

Příprava mikro a sub-mikro struktur na bázi biodegradabilních materiálů na bázi polyesteru pro kontrolované uvolňování agrochemikálií

Bc. Martin Hájek

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin Hájek**

Osobní číslo: **T15246**

Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava mikro a submikro struktur z biodegradabilních materiálů na bázi polyesteru pro kontrolované uvolňování agrochemikálií**

Zásady pro vypracování:

1. Připravit sérii mikročástic plněných vybraným herbicidem lišící se různými charakteristickými parametry.
2. Charakterizovat částice pomocí dostupných technik.
3. Provést experiment uvolňování aktivní látky ve vodném prostředí a dle získaných výsledků měnit parametry přípravy za účelem dosažení požadovaných uvolňovacích profilů.
4. Provést literární rešerši a zpracovat výsledky experimentů do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. M.e Kah, T. Hofmann, Nanopesticide research: Current trends and future priorities. Environment International 63 (2014) 224?235.
2. S. Freiberg, X.X. Zhu. Polymer microspheres for controlled drug release. International Journal of Pharmaceutics 282 (2004) 1?18.
3. P. Stloukal, P. Kucharczyk, V. Sedlarik, P. Bazant, M. Koutný. Low Molecular Weight Poly(lactic acid) Microparticles for Controlled Release of the Herbicide Metazachlor: Preparation, Morphology, and Release Kinetics. J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 4111?4119.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petr Stloukal, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

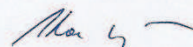
Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HÁJEK MARTIN

Obor: 102 P

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10.5.2017



¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na zkoumání možností přípravy mikrosystémů z biorozložitelných materiálů pro kontrolované uvolňování agrochemikálií. Částice byly připraveny z biorozložitelných kopolyesterů PBAT a PBSA s enkapsulovanou herbicidní látkou Clomazonem. Během práce byl zkoumán zejména vliv síťování arabské gumy a želatiny, které byly použity jako stabilizátory emulze během přípravy, na výsledné počáteční uvolnění clomazonu tzv. „burst efekt“ a kinetiku uvolňování. Připravené částice byly podrobeny charakterizaci pomocí SEM a byl stanoven obsah clomazonu v jejich struktuře a účinnost enkapsulace. Následně byly provedeny testy uvolňování Clomazonu ve vodném prostředí. Velikost takto připravených částic se pohybovala v řádech mikrometrů s velkým podílem zesíťovaných stabilizátorů na povrchu částic. Během přípravy bylo taktéž dosaženo poměrně vysoké účinnosti enkapsulace clomazonu. Bylo zjištěno, že použitím síťovacího činidla dochází k určité redukci burst efektu ve srovnání s částicemi, kde nebyly stabilizátory na povrchu zesíťované. Velikost burst efektu se taktéž liší v závislosti na množství použitého síťovacího činidla. Rovněž se ukázalo, že zvolené polymery velmi silně zapouzdřují účinnou látku, která se uvolňuje jen velice pomalu.

Klíčová slova: postupné uvolňování, PBSA, PBAT, želatina, arabská guma, metoda odpaření rozpouštědla, herbicid, clomazone

ABSTRACT

The work presented herein is focused on investigation of the preparation of microsystems from biodegradable materials for controlled release of agrochemicals. Particles were prepared from biodegradable PBAT and PBSA copolyesters with encapsulated herbicide Clomazone. In particular, the effect of the crosslinking of Arabic gum and Gelatine, which were used as emulsion stabilizers during particles preparation, on the initial release of clomazone known as "burst effect" and release kinetics, was investigated. The prepared particles were subject to SEM characterization and the content of Clomazone in their structure and encapsulation efficiency was determined. Subsequently, the release tests of Clomazone were performed in an aqueous medium. The size of the particles was evaluated in the range of micrometer with the high amount of cross-linked stabilizers on the surface of the particles. During preparation a relatively high efficiency of encapsulation of Clomazone has also been achieved. It has been found that the use of a crosslinking agent results in certain reduction in burst effect in comparison with the particles where the stabilizers have not been cross-linked. The burst effect also varied in dependence on the amount of crosslinking agent applied. It has also been shown that the selected polymers very strongly encapsulated the active substance, which is released in very slow rate.

Keywords: controlled release, PBSA, PBAT, gum arabic, gelatin, solvent evaporation technique, herbicide, clomazone

Chtěl bych poděkovat mé rodině za podporu během studií. Rovněž bych rád poděkoval Ing. Petru Stloukalovi, Ph.D. za profesionální vedení diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 POLYMERNÍ MIKRO A SUB-MIKROSTRUKTURY	12
1.1 DRUHY MIKROSTRUKTUR	12
1.1.1 Mikrosféry	12
Mikrokapsle.....	12
2 METODY PŘÍPRAVY MIKROSTRUKTUR	14
2.1 METODA ODPAŘENÍ ROZPOUŠTĚDLA	14
2.1.1 Systém O/W	14
2.1.2 Systém O/O	15
2.1.3 Systém S/O/W	15
2.2 MATERIÁLY POUŽÍVANÉ PRO PŘÍPRAVU ČÁSTIC	15
2.2.1 Kyselina polymléčná (PLA).....	15
2.2.2 Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové PLGA	16
2.2.2.1 Dvoustěnné systémy využívající PLA a PLGA.....	16
2.2.3 Polyhydroxybutyrát.....	16
2.2.3.1 Mikročástice poly (3-hydroxybutyrátu) pro postupné uvolňování	17
2.2.4 Polybutyrát adipát tereftalát PBAT	17
2.2.5 Polybutylen sukcinát PBSA	17
2.3 OVLIVŇOVÁNÍ VYLUHOVACÍCH PROFILŮ.....	18
2.4 MECHANIZMY UVOLŇOVÁNÍ ZAPOUZDŘENÉ LÁTKY	18
2.5 EFEKT RYCHLÉHO POČÁTEČNÍHO NÁRŮSTU KONCENTRACE AKTIVNÍ LÁTKY	19
2.6 LÁTKY PRO ÚPRAVU POVRCHU ČÁSTIC	21
2.6.1 Želatina.....	21
2.6.1.1 Použití želatiny jako povrchové látky v praxi	21
2.6.2 Arabská guma.....	21
2.6.2.1 Systémy pro postupné uvolňování látek se zaměřením na zdravotně nezávadné látky.....	22
2.6.3 Škrob	22
2.7 PESTICIDY	22
2.7.1 Rozdělení herbicidů	23
2.7.1.1 Selektivní herbicidy	23
2.7.1.2 Neselektivní herbicidy	23
2.8 HERBICIDY PRO MIKROSYSTEMY PRO POSTUPNÉ UVOLŇOVÁNÍ	24
2.8.1 Příklady herbicidů	24
2.8.1.1 Roundup (glyfosát)	24
2.8.1.2 Metazachlor	25
2.8.1.3 Triclopyr	25
2.8.1.4 Klomazon.....	26
2.8.2 Vliv herbicidů a pesticidů na životní prostředí	26
3 REALIZOVANÉ PRÁCE SE ZAMĚŘENÍM NA MIKROČÁSTICE	28

3.1	PŘÍPRAVA DVOUSTĚNNÝCH MIKRO ČÁSTIC PRO POSTUPNÉ UVOLŇOVÁNÍ LÉKŮ	28
3.2	MIKROČÁSTICE PLGA PRO POSTUPNÉ UVOLŇOVÁNÍ	28
3.3	SYSTÉMY PLGA MIKROČÁSTIC PRO UVOLŇOVÁNÍ LIPOFILNÍCH LÁTEK	29
3.4	OPTIMALIZACE SLOŽENÍ ČÁSTIC PRO DOSAŽENÍ CO NEJLEPŠÍHO VYLUHOVACÍHO PROFILU BEZ BURST EFEKTU	29
3.5	NANOKAPSLE PRO POSTUPNÉ UVOLŇOVÁNÍ HERBICIDŮ	30
II	PRAKTICKÁ ČÁST	31
4	MATERIÁL A POSTUP PŘÍPRAVY	32
4.1	CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE.....	32
4.1.1	Chemikálie pro přípravu a charakterizaci částic	32
4.1.2	Chemikálie pro uvolňovací testy.....	32
4.1.3	Přístroje	33
4.2	PŘÍPRAVA ČÁSTIC.....	33
4.2.1	Částice stabilizované směsí arabské gumy a želatiny	33
4.2.2	Vytvrzování stěn částic-glutaraldehydové síťování	34
4.3	CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH ČÁSTIC.....	34
4.4	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ ZAPOUZDŘENÉHO CLOMAZONU.....	34
4.4.1	Reakce probíhající během Lassaignovy zkoušky	35
4.4.2	Herbicidní plnění částic (herbicide loading, HL).....	35
4.4.3	Účinnost enkapsulace.....	35
4.5	ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA.....	35
4.6	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	36
4.7	UVOLŇOVACÍ TESTY.....	36
4.7.1	Příprava uvolňovacího média.....	36
4.7.2	Podmínky pro uvolňování	36
4.8	HPLC.....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
5.1	MORFOLOGIE ČÁSTIC	37
5.2	HERBICIDNÍ PLNĚNÍ A ÚČINNOST ENKAPSULACE	41
5.3	UVOLŇOVACÍ TESTY.....	42
5.3.1	Mikrosystémy připravené z PBSA.....	42
5.3.2	Mikrosystémy připravené z PBAT.....	43
5.4	ANALÝZA ČÁSTIC PO VÝLUHU	44
	ZÁVĚR	46
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	47
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	52
	SEZNAM OBRÁZKŮ	53
	SEZNAM TABULEK.....	54

ÚVOD

Polymerní mikrosystémy jsou perspektivním odvětvím vědy nacházejícím uplatnění v mnoha praktických aplikacích. Hlavním cílem těchto aplikací je zapouzdření účinné látky do struktury polymeru a ve vhodném prostředí ji uvolnit definovaným způsobem. Při styku polymerní částice s vodou vznikne koncentrační gradient mezi částicemi a okolním prostředím. Zapouzdřená látka začne difundovat do okolí. Jakmile dojde k degradaci polymerní matrice, dojde k uvolnění zbytku látky inkorporované v polymeru. Aby nedošlo k nežádoucímu prudkému uvolnění látky v nevhodný okamžik, je nutné připravované mikročástice patřičným způsobem upravit. Vhodnou volbou chemicko-fyzikálních vlivů na povrch výsledných částic je možné předejít tzv. burst efektu, tedy prudkému nárůstu koncentrace látky v prvních okamžicích vyluhování. Všechny tyto vlastnosti jsou rovněž uplatňovány v zemědělství. Pokud je zapouzdřen do polymerní matrice herbicid, jeho postupným uvolňováním je docíleno požadované koncentrace k vyvolání herbicidního účinku bez toxického vlivu na okolní půdní osídlení. Tato práce je zaměřena na povrchovou úpravu částic z biodegradabilních polymerů se zapouzdřeným herbicidem. Uvolňovacími testy byla zjištěna efektivita povrchové úpravy částic. [1], [2], [3]

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERNÍ MIKRO A SUB-MIKROSTRUKTURY

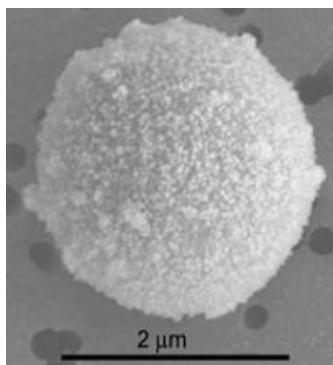
Polymerní částice o velikosti v mikrometrech až nanometrech mají nesporně vysoký potenciál využití v zemědělství a medicínských aplikacích. Využívá se zde možnosti kontrolovaného uvolňování látky zapouzdřené nebo sorbované ve struktuře částice. Pokud se jedná o biodegradabilní částice, dojde k jejich rozložení na neškodné látky. To je důležité zejména v případě medicínských aplikací, kdy dochází k uvolňování látky na buněčné úrovni. V zemědělských aplikacích se mikročástice využívají kvůli dosažení dlouhodobé účinné koncentrace pesticidu bez toxického vlivu na oživení půdy. Další vítanou vlastností těchto polymerních částic je ochrana samotné účinné látky zapouzdřené v částicích. Nedochozí k foto oxidaci, zvětrávání a je zaručena snadná manipulace s takto připraveným systémem. [4]

1.1 Druhy mikrostruktur

Jak již bylo naznačeno, při zkoumání polymerních mikro a sub mikro systémů je účinná látka zapouzdřena v polymerní matici. Avšak způsob provedení zmíněné enkapsulace má zásadní vliv na uvolňovací profil zkoumaného systému. V praxi jsou rozlišovány dva druhy polymerních mikrostruktur. Podle způsobu přípravy částic vznikají buď mikrosféry nebo mikrokapsle.

