

Biodegradabilní polymerní materiály pro potravinářské a zemědělské aplikace

Jakub Klaban

Bakalářská práce
2019

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jakub Klaban**
Osobní číslo: **T160016**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biodegradabilní polymerní materiály pro potravinářské
a zemědělské aplikace**

Zásady pro vypracování:

1. Prostudovat literaturu k danému tématu.
 2. Pokusit se připravit vhodné polymerní nosiče a experimentovat s jejich plněním účinnými látkami.
 3. Charakterizovat připravené formulace.
 4. Výsledky přehledně sepsat do formy bakalářské práce.
-

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Elektronické databáze vědeckých publikací. Seznam doporučené literatury:

1. Stloukal, P., Kucharczyk, P., Sedlarik, V., Bazant, P., Koutný, M. Low molecular weight poly(lactic acid) microparticles for controlled release of the herbicide metazachlor: Preparation, morphology, and release kinetics. (2012) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (16), pp. 4111–4119.

2. Salač, J., Šopík, T., Stloukal, P. et al. Slow release formulation of herbicide metazachlor based on high molecular weight poly(lactic acid) submicro and microparticles. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02222-9>.

3. Šerá, J., Stloukal, P., Jančová, P., Verney, V., Pekařová, S., Koutný, M. Accelerated Biodegradation of Agriculture Film Based on Aromatic-Aliphatic Copolyester in Soil under Mesophilic Conditions (2016) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (28), pp. 5653–5661.

4. Články v odborných periodikách dostupných v databázích Web Of Science, Scopus, případně dalších.

Vedoucí bakalářské práce:

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

1. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

17. května 2019

Ve Zlíně dne 1. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Příjmení a jméno: KLABAN JAKUB

Obor: 102P

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 13.5.2019

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 nevyjádřeně 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, užíje-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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Toxicita herbicidů běžně používaných v zemědělství je ovlivněna jejich chemickou stabilitou, rozpustností, biologickou dostupností a půdní sorpční schopností. Mezi možná řešení navržená pro minimalizace toxicity patří vývoj nových nosných systémů schopných modifikovat vlastnosti sloučenin a umožnit jejich řízené uvolňování. Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu polymerních mikrosystémů z biologicky rozložitelného materiálu pro kontrolované uvolňování agrochemikálií. Částice byly připraveny z biologicky rozložitelného polyesteru PHB, do kterých byly enkapsulovány herbicidy pendimethalin a clomazon metodou odpaření rozpouštědla. Byla charakterizována velikost a distribuce částic, účinnost enkapsulace a plnění částic herbicidem. Byla sledována biodegradace částic v půdě u všech sérií a u částic s clomazonem byly provedeny uvolňovací testy ve vodném prostředí. Průměrná velikost takto připravených částic se pohybovala u částic bez přídavku aktivní látky 326 nm, částice s pendimethalinem 366 nm a u částic s enkapsulovaným clomazonem 345 nm. Výsledná účinnost enkapsulace byla u částic s pendimethalinem 73 % a u částic s clomazonem 17 %.

Klíčová slova: mikro, částice, enkapsulace, metoda odpaření rozpouštědla, PHB, herbicid, pendimethalin, clomazon, postupné uvolňování, biodegradace.

ABSTRACT

The toxicity of herbicides commonly used in agriculture is influenced by their chemical stability, solubility, bioavailability and soil sorption. Possible solutions designed to minimize toxicity include the development of carrier systems able to modify the properties of the compounds and allow their controlled release. The bachelor thesis presented herein is focused on the preparation of polymer microsystems from biodegradable materials for the controlled release of agrochemicals. Particles were prepared from biodegradable polyester PHB with encapsulated herbicides pendimethalin and clomazone by the solvent evaporation method. The size and particle size distribution, the encapsulation efficiency and herbicide loading of particles were characterized. The biodegradation of particles in soil was monitored for each series and the release tests were performed on clomazone particles in an aqueous medium. The average size of the prepared particles produced without the additional active ingredient was 326 nm, the average size of particles with encapsulated pendimethalin was 366 nm and the average size of particles with encapsulated clomazone was 345 nm. . The result of encapsulation efficiency was 73 % for pendimethalin loaded particles and 17 % for clomazone loaded particles.

Keywords: micro, particles, encapsulation, solvent evaporation method, PHB, herbicide, pendimethalin, clomazone, controlled release, biodegradation.

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce panu prof. Mgr. Markovi Koutnému, Ph.D. za profesionální vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval během bakalářské práce. Rovněž bych rád poděkoval mým kolegům a všem, kteří mi poskytli jak potřebné informace, tak i podporu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 SYSTÉMY S POSTUPNÝM UVOLŇOVÁNÍM V ZEMĚDĚLSTVÍ	12
1.1 TYPY SYSTÉMŮ.....	12
1.1.1 Uvolnění a účinnost.....	12
1.1.2 Nanoemulze.....	12
1.1.3 Nanokapsule na bázi polymerů	12
1.1.4 Nanogely	13
1.1.5 Nanovlákná	13
1.1.6 Anorganické nanočástice spojené s organickou aktivní látkou.....	13
1.1.7 Anorganické nanočástice	14
1.2 POLYMERNÍ NANO A MIKROČÁSTICE	14
1.2.1 Struktura.....	15
2 METODY PŘÍPRAVY ČÁSTIC	16
2.1.1 Metoda odpaření/extrakce rozpouštědla.....	16
2.2 SYSTÉM O/V	17
2.2.1 Systém O/O	18
2.3 MATERIÁLY PRO PŘÍPRAVU POLYMERNÍCH ČÁSTIC	19
2.3.1 Polyhydroxybutyrát – PHB	19
2.4 MECHANISMUS KONTROLOVANÉHO UVOLŇOVÁNÍ	20
2.5 POČÁTEČNÍ EFEKT RYCHLÉHO NÁRŮSTU KONCENTRACE AKTIVNÍ LÁTKY	20
3 PESTICIDY	22
3.1 HERBICIDY	22
3.1.1 Historický vývoj.....	23
3.1.2 Vývoj nových herbicidů	23
3.1.3 Rozdělení herbicidů	24
3.1.4 Vliv a toxicita herbicidů na životní prostředí.....	25
3.1.5 Příklady herbicidů	26
3.1.5.1 Pendimethalin	26
3.1.5.2 Clomazon	27
3.1.5.3 Metazachlor	27
3.1.5.4 Atrazin	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 MATERIÁLY A METODY PŘÍPRAVY	30
4.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	30
4.1.1 Látky pro přípravu částic	30
4.1.2 Látky pro biodegradační testy	30
4.1.3 Látky pro uvolňovací testy.....	31
4.1.4 Přístroje	31
4.2 METODIKA	32
4.2.1 Příprava 0,5 % roztoku PVA.....	32

4.2.2	Příprava částic	32
4.2.2.1	Optimalizace přípravy částic	32
4.2.2.2	Příprava částic bez aktivní látky	34
4.2.2.3	Příprava částic s enkapsulovanou aktivní látkou	34
4.2.3	Příprava fosfátového pufru.....	35
4.3	CHARAKTERIZACE ČÁSTICE.....	35
4.4	VELIKOST ČÁSTIC.....	35
4.4.1	Polydisperzní index	36
4.5	MORFOLOGIE ČÁSTIC	36
4.6	STANOVENÍ ÚČINNOSTI ENKAPSULACE (EE) A PLNĚNÍ ČÁSTIC (HL) PDM A CLO	36
4.6.1	Herbicidní plnění (Herbicide loading, HL).....	39
4.6.2	Účinnost enkapsulace (EE)	39
4.7	BIODEGRADAČNÍ TESTY	39
4.7.1	Příprava minerálního média	39
4.7.2	Příprava lahví	40
4.8	UVOLŇOVACÍ TESTY.....	40
4.8.1	Příprava média pro uvolňování	40
4.8.2	Podmínky pro uvolňování	41
4.8.3	Odběry	41
4.9	UHPLC.....	41
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
5.1	OPTIMALIZACE METODIKY PRO PŘÍPRAVU ČÁSTIC.....	42
5.1.1	Výběr vhodného rozpouštědla.....	42
5.1.2	Optimalizace předčasného vysrážení PHB	43
5.2	CHARAKTERIZACE ČÁSTIC.....	43
5.3	MORFOLOGIE ČÁSTIC	44
5.4	HERBICIDNÍ PLNĚNÍ (HL) A ÚČINNOST ENKAPSULACE (EE)	46
5.5	UVOLŇOVACÍ TESTY.....	46
5.6	BIODEGRADAČNÍ TESTY	47
	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	56
	SEZNAM OBRÁZKŮ	57
	SEZNAM TABULEK.....	58

ÚVOD

Biologicky rozložitelné polymery jsou v dnešní době velmi diskutovaným tématem. Tenhle typ polymerů nachází velmi širokou škálu uplatnění, a to od farmacie až po zemědělství. Především se můžeme setkat s mikrosystémy jejichž hlavním cílem je zapouzdření aktivní látky a jejich následné uvolnění ve vhodném prostředí definovaným způsobem. Mezi aktivní látky můžou patřit agrochemikálie např. herbicidy v zemědělství, nebo léčiva ve farmacii. Uvolnění látky definovaným způsobem může mít za následek, že se aktivní látka dostane přesně na místo určení, nebo se aktivní látka bude postupně uvolňovat delší dobu. Postupné neboli kontrolované uvolňování aktivní látky je velmi žádáno v zemědělství. Je hlavně využíván koncentrační gradient mezi částicemi a okolním prostředím, ke kterému dojde v okamžiku setkání polymerní matrice a vody. Následně dochází k difundaci aktivní látky do okolí. Degradace polymerní matrice je také způsobena výskytem mikroorganismů, kteří využívají biologicky rozložitelný materiál a vnímají ho jako potravu. Degradací polymerní matrice dochází k uvolnění zbytku aktivní látky. Pozitivním přínosem tohoto systému je rozšíření půdní aktivity, zlepšení stability a snížení nežádoucí toxicity aplikací bioaktivních látek. Výsledkem těchto vlastností je pozitivní vliv na životní prostředí a také snadnější manipulace a aplikace takto připravených látek. Vhodným materiálem, který nezatěžuje životní prostředí může být biologicky rozložitelný polyester polyhydroxybutyrát (PHB). Využitím PHB docílíme poměrně rychlé degradaci a tím snížíme zátěž aktivních látek na životní prostředí. Tato práce je zaměřena na zkoumání rychlosti degradace takhle enkapsulovaných aktivních látek v půdním prostředí ve srovnání s čistou polymerní matricí a celulórou. Také byla zjištěna rychlost uvolňování aktivní látky ve vodném prostředí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SYSTÉMY S POSTUPNÝM UVOLŇOVÁNÍM V ZEMĚDĚLSTVÍ

1.1 Typy systémů

V posledních letech se rozvíjí trend používání několik různých systémů s nanopesticidní aplikací. Podle struktury lze tyto systémy rozdělit do několika skupin jako jsou například polymerní částice, nanovlákná, nanogely a další. [1], [2]

Tabulka 1 obsahuje výběr několika aplikací v rámci nanopesticidů, jsou rozděleny podle jejich fyzikálních vlastností. V případě každé aplikace je uvedena použitá aktivní látka, zda je systém s kontrolovaným uvolňováním výhodný oproti dávkování pouze aktivní látky. [2]

1.1.1 Uvolnění a účinnost

Některé formulace na bázi polyethylenglykolu (PEG) jsou více účinné než komerční produkty. Například biologické testy na hubení hmyzu zaznamenaly LC_{50} 30–45 mg / l pro nanoformulaci p-cyfluthrinu a 125 mg / l pro komerční formulaci. Větší účinnost byla pozorována po dobu testů (tj. 30 dnů). Větší účinnost byla způsobena pomalejším uvolňováním aktivní látky. [2]

1.1.2 Nanoemulze

Mezi cíle nanoemulzí obecně patří zvýšit rozpustnost špatně rozpustných aktivních látek, zatímco koncentrace tenzidů je nižší než koncentrace v mikroemulzi. [2]

Nanoemulze složená z neemového oleje a neionického tenzidu Tween 20 s velikostí kapiček v rozmezí 31,03 nm až 251,43 nm, byla formulována s různými koncentracemi neemového oleje a Tweenu 20. Byl zkoumán larvicidní účinek nanoemulze proti *Culex quinquefasciatus*. Výsledek vedl ke zjištění, že nanoemulze o velikosti 31,03 nm je účinným larvicidním činidlem. [33]

1.1.3 Nanokapsule na bázi polymerů

Rozdělení do dvou různých kategorií, které zkoumají osud a účinnost nanopesticidů anebo nové aplikace v oblasti ochrany rostlin. [2]

Do nanokapsulí na bázi poly (ϵ -kaprolakton) (PCL) byly enkapsulovány herbicidy na bázi triazinů a konkrétně ametryn, antrazin a shimazin. Byly provedeny testy genotoxicity, které ukázaly, že nanoformulace obsahující herbicidy byly méně toxické než samotné herbicidní

látky. Systém byl navržen tak, aby minimalizoval dopady herbicidů na lidské zdraví a životní prostředí. [34]

1.1.4 Nanogely

Nanogely jsou nerozpustné ve vodě a tudíž méně náchylné k bobtnání, nebo zmenšování se změnami vlhkosti. V posledních letech roste počet využití nanogelů aplikovaných k ochraně rostlin, jako možný způsob k splnění norem ekologického zemědělství. Jako aktivní látky se nejčastěji používají feromony, éterické oleje nebo měď. [2]

