

# **Příprava a testování mikročástic pro postupné uvolňování agrochemikálií**

Bc. Nina Janásová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Nina Janásová  
Osobní číslo: T13359  
Studijní program: N2808 Chemie a technologie materiálů  
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí  
Forma studia: prezenční

Téma práce: Příprava a testování mikročástic pro postupné uvolňování agrochemikálií

Zásady pro vypracování:

1. Připravit mikročástice plněné vybraným pesticidem lišící se různými charakteristickými parametry.
2. Charakterizovat částice pomocí dostupných technik.
3. Provést experiment uvolňování aktivní látky ve vodném prostředí.
4. Otestovat účinnost systému v reálných podmínkách.
5. Provést literární rešerši a zpracovat výsledky experimentů do formy DP.

Rozsah diplomové práce:  
Rozsah příloh:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**  
Seznam odborné literatury:  
Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petr Stloukal, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2015**  
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2015**

Ve Zlíně dne 10. února 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: JANAŠOVÁ NINA

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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 19.5.2015



<sup>1)</sup> 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 nevdělečně 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.

<sup>2)</sup> 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 díla vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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 výtěžku 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 přihlíží k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

V rámci této diplomové práce byly připraveny polymerní mikro a submikro částice z biodegradabilního polymeru (PLA), do kterých byl enkapsulován selektivní herbicid metazachlor metodou odpaření rozpouštědla. Velikost a distribuce velikosti částic stejně tak jako účinnost enkapsulace a plnění částic herbicidem byla charakterizována, a následně byly sledovány uvolňovací profily u každé série částic. Nakonec byl testován vliv enkapsulovaného metazachloru na inhibici klíčení cílových a necílových rostlin. Mezi cílovými rostlinami byl testován mák a *Echinochloa crus-galli*, mezi necílovými pak řepka a hořčice. Ze získaných výsledků vyplývá, že zatímco u malých částic byla dosažena velikost přibližně 400 nm, u velkých se pohybovala okolo 9  $\mu\text{m}$ . Nejvyšší účinnost enkapsulace byla 91,16 % pro velké a 84 % pro malé částice obsahující na počátku procesu 30 % metazachloru k množství polymeru. Nejvyšší inhibici na cílovou rostlinu *Echinochloa crus-galli* vykazovaly velké částice obsahující 20 % enkapsulovaného metazachloru.

Klíčová slova: mikro a submikro částice, enkapsulace, metoda odpaření rozpouštědla, PLA, selektivní herbicid metazachlor, postupné uvolňování, klíčivost.

## **ABSTRACT**

In the presented master thesis the biodegradable micro and sub-micro particles loaded with selective herbicide metazachlor were prepared from the Polylactic acid (PLA) by using the solvent evaporation method. The size and particle size distribution as well as the encapsulation efficiency and the herbicide loading of particles was characterized, subsequently the release profiles were determined for each series, and finally the effect of loaded particles with metazachlor on the inhibition of germination of target and non-target plants was tested. As the targeted plants the poppies and *Echinochloa* was tested as the non-target the canola and mustard was used. The obtained results showed that while smaller particles formulations reached about 400 nm, larger ones was about 9 microns. The highest encapsulation efficiency was achieved 91.16% for larger and 84% for smaller particles containing 30% of amount of metazachlor to polymer at the beginning of the particles preparation process. It was found that large particles containing 20% of encapsulated metazachlor caused the highest inhibition of germination on the target plant *Echinochloa crus-galli*.

Key words: micro and sub-micro particles, encapsulation, solvent evaporation method, Polylactic acid, Metazachlor, gradual release, inhibition, germination.

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Petru Stloukalovi, Ph.D. za vstřícnost a trpělivost při konzultacích, odborné vedení a pomoc. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům a všem ostatním, kteří mně poskytli potřebné informace a těm, kteří mě byli podporou po dobu mého studia.

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
<b>1 SYSTÉMY S POSTUPNÝM UVOLŇOVÁNÍM V ZEMĚDĚLSTVÍ</b> .....	<b>14</b>
1.1 TYPY SYSTÉMŮ.....	14
1.2 POLYMERNÍ MIKRO, SUB MIKRO A NANOČÁSTICE .....	16
1.2.1 Struktura.....	17
1.3 METODY PŘÍPRAVY ČÁSTIC .....	18
1.3.1 Metoda odpaření rozpouštědla .....	18
<i>Systém O/V</i> .....	19
<i>Systém O/O</i> .....	20
<i>Systém S/O/V</i> .....	21
1.4 LÁTKY PRO PŘÍPRAVU POLYMERNÍCH MIKRO A NANOČÁSTIC .....	21
1.4.1 Kyselina polymléčná - PLA .....	22
1.4.2 Faktory ovlivňující účinnost enkapsulace aktivní látky.....	23
1.5 UVOLŇOVACÍ MECHANIZMUS .....	24
1.5.1 Kinetika uvolňování aktivních látek z mikročástic.....	25
KDE: ZLOMEK JE UVOLNĚNÍ LÉČIVA V ČASE $t$ , $K$ JE RYCHLOSTNÍ KONSTANTA UVOLŇOVÁNÍ A $n$ JE EXPONENT UVOLŇOVÁNÍ, KTERÝ SE POUŽÍVÁ K CHARAKTERIZACI RŮZNÉHO UVOLŇOVÁNÍ Z MATRIC VÁLCOVITÉHO TVARU. ZÍSKANÁ DATA JSOU VYNÁŠENA JAKO ZÁVISLOST LOGARITMU PROCENTUÁLNÍHO UVOLŇOVÁNÍ LÉČIVA NA LOGARITMU ČASU. $C$ JE KONSTANTA, KTERÁ BERE V ÚVAHU ÚČINEK POČÁTEČNÍHO UVOLNĚNÍ. [37], [38], [52].....	26
1.5.2 Faktory ovlivňující uvolňování .....	27
<b>2 PESTICIDY</b> .....	<b>28</b>
2.1 HERBICIDY .....	29
2.1.1 Historie.....	29
2.1.2 Rozdělení.....	30
2.1.3 Vliv na životní prostředí a toxicita herbicidů.....	31
2.1.4 Příklady herbicidů .....	32
<b>3 STUDIE ZABÍVAJÍCÍ SE PŘÍPRAVOU A TESTOVÁNÍM POLYMERNÍCH SYSTÉMŮ KONTROLOVANÉHO UVOLŇOVÁNÍ</b> .....	<b>37</b>

3.1	NANOKAPSLE POLY $\epsilon$ -KAPROLAKTONU JAKO SYSTÉM NOSIČE PRO HERBICIDY: FYZIKÁLNĚ CHEMICKÁ CHARAKTERIZACE A GENOTOXICKÉ HODNOCENÍ .....	37
3.2	CHITOSAN / TRIFOSFÁTOVÉ NANOČÁSTICE OBSAHUJÍCÍ HERBICID PARAQUAT: ALTERNATIVA OVLÁDÁNÍ PLEVELE ŠETRNĚJŠÍ PRO ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ .....	38
3.3	APLIKACE ATRAZINU NAPOLY $\epsilon$ -KAPROLAKTONOVÉ NANOČÁSTICE JAKO ALTERNATIVNÍ TECHNIKA PRO OVLÁDÁNÍ PLEVELE S NIŽŠÍMI RIZIKY PRO ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ .....	39
3.4	MIKROČÁSTICE NÍZKOMOLEKULÁRNÍ POLYMLÉČNÉ KYSELINY PRO ŘÍZENÉ UVOLŇOVÁNÍ HERBICIDU METAZACHLORU: PŘÍPRAVA, MORFOLOGIE A KINETIKY UVOLŇOVÁNÍ.....	40
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>		<b>41</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>42</b>
4.1	MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	42
4.1.1	Látky pro přípravu nanočástic.....	42
4.1.2	Látky pro uvolňovací testy.....	42
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	42
4.2	METODIKA .....	43
4.2.1	Příprava 0,5 % roztoku PVA.....	43
4.2.2	Příprava částic .....	43
4.2.3	Příprava TRIS pufru pro uvolňovací testy .....	45
4.3	CHARAKTERIZACE ČÁSTIC.....	45
4.3.1	Velikost částic .....	45
4.3.2	Polydisperzní index.....	45
4.3.3	Morfologie částic .....	46
4.3.4	Stanovení účinnosti enkapsulace MTZ (EE) a plnění částic MTZ (HL) .....	46
4.4	HERBICIDNÍ PLNĚNÍ (HERBICID LOADING, HL).....	48
4.5	ÚČINNOST ENKAPSULACE.....	48
4.6	UVOLŇOVACÍ TESTY.....	48
4.7	UVOLŇOVÁNÍ V LAHVIČKÁCH .....	48
4.8	UVOLŇOVÁNÍ VE ZKUMAVKÁCH .....	49
4.9	HPLC – MS .....	49
4.10	FTIR - ATR .....	50
4.11	TESTOVÁNÍ Vlivu METAZACHLORU VE FORMĚ NANOČÁSTIC NA KLÍČIVOST SEMEN.....	51
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
5.1	CHARAKTERIZACE ČÁSTIC.....	53
5.1.1	Morfologie částic .....	55
5.2	UVOLŇOVACÍ TESTY.....	56
5.2.1	Uvolňování v lahvičkách.....	56
5.2.2	Uvolňování ve zkumavkách.....	57
5.2.3	FTIR -ATR.....	61
5.3	TESTOVÁNÍ Vlivu ČÁSTIC NA CÍLOVÉ ROSTLINY.....	62
5.4	TESTOVÁNÍ Vlivu ČÁSTIC NA NECÍLOVÉ ROSTLINY .....	64

<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>78</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>79</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>81</b>

## ÚVOD

V dnešní době je v zemědělství využíváno velké množství agrochemikálií. Jejich nadměrným užitím může docházet nejen k zatěžování životního prostředí, ale hrozí také poškození samotných rostlin, u kterých mají být zvýšeny výnosy. Možností jak snížit zatížení životního prostředí a eliminovat i další negativa agrochemikálií představuje systém kontrolovaného uvolňování bioaktivních látek. O tyto systémy je v posledních třech desetiletích vyvíjen stále větší zájem jak v oblasti farmaceutického průmyslu, životního prostředí tak i v zemědělství. Aplikací agrochemikálií do polymerních částic, vhodných pro postupné kontrolované uvolňování, by bylo možné v zemědělství docílit snížení vyluhování aktivních látek přes půdy, zamezit jejich předčasné degradaci, či volalitu. Dalším pozitivním jevem je možnost rozšíření aktivity v půdě, zlepšení stability a snížení nežádoucí toxicity aplikovaných bioaktivních látek. Dosažením těchto vlastností by mělo za následek nejen pozitivní vliv na životní prostředí, ale i snadnější manipulaci a samotnou aplikaci. Jako vhodný materiál pro enkapsulaci s minimálním dopadem na životní prostředí se jeví polymléčná kyselina (PLA). Při využití PLA o nízké molekulové hmotnosti, dochází ke vzniku jemných homogenních suspenzí, které se vyznačují rychlejší biodegradací, a představují tak nižší zátěž pro životní prostředí. [1], [2], [3]

Cílem této práce bylo zjistit mechanismus a rychlost uvolňování enkapsulované aktivní látky a otestovat jaký má enkapsulace vliv na její účinky.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 SYSTÉMY S POSTUPNÝM UVOLŇOVÁNÍM V ZEMĚDĚLSTVÍ

## 1.1 Typy systémů

V současné době se používá několik značně rozličných systémů nanopesticidních aplikací. Podle strukturní podstaty lze tyto systémy rozdělit do několika skupin jako například nanoemulze, polymerní částice, nanogely a další.

V následující Tabulce 1. je uveden výběr několika nanopesticidních aplikací, které jsou rozděleny podle jejich fyzikální podstaty. U každé aplikace je uvedena aktivní látka, která byla použita a dále výhoda systému s kontrolovaným uvolňováním oproti dávkování samotné aktivní látky. [2]

Tabulka 1 Systémy nanopesticidních aplikací. [44], [45],[46], [47]

<b>NANOEMULZE</b>	
<b>Použitá aktivní látka</b>	<b>Zjištěné vlastnosti</b>
<b>Nimbový rostlinný olej</b>	LC <sub>50</sub> nebo-li letální koncentrace, se snižuje s velikostí kapiček
<b>Permethrin</b>	Větší účinnost proti larvám než čistá aktivní látka, má snížené účinky na necílové organismy (půdní bakterie a rostliny)
<b>POLYMERY NA BÁZIPOLYETYLÉNGLYKOLU</b>	
<b>Beta-cyfluthrin</b>	Vyšší účinnost než komerční formulace (hodnocení dlouhodobých účinků)
<b>Karbofuran</b>	Vyšší účinnost než komerční formulace
<b>DALŠÍ POLYMERY</b>	
<b>Emamectin</b>	Podobná nebo mírně vyšší účinnost než u komerční formulace (laboratorní testy byly prováděny po dobu 24 ha72h expozice, na omezeném počtu hmyzu)
<b>Lansiumamide B</b>	Vyšší účinnost než u čisté aktivní látky

**NANOGEELY**

<b>Esenciální olej</b>	Vyšší účinnost než u volného oleje
<b>Měď</b>	Synergický účinek mezi chitosanem a mědí (testováno po dobu 7 dnů)

**ELEKTROSTATICKÁ NANOVLÁKNA**

<b>Thiamethoxam</b>	Efektivní při 50% doporučené dávce (skleníkové testy po dobu 9 dnů)
---------------------	---

**OBALENÉLIPOSOMY**

<b>Pyrifluquinazon</b>	Zpožděná účinnost (testováno 14 dnů) ve srovnání s čistou aktivní látkou (testováno po dobu 2 dnů)
<b>Etofenprox</b>	Dlouho trvající efekt ve srovnání s komerční formulací

**ANORGANICKÉ NANOČÁSTICE+ORGANICKÉ AKTIVNÍ LÁTKY**

<b>Chlorfenapyr</b>	Dvakrát vyšší insekticidní účinnost nanočástic oxidu křemičitého než u mikročástic (laboratorní a polní zkoušky)
<b>1-naftyl octová kyselina</b>	Vyšší podpora růstu než u čisté aktivní látky

**ANORGANICKÉ NANOČÁSTICE JAKO AKTIVNÍ LÁTKY**

<b>Oxid křemičitý</b>	Podobná účinnost jako u komerční křemeliny
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Lepší účinnost ve srovnání se standardním ošetřením (skleníkové a polní pokusy)
<b>Silver</b>	Vyšší fungicidní účinek proti 18 původcům chorob rostlin (testováno na Petriho miskách)
<b>Měď</b>	Vyšší účinnost než u oxichloridu mědi ( <i>in vitro</i> potlačení bakteriální plísně z granátového jablka)
<b>Hliník</b>	podobná nebo vyšší insekticidní účinnost než je u nejúčinnější komerčně dostupné křemelinové formulace

## 1.2 Polymerní mikro, sub mikro a nanočástice

Mikročástice jsou částice kulovitěho tvaru s průměrem v řádu mikrometrů zhruba od 1  $\mu\text{m}$  do 1 000  $\mu\text{m}$ . Submikro částice mají menší průměr a to v řádu stovek nanometrů. Nanočástice jsou pak menší než 100nm. Mimo zmíněné částice jsou ještě tzv. pelety, což jsou částice větší než mikro částice a mohou dosahovat průměru až několika milimetrů. [9]

Mikročástice jsou díky svým vlastnostem vhodné pro zapouzdření účinných aktivních látek s jejich následným řízeným uvolňováním. Zapouzdření do těchto polymerních částic přináší především výhody jako například ochrana zapouzdřených látek před jejich degradací vlivem kyselin, zásad, dehydratací, oxidací, UV zářením či vlivem teploty. Zapouzdřením aktivních látek do polymerních částic lze maskovat i jejich organoleptické vlastnosti jako barva, chuť či pach. Polymerní mikročástice bývají obvykle tvořeny polymerní matricí, do které může být imobilizována aktivní látka v určitém množství, například léčiva, proteiny, pesticidy apod. Kromě enkapsulace lze mikročástice využít také jako sorbenty. Sorpčních vlastností mikročástic lze docílit změnou výrobních parametrů tak aby došlo ke změně pórů. Díky vzniklým pórům se zvýší specifický povrch částic, díky němuž dojde ke zlepšení sorpčních vlastností částic. Na ty mohou být následně adsorbovány různé látky z vody či z půd. [16]



### 1.2.1 Struktura

Polymerní systémy ve formě částic lze rozdělit na základě jejich vnitřní struktury do dvou skupin a to na nanosféry a nanokapsle. [4] Nanosféry mají typ struktury zvaný matrix. Tuto strukturu mají částice pevných látek, bez rozdílů mezi jádrem a pláštěm jejich částic. [5] Tvar nanosfér je převážně kulovitý. Bioaktivní látka je absorbovaná na povrchu částice, popřípadě je enkapsulovaná dovnitř částice. Nanokapsle se naopak skládají z polymerní membrány, která obklopuje dutinu s vnitřním jádrem kapaliny, v němž je bioaktivní látka obvykle rozpuštěná. Kapalně jádro je složeno z olejové fáze, která slouží jako nosič pro nepolární lipofilní sloučeniny. Jádro složené z vodné fáze je naopak vhodným nosičem pro ve vodě rozpustné sloučeniny. [6], [7] Zapouzdřením aktivních látek uvnitř částic je možno zabránit degradaci či uvolňování, při kterém dochází k velmi rychlému uvolňování aktivní látky a k její částečné adsorpci na povrchu nanočástic.



*Obr. 1 Struktura nanokapslí a nanosfér*

### 1.3 Metody přípravy částic

V průběhu několika let bylo vyvinuto mnoho metod pro přípravu polymerních mikro, submikro a nanočástic. Většina metod přípravy těchto částic se skládá ze dvou fází a to z vytvoření emulgovaného systému monomerů nebo polymerů, a následně formování částic pomocí polymerace nebo srážení.

#### Příklady metod tvorby mikročástic:

- Metoda odpaření rozpouštědla
- Metoda emulgace s difuzí rozpouštědla
- Metoda emulgace s reverzním vysolováním
- Metody založené na iontové gelaci
- Mezifázová polykondenzační reakce
- Nanoprecipitace polymeru
- Tvorba nanočástic z neutrálních nanogelů
- Získávání nanočástic pomocí gemace emulzních kapek

[48], [49], [50]

#### 1.3.1 Metoda odpaření rozpouštědla

Metoda odpaření rozpouštědla patří mezi jednu z nejpoužívanějších fyzikálně mechanických metod k přípravě mikročástic z již připraveného polymeru. Metoda patří mezi oblíbené díky své snadné proveditelnosti a přístrojové nenáročnosti. Při této metodě dochází ke vzniku tzv. mikrosfér. Enkapsulace bioaktivních látek má při této metodě velmi vysokou účinnost. Nevýhodou však je nutnost použití organických rozpouštědel. Všechny metody, které využívají principu odpaření rozpouštědla včetně jejich modifikací, jsou založeny na stejném základním principu. Nejprve je vytvořen vhodný emulzní systém, a poté se z tohoto emulzního systému za použití vhodného způsobu odstraní rozpouštědlo, díky čemuž dojde k vysrážení polymerních částic.

