

VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ - TECHNICKÁ UNIVERZITA  
OSTRAVA

Univerzitní studijní programy

Nanotechnologie

**Nanokompozitní organojílové materiály s antimikrobiální účinností**

**The nanocomposite organoclay materials with antimicrobial activity**

Student:

Magdaléna Krčová

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Sylva Holešová, Ph.D.

## Zadání bakalářské práce

Student: **Magdaléna Krčová**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: Nanokompozitní organojílové materiály s antimikrobiální účinností  
The nanocomposite organoclay materials with antimicrobial activity

### Zásady pro vypracování:

Cílem bakalářské práce je příprava a charakterizace nanokompozitních materiálů na bázi jílových minerálů s vázanou účinnou složkou ciclopirox olaminem a určení jejich antimikrobiální aktivity. Experimentální část bude kromě testů antimikrobiální aktivity obsahovat také charakterizaci připravených materiálů pomocí XRD, IR a SEM. V teoretické části práce bude kladen důraz na literární rešerši dle přiložené osnovy.

Doporučený obsah teoretické a experimentální části bakalářské práce:

- struktura a klasifikace jílových minerálů
- antimikrobiální nanokompozity jílových minerálů s vázanou účinnou složkou organické povahy
- ciclopirox olamin - vlastnosti a použití
- experimentální příprava výše uvedených nanokompozitů
- charakterizace nanokompozitů pomocí XRD, IR a SEM
- určení antimikrobiální aktivity připravených nanokompozitů

### Seznam doporučené odborné literatury:

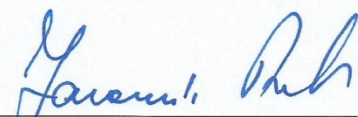
1. WEISS, Z., M. KUŽVART. Jílové minerály: Jejich nanostruktura a využití. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. 278 s. ISBN 80-246-0868-5.
2. VALÁŠKOVÁ, M.. Vybrané vrstevnaté minerály a jejich modifikované nanomateriály. 2. vyd. Brno: CERM Akademické nakladatelství, s.r.o., 2014. 167 s. ISBN 978-80-7204-886-1.
3. HOLEŠOVÁ, S., M. VALÁŠKOVÁ, E. PLEVOVÁ, E. PAZDZIORA, K. MATĚJOVÁ. Preparation of novel organovermiculites with antibacterial activity using chlorhexidine diacetate. J. Colloid Interface Sci. 2010, Vol. 342, No. 2, pp. 593-597.
4. ÖZDEMİR, G., S. YAPART, M.H. LIMONCU. Preparation of cetylpyridinium montmorillonite for antibacterial applications. Applied Clay Science. 2013, Vol. 72, pp. 201-205.
5. HOLEŠOVÁ, S., J. ŠTEMBÍREK, L. BARTOŠOVÁ, G. PRAŽANOVÁ, M. VALÁŠKOVÁ, M. SAMLÍKOVÁ, E. PAZDZIORA. Antibacterial efficiency of vermiculite/chlorhexidine nanocomposites and results of the in vivo test of harmlessness of vermiculite. Materials Science and Engineering: C. 2014, Vol. 42, No. 1, pp. 466-473.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách Centra nanotechnologií.


Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Sylva Holešová, Ph.D.**

Datum zadání: 20.10.2014

Datum odevzdání: 15.05.2015

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.  
vedoucí katedry



  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Petr Noskovič, CSc.  
prorektor pro studium

### **Místopřísežné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a že všechny použité podklady a literární zdroje jsem správně a úplně citovala.

V Ostravě dne 15. 5. 2015

..... Podpis autora

## Prohlášení

Prohlašuji, že

- jsem byla seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního (§ 60 – školní dílo);
- beru na vědomí, že Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevydělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 odst. 3);
- souhlasím s tím, že bakalářská práce bude archivována v elektronické formě v databázi Ústřední knihovny VŠB – TUO a jeden výtisk bude uložen u vedoucí bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO;
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, který byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do její skutečné výše);
- beru na vědomí, že odevzdáním své bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (Zákon o vysokých školách) bez ohledu na výsledek obhajoby.

V Ostravě dne 15. 5. 2015

.....  
Podpis (jméno a příjmení studenta)

## **Poděkování**

Velice ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Sylvě Holešové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

Tato bakalářská práce byla vypracována za finanční podpory následujících projektů: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy, projekt SP 2015/59 a IT4Innovations Centre of Excellence, CZ.1.05/1.1.00/02.0070.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací nanokompozitních organojílových materiálů s antimikrobiální účinností, kdy účinnou antimikrobiální složkou je antimykotikum ciclopiroxolamin. Byly připraveny dvě série vzorků. V prvním případě byl použit jako nosná matrice jílový minerál vermikulit a ve druhém jílový minerál bentonit. Struktura připravených vzorků byla charakterizována pomocí rentgenové difrakční analýzy (RTG), infračervené spektroskopie (IR) a skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Dále byl stanoven obsah organického uhlíku ve vzorcích kompozitů. Antimikrobiální účinnost nanokompozitů byla testována proti bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a dále proti kvasince *Candida albicans* byla vyhodnocena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC).

*Klíčová slova:* vermikulit, bentonit, ciclopiroxolamin, antimikrobiální účinek

Bibliografická citace:

KRČOVÁ, Magdaléna. *Nanokompozitní organojílové materiály s antimikrobiální účinností*. Ostrava, 2015. 44 s. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Ing. Sylva Holešová, Ph.D.

## Abstract

This bachelor thesis is focused on the preparation and characterization of organoclay nanocomposite materials with antimicrobial activity, when active antimicrobial ingredient is an antifungal ciclopiroxolamine. Two series of samples were prepared. In the first case clay mineral vermiculite was used as the supporting matrix and secondly clay mineral bentonite was used. The structure of the prepared samples was characterized by X-ray diffraction analysis (XRD), infrared spectroscopy (IR) and scanning electron microscope (SEM). Furthermore, the content of organic carbon was determined in the composite samples. Antimicrobial activity of nanocomposites was tested against bacterial strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and against yeast *Candida albicans* and it was evaluated by finding minimum inhibitory concentration (MIC).

*Keywords:* vermiculite, bentonite, ciclopiroxolamine, antimicrobial effect

Reference format:

KRČOVÁ, Magdaléna. *The nanocomposite organoclay materials with antimicrobial activity*. Ostrava, 2015. 44 s. Bachelor thesis. Vysoká škola báňská – Technical university of Ostrava. Supervisor Ing. Sylva Holešová, Ph.D.



## Obsah

1	Úvod.....	12
2	Cíl práce.....	13
3	Teoretická část.....	14
	3.1. Jíl a jílové minerály.....	14
	3.2. Struktura vrstevnatých silikátů .....	15
	3.2.1. Tetraedrická síť .....	15
	3.2.2. Oktaedrická síť.....	16
	3.2.3. Typ vrstvy .....	17
	3.2.4. Mezivrství a kationtově výměnná kapacita (CEC).....	18
	3.3. Klasifikace vrstevnatých silikátů .....	19
	3.4. Vybrané vrstevnaté silikáty – typ vrstvy 2:1 .....	19
	3.4.1. Vermikulit.....	20
	3.4.1.1 Využití vermikulitů.....	20
	3.4.2. Montmorillonit.....	21
	3.4.2.1 Využití montmorillonitu .....	21
	3.5. Antimikrobiální nanokompozity jílových minerálů s vázanou účinnou složkou organické povahy.....	21
	3.6. Ciclopiroxolamin – vlastnosti a použití .....	24
4	Experimentální část.....	25
	4.1. Příprava antimikrobiálních kompozitů .....	25
	4.1.1. Použité chemikálie.....	25
	4.1.2. Stanovení výměnné kapacity kationtů (CEC) bentonitu.....	25
	4.1.3. Interkalace antimikrobiální sloučeniny.....	25
	4.2. Metody identifikace a jejich nástroje.....	26
	4.2.1. Rentgenová difrakční analýza.....	26
	4.2.2. Infračervená spektroskopie .....	26
	4.2.3. Skenovací elektronová mikroskopie .....	27
	4.2.4. Stanovení obsahu organického uhlíku .....	27
	4.3. Antimikrobiální testy .....	27
	4.3.1. Pracovní postup.....	27
5	Výsledky a diskuze.....	28
	5.1. Vyhodnocení struktury antibakteriálních kompozitů .....	28
	5.1.1. Rentgenová difrakční analýza.....	28
	5.1.2. Infračervená spektroskopie .....	31
	5.1.3. Skenovací elektronová mikroskopie.....	35

5.1.4.	Stanovení obsahu organického uhlíku .....	36
5.2.	Zhodnocení antimikrobiálních testů .....	38
6	Závěr.....	41
7	Literatura.....	42

## Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektroskopie
BEN	bentonit
CA	chlorhexidin diacetát
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CEC	kationtová výměnná kapacita
CP	cetylpyridium
CPA	ciclopiroxolamin
CTAB	cetyltrimetyl amonium bromid
CS	chitosan
HTCC	<i>N</i> -(2-hydroxyl) propyl-3-trimethylamonium chitosan chlorid
IR	infračervená spektroskopie
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MMT	montmorillonit
OMMT	organický montmorillonit
RTG	rentgenová difrakční analýza
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TDTB	tetradecyltributylfosfonium bromid
UV-VIS	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
VER	vermikulit

# 1 Úvod

Vědní obor nanotechnologie je soubor metod, který se zabývá výzkumem, vývojem, charakterizací a aplikací v měřítku nanometrů alespoň v jednom rozměru (0,1 – 100 nm). Stavebními prvky pro výrobu nových materiálů jsou molekuly nebo samotné atomy.

Nové materiály, které jsou připraveny ze dvou nebo více různých složek, z nichž alespoň jedna se vyskytuje ve formě částic o velikosti jednotek až desítek nanometrů, se nazývají nanokompozitní materiály. Tyto materiály mají jedinečné a odlišné vlastnosti oproti materiálům, u kterých je velikost částic „objemnější“. Nanokompozitní materiály mají velmi široké využití ve zdravotnictví, elektronice, strojírenství, automobilovém, leteckém a vojenském průmyslu, k ochraně životního prostředí a mnoho další.

V předložené bakalářské práci se zabývám přípravou a charakterizací nanokompozitů na bázi jílových minerálů, které slouží jako nosiče pro antimikrobiální složku. Jílové minerály nejsou toxické a mají schopnost vázat jiné látky do vrstevnaté struktury. Jako nosiče antimikrobiální složky jsem ve své práci použila jílové minerály vermikulit a bentonit. Antimikrobiální složkou je ciclopiroxolamin, který se využívá k léčbě kandidózy, dermatofytů, mykózy a vaginální kvasinkové infekce. Připravené antimikrobiální kompozity mohou mít využití jako léčiva s postupným uvolňováním léčivé látky a to zejména pro léčbu infekcí dutiny ústní.

## 2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce byla příprava a charakterizace nanokompozitních organojílových materiálů s antimikrobiální účinností, za použití jílové matrice vermikulitu či bentonitu a antimikrobiální látky ciclopiroxolaminu. Pro charakterizaci struktury připravených materiálů byly použity metody RTG, IR, SEM a dále byl stanoven obsah organického uhlíku. Antimikrobiální vlastnosti byly hodnoceny proti bakteriálním kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a dále proti kvasince *Candida albicans*.

V teoretické části se zaměřuji na literární rešerši přípravy antimikrobiálních nanokompozitů s vázanou složkou organické povahy, strukturu a klasifikaci jílových minerálů.

## 3 Teoretická část

### 3.1. Jíl a jílové minerály

V roce 1995 byla vytvořena definice pro jíl a jílový minerál [1]. Jako jíl se označuje směsný přírodní materiál, primárně složený z jemně zrnitých minerálů, který je při přiměřeném obsahu vody obecně plastický a ztvrdne po vysušení či vypálení. Termín jílový minerál se vztahuje k těm minerálům obsažených v jílech, které jim udělují plasticitu a které se vytvrzují po vysušení či vypálení [1].