Nanogely na bázi chitosanu a kešu gummy byly připraveny a naplněny olejem *Lippia sidoides*. Byly provedeny uvolňovací testy, které ukázaly, že nanogely vykazují pomalejší a trvalejší uvolňování. Biologické testy provedené na larvách ukázaly, že úmrtnost byla vyšší u nanogelů než u čistého oleje. [35]

1.1.5 Nanovlákná

Metoda pro výrobu nanovláken elektrospinning vykazuje potenciál pro splnění požadavků průmyslové výroby. Výhoda nanovláken nad sférami a kapsulemi spočívá v jejich schopnosti vyhnout se „burst efektu“, ke kterému dochází při nerovnoměrném rozložení aktivní látky v polymerní matici. [2]

Nanovlákná připravená z kyseliny polylaktové (PLA) a celulózy byly připraveny elektrospinningem za zvýšené teploty. Do vláken bylo začleněno neiontové hydrofobní barvivo Columbia Blue jako modelová sloučenina, které napodobuje systém agrochemikálií. Testy provedené ve skleníku potvrdily trend, že s rostoucím dávkováním pesticidů, roste úmrtnost molů. [36]

1.1.6 Anorganické nanočástice spojené s organickou aktivní látkou

Ještě donedávna do téhle kategorie zapadaly formulace za použití mikroporézního oxidu křemičitého jakožto nosiče pro pomalé uvolňování, nebo oxidu titaničitého v polymerní matici pro katalýzu fotodegradace organické aktivní látky. Nově byly navrženy nové systémy formulací zahrnující použití oxidu křemičitého, nebo uhličitanu vápenatého jako nosiče pro pomalé uvolňování aktivní látky. [2]

1.1.7 Anorganické nanočástice

Oxid křemičitý

- Zvyšuje toleranci rostlin vůči různým abiotickým a biotickým stresům a proto nanočástice SiO₂ byly připraveny za účelem zvýšení kontroly nad řadou zemědělských škůdců. Nanočástice SiO₂ (15-30 nm) představují vyšší mortalitu pro hmyz než sypký SiO₂ (100–400 nm). [2]

Stříbro

- Díky svým antimikrobiálním vlastnostem bylo prokázáno, že nanočástice ze stříbra mohou významně inhibovat růst rostlinných patogenů v závislosti na dávce. [2]

Tab. 1 Účinnost a toxicita některých nanoformulací

Nanoemulze	
Neemový olej	LC ₅₀ je snižována velikostí kapiček [33]
Enkapsulované pesticidy v nanokapsulích na bázi polymerů	
Ametryn, antrazi a simazin	Menší toxicita než čistá aktivní látka [34]
Nanogely	
Esenciální olej	Vyšší efektivita než u čistého oleje [35]
Nanovlákná	
Thiamethoxan	Efektivita byla nejvyšší při 50% doporučené dávky [36]

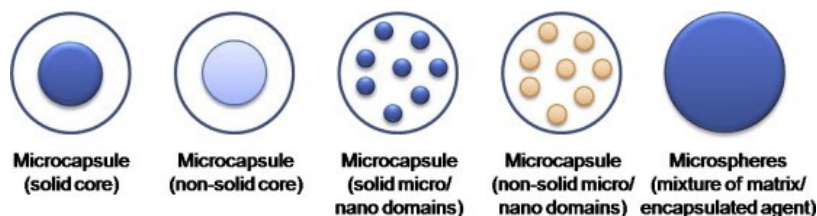
1.2 Polymerní nano a mikročástice

Mezi částice, které se vyznačují sférickým tvarem a mají průměr v řádu mikrometrů a to od 1 μm až do 1 000 μm, zařazujeme mikročástice. Pod 100 nm částice definujeme jako nanočástice. Mezi mikročásticemi a nanočásticemi se dále setkáváme se submikročásticemi, které vyplňují průměr mezi 1 μm a 100 nm. Částice, které jsou větší než mikročástice jsou nazývány makročásticemi a dosahují průměru v řádu milimetrů. [8]

Obvyklou matricí pro polymerní mikročástice je polymerní matrice, ve které může být imobilizováno určité množství aktivní látky např. pesticidy, potravinové materiály, buňky. Mikročástice mají mnoho velmi zajímavých vlastností, díky kterým jsou zvláště vhodné pro mikroenkapsulaci účinných aktivních látek a jejich následné řízené uvolňování. Zapouzdřením aktivních látek do polymerních mikročástic dostaneme značné výhody jako je zvýšení ochrany zapouzdřených materiálů před degradačními reakcemi např. před oxidací, dehydratací, UV zářením, vlivem teplot a před vlivem kyselin a zásad. Zapouzdřením aktivních látek také lze maskovat organoleptické vlastnosti jako je barva, chuť a vůně zapouzdřených materiálů. S výslednými práškovými a toxickými zapouzdřenými materiály je snadná a bezpečná manipulace. V posledních letech roste trend používat mikročástice v kompozitech, nátěrech, kosmetice, biologických vědách a v medicíně. [9]

1.2.1 Struktura

Podle distribuce účinné látky lze rozdělit částice polymerních systémů do dvou různých kategorií, na mikrosféry a mikrokapsule. Typ struktury mikrosféry se nazývá matrix, který je složen z homogenní směsi aktivní sloučeniny a suroviny. Tenhle typ struktury částic se vyskytuje u pevných látek, kde není rozlišeno mezi jádrem a pláštěm částic. Nanosféry se vyznačují převážně kulovitým tvarem. Na povrchu částice se bioaktivní látka absorbuje, nebo se enkapsuluje dovnitř částice. Mikrokapsule se vyznačují jádrem, tedy mají polymerní membránu, která obklopuje jádro, které je obvykle obsahuje rozpuštěnou aktivní látku. Struktura jádra může být pevná, kapalná nebo plynná. Kapalně jádro může být složeno buď z olejové fáze, která je vhodným nosičem pro nepolární lipofilní sloučeniny anebo z vodné fáze, které je vhodným nosičem pro sloučeniny rozpustné ve vodě. V jádru mikrokapsulí se může vyskytovat jedna nebo více domén aktivní sloučeniny znázorněno na obrázku 1. [9], [10], [11], [12]



Obr. 1 Kategorie a struktura mikročástic [9]

2 METODY PŘÍPRAVY ČÁSTIC

V posledních letech bylo vyvinuto mnoho metod přípravy polymerních částic. Nejčastěji se tyto metody dělí podle mechanismu vzniku mikročástic na chemické a fyzikálně-chemické. Metody pro přípravu těchto částic se většinou skládají ze dvousložkových fází. Primárně je vytvořen monomerní či polymerní emulgovaný systém a následně se formují částice polymerací nebo srážením. [13]

Typy metod pro přípravu mikročástic:

- Metoda odpaření/extrakce rozpouštědla
- Síťovací metody
- Mezipovrchová polymerizace
- Metoda založená na tvorbě iontových nebo kovalentních vazeb
- Tvorba nanočástic z neutrálních nanogelů
- Metoda emulgace s reverzním vysolováním
- Metoda emulgace s difuzí rozpouštědla

Jednou z nejvhodnějších metod je metoda odpaření/extrakce rozpouštědla, která byla použita v této bakalářské práci. Použitím této metody vznikají mikrosféry. [13], [14]

2.1.1 Metoda odpaření/extrakce rozpouštědla

Metoda odpaření/extrakce rozpouštědla z vnitřní fáze emulze patří mezi fyzikálně-chemické metody a je jednou z nejpoužívanějších metod pro přípravu mikročástic z předem připraveného polymeru. Na základě různých kritérií lze metodu rozdělit:

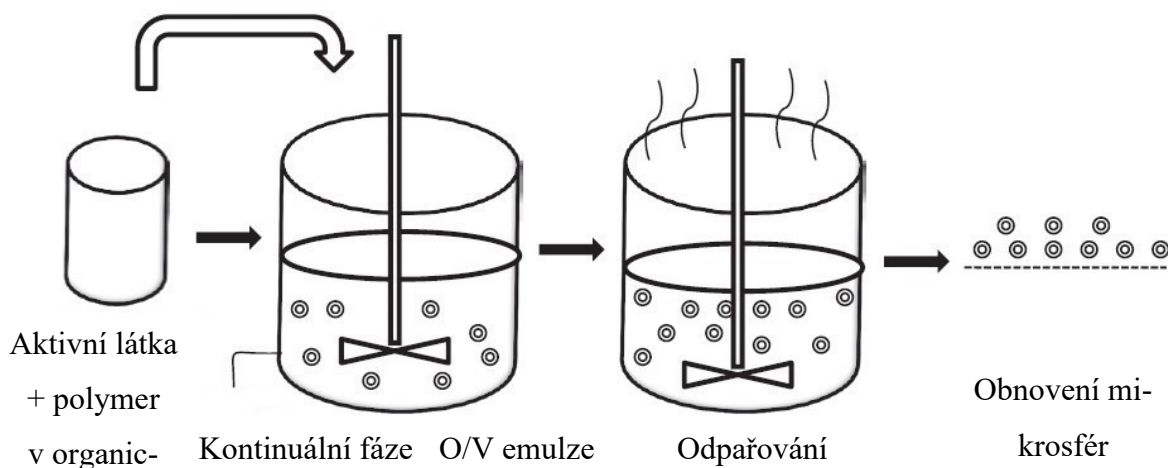
- a) podle povahy vnější fáze (vodná, nevodná),
- b) podle dispergace účinné látky (roztok, suspenze, emulze),
- c) podle způsobu odstranění rozpouštědla (odpaření, extrakce)

Díky snadnému provedení a přístrojové nenáročnosti patří metoda mezi oblíbenější. Polymerní matrice je nejprve rozpuštěna v těkavém organickém rozpouštědle a představuje vnitřní fázi. Dojde ke vzniku mikrosfér a enkapsulaci aktivní látky, která je rozpuštěna nebo dispergována v roztoku polymeru za tvorby roztoku, suspenze nebo emulze. U enkapsulace touto metodou je pozorována vysoká účinnost. Následně se organická fáze za stálého míchání emulguje do emulzního systému (vnější fáze), která obsahuje vhodný emulgátor. Vznikne jemná emulze O/V (olejová fáze/vodná fáze). Díky emulgátoru zamezíme splývání

kapek v emulzi. Cíleného stupně emulze se následně dosáhne za vysokorychlostního míchání, homogenizačního zařízení či ultrazvukové lázně. Rychlost míchání je jeden z kritických faktorů ovlivňující velikost kapek emulze ve vnější fázi. Poté je z emulzního systému odstraněno dle vhodného způsobu rozpouštědlo, které difunduje do vodné fáze a dojde k jeho odpaření na rozhraní voda/vzduch. Za stálého míchání dojde k úbytku rozpouštědla a vysrážení polymerních částic. Částice zůstávají suspendované v kontinuální fázi, které lze získat filtrací nebo odstředěním. Následně jsou promyty a vysušeny. Sušení probíhá za sníženého tlaku nebo lyofilizací, čímž získáme volně tekoucí prášek. [13], [15]

2.2 Systém O/V

Obecně upřednostňovanými metodami jsou metody využívající vodu jako vnější fáze (V) a hydrofobní roztok polymeru (O). Tyhle systémy jsou ekonomičtější a není potřeba recyklace vnější fáze. Systém je založen na principu enkapsulace. Nejprve je provedeno rozpuštění polymerní matrice v organickém rozpouštědle např. chloroformu, dichlormethanu nebo ethylacetátu. Následně proběhne dispergace aktivní látky a celá směs je emulgována do vnější vodné fáze s obsahem vhodného emulgátoru a vznikne emulze O/V. Organická fáze s roztokem polymeru je zde rozptýlena ve formě kapiček, při odpaření rozpouštědla se kapičky vysráží a vytvoří částice. Ve struktuře částic je enkapsulována, rozpuštěna či rozptýlena aktivní látka. Částice připraveny touto metodou jsou vhodné pro zpracování lipofilních látek jako například steroidních hormonů, protizánětlivých léčiv a neuroleptik. Určitý problém představují hydrofilní látky, jelikož velká část aktivní látky uniká z roztoku polymeru, z vnitřní fáze do vodního vnějšího prostředí a tím dochází ke snížení enkapsulačního procesu. Tomuhle jevu lze zabránit, modifikací dispergující vnější fáze. Například zvýšením lipofility či použitím neionizovaných forem hydrofobních látek za snížení hydrofilního charakteru látek. Přídavkem anorganických solí jako jsou např. NaH_2PO_4 či KH_2PO_4 , změnou pH, nebo přídavkem elektrolytu pro zvýšení osmotického tlaku. Schéma přípravy částic metodou odpaření rozpouštědla je znázorněno na obrázku 2. [8], [16]



Obr. 2 Znárodnující schéma přípravy částic metodou odpařování rozpouštědla [17]

Využití systému bylo popsáno v článku Low Molecular Weight Poly(lactic acid) Microparticles for Controlled Release of the Herbicide Metazachlor, kde jako polymerní matrice bylo použito PLA s enkapsulovaným metazachlorem. Metazachlor se využívá jako herbicidní prostředek v zemědělství. Postup přípravy částic proběhl následujícími kroky: rozpuštěním PLA a metazachloru v chloroformu s vznikla olejová fáze. Stabilizátorem emulze zde byl zvolen vodný roztok želatiny. Dále proběhla dispergace směsi při vysokých otáčkách (11 000 – 18 000) po dobu 5 minut. Dispergování směsi probíhalo za neustálého chlazení, aby nedošlo k předčasnému odpaření organického rozpouštědla. Dále probíhala sonifikace emulze pomocí ultrazvukové sondy po dobu 5 minut a následně za stálého míchání a sníženého tlaku bylo odpařeno rozpouštědlo. Pomocí centrifugy byly odděleny částice od emulze a promyty dekantací. Následně proběhlo zmrazení a lyofilizace částic. [2], [8]

Systém O/V byl využit i v této bakalářské práci, pro výrobu PHB mikročástic do kterých byl enkapsulován pendimethalin.