1.1.1 Mikrosféry

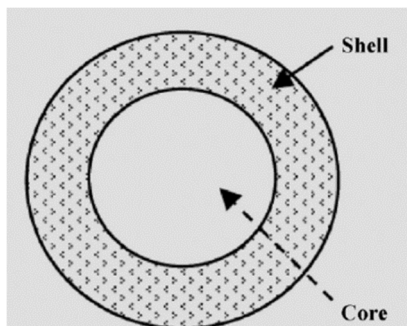
Jedná se o druh mikročástice, který je v ideálním případě tvořen sférickou částicí s homogenní strukturou v celém jejím objemu. Takto vzniklá částice je při vhodné optimalizaci podmínek značně porézní. Díky tomu lze do její struktury zapouzdřit látky, které budou později uvolněny, jakmile se částice dostane do vhodného prostředí. [5]



Obrázek 1 Příklad mikrosféry **Mikrokapsle**

Mikrokapsle je dalším z příkladů mikrosystémů, do nichž lze zapouzdřit účinnou látku za účelem postupného uvolňování. V tomto případě

se jedná o dvousložkovou částici. V jejím nitru je jádro obsahující zapouzdřenou účinnou látku. Toto jádro je obklopeno vnější stěnou. Ve vhodném prostředí dochází k postupné degradaci vnější ochranné vrstvy a později k uvolnění vnitřního obsahu. [5]



Obrázek 2 Příklad mikrokapsle

2 METODY PŘÍPRAVY MIKROSTRUKTUR

Při volbě vhodné metody přípravy mikročástic je nutné zohlednit fyzikální vlastnosti látky, která se má do polymeru enkapsulovat. V praxi byly vyzkoušeny a zavedeny různé metody přípravy částic. Principiálně jsou si metody velmi podobné. V první ze dvou fází jsou emulgovány roztoky polymerů či monomerů ve vhodném prostředí. Následuje polymerační reakce, vysrážení polymerů odstraněním rozpouštědla, případně změna rozpustnosti polymeru v daném rozpouštědle.

Příklady metod používaných pro tvorbu mikročástic:

- Metoda odpaření rozpouštědla
- Emulgace a následné vysolení
- Emulgace a difuze rozpouštědla
- Iontová gelace

Jedna z nejvhodnějších metod pro přípravu částic je metoda odpaření rozpouštědla. Při jejím použití vznikají mikrosféry. [6], [7]

2.1 Metoda odpaření rozpouštědla

Prvním krokem při aplikaci této metody je vytvoření směsi polymeru a účinné látky ve vhodném rozpouštědle. Jednu z variant této metody lze rozdělit do několika kroků. V prvním kroku se polymer rozpustí v rozpouštědle, které není mísitelné s vodou. V roztoku polymeru je následně rozpuštěna nebo dispergována látka, která se má v polymeru enkapsulovat. Následuje vznik lipofilní fáze, která je pomocí povrchově aktivních látek emulgována do kontinuální vodné fáze. Při tomto kroku vzniká emulze O/W, kde O je označení pro olejovou fázi a W pro vodnou fázi. Rozpouštědlo se v posledním kroku odpařuje, a jeho úbytkem polymeru formují mikročástic. K urychlení vypařování je možné snížit v nádobě tlak pomocí vývěvy. Vzniklé částice se následně odstředí, propláchnou a lyofilizují kvůli šetrnému odstranění vody. [5]

2.1.1 Systém O/W

Systém oil in water využívá nerozpustnosti roztoku polymeru ve vodě. Na rozhraní fází dochází ke vzniku mikro emulze, ze které jsou mikrosféry získávány po odpaření rozpouštědla. Je využíváno různých povrchově aktivních látek, které stabilizují povrch mikrosfér. Jejich

povrch lze následně upravovat pro dosažení co nejlepších vyluhovacích profilů. Použití této metody je vhodné pro lipofilní účinné látky. Hydrofilní látky mají při přípravě částic tendenci přecházet do vodné fáze a snižovat tak účinnost enkapsulce. Tento systém byl využíván i při této diplomové práci, kdy bylo s výhodou využito všech jeho vlastností příznivých pro enkapsulaci používaných látek. [5]

2.1.2 Systém O/O

V tomto případě je vodná fáze nahrazena fází nemísitelnou pro druhou organickou fází. Touto látkou mohou být oleje nebo netěkavá rozpouštědla. Výhodou je vyšší účinnost enkapsulace, protože je možné zamezit úniku účinné látky do dispergační fáze. [5]

2.1.3 Systém S/O/W

Zkratka v názvu systému se skládá ze slov solid/oil/water. Tento systém slouží pro enkapsulaci látek nemísitelných v organické fázi. Účinná látka je nejprve rozmělněna, například pomocí kryogenního mletí. Po získání částic účinné látky o velikosti maximálně několik mikrometrů dochází k emulzifikaci a dispergaci látky obdobným způsobem, jako u výše popsaných systémů. [5]

2.2 Materiály používané pro přípravu částic

Využití bio rozložitelnosti polymerních materiálů lze využít jak na poli zdravotnictví, tak i v zemědělských odvětvích. Bylo publikováno nespočet studií na téma mikročástice pro postupné uvolňování léků in vivo. V těchto případech byla biodegradabilita materiálů alfou a omegou celého výzkumu. Lze proto s výhodou využít poznatků z těchto prací a využívat vlastností některých látek, které nebudou zátěží pro životní prostředí. Mezi nejčastěji využívané materiály pro tvorbu mikročástic slouží kyselina polyléčná (PLA) či její kopolymer s kyselinou glykolovou (PLGA) [25]. Další vhodné materiály pro potřeby této diplomové práce jsou PBSA a PBAT. Jako stabilizátory při přípravě částic byly použity látky, jako je želatina, arabská guma či PVA.

2.2.1 Kyselina polyléčná (PLA)

PLA je zástupce biodegradabilních polyesterů. Vyrábí se ze škrobnatých plodů, jako je kukuřice či tapioka. Zdrojové suroviny slouží jako zdroj monomerů pro přímou kondenzaci a vzniku polyesteru, nebo je využíváno potupu otevírání laktidového kruhu. Vzniká tak poly-

mer s vynikajícími vlastnostmi, jako je mechanická pevnost a průhlednost. Její rozklad probíhá mechanismem alkalické nebo kyselý hydrolyzy esterových vazeb. Je využívána jako surovina pro výrobu obalových materiálů. Její vlastnosti jako materiál pro mikrosystémy jsou velmi výhodné, zejména biologická rozložitelnost. [21], [30], [31]

2.2.2 Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové PLGA

Jedná se o syntetický polymer schválený od Food and Drug Administration (FDA) pro použití v medicínských in vivo aplikacích. Vyrábí se polymerací kyseliny mléčné a glykolové za použití katalyzátorů na bázi cínatých sloučenin. Je rovněž biodegradabilní a biologicky dobře dostupný. K rozkladu dochází vlivem molekul vody. Čas rozkladu závisí na vzájemném poměru jednotlivých monomerů. Čím více je v polymeru zastoupena kyselina glykolová, tím kratší čas je zapotřebí k hydrolyze. Používá se jako materiál pro výrobu vláken vstřebatelných stehů pro chirurgické aplikace. Tento polymer se také využívá pro přípravu mikročástic s vhodným vyluhovacím profilem. [32], [33]

2.2.2.1 Dvoustěnné systémy využívající PLA a PLGA

Výzkumníci [21] se zaměřili na vylepšení drug loadingu a charakteristik postupného uvolňování proteinů pomocí dvoustěnných mikrostruktur. Byly vytvořeny částice s vnitřní složkou obsahující účinnou látku. Vnější stěnu tvořila vrstva jiného polymeru bez obsahu účinné látky. V této studii byly použity dva druhy polymerů. Pro vnitřní strukturu byl použit PLGA, vnější stěnu tvořila kyselina polymléčná PLA. Pro syntézu částic bylo použito dvou různých rozpouštědel. PLGA bylo rozpuštěno v dichlormethanu, PLA v ethyl-acetátu. Použitím této kombinace rozpouštědel byla minimalizována možnost opětovného narušení již připravené vnitřní vrstvy, protože PLGA se v etAC nerozpouští. Výhodou tohoto systému je rovněž možnost kontrolovaně regulovat tloušťku vnější stěny. Vyluhovací profily ukazují, že po několikadenní lagové fázi nastává postupné uvolňování látky do prostředí. Výzkumníci tím vyřešili problém nízké životnosti proteinů a nutnost jejich opakované aplikace. Dvoustěnné systémy umožňují postupnou dodávku účinné látky po dobu několika měsíců.

2.2.3 Polyhydroxybutyrát

PHB je dalším ze zástupců biodegradabilních polymerů. Z chemického hlediska se jedná o polyester. Nejen, že se jedná o biologicky rozložitelný polymer, je také přírodního původu. Někteří zástupci mikroorganismů, například *Ralstonia eutrophus* či *Bacillus megaterium*,

syntetizují PHB jako svůj metabolit. Jeho využití v zemědělských aplikacích je proto velmi příznivé. Půdní mikroorganismy jako *Aspergillus fumigatus* jsou schopné PHB rozkládat. Je rozpustný v chlorovaných uhlovodících. Jedná se rovněž o biodegradabilní polymer, který se jeví jako vhodný kandidát pro přípravu systémů s postupným uvolňováním. [34]

2.2.3.1 Mikročástice poly (3-hydroxybutyrátu) pro postupné uvolňování

Studie [22] se zabývala vývojem systémů pro postupné uvolňování hovězího sérového albuminu (BSA). Metodou odpaření rozpouštědla byly připraveny částice obsahující BSA. Díky tomu bylo možné vyhodnotit uvolňovací profily spektrofotometricky. Účinnost enkapsulace BSA byla provedena na modelové sérii částic, které obsahovaly účinnou látku BSA označenou fluoresceinem. Optickým mikroskopem získané snímky ukázaly účinnost enkapsulace uvnitř mikročástic. Současně bylo patrné zachycení proteinu na povrchu těchto částic, což následně vedlo k rychlému uvolnění BSA do prostředí. Uvnitř enkapsulovaný BSA byl uvolňován po dobu 200 hodin.

2.2.4 Polybutyrát adipát tereftalát PBAT

PBAT (polybutyrát adipát tereftalát) je kopolymer kyseliny adipové, 1,4-butndiolu a dimethyl tereftalátu. Jeden z obchodních názvů tohoto polymeru je Ecoflex a byl syntetizován jako potenciální náhrada LDPE. Zmíněný polyetylen je na rozdíl od PBAT rezistentní a nepodléhá mikrobiálnímu rozkladu. Vlastnostmi se PBAT velmi podobá LDPE a v některých aplikacích jej úspěšně nahrazuje. Příkladem těchto aplikací jsou různé folie a nákupní tašky. Vyniká dobrými vlastnostmi, jako je pevnost a ohebnost. Chemicky se jedná o kopolymer s nahodilou strukturou, proto nelze pozorovat velkou krystalinitu. To má za následek široký rozsah teplot tání. [35]

2.2.5 Polybutylen sukcinát PBSA

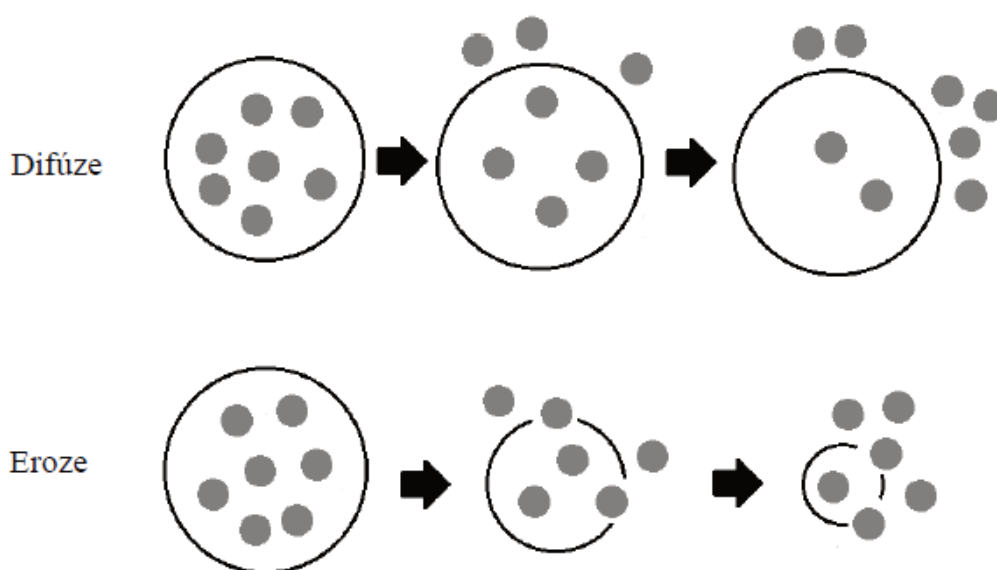
PBSA je vyráběn trans-esterifikací kyseliny jantarové a 1,4-butandiolu za vzniku PBSA oligomerů a vody. Následnou reakcí za sníženého tlaku a katalýzou titanem či jinými kovy dochází ke zvýšení molární hmotnosti polymeru. Produktem této reakce je biodegradabilní polymer s vlastnostmi podobnými polypropylenu PP. Rozkládají jej například mikrobiální kultury *Penicillium*. S výhodou se používá jako obalový materiál pro jednorázové talíře a tácky, tašky, sáčky a další. [36], [37], [38]

2.3 Ovlivňování vyluhovacích profilů

Uvolňování látek z polymerních mikrostruktur probíhá v zásadě dle dvou zákonitostí. Látka může být dávkována s lineárním nárůstem koncentrace v po celou dobu uvolňování. Druhý způsob kinetiky uvolňování se řídí Fickovým zákonem, kdy dochází k pozvolnému nárůstu koncentrace látky. Výsledný profil bude mít logaritmický průběh nárůstu koncentrace s potenciální lagovou fází. Na základě volby postupu přípravy polymerních mikročástic lze usuzovat, jaké vlastnosti bude při vyluhovacích testech systém vykazovat. Morfologie stejně tak struktura povrchu a výsledná velikost částic je silně ovlivňována metodou jejich přípravy. Dalším důležitým faktorem jsou chemicko-fyzikální vlastnosti látky zapouzdřené v částicích. Množství účinné látky enkapsulované do částice nesmí překročit kritickou úroveň, aby nedocházelo k narušení schopnosti tvorby částic. Velkým problémem je regulace rychlosti uvolňování účinné látky. Při přípravě částic je nutné omezit počáteční vysokou rychlost uvolňování vhodným technologickým postupem. Je možné postupovat různými způsoby, například vytvořením obalové stěny částice pomocí jiného polymeru. Tato úprava vyžaduje, aby měl polymer tvořící obalovou vrstvu odlišné vlastnosti a odlišný způsob přípravy, než polymer zapouzdřující účinnou látku. Je tím zamezeno předčasnému uvolnění účinné látky do prostředí, ve kterém dochází k povrchové úpravě. Příkladem takového systému může být kombinace PLGA nesoucího zapouzdřenou látku a vnější obal složený z PLA. PLA je rozpustná v ethyl acetátu, zatímco PLGA není.