Jíly vznikají zvětráváním prvotních horninotvorných minerálů, kdy mezi přírodní minerály v půdách patří živce (60%), pyroxen a amfibol (17%), křemen (12%), slída (4%). Dále vznikají při hydrotermálních procesech a sedimentací. Za jílové minerály můžeme považovat veškeré fylosilikáty, ty mají ve své struktuře jako základní koordinační jednotky tetraedry a oktaedry. Jílové minerály mají nejčastěji částice menší než 2  $\mu\text{m}$ . V mezivrstvi obsahují přírodní jíly anorganický kation a jsou hydrofilní. Po výměně anorganických kationtů za organické kationty se vlastnosti jílových minerálů změní a materiál se stane hydrofobní. Tyto organo-jílové minerály jsou snadno schopné přijmout další molekuly. Mezi další jílové minerály patří skupiny alofánu, některé hydroxidy a oxidy. Ty zajišťují jílu plasticitu, sorpční vlastnosti a po vypálení nebo vysušení se vytvrzují. Jílové minerály mají následující vlastnosti [2-4]:

- **Schopnost sorpce a iontové výměny**

Na struktury jílových minerálů se výměnné kationty ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) váží adsorpcí na přerušené nenasycené vazby na povrchu nebo elektrostaticky do mezivrstevních prostor [3].

- **Schopnost vázat vodu**

Jílové minerály na sebe mohou navázat vodu jako molekuly  $\text{H}_2\text{O}$ , které jsou v pórech mezi částicemi a sorbované na povrchu částic nebo v podobě hydroxylové skupiny  $\text{OH}^-$ , vázané v hydratačních obalech vyměnitelných kationtů v mezivrstevních prostorech [3].

- **Chování při zahřívání**

Jílové minerály při zahřívání nejprve ztratí sorbované molekuly vody (dehydratace) a dále dojde ke ztrátě  $\text{OH}^-$  (dehydroxylace). K destrukci fylosilikátové struktury dochází při teplotách kolem 500 – 800  $^\circ\text{C}$ , při teplotách nad 900  $^\circ\text{C}$  mohou vznikat nové fáze [3].

- **Reakce s organickými látkami**

Jílové minerály jsou schopny pomocí vhodných úprav dobře reagovat s organickými látkami. Takto vznikají organo-jílové komplexy, které se využívají v mnoha odvětvích [3].

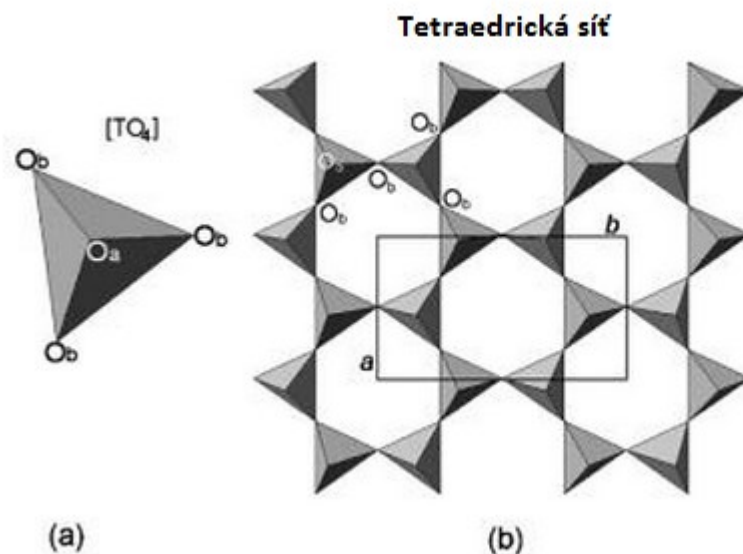
### **3.2. Struktura vrstevnatých silikátů**

Nejvýznamnější skupina minerálů, která je obsažena v zemské kůře, jsou silikáty (křemičitany). Silikáty jsou tvořeny tetraedry  $[\text{SiO}_4]^{4-}$  a kationty vyrovnávajícími záporný náboj tetraedrů ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) [2]. Velkou podskupinu silikátů tvoří právě vrstevnaté silikáty (fylosilikáty). Krystalová struktura vrstevnatých silikátů je složena ze dvou základních prvků, tetraedrů  $[\text{TO}_4]^{m-}$  (kde T jsou centrální kationty tetraedrů) a oktaedrů  $[\text{MA}_6]^{n-}$  (kde M jsou centrální kationty a A anionty oktaedrů) [2], které jsou vzájemně spojeny pomocí atomů kyslíku a vytvářejí síť [2]. Síť tetraedrů jsou spojeny se sítěmi oktaedrů sdílením aniontů a vytváří tak vrstvy. Prostor mezi dvěma vrstvami je označován jako mezivrství. V mezivrství se nachází mezivrstevní materiál (soubor iontů, atomů nebo jejich hydratovaných forem, koordinačních polyedrů či jejich sítí), jež kompenzuje záporný náboj na vrstvách.

#### **3.2.1. Tetraedrická síť**

Tetraedrická síť vzniká z tetraedrů, které jsou spojeny kovalentními vazbami přes vrcholy bazálních atomů kyslíku ( $\text{O}_b$ ). Čtvrtý atom kyslíku (vrcholový,  $\text{O}_a$ ) směřuje na libovolnou stranu kolmo na rovinu sítě tetraedrů. V ideálním případě se tetraedry spojují a vytváří hexagonální symetrii, která je vyobrazena na Obr. 1.

Tetraedrické sítě mohou obsahovat tetraedry  $[\text{SiO}_4]^{4-}$ ,  $[\text{AlO}_4]^{5-}$  nebo  $[\text{FeO}_4]^{5-}$ . Substituce hliníku za křemík v silikátových strukturách nepřesahuje 50%, z tohoto vyplývá, že ze dvou tetraedrů, které mají jednotný kyslík, aspoň jeden z nich má jako středový kationt. Proto jako sousední tetraedry by neměly v centrálních pozicích existovat. Tetraedrická síť je v důsledku rotace deformována, a proto k idealizovanému hexagonálnímu tvaru dochází jen ve výjimečných případech. Hodnota ditrigonalizace je vyjádřena pomocí úhlu rotace tetraedrů  $\alpha$  [2].



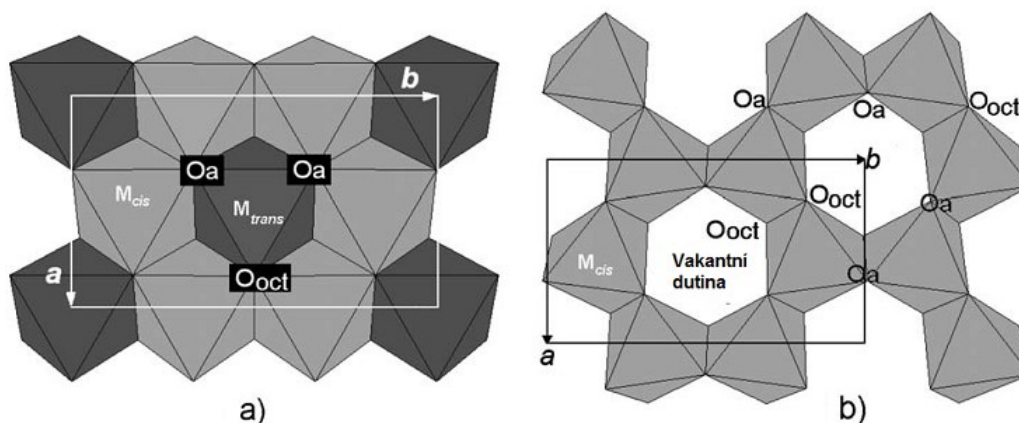
**Obr. 1:** (a) Tetraedr  $[TO_4]^{4-}$ , (b) Tetraedrická síť s vrcholovými ( $O_a$ ) a bazálními ( $O_b$ ) atomy kyslíku. Základní ortogonální buňka  $T_4O_{10}$  je vyznačena pomocí vektorů  $aab$  [5].

### 3.2.2. Oktaedrická síť

V síti oktaedrů (osmistěňů),  $[MA_6]^{n-}$  obklopuje každý centrální atom M (běžně  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) buď šest kyslíkových atomů  $O^{2-}$  nebo hydroxylových aniontů  $OH^-$ . Oktaedry pak spolu sdílí vrcholy a poloviny hran [2]. V sítích oktaedrů může nastat několik případů obsazení či neobsazení centrálních pozic (Obr. 2), proto dělíme oktaedrické síť na:

- *Trioktaedrické síť* – všechny ze tří oktaedrických pozic jsou obsazeny kationty.
- *Dioktaedrické síť* – kationty jsou zaplněny pouze dvě ze tří oktaedrických pozic, třetí pozice je vakantní (neobsazená).
- *Monoktaedrické síť* – dvě ze tří oktaedrických pozic jsou vakantní, třetí pozice je obsazena kationty.





**Obr. 2:** Oktaedrické sítě: a) trioktaedrická, b) dioktaedrická, kde  $O_a$  jsou vrcholové kyslíky tetraedrů a  $O_{oct}$  jsou aniontové pozice mezi sousedícími oktaedry [5].

Toto dělení je používáno pro lepší představu, z definice vyplývá, že počet kationtů je v trioktaedrické síti 3 a v dioktaedrické síti 2. V praxi však jejich součet leží mezi hodnotami 2 a 3. Pro vhodnější rozlišení byla vytvořena „umělá“ hranice, kdy součet kationtů odpovídá 2,5. Proto u dioktaedrické sítě je součet oktaedrických kationtů  $< 2,5$  a u trioktaedrické sítě je součet oktaedrických kationtů  $\geq 2,5$ . Monooktaedrická síť není tak často využívána, protože výskyt těchto sítí není tak častý jako u předešlých [2].

### 3.2.3. Typ vrstvy

Vrstevnaté silikáty se dělí dle typu propojení sítí, kdy může nastat spojení tetraedrické a oktaedrické sítě, nebo k spojení dvou tetraedrických sítí. Spojení dvou tetraedrických sítí nastává přes roviny bazálních kyslíků těchto sítí. Tetraedrické a oktaedrické sítě jsou spojeny přes společnou rovinu kyslíkových atomů, nebo jsou spojeny pomocí vodíkových vazeb mezi bazálními kyslíky tetraedrické sítě a rovinou aniontů  $OH^-$  oktaedrické sítě. Jestliže dojde ke spojení oktaedrické a tetraedrické sítě přes rovinu kyslíkových atomů vznikají dva typy strukturních jednotek:

- Vrstva 1:1** – spojení jedné oktaedrické a jedné tetraedrické sítě, které mají jednu společnou rovinu kyslíkových atomů. Povrch 1:1 vrstev je tedy tvořen bazálními atomy kyslíků tetraedrické sítě a hydroxylovými  $OH^-$  skupinami oktaedrické sítě.
- Vrstva 2:1** – spojení jedné oktaedrické a dvou tetraedrických sítí s opačnou polaritou. Tyto sítě mají společné dvě roviny kyslíkových atomů. Nesdílené atomy kyslíku v tetraedrech vytvářejí dvě roviny bazálních kyslíků [5].

### 3.2.4. Mezivrství a kationtově výměnná kapacita (CEC)

Ve struktuře fylosilikátů je prostor mezi vrstvami označován jako mezivrství a to obsahuje tzv. mezivrstevní materiál. Jedná se o jednomocné či dvojmocné kationty ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , atd.), molekuly vody nebo je tento prostor prázdný a pak jsou vrstvy spojeny pouze pomocí van der Waalsových sil. Mezivrstevní materiál může během chemických reakcí podléhat výměně.

Kationtově výměnná kapacita (CEC) jílu vyjadřuje množství kladných kationtů vázaných na negativní povrch jílového minerálu. CEC se udává v meq/100 g (mili-equivalenty na 100 g jílu) nebo v cmol(+)/kg (centimol kladného náboje na kg jílu). Obě vyjádřené jednotky jsou identické. Kationtová výměna je děj reverzibilní, kationty lze zpětně vyměnit a zjistit jejich uvolněný obsah [5].

Existuje několik popsaných postupů pro zjištění hodnoty CEC [6], kdy se mezi nejběžněji používanými řadí stanovení CEC pomocí adsorpce komplexů anorganických iontů,  $NH_4^+$  iontů či methylenové modře [7-9].

Pro stanovení CEC pomocí adsorpce komplexů anorganických iontů z tekuté fáze je běžně využíván kation  $Cd^{2+}$ . Hodnotu CEC lze stanovit z vícenásobného sycení příslušného jílového minerálu kationtem  $Cd^{2+}$  z vodného roztoku dusičnanu kademnatého. Stanovuje se množství adsorbovaného kationtu  $Cd^{2+}$  do struktury jílového minerálu a to pomocí zpětně vyluhovaného interkalátu v roztoku kyseliny dusičné [7].