2.2.1 Systém O/O

V systému O/O se nahrazuje vodná fáze za fázi lipofilní a nedochází k rozpuštění hydrofilní aktivní látky což eliminuje úniku aktivní látky do vodné kontinuální fáze u systému O/V. Obě fáze tedy vnitřní i vnější jsou vzájemně nemísitelné a jako kontinuální fáze se používají netěkavé kapaliny lipofilní nebo organické povahy, např. minerální oleje, rostlinné oleje nebo netěkavá organická rozpouštědla. Jako vnitřní fáze může být využit například dichlormethan. Odpařením rozpouštědla došlo ke vzniku mikročástic s trojfázovým uvolňováním

aktivních látek. Nejprve dojde k rychlému uvolnění aktivní látky z povrchu mikročástice, poté následuje fáze pomalého uvolňování z matrice průnikem vody do mikročástice a následuje rozpad částice s rychlým uvolněním aktivní látky. Kinetika a rychlost uvolňování je obdobná jako u částic připravených metodou O/V. [8]

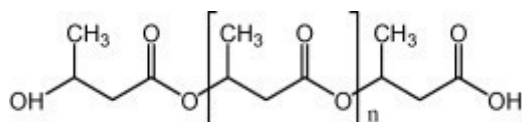
Jako další modifikace metody O/V můžeme zahrnout systém V/O/V, který je vhodný k enkapsulaci hydrofilních látek využitím násobné emulze. Systém O/V/O je vhodný pro přípravu mikročástic obsahující aktivní látky lipofilní povahy.

2.3 Materiály pro přípravu polymerních částic

Mezi vhodné polymerní materiály používané pro přípravu polymerních částic se řadí především biologicky degradovatelné a biologicky kompatibilní materiály. Jako vhodným materiálem, který je dobře biologicky degradovatelný a zároveň biologicky kompatibilní je PHB, které bylo vybráno v rámci této bakalářské práce. PHB lze využít jak ve zdravotnictví, tak i v zemědělském odvětví. Jako stabilizátor při přípravě částic byl použit polyvinyl alkohol (PVA).

2.3.1 Polyhydroxybutyrát – PHB

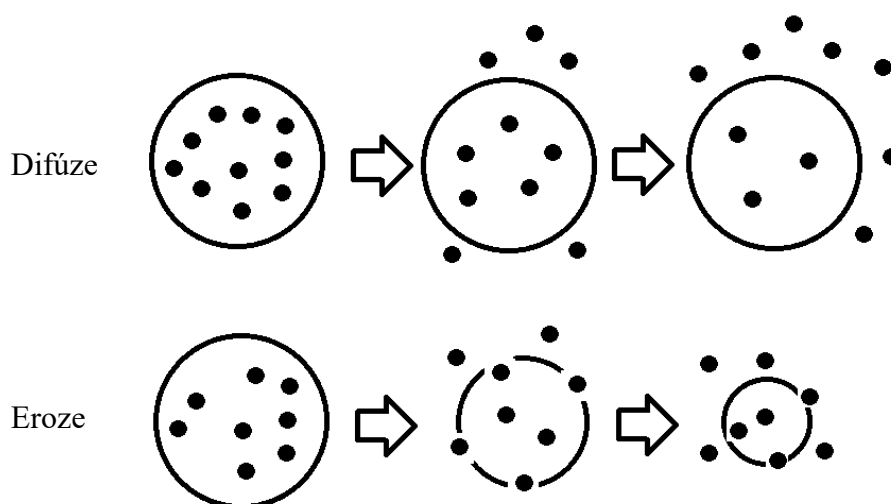
Poly-(3-hydroxybutyrát) biopolyester ze skupiny polyhydroxyalkanoátů, který je syntetizovaný jako rezervní materiál mikroorganismů z obnovitelných zdrojů. PHB má podobné termoplastické vlastnosti jako polyethylen a polypropylen. PHB je inertní, biokompatibilní a biologicky rozložitelný materiál, díky těmhle vlastnostem je PHB ideální pro lékařské a biomedicínské využití. Je důležité, aby PHB neobsahovalo toxické produkty související s degradací. Produkce biopolymeru mikrobiální fermentací zabraňuje přítomnosti toxických produktů ze syntetické polymerace, zatímco hydrolytická degradace PHB vede k získání monomeru kyseliny D-3-hydroxymáselné. Tato kyselina je normální složkou krve a je jednou ze tří ketolátek, produkovaných endogenně procesem známým jako ketogeneze. V posledních letech se pro průmyslovou výrobu používá pouze několik bakteriálních druhů, jako jsou *Cupravidus necator*, *Azohydromonas lata* a rekombinantní *Escherichia coli*. Chemická struktura PHB je znázorněna na obrázku 3. [18], [19]



Obr. 3 Chemická struktura PHB [18]

2.4 Mechanismus kontrolovaného uvolňování

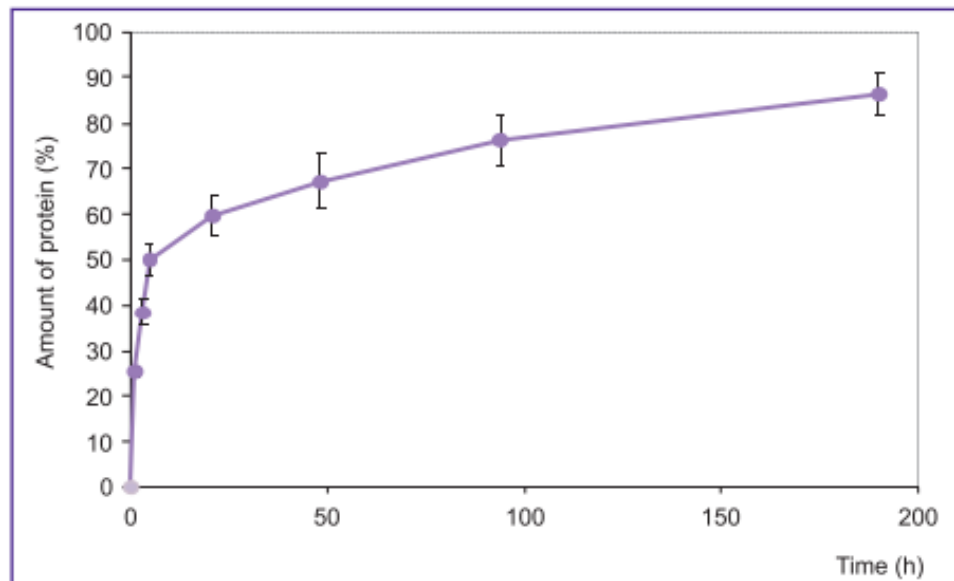
Návrhy a vývoj systémů s kontrolovaným uvolňováním jsou za poslední roky předměty, které přitahují velký zájem. Aktivní látky jsou uvolňovány z biologicky rozložitelných částic několika mechanismy a to difúzí, erozí anebo změnou chemických aspektů. Většinou jeden z mechanismů převažuje. Systémy fungující na difuzním principu uvolňují aktivní látku na základě koncentrací uvnitř a vně polymerní matrice. Erozní mechanismus dělíme na povrchový a objemový. Povrchová eroze je na rozdíl od rychlé objemové eroze žádoucí jelikož dochází k jevu, že rychlost uvolňování aktivní látky je řízena velikostí povrchu částice. Mezi chemické aspekty můžeme zařadit například změny pH, teplota, světelné záření, redoxní potenciál, nebo biologické stimulační. Význam kontrolovaného uvolňování z pohledu životního prostředí je takový, že tenhle systém může minimalizovat toxicitu aktivní látky. Zjednodušený princip difúze a eroze je znázorněn na obrázku 4. [8], [27], [34]



Obr. 4 Znázornění uvolňovacích mechanismů

2.5 Počáteční efekt rychlého nárůstu koncentrace aktivní látky

Aplikací mikročástic do vhodného prostředí je vystavíme řadě fyzikálním a chemickým vlivům. Nejvíce se zde uplatňuje vysoký koncentrační gradient mezi enkapsulovanou aktivní látkou a vodním prostředím. V počáteční fázi dojde k prudkému nárůstu koncentrace aktivní látky v uvolňovacím médiu či prostředí. Tento jev se nazývá burst-efekt. Avšak v případě kontrolovaného uvolňování je tenhle jev značně nežádoucí, jelikož je zamezeno kontinuálnímu uvolňování po delší dobu. Vhodnou povrchovou úpravou mikročástic lze tomuto jevu zabránit. Obrázek 5 znázorňuje rychlé uvolnění aktivní látky v uvolňovacím prostředí. [38]



Obr. 5 Uvolňovací profil s počátečním burst efektem [38]

3 PESTICIDY

Podle organizace Food and Agricultural Organisation se jako pesticidy označují sloučeniny nebo jejich směsi určené pro prevenci, potlačení, odpuzení či kontrolu škodlivých činitelů tedy proti nežádoucím mikroorganismům, rostlinám a živočichům během produkce, skladování, transportu, distribuce a rovněž zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv. V tabulce 2 je k dispozici přehled základních typů pesticidů podle jejich cílového činitele. [20]

Tab. 2 Základní dělení pesticidů podle cílového činitele [21]

Skupina pesticidů	Cílový škodlivý činitel
Insekticidy	hmyz
Akarcidy	pavoukovití
Fungicidy	plísně, cizopasně houby
Moluskocidy	měkkýši
Rodenticidy	hlodavci
Herbicidy	plevelné rostliny
Regulátory růstu rostlin	přirozený růst

V této bakalářské práci byl vybrán pendimethalin a clomazone jako druh uvolňované aktivní látky, řadící se mezi herbicidy

3.1 Herbicidy

Herbicidy jsou chemikálie, které zpomalují nebo přerušují normální růst a vývoj rostlin v zemědělství. Použití herbicidů je relativně málo náročné na lidskou práci a většinou bývá méně nákladné než ostatní možnosti regulace plevelů. Avšak při používání herbicidů existují rizika například poškození pěstované plodiny, negativní vliv na obsluhu rozprašovačů a dalších osob, které přichází do kontaktu s těmito látkami. Herbicidy navíc významně zatěžují životní prostředí. Herbicidní látky nebo meziproducty jejich rozkladu často přetrvávají v půdě, mo-

hou být vyplavovány do pozemních a podzemních vod, anebo můžou být jejich rezidua obsažena i v potravinách. Pro své nebezpečné vlastnosti je většina herbicidů označována jako jedy. [22], [23]

3.1.1 Historický vývoj

Významný mezník pro herbicidy nastal na přelomu 19. a 20. století, kdy se k regulačním účelům začaly používat anorganické sloučeniny (síran měďnatý či železnatý, kyselina sírová a chlorečnan sodný). Revoluce nastala na začátku 40. let 20. století objeven herbicidního účinku syntetických auxinů. Šlo o první selektivní a velmi účinné herbicidy. Velký význam při vývoji herbicidů sehrála 2. světová válka, neboť tyto látky byly tajně vyvíjeny jako potencionální chemické zbraně. V jižním Vietnamu během vietnamské války byly roztoky herbicidů dokonce aplikovány za účelem defoliace lesů ničení úrodných půd. Aplikace probíhala především z letadel a vrtulníků na lesy a zemědělskou půdu. Během vietnamské války bylo postříkáno 12 % lesů a 5 % zemědělské půdy jižního Vietnamu. Bylo aplikováno cca 70 000 tun různých herbicidů, nejvíce však herbicid složený z 2,4-dichlor-fenoxyoctové kyseliny a 2,4,5-trichlor-fenoxyoctové kyseliny s názvem Agent Orange. Jako malou přísadu tyto herbicidy obsahovaly 2,3,7,8-tetrachlor-dibenzo-p-dioxin a díky obsahu dioxinů jsou tyto herbicidy považovány za jedny z nejtoxičtějších nízkomolekulárních jedů. Zaváděním herbicidů do praxe přineslo podstatné zvýšení účinnosti regulačních opatření proti plevelům. Vysoká účinnost moderních herbicidů zaručovala spolehlivost ochrany i při nedodržování základních agrotechnických zásad. [22], [23], [24]

3.1.2 Vývoj nových herbicidů

Vývoj nových pesticidů je velmi náročný a nákladný proces. Hlavními požadavky na nově zaváděné herbicidy jsou:

- vysoká selektivita k plodině a necílovým organismům,
- vysoká a rychlá účinnost v nízkých dávkách,
- rychlá a bezpečná degradace v prostředí,
- relativně levná syntéza a dostupná nákupní cena. [22]

3.1.3 Rozdělení herbicidů

Místem a mechanismem působení

Herbicidní účinek je způsoben tím, že narušují některý důležitý fyziologický proces nezbytný pro normální růst a vývoj. Většinou se jedná o inhibici jednoho nebo více enzymů, katalyzujících některou z reakcí při biosyntéze organických sloučenin. Znalost biochemické aktivity herbicidů je významné především z hlediska selekce odolných druhů a rezistence plevelných společenstev při dlouhodobém používání přípravku se stejným účinkem. [22], [24]

Aby bylo dosaženo správné účinnosti herbicidů, je třeba, aby byly splněny následující podmínky:

- zasažení cílové rostliny,
- dostatečný příjem účinné látky,
- transport v rostlině na místo účinku,
- akumulace a perzistence herbicidu v místě účinku, aby mohl být inhibován cílový enzym herbicidního účinku. [25]

Dle místa a mechanismu účinku můžeme herbicidy dále dělit na:

- Inhibitory fotosyntézy
- Inhibitory biosyntéz rostlinných pigmentů
- Inhibitory syntézy aminokyselin
- Inhibitory syntézy lipidů
- Inhibitory stavby mikrotubulů [22]