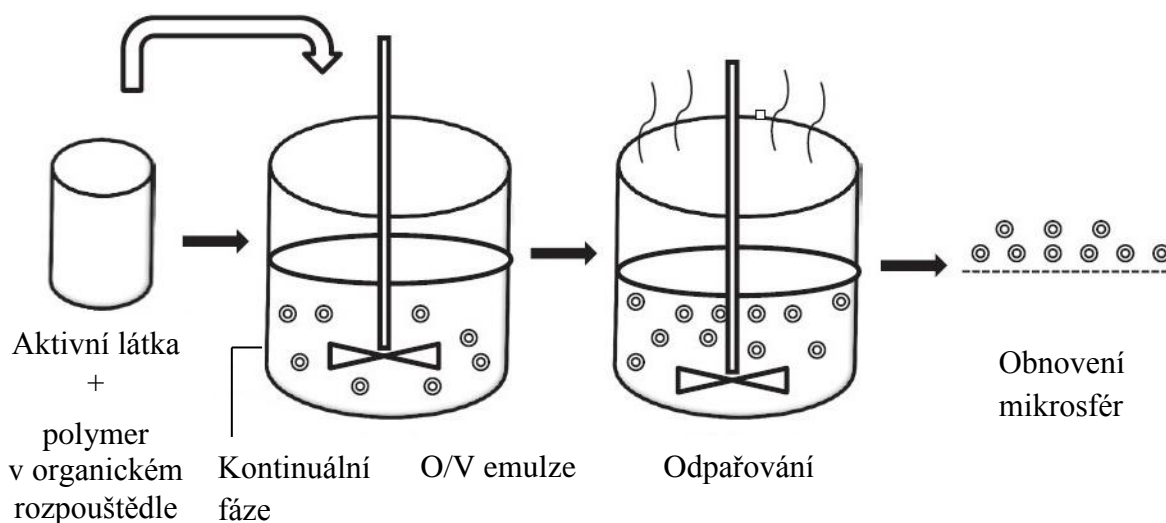
Princip metody spočívá v odpaření rozpouštědla, které obsahuje rozpuštěné nebo dispergované látky (v našem případě metazachlor) a polymer. Nejprve je polymer rozpuštěn v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou. Následně se k roztoku polymeru a rozpouště-

dla přidá aktivní látka, která je zde rozpuštěna či dispergována a následně uzavřena v polymeru. Vzniká lipofilní fáze, která je poté, často za pomoci tenzidů, emulgována do kontinuální vodné fáze za vzniku jemné emulze O/V (olejová fáze/vodná fáze). Požadovaného stupně emulze lze dosáhnout pomocí vysokorychlostního míchání, homogenizačního zařízení, popřípadě pomocí ultrazvukové lázně. Organické rozpouštědlo následně difunduje do vodné fáze a dochází k jeho odpaření na rozhraní voda/vzduch. Vlivem míchání a úbytku rozpouštědla dojde k vysrážení polymeru a tak k tvorbě mikročástice. Tyto mikročástice se následně zfiltrují, pomývají a suší. Často je v tomto kroku využívána lyofilizace. [8], [9], [51]

### *Systém O/V*

Systém O/V je založen na principu enkapsulace. Mísí se zde dvě nemísitelné složky kontinuální vodné fáze (značeno V) s vodou nemísitelného roztoku polymeru (značeno O). Pomocí emulzifikace dochází k jejich smísení a vzniku emulze O/V. Organická fáze s rozpuštěným polymerem je rozptýlena ve formě malých kapiček a při následném odpařování rozpouštědla se vysrážením z těchto kapiček vytvoří částice, v jejichž struktuře je enkapsulovaná, rozpuštěná či rozptýlená aktivní látka. Metoda je využívána pro přípravu mikročástic s aktivními látkami, které jsou obtížně rozpustné ve vodě.

Látky dobře rozpustné ve vodě nejsou pro modifikaci O/V příliš vhodná, a to proto, že velká část rozpuštěných látek uniká z roztoku polymeru, neboli z vnitřní fáze do vodné kontinuální fáze. Tento problém má za následek nižší obsah aktivních látek, jež jsme chtěli uzavřít v mikročásticích polymeru. Problém s unikáním látek do vodné fáze, má několik řešení. Například snížením hydrofilního charakteru látek za zvýšení lipofility nebo použitím neionizovaných forem ve vodě rozpustných látek, které mají často vyšší lipofilitu. Dále lze využít hydrofilní kosolventy, které zvyšují rozpustnost látek v organických rozpouštědlech, díky čemuž se sníží únik rozpuštěných látek do vodné fáze. Přídavkem anorganických solí jako např.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  lze také dosáhnout snížení rozpustnosti ve vodní vnější kontinuální fázi. Nasycením kontinuální fáze látkou, kterou chceme enkapsulovat lze také dosáhnout vyššího obsahu látky v polymerních mikročásticích avšak, v případě vyšší cenové kategorie, by se výrazně zvýšily náklady na výrobu. [9], [10]



Obr. 2 Schéma přípravy částic metodou odpaření rozpouštědla. [14]

Systém O/V byl využit také v článku Low Molecular Weight Poly(lactic acid) Microparticles for Controlled Release of the Herbicide Metazachlor [2] zde bylo pro přípravu částic využito PLA s enkapsulovaným metazachlorem, který se využívá v zemědělství jako herbicid. Příprava těchto částic proběhla následovně: nejprve bylo PLA rozpuštěno v chloroformu spolu s metazachlorem za vzniku olejové fáze. Jako vodná fáze byla využita želatina ve formě roztoku, která sloužila jako stabilizátor emulze. Následně byla směs dispergována při vysokých otáčkách (11 000 – 18 000) pod dobu 5 minut. Směs byla dispergována za stálého chlazení, a to z důvodu, aby nedocházelo k předčasnému odpaření rozpouštědla. Následně byla emulze pomocí ultrazvukové sondy sonifikována a poté bylo za sníženého tlaku a stálého míchání odpařeno rozpouštědlo. Vzniklé částice byly odděleny z emulze centrifugací a dále byly promyty dekantací. Takto připravené částice byly zamrazeny a lyofilizovány. [1]

Systém O/W byl využit i v této diplomové práci, při výrobě mikročástic do kterých byl enkapsulován již zmiňovaný metazachlor.

### ***Systém O/O***

V tomto systému je vodná kontinuální fáze nahrazena fází lipofilní, ve které nedochází k rozpuštění léčiva. Díky tomuto jevu je účinně eliminován únik aktivní látky právě do vodné kontinuální fáze, jako je tomu v systému O/V. Obě fáze systému O/O, vnitřní i vnější jsou vzájemně nemísitelné a jako kontinuální fáze se například používají kapaliny lipo-

filní nebo organické oleje (minerální či rostlinné), nebo netěkavá organická rozpouštědla. Jako vnitřní fáze se využívá například dichlormethan. Odpařením rozpouštědla vzniknou mikročástice s trojfázovým uvolňováním aktivních látek, kdy nejprve dochází k uvolňování aktivní látky z povrchu mikročástic, poté pomalé uvolňování z matrice, a následně rychlé uvolnění poslední části aktivní látky. Kinetika uvolňování je obdobná jako u systému O/V. [9]

### *Systém S/O/V*

Princip systému S/O/V spočívá v tom, že aktivní látka, která je málo rozpustná až nerozpustná v organické olejové fázi, je rozptýlena v roztoku v pevné formě malých částic. Aktivní látku je třeba před aplikací do roztoku nadrtit na velmi jemný prášek, který je poté dispergován do organické fáze. Následný postup je obdobný jako v případě systému O/V.

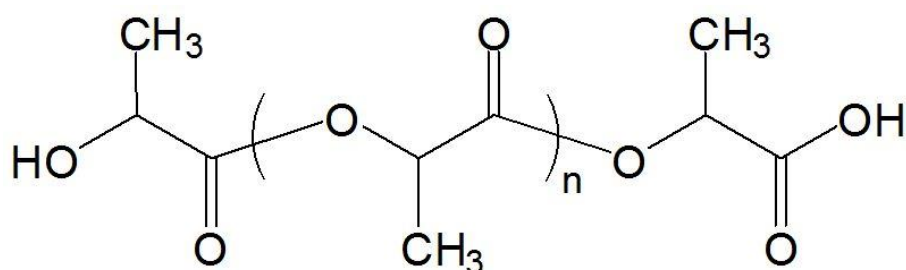
Mezi další metody patří například Systém V/O/V který je vhodný pro enkapsulaci hydrofilních látek, O/V/O který je naopak vhodný pro inkorporaci lipofilních substancí, a další. [9],[15]

## **1.4 Látky pro přípravu polymerních mikro a nanočástic**

Látky používané pro přípravu mikročástic jsou vybírány především z hlediska jejich biodegradability či biokompatibility. Mezi první materiály, který začal být využíván pro výrobu mikročástic patří kyselina polymlečná (PLA), která splňuje oba požadavky. Pro tvorbu mikročástic je také využíván kopolymer poly(mlečné kyseliny) a poly(glykolové kyseliny) (PLGA) který je taktéž biokompatibilní a biodegradovatelný. Dalším biologicky rozložitelným polymerem je často využíván polykaprolakton (PCL) a jeho kopolymery. Všechny uvedené materiály netvoří při jejich degradaci toxické produkty, a jsou považovány za bezpečné i pro zdraví člověka při užití *in vivo*. [9]

### 1.4.1 Kyselina polymléčná - PLA

Kyselina polymléčná je biodegradabilní alifatický polyester, který má chirální strukturu a vyskytuje se ve formě dvou izomerů D (-) a L (+). Kyselina polymléčná je díky přítomné methylové skupině málo náchylná k hydrolytickému štěpení. Methylová skupina brání proniknutí vody k labilním vazbám. Vzniká otevřením polymerního kruhu laktidu kyseliny mléčné. Kyselinu mléčnou jako výchozí látku pro přípravu laktidu, lze získat fermentačním kvašením glukózy, která se získává štěpením škrobu ze zemědělských plodin, jako jsou kukuřice, cukrová řepa, nebo cukrová třtina. PLA má mnoho využití a to díky jejím žádaným vlastnostem. Je to především její dobrá mechanická pevnost, nízká hodnota tažnosti, průhlednost a pro životní prostředí je to především dobrá biodegradabilita. Vlivem klimatických a mikrobiálních procesů se štěpí postupně přes oligomery až na monomer. PLA lze štěpit na čistý monomer i chemicky. [28] Rozklad PLA probíhá jak v kyselém tak i zásaditém prostředí vlivem molekul vody, které hydrolyzují esterové vazby na jejím řetězci. [34],[36] V průmyslu se nejčastěji využívá jako obalový materiál. Sumární vzorec:  $(C_3H_4O_2)_n$



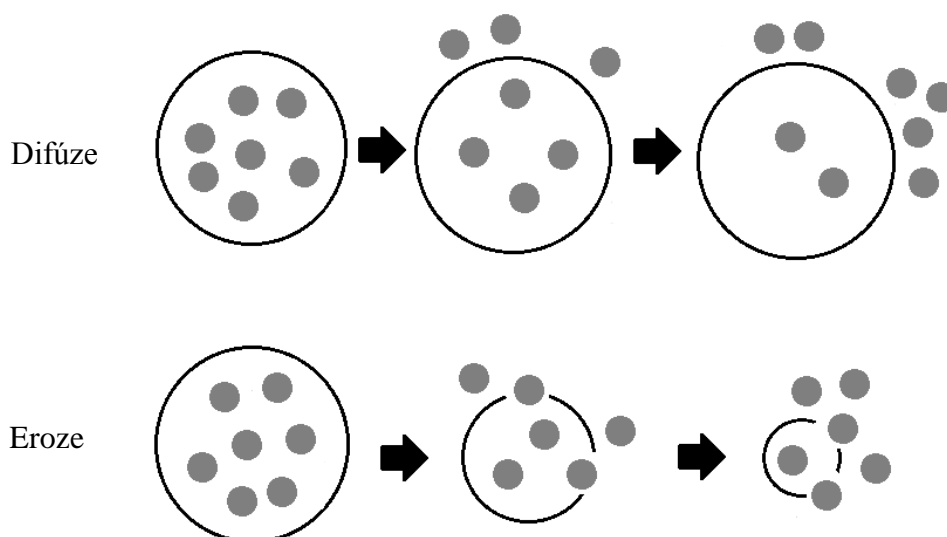
Obr. 3 Strukturální schéma PLA [28]

#### 1.4.2 Faktory ovlivňující účinnost enkapsulace aktivní látky

Velmi významný faktor pro tvorbu mikročastic je koncentrace polymeru. Z pravidla platí, že s rostoucí koncentrací polymeru roste i velikost připravených mikročastic. Zároveň platí, že čím vyšší koncentrace polymeru, tím vyšší je enkapsulační účinnost. Naopak při nízkých koncentracích dochází ke vzniku mikročastic s pórovitější strukturou, díky čemuž je aktivní látka rychleji uvolňována. Dalším významným faktorem je také typ a koncentrace emulgátoru. Platí zde úměra čím větší koncentrace emulgátoru, tím jemnější emulze a tím menší mikročastice. Koncentrace emulgátoru je důležitá z důvodu, jejího vlivu na enkapsulační účinnost. Do určité koncentrace je emulgátor schopen enkapsulační účinnost zvýšit. Při překročení této limitní koncentrace, může dojít naopak k poklesu schopnosti enkapsulace. Vznik mikročastic je také ovlivněn dobou a rychlostí mechanického míchání, ultrasonifikací, rychlostí míchání při odpařování rozpouštědla, nebo teplotou. Přípravu mikročastic a nanočastic můžeme rozdělit podle toho, zda máme námi používaný polymer již připravený nebo jej musíme prvně vytvořit. Při samotné volbě vhodné metody pro zachycení požadovaného množství látky, se musíme řídit fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek, které chceme enkapsulovat a také vlastnostmi polymerního materiálu do kterého má být látka zachycena. [16]

## 1.5 Uvolňovací mechanismus

K uvolňování bioaktivních látek tvořených z biologicky rozložitelných částic může docházet pomocí dvou hlavních mechanismů, a to difúzí nebo erozním mechanismem. Oba mechanismy jsou vhodné pro uvolňování aktivních látek. Obvykle jeden z principů převažuje. [17] Systémy, které fungují na principu difúze, uvolňují aktivní látku na základě rozdílů koncentrací uvnitř a vně polymerní matrice. Samotné šíření uvolněné látky je ovlivněno její rozpustností a difuzivitou v závislosti na vlastnostech aktivní účinné látky a polymerní matrici. Naproti tomu systémy, které fungují na principu eroze, postupně uvolňují aktivní látku do okolního prostředí pomocí rozpadu polymeru v důsledku přítomnosti hydrolytické nebo enzymatické štěpitelné vazby. [18], [9] Tato technika je vhodná pro sloučeniny s nízkou rozpustností ve vodě. Erozi můžeme rozdělit na povrchovou a objemovou. O povrchovou erozi se jedná v případě, kdy je rychlost degradace povrchu vyšší než rychlost difúze vody do polymeru. Povrchová eroze je žádoucí mechanismus a to z důvodu, že rychlost uvolňování je možné řídit pomocí velikosti povrchu částic. [18] Objemová eroze nastává v případě, kdy je průnik vody do polymeru rychlejší než eroze povrchu polymeru. V tomto případě dochází spíše k nežádoucímu rychlému uvolnění aktivní látky při celkovém rozpadu polymerní matrice.



Obr. 4 Schéma difúzního a erozního uvolňování aktivních látek z nanočástic



### 1.5.1 Kinetika uvolňování aktivních látek z mikročástic

V průběhu několika desetiletí bylo vytvořeno mnoho modelů, které popisují kinetiku uvolňování aktivních látek z polymerních matic. Modely se rozdělují na statické metody (opakované měření, průzkumné analýzy dat), modelově závislé metody (nultý a první řád, Korsmeyer-Peppasův model, Higuchiho model) a modelově nezávislé metody (faktory podobnosti a rozdílnosti). Níže budou popsány dva základní matematické modely uvolňování. [29]

#### Kinetika nultého řádu:

Matrice, v níž se nachází aktivní látka, zůstává neporušená a dochází k pozvolnému rozpouštění aktivní látky. Tuto reakci lze popsat následující rovnicí (1) která popisuje množství uvolněné aktivní látky za určitý čas.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (1)$$

Kde:  $Q_t$  značí množství aktivní látky uvolněné v čase  $t$ ,  $Q_0$  je počáteční množství aktivní látky obsažené v roztoku,  $K_0$  značí rychlostní konstantu rovnice nultého řádu vyjádřenou jednotkou koncentrace za čas. [29]

#### Kinetika prvního řádu:

Popisuje absorpci popřípadě eliminaci aktivní látky. Uvolňování aktivní látky lze popsat rovnicí (2):

$$C(t) = C_0 \exp(-kt) \quad (2)$$

kde  $C(t)$  je zbývající množství herbicidu (% z počáteční aplikované dávky) v čase  $t$ ,  $C_0$  je počáteční extrahovatelné procento herbicidu v polymerní částici a  $k$  je rychlostní konstanta prvního řádu [ $\text{čas}^{-1}$ ]. Rychlostní konstanta se určuje pomocí nelineární regrese. [35]

Korsmeyer-Peppas model

Korsmeyer a spol. odvodili jednoduchý vztah, který popisuje uvolňování léčiv z polymerních systémů, tento vztah (4) se dá však použít nejen na uvolňování léčiv, ale na jakékoliv aktivní látky.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n + C \quad (4)$$

Kde: zlomek je uvolnění léčiva v čase  $t$ ,  $K$  je rychlostní konstanta uvolňování a  $n$  je exponent uvolňování, který se používá k charakterizaci různého uvolňování z matric válcovitého tvaru. Získaná data jsou vynášena jako závislost logaritmu procentuálního uvolňování léčiva na logaritmu času.  $C$  je konstanta, která bere v úvahu účinek počátečního uvolnění. [37], [38], [52]

Pokud dosazením hodnot do tohoto vzorce (4) získáme  $n = 1$ , můžeme říci, že se jedná o erozní mechanismus, který se vyznačuje tzv. „burst efektem“ – ve vzorci je vyjádřeno konstantou  $C$ . Jedná se o rychlé počáteční uvolnění aktivní látky, a tento efekt je nežádoucí. Platí zde pravidlo, čím je konstanta  $C$  vyšší, tím vyšší je i *burst efekt*. [1], [29], [53]

### 1.5.2 Faktory ovlivňující uvolňování

Uvolňování aktivních látek z polymerní matrice ve formě mikročástic závisí například na způsobu jejich přípravy. Různé metody příprav mikročástic ovlivňují morfologii povrchu, velikost částic, krystalovou strukturu polymeru ale i jeho stabilitu jako nosiče pro aktivní látky. Velikost částic je další z faktorů ovlivňující uvolňování aktivní látky. Další vliv má obsah enkapsulované látky, s jeho rostoucím množstvím, se snižuje stabilita micel a hydrofobně-hydrofilní rovnováha. V neposlední řadě je uvolňování ovlivněno délkou polymerních řetězců a molekulovou hmotností. Ren Zhong Xiao a spol. zjistili, že delší řetězce PLA zajistí větší průměr micel, a tím i větší obsah enkapsulované aktivní látky a její pomalejší uvolnění z micel. [30] Dále uvolňování ovlivňuje polymerní mikrostruktura, polarita segmentů kopolymeru, teplota skelného přechodu polymeru, pružnost hlavního řetězce polymeru, molekulová hmotnost polymeru, hustota zesíťování polymerního řetězce, interakce mimo řetězec, také stupeň rozvětvení, přítomnost ko-monomerních bočních skupin. [1]

Uvolňování aktivní látky pomocí řízeného difúzního systému má tři omezující případy, které toto uvolňování ovlivňují.