Postup stanovení CEC pomocí  $NH_4^+$  iontů spočívá ve vymývání jílu molárním roztokem octanu amonného ( $CH_3COONH_4$ ). Přebytek kationtů  $NH_4^+$  vytěsňuje výměnné kationty, které jsou obsaženy v mezivrství jílu a kationty  $NH_4^+$  zaplní jejich místo. Přebytečné množství octanu amonného je odstraněno pomocí etanolu. Amonné kationty, které byly absorbovány, jsou zpětně nahrazeny chloridem draselným (KCl). Kationty jsou stanoveny z výluhu půdy octanem amonným, ke stanovení amoniakálního dusíku odpovídá výluh půdy chloridem draselným. Tento obsah odpovídá pomocí vhodného vyjádření hodnotě kationtové výměnné kapacity [8].

Další možností stanovení CEC je pomocí methylové modře. Současně probíhají dva možné mechanismy pro zjištění hodnoty CEC. První z nich je výměna iontu, tento mechanismus má chemickou povahu a je nezávislý na koncentraci roztoku. Druhým mechanismem je fyzická adsorpce na povrchu, po ukončení iontové výměny, která je závislá na koncentraci roztoku. Proces probíhá, že vzorky jsou aktivovány s kyselinou chlorovodíkovou a promývány destilovanou vodou, dokud není vzorek bez  $Cl^-$ . Sorpční

kapacita kyseliny aktivovaných prášků byla získána měřením koncentrace kationtů methylové modře v roztoku, za použití UV-VIS spektrofotometru [9].

### 3.3. Klasifikace vrstevnatých silikátů

Fylosilikáty lze rozdělit podle typu vrstev na 1:1 fylosilikáty, u kterých vzdálenost mezi vrstvami odpovídá přibližně 7 Å a na 2:1 fylosilikáty, které mají vzdálenost větší než 9 Å. V tabulce 1 jsou vypsány základní skupiny fylosilikátů dělené dle typu vrstvy a oktaedrické sítě.

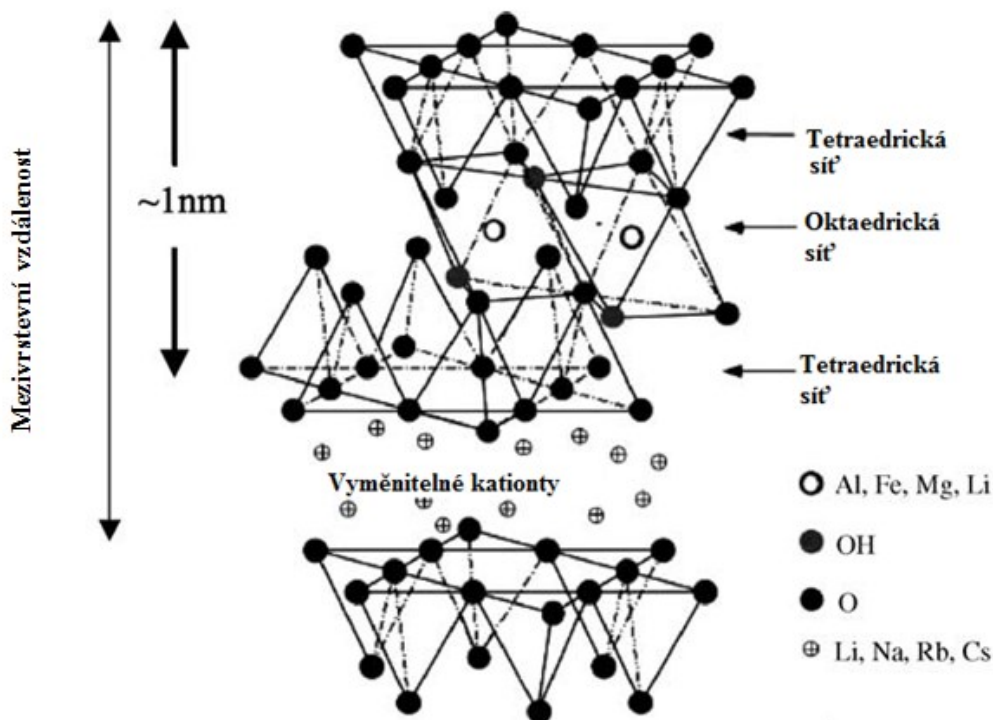
**Tabulka 1.** Klasifikace vrstevnatých silikátů.

<i>Typ vrstvy</i>	<i>Skupina</i>	<i>Typ oktaedrické sítě</i>	<i>Příklady</i>
1:1	serpentinit - kaolinit	tri-	amnestit, serpentinit, lizardit, berthierin, nepouit
		di-	kaolonit, dickit, nakrit, halloysit (planární)
2:1	mastky - pyrofylyty	tri-	mastek, willemseit, kerolit, pimelit
		di-	
2:1	slídy	tri-	annit, siderofylit, biotit
		di-	muskovit, seladonit, illit
2:1	smektity	tri-	saponit, hektorit, saucnit
		di-	montmorillonit, nontronit, beidellit
2:1	vermikulity	tri-	trioktaedrický vermikulit
		di-	dioktaedrický vermikulit
2:1	chlority	tri-, tri-	klinochlor, chamosit, nimit
		di-, di-	donbasit
		tri-, di-	cookeit, sudoit

### 3.4. Vybrané vrstevnaté silikáty – typ vrstvy 2:1

Pro přípravu nejrůznějších kompozitů na bázi jílu jsou nejčastěji používané vrstevnaté silikáty s typem vrstvy 2:1. Jak již bylo řečeno, jejich krystalová struktura je tvořena spojením dvou tetraedrických a jedné oktaedrické sítě (Obr. 3). Tloušťka vrstvy

se pohybuje kolem 1 nm a laterální rozměr těchto vrstev se může pohybovat od 30 nm až do několika  $\mu\text{m}$ , což závisí na konkrétním typu vrstevnatého silikátu.



**Obr. 3:** Struktura 2:1 vrstevnatých silikátů [10].

### 3.4.1. Vermikulit

Vermikulit se v přírodě vyskytuje ve formě šupinkových agregátů a nejčastěji vzniká zvětráváním biotitu, flogopitu nebo muskovitu [11]. Převážně se vyskytuje ve formě trioktaedrické. Jeho struktura je tvořena 2:1 vrstvami, které jsou od sebe vzdáleny okolo 14 Å, což záleží na mezivrstevním materiálu (voda, vyměnitelné kationty). V přírodních vermikulitech převládá v mezivrstevní  $\text{Mg}^{2+}$ , který se do struktury dostal při vzniku vermikulitu, nejčastěji zvětráváním biotitu. Vermikulity mají schopnost přijímat a odevzdávat vodu. Tato schopnost souvisí se změnami ve struktuře mezivrstevní během dehydratace a dehydratace [2, 5].

#### 3.4.1.1 Využití vermikulitů

Jedna z nejvyužívanějších vlastností vermikulitu je jeho schopnost silně expandovat při zahřátí na teplotu 700 °C až 900°C. Svůj objem může zvětšit až dvacetinásobně, přitom jeho objemová hmotnost klesne např. z 640 – 960  $\text{kg/m}^3$  až na 56 – 192  $\text{kg/m}^3$ . Vermikulit,

který je expandovaný je velmi lehký, dobře tepelně a zvukově izoluje, je chemicky inertní, nedráždivý, bez zápachu, neztvrdává a je žáruvzdorný. Především je využíván jako lehčené plnivo využívané u stavebních hmot, k izolaci potrubí a boilerů, dále jako plnivo do žáruvzdorných hmot. Vermikulit je také využíván k zachycení radioaktivního a toxického odpadu [2]. Využíván je dále pro absorpci průmyslových hnojiv, jak nosič pesticidů a herbicidů.

### **3.4.2. Montmorillonit**

Jílový minerál montmorillonit je majoritní složkou smektitů, které jsou především obsaženy v jílové hornině bentonitu. Stejně jako vermikulit je tvořen typem vrstvy 2:1. Rozdíl od vermikulitu je v náboji na vrstvě, který vzniká substitucí především  $Mg^{2+}$  za  $Al^{3+}$  v oktaedrech a je u montmorillonitu nižší než u vermikulitu [2, 5]. Montmorillonit se vyskytuje v mnoha barevných kombinacích narůžovělý, nažloutlý, nazelenalý, nahnědlý. Montmorillonitové částice zaujímají nejčastěji tvar destičkovitý o středním průměru částic 1  $\mu m$ .

#### **3.4.2.1 Využití montmorillonitu**

Montmorillonit (bentonit) má značný stupeň disperzity a hydrofilnosti, díky tomu je velmi využíván ve farmacii a kosmetice. V kosmetickém průmyslu se využívá jako přísada do léčivých mastí, ochranných prostředků proti dráždivým látkám nebo k ošetření podrážděné pokožky a při výrobě toaletního mýdla. Ve farmacii jde o stabilizátory a emulgátory, které jsou přidávány do mastí, pilulek a past [2].

## **3.5. Antimikrobiální nanokompozity jílových minerálů s vázanou účinnou složkou organické povahy**

Přírodní jílové minerály samy o sobě nevykazují antimikrobiální vlastnosti, ale pokud je interkalován materiál s antimikrobiální aktivitou, tak jsou schopny adsorbovat a zabít bakterie a další mikroby. Antimikrobiální jílové materiály jsou děleny dle vázané antimikrobiální složky na anorganické a organické. U anorganických jsou využívány anorganické kationty především těžkých kovů např.  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  [12-16]. Anorganické materiály na bázi jílu jsou přínosné vysokou tepelnou stabilitou, ale nevýhodou je hromadění škodlivých těžkých kovů, což vede ke snížení antibakteriální aktivity.

Organické materiály na bázi jílu vykazují naopak nízkou tepelnou stabilitu. Výhodou je snadné ukotvení a vyhubení bakterií [17,18]. Interkalace léčivé látky do mezivrstevního prostoru jílového minerálu způsobuje, že je léčivá látka rovnoměrně, pozvolna uvolňována a vzrůstá účinnost léčby. Biologická aktivita organických molekul závisí na jejich prostorovém uspořádání (orientaci) atomů v molekule sloučenin. Pomocí jílových minerálů může být zvýšena účinnost některých léčiv. Tuto orientaci lze ovlivnit upevnění organických molekul na vrstvě silikátu [19]. Přírodní jílové minerály jsou hydrofilní, a proto nevykazují afinitu k nepolárním organickým látkám. Vhodnou modifikací lze dosáhnout vytvoření nových struktur, které umožní sorpci nepolárních látek. Modifikace může být provedena výměnnou přirozeně se vyskytujícími anorganickými kationty v mezivrstvích za organické kationty.

Mezi často používané organické sloučeniny s antimikrobiálními vlastnostmi pro modifikaci jílových minerálů patří kvartérní amonné soli, soli chlorhexidinu či chitosan.

Ve vědecké práci [20] bylo prokázáno, že různé typy vstupních montmorillonitů modifikované antibakteriální látkou cetylpyridinem ( $CP^+$ ), mohou být aktivní při odstraňování bakterií z vodného roztoku. Byly použity tři typy montmorillonitu CPAAM (kyselinou aktivovaný montmorillonit), CPSTX-1 (Ca-montmorillonit) a CPSWY-2 (Na-montmorillonit). Antimikrobiální aktivita nemodifikovaných jílu i kompozitů s  $CP^+$  byla testována na bakterii *Salmonella enteritidis*. Antibakteriální účinnost jílu byla testována při různých hodnotách pH, teplotách a koncentracích. Vědci určili, že na antimikrobiální aktivitu nemá podstatný vliv hodnota pH. Naopak při nízkých teplotách je i nízká antimikrobiální činnost. Nemodifikované jíly při testech prokázaly určitou schopnost snížit počty mikroorganismů. Ale naproti tomu jíly, které byly modifikované  $CP^+$ , značně zvýšily schopnost snížit počty bakterií. Na-montmorillonit se ukázal, za neúčinnější antimikrobiální jíl. V podobné práci [21] byl také připraven  $CP^+$ -MMT. Antibakteriální testy byly prováděny proti bakteriálním kmenům *P. aeruginosa* a *S. aureus* na vstupním  $Na^+$ -MMT a modifikovaném  $CP^+$ -MMT. Tyto bakteriální kmeny byly vybrány díky své vysoké odolnosti vůči antibiotikům. Výsledné testy ukázaly, že  $Na^+$ -MMT nevykazoval žádnou antibakteriální aktivitu vůči oběma bakteriím. Připravené vzorky  $CP^+$ -MMT byly účinné proti *S. aureus*, avšak proti *P. aeruginosa* nevykazovaly žádnou antibakteriální aktivitu. Výsledky této práce ukazují, že antibakteriální aktivita souvisí s uvolněným množstvím  $CP^+$  z povrchu jílu.