Podle selektivity

Mezi herbicidy existují rozdíly v míře selektivity, která se nejčastěji vyjadřuje takzvaný kvocientem selektivity (Qs), který je dán poměrem mezi dávkou herbicidy, v jejímž důsledku dochází k 10 % poškození plodiny a dávkou potřebnou k zajištění 90 % účinnosti na plevel. Dělení herbicidů podle účinku je na selektivní a neselektivní. [22]

- a) Selektivní herbicidy – jde o sloučeniny, které se zaměřují pouze na určité druhy plevelů, aniž by byla poškozena kulturní rostlina. Účinek herbicidu je umožněn určitými rozdíly mezi určitou kulturní rostlinou a určitým plevellem. Tyhle rozdíly mohou být například odlišný tvar a postavení listů, jejich ochlupení, či krytí voskovou vrstvou nebo způsob uložení vegetačního vrchole. [23]

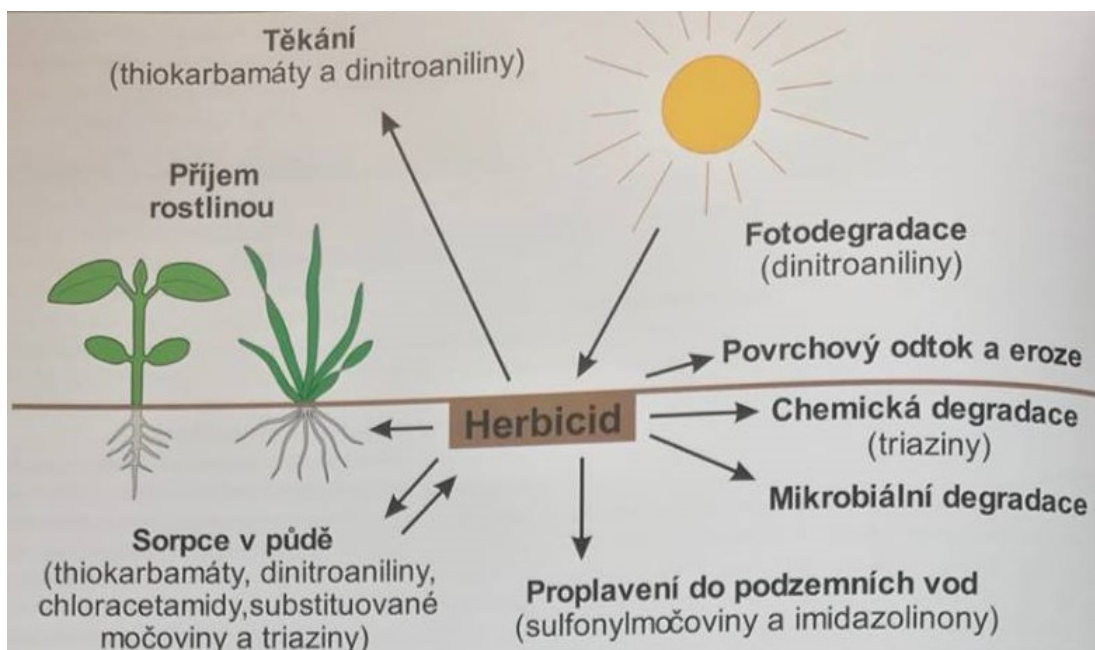
- b) Neselektivní herbicidy – ničí veškerou vegetaci nevhledě na rozdíly mezi rostlinnými druhy. Jedná se o nejpoužívanější herbicidy. Používají se například k hubení plevelů v meziorostním období a také se využívají i na nezemědělských půdách například na cestách. [23], [24]

Způsobem účinku

- a) Dotykové (kontaktní) – poškozují nebo zcela ničí pouze tu část rostliny, která jimi byla zasažena. Mechanismus spočívá zejména ve srážení bílkovin a dehydrataci plev. tiv.
- b) Translokační neboli systémově působící – pronikají do rostliny a jsou rozváděny do jejich částí. Tyhle druhy herbicidů dokáží ničit i vytrvalé plevele.
- c) Sterilizující půdu – díky umrtvování rozmnožovacích orgánů plevelů v půdě zbavují půdu plevelů. [23]

3.1.4 Vliv a toxicita herbicidů na životní prostředí

Herbicidy mohou především při nesprávném zacházení významně ovlivňovat životní prostředí. Pouze malá část z celkového aplikovaného množství účinné látky herbicidu dosáhne určeného cíle a je přijata plevelnou rostlinou. Zbytek pak podléhá změnám pod vlivem působení řady biotických a abiotických faktorů. Při vysoce intenzivním používání dochází ke kontaminaci půdy, vody, ovzduší i samotných zemědělských plodin. Největší problém z toxického hlediska představují dioxiny, zejména 2,4-DCDD a 2,4,5-TCDD, které jsou obsaženy jako vedlejší složka ve fenoxi herbicidech. Největším problémem dioxinů je jejich stálost v prostředí a následná akumulace. Další významné problémy představují metabolity vzniklé degradací herbicidů. Problémem je například metabolit DDE (1,1-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethen), který vzniká částečným odbouráním DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan) v životním prostředí a organismu. DDE je velmi stálým a lipofilním metabolitem. Na obrázku č. 6 je znázorněn osud herbicidu v životním prostředí. V posledních letech je však kladen vysoký důraz na minimalizaci ekotoxikologických rizik ve vztahu k životnímu prostředí a zdraví lidí. Nově vzniklá kritéria pro nové herbicidy jsou stále přísnější. V posledních letech se odklání od používání perzistentních herbicidů, které zůstávají v rostlinách dlouhou dobu a proto hrozí riziko jejich přenosu do krmení pro zvířata nebo potravin pro lidi a následná kumulace těchto látek v organismu. [22], [23], [24]

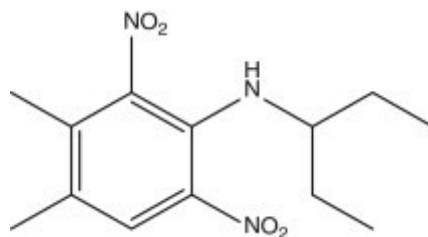


Obr. 6 Obecné schéma faktorů působících na degradaci herbicidů v prostředí [22]

3.1.5 Příklady herbicidů

3.1.5.1 Pendimethalin

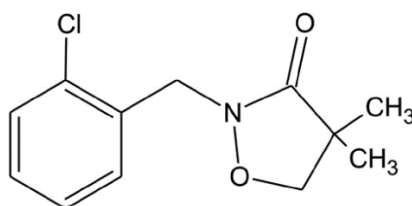
Jedná se o syntetickou chemickou látku, která se využívá především jako herbicid pro kontrolu dřevin a širokolistých plevelů. Je selektivním herbicidem a hlavní využití má pro řízení růstu plevelů například v kukuřici, rýži, bavlně, bramborám, tabáku, ale také najde využití na silnicích a na obytných travních prostorech. Pendimethalin má nízkou akutní toxicitu pro lidi, ale je vysoce toxický pro ryby a ptáky. Je detekován v různých biotopech, rybách, bezobratlých a ptácích. Pendimethalin je oranžově žlutá krystalická pevná látka s teplotou tání 56 °C a je rozpustný ve většině organických rozpouštědel, logP (oktanol – voda) je 5,18 (-) a rozpustnost ve vodě je 0,3 mg·l⁻¹. Pendimethalin je herbicidem využitým pro enkapsulaci do částic zkoumaných v této bakalářské práci a jeho chemická struktura je znázorněna na obrázku 7. [26]



Obr. 7 Chemická struktura
pendimethalinu [26]

3.1.5.2 Clomazon

Je syntetickou chemickou látkou, sloužící především k hubení a kontrole širokolistých plevelů a jednotlivým dvouděložným plevelům. Využití najde například u sójových bobů, rýže, hrachu, kukuřice, tabáku a cukrové třtiny. Aplikace může probíhat ještě před vyklíčením má tedy preemergentní použití. Clomazon je vstřebáván kořeny rostlin a inhibuje biosyntézu prekurzorů chlorofylu a karotenoidů. Jedná se o bílou krystalickou pevnou látku s bodem tání 25 °C, která je rozpustná ve většině organických rozpouštědel, logP(o-w) je 2,5 (-) a rozpustnost ve vodě je 1100 mg·l⁻¹. Clomazon je herbicidem využitým pro enkapsulaci do částic zkoumaných v této bakalářské práci, chemická struktura clomazonu je znázorněna na obrázku 8. [31]

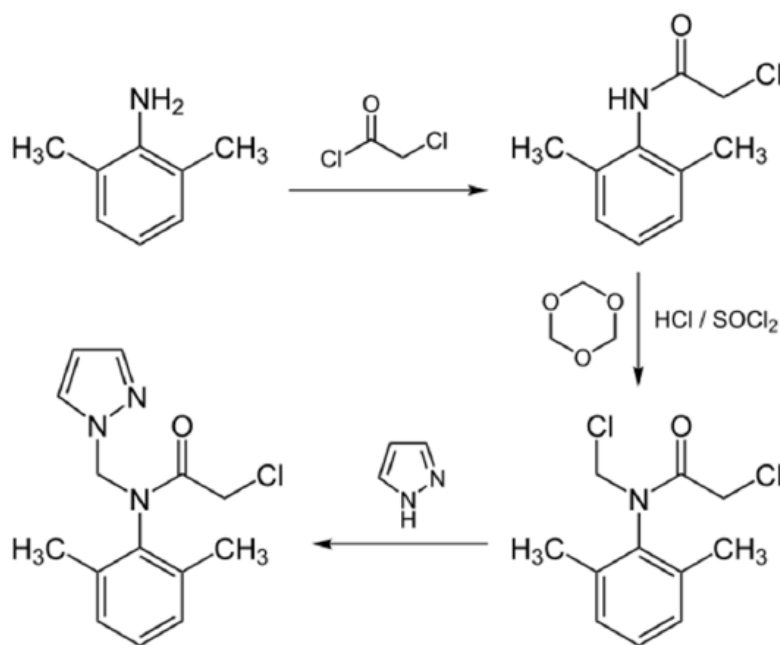


Obr. 8 Chemická struktura
clomazonu [32]

3.1.5.3 Metazachlor

Patří mezi selektivní preventivní a částečně kontrolní herbicidy. Využívá se především proti lipnicovým a dvouděložným plevelům zvláště u řepky, kukuřice a brokolice. Je přijímán kořenovým systémem a aplikace probíhá před vyklíčením plevelů, patří tedy mezi preemergentní herbicidy. Metazachlor způsobuje odumření plevele krátce po vyklíčení. Má nízkou

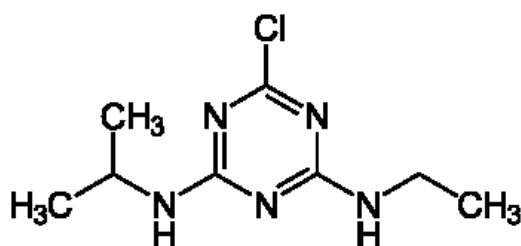
akutní toxicitu pro lidský organismus a do organismu se může dostat inhalací, orální cestou nebo přes kůži. Mezi základní suroviny pro výrobu metazachloru patří chloracetyl chlorid a 2,6-dimethyl anilin, jeho syntéza je znázorněna na následujícím obrázku. [28], [29]



Obr. 9 Syntéza metazachloru

3.1.5.4 Atrazin

V České Republice byl atrazin do zákazu roku 2005 nejběžněji používaný herbicid. Zakázán byl z důvodu kontaminace vod, je toxický pro savce, vodní rostliny a některé druhy řas. Atrazin má velmi negativní vliv na živé organismy. Atrazin působí jako endokrinní disruptor, je poměrně perzistentní a je zařazen mezi karcinogenní látky. U člověka způsobuje podráždění kůže, očí a také nevolnost a zvracení. Při použití se zaměřuje na specifické enzymy zapojené do fotosyntézy rostlin dvouděložných plevelů. Nejčastější využití zaujímá u kukuřice, cukrové třtiny a chmelu. Chemická struktura atrazinu je znázorněna na obrázku 10. [30]



Obr. 10 Chemická struktura atrazinu

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A METODY PŘÍPRAVY

4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Látky pro přípravu částic

- Polyhydroxybutyrát (PHB T21 a PHB T22)
- Polyvinylalkohol (PVA 88)
- Chloroform – ($M_w = 119,378 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- Dichlormethan ($M_w = 84,93 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- Acetonitril ($41,05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- Ledová kyselina octová ($M_w = 60,0516 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- Destilovaná voda
- Pendimethalin ($M_w = 281,31 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- Clomazone ($M_w = 239,7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

4.1.2 Látky pro biodegradační testy

- Půda
- Perlit
- Vzorek nanočástic
- Minerální médium
 - Chlorid vápenatý dihydrát ($M_w = 147,02 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Síran diamonno-železnatý hexahydrát ($M_w = 392,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Dihydrogenfosforečnan draselný ($M_w = 136,086 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Síran hořečnatý heptahydrát ($M_w = 246,48 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Chlorid sodný ($M_w = 58,443 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($M_w = 358,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Chlorid amonný ($M_w = 53,492 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Stopové prvky
 - Síran hořečnatý pentahydrát ($M_w = 241,077 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Kyselina boritá ($61,832 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Síran zinečnatý heptahydrát ($M_w = 287,56 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Molybden amonný tetrahydrát ($M_w = 1235,86 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Nitrid kobaltu hexahydrát ($M_w = 291,03 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

- Síran měďnatý pentahydrát ($M_w = 249,686 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

4.1.3 Látky pro uvolňovací testy

- Dihydrogen fosforečnan sodný dihydrát ($M_w = 156,0076 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- Destilovaná voda
- Azid sodný ($M_w = 65,011 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- Hydroxid sodný ($M_w = 39,997 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- Methanol ($M_w = 32,042 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

4.1.4 Přístroje

- Vysokorychlostní homogenizátor Ultra-turrax® (T 18 Basic, IKA®, Belgie)
- Ultrazvukový homogenizátor SONOPULS HD 2200
- Magnetické míchadlo (RH Basic, IKA, Belgie)
- Centrifuga Rotanta 460R (Hettich, Velká Británie)
- Analyzátor částic Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK)
- Lyofilizátor SanVac (CoolSafe, Labo Gene)
- Zpětný chladič
- Skenovací elektronový mikroskop Phenom Pro
- Vysoceúčinný kapalinový chromatograf (1260 Infinity II Prime LC)
- Univerzální analyzátor plynu (SRS UNIVERSAL GAS ANALYZER)
- Automatický analyzátor prvkového složení Thermo Electron Corporation Flash EA 1112 Series v konfiguraci CHNS/O

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava 0,5 % roztoku PVA

Jako stabilizátor emulze a vnější vodná fáze pro přípravu částic byl použit roztok PVA.