1. Pokud je počáteční množství látky menší nebo rovno, než maximální rozpustnost látky v polymeru závisí rychlost uvolňování na difúzním koeficientu a počátečním množství aktivní látky v částici. Platí pro homogenní matrice, ve kterých je aktivní látka rozpuštěná.
2. Pokud je větší než maximální rozpustnost látky v polymeru, ale výrazně menší než hmotnost polymeru (např. méně 10% w/w v závislosti na druhu polymeru), tak rychlost uvolňování opět závisí na difúzním koeficientu a počátečním množství aktivní látky v částici. Platí pro heterogenní matrice a matrice, ve kterých je aktivní látka dispergovaná.
3. Pokud je množství aktivní látky vyšší než cca 10 % hmotnostního objemu (w/w) polymeru, dochází v průběhu uvolňování k tvorbě kontinuálních pórů nebo kanálků v polymerní matrici, které zde vytvořila přítomnost již vyluhované aktivní látky, a těmito póry / kanálky bude probíhat difúze dalšího obsahu aktivní látky v polymerní matrici. Rychlost uvolňování pak bude záviset na difúzní charakteristice elučního média. Platí pro porézní / granulované matrice. [54], [55]

## 2 PESTICIDY

Podle definice Food and Agricultural Organisation jsou pesticidy látky určené k ničení, potlačení, odpuzení, ale také k prevenci proti nežádoucím rostlinám, mikroorganismům či živočichům v době růstu, zpracování, transportu, výroby, distribuce a skladování potravin, zemědělských komodit nebo krmiv. Pesticidy jsou v zemědělství dnešní doby velmi důležitou součástí. Díky nim dochází k omezení ztrát produktů a zvýšení jejich jakosti. I přesto že pesticidy mají pozitivní vliv na zemědělskou produkci, je zde řada negativních dopadů na necílové skupiny, jako je životní prostředí a živé organismy. Dalším negativem je také možnost vzniku jisté rezistence škůdců vůči účinkům pesticidů, především při nadměrném, neuváženém a neodborném používání. Z tohoto důvodu byly stanoveny maximální limity reziduí pesticidů. Rezidua pesticidů jsou velkým rizikovým faktorem pro životní prostředí a mohou být prekuzory toxičtějších sloučenin, než samotná rezidua. [20]

Pesticidy lze rozdělit do několika základních skupin podle jejich cílové skupiny působení:

*Tabulka 2 Základní rozdělení pesticidů [20]*

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

V této diplomové práci byl jako druh uvolňované aktivní látky vybrán Metazachlor, řadící se mezi skupinu herbicidů, které jsou popsány níže.

## 2.1 Herbicidy

Herbicidy jsou přípravky, které slouží k potlačení růstu a k hubení plevelných rostlin. Jsou využívány již desítky let, a v dnešní době se již bez nich neobejdeme. Nachází využití nejen v oblasti zemědělství, ale také ve stavebním průmyslu, kde je využíváme k odplevelení zastavovaných ploch, výstavbě silnic, chodníků, apod. Je to směs účinné látky, emulgátorů, plnidel a často barviv. Velké množství herbicidů je pro své nebezpečné vlastnosti klasifikováno jako jedy. Kromě užitku, mohou přinést také řadu problémů. Nebezpečné jsou zvláště pro povrchové a podzemní vody, kam se mohou dostat erozí půd, či průsakem. Vody znehodnocené herbicidy nelze poté využít ve vodárenském průmyslu. Dalším rizikem je možný vznik reziduí herbicidů v potravinách. Tyto jevy lze však sledovat jen u perzistentních herbicidů. Smrtelné riziko představují pro řadu živočišných organismů. Při neopatrné manipulaci, mohou ohrozit i zdraví člověka. [21]

Výhoda používání herbicidů spočívá v nenáročném aplikaci, a poměrně nízkých nákladů. Při využití pro zemědělské plodiny, je však důležitá správnost jejich užití. Nadměrné používání může poškodit nejen životní prostředí, vody či zdraví člověka, ale v neposlední řadě mohou poškodit i samotné plodiny, u kterých chceme dosáhnout vyšších výnosů. Pro správnou aplikaci je důležité znát mechanismy působení herbicidů. [22], [23]

### 2.1.1 Historie

Herbicidy jsou využívány již od 19. století. Jako první herbicid se využívala modrá skalice neboli síran měďnatý. Jako další byly vyzkoušeny například síran železnatý, kyselina sírová a chlorečnan sodný. Na konci 19. Století se začaly používat i organická hnojiva jako dusíkaté vápno. To sloužilo prvně jako hnojivo, později se také přišlo na jeho herbicidní účinky. Ve druhé vietnamské válce, Laosu a Kampučii byly herbicidy dokonce použity k vojenským účelům, přesněji k účelům defoliace lesních porostů, ničení přirozených úkrytů a úrodných půd. Pro tyto účely byl využit směsný herbicid fenoxxy herbicidů, známý pod názvem Agent Orange. Fenoxxy herbicidy, jsou jedny z nejtoxičtějších nízkomolekulárních jedů a to díky obsaženým dioxinům. [21]

Triaziny a jejich herbicidní účinky se začaly využívat až v 50. letech 20. století. Triaziny měli jak selektivní tak neselektivní účinky. Mezi nejdůležitější objev patří simazin, který byl uveden na trh jako první, dále pak atrazin, terbutryn a terbuthylazin. Jako další byly vyvinuty herbicidy na bázi chloracetamidů například alachlor, a herbicidy na bázi substituovaných močovin například isoproturon. Používání těchto herbicidů spolu s triaziny je

v Evropě postupně omezováno, a to pro jejich velkou perzistenci, zatížení půd, okolního prostředí i podzemních vod. Herbicidy jsou v neustálém vývoji, avšak vývoj a výzkum nových herbicidů je značně nákladný. Může trvat 8-10 let než je vyvíjený herbicid uveden na trh. U nově vyvíjených herbicidů je požadována vysoká a rychlá účinnost, vysoká selektivita, bezpečná a rychlá degradace v prostředí a také cenová dostupnost a syntéza. [21], [22]

### **2.1.2 Rozdělení**

Základní rozdělení herbicidů je podle toho, zda se jedná o herbicidy selektivní nebo neselektivní neboli, dle jejich účinku.

#### ***Selektivní herbicidy***

Dokážou ničit pouze určité druhy plevelů, aniž by byla poškozena pěstovaná rostlina. Tento jev funguje na principu odlišností, které jsou mezi pěstovanými kulturními rostlinami a druhem plevelů. Rozdíly jsou jak v tvaru či postavení listů, ale i v jejich pokrytí voskovou vrstvou, ochlupením nebo způsobu uložení vegetačního vrcholu. Můžeme je dělit podle druhu aplikace na plošné, řádkové, ohniskové, pod listové a dělené aplikace.[21], [22], [23]

#### ***Neselektivní herbicidy***

Jsou to takové chemické látky, které slouží k ničení veškeré vegetace, nehledě na rozdíly, které mezi rostlinnými druhy jsou. Jsou to jedny z nejpoužívanějších herbicidů. Kromě využití na zemědělských půdách například v mezi-porostním období, nachází využití i na nezemědělských půdách při hubení nežádoucí vegetace, jako například na cestách, hřištích, apod. Na nezemědělské půdy se častěji používají neselektivní herbicidy s dlouhými reziduálními účinky a tím vzniká větší ekologické riziko. Herbicidy s krátkým reziduálním účinkem pronikají do rostlin nadzemní částí a v půdě se rychle eliminují. Herbicidy s krátkým reziduálním účinkem, jsou buď schopné potlačovat nadzemní části rostlin, anebo nadzemní i podzemní části rostlin. [21], [22], [23]

Herbicidy podle způsobu účinku můžeme také rozdělit na herbicidy dotykové – kontaktní, translokační neboli systémově působící, a na herbicidy sterilizující půdu. To jakým způsobem je herbicid rostlinou přijímán můžeme tuto aplikaci rozdělit na listovou a kořenovou. Listová aplikace, se využívá v době vegetace pro dotykové a systematické herbicidy. U kořenové aplikace je herbicidní látka přijímána za pomoci kořenového systému rostliny.

Kořenová aplikace je využívána především pro půdní sterilaci. [23]

***Doba aplikace herbicidů se dělí na:***

- a) Předset'ovou aplikaci – půda je ošetřena před vysázením plodin.
- b) Preemergentní aplikaci – půda je ošetřena herbicidem po zasetí plodin.
- c) Postemergentní aplikaci – půda je ošetřena po vzejití plodiny. [23]

### **2.1.3 Vliv na životní prostředí a toxicita herbicidů**

Řada herbicidů jsou zdraví škodlivé, jedovaté i zvláště nebezpečně jedovaté. Největším problémem z hlediska toxicity jsou fenoxi herbicidy, které jsou zdrojem nebezpečných dioxinů. Při nadměrném používání těchto látek se snadno dostávají do ovzduší (v období suchého léta), do povrchových i podzemních vod a v neposlední řadě i do potravního řetězce. V půdě se mohou dioxiny dostat až metr pod povrch. Problémem dioxinů, je jejich stálost v prostředí, a akumulace. Byla také dokázána souvislost mezi dioxiny a zvýšeným výskytem rakovinnotvorného bujení. Byl prokázán například sarkom měkkých tkání, lymfomy, nonhodgkinský lymfom a karcinom plic. Dále má redukční vliv na metabolismus a negativně působí na růst plodu. Mezi herbicidy jež mohou vyvolat genetické mutace u živočichů a lidí se řadí zvláště nebezpečná látka 2,4,5-trichlorfenoxycetová kyselina, která právě obsahuje toxický kontaminant dioxin. [21], [23]

To jaké budou ekotoxikologické dopady herbicidů, závisí na jejich chování v půdě, vzduchu a ve vodě. Velmi důležité pro šíření pesticidů obecně jsou reakce probíhající v půdách. Mnoho těchto reakcí je ovlivněno půdními sorpčními vlastnostmi. Mezi parametry, který tyto vlastnosti udává, patří půdní adsorpční koeficient. Vyjadřuje schopnost pesticidu vázat se na půdní částice. Je charakterizován mírou perzistence rezidua v půdním prostředí. [31]

To zda se herbicidy a jejich degradační produkty budou distribuovat mezi půdní a vodní fázi je ovlivněno mnoha faktory. Především je to dáno chemickou povahou dané látky a její rozpustností ve vodě, vlastnostmi půdy jako je půdní sorpční konstanta, rozdělovací koeficient oktanol/voda a poločas života v půdě, další vliv mají klimatické faktory. Například pesticidy s nízkým sorpčním koeficientem, vysokou rozpustností ve vodě a dlouhým poločasem života představují riziko pro podzemní vody, naopak látky vázané na půdní částice nemají tendence k vypařování a uvolňování do vodního prostředí. [32]

Dopad herbicidů a pesticidů obecně na životní prostředí je dán také jejich schopností degradace. Degradace těchto látek v půdách je krom chemických reakcí způsobena také půd-

ními mikroorganismy. Ty dokážou pesticidy rozložit až na oxid uhličitý, vodu a anorganické látky. Během degradace může docházet k vytváření tak zvaných metabolitů, které však nemusí být pro životní prostředí nebezpečné. Mikrobiální degradace je omezena hloubkou jejich výskytu. Mikroorganismy se totiž vyskytují pouze v blízkosti kořenového systému rostlin. Pokud se tedy herbicidy i pesticidy obecně dostanou do větší hloubky, nemůže zde k mikrobiální degradaci dojít. [32] S degradací souvisí také poločas rozpadu pesticidů. Ten značí dobu poklesu jejich aktivity na polovinu. Pesticidy lze dle tohoto parametru rozdělit na pesticidy neperzistentní (poločas rozpadu do 30 dní), středně perzistentní (poločas rozpadu 30 – 100 dní) a vysoce perzistentní (poločas rozpadu nad 100 dní). Kromě mikrobiální a chemické degradace, se pesticidy degradují také vlivem fotodegradace. Jedná se o proces odbourávání pesticidů pomocí slunečního záření. Účinnost fotodegradace je závislá na intenzitě a spektrálních vlastnostech slunečního záření, délkou expozice a vlastnostmi pesticidů. [33]

#### 2.1.4 Příklady herbicidů

První tři příklady herbicidů, byly testovány ve studiích, kterými se zabývám v rešeršní části této práce. Poslední příklad herbicidu Metazachlor, je herbicid, který jsme použili v této diplomové práci pro testování kontrolovaného uvolňování.

##### *Atrazin*

Jedná se o nejběžnější herbicid, který je v České republice od roku 2005 zakázán z důvodu kontaminace vod. Najdeme ho v půdách i ve vodách. Je účinný na dvouděložné plevely a funguje na principu inhibice fotosyntézy. Využití nachází při pěstování kukuřice, chmelu a cukrové třtiny. Je mírně toxický pro savce, vodní rostliny a některé druhy řas. Atrazin má velmi negativní vliv na živé organismy. Narušuje hormonální systém, reprodukci a vývoj nenarozených organismů. Ve vyšších dávkách způsobuje poruchy koordinace, motoriky a také respirační problémy. Dráždí sliznice žaludku, vyvolává zvracení, průjem a kožní dermatitidy. V půdě se sorbuje na jílové minerály a se snižující se hodnotou pH se adsorpce zvyšuje. [24]



### *Simazin*

Využití v České republice nacházel při ošetření brambor, vojtěšky, sadů, vinic, chmelnic, angreštu, malin, ostružin, jahodníku a okrasných rostlin. Momentálně je jeho používání v České republice povoleno pouze do vyprodání zásob. Často se aplikoval v kombinaci s dalšími herbicidy, jako jsou atrazin, paraquat, Surfan, Dual, apod. Nacházíme ho v půdách a splachem půd se může dostat i do vod. Je to herbicid téměř netoxický pro ptáky a pro vodní ekosystémy je toxicita obdobná jako u atrazinu. Jen velmi málo se akumuluje v těle vodních organismů a není perzistentní. [25]

### *Paraquat*

Jedná se o neselektivní perzistentní herbicid, který je využívám celoplošně nejčastěji formou postřiku pro ničení všech skupin rostlin. Využití nachází při pěstování sóji, kukuřice a rýže. Paraquat ve vyšších dávkách způsobuje poškození plic, jater, srdce a ledvin. Dlouhodobé vystavení tomuto herbicidu může vést k až poruchám rozmnožování a vzniku rakoviny kůže. Paraquat je třetí nejběžnější pesticid na světě. V Evropské unii je jeho použití zakázáno. [26]

### *Metazachlor*

Patří mezi běžně užívané selektivní herbicid, který je účinný proti lipnicovým a dvouděložným plevelům. Je přijímán především kořenovým systémem. Aplikuje se na půdu před vzejitím plevelů, které při klíčení přijímají herbicid a ten způsobí jejich odumření krátce po vyklíčení. Dobrou účinnost zajišťuje dostatečná půdní vlhkost.

Využití nachází pro ničení plevele vyskytujícího se na polích s kukuřicí, brokolicí, růžičkovou kapustou, okurkami, jahodami, cukrovou třtinou, bramborami, sójou nebo slunečnicí. Akutní toxicita u metazachloru je poměrně nízká.

Do těla se může dostat inhalací, přes pokožku či orální cestou. Při pokusech na zvířatech se dokázalo, že při kontaktu s kůží jí dokáže senzibilizovat a při pravidelném podávání poměrně vysokých dávek metazachloru dochází k poškození jater, ledvin a krevních buněk. V dlouhodobých studiích nebyly prokázány žádné mutagenní vlastnosti. U testovaných zvířat nedocházelo ani k vývojovým či reprodukčním poruchám. Metazachlor není nebezpečný pro půdní mikroflóru, žížaly, ptáky a včely. Středně toxický je například pro dafnie,

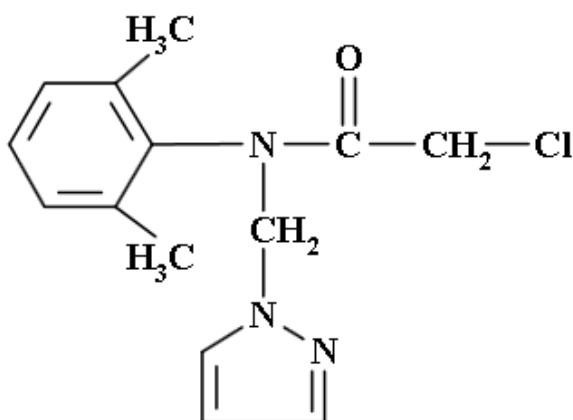
kapra nebo Slunečnici velkoploutvou. Nejvíce náchylné jsou zelené řasy a z vodních druhů je to pstruh. [27]

Nejčastější analytickou metodou pro stanovení aktivní složky metazachloru se používá metoda HPLC. Retenční doba metazachloru v roztoku vzorku by neměla mít odchylku více než 1% od autentického kalibračního roztoku. Ve světě je pro testování fyzikálních a chemických vlastností technických materiálů a konkrétně metazachloru využíváno CIPAC metod (collaborative international pesticides analytical council). Metazachlor by neměl obsahovat žádné nečistoty, a proto nejsou ani zapotřebí žádné speciální metody pro stanovení případných nečistot. Jako alternativní metoda pro zjištění identity a obsahu metazachloru se využívá i metoda infračervené spektrometrie. [24], [27], [35]

#### Fyzikální vlastnosti:

Metazachlor ve formě koncentrovaného roztoku, je díky své velmi pomalé rychlosti hydrolyzy považován za velmi stabilní za normálních podmínek. Teplota tání je závislá na použitém rozpouštědle, ze kterého byly získány krystaly metazachloru. Teplota tání je 85°C pokud je použit jako rozpouštědlo cyklohexan, 80°C při použití směsi chloroform/hexanu, a 76°C u diisopropyletheru. Čistý metazachlor má teplotu rozkladu přibližně při 205°C. Poločas rozpadu vlivem mikrobiálního působení se pohybuje v rozmezí 3-9 dnů. [27] Jeho molekulární hmotnost je 277,8 g.mol<sup>-1</sup>, rozpustnost ve vodě je 430 mg.l<sup>-1</sup> a tlak par je 0,0490 mPa. [35], [35]

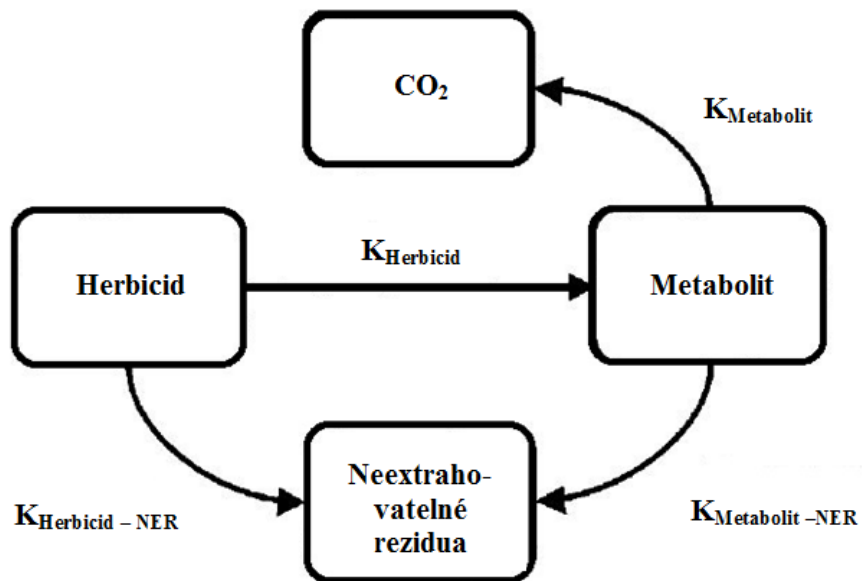
Sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O



Obr. 5 Strukturní schéma metazachloru [27]

Degradace metazachloru

Mineralizace metazachloru podle L. Mamy a kol. probíhá přes tvorbu metabolitů a následně vzniku neextrahovatelných reziduí, které vznikají jak z původního herbicidu, tak i z jeho metabolitů. [35]



Obr. 6 Schéma mineralizace metazachloru podle L. Mamy a kol.