2.4 Mechanizmy uvolňování zapouzdřené látky

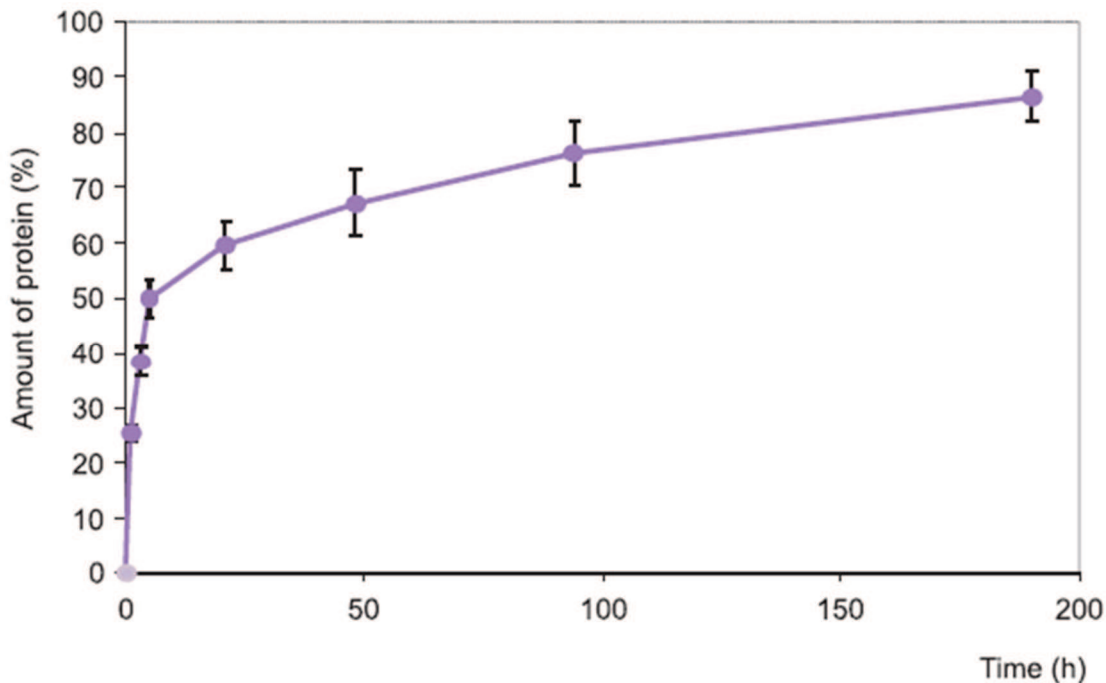
Enkapsulací látky do struktury polymerní částice je získán systém pro postupné uvolnění dané látky. V závislosti na charakteru účinné látky bude probíhat její únik do prostředí na základě dvou známých principů. Jedním z nich je difuze, druhý je eroze, přičemž vždy jeden převažuje nad druhým [11]. Difuze probíhá na základě rozdílu koncentrací látky uvnitř a vně polymerní matrice. Pokud jsou látky zapouzdřené v matrici dobře rozpustné ve vodě, bude tento princip převažovat. Protikladem tomuto systému je eroze polymerní matrice. V prostředí dochází k degradaci polymeru a k úniku látky do prostředí [12]. Pokud je látka omezeně mísitelná s vodou, dojde k jejímu uvolnění převážně erozním mechanismem.



Obrázek 3 Ilustrace uvolňovacích mechanismů [11], [12]

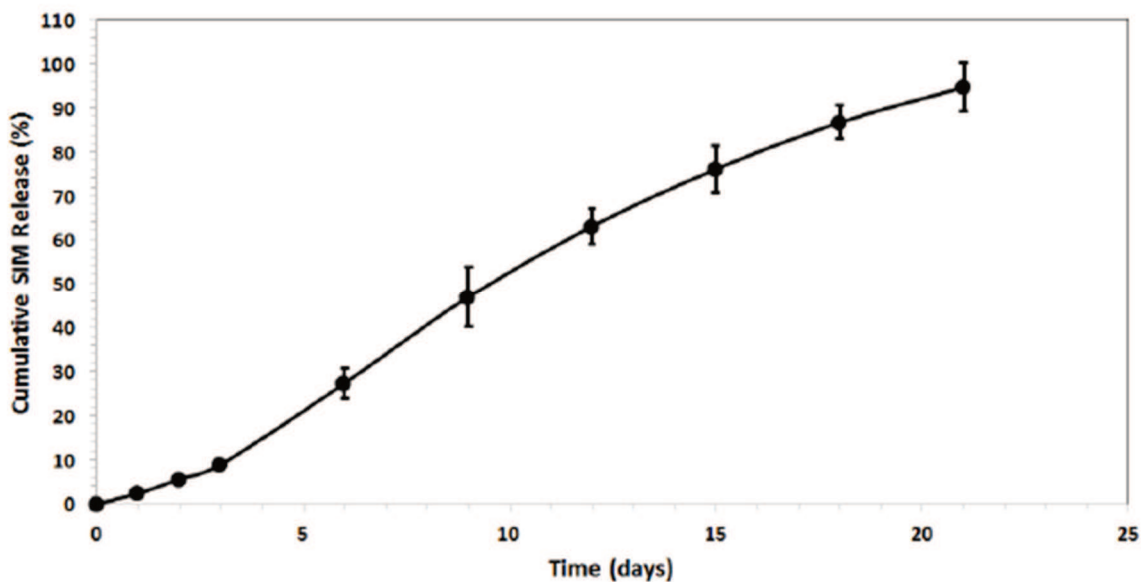
2.5 Efekt rychlého počátečního nárůstu koncentrace aktivní látky

Mikročástice jsou po aplikaci do vhodného prostředí vystaveny řadě fyzikálním a chemickým vlivům. Zejména se jedná o vysoký koncentrační gradient mezi zapouzdřenou látkou a okolním vodním prostředím. V první fázi uvolňování dochází k prudkému nárůstu koncentrace účinné látky v uvolňovacím médiu či prostředí. Tento jev se označuje jako burst-efekt. Je však značně nežádoucí, prudké uvolnění látky do prostředí znemožní kontinuální, postupné uvolňování látky po dlouhou dobu. Tento jev však lze omezit použitím vhodné úpravy povrchu mikročástic pomocí emulgačního činidla. Chemickými cestami lze dosáhnout dodatečného vytvrzení vzniklého povrchu. Následující obrázek demonstruje rychlý nárůst koncentrace účinné látky v systému.



Obrázek 4 Vyluhovací profil s velkým burst efektem [22]

Kombinací vhodných postupů lze burst efekt omezit. Následuje obrázek vyluhovacího profilu, který není zatížen prvotním náhlým nárůstem koncentrace účinné látky.



Obrázek 5 Uvolňovací profil bez burst efektu [33]

2.6 Látky pro úpravu povrchu částic

Polymerní matrice slouží k zapouzdření látky, která má být uvolňována. Samotné zapouzdření účinné látky však nezaručuje žádoucí kinetiku uvolňovacího profilu. Během přípravy mikrosystému se proto používají různé látky, které povrch částic během přípravy opatří vrstvou, která následné uvolnění patřičně upraví. Jedná se zejména o ovlivnění rychlosti vyluhování či a stability částic. Tyto látky rovněž vykazují schopnost snižovat povrchové napětí vody, což je výhodné zejména během tvorby mikroemulze.

2.6.1 Želatina

Získává se z různých zvířecích reziduí bohatých na kolagen. V potravinářství se používá jako gelovací prostředek, ve farmaceutickém průmyslu slouží k výrobě tobolek. Po reakci s vodou dochází k ireverzibilní hydrolyze kolagenu, jinými slovy dojde k zmenšení bílkovinných vláken do menších peptidů. Těchto vlastností je možné využít při přípravě mikrostruktur. Pokud je želatina přítomna ve vodné fázi při emulzifikaci, obalí povrch částic a vznikne tak vrstva omezující průnik vody. Zprůchodnění částice je způsobeno pozvolna během degradace této vrstvy ve vhodném prostředí. [19], [39]

2.6.1.1 Použití želatiny jako povrchové látky v praxi

Tato studie [19] se zaměřila na produkci částic vyrobených ze směsi želatiny a arabské gummy. Enkapsulovanou látkou do nitra částic byl kafrový olej. Tento aromatický olej má velmi příznivé léčivé vlastnosti, avšak může vyvolávat alergické reakce při dlouhodobém kontaktu. Výzkumný tým se proto zaměřil na přípravu částic s postupným uvolňováním této látky. Prvním krokem přípravy částic byla homogenizace oleje s roztokem želatiny a arabské gummy. Po přidavku kyseliny v přesném množství došlo k vytvoření větších celků částic. Vytvrzení stěn bylo docíleno glutaraldehydem. Pro podporu postupného uvolňování byl do oleje přidáván nízkomolekulární polystyren, který významně ovlivnil vyluhovací křivky. Díky jeho přidavku bylo zaručeno postupné uvolnění oleje do prostředí.

2.6.2 Arabská guma

Arabská guma je pryskyřice získaná například z mízy akácie arabské. Používá se v potravinářství jako stabilizátor. Je to směs sacharidů a glykoproteinů. S oblibou se využívá jako lepidlo na poštovních známkách a cigaretových papírcích. Při přípravě mikrostruktur má

podobné využití, jako želatina-snižuje povrchové napětí vody a obaluje povrch částic. Použitím síťovacího činidla lze její povrch vytvrdit. Omezení burst efektu touto látkou se nabízí jako vhodná, biodegradabilní alternativa jiným substancím. [40]

2.6.2.1 *Systémy pro postupné uvolňování látek se zaměřením na zdravotně nezávadné látky*

Výzkumný tým [16] se věnoval vývoji polymerních částic pro distribuci allyl-isothiokyanátu per os. Allyl isothiokyanát (AITC) je látka s antimikrobními účinky a příznivým vlivem pro trávicí soustavu. Její použití je však značně omezené, protože je velmi těkavá, špatně rozpustná ve vodě a velmi snadno se rozkládá. Pro překonání těchto překážek byly zkoumány možnosti zapouzdření AITC do biopolymerní matrice. Takovýto systém by rovněž umožňoval postupné uvolňování účinné látky. Tato studie se zaměřila na použití arabské gumy a želatiny se zvláštním důrazem na použití zdravotně nezávadných činidel pro přípravu systémů. Výzkumný tým vyloučil použití klasických síťovacích činidel, jako je formaldehyd a glutaraldehyd z důvodu jejich toxicity. Jako alternativu těmto síťovadlům bylo zkoumáno použití tříslovin, které mají schopnost tvořit komplex s vodíkovými můstky přítomnými v proteinech želatiny a arabské gumy. Síťovacím činidlem byla kyselina taninová, AITC byl rozpouštěn v olivovém oleji. Příprava částic sestávala ze tří kroků. Nejprve byla vytvořena emulze AITC v oleji se želatinou, poté byl vytvořen komplex s arabskou gumou a na závěr byly stěny částic vytvrzeny síťovacím činidlem. Výzkumnému týmu se povedlo syntetizovat mikrosféry shluknuté do větších celků vlivem síťování. Tento systém vykazoval větší účinnost enkapsulace, než doposud zkoumané systémy využívající komplex alginátu a chitosanu.

2.6.3 Škrob

Jedná se o přírodní polysacharid složený z mnoha molekul glukózy spojených glykosidickou vazbou. Je hojně využíván v potravinářství k zahušťování pokrmů. V průmyslu nachází uplatnění při výrobě papíru a jako zdroj pro výrobu lepidel. Podléhá enzymatické hydrolýze. Jeho použití jako stabilizátoru vnější vrstvy mikročástic se proto jeví jako velmi výhodné. Potlačení počátečního burst efektu je dosaženo dobrou biodostupností škrobu.

2.7 Pesticidy

Pesticidy jsou látky hubící škůdce. Z anglického slova pest (škůdce) pochází základ slova. Pesticidy jsou dále rozděleny podle cílových organismů, které jimi mají být hubeny. V této

práci byly používány výhradně látky s herbicidním účinkem. Jinými slovy, látky likvidující rostliny. Použitím těchto látek se zvyšuje efektivita pěstování důležitých plodin, zvyšují se zemědělské výnosy a zrychluje se proces kultivace vypěstovaných zdrojových rostlin. Následující přehled shrnuje typologii používaných pesticidů [13].