V 500 ml odměrné baňce bylo smícháno 2,5 g PVA 88 s 250 ml destilované vody. Pomocí magnetického míchadla za pokojové teploty bylo PVA rozpuštěno za stálého míchání po dobu 90 min. Následně byl roztok doplněn destilovanou vodou po rysku, důkladně promíchán a následně použit pro přípravu částic. U přípravy částic je roztok PVA vnější vodnou fází.

4.2.2 Příprava částic

4.2.2.1 *Optimalizace přípravy částic*

Byla vyzkoušena řada různých metod pro přípravu částic o požadovaných vlastnostech. V procesu optimalizace se řešilo rozpuštění polymerní matrice v rozpouštědle, zabránění vysrážení částic v různých stupních přípravy a vhodná forma výsledného roztoku.

4.2.2.1.1 Rozpuštění PHB

Dichlormethan (DCM) jako rozpouštědlo (bez zahřívání):

Bylo naváženo 300 mg PHB, do kterého bylo odpipetováno 10 ml DCM. Směs byla následně ponechána po dobu 5 hodin na elektronickém míchadle za stálého míchání pod zpětným chladičem. Po uplynutí doby nedošlo k rozpuštění PHB.

DCM jako rozpouštědlo (se zahříváním):

Bylo naváženo 300 mg PHB, do kterého bylo odpipetováno 10 ml DCM. Směs byla zahřívána na teplotu varu DCM 39 °C na elektronickém míchadle a za stálého míchání byla takto ponechána po dobu 2 hodin pod zpětným chladičem. Stejně jako v předchozím případě i tentokrát nedošlo k rozpuštění PHB.

Acetonitril s ledovou kyselinou octovou jako rozpouštědlo:

Bylo odváženo 300 mg PHB do něhož bylo odpipetováno 10 ml ledové kyseliny octové a 10 µl acetonitrilu (0,001 %). Směs byla následně zahřívána za teploty varu po dobu 1 hodiny

bez míchání. Po uplynulé době bylo PHB dokonale rozpuštěno, avšak po delší době došlo ke ztuhnutí námi připravené suspenze.

Chloroform jako rozpouštědlo:

Navážilo se 300 mg PHB, do kterého bylo odpipetováno 10 ml chloroformu. Směs byla vložena na elektronické míchadlo s regulátorem teploty pod zpětný chladič. Teplota na míchadle byla nastavena na teplotu 120 °C, jelikož docházelo k úniku tepla a chloroform nedokázal dosáhnout teploty varu. Směs byla míchána a ponechána za teploty varu 1-2 hodiny. Po uplynulé době bylo PHB dokonale rozpuštěno a vznikla organická fáze, která byla použita v následujících krocích.

4.2.2.1.2 Zabránění předčasnému vysrážení částic

PHB rozpuštěné v acetonitrilu s ledovou kyselinou octovou:

Po rozpuštění PHB v tomhle rozpouštědle došlo po ochlazení suspenze ke změně struktury. Struktura se proměnila z kapalné na tužší rosolovitou strukturu. Takhle připravená suspenze byla následně znovu zahřáta do změny struktury na kapalnou a následně nabrána do injekční stříkačky a injektována do PVA stabilizátoru emulze v kádince. Po injektáži rozpuštěného PHB vznikala ve vodném prostředí struna. Takhle připravená struna nebyla dále zkoumána v této práci.

PHB rozpuštěné v chloroformu 1:

Po rozpuštění PHB v chloroformu byla smíchána organická fáze se stabilizátorem emulze PVA tedy s vodnou fází. Směs byla přemístěna do menší kádinky, kolem které bylo nadrženo malé množství ledu. Vzniklá směs O/V byla homogenizována vysokorychlostním homogenizátorem a následně sonifikována. Emulze byla ponechána na míchačce při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin a to z důvodu úplného odpaření rozpouštědla. Následným pozorováním bylo zjištěno, že výsledná směs obsahuje malé viditelné agregáty.

PHB rozpuštěné v chloroformu 2:

Následný postup byl opakován, s větším množstvím ledu, aby byla suspenze lépe chlazená. Navíc byla organická fáze vložena do mrazícího zařízení a stabilizátor emulze byl vložen do lednice po dobu jednoho dne. Následně do velké kádinky bylo vloženo velké množství ledu a vytvořila se ledová lázeň. V menší kádince, která byla ponořena v ledové lázni byly smí-

cháno obě fáze. Následovala homogenizace a sonifikace obě fáze po dobu 5 minut. Po ukončení těchto procesů byla emulze vložena na automatické míchadlo a za neustálého míchání bylo odpařováno rozpouštědlo po dobu 24 hodin. Po uplynulé době byla směs pozorována. Ve směsi se nenacházely žádné agregáty a směs byla podrobena další charakterizaci. Takhle byla optimalizována metoda přípravy částic byla použita pro přípravu částic v téhle bakalářské práci. Tento pracovní postup byl uznám jako vhodným pro následnou přípravu plněných polymerních mikroformulací.

4.2.2.2 Příprava částic bez aktivní látky

Částice bez obsahu aktivní látky byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla (O/V). Nejprve byla připravena organická fáze (O), ve které bylo rozpuštěno 300 mg PHB v 10 ml chloroformu. Organickou fází bylo třeba zahrát na teplotu varu chloroformu 61 °C, aby byla polymerní matrice dokonale rozpuštěna. K 10 ml fáze (O) bylo přidáno 100 ml 0,5 % připraveného roztoku PVA, který sloužil jako stabilizátor emulze a zároveň jako vodná fáze (V). Vzniklá směs (O/V) byla homogenizována na vysokorychlostním homogenizátoru Ultra-turrax® (T 18 Basic, IKA®, Belgie) při 20 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Poté pro zjemnění částic byla využita ultrasonifikace pomocí ultrazvukového homogenizátoru SONOPULS HD 2200 po dobu 5 minut. Během homogenizace a sonifikace byla emulze chlazená ledovou tříští, aby nedošlo k předčasnému odpaření rozpouštědla (chloroformu). Ze vzniklých emulzí za stálého míchání na magnetickém míchadle (RH Basic, IKA®, Belgie) při 300 otáčkách za minutu po dobu 24 hodin a laboratorní teplotě bylo odpařeno rozpouštědlo. Dále byla změřena velikost částic pomocí analyzátoru částic Zetasizer a částice byly odděleny od emulze centrifugací při 11500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Po centrifugaci byl slit supernatant a byla provedena resuspendace částic ve 20 ml vody a částice byly následně centrifugovány, celý postup odstředování proběhl dvakrát. K promytým částicím bylo přidáno minimální množství destilované vody, částice byly zmrazeny pro následnou lyofilizaci pomocí lyofilizátoru ScanVac.

4.2.2.3 Příprava částic s enkapsulovanou aktivní látkou

Příprava opět probíhala metodou odpaření rozpouštědla (O/V). Nejprve bylo naváženo množství aktivní látky (PDM, CLO), které odpovídalo procentuálnímu zastoupení aktivní látky v částicích. Množství aktivní látky odpovídalo 30 % použité navážky PHB. Po rozpuštění PHB byla navážka jedné z aktivních látek přidána do organické fáze a rozpuštěna a

rozpuštěna v téhle fázi, následující postup přípravy byl stejný jako při přípravě částic bez aktivní látky. Všechny vzniklé částice byly charakterizovány v tabulce 3.

Tab. 3 Parametry přípravy částic s enkapsulovanou aktivní látkou

	Pendimethalin	Clomazone
Teoretický obsah aktivní látky [%]	30	
PHB [mg]	300	
Chloroform [ml]	10	
0,5 % PVA [ml]	100	
Rychlost homogenizace [rpm]	22 000	
Ultrazvuk [amplituda %]	100	

4.2.3 Příprava fosfátového pufru

Pro přípravu 0,02M fosfátového pufru bylo rozpuštěno 1,559 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrát v destilované vodě a poté bylo pH upraveno na 6,5 pomocí roztoku chloridu sodného. Po úpravě pH byl přidán 1 g azidu sodného (0,2 %) a roztok byl doplněn v 500 ml odměrné baňce po rysku.

4.3 Charakterizace částice

U připravených částic proběhly série analýz. Bylo potřeba zjistit velikost částic, enkapsulované množství aktivní látky a pořídit mikroskopické snímky ilustrující morfologii částic.

4.4 Velikost částic

Velikost částic byla měřena pomocí přístroje Zetasizer. Princip měření je založen na dynamickém rozptylu světla, kdy pomocí Brownova pohybu dochází k pohybu částic a molekul, rychlost tohoto pohybu určuje teplota. Detekce probíhá pomocí lavinové fotodiody, která zachycuje časem se měnící intenzitu rozptylu pro určitý úhel. Měření probíhá při 25 °C, pro každý vzorek třikrát. Ze Zetasizeru získáme kromě velikosti částic v nanometrech i polydispersní index (PDI).

4.4.1 Polydisperzní index

Polydisperzní index (PDI) byl vypočítán jako podíl standardní odchylky σ a stanoveného hydrodynamického průměru (Z_D).

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{Z_D}\right)^2 \quad (1)$$

4.5 Morfologie částic

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Phenom ProX byla určena morfologie částic. Metoda se dá použít pro charakterizace heterogenních organických a anorganických materiálů v rozměrech od mikrometrů až po nanometry. Využívá se zvětšení 10x až 30 000x ve vakuu. Principem je detekce rozptýlených a vysrážených elektronů z povrchu vzorku.

Vzorek byl nanesen na oboustranně lepicí vodivou pásku, která byla z druhé strany přilepena k terčíku. Vzorky byly potaženy tenkou vrstvou Au a vyčištěny od prachu pomocí stlačeného suchého vzduchu. Připravený vzorek s terčíkem byl připevněn do držáku, který byl vložen do mikroskopu. Po uzavření dvířek byl vzorek přesunut k optickému mikroskopu a po spuštění SEM režimu pokračoval do vakuové komory, kde probíhalo měření.

4.6 Stanovení účinnosti enkapsulace (EE) a plnění částic (HL) PDM a CLO

Pro zjištění prvků potřebných pro výpočet enkapsulace v částicích bylo tyto částice nejprve nutno podrobit elementární analýze pomocí Thermo Electron Corporation Flash EA 1112 Series v konfiguraci CHNS/O a zjistit tak procentuální zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku. Získaná data byla využita pro výpočet, který proběhl pomocí tří rovnic o třech neznámých (rovnice 2) a bylo vypočítáno procentuální zastoupení PHB, PVA a jedné z aktivních látek PDM a CLO. Přepočtení bylo využito pro účinnost enkapsulace (EE). Data z elementární analýzy jsou zobrazena v tabulce 4 a s těmito daty bylo následně počítáno.

Tab. 4 Parametry pro výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých látek

	Sumární vzorec	Molární hmotnost [g·mol ⁻¹]	C [%]	H [%]	O [%]	N [%]	Cl [%]
PHB	C ₄ H ₆ O ₂	86,09	55,1	7,02	37,17		
PVA	C ₂ H ₄ O	44,05	54,53	9,15	36,32		
PDM	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281,31	55,50	55,50	22,75	14,94	
CLO	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	239,70	60,13	60,13	13,35	5,84	14,79

Příklad:

Výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých látek v částicích s 30 % PDM

Výsledky elementární analýzy částic obsahují 30 % zapouzdřeného pendimethalinu znázorněné v tabulce 5 a následné provedené výpočty pro zjištění procentuálního zastoupení prvků v částicích:

Tab. 5 Procentuelní zastoupení prvků u částic s 30 % zastoupením pendimthalinu

	C [%]	H [%]	N [%]
1. Měření	55,91	6,95	3,32
2. Měření	55,89	7,12	3,26
Ø	55,90	7,035	3,29

$$C: \quad 55,9 = 55,81x + 54,53y + 55,50z$$

$$H: \quad 7,03 = 7,02x + 9,15y + 6,81z \quad (2)$$

$$N: \quad 3,29 = 14,94z$$

$$C = 55,9 \%; \quad H = 7,035 \%; \quad N = 3,29 \%$$

$$N: \quad z = \frac{3,29}{14,94} = 0,2169 \rightarrow 21,69 \% \text{ PDM}$$

$$C: \quad 55,9 = 55,81x + 54,53y + 55,5 \cdot 0,2169$$

$$H: \quad 7,035 = 7,02x + 9,15y + 6,81 \cdot 0,2169$$

$$C: \quad 43,86 = 55,81x + 54,53y \rightarrow x = \frac{43,86 - 54,53y}{55,81}$$

$$H: \quad 5,56 = 7,02x + 9,15y$$

$$H: \quad 5,56 = 7,02 \cdot \frac{43,86 - 54,53y}{55,81} + 9,15y$$

$$H: \quad 5,56 = 5,52 - 6,86y + 9,15y$$

$$H: \quad y = \frac{0,04}{2,29} = 0,017$$

$$y = 0,017 \rightarrow 1,7 \% \text{ PVA}$$

$$C: \quad x = \frac{55,9 - 55,81 \cdot 0,017 - 55,5 \cdot 0,2169}{55,81} = 0,7689$$

$$x = 0,7689 \rightarrow 76,9 \% \text{ PHB}$$

Takhle použitý výpočet byl použit pro částice s enkapsulovaným clomazonem i pro částice připravené bez aktivní látky.