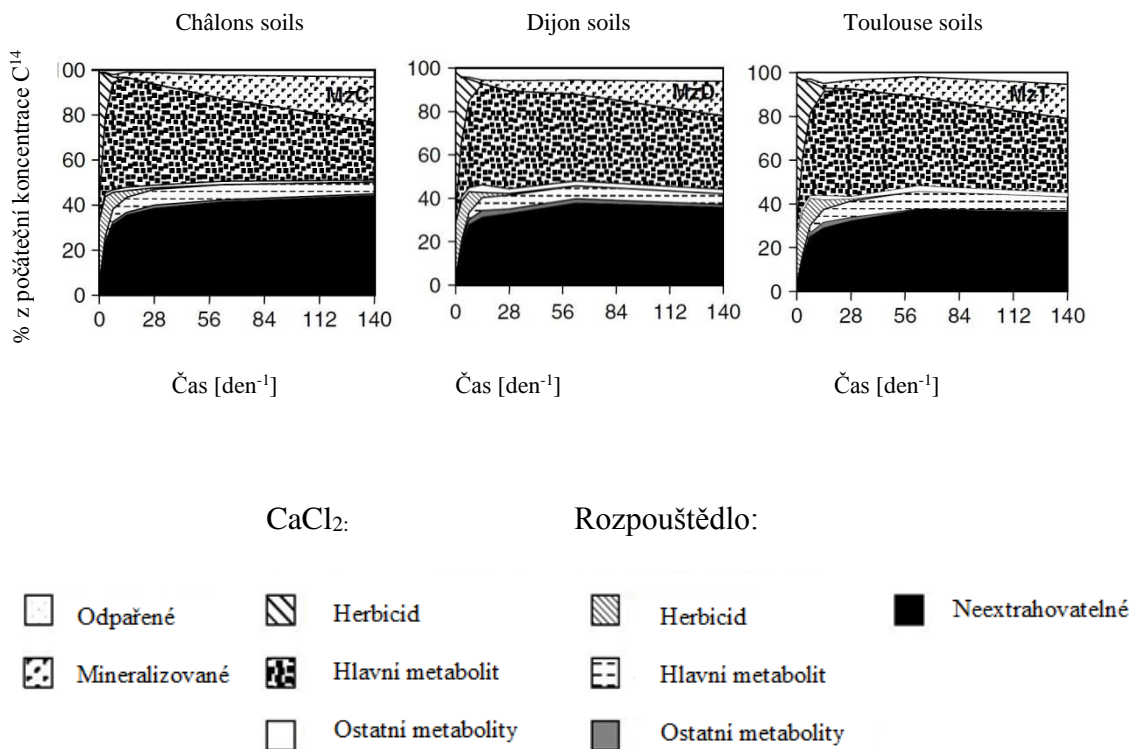
$K_{\text{Herbicid}}$  – koeficient degradace herbicidů

$K_{\text{Metabolit}}$  – koeficient degradace metabolitů

$K_{\text{Herbicid - NER}}$  – rychlostní konstanta tvorby neextrahovatelných reziduí z herbicidu (NER),

$K_{\text{Metabolit - NER}}$  – rychlostní konstanta tvorby neextrahovatelných reziduí z metabolitů.

Extrakcí půdy pomocí vodných roztoků ( $\text{CaCl}_2$  0,01M), byl pod vedením L. Mamy a kol. zjištěn předpokládaný vznik možných reziduí metazachloru a dalších testovaných pesticidů během jejich mineralizace. Přítomnost reziduí metazachloru byla velmi vysoká (Obr. 7). Na konci 140 denní inkubace, byla zjištěna 36% přítomnost reziduí. Metazachlor byl v půdním prostředí velmi rychle degradován na hlavní neidentifikovaný metabolit. Po dobu testování byl pak ve vodných extraktech detekován pouze tento metabolit. Podíl přítomnosti pesticidů ve vodných extraktech je závislý na jejich sorpci. Tento podíl je však také závislý na čase, vývoji sorpčních interakcí, degradaci pesticidů na jejich metabolity s odlišnou sorpční schopností. L Mamy a spol. vyhodnotili, že metazachlor spolu s dalšími testovanými pesticidy, představují vážné riziko krátkodobého znečištění. [35]



Obr. 7 Mineralizace metazachloru ve třech půdních typech, pomocí vodných roztoků  $\text{CaCl}_2$  a organického rozpouštědla.[35]

### 3 STUDIE ZABÍVAJÍCÍ SE PŘÍPRAVOU A TESTOVÁNÍM POLYMERNÍCH SYSTÉMŮ KONTROLOVANÉHO UVOLŇOVÁNÍ

V rámci této diplomové práce byly prostudovány dostupné studie týkající se tématu, kterému se v této práci věnujeme.

#### 3.1 Nanokapsle poly $\epsilon$ -kaprolaktonu jako systém nosiče pro herbicidy: Fyzikálně chemická charakterizace a genotoxické hodnocení

Grillo a spol. se zabývali možnostmi tvorby nanokapslí z poly $\epsilon$ -kaprolaktonu jako nosného systému pro herbicidy. Pro testování byly použity triazinové herbicidy (ametryn, atrazin a simazin). Nanokapsle poly $\epsilon$ -kaprolaktonu byly připraveny pomocí metody O/V za odpaření rozpouštědla, tedy emulzifikace organické fáze ve vodní fázi s následným odpařením. Organická fáze byla složena ze 100 mg poly $\epsilon$ -kaprolaktonu, 30 ml organického rozpouštědla acetonu, 200 mg oleje z kaprinových triglyceridů a kaprylové kyseliny, 40 mg povrchově aktivní látky sorbitan monostearátu a 10 mg vybraného herbicidu. Vodná fáze byla složena z 30 ml roztoku obsahujícího 60 mg polysorbátu. Po rozpuštění komponentů z obou fází, se organická fáze postupně vložila do vodné fáze za stálého míchání magnetickým míchadlem po dobu 10 minut. Následně se organické rozpouštědlo odpařilo za sníženého tlaku pomocí rotačního výparníku. Suspenze nanočástic byla odpařena do konečného objemu 10 ml, která vede ke koncentraci herbicidu 1 mg / ml. Velikosti získaných částic obsahující herbicidy byly v rozmezí 232-290 nm. Účinnost enkapsulace u použitých herbicidů byla pro ametryn  $84,1 \pm 2,5\%$ , pro atrazin  $86,7 \pm 0,7\%$ , a  $97,0 \pm 0,5\%$  pro simazin. Všechny sloučeniny vykazovaly dobrou efektivnost enkapsulace prokazující jejich afinitu k nanostrukturnímu systému. Kinetika uvolňování byla sledována ve vodném prostředí s následnou analýzou odebraných vzorků pomocí HPLC s UV-VIS detektorem. Uvolňovací profil byl testován po dobu 5 dnů s výsledky 61 % pro ametryn, 72 % pro atrazin a pro simazin pouze 25 %. Podle autorů mohou být dány nízké hodnoty uvolňovacího profilu u simazinu chemickou strukturou. Simazin má oproti atrazinu a ametrynu menší počet  $\text{CH}_3$  skupin. Dále byla testována genotoxicita s různými typy buněk (lidské lymfocyty). Při testování bylo zjištěno, že zapouzdřené formulace jsou méně toxické než herbicidy používané ve svých volných formách. V závěru této studie byl systém nanokapslí označen za atraktivní alternativní metodu pro uvolňování triazinových herbicidů, která by mohla pomoci zmírnit dopady na životní prostředí, jakož i snížit množství chemických látek potřebných pro hubení plevelu na plantážích. [11]

### **3.2 Chitosan / trifosfátové nanočástice obsahující herbicid paraquat: Alternativa ovládnání plevelu šetrnější pro životní prostředí**

Autoři Grillo a spol. se zabývali přípravou s enkapsulovaným neselektivním herbicidem zvaným paraquat, jakožto možností šetrnější aplikace pro životní prostředí. Nanočástice byly připraveny iontovou gelifikací technikou. Roztok 0,1% chitosanu byl smíchán s 0,2% kyselinou octovou za stálého magnetického míchání po dobu 12 hodin při pH 4,7. Samostatný vodný roztok 0,1% trifosfátu byl připraven za chlazení při teplotě 4°C. Oba roztoky byly následně přefiltrovány přes filtrační membránu o pórech 0,45 µm, k odstranění agregovaného nebo nerozpustného materiálu. Po přípravě těchto základních roztoků bylo 5 ml roztoku trifosfátu přidáno do 20 ml roztoku chitosanu, za stálého míchání na magnetickém míchadle. Po dobu 10 minut. Paraquat (12 mg) byl začleněn do roztoku chitosanu před přípravou nanočástic. Velikosti získaných nanočástic pohybovali kolem 390 nm bez aktivní látky paraquat a 420 nm s paraquatem. Účinnost enkapsulace byla 62,66 ± 0,77% což naznačuje dobrou afinitu mezi složkami. Dobrá afinita je dána elektrostatickými silami a to tak, že paraquat nese pozitivní náboj zatím, co trifosfát nese záporně nabitý aniont. Kinetika uvolňování byla testována za laboratorních podmínek. Volný herbicid dosáhl 92% uvolnění z nanočástic. V enkapsulované formě jej bylo z nanočástic uvolněno 70% a to za stejných podmínek v akceptorové komoře po 350 minutách. Dále byla testována cytotoxicita a genotoxicita. Vytvořené nanočástice jak bez obsahu paraquatu tak i s jeho obsahem nevykazovaly prakticky žádnou toxicitu (testy byly prováděny po dobu 24 hodin). Celkově tato zjištění ukázala, že enkapsulace paraquatu v nanočásticích snižuje jeho cytotoxicitu i genotoxicitu. Testování *Allium cepa* chromozomových aberací prokázaly, že částice vázané s paraquatem způsobují mnohem menší poškození chromozomů. Dále bylo zjištěno, že zapouzdření herbicidu do nanočástic nesnižuje jeho dostupnost v půdě. [12]

### **3.3 Aplikace atrazinu napolyε-kaprolaktonové nanočástice jako alternativní technika pro ovládání plevelu s nižšími riziky pro životní prostředí**

Pereira a spol. se zabývali přípravou nanočástic z polyε-kaprolaktonu, do nichž byl enkapsulován herbicidní přípravek atrazin, a jeho následným testováním na cílových a necílových rostlinách. Nanokapsle a nanosféry polyε-kaprolaktonu byly připraveny metodu olej ve vodě. Organická gáze byla připravena ze dvou roztoků. První obsahoval 400 mg polymeru rozpuštěného v 20 ml dichlormethanu a druhý obsahoval 10 mg atrazinu rozpuštěného v 10 ml acetonu. Nanokapsle byly vyrobeny přidáním 200 mg myritolu do roztoku polymeru, zatímco nanosféry byly vyrobeny pomocí samotného roztoku polymeru. Oba roztoky byly vloženy do chladné ultrazvukové lázně na dobu 1 minuty při 90 % výkonu. Následně bylo přidáno 50 ml roztoku polyvinylalkoholu (3 mg / ml) a opět se roztok podrobil ultrazvukové lázni za studena po dobu 8 minut při 9, % výkonu. Získaný objem emulze byl 80 ml a byl umístěn do rotační odparky pro odstranění rozpouštědla. Výsledný objem byl 10 ml s obsahem 1 mg / ml atrazinu. Velikost částic nanokapslí a nanosfér bez atrazinu byly  $513,0 \pm 7,5$  a  $365,1 \pm 0,16$  nm. Po zapouzdření herbicidu došlo k poklesu velikosti u nanokapslí a to na  $483,1 \pm 2,5$  nm a ke zvýšení velikosti částic u nanosfér na  $408,5 \pm 2,5$  nm. Účinnost enkapsulace byla pro nanokapsle  $93,4 \pm 1,2$  % a pro nanosféry  $92,7 \pm 1,2$  %. Použití testu Alliumcepa chromozomových aberací prokázala, že nanočásticové systémy byly schopny snížit genotoxicitu zkoumaného herbicidu. [12]

### **3.4 Mikročástice nízkomolekulární polymléčné kyseliny pro řízené uvolňování herbicidu metazachloru: Příprava, morfologie a kinetiky uvolňování**

Stloukal a spol. se zabývali enkapsulací selektivního metazachloru do polymerních částic z polymléčné kyseliny a testovali jeho uvolňování ve vodním prostředí. Submikro částice byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla olej ve vodě. 400 mg PLA bylo rozpuštěno ve 4 ml chloroformu. Jako stabilizátor byla použita želatina (0,5 %) a směs PLA, chloroformu a želatiny byla dispergována za stálého míchání při otáčkách od 11 500 do 18 000 otáček za minutu po dobu 5 minut za studena. Byly vytvářeny 3 velikosti částic značeny S, M a L. Tyto částice pokaždé obsahovaly 5, 10, 20 a 30 % enkapsulovaného metazachloru. Pro získání S a M částic byla směs sonifikována ultrazvukovou sondou po dobu 5 minut s amplitudou 20 až 35 %. Ze získaných emulzí bylo odpařeno organické rozpouštědlo, za sníženého tlaku a stálého míchání v Erlenmayerově baňce. Velikost částic se pohybovala od 0,587  $\mu\text{m}$  do 8,07  $\mu\text{m}$  v závislosti na druhu velikosti částic (S, M, L). Účinnost enkapsulace byla nejmenší u malých S částic obsahujících 5% enkapsulovaného MTZ a to 35,1 %. Nejvyšší účinnost enkapsulace byla u velkých L částic obsahujících 5 % enkapsulovaného MTZ a to 73,0 %. Při tomto testování bylo zjištěno, že rychlost uvolňování herbicidu se snižuje s rostoucí velikostí částic a s nižším obsahem enkapsulovaného herbicidu. Uvolňování probíhalo difúzním mechanismem u větších částic, a u menších částic docházelo k eroznímu uvolňování. [3]



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Materiál a přístrojové vybavení

#### 4.1.1 Látky pro přípravu nanočástic

- Polymlečná kyselina – PLA – biodegradabilní polymerní matrice (PLA 3251D In-geo, Naturework)
- Polyvinylalkohol –PVA – stabilizátor (Poval ® PVA 205, Kuraray, Japonsko)
- Dichlormethan - p.a.stabilizovaný ( $M_w = 84,93 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , IPL, Uherský Brod)
- Destilovaná voda
- Metazachlor – MTZ – aktivní látka ( $M_w = 278 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , Chemos, ČR)

#### 4.1.2 Látky pro uvolňovací testy

- Tris(hydroxymethyl)aminomethane ( $M_w = 121,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)
- Kyselina octová ledová ( $M_w = 60,05 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, USA)
- Destilovaná voda pro HPLC
- acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí v poměru určeném gradientem – mobilní fáze pro HPLC

#### 4.1.3 Přístrojové vybavení

- vysokorychlostní homogenizátor Ultra-turrax ® (T 18 Basic, IKA ®, Belgie)
- ultrazvukový homogenizátor SONOPULS HD 2200 (ULTRAZVUK, Hradec Kr.)
- magnetické míchadlo (RH Basic, IKA®, Belgie)
- vakuová pumpa Solid PTFE (KNF Laboport®, Neuberger, USA)
- Centrifuga Rotanta 460R (Hettich, Velká Británie)
- analyzátor částic Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK)
- lyofilizátor ScanVac (CoolSafe, Labo Gene, Dánsko)
- skenovací elektronový mikroskop (PHENOM PRO)
- optický mikroskop Olympus (CX31RBSF)
- FT-IR Spectrometr (Nicolet iS10, US)
- Autokláv LaM-MCS (SANOclav, Německo)
- Vysoceúčinný kapalinový chromatograf (Dionex Ultimate 3000, Německo)

- Analytická kolona s předkolonou ZORBAC RRHD Eclipse Plus C18 (3 x 50 mm, 1,8 µm), (Agilent Technologies, USA)

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Příprava 0,5 % roztoku PVA

Jako vnější vodná fáze při přípravě částic a zároveň jako stabilizátor emulze byl použit roztok polyvinylalkoholu (PVA).

Ve 100 ml odměrné baňce bylo smícháno 0,5 g PVA (Poval ® 205) s 50 ml destilované vody. Za pomoci magnetického míchadla a při teplotě 60°C bylo PVA rozpuštěno za stálého míchání po dobu 40 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl roztok doplněn destilovanou po rysku, promíchán a dále využit pro přípravu částic. Při přípravě částic slouží jako vnější vodná fáze

### 4.2.2 Příprava částic

#### Příprava čistých částic:

Čisté částice bez obsahu enkapsulovaného metazachloru byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla (O/V). Nejprve byla připravená organická fáze (O) rozpuštěním 100 mg PVA ve 100 µl dichlormethanu. K 10 ml této fáze bylo přidáno 100 ml 0,5 % předem připraveného roztoku PVA, který sloužil jako vodná fáze (V) a stabilizátor emulze. Vzniklá směs olej ve vodě (O/V) byla homogenizována pomocí vysokorychlostního homogenizátoru (Ultra TurraxT 18 Basic, IKA®, Belgie) při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut pro tvorbu velkých částic a při 24 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut pro tvorbu malých částic. Pro zjemnění emulze u malých částic byla využita i ultrasonifikace pomocí ultrazvukového homogenizátoru SONOPULS HD 2200 (ULTRAZVUK, Hradec Králové) při pulzaci 50% a amplitudě 100% po dobu 5 minut. Po dobu homogenizace a ultrasonifikace byly vzniklé emulze chlazeny ledovou tříští, aby bylo zabráněno předčasnému odpaření rozpouštědla (dichlormethan). Vzniklé emulze byly odpařeny za stálého míchání na magnetickém míchadle (RH Basic, IKA®, Belgie) pomocí vakuové odparky při 140 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě, po dobu dvou hodin. Následovalo oddělení vzniklých částic centrifugací při 4500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Po slití supernatantu byly částice dvakrát promyty 20 ml destilované vody. K promyтым částicím bylo přidá-

no 10 ml destilované vody a částice se nechaly lyofilizovat v lyofilizátoru ScanVac (Cool-Safe, Labo Gene, Dánsko). U připravených částic byla poté změřena velikost částic na přístroji Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK).

