriální účinky křemičitých nanovláken s imobilizovanou kyselinou tříslivou. To je patrné především u testů s kmeny *Staphylococcus gallinarum*, kde došlo u vzorku materiálu připraveného imobilizací v 1% roztoku kyseliny tříslivé k úplnému usmrcení bakterií, tedy k poklesu o 10^8 bakterií již po 3 hodinách (Obrázek). U stejného materiálu v případě *Escherichia coli* došlo k úplné redukci bakterií až po 24 hodinách, ale k výraznému úbytku bakterií dochází již po třech hodinách působení.

Rozšířený Abstrakt



Obrázek 1: Srovnání počtu kolonií před (A) a po inkubaci SiO₂ nanovláken modifikovaných 1% kyselinou tříslovou v bakteriologickém roztoku - po 1 hodině (B) a po 3 hodinách působení (C) při koncentraci bakterií $1 \cdot 10^5$ kmen *Staphylococcus gallinarum*



Obrázek 2: Srovnání počtu kolonií před (A) a po inkubaci SiO₂ nanovláken modifikovaných 1% kyselinou tříslovou v bakteriologickém roztoku - po 1 minutě (B) a po 1 hodině působení (C) při koncentraci bakterií $1 \cdot 10^5$ a zředění (1:200) kmen *Escherichia coli*

Závěr

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

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

Reference

- [1] MA Z. et. al., *Surface modifications and property analysis of biomedic polymers used for tissue engineering*, Colloids and Surface B: Biointerfaces, 2007, Vol. 60, pp. 137 – 157
- [2] KOSEMO B. et. al., *Biological surface science*, Surface Science, 2002, Vol. 500, pp. 656 – 677
- [3] MOTTOLA A. H., *Chemically Modified Surfaces*, Elsevier, Amsterdam, 1992, 1, ISBN: 978-0447-8930-55
- [4] HAGERMAN E. A., *The Tannin Handbook*, 2011, [online], 23. 3. 2015, URL: <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/tannin.pdf>
- [5] AKIYAMA H. et. al, *Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, Vol.48, pp. 487 – 491
- [6] ŠLAMBOROVÁ I., EXNAR P., *Biomedicínské aplikace anorganických nanovláken na bázi oxidu křemičitého*, 2014, [online], 1. 2. 2014, URL: <http://www.kch.tul.cz/publications/sb35.pdf>