V práci [22] popsali vědci řešení, které by vedlo k odstranění růstu mikrobů na textilních materiálech. Modifikovali povrch bavlněných vláken antibakteriálními kompozity na bázi montmorillonitu (MMT). Autoři zkoumali antibakteriální aktivitu proti kmenům *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* u přírodního MMT a u organicky modifikovaného jílu, který byl připraven interkalací s kvartérní amoniou solí tetradecyltributylfosfonium bromidem (TDTB). Počet kolonií bakterií *S. aureus* a *E. coli* byl rapidně snížen pro organicky modifikovaný MMT-TDTB, ale překvapivě i v menší míře u přírodního MMT.

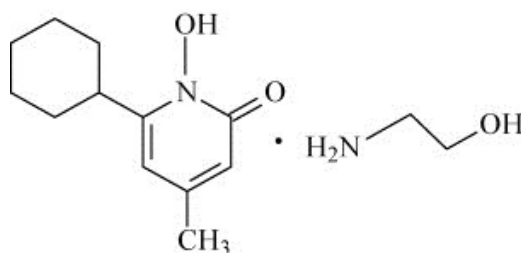
Velmi často využívanou organickou látkou pro přípravu antimikrobiálních organojílů je chlorhexidin diacetát (CA). CA má široké spektrum antibakteriální aktivity, vykazuje okamžitý a dlouhotrvající účinek i proti více bakteriálním kmenům, jako je například gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a gram-negativní bakterie *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Ve vědecké práci [23] byl CA interkalován do mezivrstev montmorillonitu (MMT). Výsledky ukázaly, že se zvyšujícím se obsahem CA se mezivrstevní vzdálenost zvětšuje, což naznačuje, že CA vstoupil do mezivrstev MMT. Při antibakteriálních testech CA/MMT vykázal silnější účinnost proti gram-pozitivním, než gram-negativním bakteriím. *In vitro* studie uvolňování CA z CA/MMT prokázaly, že v počátečních 24 hodinách docházelo k prudkému uvolňování léčiva a poté k pozvolnému uvolňování během 72 hodin. Proto by mohly být jílové materiály v budoucnu využity jako nosiče pro dodávku léků s řízeným uvolňováním. Autoři práce [17] se věnovali ukotvení CA do struktury jiného jílového minerálu a to vermikulitu (VER). Bylo připraveno pět vzorků v různých koncentracích. Antibakteriální aktivita byla pozorována v různých časových intervalech. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) naznačovaly, že všechny studované vzorky i při nejnižší koncentraci byly velmi účinné, i déle než po 24 hodinách. Tento experiment opět poukázal na to, že jíly mohou být použity jako dlouhodobě působící antibakteriální látky.

Autoři práce [24] připravili jednoduchým mícháním v roztoku antimikrobiální nanokompozit chitosanu a vrstevnatého silikátu. Pro dosažení lepšího efektu při interkalaci byl montmorillonit (MMT) nejprve modifikován cetyltrimethyl amonium bromidem (CTAB), čímž došlo ke zvýšení jeho organofilicity. Chitosan (CS) byl z důvodu špatné rozpustnosti ve vodě upraven na derivát *N*-(2-hydroxyl)propyl-3-trimethylamonium chitosan chlorid (HTCC). Následně byly připraveny nanokompozity HTCC/organický MMT (OMMT) v různých hmotnostních poměrech, které vykazovaly silnou antimikrobiální aktivitu. Nanokompozity silně inhibují růst mikroorganismů, včetně gram-

pozitivních bakterií, gram-negativních bakterií a hub. V budoucnosti mohou netoxické a biologicky kompatibilní HTCC/OMMT nanokompozity nahradit některá antibiotika nebo léky, které ničí patogenní bakterie v gastrointestinálním traktu zvířat.

### 3.6. Ciclopiroxolamin – vlastnosti a použití

Ciclopiroxolamin (CPA) je bílý až lehce nažloutlý krystalický prášek, který patří do chemické skupiny hydroxypyridinů (2-aminoethanolová sůl 6-cyklohexyl-1-hydroxy-4-methyl-2(1*H*)-pyridin) (Obr. 4). Jedná se o širokospektrální antimykotikum poprvé syntetizované zhruba před čtyřiceti lety. Zabraňuje výskytu kandidózy, dermatofytům, využívá se k léčbě mykózy, onychomykózy (houbová infekce nehtů) a vaginální kvasinkové infekce. Ciclopiroxolamin je možné aplikovat ve formě léků, gelů, krémů, šampónů nebo ve formě laků na nehty. Vnitřní užití je nebezpečné. Mechanismus účinku ciclopiroxolaminu se liší od jiných lokálních antimykotik, které obvykle působí jako inhibitory ergosterolu. Ciclopiroxolamin má vysokou afinitu vůči trojmocným kationtům kovů, což způsobuje inhibici metaloenzymů, které jsou zodpovědné za degradaci peroxidů uvnitř buněk kvasinek a plísní. Toto se zdá být hlavním faktorem jeho antimikrobiální aktivity. Má silný sterilizační účinek s nízkou toxicitou. Proniká do hlubších vrstev kůže, sliznic a nehtů. Léčivo postrádá systémové nežádoucí účinky, mírné nežádoucí účinky se mohou vyskytovat v podobě pálení pokožky, podráždění, zarudnutí, bolest nebo svědění [25].



**Obr. 4:** Strukturní vzorec ciclopiroxolamin [26].



## 4 Experimentální část

### 4.1. Příprava antimikrobiálních kompozitů

#### 4.1.1. Použité chemikálie

Jako vstupní jílové minerály byly použity přírodní vermikulit (VER) z ložiska Letovice s CEC 140 cmol(+)/kg a bentonit (BEN) dodávaný firmou Kulich Pharma, s.r.o., u kterého byla hodnota CEC zjišťována. Dále byly použity chemikálie: ciclopiroxolamin (CPA, 2-aminoethanolová sůl 6-cyklohexyl-1-hydroxy-4-methyl-2(1*H*)-pyridin, Sigma Aldrich), dusičnan kademnatý ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ), kyselina dusičná ( $\text{HNO}_3$ ) a ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) jako rozpouštědlo.

#### 4.1.2. Stanovení výměnné kapacity kationtů (CEC) bentonitu

K 0,1 g vzorku BEN bylo přidáno 50 ml roztoku dusičnanu kademnatého  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ . Vzniklá suspenze byla třepána po dobu 20 minut a poté byla odstředěna na centrifuze rychlostí 4000 ot/min po dobu 20 minut. Po odstředění byl roztok slit a k pevné fázi bylo přidáno 50 ml čerstvého roztoku  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ , vzorek byl opět třepán a odstředěn. Tento proces byl 5krát opakován. Po pátém sycení byl vzorek přefiltrován pomocí Büchnerovy nálevky přes membránový filtr a promyt 50 ml demineralizované vody. Vzorek byl převeden na Petriho misku a vysušen při teplotě 40 °C. Vysušený vzorek byl rozetřen v třecí misce a zvážen ( $m_n$ ). K vzorku bylo přidáno 100 ml studené 2M  $\text{HNO}_3$  a poté následovalo třepání po dobu 24 hodin. Následný den byl vzorek filtrován a promyt 50 ml horké (60°C) 2M  $\text{HNO}_3$ . Filtrát byl doplněn demineralizovanou vodou na objem 200 ml ( $V_r$ ). Stanovení  $\text{Cd}^{2+}$  iontů bylo provedeno pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS). Výsledná hodnota CEC byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$CEC = \frac{\rho \cdot V_r \cdot Z}{M \cdot m_n}$$

, kde je  $\rho$  hustota (koncentrace) stanovená spektrometrem [mg/l],  $V_r$  objem roztoku [l],  $Z$  náboj iontu,  $M$  molární hmotnost  $\text{Cd}^{2+}$  [g/mol],  $m_n$  hmotnost navážky  $\text{Cd}^{2+}$  montmorillonitu [mg]. Výsledná hodnota CEC pro BEN byla stanovena na 58.2 cmol(+)/kg.

#### 4.1.3. Interkalace antimikrobiální sloučeniny

Celkem byly připraveny dvě série kompozitů s ciclopiroxolaminem (CPA), a to s jílovým minerálem VER a BEN. V každé sérii bylo připraveno pět vzorků, které se lišily

hmotnostním poměrem CPA a jílového minerálu. Modifikace organickou sloučeninou probíhala pomocí následujícího postupu:

Do Erlenmeyerovy baňky (250 ml) byly naváženy 4 g příslušného jílového minerálu, ke kterému bylo přidáno 100 ml demineralizované vody. Do další Erlenmeyerovy baňky (100 ml) bylo naváženo potřebné množství CPA v závislosti na CEC jílu a 25 ml etanolu, aby došlo k rozpuštění. Po rozpuštění byl CPA převeden do Erlenmeyerovy baňky s VER nebo BEN. Takto připravený roztok byl umístěn na elektromagnetickou míchačku, zahřát na teplotu 75 °C a za stálého míchání byl roztok udržován při této teplotě po dobu 6 hodin. Po ukončení tohoto procesu, byl roztok oddělen od pevného podílu pomocí centrifugace při 3500 ot/min po dobu 20 minut. Pevný podíl byl vysušen při 80 °C po dobu 24 hodin. Označení jednotlivých připravených vzorků je znázorněno v Tabulce 2.

**Tabulka 2.** Označení připravených vzorků.

Jílový minerál	Poměr jílového minerálu a CPA				
	0,25 x CEC	0,5 x CEC	1,0 x CEC	1,5 x CEC	2,0 x CEC
VER	VER_CPA (0,25)	VER_CPA (0,5)	VER_CPA (1,0)	VER_CPA (1,5)	VER_CPA (2,0)
BEN	BEN_CPA (0,25)	BEN_CPA (0,5)	BEN_CPA (1,0)	BEN_CPA (1,5)	BEN_CPA (2,0)

## 4.2. Metody identifikace a jejich nástroje

Změny struktury připravených vzorků byly pozorovány pomocí rentgenové difrakční analýzy (RTG), infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Dále byl stanoven obsah organického uhlíku (C%).

### 4.2.1. Rentgenová difrakční analýza

RTG záznamy byly pořízeny na rentgenovém difraktometru Ultima IV RIGAKU (záření CuK $\alpha$ , uspořádání Bragg-Brentano) se scintilačním detektorem. Vzorky (práškové) byly vtlačeny do plochého skleněného držáku. Analýza probíhala v reflexním módu za konstantních podmínek 40 mA, 40 kV, 2,6°/min, rozsah měření 1.5-60° 2 $\theta$ .

### 4.2.2. Infračervená spektroskopie

Ze vzorků byla připravena infračervená spektra (IR), která byla pořízena na přístroji NEXUS 470 s Fourierovou transformací. Všechny vzorky byly měřeny ve formě KBr tablet. Spektrometr byl vybaven IR zdrojem Globar, KBr beam splitterem a DTGS

detektorem. Vzorky byly změřeny při 128 skenech rozlišení  $4 \text{ cm}^{-1}$  v rozsahu 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.3. Skenovací elektronová mikroskopie

SEM snímky byly pořízeny pomocí skenovacího elektronového Philips XL Series 30 a detekce byla provedena pomocí detektoru sekundární elektronů.

#### 4.2.4. Stanovení obsahu organického uhlíku

Obsah organického uhlíku byl stanoven pomocí analyzátoru fázového uhlíku, volné a vázané vody LECO RC612. Vzorky byly naváženy do křemenné lodičky a spalovány v atmosféře kyslíku v teplotním režimu od 100 do 1 000 °C. Uhlík je detekován v IR celách jako  $\text{CO}_2$ .

### 4.3. Antimikrobiální testy

Antimikrobiální testy jednotlivých vzorků byly provedeny ve Zdravotním ústavu Ostrava, Centrum klinických laboratoří.

#### 4.3.1. Pracovní postup

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je nejnižší koncentrace antimikrobiální chemické látky, která zabraňuje bakteriálnímu růstu (% w/v). Tato hodnota byla určena u všech připravených vzorků.