#### Příprava částic s enkapsulovaným MTZ

Pro přípravu částic byla opět využita metoda odpaření rozpouštědla (O/V). Nejprve bylo naváženo množství metazachloru, které odpovídalo jeho procentuálnímu zastoupení v částicích. Pro malé a velké částice bylo vždy váženo takové množství metazachloru aby odpovídalo 20 a 30 % použité navážky PLA, přičemž pro 40 % obsah metazachloru byly využity pouze velké částice. Navážky metazachloru byly smíchány s roztokem PLA a následující postup přípravy byl stejný jako při přípravě čistých částic. Všechny vytvořené částice byly charakterizovány a podrobeny elementární analýze.

*Tabulka 3 Parametry pro přípravu sub mikro a mikro částic.*

	Malé částice			Velké částice			
Teoretický obsah MTZ [%]	0	20	30	0	20	30	40
PLA [mg]	100						
Dichlormethan [ml]	1						
0,5 % PVA [ml]	100						
Rychlost homogenizace [otáček / minutu]	24 000			14 000			
Ultrazvuk [amplituda %]	100			0			

### 4.2.3 Příprava TRIS pufru pro uvolňovací testy

K přípravě pufru o molaritě 0,02 mol / l bylo zapotřebí destilované vody a chemikálií ve vysoké čistotě vhodných pro HPLC-MS. Nejprve bylo rozpuštěno 2,422 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu v destilované vodě a poté bylo pH upraveno na hodnotu 7 pomocí čisté kyseliny octové. Po úpravě pH byl roztok pufru vysterilizován v autoklávu.

## 4.3 Charakterizace částic

### 4.3.1 Velikost částic

Velikost částic menších jak 5  $\mu\text{m}$  byla změřena pomocí přístroje Zetasizer (Zetasizer nano ZS, Malvern Instruments). Měření funguje na principu dynamického rozptylu světla, kdy jemné částice a molekuly se pohybují Brownovým pohybem a rychlost tohoto pohybu je určena teplotou. K měření rychlosti se využívá laser. Intenzita rozptylu se mění v čase pro určitý úhel, což se detekuje pomocí lavinové fotodiody. Měření probíhá při 25°C třikrát vedle sebe. Kromě velikosti částic v nanometrech získáme polydisperzní index (PDI).

Velikost částic větších jak 5  $\mu\text{m}$  byla vyhodnocena pomocí softwaru ImageJ. Tento program byl využit také pro zjištění hodnot distribuce velikosti částic, které byly vyjádřeny jako polydisperzní index (PDI) a ke zjištění jejich průměrné velikosti  $Z_D$ . K vyhodnocení jsme použily fotografie (Obr. 8 a 9) získané pomocí optického a skenovacího elektronového mikroskopu (PHENOM PRO), pomocí kterého byla určena také morfologie částic.

### 4.3.2 Polydisperzní index

Polydisperzní index (PDI) byl vypočítán jako podíl standardní odchylky  $\sigma$  a průměrné velikosti  $Z_D$  (Tab. 5). U malých částic byl PDI vypočten ze stanoveného hydrodynamického průměru ( $Z_D$ ), u velkých částic pak z průměrné velikosti částic stanovené obrazovou analýzou.

$$PDI = \left( \frac{\sigma}{Z_D} \right)^2 \quad (5)$$

### 4.3.3 Morfologie částic

Morfologie částic byla určena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu - SEM (PHENOM PRO). Tato metoda nachází využití pro charakterizaci heterogenních organických i anorganických materiálů a to v řádu nanometrů až mikrometrů. Pracuje při zvětšení 10 až 30 000x v prostředí vakua. Pomocí SEM je možno zobrazit povrch molekul. Funguje na principu detekce rozptýlených a vyražených elektronů z povrchu vzorku. Vzorek byl před samotným pozorováním nanesen na hliníkový hříb a poté pozorován při zvětšení při zvětšení 3000x a 50000x pomocí BSE detektoru měřící zpětně odražené elektrony

### 4.3.4 Stanovení účinnosti enkapsulace MTZ (EE) a plnění částic MTZ (HL)

Pro výpočet účinnosti enkapsulace bylo nejprve nutné vzorky podrobit elementární analýze v Thermo Electron Corp a zjistit procentuální zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku. Ze získaných výsledků bylo poté ze soustavy tří rovnic o třech neznámých (rovnice 6) vypočítáno procentuální zastoupení PLA, PVA a metazachloru (herbicidní plnění částic) ve všech připravených sériích částic s enkapsulovaným metazachlorem. Přepočtem byl účinnost enkapsulace (EE).

#### Výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých látek v připravených částicích

Tabulka 4 Parametry pro výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých látek

	Sumární vzorec	Molární hmotnost [g.mol <sup>-1</sup> ]	C [%]	H [%]	O [%]	N [%]
PLA	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	72,06	0,4995	0,0555	0,4441	---
PVA	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	44	0,5455	0,0909	0,3636	---
MTZ	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O	277,75	0,6049	0,0576	---	0,1512

$$C: 51,35 = 49,95x + 54,55y + 60,49z$$

$$H: 5,73 = 5,55x + 9,09y + 5,76z$$

(6)

$$N: 0,89 = 15,12z$$

Příklad:

Výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých látek v malých částicích s 20 % MTZ

Výsledky elementární analýzy částic obsahující 20% zapouzdřeného metazachloru:

$$C = 51,35 \% ; H = 5,73 \% ; N = 0,89\%N: \quad z = 0,89 / 15,12$$

$$N: \quad z = \mathbf{0,0589} \rightarrow \mathbf{5,89 \% MTZ}$$

$$C: \quad 51,35 = 49,95x + 54,55y + 60,49 * 0,0589$$

$$H: \quad 5,73 = 5,55x + 9,09y + 5,76 * 0,0589$$

---


$$C: \quad 47,79 = 49,95x + 54,55y$$

$$H: \quad 5,73 = 5,55x + 9,09y \rightarrow y = \frac{5,39 - 5,55x}{9,04}$$

$$C: \quad 47,79 = 49,95x + 54,55 * \frac{5,39 - 5,55x}{9,04}$$

$$C: \quad 15,14 = 16,64x$$

$$x = 15,14 / 16,64$$

$$x = \mathbf{0,9279} \rightarrow \mathbf{92,79 \% PLA}$$

$$H: \quad y = \frac{5,39 - 5,55 * 0,9279}{9,04}$$

$$y = \mathbf{0,0264} \rightarrow \mathbf{2,64 \% PVA}$$

#### 4.4 Herbicidní plnění (Herbicid loading, HL)

Herbicidní plnění neboli plnění částic herbicidem se definuje jako množství zapouzdřeného metazachloru děleno konečnou hmotností částic se zapouzdřeným metazachlorem na konci procesu.

$$HL (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného steroidu}}{\text{hmotnost částic}} \cdot 100 \quad (7)$$

#### 4.5 Účinnost enkapsulace

Účinnost procesu enkapsulace (EE) byla definována jako poměr mezi hmotností zapouzdřeného herbicidu k jeho celkové hmotnosti na začátku procesu.

K výpočtu účinnosti enkapsulace lze využít rovnice (8):

$$EE (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného steroidu}}{\text{počáteční hmotnost steroidu}} \cdot 100 \quad (8)$$

#### 4.6 Uvolňovací testy

Testy uvolňování metazachloru enkapsulovaného v polymerních částicích bylo prováděno dvojím způsobem. A to uvolňování v lahvičkách, a poté uvolňování ve zkumavkách. Pro testování bylo zapotřebí nejprve připravit tzv. TRIS – pufr, do kterého se enkapsulovaný metazachlor uvolňoval.

#### 4.7 Uvolňování v lahvičkách

Pro testování byly použity 100 ml uzavíratelné skleněné lahvičky. Opět zde bylo naváženo takové množství částic, aby odpovídalo obsahu 50 mg  $\cdot$  l<sup>-1</sup> čistého metazachloru. Uvolňování probíhalo v 50 ml připraveného TRIS pufru. Lahvičky byly umístěny na třepačku a opět docházelo za stálého míchání k uvolňování enkapsulovaného metazachloru. Uvolňování probíhalo v temné místnosti, kde byla udržována stálá teplota 20°C. Z lahviček bylo ve vhodných intervalech odebíráno mikropipetou 1,5 ml usazeného roztoku, který byl ihned přefiltrován a uschován v lednici až do analýzy na HPLC-MS. Do lahviček se poté doplnilo 1,5 ml čistého pufru a byly znova umístěny na třepačku.



## 4.8 Uvolňování ve zkumavkách

Testování bylo prováděno v plastových zkumavkách určených pro odstředivku. Do těchto zkumavek bylo naváženo množství částic odpovídající obsahu 1 mg čistého metazachloru. K navážce částic bylo přidáno 10 ml připraveného TRIS pufru. Zkumavky byly poté umístěny na třepačku a za stálého míchání docházelo k uvolňování enkapsulovaného metazachloru. Uvolňování probíhalo v temné místnosti, kde byla udržována stálá teplota 20°C. Vzorky byly odebírány v určitých časových intervalech. První odběr byl proveden po hodině a následně se odběry prováděly jedenkrát denně. Před každým odběrem vzorku byly roztoky ve zkumavkách odstředěny a odebrán celkový objem roztoku. Část roztoku byla poté přefiltrována a uschována v lednici až do analýzy na HPLC-MS (Dionex Ultimate 3000, Německo). K odstředěným částicím bylo přidáno 10 ml čistého pufru a opět byly zkumavky umístěny na třepačku.

## 4.9 HPLC – MS

Pro stanovení nenavázaného MTZ z uvolňovacích testů byla využita analytická metoda ultra účinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem (HPLC – MS). Bylo vycházeno z práce autorů Montoro, E. P. *et al*, kteří se zabývali stanovením herbicidů ve vodě [56].

Analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu Dionex Ultimate 3000 (Německo) na analytické koloně ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (3 x 50 mm, 1,8 µm), Agilent Technologies (USA). Chromatografická separace proběhla pomocí gradientové eluce s mobilní fází sestávající se z 0,1 % kyseliny mravenčí (A) a acetonitrilu (B). Analýza začínala s 20 % eluentu B, který byl lineárně zvýšen na 75% během 2 minut a pak dále na 90 % během další minuty. Toto složení bylo udržováno po dobu 2 minut, než byl poměr eluentu B navrácen na 20 % během 2 minut s následnými 3 minutami pro ekvilibraci tlaku v koloně. Průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 0,25 ml·min<sup>-1</sup> po celých 10 minut analýzy. Teplota analytické kolony byla 40 °C a nástřik vzorku na kolonu 1 µl. Za těchto podmínek byl retenční čas MTZ 3,98 min.

Tandemová hmotnostně spektrometrická analýza byla provedena pomocí přístroje API 2000 od firmy AB Sciex (USA) využívajícího ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu. Parametry byly optimalizovány pomocí metody přímého nástřiku standardu o koncentraci 5 mg·l<sup>-1</sup> a byly určeny na hodnoty: napětí na kapiláře 5,0 kV, teplota iontového zdroje

350°C, deklasterační potenciál 6,0 V, fokusační potenciál 300,0 V, vstupní potenciál 5,0 V, kolizní energie 20,0 V; výstupní potenciál z kolizní cely 5,0 V. Ostatní parametry byly ponechány defaultně nastavené výrobcem. Kolizně indukovaná disociace na specifické fragmenty MTZ ve skenovacím módu MRM (*MultipleReaction Monitoring*) byla provedena za využití dusíku jako kolizního plynu. Pro analýzu byly vybrány 2 specifické fragmenty, iont 277,900/210,200 pro kvantifikaci a iont 277,900/134,200 pro identifikaci sloučeniny.

#### 4.10 FTIR - ATR

Fourierova transformační infračervená spektrometrie zeslabené totální reflektance byla použita pro měření spekter na přístroji Nicolet IS10 opatřeném ZnSe (zinek-selenidovým) krystalem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Celkový odraz světla od povrchu byl měřen v rozsahu vlnové délky 500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Každé spektrum se skládalo ze 64 skenů s spektrálním rozlišením 2  $\text{cm}^{-1}$ . Spektra byly využity jako podpůrný důkaz o zapouzdření metazachloru do částic a jako důkaz jeho následného uvolnění. Vyhodnoceny byly částice obsahující zapouzdřený metazachlor, čisté částice a částice po uvolňovacích testech s 20 % metazachloru.

#### 4.11 TESTOVÁNÍ VLIVU METAZACHLORU VE FORMĚ NANOČÁSTIC NA KLÍČIVOST SEMEN

Kromě uvolňovacích testů byly připravené částice testovány také přímo na cílových a necílových rostlinách. Pro testování cílových skupin plevelnatých rostlin byly vybrány rostliny druhu *Echinochloa crus-galli* (ježatka kuří-noha) a vlčí mák.

Testy byly prováděny na plastových Petriho miskách, do kterých byl vložen filtrační papír. Na filtrační papír bylo nadávkováno buď 10 ml roztoku metazachloru, ekvivalentní množství částic obsahující 20, 30 a 40% enkapsulovaného metazachloru a to o povolené maximální aplikační koncentraci MTZ 90 mg · l<sup>-1</sup>. Pomocí pinzety bylo na Petriho misky rovnoměrně rozmístěno 30 semen vybraného druhu rostliny. Uzavřené Petriho misky, byly ponechány po dobu 72– 168 hod., v závislosti na druhu semen, v temné místnosti bez přístupu světla a při stálé teplotě 20°C. Po 72 – 168 hodinách byly zaznamenány délky všech kořínků a počet nevyklíčených semen, které byly počítány jako semena s nulovou délkou kořínku. Pokud byla semena vyklíčená, ale nebyl patrný kořínek, byla hodnota započítána taktéž jako nulová. Z hodnot se poté vypočítal aritmetický průměr, který byl použit pro výpočet inhibice růstu kořene v testovaných aktivních látkách oproti kontrolním miskám bez aktivních látek. [43] Testování klíčivosti a její inhibice u cílových rostlin byla prováděna po dobu 168 hodin pro vlčí mák 120 hodin pro ježatku. Dále byl stanoven růstový faktor RD [57], k jeho výpočtu bylo zapotřebí znát dobu, po kterou vyrostlo alespoň 50 % klíčků nad 2 mm, což je považováno za vyklíčené semínko. Tento způsob testování byl zvolen, jelikož aplikace metazachloru jako herbicidní látky se provádí preemergentně, neboli před vzejitím klíčků.

Pro výpočet inhibice klíčení byla použita následující rovnice (9) :

$$li = \frac{Lc - Lv}{Lc} * 100 \quad (9)$$

Kde:  $li$  je inhibice růstu kořene [%],  $Lc$  značí průměrnou délku kořene v miskách bez aktivní látky v [mm],  $Lv$  je průměrná délka kořene v miskách s aktivní látkou [mm]. [43]

Pro výpočet rychlosti růstu klíčků byla použita rovnice (10):

$$RD = \frac{1}{D_{50}} \quad (10)$$

Kde:  $RD$  je značení pro rychlost růstu,  $D_{50}$  značí dobu, za kterou narostlo 50 % klíčků nad 2 mm v [hod]. [57]

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Charakterizace částic

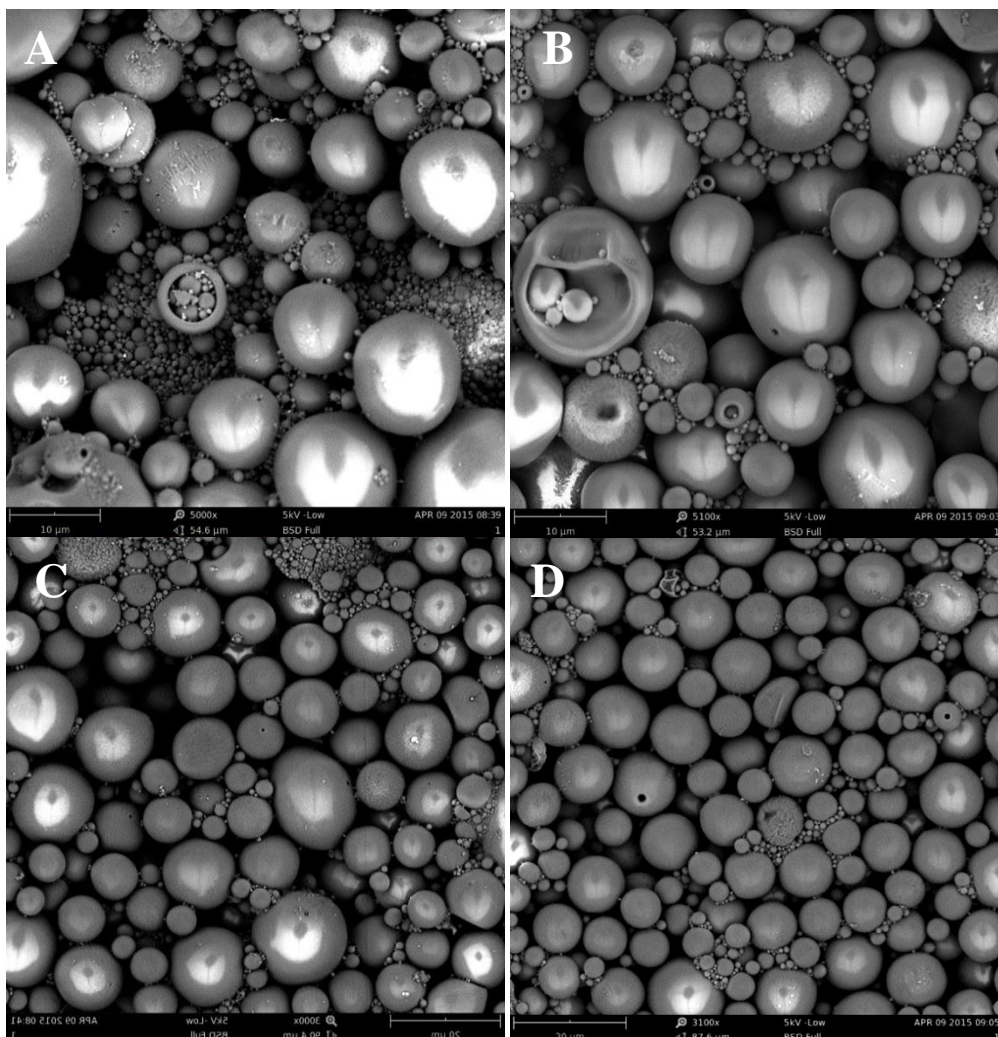
Z analýzy velikosti částic bylo zjištěno, že se velikost malých částic pohybuje v rozmezí od 403,6 nm do 454,2 nm. Tato velikost odpovídá submikro částicím. U velkých částic se velikost pohybovala v rozmezí od 8786 nm do 9851 nm. Pro jednotlivá plnění (HL) se velikost malých submikro částic příliš neliší a lze tudíž říci, že množství enkapsulovaného herbicidu nemá na velikost malých částic vliv. U větších částic byla velikost pro jednotlivá plnění viditelně odlišná. Polydisperzní index malých částic byl oproti velkým částicím značně větší. Na povrchu částic zůstávalo 0,6 – 7,08 % PVA. Při srovnání částic se stejným počátečním množstvím MTZ bylo množství PVA na povrchu částic obecně vyšší pro menší částice pravděpodobně z důvodu jejich většího aktivního povrchu. Zůstatek PVA byl zjišťován z důvodu jeho vlivu na smáčivost částic. Čím více PVA částice obsahují, tím lépe by mohl být jejich povrch smáčen, což by mohlo mít vliv na rychlost uvolňování enkapsulovaného herbicidu. Účinnost enkapsulace byla nejvyšší u částic s plněním 30 % a to jak u malých tak velkých částic. U částic bez obsahu metazachloru nebyla z časových důvodů stanovena elementární analýza a proto nebyly vypočítány zůstatky PVA. Částice o obsahu 40 % MTZ byly připraveny pouze ve formě velkých částic. Malé částice s 40 % MTZ se nepodařilo připravit pravděpodobně z důvodu nedostatečného množství PLA k poměru MTZ, které je pro vznik částic potřebný.