Výsledky elementární analýzy částic obsahují 30 % zapouzdřeného clomazonu znázorněné v tabulce 6 a následné procentuální zastoupení látek v částicích:

Tab. 6 Procentuelní zastoupení prvků u částic s 30 % zastoupením pendimthalinu

	C [%]	H [%]	N [%]
1. měření	55,73	6,99	0,29
2. měření	55,84	7,11	0,29
Ø	55,78	7,05	0,29

$$C: \quad 55,785 = 55,81x + 54,53y + 60,13z$$

$$H: \quad 7,05505 = 7,02x + 9,15y + 5,89z \quad (3)$$

$$N: \quad 0,29 = 5,84z$$

C = 55,785 %; H = 7,055 %; N = 0,29 %

C: $x = 0,8921 \rightarrow 89,21 \%$ PHB

H: $y = 0,05545 \rightarrow 5,545 \%$ PVA

N: $z = 0,04966 \rightarrow 4,966 \%$ CLO

4.6.1 Herbicidní plnění (Herbicide loading, HL)

Herbicidní plnění neboli plnění částic herbicidem je definováno jako poměr množství zapouzdřené aktivní látky ku konečné hmotnosti se zapouzdřenou aktivní látkou na konci procesu.

$$HL (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulované aktivní látky}}{\text{hmotnost částice}} \cdot 100 \quad (4)$$

4.6.2 Účinnost enkapsulace (EE)

Účinnost enkapsulace je definována jako poměr mezi hmotností zapouzdřené aktivní látky na konci procesu ku počáteční hmotnosti aktivní látky na začátku procesu

$$EE (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulované látky}}{\text{počáteční hmotnosti látky}} \cdot 100 \quad (5)$$

4.7 Biodegradační testy

4.7.1 Příprava minerálního média

Minerální médium bylo připraveno zvlhčením půdy na 50 % vlhkost. Do 1000 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 10 ml chloridu vápenatého dihydrátu, 10 ml síranu diamonnoželeznatého hexahydrátu, 20 ml dihydrogenfosforečnanu draselného, 10 ml síranu hořečnatého heptahydrátu, 10 ml chloridu sodného, 80 ml dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, 10 ml chloridu amonného a 2,4 ml stopových prvků a odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

4.7.2 Příprava lahví

Půda byla zbavená větších kusů pomocí jemného síta, následně byla pomocí sušárny při 150 °C třikrát vedle sebe stanovena a vypočtena sušina půdy. Půda v lahvích musela mít 50 % vlhkost. Do lahve bylo přidáno 13 ml minerálního média, 5 g perlitu, 50 mg vzorku částic nebo celulózy, 15 g půdy. Bylo připraveno 5 sérií lahví, čtyři lahve bez vzorku částic na slepý pokus, tři lahve s celulózou, tři lahve s čistými PHB částicemi, tři lahve s částicemi s enkapsulovaným pendimethalinem a tři lahve s částicemi s enkapsulovaným clomazonem. Takhle připravené lahve byly uzavřeny a uloženy do temné místnosti při 25 °C. Měření probíhalo v daných časových intervalech pomocí univerzálního analyzátoru plynů (SRS UNIVERSAL GAS ANALYZER), kdy byla vložena jehla do sklenice a následně byly analyzovány hodnoty plynů: oxidu uhličitého a kyslíku. Koncentrace byly zaznamenány v programu RGA do grafů. Z hodnot plynů byla vypočtena biodegradace vzorku za čas v lahvi. Provdušnění probíhalo po daném časovém intervalu.

Výpočet sušiny a objemu minerálního média pro dosažení 50% vlhkosti:

Součet hmotností mokré půdy: 30,22 g

Součet hmotností vysušené půdy: 28,23 g

Výpočet sušiny půdy: $x = \frac{22,23}{30,22} = 0,9341 \rightarrow 93,41 \%$

Výpočet objemu minerálního média na 15 g půdy:

Sušina: 13,95g = 93 %

Vlhkost: 1,05g = 7 %

Výpočet potřebného objemu: 13,95 – 1,05 = 12,9 ml

4.8 Uvolňovací testy

4.8.1 Příprava média pro uvolňování

Byl připraven 0,02 M roztok dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu a jeho pH bylo upraveno pomocí 1 M hydroxidu sodného na hodnotu 6,5. Ke konzervaci byl využit azid sodný (0,2 %).

4.8.2 Podmínky pro uvolňování

Do skleněných lahví o objemu 50 ml bylo odpipetováno 50 ml pufru o pH 6,5. Následně bylo přidáno 13,3 mg částic s obsahem clomazonu. Bylo odebráno 1,5 ml pufru v daných časových intervalech a pufr byl až do HPLC analýzy uchován při nízké teplotě. Vždy po odběru byl odebraný objem testovacího média doplněn čistým pufrem.

4.8.3 Odběry

Vzorky byly odebrány v daných časových intervalech 1, 24, 48 hodin, dále po 3, 4, 7, 10 a 17 dnech. Takto odebrané vzorky byly skladovány za nízké teploty a po odebrání posledního vzorku byla provedena analýza UHPLC.

4.9 UHPLC

Analýza byla provedena pomocí ultra výkonného kapalinového chromatografu (1260 Infinity II Prime LC). Chromatografické podmínky použité pro analýzu clomazonu byly: mobilní fáze 70 % methanolu pro HPLC a 30% destilované vody pro HPLC. Celkový průtok byl $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a injekční nástřik vzorku na kolonu měl objem 20 μl . Detekce byla prováděna při 230 nm. Při těchto podmínkách byl retenční čas clomazonu přibližně 10,3 min. Měření byla prováděna při pokojové teplotě.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace metodiky pro přípravu částic

V rámci této bakalářské práce byla provedena optimalizace metody, pro vhodnou přípravu částic metodou odpaření rozpouštědla. Vhodné postupy byly vybírány na základě literatury. Optimalizace byla provedena v několika krocích. Prvním krokem bylo najít vhodné rozpouštědlo, ve kterém byl polymerní materiál rozpuštěn. Dále bylo zkoumáno předčasné vysrážení částic během procesu přípravy a forma výsledné suspenze. Výsledná optimalizace metodiky byla použita v rámci této bakalářské práce.

5.1.1 Výběr vhodného rozpouštědla

Vzhledem k rozpustnosti PHB ve většině chlorovaných rozpouštědlech byl vybrán dichlormethan (DCM) a chloroform. Kvůli vysoké těkavosti DCM a chloroformu byl pro přípravu částic těmito rozpouštědly použit zpětný chladič, aby nedošlo k vypaření organické fáze. Dalším vhodným rozpouštědlem se jeví 0,001 % acetonitril s ledovou kyselinou octovou, jelikož PHB být může rozpuštěno i v kyselinách a zásadách.

Prvním zkoušeným rozpouštědlem byl DCM. Při míchání PHB v DCM za pokojové teploty nedocházelo k žádným změnám v rámci několika hodin. Změny nebyly pozorovány ani při zahřátí DCM na vyšší teplotu. Je možné, že by se PHB mohlo v DCM rozpustit, ale teplota varu DCM by se musela udržovat delší dobu. Vzhledem k možné časové náročnosti byly vyzkoušeny další rozpouštědla a s DCM se již dále nepracovalo.

Do 0,001 % acetonitrilu s kyselinou octovou bylo přidáno PHB a za varu této směsi se PHB podařilo rozpustit. U metody nebyl využit zpětný chladič, ale jen stěna kádinky což se ukázalo jako dostačující. Po ochlazení směsi došlo k mírnému ztuhnutí a směs se musela opakovaně zahřát, aby s ní bylo možno dále pracovat. Směs byla umístěna do injekční stříkačky a následně injektována do PVA stabilizátoru emulze, kde vytvářela vlákna. Metoda použití 0,001 % acetonitrilu s kyselinou octovou nebyla dále využívána.

Nejvhodnějším rozpouštědlem, ve kterém bylo PHB rozpuštěno byl chloroform. PHB se podařilo rozpustit za teploty varu a bylo s ním možno dále postupovat.

5.1.2 Optimalizace předčasného vysrážení PHB

Připravená suspenze PHB v chloroformu byla následně smíchána s 0,5 % roztokem PVA, sloužícímu ke stabilizaci organické a vodné fáze. Smíchání proběhlo v menší kádince, která byla ponořena do větší kádinky s ledovou lázní. Ihned po smíchání byla emulze homogenizována po 5 minut. Po uplynutí doby potřebné pro homogenizaci byla emulze sonifikována po dobu 5 minut a následně byla směs po dobu 24 hodin míchána za účelem odpaření organické fáze. Již během procesu sonifikace docházelo k pozorovatelným změnám probíhajících v emulzi. V emulzi se začaly objevovat viditelné částičky PHB, což pro tuto práci nebylo přijatelné. Problémem mohlo být nedostatečné chlazení během homogenizace a sonifikace docházelo k postupnému zahřívání emulze. Postupným zahříváním mohlo dojít k předčasnému vypaření rozpouštědla a vysrážení PHB.

Pro lepší optimalizaci metody byla organická fáze s PHB umístěna do mrazícího zařízení a roztok PVA do lednice. Suspenze byly ponechány za nízké teploty po dobu 1 dne. Celý proces byl opakován s větším množstvím ledu v ledové lázni. Během homogenizace a sonifikace nedocházelo k viditelným změnám a z emulze bylo po 24 hodinovém míchání odpařeno rozpouštědlo. S takto optimalizovanou metodou byly připravovány částice t téhle práci.

5.2 Charakterizace částic

Částice připravené, rozpuštěním PHB v chloroformu metodou odpaření rozpouštědla byly charakterizovány. Provedené zkoušky charakterizovaly všechny potřebné vlastnosti připravených částic. Charakterizace přípravy částic vychází z elementární analýzy a z analýzy pomocí Zetasizeru. Výsledky byly shrnuty do následující tabulky.

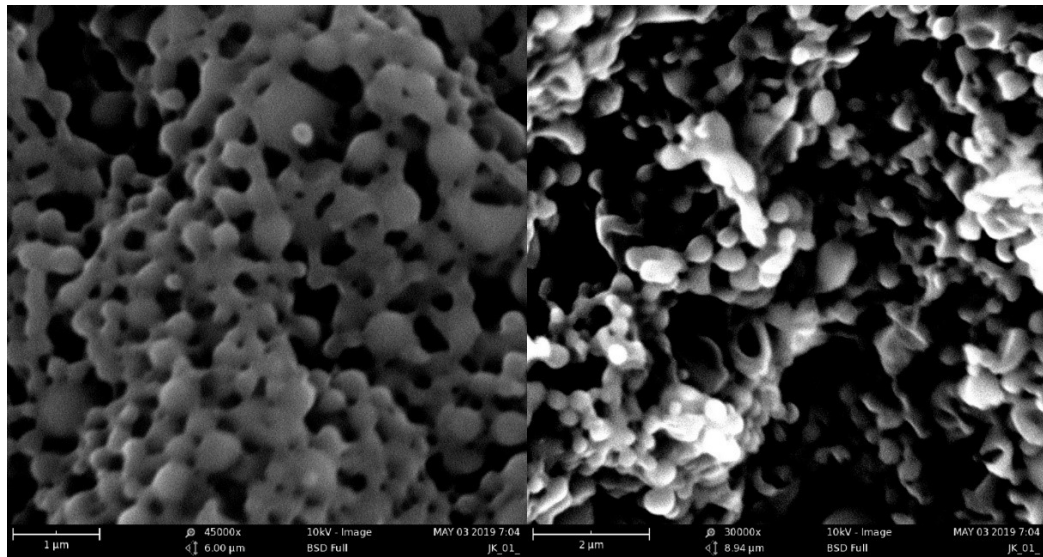
Tab. 7 Výsledné parametry částic

Částice	Čisté PHB	PHB + PDM	PHB + CLO
Aktivní látka (%)	N/A	22	5
Zůstatek PVA (%)	2,6	1,8	5,3
PdI	0,1255	0,1755	0,2175
Velikost částic (nm)	326	366	345
HL (%)	N/A	22	5
EE (%)	N/A	73	17

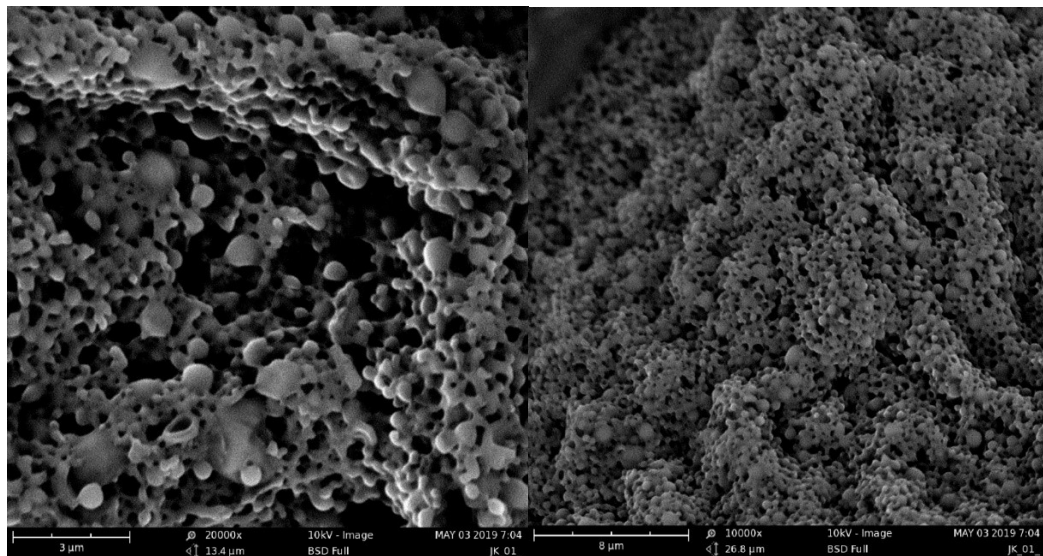
Výsledky ukazují, že průměrná velikost změřená pomocí Zetasizeru u čistých částic je 326 nm, u částic s přídavkem pendimethalinu je 366 nm a u částic s přídavkem clomazonu je 345 nm. Podle průměrné velikosti můžeme částice zařadit mezi submikro částice. Z herbicidních plnění (HL) vyplývá, že s nárůstem plnění dochází ke zvětšení průměrné velikosti částic a indexu polydisperzity. Zůstatek PVA byl zjišťován kvůli vlivu PVA na smáčivost částic. Čím více PVA částice obsahují, tím lépe by mohl být jejich povrch smáčen a to se projeví na rychlosti uvolňování enkapsulované aktivní látky. Účinnost enkapsulace (EE) mohla být ovlivněna promýváním částic mezi centrifugací, smícháním organické fáze s vodní fází, či chybným stanovením elementární analýzy. Kontrolní elementární analýza byla provedena, ale z časových důvodů není zde uvedena.