Na mikrotitrační desce s 96 jamkami bylo provedeno ředění a kultivace vzorků. V první sérii jamek byl obsažen příslušný vzorek ve formě 10% (w/v) vodné disperze. Dále byla tato disperze zředěna trojkovou zředovací metodou v glukózovém základu, kdy série jamek od druhé do sedmé obsahovaly vzorek o koncentraci 3.33%, 1.11%, 0.37%, 0.12%, 0.04% a 0.01%. Pro kontrolu obsahovala osmá série čistý roztok glukózy. K připraveným koncentrovaným disperzím antimikrobiálního kompozitu byl přidán pomocí inokulátoru 1  $\mu\text{l}$  glukózové suspenze příslušného kmene bakterií, *Staphylococcus aureus* CCM 3953 ( $1.0 \times 10^9 \text{ cfu ml}^{-1}$ ), *Escherichia coli* CCM 3954 ( $1.1 \times 10^9 \text{ cfu ml}^{-1}$ ) a kvasinky *Candida albicans* ATC 90028 ( $1.2 \times 10^9 \text{ cfu ml}^{-1}$ ), poskytnutých Českou sbírkou mikroorganismů (CCM). Připravená mikrobiální suspenze byla vždy po uplynutí 30, 60, 90, 120, 180, 240 a 300 minut, poté během 5 dní v 24 hodinových intervalech přenesena z každé jamky do 100  $\mu\text{l}$  čerstvého glukózového základu. Bakterie byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. Vzniklým zákalem, který zobrazuje bakteriální růst, byla hodnocena antibakteriální účinnost.

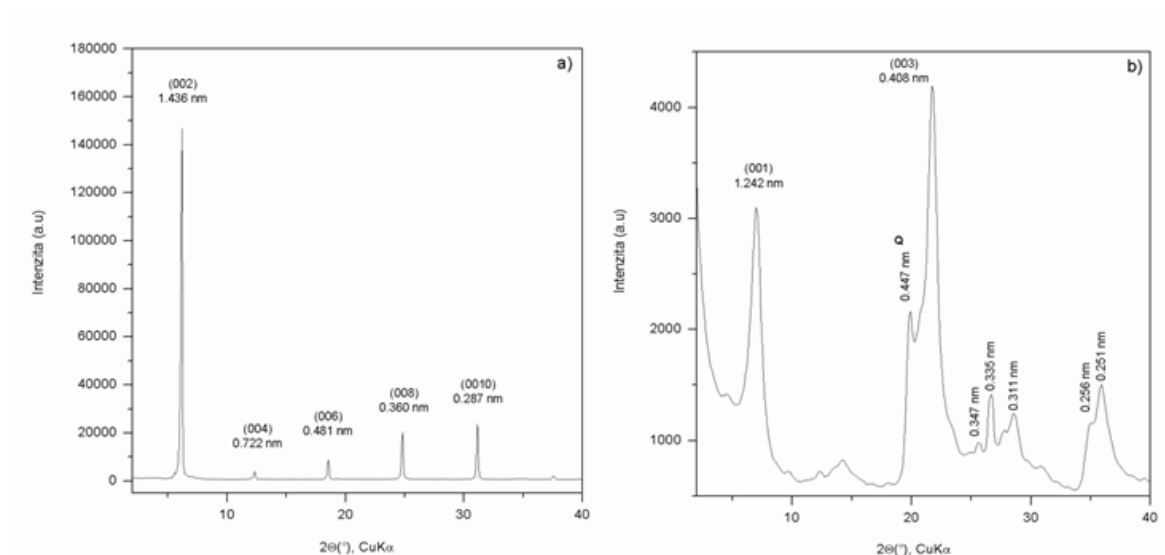
## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1. Vyhodnocení struktury antibakteriálních kompozitů

#### 5.1.1. Rentgenová difrakční analýza

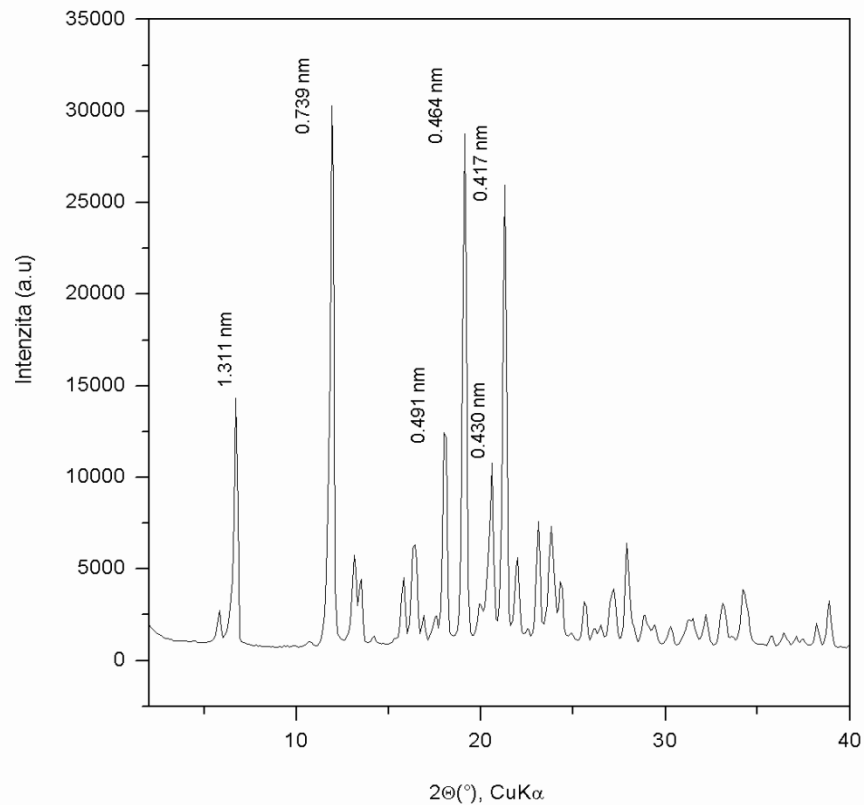
U všech připravených vzorků byly změřeny rentgenové difrakční záznamy. Na Obr. 5 jsou zobrazeny záznamy čistých jílových minerálů VER a BEN, na Obr. 6 CPA, na Obr. 7 modifikované formy VER\_CPA a na Obr. 8 modifikované formy BEN\_CPA.

RTG difrakční záznam původního VER (Obr. 5a) ukazuje intenzivní sekvenci bazálních difrakcí s hodnotou mezivrstevní vzdálenosti  $d(002) = 1.436$  nm, která je charakteristická pro vermikulit. Tato mezivrstevní vzdálenost odpovídá dvěma rovinám molekuly vody okolo  $Mg^{2+}$  kationtů v mezivrství vermikulitu. Na RTG difrakčním záznamu bentonitu (Obr. 5b) vidíme první bazální difrakci  $d(001) = 1.242$  nm odpovídající mezivrstevní vzdálenosti, kterou se vyznačuje především  $Na^+$  forma jílového minerálu montmorillonitu. Hodnota označená  $Q d = 0.447$  nm nám udává, že je ve vzorku BEN obsažena příměs amorfního  $SiO_2$  [27]. Obsah amorfního  $SiO_2$  nám také potvrdily záznamy z IR.



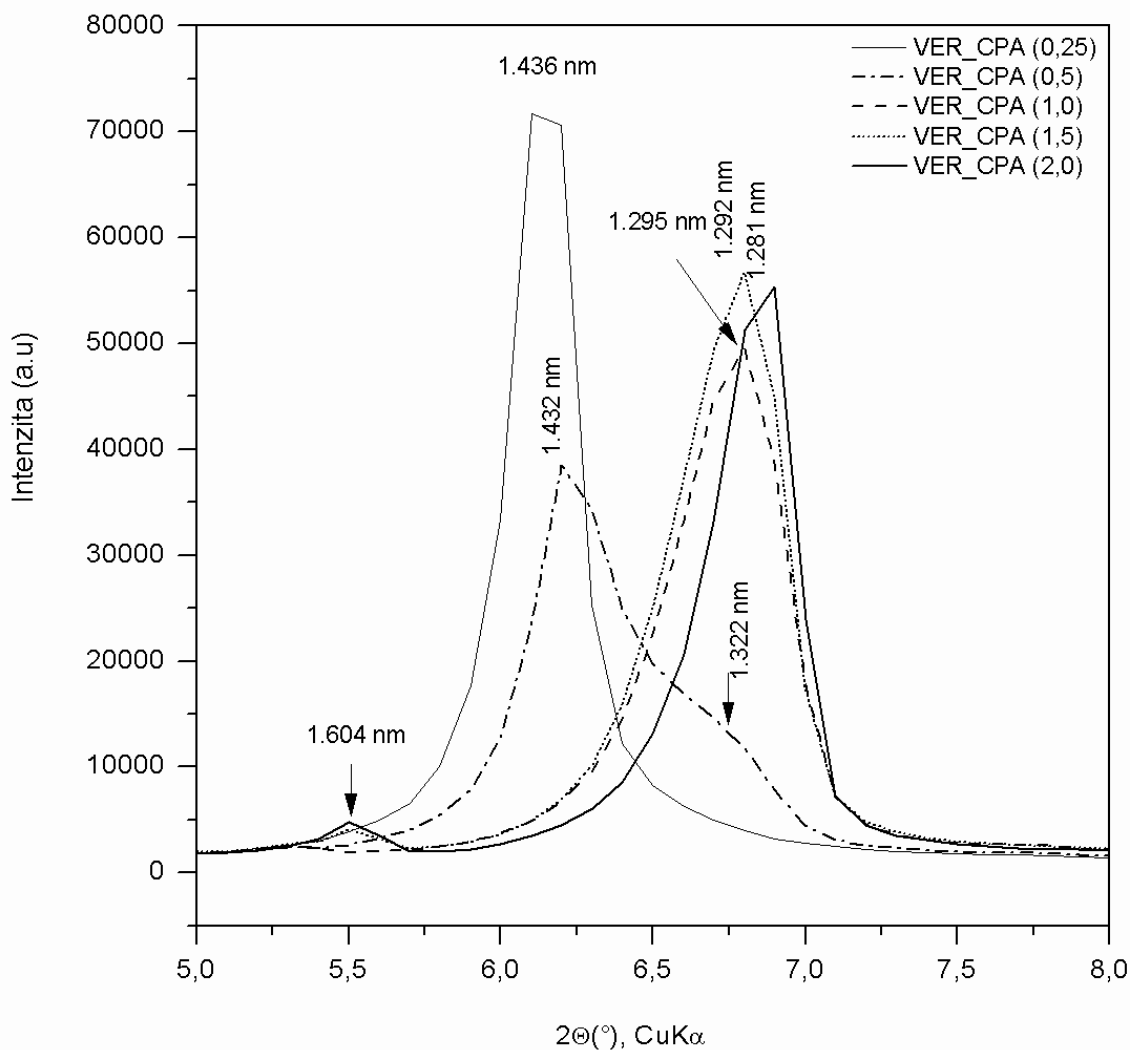
**Obr. 5:** RTG záznamy vzorků a) VER, b) BEN.

Na difrakčním záznamu CPA (Obr. 6) byly vyznačeny nejvýznamnější difrakce, charakterizující ciclopiroxolamin.



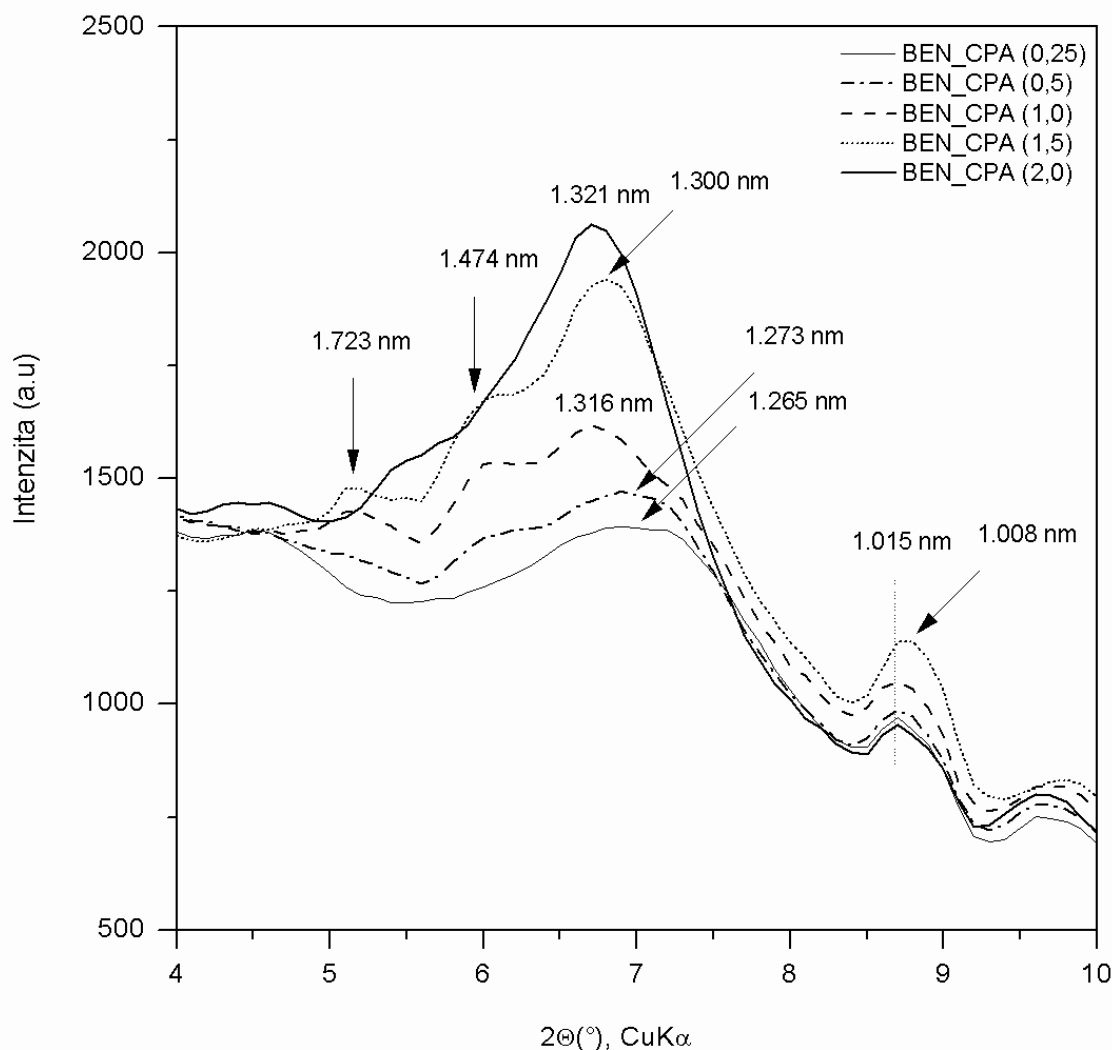
**Obr. 6:** RTG záznam vzorku CPA.