Tabulka 1 Rozdělení pesticidů

Druh pesticidu	Cílová skupina
Herbicidy	plevelné rostliny
Fungicidy	plísně, cizopasně houby
Regulátory růstu rostlin	přirozený růst
Insekticidy	hmyz
Akaricidy	pavoukovití
Moluskocidy	měkkýši
Rodenticidy	hlodavci

2.7.1 Rozdělení herbicidů

Herbicidy se dělí podle jejich účinku na jednotlivé druhy rostlin.

2.7.1.1 *Selektivní herbicidy*

Tyto látky působí pouze na plevele, které brání či zpomalují růst hospodářských rostlin. Jejich působení či naopak nepůsobení na jednotlivé rostliny závisí na několika faktorech, zejména na způsobu penetrace do rostliny, afinitě látky k povrchu rostliny, atp. [14], [15].

2.7.1.2 *Neselektivní herbicidy*

Jedná se o látky likvidující veškeré druhy rostlin. Jejich účinek mnohdy spočívá v inhibici aktivity či syntézy enzymu, bez kterého daná rostlina není schopná života. Využívají se nejen v zemědělství, ale také k ošetření nezemědělských půd, jako jsou například okraje silnic či sportovní plochy [14], [15].

Aplikace herbicidů je rovněž nutná pouze v určitých stádiích životních cyklů rostlin. Herbicidy je možné aplikovat jak na již vzrostlé rostliny, tak i do půdy obsahující jejich semena, nebo také k pouhé sterilaci půdy bez semen.

- a) Preemergentní aplikace-ošetření půdy po zasetí rostlin

- b) Předset'ová aplikace- ošetření půdy před zasetím rostlin
- c) Postemergentní aplikace- ošetření po vzejití rostliny

[14], [15].

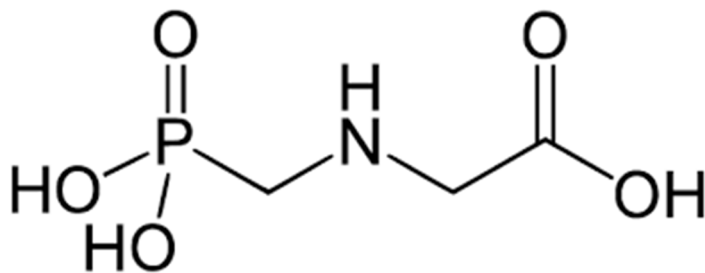
2.8 Herbicidy pro mikrosystémy pro postupné uvolňování

Herbicidy mají spoustu nežádoucích účinků, jak pro životní prostředí, tak pro zemědělské produkty samotné. Mnohdy je nutné dávkovat herbicid v nadbytku, aby se dosáhlo účinné koncentrace k vyvolání herbicidního účinku. Následná rezidua mohou a mnohdy představují riziko pro další organizmy. Než dojde k degradaci přebytečného množství látky v prostředí, mohou být kontaminovány podzemní vody. Tyto látky jsou většinou toxické pro ryby, a to i v malých koncentracích. Tyto aspekty je nutné mít na paměti a použitím mikrosystémů pro postupné uvolňování je možné omezit či zcela odstranit nastíněné problémy. Optimalizací mikrosystémů je možné docílit dávkování potřebného množství herbicidu. Dávky jsou tak zajištěny tak, aby látka účinně likvidovala škůdce a zároveň nepůsobila toxicky pro okolní ekosystém. Rovněž dochází k efektivnímu odbourávání herbicidu, protože je mikroorganizmům lépe dostupný v malých koncentracích.

2.8.1 Příklady herbicidů

2.8.1.1 Roundup (glyfosát)

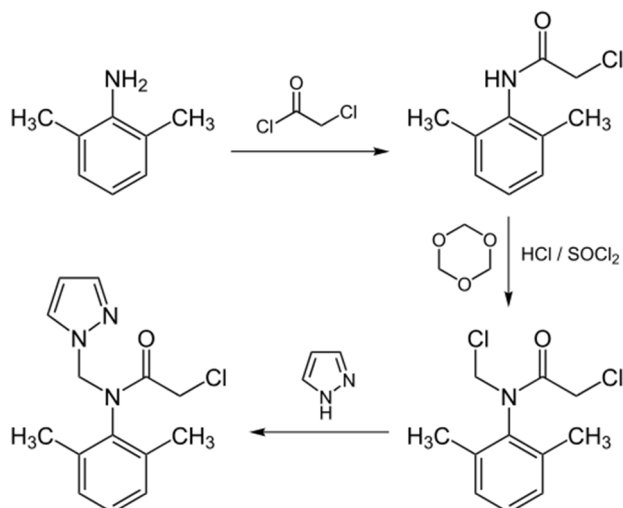
Roundup je obchodním označením herbicidního přípravku s totálním účinkem. Účinnou látkou je glyfosát. Tato látka je inhibitorem syntézy tyrozinu, tryptofanu a fenylalaninu. [25] Vstřebává se přes listy již vyrostlých rostlin, kořenový systém jej absorbuje velmi málo. Jeho použití je značně rozšířeno, avšak přetrvávají obavy z nežádoucích účinků na člověka a životní prostředí. [26] Je prezentován jako biologicky odbouratelný. Existují různé druhy zemědělských plodin, které byly geneticky modifikovány, aby byly odolné účinkům glyfosátu. Genetická modifikace spočívala v introdukci genu izolovaného z bakterií do genomu rostlin. Gen řídí syntézu EPSP syntázy. Díky tomu je možné pěstovat plodiny a ošetřovat je glyfosátem bez rizika úhynu a s jistotou likvidace plevelu.



Obrázek 6 Glyfosát

2.8.1.2 Metazachlor

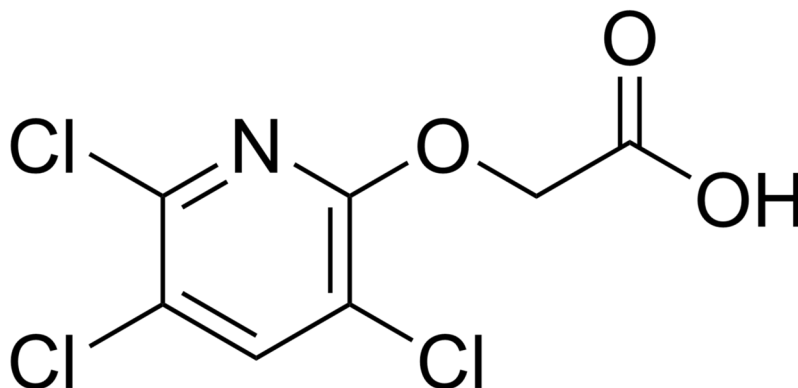
Tato látka patří mezi preemergentní herbicidy. Je vstřebáván především kořenovým systémem. Jedná se o selektivní herbicid likvidující lipnicové a dvouděložné plevely. Jeho výhodou je poměrně nízká akutní toxicita. Základními surovinami pro jeho výrobu jsou chloracetyl chlorid a 2,6-dimethyl anilin.



2.8.1.3 Triclopyr

Obrázek 7 Syntéza metazachloru

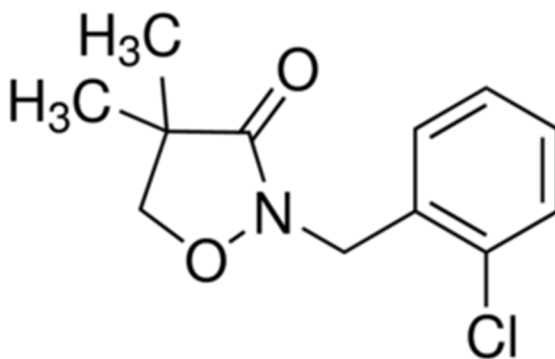
Tato látka se používá k hubení dvouděložných plevelů a náletových dřevin. Jeho molekula je podobná struktuře kyseliny trichlorfenoxyoctové. Ta je však nechvalně známá pro své dlouhodobě nežádoucí účinky-obsah dioxinů dodnes způsobuje reprodukční potíže ve Vietnamu. Rovněž působí jako defoliant, v důsledku ztráty listů dojde k úhynu rostliny. [27]



Obrázek 8 Triclopyr

2.8.1.4 Klomazon

Dalším zástupcem z řad herbicidů je klomazon, látka používaná pro enkapsulaci v mikrosystémech zkoumaných v této diplomové práci. Jedná se o herbicid působící proti jednolepým dvouděložným plevelům. Používá se jako preemergentní, tedy než plevel vyrostе. Vstřebává se kořeny rostlin a inhibuje biosyntézu prekurzorů chlorofylu a karotenoidů. Nepůsobí proti plevelům šířícím se kořeny. [28]



Obrázek 9 Klomazon

2.8.2 Vliv herbicidů a pesticidů na životní prostředí

Jak již bylo naznačeno, pesticidy mají ve většině případů nežádoucí účinky. Z podstaty jejich účinku se jedná o jedy, ať už likvidují rostliny nebo škůdce zvířecího druhu. Pesticidní účinky jsou vítanou vlastností těchto látek, avšak jejich dopad na životní prostředí je nezanedbatelný, či spíše vážný. Aplikací těchto látek jsou mnohdy zasaženy všechny sféry životního prostředí, tedy ovzduší, půda i voda. Zvláště nebezpečné jsou vedlejší produkty při výrobě těchto látek. Jako příklad uvedme Agent Orange. Účinné látky tohoto herbicidu byly kontaminovány značným množstvím dioxinů, které vznikají při syntéze. Jejich toxický efekt se projevuje i mnoho desítek let po aplikaci. [29] Dalším aspektem je post-aplikační chování

látek v prostředí. Všechny povolené pesticidy podléhají degradaci v půdním prostředí. Efektivita tohoto jevu je charakterizována půdním adsorpčním koeficientem. Rozklad mikroorganismy může vést až ke vzniku neškodných anorganických látek, jako oxid uhličitý, voda atd. Existuje však i riziko vzniku metabolitů s nejistým účinkem. Závisí také na hloubce průniku látek do půdy. K mikrobiální degradaci dochází zejména v blízkosti kořenového systému. Čím hlouběji pesticid pronikne, tím hůře jeho rozklad probíhá [16]. Pesticidy se rozkládají také působením UV záření. Fotodegradace závisí na chemickém charakteru sloučeniny a spektru dopadajícího na molekulu [17].

3 REALIZOVANÉ PRÁCE SE ZAMĚŘENÍM NA MIKROČÁSTICE

3.1 Příprava dvoustěnných mikro částic pro postupné uvolňování léků

Studie [18] se zaměřila na přípravu biodegradabilních částic pro transport léčiva Doxorubicinu. Jedná se o lék na leukémii a samotný je vysoce kardiotoxický. Rovněž si buňky na jeho dávku snadno vytvářejí rezistenci. Vyšší dávky se potom velmi rychle přibližují dávkám toxickým. Pro jejich transport do organismu nelze použít klasické jednosložkové polymerní systémy, protože by k uvolnění léčiva docházelo příliš rychle. Byly proto zkoumány techniky přípravy dvousložkových částic, z jejichž nitra se látky uvolňují výrazně pomaleji a omezují prvotní burst efekt. V této studii byly připraveny částice složené z polymerů PLLA a PLGA v různých poměrech. Na základě rozpustnosti jednotlivých složek v ethyl acetátu byly zkoumány jednotlivé vrstvy, ve kterých byl zapouzdřen Doxorubicin. Zkoumání distribuce látky v částicích touto metodou ukázalo, že se léčivo uzavírá v naprosté většině v PLGA. PLLA tvoří druhou, ochrannou vrstvu. Takto připravené částice vykazovaly omezený burst efekt a možnost dávkování léku až po dobu 80 dní, pokud byly polymery smíchány v poměru 1:1.

3.2 Mikročástice PLGA pro postupné uvolňování

Tým [33] zkoumal uvolňovací charakteristiky částic připravených z PLGA. Uvolňovanou látkou bylo léčivo Simvastatin (SIM). Výzkumný tým proto enkapsuloval SIM do částic z tohoto polymeru a zkoumal vyluhovací charakteristiky, účinnost enkapsulace a schopnost částic pojmout léčivo (drug loading). Současně zkoumal vhodnost použití těchto částic s ohledem na možný burst efekt, který je velmi nežádoucím jevem. Systémy byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla, jako stabilizátor částic byl použit polyvinylalkohol. Po provedení jednotlivých charakterizací bylo zjištěno, že SIM je možné zapouzdřit s 85 % účinností. Následné vyluhovací testy ukázaly, že k uvolnění 27 % SIM nastalo po 6 dnech a současně nedošlo k burst efektu. Tento materiál pro přípravu mikročástic pro postupné uvolňování se tedy jeví jako velmi výhodný a dostupný způsob dávkování látek zapouzdřených do jeho struktury.