5.3 Morfologie částic

Příprava polymerních částic byla provedena dle výše uvedeného postupu. Struktura částic byla porovnávána pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Phenom ProX. Výsledky analýzy provedené pomocí SEM jsou znázorněny na obrázcích 11 a 12. Z dat pořízených pomocí SEM na obrázku 11 je patrné, že částice jsou kulovitého tvaru a velikosti od 100 nm do 500 nm což odpovídá průměrné velikosti určené pomocí Zetasizeru, která byla kolem 340 nm. Na snímcích je patrné, že částice jsou agregovány do větších celků a tvoří pórovitou strukturu. Takle agregace může být zapříčiněna pokovováním, které bylo provedeno před SEM z důvodu zvýšení stability částic, jelikož dochází k rychlé degradaci částic tokem elektronů.



Obr. 11 Připravené částice z PHB zvětšené 45000x a 30000x



Obr. 12 Připravené částice z PHB zvětšené 20000x a 10000x

5.4 Herbicidní plnění (HL) a účinnost enkapsulace (EE)

Množství aktivní látky zapouzdřené v polymerní částici bylo vypočteno z dat elementární analýzy. Výsledky následně slouží k získání charakteristických parametrů částic. Mezi tyto parametry patří HL (herbicide loading) a EE (encapsulation efficiency), které byly shrnuty od následující tabulky.

Tab. 8 Výsledky výpočtů z elementární analýzy

Částice	Průměr HL (%)	Účinnost enkapsulace (%)
PHB + PDM	22	73
PHB + CLO	5	17

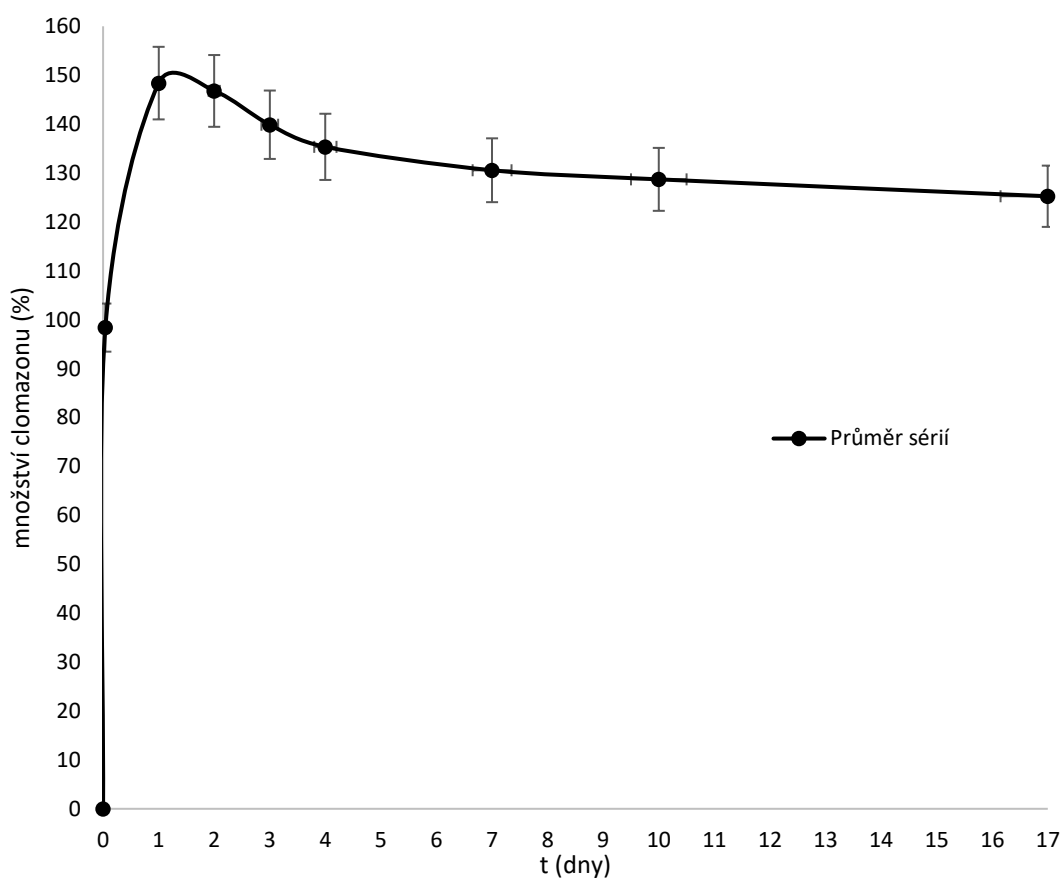
5.5 Uvolňovací testy

Uvolňování probíhalo v 50 ml lahvičkách v temné místnosti za 25 °C. Do každé bylo naváženo 13,3 mg částic. Přesná hmotnost navážených částic (m) je uvedena v tabulce 9. V tabulce jsou rovněž znázorněna i data pro teoretickou hmotnost aktivní látky ($m_{AL\ teor.}$) v částicích a také data, která byla vypočtena z dat elementární analýzy pro reálnou hmotnost aktivní látky ($m_{AL\ real.}$). Analýza odebíraných vzorků byla provedena pomocí kapalinového chromatografu 1260 Infinity II Prime LC. Uvolňování probíhalo po dobu několika týdnů. Výsledky jsou zaznamenány do obrázku 14, ve kterém je znázorněna závislost koncentrace clomazonu na čase ve dnech pro průměr z analyzovaných sérií. Lze pozorovat prudký nárůst koncentrace aktivní látky v prvních dnech uvolňování a poté dochází k postupnému poklesu koncentrace. Výsledky naznačují, že v prvních dnech se uvolnilo pouze povrchové množství clomazonu a poté kvůli pomalé hydrolyze PHB dochází k postupné degradaci clomazonu a nedochází k uvolnění enkapsulovaného clomazonu.

Prudký nárůst koncentrace pozorovatelný na obrázku 13 je nad 100 % koncentrace clomazonu, což může být zapříčiněno špatnými výsledky z elementární analýzy, nebo špatně vyhodnocenou kalibrační křivkou z UHPLC. Z časových důvodů se do bakalářské práce již nestihla dát nová data, která byla vyhodnocena dalšími analýzami.

Tab. 9 Hmotnost částic s clomazonem a hmotnost samotného clomazonu

Série	1	2	3	Průměr
m (mg)	13,5	13,9	13,7	13,7
m_{AL} teor. (mg)	4,05	4,17	4,11	4,11
m_{AL} real. (mg)	0,675	0,695	0,685	0,685

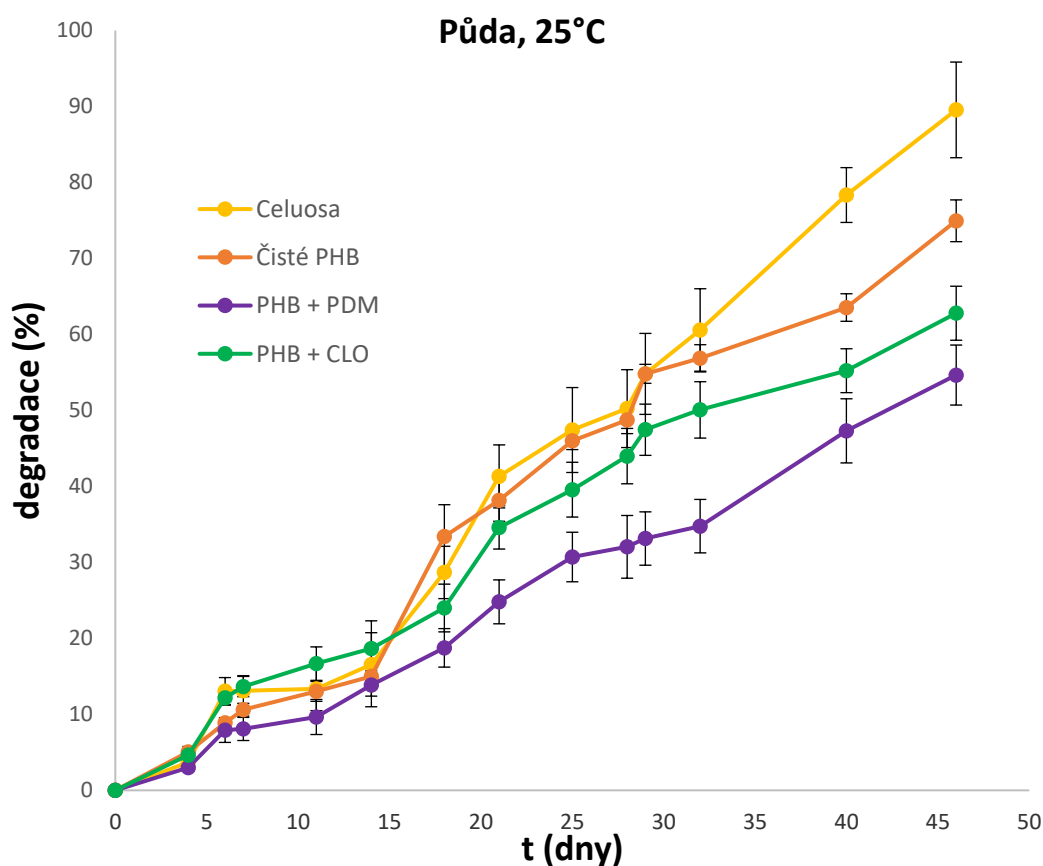


Obr. 13 Uvolňovací profil částic

5.6 Biodegradační testy

Biodegradační testy probíhaly v 500 ml lahvích v temné místnosti při 25 °C. Lahve byly rozděleny na série po čtyřech vedle sebe u slepého pokusu a po třech vedle sebe u testů s PHB a PHB s přísádkem aktivní látky. Jako kontrolní vzorek sloužila celulóza. Testy probíhaly v určitých časových intervalech. Vzorky byly analyzovány pomocí univerzálního analyzátoru plynů (SRS UNIVERSAL GAS ANALYZER). Z analyzovaných dat koncentrací plynů v uzavřené lahvi se vypočetla rychlost degradace celulózy, polymerních částic a

polymerních částic s aktivními látkami. Na obrázku 17 lze pozorovat závislost degradace uvedených materiálů v závislosti na čase. Biodegradační test v půdním prostředí se jeví jako vhodný ukazatel, jelikož PHB je biologicky dobře rozložitelné. Srovnání rychlosti degradace čistého PHB s rychlostí degradace částic s enkapsulovaným pendimethalinem vyplývá, že aktivní látka je postupně uvolňována a mírně zpomaluje aktivitu mikroorganismům s dalším rozkladem PHB. Clomazon mírně ovlivňuje rychlost degradace PHB z důvodu, že výsledný obsah herbicidu byl pouze 5 %, ale i tak na obr. 14. je vidět určité zdržení oproti částicím z čistého PHB. Clomazon nemá takové brzdící účinky jako na rozdíl od pendimetalinu. Důvodem může být nejspíše fakt, že EE pro částice s CLO byla pouze 17 %. Postupné uvolňování herbicidních látek mohlo v biodegradačních testech vést k mírnému zpomalení oproti čistému PHB. Z časových důvodů nebyla biodegradace dokončena, ale měření byla zaznamenávána i po dokončení bakalářské práce.



Obr. 14 Závislost degradace na počtu dní u vybraných materiálů

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo připravit a otestovat sérii submikro a mikročástic na bázi přírodního polymeru PHB. Byly připraveny tři série částic. Dvě série obsahovaly enkapsulovanou aktivní látku, kterou byly herbicidy s názvem pendimethalin a clomazone. Jedna série částic byla připravena pouze z čistého PHB.