Tabulka 5 Parametry získané výpočtem z hodnot elementární analýzy malých a velkých částic, skenovacího elektronového mikroskopu, softwaru IImage, přístroji ZetaSizer.

	Malé částice			Velké částice			
	0	20	30	0	20	30	40
MTZ [%]	0	20	30	0	20	30	40
Velikost částic [nm]	408,0	403,6	454,2	8786	9093	9037	9851
Poly-disperzní index	0,281	0,343	0,328	0,055	0,122	0,028	0,098
Zůstatek PVA [%]	---	2,64	7,08	---	1,87	5,38	0,6
Plnění HL [%]	---	5,88	19,38	---	47,60	21,03	21,83
Účinnost enkapsulace [%]	---	33,27	84	---	47,60	91,16	76,39

### 5.1.1 Morfologie částic

Na Obr. 8 jsou vyobrazeny fotografie ze SEM námi připravených částic. Jak je možné pozorovat, částice mají kulovitý tvar a hladký povrch. Na povrchu nejsou znatelné žádné póry, které by mohli vzniknout po dvojitým promytí při jejich přípravě, kdy byl z povrchu odstraněn nadbytečný metazachlor. Charakteristika částic pomocí SEM byla využita pouze pro velké částice. Malé částice nebyly pozorovány z důvodu jejich rychlé degradace v toku elektronů. Dříve než bylo možné fotografii pořídít a zaostřit, došlo k jejich značné degradaci.

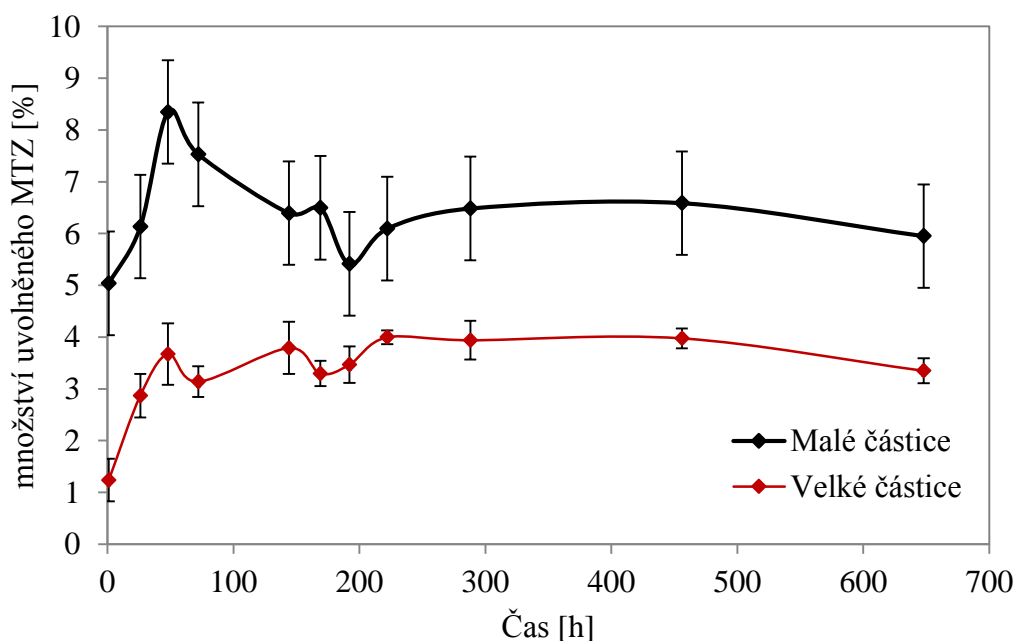


Obr. 8 A - velké částice s 20 % MTZ při 5000 x zvětšení, B - 3000 x zvětšení.  
C – velké částice s 30 % MTZ při 5000 x zvětšení, D - 3000 x zvětšení.

## 5.2 Uvolňovací testy

### 5.2.1 Uvolňování v lahvičkách

Jako první testování bylo zvoleno uvolňování v lahvičkách. Na Obr. 11 je vyobrazen uvolňovací profil malých a velkých částic obsahujících 20 % enkapsulovaného metazachloru, kde můžeme vidět zmiňovaný pokles a stagnaci růstu koncentrace uvolňovaného MTZ v pufracím roztoku. Jak je však patrné z uvolňovací křivky, toto testování se ukázalo jako ne příliš vhodné. Místo zvyšování koncentrace uvolněného metazachloru docházelo postupem času k úbytku jeho koncentrace a následně k její stagnaci. První negativum u toho testování byla možnost částečného úbytku částic při odběru vzorků, i přes to, že byly lahvičky prvně ponechány v klidu, aby mohlo dojít k sedimentaci částic. Dalším negativem při tomto testování bylo to, že nemohl být použit azid sodný jako konzervační činidlo. Azid sodný nemohl být použit z důvodu možného poškození hmotnostního spektrometru. Absence tohoto konzervačního činidla, mohla způsobit nárůst mikro organismů, které využívají uvolňující se metazachlor jako zdroj dusíku pro svůj metabolismus. Další vliv na klesající koncentraci metazachloru by mohla mít také hydrolýza.



Obr. 9 Uvolňovací profil malých a velkých částic obsahující 20% enkapsulovaného metazachloru v prostředí TRIS - pufru ve skleněných uzavíratelných lahvičkách při teplotě 20°C za stálého míchání na třepačce.



### 5.2.2 Uvolňování ve zkumavkách

Jako první byly testovány malé a velké částice obsahující 20 % enkapsulovaného MTZ. Z uvolňovacího profilu na Obr. 12 bylo zjištěno, že k uvolňování MTZ z PLA částic dochází ve dvou fázích lišících se jeho rychlostí. V první fázi je nejdříve patrné rychlejší uvolňování metazachloru, které postupně přechází v druhou fázi charakterizovanou pomalejším uvolňovacím profilem, kdy jsou uvolňovány nižší koncentrace MTZ. Jako první byl uvolňován MTZ, který se vyskytoval blíže povrchu částic a poté byl uvolňován MTZ, který se vyskytoval blíže středu částic a pro jeho uvolnění musel nejprve vydifundovat k povrchu částic.

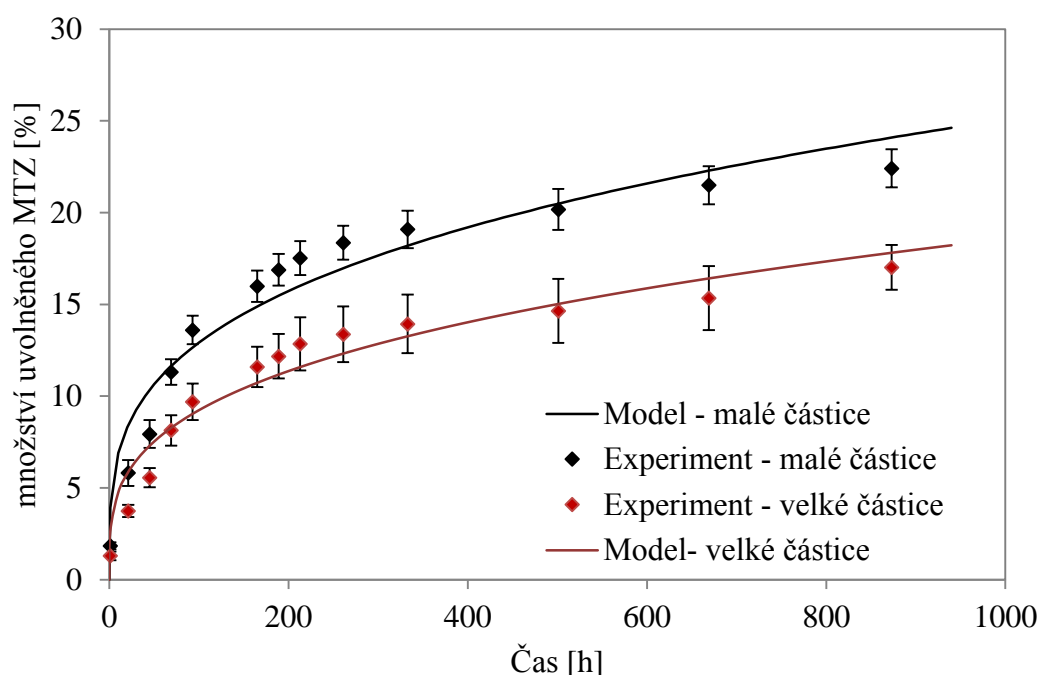
Získané hodnoty byly analyzovány Korsmeyer-Peppas modelem pomocí regresní metody nejmenších čtverců (Tabulka 6). Jak již bylo řečeno (viz. Kapitola X),  $n$  je exponent uvolňování,  $K$  je rychlostní konstanta,  $C$  vyjadřuje počáteční uvolnění MTZ. Nízké hodnoty difúzního parametru „ $n$ “ ( $n=0,43$ )[3] nám říkají, že uvolňování probíhalo spíše difúzním mechanismem. Nejvíce se modelovému mechanismu difúzního uvolňování blížily částice s 40 % MTZ.

Nízké hodnoty parametru  $C$  potvrzují odstranění nežádoucího „burst efektu“. Nejnížší hodnoty byly zjištěny u velkých částic s obsahem 20 % MTZ.

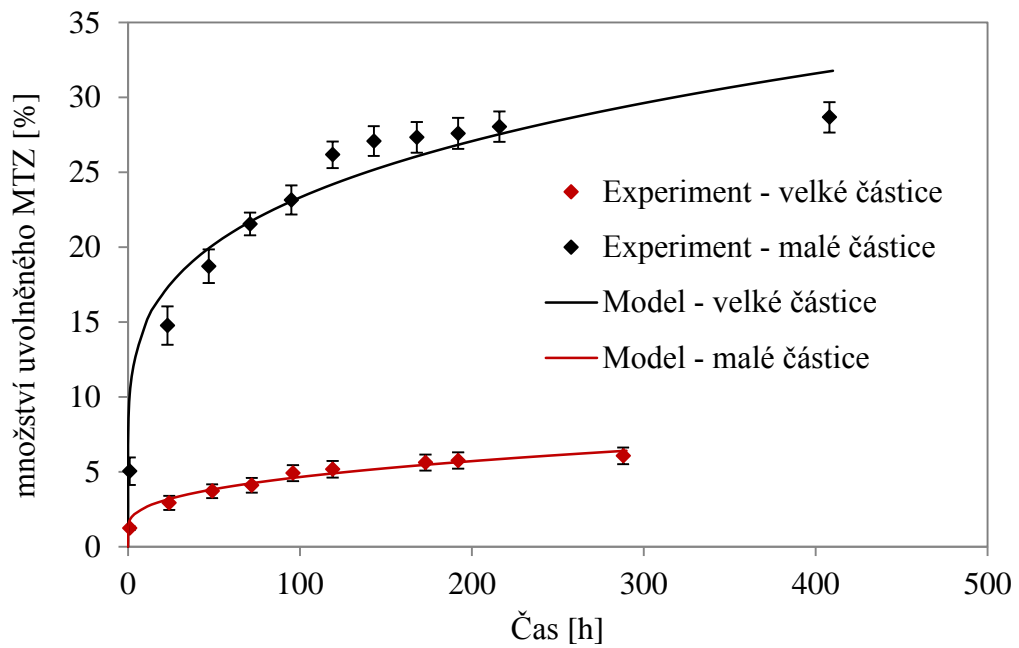
Dalším stanoveným parametrem byla kinetická konstanta  $K$ , která se značně liší v závislosti na formulačních parametrech částic. Nejnížší je u velkých částic s 30 % MTZ. Z grafu na Obr. 13. můžeme vidět, že u velkých částic došlo k uvolnění velmi nízkých koncentrací MTZ oproti malým částicím s 30%. Porovnáme-li uvolňovací profil velkých částic, které obsahovaly 30 % MTZ s velkými částicemi o obsahu 20 % MTZ, zjistíme, že rozdíl je dvojnásobný. Kinetická konstanta je v tomto porovnání u velkých částic s 20 % dokonce více jak 3x vyšší než u velkých částic s 30 %. Toto zjištění neodpovídá předpokladu, že při stejné velikosti částic by mělo docházet k rychlejšímu uvolňování aktivní látky u částic s vyšším plněním. Kromě možnosti ovlivnění difúzní kinetiky množstvím enkapsulovaného MTZ, mohl být tento jev také zapříčiněn možným úbytkem částic, a to jejich odebráním spolu s odebíraným roztokem. Velké částice oproti malým hůře sedimentovaly a i po odstředění byly náchylné k rychlému rozptýlení vlivem manipulace se zkumavkami. I přes opatrnou manipulaci tak mohlo docházet k mírnému rozptýlení částic a následně k jejich odběru. Další možností tak velkého rozdílu koncentrací by mohla být kontaminace vzorků mikroorganismy. Tato příčina by měla být málo pravděpodobná z důvodu důkladné sterilace veškerého laboratorního materiálu, kterého bylo při testování využito. Nejrychlejš-

ší kinetiku uvolňování měly malé částice s 30 % MTZ, což je dáno jejich vysokým plněním a aktivním povrchem. Tato skutečnost je ilustrována nejvyšší hodnotou kinetické konstanty  $K$  a lze ji taktéž vidět i na obr. 13. Uvolňovací profil částic obsahující 40 % enkapsulovaného MTZ se příliš neliší od profilu s 20 %. Ze získaných výsledků můžeme říci, že nejlepšího uvolňovacího profilu bylo dosaženo u částic s 20 % enkapsulovaného metazachloru

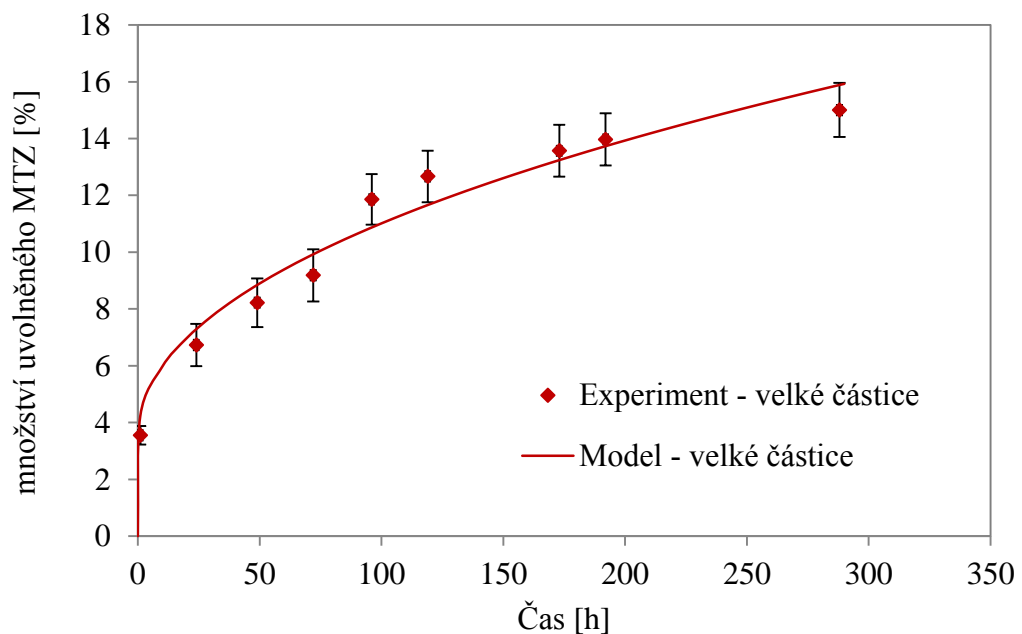
Z vysokých hodnot korelačního parametru  $R$  můžeme získané experimentální data považovat za statisticky významné. Parametr  $t_{50}$  nám potom říká, za jak dlouho by došlo k uvolnění 50 % enkapsulovaného metazachloru modelovým uvolňovacím mechanismem. Při zhodnocení tohoto parametru je nutné brát v potaz, že modelový mechanismus uvolňování nepočítá s tím, že byl využit pro přípravu polymerních částic biodegradabilní materiál. K uvolnění 50 % MTZ by v reálných podmínkách došlo mnohem dříve a to vlivem dřívějšího rozpadu polymerní matrice.



Obr. 10 Grafické vyjádření uvolňovacího profilu metazachloru malých a velkých částic s 20% MTZ v prostředí TRIS – pufry ve zkumavkách, při teplotě 20°C za stálého míchání na třepače. Porovnání s modelovou křivkou.



Obr. 11 Grafické vyjádření uvolňovacího profilu metazachloru malých a velkých částic s 30% MTZ v prostředí TRIS - pufru ve zkumavkách, při teplotě 20°C za stálého míchání na třepačce.



Obr. 12 Grafické vyjádření uvolňovacího profilu metazachloru velkých částic s 40% MTZ v prostředí TRIS - pufru ve zkumavkách, při teplotě 20°C za stálého míchání na třepačce.