3.3 Systémy PLGA mikročastic pro uvolňování lipofilních látek

Výzkumný tým [20] zkoumal vlastnosti a způsoby přípravy mikročastic PLGA pro uvolňování ve vodě téměř nerozpustného Fenretinidu. Jedná se o látku s chemoterapeutickým účinkem pro léčbu rakoviny. Má však velmi nízkou rozpustnost ve vodě a dosahování terapeutických dávek v krvi je náročné zejména kvůli jeho malé biodostupnosti. Tým výzkumníků zvolil poněkud odlišný způsob přípravy těchto částic vzhledem k malé polaritě Fenretinidu. Do struktury PLGA byly zapouzdřovány samotné krystaly této látky, které byly získány kryogenním mletím na velikost pod 5 mikrometrů. Následovaly pokusy s přidávkou různých povrchově aktivních látek pro zlepšení následné distribuce léčiva do těla. Příprava těchto mikročastic spadá do kategorie S-O-W metody. Počáteční burst efekt byl potlačován vhodnou volbou povrchové aktivní látky a její koncentrace. V kombinaci s přidávkou uhličitanu hořečnatého při přípravě částic bylo dosaženo postupného uvolňovacího profilu s malým počátečním burst efektem. Rovněž bylo dosaženo vysokého procenta tzv. drug loadingu, tedy schopnosti částice pojmout danou látku. Částice uvolňovaly Fenretinid po dobu jednoho měsíce a při testování v in-vivo podmínkách nedocházelo k negativním interakcím částic se zkoumaným organismem.

3.4 Optimalizace složení částic pro dosažení co nejlepšího vyluhovacího profilu bez burst efektu

Další ze studií [23] podrobně obsáhla vliv složení mikročastic na vyluhovací profily. Jedná se rovněž o studii využívající dvojice polymerů PLA a PLGA. Příprava mikročastic probíhala metodou odpaření rozpouštědla a zkoumanou látkou byl pyroxicam. PLA sloužil jako vnější stěna obalující částici. PLGA s enkapsulovanou látkou tvořil vnitřní skelet. I tato studie využívá nerozpustnosti PLGA v ethyl acetátu a využívá jej jako rozpouštědlo pro vnější PLA stěnu. Vyluhovací testy probíhaly za použití částic s různým poměrem zastoupení PLA/PLGA. Nejlepší vyluhovací profil měl systém se 3 díly PLA a 1 dílem PLGA. Vyluhovací charakteristiky ukázaly postupné dávkování piroxicamu. Prvních 10 dní se uvolnilo 20 % látky, zbytek byl pozvolna dávkován po dobu celkových 60 dní. Tento výsledek je značně příznivý pro další zkoumání v této diplomové práci.

3.5 Nanokapsle pro postupné uvolňování herbicidů

Grillo a kolektiv [24] připravovali nanokapsle z poly ϵ kaprolaktonu. Syntéza probíhala metodou O/W odpařením rozpouštědla. Dosažení velikosti částic v nano měřítku bylo provedeno použitím surfaktantů. Rozpětí velikostí částic bylo 200-300 nm. Účinné látky byly enkapsulovány s účinností kolem 80 %. Vyluhovací testy probíhaly ve vodném prostředí. Autoři zkoumali genotoxicitu připravených systémů na lidských lymfocytech. Výsledky tohoto zkoumání bylo zjištění, že zapouzdřená forma pesticidů má nižší toxický účinek, než volná forma. Tato studie se jeví jako vhodná inspirace pro syntézu systémů s postupným uvolňováním.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A POSTUP PŘÍPRAVY

4.1 Chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie pro přípravu a charakterizaci částic

- PBSA
- PBAT
- Arabská guma
- Želatina, čistá, (Penta, ČR)
- Destilovaná voda
- Dichlormethan (Merck, Německo)
- Chloroform (Merck, Německo)
- Clomazone (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina octová (Penta, ČR)
- Kovový sodík
- Dusičnan stříbrný (Lachema, ČR)
- Chroman draselný (Lachema, ČR)
- Kyselina mravenčí (Penta, ČR)
- Acetonitril (Honeywell, Německo)

4.1.2 Chemikálie pro uvolňovací testy

- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR)
- Hydroxid sodný (Penta, ČR)
- Destilovaná voda
- azid sodný (Penta, ČR)

4.1.3 Přístroje

- Vysocúčinný kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000
- Skenovací elektronový mikroskop Phenom Pro
- lyofilizátor ScanVac (CoolSafe, Labo Gene)
- vakuová pumpa Solid PTFE (KNF Laboport)
- Centrifuga MultiFuge (Thermo Scientific, USA)
- magnetické míchadlo (RH Basic, IKA, Belgie)
- ultrazvukový homogenizátor SONOPULS (Bandelin, Německo)
- vysokorychlostní homogenizátor Ultra-turrax (T 18 Basic, IKA®, Belgie)
- automatický analyzátor prvkového složení Flash 2000 CHNS/O+MAS200R (Thermo Scientific, USA)

4.2 Příprava částic

Mikročástice byly připravovány zavedeným postupem vhodným pro metodu odpaření rozpouštědla. Odlišnosti spočívaly v použití různých koncentrací vytvrzovacího činidla. Tím bylo dosaženo rozdílného stupně síťování povrchu částic a tím ke změně vlastností celého systému. Cílem bylo vybrat takovou koncentraci vytvrzovacího činidla, aby bylo dosaženo co nejlepších vyluhovacích charakteristik, tzn. minimální burst efekt a kontinuální uvolnění bez výkyvů.

4.2.1 Částice stabilizované směsí arabské gumy a želatiny

Byl připraven roztok polymeru (PBSA nebo PBAT) smícháním 1 g polymeru a 10 ml dichlormethanu. Po dokonalém rozpuštění bylo do reakční nádoby naváženo 50 mg clomazonu. Následně bylo k navážce pipetováno 2 ml roztoku polymeru. Toto množství clomazonu odpovídá 20 % účinné látky vztažené na obsah polymeru v roztoku. Obsah reakční nádoby byl převeden do kádinky obsahující 20 ml roztoku želatiny a arabské gumy. Tento roztok sloužil jako vodná fáze a byl připraven smícháním 0,5 g želatiny a 0,5 g arabské gumy v destilované vodě. Směs vodné fáze, polymeru a pesticidu byla následně homogenizována vysokootáčkovým homogenizátorem IKA Turrax při 24000 otáčkách po dobu 5 minut za stálého chlazení ledovou tříští. Po homogenizaci následovala sonifikace pomocí přístroje Bandelin. Probíhala po dobu 5 minut. Po dokončení sonifikace bylo z roztoku podtlakově odčerpáno rozpouštědlo. Po úplném odsátí dichlormethanu bylo do roztoku přikapáváno takové množství

20 % kyseliny octové, aby pH kleslo na hodnotu 3,7. Následoval přídavek glutaraldehydu, podle potřeby bylo přidáno 0,1; 0,2; 0,5 ml 50% roztoku. Směs byla míchána po dobu 10 minut, ve které probíhala síťovací reakce. Suspenze byla následně převedena do plastových vialek a centrifugována po dobu 10 minut při 14000 ot/min. Po centrifugaci byl slit supernatant a došlo k resuspendaci částic ve 20 ml vody. Odstředění se opakovalo dvakrát i s proplachem. Po odstředění byly částice resuspendovány v 10 ml vody a zmrazeny pro následnou lyofilizaci.

4.2.2 Vytvrzování stěn částic-glutaraldehydové síťování

Želatina a arabská guma jsou hydrofilní látky. Aby byl omezen burst efekt a zpomalen celý uvolňovací proces, bylo do 20 ml vodné fáze dávkováno patřičné množství glutaraldehydu dle postupu výše. K vytvrzení stěn částic došlo během 10 minut. Přídavkem daného množství glutaraldehydu do vodné fáze vznikly reakční směsi o koncentracích 0,25%, 0,5% a 1,25% obj.

4.3 Charakterizace připravených částic

Připravené částice byly podrobeny sérii analýz. Bylo zapotřebí stanovit skutečné množství enkapsulované látky a pořídit mikroskopické snímky ilustrující velikost a morfologii částic.

4.4 Stanovení množství zapouzdřeného clomazonu

Množství zapouzdřené látky v částicích je vyjádřeno parametrem zvaným drug loading. Stanovení množství clomazonu v připravených částicích je nezbytným parametrem pro následné přizpůsobení vyluhovacích testů. Pro stanovení obsahu clomazonu byla použita Lassaignova zkouška. Bylo naváženo 25 mg částic a převedeno do zkumavky z tavitelného skla. K navážce bylo přidáno malé množství kovového sodíku, přidávané množství přibližně odpovídalo velikosti krychle o straně 3 mm. Zkumavka byla důkladně zahřívána nad plynovým kahanem po dobu 5 minut. Tím došlo k rozkladu částic a k reakci jednotlivých složek se sodíkem. Po uplynutí 5 minut byla zkumavka rychle ponořena do kádinky s 20 ml destilované vody. Stěna zkumavky praskla a její obsah byl suspendován ve vodě. Rovněž došlo k rozpuštění produktů reakce se sodíkem. To umožnilo jejich stanovení dostupnými analytickými metodami.

4.4.1 Reakce probíhající během Lassaignovy zkoušky

Molekula clomazonu obsahuje ve své struktuře atom chloru, který reagoval se sodíkem za vzniku NaCl. Množství clomazonu je tedy možné stanovit jako obsah NaCl argentometrickou titrací. Obsah kádinky s produkty reakce byl přefiltrován do Erlenmayerovy baňky. Následně bylo přidáno několik kapek 0,05 M roztoku chromanu draselného K_2CrO_4 , který sloužil jako indikátor obsahu stříbrných iontů. Tato směs byla titrována 0,05 M roztokem dusičnanu stříbrného do první viditelné změny zbarvení. Tento přechod je indikován vznikem hnědé sraženiny chromanu stříbrného. Každé stanovení bylo dvakrát opakováno, celkově byly získány 3 hodnoty obsahu clomazonu.

4.4.2 Herbicidní plnění částic (herbicide loading, HL)

Získané výsledky z Lassaignovy zkoušky lze využít pro výpočet charakteristických vlastností vzniklých částic. Množství herbicidu zapouzdřeného v částicích lze vypočítat jako podíl hmotnosti herbicidu ke hmotnosti částic podrobených zkoušce. Získaná hodnota se nazývá Herbicide Loading, HL.

$$HL = \frac{\text{hmotnost enkapsulované látky}}{\text{hmotnost částic}} \times 100 \quad (1)$$

4.4.3 Účinnost enkapsulace

Při přípravě částic bylo do systému O/W dávkováno definované množství herbicidu. Avšak pouze v ideálním případě dojde k zapouzdření veškerého množství látky do polymerní matrice. Poměr skutečného množství herbicidu v částicích a množství látky původně dávkované se nazývá účinnost enkapsulace (encapsulation efficiency)..

$$EE = \frac{\text{hmotnost enkapsulované látky}}{\text{počáteční hmotnost látky}} \times 100 \quad (2)$$

4.5 Elementární analýza

Pro stanovení množství želatiny a arabské gumy na povrchu částic byla provedena elementární analýza pomocí automatického analyzátoru prvkového složení Flash 2000 CHNS/O+MAS200R. Bylo sledováno množství uhlíku, dusíku, vodíku a kyslíku ve vzorcích mikročástic.

4.6 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro získání informací o velikosti, distribuci velikosti a morfologii vzniklých částic bylo využito skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu Phenom Pro.

4.7 Uvolňovací testy

4.7.1 Příprava uvolňovacího média

Byl připraven 0,1 M roztok dihydrogenfosforečnanu draselného a jeho Ph bylo upraveno pomocí 1M hydroxidu sodného na hodnotu 7. Jako konzervační látka byl použit azid sodný, jehož výsledná koncentrace v roztoku byla zvolena na 0,2 %.

4.7.2 Podmínky pro uvolňování

Do skleněných lahví o objemu 50 ml bylo nadávkováno 50 ml pufru o ph 7. Na základě stanovení množství klomazonu enkapsulovaného v částicích bylo naváženo odpovídající množství částic k uvolňování. Jejich hmotnost byla volena tak, aby konečná koncentrace klomazonu v testovacích lahvích nepřekročila 50 mg/l. V daných časových intervalech bylo odebíráno 1,5 ml vzorku. Ten byl až do analýzy na HPLC uchován při nízké teplotě. Po odběru byl objem testovací lahve doplněn na původní hodnotu čistým pufrem.