Na Obr. 7 jsou zobrazeny difrakční záznamy vzorků nanokompozitů VER\_CPA. U prvního vzorku s nejnižší koncentrací CPA VER\_CPA (0,25) vidíme, že došlo pouze ke snížení intenzity bazální difrakce jílového minerálu VER. Postupně se zvyšujícím se obsahem CPA dochází k posunu hodnoty bazální difrakce k nižším hodnotám. U VER\_CPA (0,5) se hlavní bazální difrakce zmenšila na hodnotu  $d = 1.432$  nm. Dále u vzorků VER\_CPA (1,0), VER\_CPA (1,5) a VER\_CPA (2,0) se jednotlivé mezivrstevné vzdálenosti snížily na 1.295, 1.292 a 1.281 nm. Hodnoty okolo 1.3 nm naznačují vznik tzv. přechodné fáze vrstev molekul vody (stav mezi dvěma a jednou vrstvou molekul vody), která vzniká interkalací organické sloučeniny a tím dochází k vytěsňování molekul vody z mezivrstev [27]. U vzorků VER\_CPA (1,5) a VER\_CPA (2,0) s nejvyšším zastoupením CPA, můžeme také vidět vznik nového píku v 1.604 nm, tato změna je vysvětlována tak, že CPA plně vytěsnil dvě roviny molekul vody okolo hydratovaných kationtů  $Mg^{2+}$  a s jeho vzrůstající koncentrací se dále vytváří nová fáze s mezivrstevnou vzdáleností 1.604 nm.



**Obr. 7:** RTG záznam modifikovaných VER\_CPA.

Difrakční záznamy vzorků BEN\_CPA jsou znázorněny na Obr. 8. Na snímku lze vidět, že u všech vzorků došlo k posunu hlavních bazálních difrakcí směrem doleva k vyšším hodnotám. Tento posun naznačuje, že CPA vnikl do mezivrství a došlo ke zvětšení mezivrstevní vzdálenosti a to v hodnotách  $d(001)$  od 1.265 do 1.321 nm. U vzorků BEN\_CPA (1,0) a BEN\_CPA (1,5) se objevuje nová difrakce shodnou mezivrstevní vzdálenosti 1.723 nm, která je přiřazována bentonitům s dvojvrstevným uložením interkalovaných molekul [27]. Tento jev paradoxně nepozorujeme u vzorku s očekávaným nejvyšším hmotnostním podílem CPA (BEN\_CPA (2,0)). Tento výsledek však plně potvrzují i další analýzy, IR a především stanovení obsahu organického uhlíku, kdy je v tomto vzorku obsaženo množství uhlíku, blížíící se spíše vzorku BEN\_CPA (0,5).



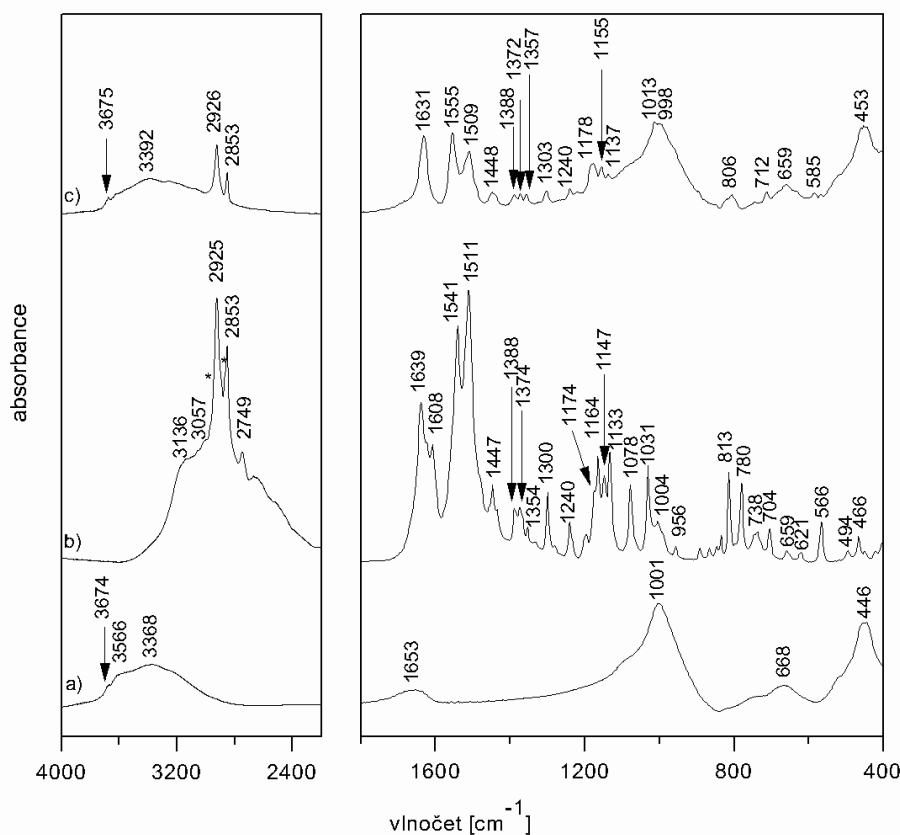
**Obr. 8:** RTG záznam modifikovaných BEN\_CPA.

### 5.1.2. Infračervená spektroskopie

IR spektra byla změřena u vstupních jílových minerálů a dále pro všechny připravené nanokompozity. Na následujících záznamech (Obr. 9, 10) je vždy vyobrazeno kromě spektra vstupního jílu a ciclopiroxolamin pouze jedno vybrané spektrum z odpovídající série vzorků, jelikož spektra jednotlivých kompozitů v dané sérii se liší pouze intenzitou píků v závislosti na koncentraci interkalované sloučeniny, přičemž polohy pásů charakteristických vibrací zůstávají zachovány. Na Obr. 9 jsou vyobrazena IR spektra vzorků a) VER, b) CPA, c) VER\_CPA (1,0), na Obr. 10. jsou vyobrazena spektra a) BEN, b) CPA, c) BEN\_CPA (1,0). Z IR spekter můžeme vyčíst změny, ke kterým dochází v důsledku navázání organické složky na jílovou matici. V Tabulce 3 jsou pro vzorky VER, BEN a CPA shrnuty vlnočty nejvýznamnějších absorpčních pásů a zároveň jejich přiřazení k charakteristickým vibracím, k čemuž byla použita literatura [18, 28].

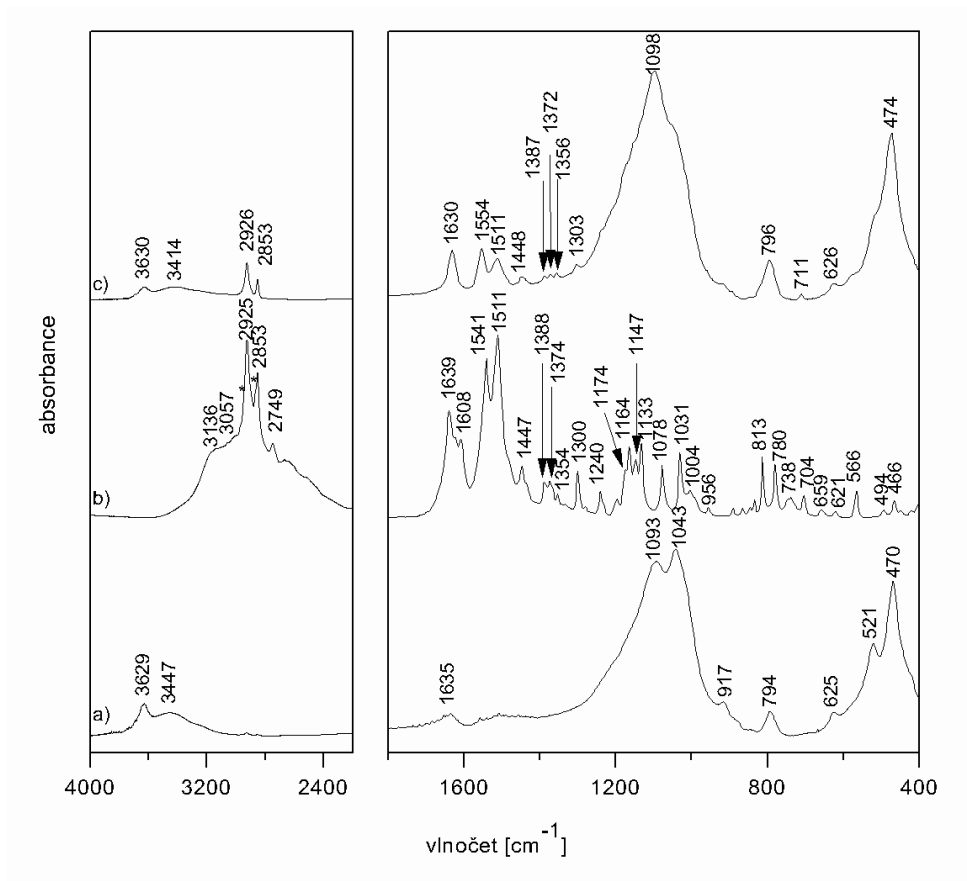
Při porovnání IR spekter vzorků VER (Obr. 9a), CPA (Obr. 9b) a VER\_CPA (1,0) (Obr. 9c) můžeme ve spektru VER\_CPA (1,0) pozorovat posun v oblasti charakteristických valenčních vibrací OH skupin pocházejících z VER ( $3392\text{ cm}^{-1}$ ). Toto vypovídá o interakci, zřejmě pomocí vodíkové vazby, mezi strukturálními OH skupinami VER a OH skupinami CPA, které náleží do amidického uskupení. S tímto jevem také souvisí posun v oblasti odpovídající valenčním vibračním vazby C=O z hodnoty  $1541\text{ cm}^{-1}$  na  $1555\text{ cm}^{-1}$ . Zároveň se v tomto spektru vyskytují další absorpční pásy odpovídající asymetrickým a symetrickým valenčním vibračním C-H skupin, deformačním vibračním C-H skupin, valenčním vibračním N-O a C-N, což také napovídá o přítomnosti CPA.

Na IR záznamu (Obr. 10) můžeme vidět spektra vzorků BEN (Obr. 10a), CPA (Obr. 10b) a BEN\_CPA (1,0) (Obr. 10c). V případě BEN\_CPA (1,0), (Obr. 10c) dochází k obdobné situaci navázání sloučeniny CPA na jílový minerál BEN jako v případě VER. Ve spektru BEN (Obr. 10a) můžeme také pozorovat přítomnost valenční vibrace Si-O s vlnočtem  $1093\text{ cm}^{-1}$ , což vypovídá o přítomnosti amorfního  $\text{SiO}_2$  v tomto jílovém minerálu a potvrzuje se tím také výsledek RTG analýzy, kde je tato fáze viditelná.