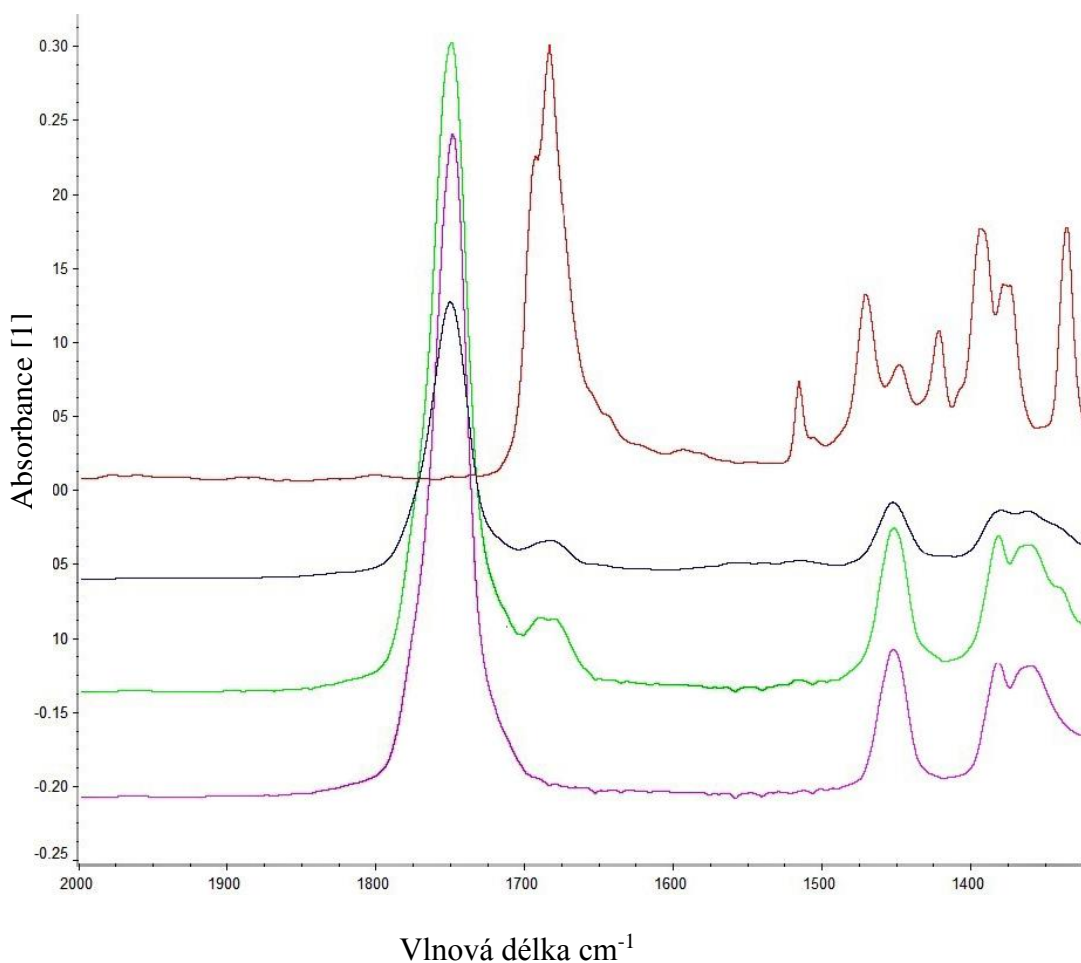
Tabulka 6 Parametry uvolňovací křivky, získané regresní metodou nejmenších čtverců

Parametry	Malé částice		Velké částice		
	20	30	20	30	40
Obsah MTZ [%]	20	30	20	30	40
C [ $10^{-2}$ ]	0,981	4,633	0,598	1,176	3,320
K [ $10^{-2}$ ]	2,932	5,517	1,994	0,594	0,908
n	0,305	0,265	0,318	0,384	0,464
R	0,977	0,950	0,975	0,981	0,966
t <sub>50</sub> [den]	428,75	119	998,74	4051	203

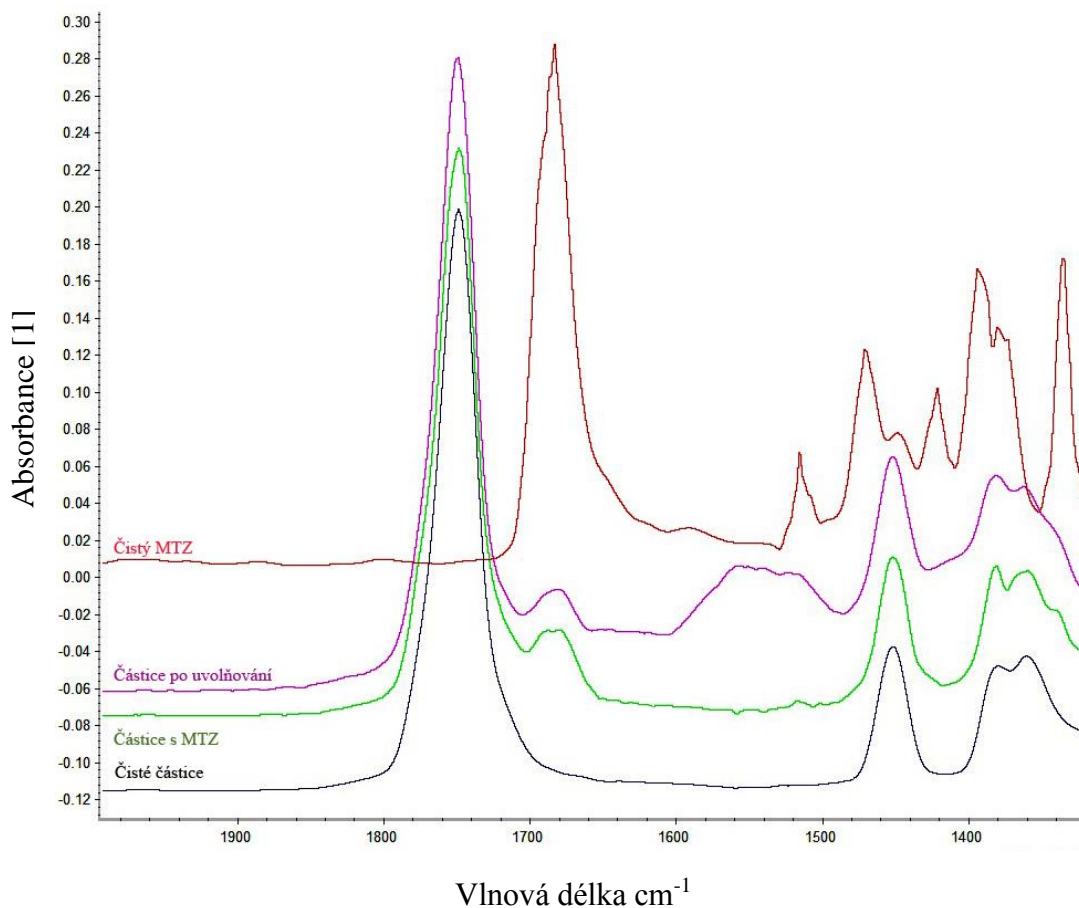
### 5.2.3 FTIR -ATR

Spektrum PLA byla charakterizována typickým signálem píku při vlnové délce  $1751\text{ cm}^{-1}$  a odpovídajícího esterovým vazbám (C=O). Spektrum MTZ měřené při  $1685\text{ cm}^{-1}$  odpovídá karbonylovému píku, který je typický pro jeho amidové vazby. [39, 40,41, 42]

Touto metodou byly charakterizovány pouze částice o obsahu 20 % MTZ. Další vzorky nebyly charakterizovány z důvodu nedostatečného množství vzorku, po uvolňovacích testech, pro analýzu. Na spektrech z uvolněných částic je patrný pokles metazachloru, který nám slouží jako důkaz uvolnění MTZ. To že v částicích i na konci testování zůstala zbytková část MTZ značí, že pro její uvolnění je zapotřebí delšího času vyluhování, jak je patrné z uvolňovacích profilů.



Obr. 13 Absorpční spektra částic a látek před a po enkapsulaci MTZ, a následně před a po uvolňovacích testech pro malé částice s 20 % MTZ



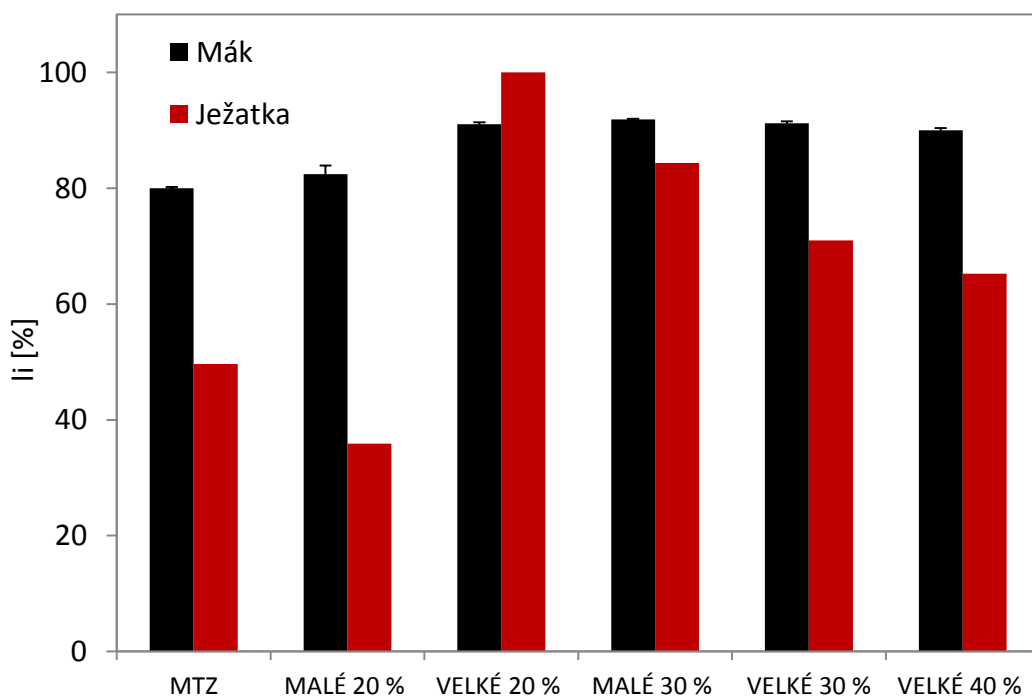
Obr. 14 Absorpční spektra částic a látek před a po enkapsulaci MTZ, a následně před a po uvolňovacích testech pro velké částice s 20 % MTZ

### 5.3 Testování vlivu částic na cílové rostliny

V případě cílových rostlin musela být doba testování prodloužena ze 72 hodin na 120 hodin u Ježatky a na 168 hodin u máku, jelikož během této doby (72 hod.) nedošlo k naklíčení semen ani bez obsahu herbicidu.

Testováním klíčivosti bylo zjištěno, že nejvyšší účinek inhibice na cílové rostliny měly částice obsahující 20 a 30 % enkapsulovaného metazachloru. U plevelu druhu *Echinochloa* byla inhibice po 120 hodinách pro velké částice s 20 % MTZ 100%. Nejnižší účinnost inhibice měly pro hořčici malé částice s 20 % MTZ (Tab. 7). Toto testování bylo však nutné provést dvakrát. Při prvním testování vůbec nedošlo k naklíčení plevelu druhu *Echinochloa*

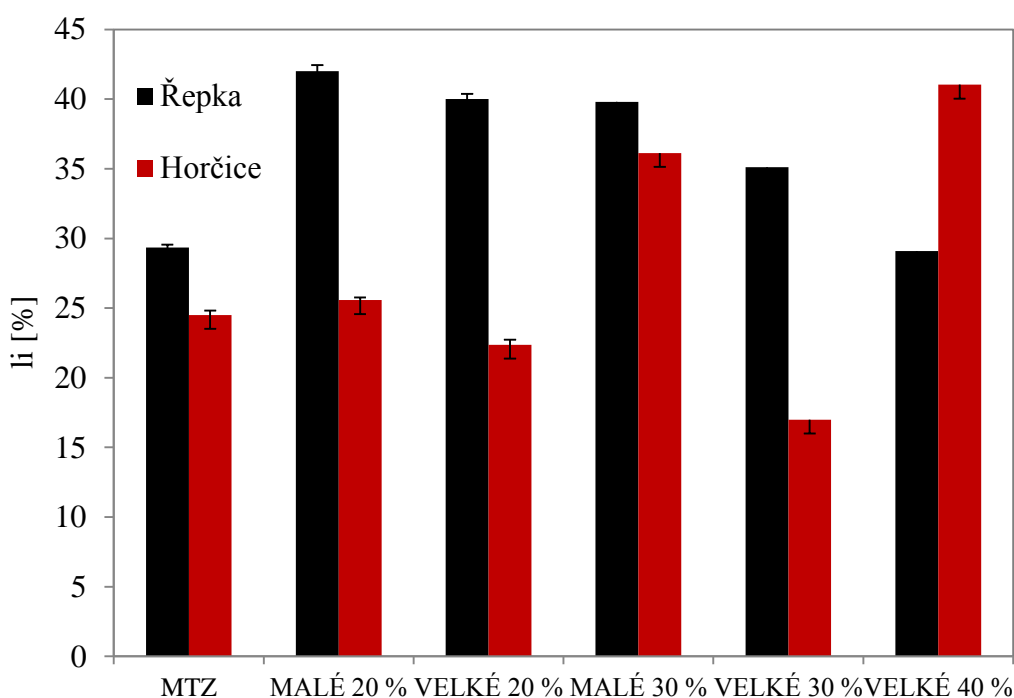
ani po 120 hodinách. Během 72 hodin došlo také k nárůstu plísňe u většiny semen. Poté byly testovány jiná semena tohoto druhu plevele, u kterých již klíčivost mohla být stanovena. Tímto můžeme říci, že testování klíčivosti je velmi individuální faktor. I přes dodržení vhodných podmínek jako je teplota, světlo a dostatečná vlhkost nebylo možné odhadnout kvalitu semen. Doba testování klíčivosti u vlčího máku byla prodloužena na 168 hodin. Po této době se inhibice růstu pohybovala v rozmezí 80 – 92 %. Nejvyšší účinnost inhibice vykazovaly malé a velké částice se 30 % enkapsulovaného MTZ, což odpovídá nejvyššímu množství enkapsulovaného herbicidu. Nejnižší účinnost inhibice na vlčí mák měl čistý roztok metazachloru (Tab. 7), což mohlo být způsobeno právě jeho rychlou degradací. Na obr. 17 lze vidět porovnání ježatky bez obsahu metazachloru a ježatky, na kterou byly aplikovány velké částice s obsahem 20 % MTZ. Z tohoto obrázku lze názorně vidět, jakých bylo dosaženo výsledků.



Obr. 15 Grafické porovnání inhibice klíčení (li) na cílové rostliny – vlčí mák a Ježatku (*Echinochloa crus-galli*).

#### 5.4 Testování vlivu částic na necílové rostliny

Enkapsulovaný metazachlor, má kromě vyšší inhibice u cílových rostlin také nepatrně vyšší inhibiční vliv na necílové rostliny a to v jejich počátečním klíčení. Rozdíly inhibice byly různé pro hořčici a řepku a to jak v závislosti na velikosti částic tak i na obsahu metazachloru. Nejvyšší inhibici u hořčice měly částice obsahující 40 % enkapsulovaného MTZ. U velkých částic s 20 a 30 % MTZ byla inhibice u hořčice dokonce nižší jak u samotného MTZ (Tab. 8), což je pozitivní efekt plněných částic MTZ na necílové rostliny U řepky byla inhibice přibližně u všech částic stejná, a vyjma částic s 40 % MTZ byla inhibice o 10 % vyšší oproti samotnému MTZ (Obr. 16). Nutno dodat, že docházelo pouze k pozdějšímu naklíčení a nikoliv usmrcení semen. Růst hořčice a řepky byl sledován i po 72 hodinách testování a zhruba po 96 hodinách došlo k naklíčení zelené natě u obou plodin (Obr. 18 a 19). To do jaké míry částice s enkapsulovaným metazachlorem ovlivňují celkový růst plodin, by bylo nutné dále otestovat v reálných podmínkách.



Obr. 16 Grafické porovnání inhibice klíčení (li) na necílové rostliny – řepku a hořčici.



Tabulka 7 Inhibice klíčení a růstový faktor pro cílové rostliny, na které byl aplikován selektivní herbicid v čisté a enkapsulované formě.

		Inhibice klíčení [%]					
	Bez MTZ	MTZ	MALÉ 20 %	VELKÉ 20 %	MALÉ 30 %	VELKÉ 30 %	VELKÉ 40 %
Mák	---	80	82,46	91,05	91,9	91,2	90
Ježatka	---	49,66	35,9	100	84,35	70,97	65,24

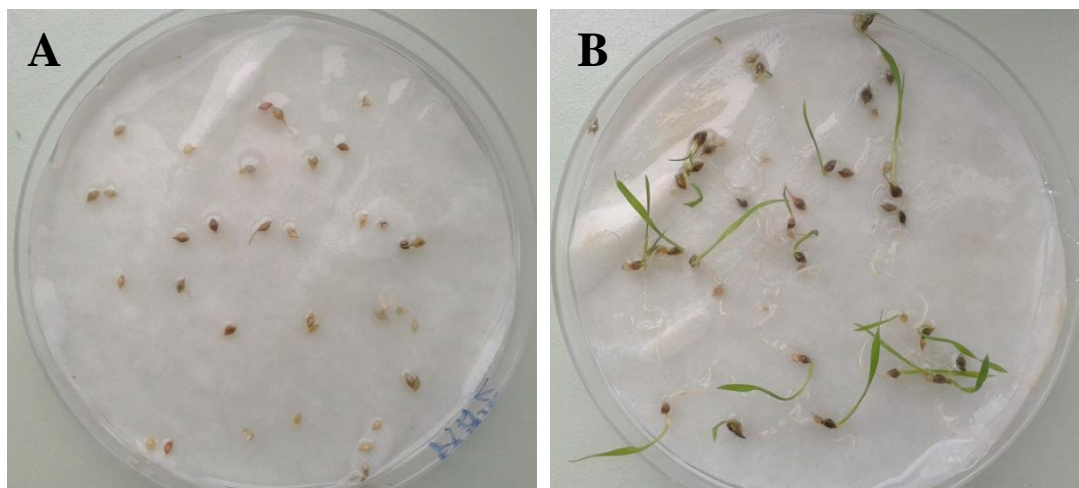
		RD [hod]					
	Bez MTZ	MTZ	MALÉ 20 %	VELKÉ 20 %	MALÉ 30 %	VELKÉ 30 %	VELKÉ 40 %
Mák	0,0100	0,0026	0,0044	0,0104	0,0020	0,0024	0,0029
Ježatka	0,0091	0,007	0,0068	0	0,0021	0,0043	0,0036

Tabulka 8 Inhibice klíčení a růstový faktor pro necílové rostliny, na které byl aplikován selektivní herbicid v čisté a enkapsulované formě.

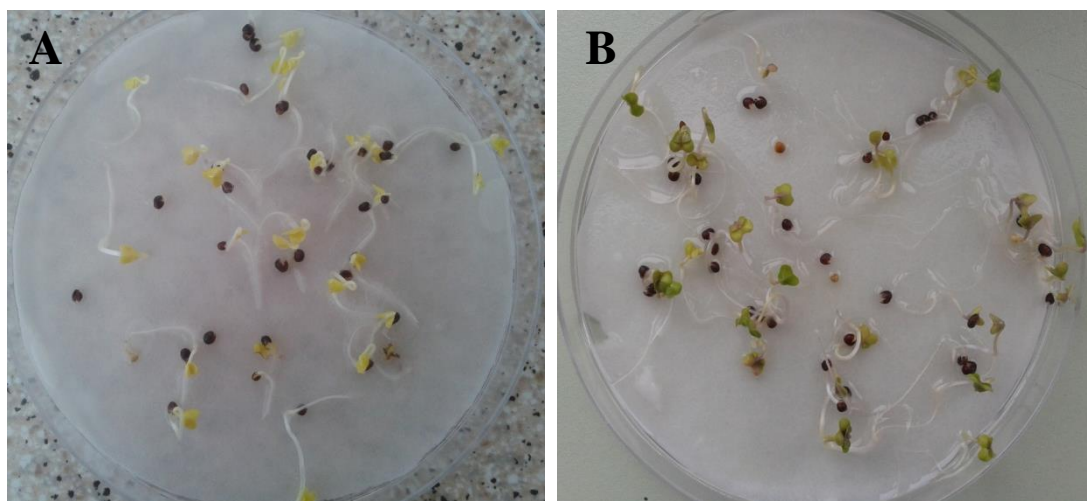
		Inhibice klíčení [%]					
	Bez MTZ	MTZ	MALÉ 20 %	VELKÉ 20 %	MALÉ 30 %	VELKÉ 30 %	VELKÉ 40 %
Řepka	---	29,35	42	40	39,8	35,11	29,10
Hořčice	---	24,50	25,57	22,37	36,13	16,99	41,03

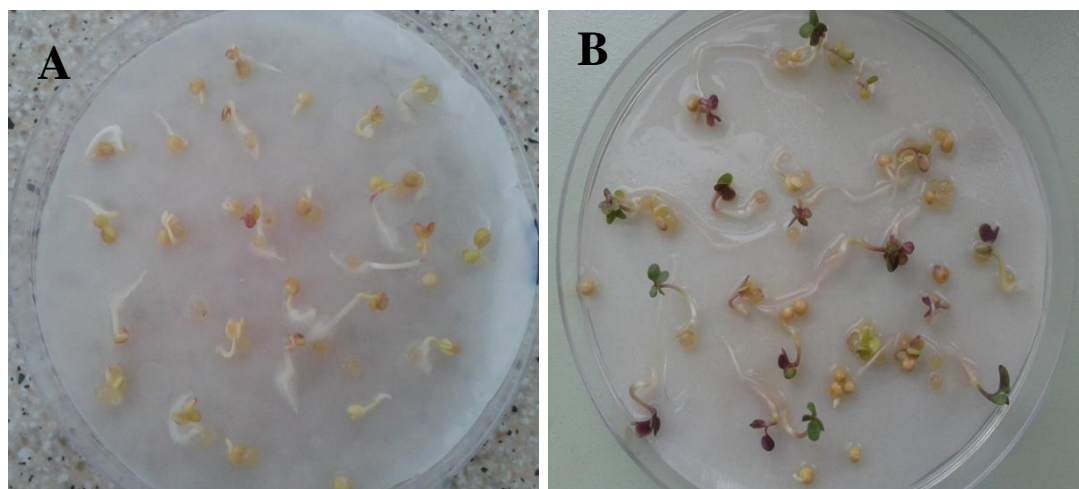
		RD [hod]					
	Bez MTZ	MTZ	MALÉ 20 %	VELKÉ 20 %	MALÉ 30 %	VELKÉ 30 %	VELKÉ 40 %
Řepka	0,0833	0,0769	0,0476	0,0476	0,0269	0,0278	0,0278
Horčice	0,0417	0,0385	0,0286	0,0286	0,0214	0,0225	0,0228



Obr. 17 Semena ježatky (*Echinochloa*). A – po 120 hodinách s velkými částicemi o obsahu 20 % MTZ, B – po 144 hodinách bez přídavku MTZ.