4.8 HPLC

Analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu DionexUltimate 3000 (Německo) na analytické koloně Acclaim C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m), Thermo Scientific. Chromatografická separace proběhla pomocí gradientové eluce s mobilní fází sestávající se z 1 % kyseliny mravenčí (A) a acetonitrilu (B). Analýza začínala s 40 % eluentu B, který byl skokově zvýšen na 60 % po 15 minutách. Toto složení bylo udržováno po dobu 3 minut, než byl poměr eluentu B navrácen na 40 %. Průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 1 ml \cdot min⁻¹ po celých 20 minut analýzy. Teplota analytické kolony byla 25 °C a nástřik vzorku na kolonu 50 μ l. Detekce probíhala na diodovém poli při 260 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Byly provedeny jednotlivé zkoušky charakterizující všechny potřebné vlastnosti přípravných mikrosystémů. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 2 Výsledné vlastnosti mikrosystémů

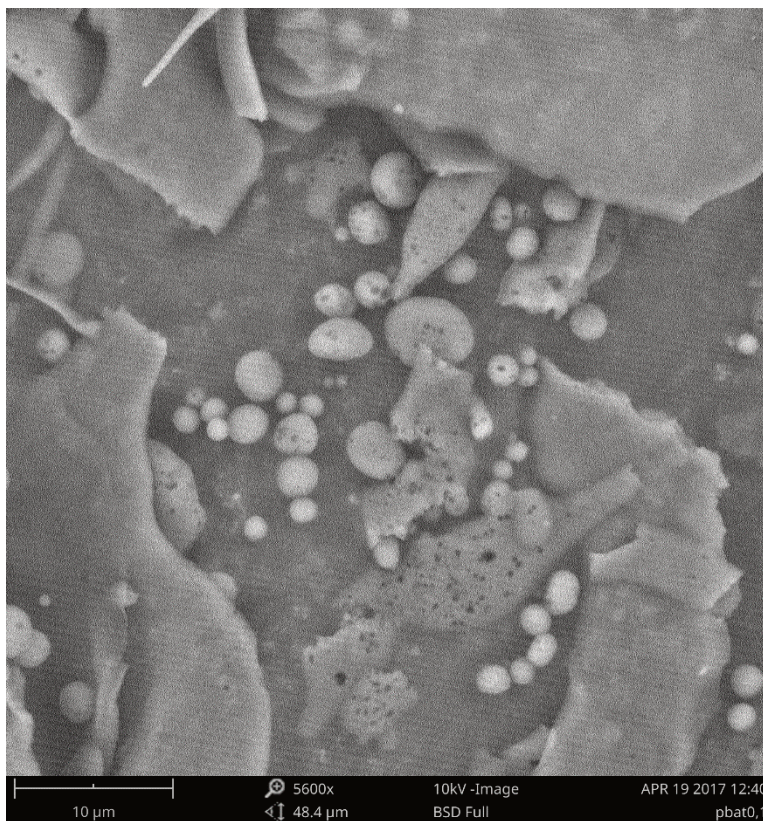
Polymer	Koncentrace glutaraldehydu (%)	Průměr (μm)	HL (%)	EE (%)	Želatina (%)	Arabská guma (%)
PBSA	0,25	6,6 \pm 1,2	15,9 \pm 0,3	79,7	N/A	N/A
PBSA	0,5	1,38 \pm 0,48	17,3 \pm 1,5	86,3	18	37,5
PBSA	1,25	1,1 \pm 0,19	17,6 \pm 1,1	87,8	15	35,8
PBAT	0,25	2,2 \pm 0,7	13,8 \pm 1,2	69,2	23	45
PBAT	0,5	2,1 \pm 0,8	18,3 \pm 0,2	91,3	19	46
PBAT	1,25	2,1 \pm 0,8	17,1 \pm 0,8	85,3	20	47
PBAT	0	-	15,8 \pm 2,5	79	15,5	40,7
PBSA	0	-	10,9 \pm 1,9	54,5	15,6	37,6

Výsledky ukazují, že množství použitého glutaraldehydu k síťování povrchu částic má vliv na jejich výslednou velikost. U polymeru PBSA je vidět, že s rostoucí koncentrací glutaraldehydu klesá velikost částic. Vytvrzením stěn zřejmě dochází i ke smrštění jednotlivých částic. Rovněž lze pozorovat souvislost mezi koncentrací glutaraldehydu a množstvím zapouzdřené látky. Z toho lze soudit, že jeho množství v poslední fázi přípravy částic je zásadním parametrem ovlivňujícím vlastnosti mikrosystémů. Hodnoty obsahu želatiny a arabské gummy byly získány elementární analýzou. Zastoupení jednotlivých látek pro úpravu povrchu částic je konzistentní s jejich rozpustností ve vodě. Želatina je látka s obsahem bílkovin a ve vodě je rozpustná jen omezeně. Zatímco arabská guma bílkoviny neobsahuje a ve vodě se rozpouští snáze. Proto je patrné větší zastoupení arabské gummy v částicích-během emulgace lépe přilnula k povrchu částic.

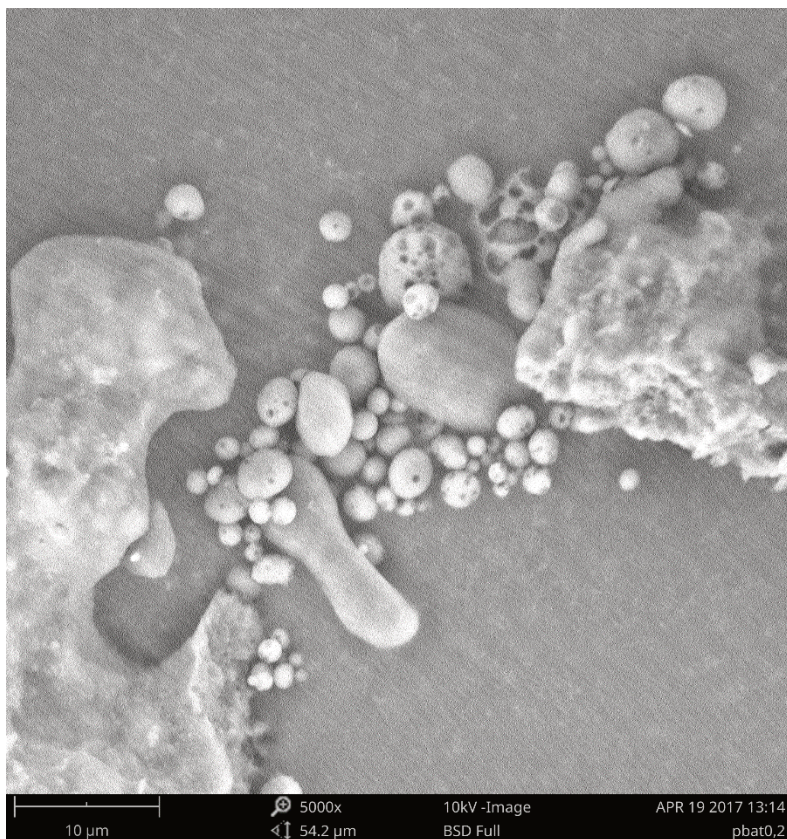
5.1 Morfologie částic

Polymerní částice byly připraveny dle výše popsaného postupu. Jejich struktura byla pozorována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Phenom Pro. Jak ukazují snímky níže, odlišná množství síťovacího činidla mají na strukturu částic nemalý vliv. Se zvyšujícím se množstvím síťovadla se zvyšuje velikost pórů a částice mají tendenci se shlukovat do větších celků. Rovněž lze pozorovat tvorbu pórů se zvyšujícím se množstvím glutaraldehydu. To je zřejmě způsobeno tím, že glutaraldehyd působil na větším povrchu, než v jiných

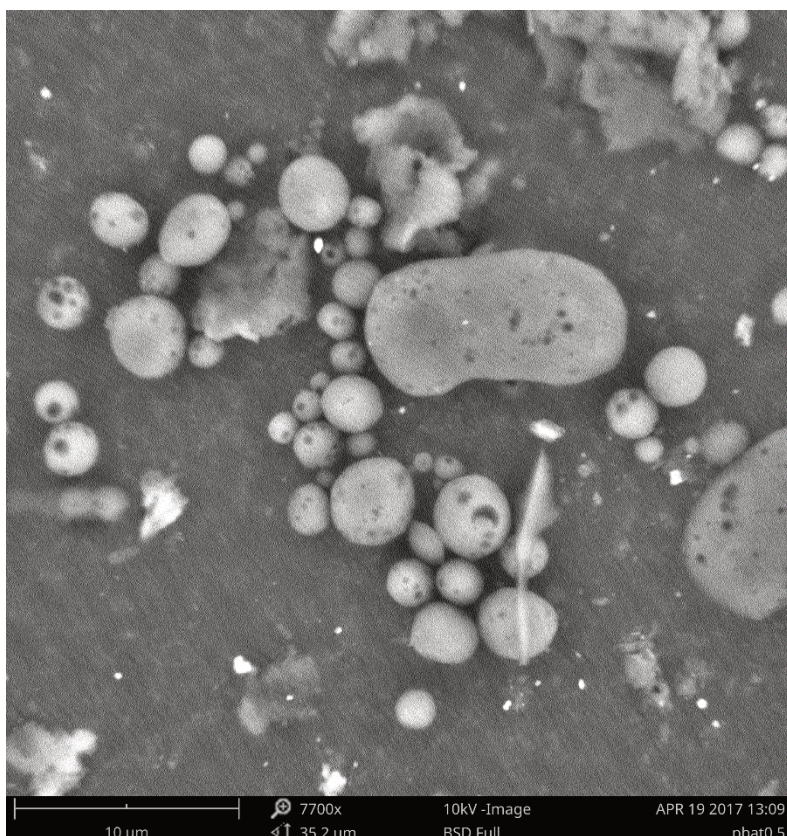
sériích. Na snímcích lze pozorovat větší celky materiálu a samotné částice. Tyto větší útvary jsou tvořeny zbytkovým materiálem použitým pro úpravu povrchu částic, tedy arabskou gumou a želatinou. Jejich vznik je dán použitou metodikou a není na závadu.



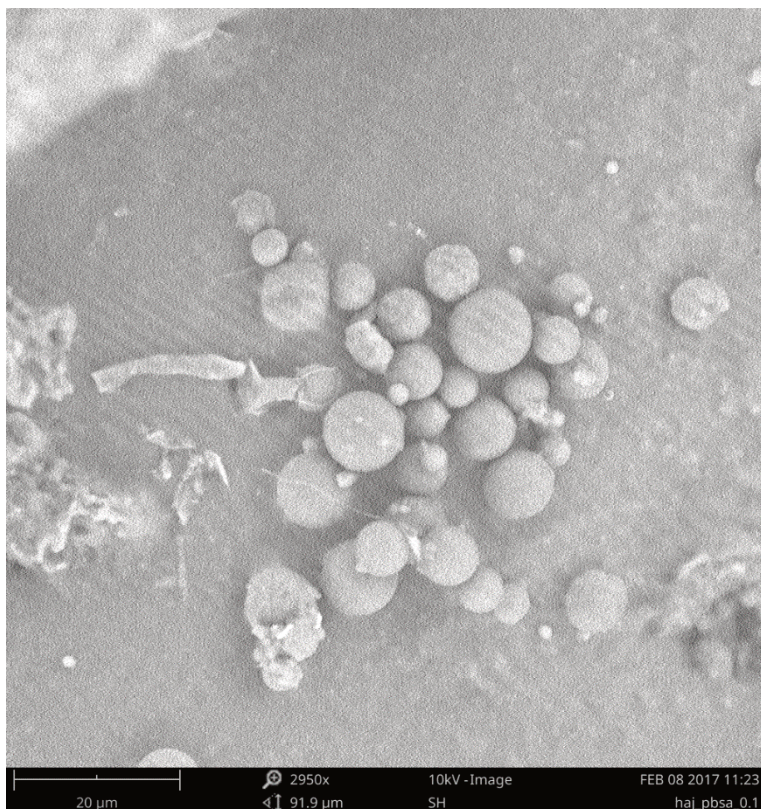
Obrázek 10 Částice PBAT s 0,25% glutaraldehydu



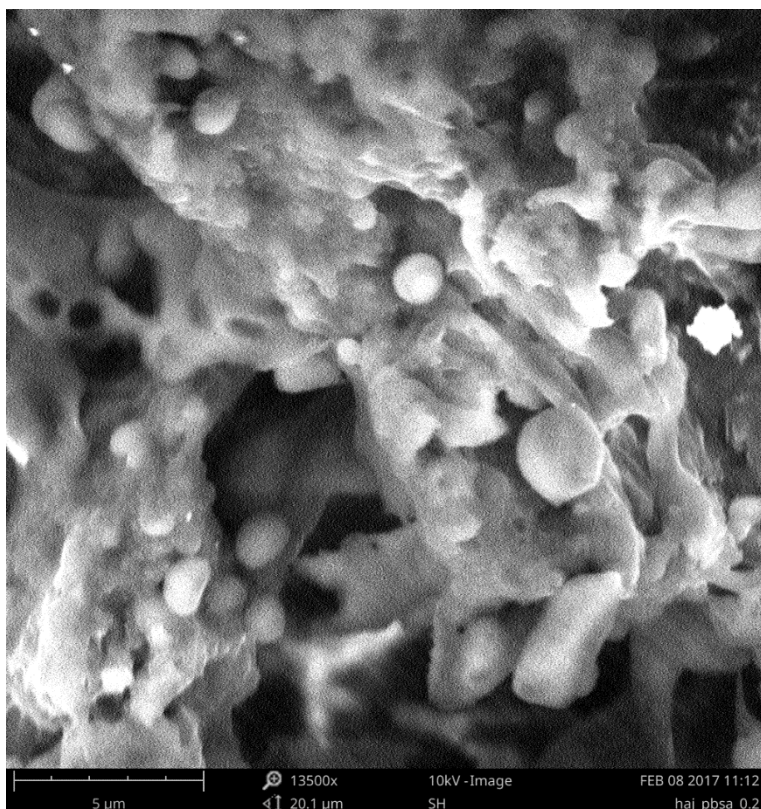
Obrázek 11 Částice PBAT s 0,5% glutaraldehydu