**Obr. 9:** IR spektra vzorků a) VER, b) CPA, c) VER\_CPA (1,0).





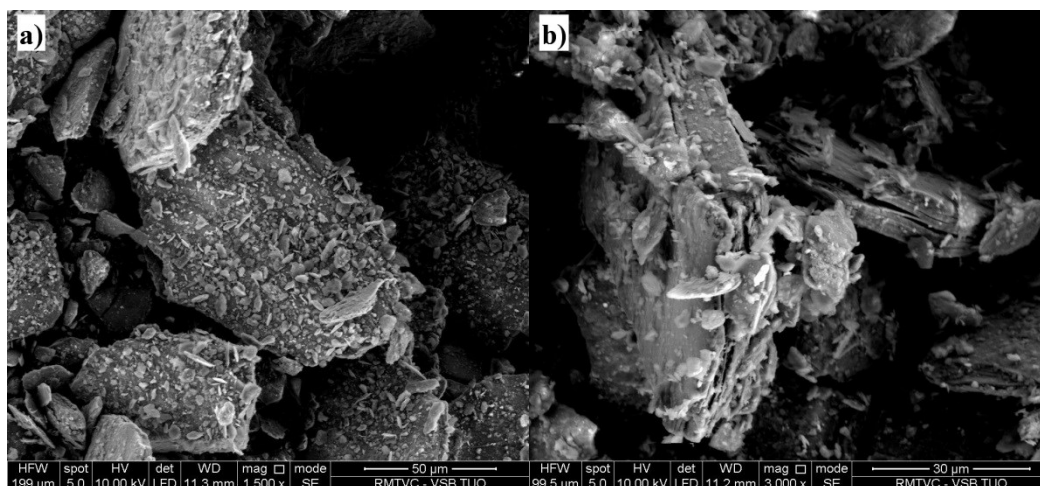
**Obr. 10:** IR spektra vzorků a) BEN, b) CPA, c) BEN\_CPA (1,0).

**Tabulka 3:** Nejvýznamnější vlnočty absorpčních pásů vzorků VER, BEN, CPA a jejich přiřazení charakteristickým vibracím [18, 28].

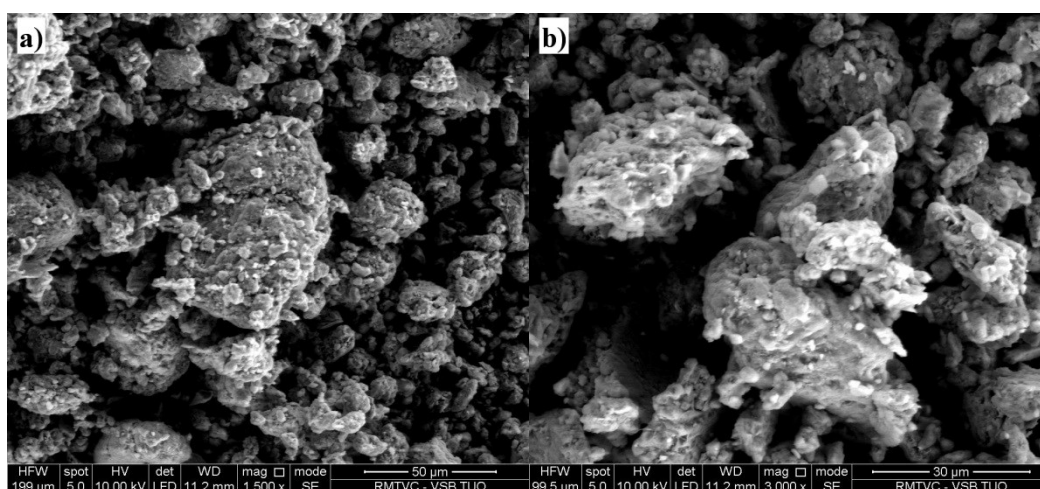
	Vlnočty [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Charakteristická vibrace
VER	3674	Valenční vibrace OH skupin (uskupení $\text{Mg}_3\text{OH}$ )
	3566	Valenční vibrace OH skupin (uskupení $\text{Fe}_2\text{OH}$ )
	3368	Valenční vibrace OH skupin (absorbovaná voda)
	1653	Deformační vibrace OH skupin (absorbovaná voda)
	1001	Si-O valenční vibrace
	668	Deformační vibrace OH skupin
	446	Si-O deformační vibrace
BEN	3629	Valenční vibrace OH skupin (strukturní OH)
	3447	Valenční vibrace OH skupin (absorbovaná voda)
	1635	Deformační vibrace OH skupin
	1093	Si-O valenční vibrace (amorfní $\text{SiO}_2$ )
	1043	Si-O valenční vibrace (strukturní Si-O)
	917	Deformační vibrace OH skupin (uskupení $\text{AlAlOH}$ )
	794	Deformační vibrace Si-O (amorfní $\text{SiO}_2$ )
	521	Deformační vibrace Si-O (uskupení Si-O-Al)
	470	Deformační vibrace Si-O (uskupení Si-O-Si)
CPA	3136	Valenční vibrace OH skupin (uskupení – C=O...H-O-)
	3057	Valenční vibrace C-H skupin (aromatika)
	2925	Asymetrické valenční vibrace C-H skupin (uskupení $-\text{CH}_2-$ )
	2853	Symetrické valenční vibrace C-H skupin (uskupení $-\text{CH}_2-$ )
	*2973	Asymetrické valenční vibrace C-H skupin (uskupení $-\text{CH}_3-$ )
	*2868	Symetrické valenční vibrace C-H skupin (uskupení $-\text{CH}_3-$ )
	2749	Deformační overtone $-\text{CH}_3$ skupiny
	1639, 1541, 1511	Valenční vibrace C=O skupiny (amidické uskupení $-\text{CO-N}$ )
	1608	Deformační vibrace N-H skupin (alifatické aminy)
	1447 - 1354	Deformační vibrace C-H skupin (uskupení $\text{CH}_2$ a $\text{CH}_3$ )
	1300	Valenční vibrace N-O
	1240	Valenční vibrace C-N
	1174 - 1133	Deformační vibrace N-H skupin (primární alifatické aminy), C-H skupin (alifatické uhlovodíky)
1078	Valenční vibrace O-H (primární alkohol)	

### 5.1.3. Skenovací elektronová mikroskopie

Snímky pořízené pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, nám umožnily srovnání morfologie částic jílových minerálů s modifikovanými vzorky. Výsledné snímky (Obr. 11 a Obr. 12) vykazují přírodní jílové minerály VER a BEN. Na Obr. 11b lze při větším zvětšení vidět vrstevnatou strukturu vermikulitu. Tuto skutečnost nepozorujeme v případě vzorku BEN (Obr. 12), což je zřejmě způsobeno příměsí amorfního  $\text{SiO}_2$ .

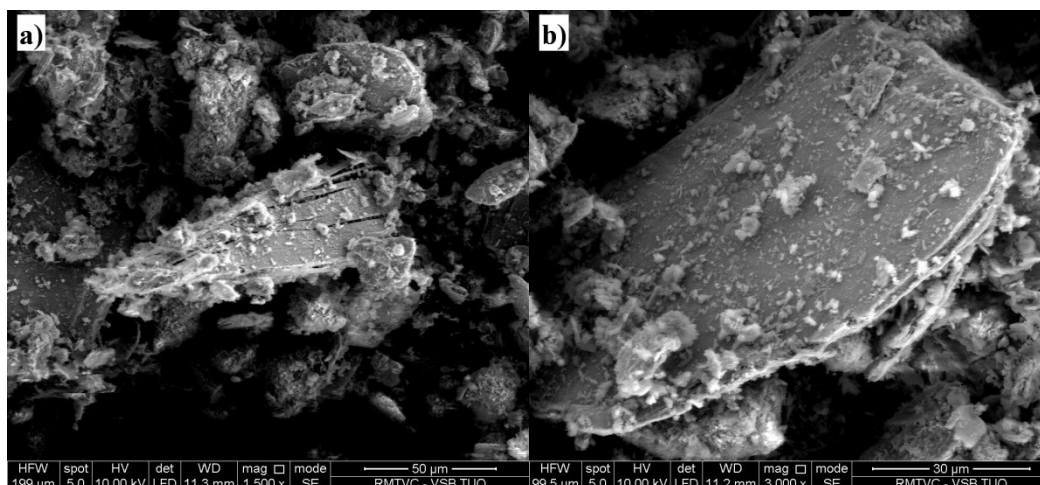


**Obr. 11:** SEM snímky vzorků a) VER zvětšení 1500x, b) VER zvětšení 3000x.

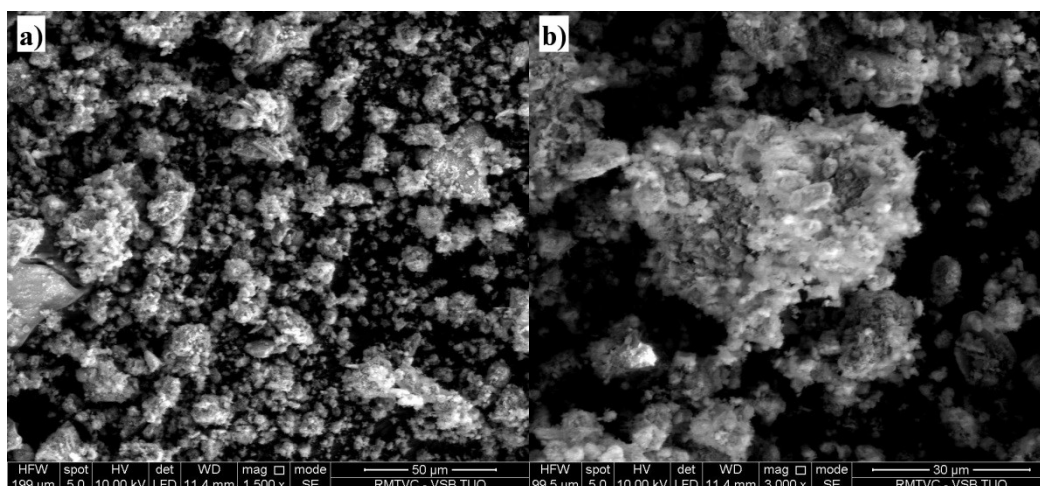


**Obr. 12:** SEM snímky vzorků a) BEN zvětšení 1500x, b) BEN zvětšení 3000x.

Z Obr. 13a je patrné, že došlo ke zmenšení mezirnovinné vzdálenosti, proti původnímu vermikulitu. Toto zmenšení mezirnovinné vzdálenosti nám potvrdily i RTG difrakční záznamy. Na snímku Obr. 14a lze vidět, že po modifikaci došlo ke zjemnění částic.



**Obr. 13:** SEM snímky a) VER\_CPA (1,0) zvětšení 1500x, b) VER\_CPA (1,0) zvětšení 3000x.



**Obr. 14:** SEM snímky a) BEN\_CPA (1,0) zvětšení 1500x, b) BEN\_CPA (1,0) zvětšení 3000x.

#### 5.1.4. Stanovení obsahu organického uhlíku

Přírodní jílové minerály neobsahují žádný organický uhlík. Z výsledku měření (Tabulka 4) připravených vzorků, lze vidět došlo k interkalaci organické látky CPA do jílového minerálu. U vzorku vermikulitů, lze vidět, že se zvyšujícím se obsahem CPA roste i hodnota obsaženého uhlíku. U série vzorku bentonitu se také hodnota obsahu organického uhlíku zvětšuje. Avšak u nejvyšší koncentrace (BEN\_CPA (2,0)) došlo k poklesu hodnoty. Tohoto jevu lze pozorovat i u RTG difrakčních záznamů a na IR záznamech.

**Tabulka 4:** Naměřené hodnoty organického obsahu uhlíku.

vzorek	C [%]
VER_CPA (0,25)	4.27
VER_CPA (0,5)	8.90
VER_CPA (1,0)	16.36
VER_CPA (1,5)	19.86
VER_CPA (2,0)	24.37
BEN_CPA (0,25)	3.78
BEN_CPA (0,5)	7.24
BEN_CPA (1,0)	12.52
BEN_CPA (1,5)	13.71
BEN_CPA (2,0)	8.86

## 5.2. Zhodnocení antimikrobiálních testů

Antimikrobiální aktivita připravených vzorků byla testována proti gram-pozitivnímu bakteriálnímu kmeni *Staphylococcus aureus*, gram-negativnímu bakteriálnímu kmeni *Escherichia coli* a kvasince *Candida albicans*. Výsledné hodnoty MIC jsou uvedeny v tabulkách 4, 5 a 6, v časových intervalech (30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 1 den až 5 dní po 24 h).