Obr. 18 Naklíčená semena řepky s malými částicemi o obsahu 30 % MTZ. A – po 72 hodinách, B – po 96 hodinách.



Obr. 19 Naklíčená semena hořčice s malými částicemi o obsahu 30 % MTZ. A – po 72 hodinách, B – po 96 hodinách.

## ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo připravit a otestovat sérii submikro a mikro částic plněných herbicidem zvaný metazachlor o různé procentuální koncentraci. U všech částic byla určena velikost a distribuce velikosti částic, množství enkapsulovaného MTZ, dále obsah zbytkového stabilizátoru suspenze PVA a byla sledována jejich morfologie. Dále byly sledovány uvolňovací profily jednotlivých sérií částic a byla otestována účinnost enkapsulované aktivní látky a její inhibiční vliv na cílových a necílových rostlinách.

Podářilo se připravit tři série malých a velkých částic, kulovitěho tvaru, které se lišily počátečním množstvím enkapsulovaného MTZ. Účinnost enkapsulace byla nejvyšší u velkých částic obsahující 30 % MTZ na počátku procesu. Účinnosti enkapsulace pro velké částice bylo dosaženo vysoké hodnoty 91,16 % a 84 % pro malé částice.

Z experimentálních dat uvolňovacích profilů bylo Korsmeyer – Peppas modelem, pomocí regresní metody nejmenších čtverců zjištěno, že uvolňování probíhalo spíše difúzním mechanismem. Taktéž byl odstraněn nežádoucí počáteční efekt rychlého uvolnění tzv. „burst efekt“. V rámci této práce se povedlo zjistit, že určité série částic měly stejný nebo lepší účinek inhibice na cílové rostliny a v případě necílových rostlin byla inhibice pro určité částice nižší jak u komerčně využívaného čistého metazachloru. Vyšší účinek metazachloru lze přisuzovat zvýšení účinnosti vlivem jeho enkapsulace, kdy je aktivní látka uvolňována do prostředí postupně a je tak chráněna proti její možné degradaci.

Z testování inhibice klíčení na cílových rostlinách, měly nejvyšší účinek velké částice o obsahu 20 % MTZ pro *Echinochloa crus-galli*. Z celkového množství testovaných semen nevyklíčilo žádné. U vlčího máku jako cílové rostliny měly téměř všechny série částic stejný účinek inhibice a to průměrně 89 %.

Testy na necílových rostlinách ukázaly, že u hořčice měly velké částice s 20 a 30 % MTZ nižší inhibici než samotný metazachlor. U ostatních částic byla inhibice pro hořčici zhruba o 10 % vyšší než u samotného MTZ (Tab. 8). U semen řepky byla inhibice zhruba o 10 % vyšší u všech částic vyjma částic obsahující 40 % MTZ, kde byla inhibice srovnatelná s inhibicí samotného metazachloru.

Rozdíly účinnosti mezi velikostmi částic a jejich obsahu MTZ, jsou především ovlivněny rozdílnou kinetikou uvolňování a rozdíly difúzních parametrů pro jednotlivé částice.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MOHAMMAD, A. – CHOWDHURY. The controlled release of bioactive compounds from lignin and lignin-based biopolymer matrices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, vol. 65, p. 136–147.
- [2] KAH, M. – HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International*, 2013, vol. 63, p. 224–235.
- [3] STLOUKAL, P. – KUCHARCZYK, P. – SEDLARIK, 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>>.
- [4] 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/>>.
- [5] REIS, C. P. – NEUFELD, R. J. – RIBEIRO, A. J. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2006, vol. 2, p. 8-21.
- [6] 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.

- [7] PITAKSUTEEPONE, T., DAVIES, N. M., TUCKER, I. G., RADES, T. Factors influencing the entrapment of hydrophilic compounds in nanocapsules prepared by interfacial polymerisation of water-in-oil microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002, vol. 53, p. 335-342.
- [8] PINTO REIS, C. – NEUFELD, R. J. – RIBEIRO, A. J. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2006, vol. 2, p. 8-21. ISSN:1549-9634.
- [9] VYSLOUŽIL, J. – DVOŘÁČKOVÁ, K. – KEJDUŠOVÁ, M. Příprava léčivých mikročastic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*, 2013, vol. 107, p. 16-23. ISSN: 0009-2770.
- [10] BYUN, Y. –Hwang, J. B. – Bang, S. H. Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *Article LWT - Food Science and Technology*, 2011, vol.44, p. 24-28.
- [11] GRILLO, R. – ZOCAL, N. P. – RODRIQUES, C. M. – HENRIQUE, A. R. Poly( $\epsilon$ -kaprolaktone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Haradous Materials*, 2012, p. 231-232.
- [12] GRILLO, R – PEREIRA, A. E. S. – NISHISAKA, C. S. Chitosan/tripolyphosphatenanoparticlesloadedwithparaquatherbicide: An environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, vol. 278, p. 163-171.

- [13] PEREIRA, A. E.S – GRILLO, R. – MELLO, N. F.S. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weed and reduce damage to the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, vol. 268, p. 207-215.
- [14] 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 [cit.2015-1-10]; vol. 5, p. 1-10. Dostupné z: <<http://www.cysonline.org/text.asp?2014/5/1/1/129327>>.
- [15] GIBAUD, S. – GAIA, A. – ASTIER, A. Slow-release melarsoprol microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, vol. 243, p. 161-166.
- [16] CAMPOS, E. – BRANQUINHO, J. – CARREIRA, A. S. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal*, 2013 vol.49, p. 2005-2021.
- [17] BAJPAI, A. K. – SHUKLA, S. K. – BHANU, S. – KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 2008, vol. 33, p. 1088–1118.
- [18] ZULEGER, S. – LIPPOLD, B. C. Polymer particle erosion controlling drug release. I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, vol. 217, no. 1-2, p. 139-152.

- [19] UHRICH, K. E. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews*, 1999, vol. 99, p. 3181-3198.
- [20] HAJŠLOVÁ, J. – TICHÁ, J. – KOCOUREK, V. Rezidua pesticidů v ovoci a zelenině. Možnosti minimalizace. *Výzkumný ústav rostlinné výroby*[online], 2005 [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: <[http://www.phytosanitary.org/projekty/2005/VVF\\_11\\_2005.pdf](http://www.phytosanitary.org/projekty/2005/VVF_11_2005.pdf)>.
- [21] FUSEK, J. – MĚRKA, V. Nebezpečné herbicidy, *Vojenské zdravotnické listy*. [online] 2003. [cit. 2014-12-20]. Dostupné z: <[http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL6\\_2003/03.pdf](http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL6_2003/03.pdf)>
- [22] 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. 2014-12-20]. Dostupné z: <[http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2010/PDF/14-16.PDF](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/14-16.PDF)>.
- [23] MIKULKA, J. – KNEIFELOVÁ, M. Rizika kontaminace potravin a pitné vody. *Výzkumný ústav rostlinné výroby*. [online], 2003 [cit. 2014-12-20]. Dostupné z: <<http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf>>.
- [24] Atrazin. *Integrovaný registr znečišťování*. [online]. 2013 [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: <<http://www.irz.cz/node/14>>.
- [25] Simazin. *Integrovaný registr znečišťování*. [online]. 2013 [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: <<http://www.irz.cz/node/89>>.

- [26] Fact about Paraquat. *Center for Disease Control and Prevention*. [online] 2013. [cit.2015-01-20]. Dostupné z: <<http://www.bt.cdc.gov/agent/paraquat/basics/facts.asp>>.
- [27] Fao specifications and evaluations for plant protection products. Food and agriculture organization of the United Nations. [online] 1999. [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/metazach.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/metazach.pdf)>.
- [28] JAMSHIDIAN, M. – TEHRANY, E.A. – IMRAN, M. Poly-lactic acid: Production, applications, Nanocomposites, and Release studies. *Institut of Food Technologists*, 2010, vol. 9.
- [29] DASH, S. – MURTHY, P.N. – NATH, L. Kinetic modeling on drug Release from Controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutice – Drug Researc*, 2010, vol. 67, p. 217-223.
- [30] XIAO, R. Z. – ZENG, Z. W. – ZHOU, G. L. a spol. Recent Advances in PEG-PLA Block Copolymer Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2010, vol. 5, p. 1057-1065. ISSN:1176-9114
- [31] Gawlik, B.M. – Sotirii, N. - Eicht, E.A. a spol. Alternatives for determination of the soil adsorption coefficient KOC, of non-ionic organic compounds-a review, *Chemosphere*, 1997, 34, 225-2551



- [32] Food and Agricultural Organization (FAO). International code of conduct on the Distribution and use of pesticides, 2003. [Cit. dne 15.12.2014] Dostupné z: <<http://www.rlc.fao.org/Foro/bpa/pdf/good.pdf>>
- [33] KERLE, J. – JENKINS, J. – VOUGE, P.A. Understanding pesticide persistence and mobility for ground water and surface water protection, *Oregon State University, Extension Service*, 1994
- [34] DE JONG, S.J. – ARIAS, E.R. – RIJKERS, D.T.S. New Insights into the Hydrolytic Degradation of Poly(Lactic Acid): Participation of the Alcohol Terminus. *Polymer*, 2001, vol. 42, p. 2795-2802.
- [35] MAMY, L. – BARRIUSO, E. – GABRIELLE B. Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science*, 2005, vol. 61, p. 905-916.
- [36] VAN NOSTRUM, C.F., VELDHUIS, T.F.J., BOS, G.W., HENNINK, W.E. Hydrolytic Degradation of Oligo(Lactic Acid): A Kinetic and Mechanistic Study. *Polymer*, 2004, vol. 45, p. 6779-6787, ISSN 0032-3861.
- [37] ZULEGER, S. – LIPPOLD, B. C. Polymer particle erosion controlling drug release. I. Factors influencing drug release and characterization of the release mechanism. *Int. J. Pharm.* 2001, vol. 217, p. 139–152.

- [38] SIEPMANN, J. – PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Delivery Rev*, 2001, vol. 48, p. 139–157.
- [39] PANYAM, J. – DALI, M.M. – SAHOO, S.K. Panyam. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano and micro particles. *J. Controlled Release* 2003, vol. 92, p. 173–187.
- [40] ASO, Y. – YOSHIOKA, S. – WAN, Po, A. L. Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(D,L-lactide) microspheres. *J. Controlled Release* 1994, vol. 31, p. 33–39.
- [41] GARLOTTA, D. A literature review of poly(lactic acid). *Journal Polymeric Environment*, 2001, vol. 9.
- [42] KRISTER, G. – CASSANAS, G. – VERT, M. Effects of morphology, conformation and configuration on the IR and Raman spectra of various poly(lactic acid)s. *Polymer* 1998, vol. 39, p. 267–273.
- [43] JADAMUSOVÁ, P. – SEZIMOVÁ, H. Stanovení účinku odpadních vod na klíčivost semen a růst v počátečních stádiích vývoje rostliny SINAPIS ALBA. Ostravská univerzita v Ostravě. Cit [12-03-2015]. Dostupné z: <<http://konference.osu.cz/svk/sbornik2012/pdf/budoucnost/biologieEkologie/jadamusova.pdf>>.

- [44] 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.
- [45] 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
- [46] 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.
- [47] ADAK, T. – KUMAR, J. – SHAKIL, N.A. Development of controlled release formulations of imidacloprid employing novel nano-ranged amphiphilic polymers. *Journal of Environmental Science and Health*, 2012, vol.47.
- [48] BRINBAUM, D.T. – KOSMALA, D.B. – HENTHORN, L.B. Controlled release of b-estradiol from PLAGA micro particles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release, *Journal Controlled. Release*, vol. 65 (2000) , p. 375–387.
- [49] 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.

- [50] ARSHADAY, R. Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres. *Journal Controlled Release*, 1991, vol. 17 p. 1–22.
- [51] 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.
- [52] CHOWDHURY, M.A. - HILL, D.J.T. – WHITTAKER, A.K. *Polymer International*, 2005, vol. 54, p. 267–273.
- [53] RITGER, P.L. – PEPPAS, N.A. Transport of penetrants in the macromolecular structure of coals: 4. Models for analysis of dynamic penetrant transport. *Fuel* 6, 1987, vol. 66, p. 815–826.
- [54] CHOWDHURY, M.A. Diffusion and drug release study from 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)-based methacrylate polymers PhD Thesis, *School of Molecular and Microbial Sciences*, The University of Queensland, 2003.
- [55] CHOWDHURY, M.A. - HILL, D.J.T. – WHITTAKER, A.K. Vitamin B12 release from P(HEMA-co-THFMA) in water and SBF: A model drug release study. *Australian Journal Chemistry*, 2005, vol. 58, p. 451–456.

- [56] MONTORO, E.P. – GONZÁLES, R.R. – FRENICH, A.G. Fast determination of herbicides in waters by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry*, 2007, vol. 21, p. 3585-3592.
- [57] GHADERI-FAR, F – GHEREKHLOO, J. – ALIMAGHAM, M. Influence of environmental factors on seed germination and seedling emergence of yellow sweet clover (*Melilotus officinalis*). *Plantadaninha*, 2010, vol.28, p. 463-469.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

EE	Účinnost enkapsulace.
HL	Účinnost plnění částic herbicidem.
HPLC-MS	Ultra účinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem.
Li	Inhibice klíčení.
O/V	Metoda odpaření rozpouštědla olej ve vodě.
PdI	Polydisperzní index.
PCA	Polykaprolakton.
PLA	Polymléčná kyselina.
PLGA	Polymléčná-glykolová kyselina.
PVA	Polyvinylalkohol.
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1	Struktura nanokapslí a nanosfér .....	17
Obr. 2	Schéma přípravy částic metodou odpaření rozpouštědla. [14].....	20
Obr. 3	Strukturní schéma PLA [28].....	22
Obr. 4	Schéma difúzního a erozního uvolňování aktivních látek z nanočástic .....	24
Obr. 5	Strukturní schéma metazachloru[27].....	34
Obr. 6	Schéma mineralizace metazachloru podle L. Mammy a kol. ....	35
Obr. 7	Mineralizace metazachloru ve třech půdních typech, pomocí vodných roztoků CaCl <sub>2</sub> a organického rozpouštědla.[35] .....	36
Obr. 8	A - velké částice s 20 % MTZ při 5000 x zvětšení, B - 3000 x zvětšení. C – velké částice s 30 % MTZ při 5000 x zvětšení, D - 3000 x zvětšení. ....	55
Obr. 9	Uvolňovací profil malých a velkých částic obsahující 20% enkapsulovaného metazachloru v prostředí TRIS - pufru ve skleněných uzavíratelných lahvičkách při teplotě 20°C za stálého míchání na třepače. ....	56
Obr. 10	Grafické vyjádření uvolňovacího profilu metazachloru malých a velkých částic s 20% MTZ v prostředí TRIS – pufru ve zkumavkách, při teplotě 20°C za stálého míchání na třepače. Porovnání s modelovou křivkou.....	58
Obr. 11	Grafické vyjádření uvolňovacího profilu metazachloru malých a velkých částic s 30% MTZ v prostředí TRIS - pufru ve zkumavkách, při teplotě 20°C za stálého míchání na třepače.....	59
Obr. 12	Grafické vyjádření uvolňovacího profilu metazachloru velkých částic s 40% MTZ v prostředí TRIS - pufru ve zkumavkách, při teplotě 20°C za stálého míchání na třepače. ....	59
Obr. 13	Absorpční spektra částic a látek před a po enkapsulaci MTZ, a následně před a po uvolňovacích testech pro malé částice s 20 % MTZ .....	61
Obr. 14	Absorpční spektra částic a látek před a po enkapsulaci MTZ, a následně před a po uvolňovacích testech pro velké částice s 20 % MTZ .....	62
Obr. 15	Grafické porovnání inhibice klíčení (li) na cílové rostliny – vlčí mák a Ježatku ( <i>Echinochloa crus-galli</i> ). ....	63
Obr. 16	Grafické porovnání inhibice klíčení (li) na necílové rostliny – řepku a hořčici. ....	64
Obr. 17	Semena ježatky ( <i>Echinochloa</i> ). A – po 120 hodinách s velkými částicemi o obsahu 20 % MTZ, B – po 144 hodinách bez přídatku MTZ. ....	66

---

Obr. 18 Naklíčená semena řepky s malými částicemi o obsahu 30 % MTZ. A – po 72 hodinách, B – po 96 hodinách. ....	66
Obr. 19 Naklíčená semena hořčice s malými částicemi o obsahu 30 % MTZ. A – po 72 hodinách, B – po 96 hodinách. ....	66



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Systémy nanopesticidních aplikací. [44], [45],[46], [47] .....	14
Tabulka 2 Základní rozdělení pesticidů [20] .....	28
Tabulka 3 Parametry pro přípravu sub mikro a mikro částic. ....	44
Tabulka 4 Parametry pro výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých látek .....	46
Tabulka 5 Parametry získané výpočtem z hodnot elementární analýzy malých a velkých částic, skenovacího elektronového mikroskopu, softwaru IJmage, přístroji ZetaSizer. ....	54
Tabulka 6 Parametry uvolňovací křivky, získané regresní metodou nejmenších čtverců .....	60
Tabulka 7 Inhibice klíčení a růstový faktor pro cílové rostliny, na které byl aplikován selektivní herbicid v čisté a enkapsulované formě. ....	65
Tabulka 8 Inhibice klíčení a růstový faktor pro necílové rostliny, na které byl aplikován selektivní herbicid v čisté a enkapsulované formě. ....	65