Byla provedena optimalizace přípravy částic. Pro rozpuštění polymeru PHB bylo zkoušeno použití několika typů rozpouštědel (dichlormethan, acetonitril s ledovou kyselinou octovou a chloroform). Jako nejvhodnější metoda pro tuto práci bylo rozpuštění polymeru PHB v chloroformu za teploty varu. Druhou vhodnou metodou by bylo rozpuštění PHB v acetonitrilu s ledovou kyselinou octovou, ale následná výroba částic by byla pracnější a musely by se použít jiné metody následné výroby. Rozpuštění PHB se nepodařilo s dichlormethanem a v průběhu přípravy s ním nebylo nadále zacházeno.

Připravené částice byly podrobeny sérii testů. Výsledky testů určují průměrnou velikost vzniklých částic, index polydisperzity, morfologii a také množství zapouzdřené látky. Z charakteristiky provedené elementární analýzou bylo také možno zjistit procentuální zastoupení zbytkového stabilizátoru suspenze PVA v částicích. Série částic s aktivními látkami byly plněny 30% dané aktivní látky. Výsledné účinnosti plnění 73 % pro PHB s PDM a 17 % pro PHB s CLO nejsou příliš příznivé. Účinnost plnění částic pomocí CLO může být nízká z důvodu poměrně vysoké rozpustnosti CLO ve vodě, nebo mohlo dojít k nesprávnému stanovení elementární analýzou. K vymytí CLO mohlo dojít během přípravy a to zejména při styku organické fáze s vodným roztokem PVA, nebo promývání během odstředování pomocí centrifugy.

Z biodegradčních testů vychází, že částice s obsahem aktivní látky byly degradovány mírně pomaleji než částice jen z PHB. Pomalejší degradace může být způsobena postupným uvolňováním aktivní látky do půdy, což zabraňuje vyšší aktivitě mikroorganismům v degradaci částic. Z výsledků vyplývá, že koncentrace aktivní látky přímo ovlivňuje rychlost degradace částic mikroorganismy.

Mikročástice připravené z biologicky rozložitelného PHB se jeví jako vhodný nosič pro agrochemikálie. V téhle práci byly jako testované agrochemikálie použity herbicidy. Z biodegradabilních testů vyšlo, že docházelo k postupné degradaci PHB a herbicidy byly postupně uvolňovány do půdy. Díky postupnému uvolňování můžou herbicidy při stejném dávkování

déle působit a tím snížit vysokou nárazovou toxicitu, která je vyvolána nárazovým dávkováním čistého herbicidu. Mezi výhody systému s postupným uvolňováním patří nižší zatěžování necílových rostlin a okolního životního prostředí. Výhoda využití PHB spočívá v tom, že půdní mikroorganismy mohou rozkladem tohoto polymeru získávat potřebné živiny a nedochází k akumulaci nerozloženého polymeru v půdě.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] STLOUKAL, P. – KUCHARCZYK, P. – SEDLARİK, V. 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*, 2012-04-25, vol. 60, p. 4111-4119. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf300521j>
- [2] KAH, M., HOFMANN, T., KAH, M., & HOFMANN, T. (2016). Nanopesticide research: Current trends and future priorities Nanopesticide research : *Current trends and future priorities*, (February). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>.
- [3] BOUCHEMAL, K. – BRIANCON, S. – PERRIER, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, vol. 280, p. 241-251.
- [4] LIU, T. – LIU, H. – WU, Z. The use of poly(methacrylic acid) nanogel to control the release of amoxicillin with lower cytotoxicity. *Materials Science and Engineering: C*, 2014, vol.43, p. 622-629.
- [5] ANJALI, CH. – SHARMA, Y. – MUKHERJEE, A. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion as potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Management Science*, 2012, vol. 68, p. 158-163.
- [6] ADAK, T. – KUMAR, J. – SHAKIL, N.A. Development of controlled re-lease formulations of imidacloprid employing novel nano-ranged amphiphilic polymers. *Journal of Environmental Science and Health*, 2012, vol.47.
- [7] KOOKANA, RAI S., ALISTAIR B. A. BOXALL, PHILIP T. REEVES, et al. Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, 62(19), 4227-4240 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1021/jf500232f. ISSN 0021-8561.
- [8] VYSLOUŽIL, J. – DVOŘÁČKOVÁ, K. – KEJDUŠOVÁ, M. Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*, 2013, vol. 107, p. 16-23. ISSN: 0009-2770.

- [9] 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.
- [10] COELHO, JORGE F., PAULA C. FERREIRA, PATRICIA ALVES, ROSEMEYRE CORDEIRO, ANA C. FONSECA, JOANA R. GÓIS A MARIA H. GIL. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal* [online]. 2010, 1(1), 164-209 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1007/s13167-010-0001-x. ISSN 1878-5077.
- [11] GUTERRES, SÍLVIA S., MARTA P. ALVES A ADRIANA R. POHLMANN. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights* [online]. 2017, 2 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1177/117739280700200002. ISSN 1177-3928.
- [12] ZHANG, Y. – ZHU, S. – YIN, L. a kol. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. *European Polymer Journal*, 2008, vol. 44, p. 1654-1661.
- [13] GAJDZIOK, J. (2009). Metody přípravy mikročástic ve farmaceutické technologii. *Ceská a Slovenská farmacie: casopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti*. 58.
- [14] ARSHADAY, R. Preparation of porous and nonporous biodegradable poly-meric hollow microspheres. *Journal Controlled Release*, 1991, vol. 17 p. 1–22.
- [15] ZAMBAUX, M.F. – BONNEAUX, R. – GREF, P. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by double emulsion method. *Journal Controlled Release*, 1998, vol. 50, p. 31–40.
- [16] BENOIT, J.-P. et al.: Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology. In: Benita, S. (ed.). *Micro-encapsulation: Methods and Industrial Applications*. New York: *Marcel Dekker Inc*. 1996; 35–72
- [17] KURREY, A. – SURESH, PK. – SINGH, MR. Hollow microspheres as a drug carrier: An overview of fabrication and in vivo characterization techniques. *Chronicles of Young Scientists* [online]. 2014, 5(1) [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.4103/2229-5186.129327.

- [18] PEÑA, C., T. CASTILLO, A. GARCÍA, M. MILLÁN a D. SEGURA. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology* [online]. 2014, 7(4), 278-293 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1111/1751-7915.12129. ISSN 17517915.
- [19] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., CANAL, C., CALAFELL-MONFORT, M., GINEBRA, M. P., JULIO-MORAN, G., & MARQUÉS-CALVO, M. S. Methods for the preparation of doxycycline-loaded phb micro- and nano-spheres. *European Polymer Journal* [online]. 2013, 49(11), 3501-3511 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.08.010.
- [20] Velíšek a kolektiv: *Chemie potravin*, 2. upravené vydání, OSSIS, Tábor, (2002).
- [21] HAJŠLOVÁ, J. – TICHÁ, J. – KOCOUREK, V. Rezidua pesticidů v ovoci a zelenině. Možnosti minimalizace. *Výzkumný ústav rostlinné výroby* [online], 2005 [cit.2019-01-25]. Dostupné z: http://www.phytosanitary.org/projekty/2005/VVF_11_2005.pdf >.
- [22] JURŠÍK, M. *Plevel: biologie a regulace*. České Budějovice: Kurent, 2011. ISBN 978-80-87111-27-7.
- [23] FUSEK, J. – MĚRKA, V. Nebezpečné herbicidy, *Vojenské zdravotnické listy*. [online] 2003. [cit.2019-01-25]. Dostupné z: <http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL6_2003/03.pdf>
- [24] MIKULKA, J. – KNEIFELOVÁ, M. Rizika kontaminace potravin a pitné vody. *Výzkumný ústav rostlinné výroby*. [online], 2003 [cit.2019-01-25]. Dostupné z: <<http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf>>.
- [25] JURŠÍK, M. – SOUKUP J. – HOLEC J. Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů. *Listy cukrovarnické a řepkařské*. [online]. 2010, č. 1, p.1-3, [cit.2019-01-26]. Dostupné z: <http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/14-16.PDF>.
- [26] RAMASAHAYAM, S. Pendimethalin. *Encyclopedia of Toxicology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 765-767 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00417-6. ISBN 9780123864550.

- [27] BRUNEAU, M., BENNICI, S., BRENDLE, J., DUTOURNIE, P., LIMOUSY, L., & PLUCHON, S. (2018). Systems for stimuli-controlled release: Materials and applications. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, 294, 355-371 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.12.038. ISSN 01683659.
- [28] MOHR, S, R BERGHAHN, M FEIBICKE, S MEINECKE, T OTTENSTROER, I SCHMIEDLING, R SCHMIEDICHE a R SCHMIDT. Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. *Aquatic Toxicology* [online]. 2007, 82(2), 73-84 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.02.001. ISSN 0166445X.
- [29] Fao specifications and evaluations for plant protection products. *Food and agriculture organization of the United Nations*. [online] 1999. [cit.2019-01-27]. Dostupné z: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/metazach.pdf>.
- [30] WEINER, J. A., DELORENZO, M. E., & FULTON, M. H. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquatic Toxicology* [online]. 2004, 68(2), 121-128 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.004. ISSN 0166445X.
- [31] MERVOSH, T. L., GERALD K. SIMS A EDWARD W. STOLLER. Clomazone fate in soil as affected by microbial activity, temperature, and soil moisture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1995, 43(2), 537-543 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1021/jf00050a052. ISSN 0021-8561.
- [32] SILVA, M. dos S., COCENZA D. S., de MELO N. F. S., GRILLO R., ROSA A. H. a FRACETO L. F. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. *Química Nova* [online]. 2010, 33(9), 1868-1873 [cit. 2019-04 30]. DOI: 10.1590/S0100-40422010000900009. ISSN 0100-4042.
- [33] ANJALI, CH, SHARMA Y., MUKHERJEE A. a CHANDRASEKARAN N. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion-a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Management Science* [online]. 2012, 68(2), 158-163 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1002/ps.2233. ISSN 1526498X.
- [34] R. GRILLO, PEREIRA DOS SANTOS N.Z., MARUYAMA C.R., ROSA A.H., DE LIMA R., FRACETO L.F. Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier sys-

- tems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2012, 231-232, 1-9 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.06.019. ISSN 03043894.
- [35] ABREU, FLÁVIA O.M.S., OLIVEIRA E. F., PAULA H. C.B. a DE PAULA R. C.M.. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, 89(4), 1277-1282 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.04.048. ISSN 01448617.
- [36] XIANG, CH, TAYLOR A G., HINESTROZA J P. a FREY M W.. Controlled release of nonionic compounds from poly(lactic acid)/cellulose nanocrystal nanocomposite fibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2013, 127(1), 79-86 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1002/app.36943. ISSN 00218995.
- [37] HAN, J., WU L.-P., LIU X.-B., HOU J., ZHAO L.-L., CHEN J.-Y., ZHAO D.-H. a XIANG H. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers. *Biomaterials* [online]. 2017, 139, 172-186 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.006. ISSN 01429612.
- [38] ZERNOV, A.L., IVANOV E.A., MAKHINA T.K., et al. Microcapsules of Poly(3-Hydroxybutyrate) for Prolonged Protein Release. *Sovremennye tehnologii v medicine* [online]. 2015, 7(4), 50-57 [cit. 2019-05-13]. DOI: 10.17691/stm2015.7.4.06. ISSN 20764243.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EE	Encapsulation efficiency – účinnost enkapsulace
HL	Herbicide loading – plnění částic herbicidní látkou
HPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
PHB	Polyhydroxybutyrát
PdI	Index polydisperzity
PVA	Polyvinylalkohol
O/V	Metoda odpaření rozpouštědla olej ve vodě
SEM	Spektrální elektronová mikroskopie
UHPLC	Ultra účinné kapalinová chromatografie
DCM	Dichlormethan
Os	Kvocient selektivity
Z _D	Hydrodynamický průměr
σ	Odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Kategorie a struktura mikročástic [9].....</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 2 Znázorňující schéma přípravy částic metodou odpaření rozpouštědla [17] ..</i>	<i>18</i>
<i>Obr. 3 Chemická struktura PHB [18]</i>	<i>19</i>
<i>Obr. 4 Znázorňování uvolňovacích mechanismů</i>	<i>20</i>
<i>Obr. 5 Uvolňovací profil s počátečním burst efektem [38]</i>	<i>21</i>
<i>Obr. 6 Obecné schéma faktorů působících na degradaci herbicidů v prostředí [22]</i>	<i>26</i>
<i>Obr. 7 Chemická struktura pendimethalinu [26]</i>	<i>27</i>
<i>Obr. 8 Chemická struktura clomazonu [32]</i>	<i>27</i>
<i>Obr. 9 Syntéza metazachloru</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 10 Chemická struktura antrazinu</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 11 Připravené částice z PHB zvětšené 45000x a 30000x.....</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 12 Připravené částice z PHB zvětšené 20000x a 10000x.....</i>	<i>45</i>
<i>Obr. 13 Uvolňovací profil částic</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 14 Závislost degradace na počtu dní u vybraných materiálů</i>	<i>48</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Účinnost a toxicita některých nanoformulací.....</i>	<i>14</i>
<i>Tab. 2 Základní dělení pesticidů podle cílového činitele [21]</i>	<i>22</i>
<i>Tab. 3 Parametry přípravy částic s enkapsulovanou aktivní látkou.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 4 Parametry pro výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých látek</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 5 Procentuelní zastoupení prvků u částic s 30 % zastoupením pendimthalinu ..</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 6 Procentuelní zastoupení prvků u částic s 30 % zastoupením pendimthalinu ..</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 7 Výsledné parametry částic</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 8 Výsledky výpočtů z elementární analýzy.....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 9 Hmotnost částic s clomazonem a hmotnost samotného clomazonu</i>	<i>47</i>