U gram-negativního kmene *S. aureus* můžeme v krátkých časových intervalech zaznamenat slabou, u některých vzorků i nulovou antimikrobiální aktivitu. Avšak po 24 h a delších časových intervalech dochází k poklesu hodnot MIC k nízkým koncentracím. U vzorku VER\_CPA (0,25) nebyla během měření zaznamenána žádná antimikrobiální aktivita (Tabulka 4). Účinnější se jeví série vzorků připravená z jílového minerálu bentonitu. Zde se po 2 dnech dostáváme až na nejnižší MIC 0.014 %w/v a to již se vzorkem BEN\_CPA (0,5).

Obdobné výsledky jako v případě *S. aureus* jsme obdrželi u gram-negativního kmene *E. coli* (Tabulka 5). Opět nebyla zaznamenána žádná antimikrobiální aktivita u vzorku VER\_CPA (0,25) a dále u vzorku VER\_CPA (0,5).

Testováním vzorků na aktivitu proti kvasince *Candida albicans* jsme zaznamenali účinnost u všech vzorků série v časových intervalech delších než 24h. Opět se zvyšujícím se obsahem CPA a v delších časových intervalech sledujeme pokles MIC (Tabulka 6), kdy znovu série připravená na BEN vykazuje lepší výsledky.

Obecně lze tedy shrnout, že vzorky připravené z bentonitu mají větší antimikrobiální účinnost, než vzorky obsahující vermikulit. Tento jev je velice zajímavý z toho hlediska, že ačkoli v případě série připravené na BEN vstupuje do reakcí nižší množství účinné složky CPA než v případě VER (počítáno na hodnotu CEC), vykazuje série s BEN lepší antimikrobiální chování. Antimikrobiální aktivita tak zřejmě souvisí nejen s obsahem účinné složky, ale také s uspořádáním dané sloučeniny na jílové matici. Pokles hodnoty MIC je zaznamenán kromě vzorků VER\_CPA (0,25) a VER\_CPA (0,5) u všech vzorků série. Hodnota MIC klesá nejvýrazněji u obou bakteriálních kmenů a u kvasinky v časovém úseku 300 minut až 24 hod. V tomto časovém rozmezí nejsme přesně schopni určit aktivitu z provozních důvodů laboratoře. Dále u všech měřených vzorků je patrné, že se zvyšujícím se obsahem CPA hodnota MIC klesá.

**Tabulka 4:** *Staphylococcus aureus*.

vzorek/čas	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	300 min	1 den	2 dny	3 dny	4 dny	5 dní
VER_CPA (0,25)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VER_CPA (0,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.33	-
VER_CPA (1,0)	-	-	-	-	-	-	-	1.11	0.37	0.37	0.37	0.37
VER_CPA (1,5)	10	10	10	10	10	10	10	0.37	0.041	0.041	0.041	0.12
VER_CPA (2,0)	10	10	10	10	10	10	10	10	0.12	0.12	0.12	0.12
BEN_CPA (0,25)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12	0.12	0.12	0.12
BEN_CPA (0,5)	10	10	10	10	10	10	10	10	0.014	0.014	0.014	0.014
BEN_CPA (1,0)	10	10	10	10	10	10	10	10	0.014	0.014	0.014	0.014
BEN_CPA (1,5)	-	-	10	10	10	10	10	0.041	0.014	0.014	0.014	0.014
BEN_CPA (2,0)	10	10	10	10	10	10	10	0.12	0.014	0.014	0.014	0.014

**Tabulka 5:** *Escherichia coli*.

vzorek/čas	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	300 min	1 den	2 dny	3 dny	4 dny	5 dní
VER_CPA (0,25)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VER_CPA (0,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VER_CPA (1,0)	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10
VER_CPA (1,5)	-	-	-	-	-	-	-	10	3.33	10	0.37	0.37
VER_CPA (2,0)	-	-	10	10	10	10	10	10	3.33	3.33	0.041	0.041
BEN_CPA (0,25)	-	-	-	-	-	-	-	10	10	1.11	0.37	0.37
BEN_CPA (0,5)	10	10	10	10	10	10	-	10	3.33	3.33	0.12	0.12
BEN_CPA (1,0)	-	-	-	-	-	-	-	10	3.33	3.33	0.12	0.12
BEN_CPA (1,5)	10	10	10	10	10	10	10	3.33	3.33	0.014	0.014	0.014
BEN_CPA (2,0)	10	10	10	10	10	10	10	3.33	3.33	0.37	0.12	0.12

**Tabulka 6:** *Candida albicans*.

vzorek/čas	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	300 min	1 den	2 dny	3 dny	4 dny	5 dní
VER_CPA (0,25)	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	10	10
VER_CPA (0,5)	-	-	-	-	-	-	-	1.11	3.33	3.33	0.12	0.12
VER_CPA (1,0)	-	-	10	10	10	10	10	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
VER_CPA (1,5)	10	10	10	10	10	10	10	0.12	0.12	0.041	0.041	0.041
VER_CPA (2,0)	10	10	10	10	10	10	10	0.37	0.041	0.041	0.041	0.041
BEN_CPA (0,25)	-	10	10	-	-	-	-	1.11	0.12	0.041	0.041	0.041
BEN_CPA (0,5)	10	10	10	10	10	-	10	3.33	0.041	0.041	0.041	0.041
BEN_CPA (1,0)	10	10	10	10	10	3.33	3.33	0.37	0.041	0.041	0.014	0.014
BEN_CPA (1,5)	-	10	10	10	10	10	10	10	0.014	0.014	0.014	0.014
BEN_CPA (2,0)	10	10	10	10	10	10	10	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014



## 6 Závěr

Cílem bakalářské práce byla příprava nanokompozitních organojílových materiálů s antimikrobiální účinností. Jako nosná matrice byl použit vermikulit a bentonit, jako antimikrobiálně aktivní látka ciclopiroxolamin. Změny struktury byly studovány metodami rentgenové difrakční analýzy (RTG), infračervené spektroskopie (IR) a skenovací elektronovou mikroskopií (SEM). Dále proběhlo stanovení obsahu organického uhlíku a porovnání antimikrobiální aktivity.

Výsledky všech analýz potvrzují, že došlo k navázání léčivé látky na vrstevnatou strukturu obou jílových minerálů.

Antimikrobiální účinnost byla stanovena pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC). Testy byly prováděny na bakteriálních kmenech *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* a kvasince *Candida albicans*. Z výsledků je patrné, že tyto vzorky jsou především aktivní v dlouhých časových intervalech. Ve všech případech jsme obdrželi o něco lepší výsledky se sérií připravenou na jílovém minerálu bentonitu, přestože ve srovnání s vermikulitem se na tento jílový minerál navázalo menší množství aktivní složky. Z toho lze usoudit, že nezáleží jenom na obsahu aktivní látky, ale také na jejím uspořádání na jílové matrici.

Výsledky antimikrobiálních testů připravených nanokompozitů napovídají o možnostech využití u léčiv s postupným uvolňováním léčivé látky pro léčbu infekcí, např. dutiny ústní.

## 7 Literatura

- [1] GUGGENHEIM, S., Martin, R. T. Definition of clay and clay mineral: joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees. *Clays and clayminerals*, 1995, 43.2: 255-256.
- [2] WEISS, Z. *Jílové minerály: jejich nanostruktura a využití*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0868-5.
- [3] BARABASZOVÁ, K. *Nanotechnologie a nanomateriály*. Ostrava: Tiskárna Schenk, 2006, 158 s. ISBN 80-248-1210-X.
- [4] WEISS, Z., Simha Martynková G., Šustai O. *Nanostruktura uhlikatých materiálů*. Vyd. 1. Ostrava: Repronis, 2005, ii, 132 s. ISBN 80-7329-083-9.
- [5] VALÁŠKOVÁ, M. *Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich modifikované nanomateriály*. Vyd. 1. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012, 148 s. ISBN 978-80-7204-811-3.
- [6] BERGAYA, F., Lagaly, G., Vayer, M. Cation and anion Exchange. In. BERGAYA, F., THENG, B. K. G, LAGALY, G., (Eds.): *Handbook of Clay Science*. Elsevier. 2006, vol. 1, s. 979-1001. ISBN 978-0-08-044183-2.
- [7] HONĚK, D. *Charakterizace strukturních vlastností vermikulitů po acidifikaci*. Ostrava, 2013. 39 s. Diplomová práce. Vysoká škola báňská – Technická Univerzita Ostrava.
- [8] *Laboratorní výuka z výživy rostlin* [online]. 2010, 26. 1. 2010 [cit. 2015-03-9]. Dostupné z WWW:[http://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/laborator/index.php?N=1&I=3&J=10&K=0](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/laborator/index.php?N=1&I=3&J=10&K=0)
- [9] YENER, N., Biçer C., Önal M., Sarıkaya Y. Simultaneous determinativ of cation Exchange capacity and surface area of acid activated bentonite powders by methylene blue sorption. *Applied Surface Science* [online]. 2012, vol. 258, issue 7, s. 2534-2539 [cit. 2015-03-16].
- [10] SINHA R., Okamoto Suprakas a Masami. Polymer/layered silicite nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science*. 2003, vol. 28, issue 11, s. 1539-1641.
- [11] VALÁŠKOVÁ M., Simha Martynková G. Vermiculite: Structural properties and examples of the use. In: *Clay Minerals in Nature – Their Characterization*,

- Modification and Application. INTECH open science/open minds. 2012, s. 207-238. ISBN 978-953-51-07738-5.
- [12]MAGANA, S. M., et al. Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2008, 281.1: 192-199.
- [13]VALÁŠKOVÁ, M., et al. Preparation and characterization of antibacterial silver/vermiculites and silver/montmorillonites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010, 74.22: 6287-6300.
- [14]ZHOU, Y., et al. Antimicrobial ability of Cu<sup>2+</sup> - montmorillonite. *Applied clay science*, 2004, 27.3: 215-218.
- [15]DRELICH, J., et al. Vermiculite decorated with copper nanoparticles: Novel antibacterial hybrid material. *Applied Surface Science*, 2011, 257.22: 9435-9443.
- [16]TAN, S.Z., Zhang,K.H., Zhang, L.L., Xie, Y.S., Liu Y.L. Preparation and Characterization of the Antibacterial Zn<sup>2+</sup> or/and Ce<sup>3+</sup> Loaded Montmorillonites. *Chinese J. Chem.* 2008; 26: 865-869.
- [17]HOLEŠOVÁ, S., et al. Preparation of novel organovermiculites with antibacterial activity using chlorhexidine diacetate. *Journal of colloid and interface science*, 2010, 342.2: 593-597.
- [18]HOLEŠOVÁ, S., et al. Antibacterial activity of organomontmorillonites and organovermiculites prepared using chlorhexidine diacetate. *Applied Clay Science*, 2013, 83: 17-23.
- [19]*Vesmír: přírodovědecký časopis* [online]. 2000 [cit. 2015-01-25]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/jily-nejen-v-optoelektronice-a-farmacii>
- [20]HERRERA, P., R.C. BURGHARDT a T.D. PHILLIPS. Adsorption of Salmonella enteritidis by cetylpyridinium-exchanged montmorillonite clays. *Veterinary Microbiology*. 2000, vol. 74, issue 3, s. 259-272.
- [21]ÖZDEMİR, G.; Yapar, S.; Limoncu, M. H. Preparation of cetylpyridinium montmorillonite for antibacterial applications. *Applied Clay Science*, 2013, 72: 201-205.
- [22]MARYAN, SadeghianA., MontazerM. Natural and organo-montmorillonite as antibacterial nanoclays for cotton garment. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2014, in press. [cit. 2015-03-19].
- [23]MENG, Na, Zhou N., Zhang S.,SHEN J. Controlled release and antibacterial activity chlorhexidineacetate (CA) intercalated in montmorillonite. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, vol. 382, 1-2, s. 45-49 [cit. 2015-03-19].

- [24] WANG, X., et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of quaternized chitosan/organic montmorillonite nanocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007, 84 A, s. 384-390.
- [25] SUBISSI, A., Monti D., Togni G., Mailland F. Ciclopirox. *Drugs*. 2010, vol. 70, issue 16, s. 2133-2152.
- [26] LI, J., Jiang Y., SUN T., RENS. Fast and simple method for assay of cyclopiroxolamine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, vol. 47, 4-5, s. 929-933.
- [27] VALÁŠKOVÁ, M. *Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich modifikované nanomateriály*. 2., dopl. a opr. vyd. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2014, 167 s. ISBN 978-80-7204-886-1.
- [28] SOCRATES, G., *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts*, Vyd. 3, Chichester: John Wiley & Sons Inc., 2001, 366 s. ISBN 978-0-470-09307-2.