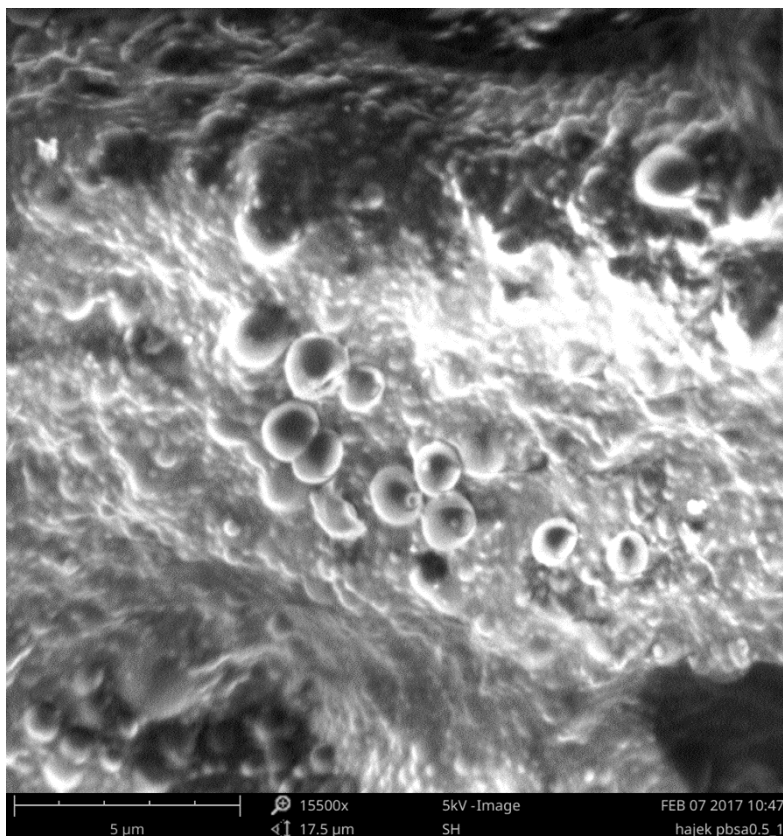
Obrázek 12 Částice PBAT s 1,25% glutaraldehydu



Obrázek 13 Částice PBSA s 0,25% glutaraldehydu



Obrázek 14 Částice PBSA s 0,5% glutaraldehydu



Obrázek 15 Částice PBSA s 1,25% glutaraldehydu

5.2 Herbicidní plnění a účinnost enkapsulace

Množství clomazonu zapouzdřeného v polymeru bylo stanoveno Lassaignovou zkouškou. Výsledky této zkoušky slouží k výpočtu klíčových charakteristických parametrů částic. Jedná se o HL (herbicide loading) a EE (encapsulation efficiency).

Tabulka 3 Výsledky Lassaignovy zkoušky PBSA

částice	Průměr HL (%)	Odchylka	Účinnost enkapsulace (%)
PBSA0,25	15,9	0,3	79,7
PBSA0,5	17,3	1,5	86,3
PBSA1,25	17,6	1,1	87,8

Tabulka 4 Výsledky Lassaignovy zkoušky PBAT

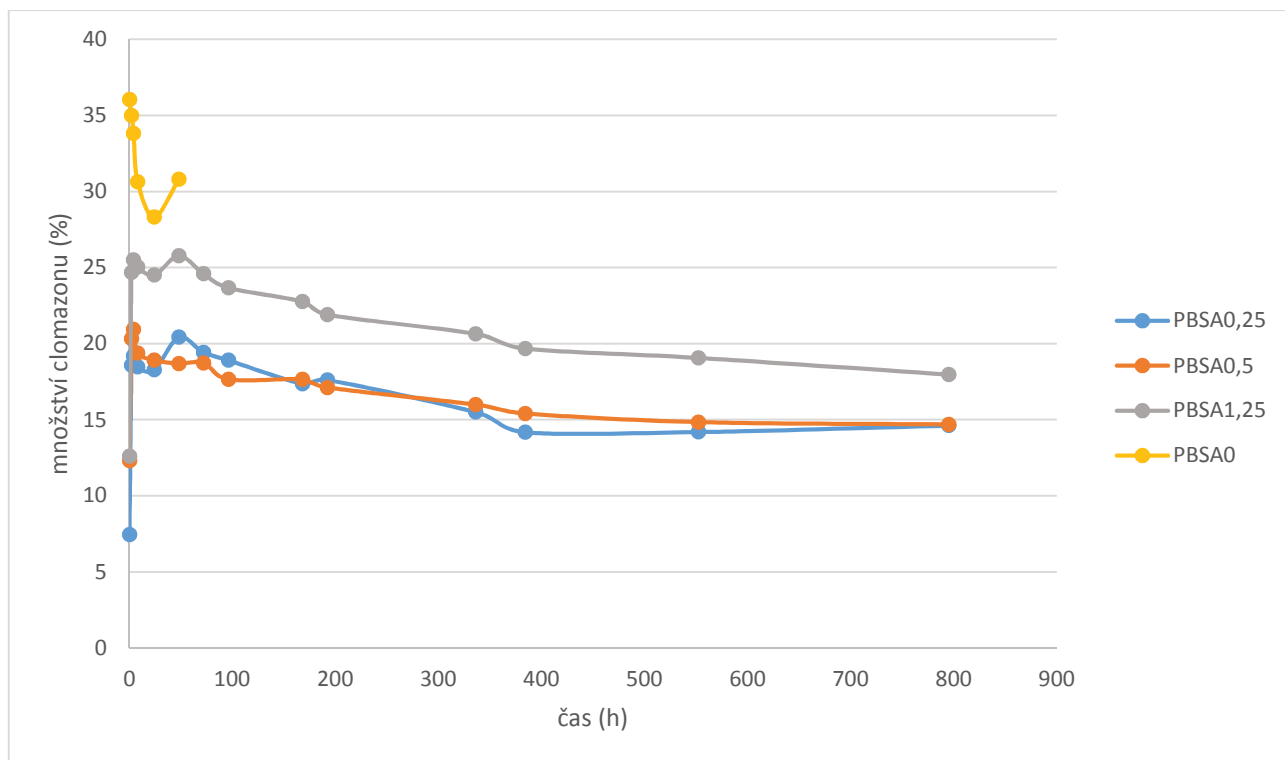
částice	Průměr HL (%)	Odchylka	Účinnost enkapsulace (%)
PBAT0,25	13,8	1,2	69,2
PBAT0,5	18,3	0,2	91,3
PBAT1,25	17,1	0,8	85,3

5.3 Uvolňovací testy

Uvolňování probíhalo ve 100 ml lahvičkách. Do každé z nich bylo naváženo potřebné množství částic tak, aby celková koncentrace clomazonu nepřekročila 50 mg/l. Uvolňování probíhalo po dobu několika týdnů. Výsledky jsou patrné na obrázcích uvedených níže. Lze pozorovat zvýšený nárůst koncentrace v prvních dnech vyluhování. Vyluhovací profily naznačují velmi silnou enkapsulaci účinné látky ve struktuře polymerní matrice, protože koncentrace herbicidu s postupujícím časem výrazně nestoupá. V počátku došlo k uvolnění části látky, vzhledem k pomalé hydrolyze matrice se již další množství herbicidu neuvolňovalo. Pokud by byly částice vpraveny do půdního prostředí, je velmi pravděpodobné, že by degradace samotné matrice probíhala mnohem výrazněji. V tomto případě by nastalo i uvolnění zbývající látky do prostředí. Přítomnost půdních mikroorganismů či vyšší teplota rozkladů hydrolyze použitých polymerů může pomoci.

5.3.1 Mikrosystémy připravené z PBSA

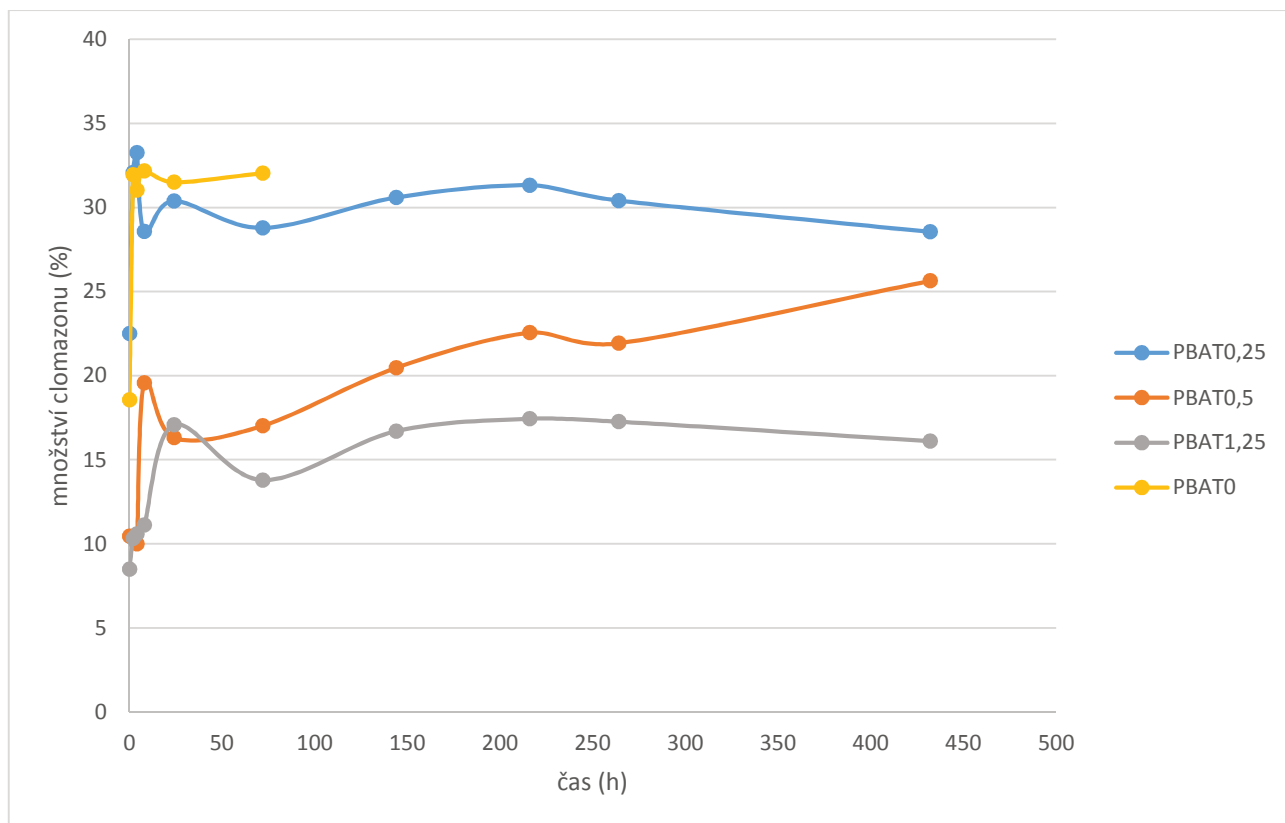
Mikrosystémy byly podrobeny vyluhovacím testům dle výše uvedeného postupu. Grafická znázornění jednotlivých systémů s rozdílným množstvím vytvrzovacího činidla (glutaraldehydu) demonstrují následující grafy. U každého z profilů je znatelný nárůst koncentrace herbicidu v prvních hodinách výluhu. Nejmenší množství herbicidu pozorujeme u prvních dvou koncentrací. Poslední, nejvyšší z nich, se jeví jako neúčinná. Lze tak soudit dle příliš velkého počátečního nárůstu koncentrace. Jako vhodnou koncentraci glutaraldehydu je možné doporučit maximálně 0,5 % glutaraldehydu ve vodné fázi při přípravě částic. Z důvodu ověření vlivu vytvrzování na vyluhovací profily byly připraveny částice bez použití glutaraldehydu coby síťovacího činidla. Výsledky ukazují, že nesíťované částice v prvních hodinách uvolní nejvyšší množství clomazonu ze všech provedených pokusů. Proto bylo jejich uvolňování po třech dnech zastaveno.



Obrázek 16 Vyluhovací profily částic z PBSA

5.3.2 Mikrosystémy připravené z PBAT

Obdobným způsobem, jako v případě PBSA, byly připraveny vyluhovací testy s mikročásticemi PBAT. I jejich povrch byl stabilizován arabskou gumou a želatinou. Vliv síťování je v tomto případě mnohem markantnější a jak ukazují následující grafy, je také účinnější. Po užití nejnižší koncentrace síťovadla nedošlo k významným změnám v kinetice uvolňování v porovnání s profilem částic s nevytvrzeným povrchem. V případě použití koncentrace 0,5 % lze pozorovat výrazné omezení tzv. burst efektu. Účinná látka byla v tomto případě dávkována téměř lineárně. Při použití nejvyšší koncentrace glutaraldehydu již nelze hovořit o lineárním průběhu, avšak zde došlo k uvolnění nejnižšího množství herbicidu v daném čase. Pro dlouhodobé uvolňování je tato charakteristika velmi příznivá.



Obrázek 17 Vyluhovací profily částic z PBAT

5.4 Analýza částic po výluhu

Částice byly po vyluhování podrobeny opětovné analýze pomocí Lassaigovy zkoušky. Cílem této analýzy bylo ověření zbytkového množství clomazonu ve struktuře částic, jelikož se veškerý herbicid, soudě dle vyluhovacích profilů, neuvolnil do vyluhovacího média. Výsledky této analýzy shrnuje následující tabulka. Je patrné, že polymerní matrice obsahuje zbytkové množství herbicidu, které by se uvolnilo během hydrolyzy polymeru. Následné uvolnění zbylého clomazonu je závislé na rozkladu matrice probíhající v přirozeném prostředí.

Tabulka 5 Obsah clomazonu v částicích PBSA po výluhu

částice	Hmotnost částic (mg)	Hmotnost clomazonu (mg)	Zbytkové množství (%)
PBSA0,25	18	1,798	10,0
PBSA0,5	31	1,86	6
PBSA1,25	19	1,805	9,5

Tabulka 6 Obsah clomazonu v částicích PBAT po výluhu

částice	Hmotnost částic (mg)	Hmotnost clomazonu (mg)	Zbytkové množství (%)
---------	----------------------	-------------------------	-----------------------

PBAT0,25	24,9	2,2161	8,9
PBAT0,5	27,6	1,794	6,5
PBAT1,25	51,3	3,591	7

ZÁVĚR

Tato diplomová práce pojednává o mikrosystémech na bázi biodegradabilních polymerů. Byly připravovány systémy z PBSA a PBAT, jejichž povrch byl upravován pomocí arabské gumy a želatiny. Následné vytvrzení stěn pomocí glutaraldehydu vedlo dle získaných výsledků ke změně následných vyluhovacích profilů. Enkapsulovanou látkou byl herbicid s názvem clomazone. Omezení počátečního burst efektu bylo jedním z klíčových úkolů během výzkumu.

Částice byly podrobeny sérii testů. Jejich výsledky určují velikost vzniklých částic, morfologii a také množství zapouzdřené látky. Všechny připravované série částic byly naplněny 20 % herbicidu. Výsledné účinnosti plnění 91,3 % pro PBAT a 87,8 % pro PBSA jsou velmi příznivé.

Provedené vyluhovací profily vystihují vliv povrchové úpravy, vliv množství glutaraldehydu a v neposlední řadě vliv použitých materiálů. Jako nejvhodnější kombinace se dle vyluhovacích profilů jeví použití PBSA s koncentrací glutaraldehydu max. 0,5 %. Touto kombinací bylo dosaženo nejmenšího burst efektu. V případě PBAT se jako nejvhodnější ukázala koncentrace 0,5 % síťovadla. U těchto částic se podařilo omezit burst efekt. Lze soudit, že použité látky ke stabilizaci a úpravě povrch mají zásadní vliv na ovlivnění kinetiky uvolňování zapouzdřené látky. Společně s vhodně dávkovaným vytvrzovacím činidlem uspokojivě eliminují počáteční burst efekt.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHOWDHURY, Mohammad A. The controlled release of bioactive compounds from lignin and lignin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, **65**, 136. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.012. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014000130>
- [2] KAH, Melanie a Thilo HOFMANN. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International*. 2014, **63**, 224-235. DOI: 10.1016/j.envint.2013.11.015. ISSN 01604120. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412013002754>
- [3] STLOUKAL, Petr, Pavel KUCHARCZYK, Vladimir SEDLARIK, Pavel BAZANT a Marek KOUTNY. Low Molecular Weight Poly(lactic acid) Microparticles for Controlled Release of the Herbicide Metazachlor: Preparation, Morphology, and Release Kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(16), 4111. DOI: 10.1021/jf300521j. ISSN 0021. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf300521j>
- [4] CAMPOS, E. – BRANQUINHO, J. – CARREIRA, A. S. Designing poly-meric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal*, 2013 vol.49, p. 2005-2021.
- [5] GUTERRES, S. S. – ALVES, M. P. – POHLMAN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. [online] 2007 [cit.2014-12-10], 2: 147–157. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155227/>>.
- [6] BODMEISER, R. – MCGINITY, J.W. Solvent selection in the preparation of poly(D,L-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method, *International Journal Pharmaceutics*, 1988, vol. 43 p. 179– 186.
- [7] CROTTS, George a Tae Gwan PARK. Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres. *Journal of Controlled Release*. 1995, **35**(2-3), 91-105. DOI: 10.1016/0168-3659(95)00010-6. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168365995000106>
- [8] PINTO REIS, Catarina, Ronald J. NEUFELD, António J. RIBEIRO, a Francisco VEIGA. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006, **2**(1), 8-21. DOI: 10.1016/j.nano.2005.12.003. ISSN 15499634. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963406000050>

- [9] VYSLOUŽIL, J. – DVOŘÁČKOVÁ, K. – KEJDUŠOVÁ, M. Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*, 2013, vol. 107, p. 16-23. ISSN: 0009-2770.
- [10] BYUN, Youngjae, Jin Bong HWANG, Sung Hwan BANG, Duncan DARBY, Kay COOKSEY, Paul L. DAWSON, Hyun Jin PARK a Scott WHITESIDE. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *LWT - Food Science and Technology*. 2011, **44**(1), 24-28. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.06.032. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643810002501>
- [11] BAJPAI, A.K., Sandeep K. SHUKLA, Smitha BHANU a Sanjana KANKANE. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*. 2008, **33**(11), 1088. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005. ISSN 00796700. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670008000609>
- [12] ZULEGER, Susanne a Bernhard C. LIPPOLD. Polymer particle erosion controlling drug release. I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, **217**(1-2), 139-152. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00596-8. ISSN 03785173. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301005968>
- [13] HAJŠLOVÁ, J.; TICHÁ, J.; KOCOUREK, V. Rezidua pesticidů v ovoci a zelenině, možnosti minimalizace. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, Praha*, 2005.
- [14] FUSEK, J.; MĚRKA, V. Nebezpečné herbicidy. *Vojenské zdravotnické listy*, 2003, 6: 262-273.
- [15] JURSIK, Miroslav, et al. MECHANIZMY ÚČINKU HERBICIDŮ A PROJEVY JEJICH PŮSOBENÍ NA ROSTLINY: Inhibitory biosyntézy aminokyselin. *Listy Cukrovarnické a Re-parské*, 2010, 126.
- [16] ZHANG, Zhi-Qiang, Cheol-Ho PAN a Donghwa CHUNG. Tannic acid cross-linked gelatin-gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study. *Food Research International*. 2011, **44**(4), 1000-1007. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.02.044. ISSN 09639969. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911001463>

- [17] MASAELI, Reza, et al. Preparation, characterization and evaluation of drug release properties of simvastatin-loaded PLGA microspheres. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 2016, 15.Suppl: 205.
- [18] TAN, Eng Chew, Rongyi LIN a Chi-Hwa WANG. Fabrication of double-walled microspheres for the sustained release of doxorubicin. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, **291**(1), 135-143. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.04.089. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979705004832>
- [19] CHANG, Chih-Pong, Ting-Kai LEUNG, Shang-Ming LIN a Che-Chang HSU. Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006, **50**(2), 136-140. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.008. ISSN 09277765. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776506001408>
- [20] ZHANG, Ying, Christian WISCHKE, Sachin MITTAL, Amitava MITRA a Steven P. SCHWENDEMAN. Design of Controlled Release PLGA Microspheres for Hydrophobic Fenretinide. *Molecular Pharmaceutics*. 2016, **13**(8), 2622. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00961. ISSN 1543. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00961>
- [21] XIA, Yujie; RIBEIRO, Pedro F.; PACK, Daniel W. Controlled protein release from monodisperse biodegradable double-wall microspheres of controllable shell thickness. *Journal of Controlled Release*, 2013, 172.3: 707-714.
- [22] ZERNOV, A.L., E.A. IVANOV, T.K. MAKHINA, et al. Microcapsules of Poly(3-Hydroxybutyrate) for Prolonged Protein Release. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2015, **7**(4), 50-57. DOI: 10.17691/stm2015.7.4.06. ISSN 20764243. Dostupné také z: <http://stm-journal.ru/en/numbers/2015/4/1191>
- [23] POLLAUFG, Emily J.; KIM, Kyekyoon Kevin; PACK, Daniel W. Small-molecule release from poly (D, L-lactide)/poly (D, L-lactide-co-glycolide) composite microparticles. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2005, 94.9: 2013-2022.
- [24] GRILLO, Renato, et al. Poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of hazardous materials*, 2012, 231: 1-9.
- [25] GIESY, John P., Stuart DOBSON a Keith R. SOLOMON. *Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup*. , 35. DOI: 10.1007/978. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/978>
- [26] STEINRÜCKEN, H.C. a N. AMRHEIN. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications*. 1980, **94**(4), 1207-1212. DOI: 10.1016/0006-291X(80)90547-1. ISSN 0006291x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X80905471>
- [27] APPLEBY, Arnold P., Franz MÜLLER a Serge CARPY. Weed Control. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2000. DOI: 10.1002/14356007.a28_165. ISBN 3527306730. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a28_165
- [28] FERHATOGLU, Yurdagul a Michael BARRETT. Studies of clomazone mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2006, **85**(1), 7. DOI: 10.1016/j.pestbp.2005.10.002. ISSN 00483575. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357505001288>
- [29] NGO, A. D, R. TAYLOR, C. L ROBERTS a T. V NGUYEN. Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta. *International Journal of Epidemiology*. 2006, **35**(5), 1220. DOI: 10.1093/ije/dyl038. ISSN 0300. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ije/article>
- [30] SÖDERGÅRD, Anders a Mikael STOLT. Industrial Production of High Molecular Weight Poly(Lactic Acid). *Poly(Lactic Acid)*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2010, , 27. DOI: 10.1002/9780470649848.ch3. ISBN 9780470649848. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470649848.ch3>
- [31] TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada P. CALABIA, Charles U. UGWU a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2009, **10**(9), 3722-3742. DOI: 10.3390/ijms10093722. ISBN 9780470649848. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/9/3722/>
- [32] ASTETE, Carlos E. a Cristina M. SABLIOV. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2006, **17**(3), 247. DOI: 10.1163/156856206775997322. ISSN 0920. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856206775997322>
- [33] PAVOT, Vincent, Morgane BERTHET, Julien RESSÉGUIER, Sophie LEGAZ, Nadège HANDKÉ, Sarah C GILBERT, Stéphane PAUL a Bernard VERRIER. Poly(lactic acid) and poly(lactic- co -glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine*. 2014, **9**(17), 2703-2718. DOI: 10.2217/nnm.14.156. ISSN 1743-5889. Dostupné také z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm.14.156>
- [34] JACQUEL, Nicolas, Chi-Wei LO, Yu-Hong WEI, Ho-Shing WU a Shaw S. WANG. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*. 2008, **39**(1), 15-27. DOI: 10.1016/j.bej.2007.11.029. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X07004433>

- [35] JIANG, Long, Michael P. WOLCOTT a Jinwen ZHANG. Study of Biodegradable Poly-lactide/Poly(butylene adipate- co -terephthalate) Blends. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(1), 199-207. DOI: 10.1021/bm050581q. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm050581q>
- [36] CAROTHERS, Wallace H. a J. A. ARVIN. STUDIES ON POLYMERIZATION AND RING FORMATION. II. POLY-ESTERS. *Journal of the American Chemical Society*. 1929, **51**(8), 2560-2570. DOI: 10.1021/ja01383a042. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01383a042>
- [37] TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada P. CALABIA, Charles U. UGWU a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, **10**(9), 3722. DOI: 10.3390/ijms10093722. ISSN 1422. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422>
- [38] JACQUEL, Nicolas, Floriane FREYERMOUTH, Françoise FENOUILLOT, Alain ROUSSEAU, Jean Pierre PASCAULT, Patrick FUERTES a René SAINT-LOUP. Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2011, **49**(24), 5301-5312. DOI: 10.1002/pola.25009. ISSN 0887624x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.25009>
- [39] DJAGNY, Kodjo Boady, Zhang WANG a Shiyong XU. Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001, **41**(6), 481-492. DOI: 10.1080/20014091091904. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20014091091904>
- [40] RENARD, Denis, Laurence LAVENANT, Marie RALET a Christian SANCHEZ. Acacia senegal Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(9), 2637. DOI: 10.1021/bm060145j. ISSN 1525. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm060145j>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HL	- Herbicide loading (plnění částic účinnou látkou)
EE	- Encapsulation efficiency (účinnost enkapsulace)
PBSA	- poly butylen sukcinát adipát
PBAT	- poly butylen adipát tereftalát
PHB	- poly hydroxy butyrát
PLGA	- kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PLA	- kyselina polylactonová
PVA	-poly vinyl alkohol

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Příklad mikrosféry	12
Obrázek 2 Příklad mikrokapsle.....	13
Obrázek 3 Ilustrace uvolňovacích mechanismů [11], [12].....	19
Obrázek 4 Vyluhovací profil s velkým burst efektem [22]	20
Obrázek 5 Uvolňovací profil bez burst efektu [33]	20
Obrázek 6 Glyphosát	25
Obrázek 7 Syntéza metazachloru.....	25
Obrázek 8 Triclopyr.....	26
Obrázek 9 Klomazon	26
Obrázek 10 Částice PBAT s 0,25% glutaraldehydu	38
Obrázek 11 Částice PBAT s 0,5% glutaraldehydu	39
Obrázek 12 Částice PBAT s 1,25% glutaraldehydu	39
Obrázek 13 Částice PBSA s 0,25% glutaraldehydu	40
Obrázek 14 Částice PBSA s 0,5% glutaraldehydu	40
Obrázek 15 Částice PBSA s 1,25% glutaraldehydu	41
Obrázek 16 Vyluhovací profily částic z PBSA	43
Obrázek 20 Vyluhovací profily částic z PBAT	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Rozdělení pesticidů.....	23
Tabulka 2 Výsledné vlastnosti mikrosystémů	37
Tabulka 3 Výsledky Lassaignovy zkoušky PBSA	41
Tabulka 4 Výsledky Lassaignovy zkoušky PBAT	42
Tabulka 5 Obsah clomazonu v částicích PBSA po výluhu	44
Tabulka 6 Obsah clomazonu v částicích PBAT po výluhu	44