



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ MIKROENKAPSULACE PŘI VÝVOJI HYDROGELOVÝCH NOSIČOVÝCH SYSTÉMŮ

APPLICATION OF MICROENCAPSULATION TECHNIQUES IN DEVELOPMENT OF NOVEL CONTROLLED-
RELEASE SYSTEMS.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Iva Karásková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0960/2015
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Iva Karásková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Využití mikroenkapsulace při vývoji hydrogelových nosičových systémů

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma mikroenkapsulačních technik a potenciálu jejich využití ve vývoji nosičových systémů.
2. Na základě literární rešerše navrhnout základní kompozici testovaného biopolymerního nosičového systému.
3. Realizovat a vyhodnotit sérii experimentů s cílem optimalizovat vybrané mikroenkapsulační techniky pro jejich využití při vývoji navržených nosičových systémů.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Iva Karásková
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá využitím metody mikroenkapsulace při vývoji hydrogelových nosičových systémů, ve kterých hrály zásadní roli huminové kyseliny, biopolymer chitosan, vícesložkové hnojivo NPK a kyselina 3-indolactová. Předložená práce navazuje na moji bakalářskou práci o možnostech využití polyelektrolytových komplexů. Náplní této práce bylo vypracovat literární rešerši na téma mikroenkapsulačních technik a na základě získaných poznatků optimalizovat tuto metodu pro přípravu hydrogelových částic. Mikroenkapsulace byla prováděna na komerčním enkapsulátoru BUSCHI B-395 Pro a bylo měřeno uvolňování jednotlivých složek z částic do vody. Analýza byla prováděna metodou UV-VIS spektrofotometrie a HPLC analýzy. Dále bylo testováno opakované sušení a botnání. Bylo ověřeno, že vhodné složení a kombinace látek tvoří hydrogely pro případné další použití v oblasti zemědělství.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with application of microencapsulation techniques in development of hydrogel controlled-release systems in which the main role is played by humic acids, biopolymer chitosan, compound fertilizer NPK and 3-indoleacetic acid. This paper continues my bachelor thesis topic about utilization of polyelectrolyte complexes. The aim of this work was to develop a literature review focusing on the microencapsulation techniques and according to its results optimize the method. Microencapsulation was performed with a commercial encapsulator BUSCHI B-395 Pro and a release of individual components into a water was measured. An amount of released substances was measured by UV-VIS method and HPLC analysis. Practical part also included testing of repeated swelling and drying. It was found that suitable composition and combination of ingredients form hydrogels for further use in agriculture.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enkapsulace, Hydrogely, Huminové kyseliny, Chitosan

KEYWORDS

Encapsulation, Hydrogels, Humic acids, Chitosan

KARÁSKOVÁ, I. *Využití mikroenkapsulace při vývoji hydrogelových nosičových systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 46 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Iva Karásková

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D., za jeho čas, energii, cenné rady a konzultace velmi potřebné pro vypracování této diplomové práce. Další velké poděkování patří Ing. Jaromírovi Pořízkovi, Ph.D. a Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za pomoc a ochotu při realizaci vybraných měření.

OBSAH

1.	ÚVOD	6
2.	CÍLE PRÁCE	7
3.	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1.	ENKAPSULACE	8
3.2.	HYDROGELY	10
3.2.1.	<i>Řízené uvolňování</i>	11
3.2.2.	<i>Botnání</i>	12
3.2.3.	<i>Aplikace hydrogelových nosičových systémů</i>	13
3.2.4.	<i>Huminové látky</i>	15
3.2.5.	<i>Chitosan</i>	17
3.2.6.	<i>Modelová hnojiva</i>	19
3.2.7.	<i>Modelová biologicky aktivní molekula</i>	20
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	21
4.2.	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	21
4.3.	PŘÍPRAVA MIKROSKOPICKÝCH PEREL	22
4.4.	PŘÍDAVEK VÍCESLOŽKOVÉHO HNOJIVA	25
4.5.	PŘÍPRAVA CS ČÁSTIC S KYSELINOU 3-INDOLOCTOVOU	26
4.6.	OPTIMALIZOVANÉ VZORKY	26
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
5.1.	STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE	27
5.2.	SUŠENÍ A BOTNÁNÍ	29
5.2.1.	<i>Vzorky sušené na vzduchu</i>	29
5.2.2.	<i>Termogravimetrická analýza</i>	29
5.2.3.	<i>Vzorky sušené lyofilizací</i>	33
5.3.	SLEDOVÁNÍ UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK	34
5.3.1.	<i>Uvolňování huminových kyselin</i>	34
5.3.2.	<i>Uvolňování kyseliny 3-indolactové</i>	36
5.3.3.	<i>Uvolňování draslíku a fosforu</i>	38
6.	ZÁVĚR	39
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	40
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	44
9.	PŘÍLOHY	45

1. ÚVOD

V dnešní uspěchané době si pomalu začínáme uvědomovat možné následky našeho počínání při tlaku na výnosy v oblasti zemědělství. Čím dál častěji kolem sebe slycháme pojmy jako „EKO, BIO, GMO“ a mnohé další. Je možné, že je to jen aktuální módní trend, ale můžeme doufat, že tím pomůžeme dalším generacím.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala přípravou hydrogelů na bázi polyelektrolytových komplexů a tyto materiály mě dovedly až k metodě enkapsulace. Původní směr kosmetických a medicínských aplikací rozhodně nebyl nezajímavý, nicméně využití získaných poznatků pro oblast půd mě nadchlo a přišlo mi přirozenější.

Hydrogely jsou látky tvořené rozsáhlými polymerními sítěmi, které mají schopnost zadržet velké množství vody. Mimo to jsou vhodné pro přenos různých aktivních látek, které mohou postupně řízeně uvolňovat. Právě tato kombinace vlastností z nich dělá čím dál populárnější materiály.

Enkapsulace, tedy imobilizace aktivních složek v polymerní síti, je jedna z relativně mladých technik, která se začíná v oblasti uvolňování látek z hydrogelů značně osvědčovat. V této práci se jako hlavní složka používal lignohumát, který je plně rozpustný ve vodě. Huminové kyseliny, které tvoří jeho důležitou součást, jsou mimo jiné známe pro využití v oblasti organických hnojiv. Právě v kombinaci s přírodním biodegradabilním polymerem chitosanem se jeví jako vhodné materiály pro ekologické zemědělství.

Mojí snahou bylo systematicky zhodnotit a otestovat tuto oblast a porovnat získané výsledky s různými alternativami. Jako referenční materiál sloužilo komerční vícesložkové hnojivo NPK. Pro širší využití potenciálu enkapsulace byly otestovány i kapsule typu core-shell (CS), ve kterých byl přídavek modelové aktivní látky, kyseliny 3-indolactové. Ta je nejznámějším přírodním růstovým hormonem rostlin z třídy auxinů.

Představa o využití těchto materiálů má základ ve snížení agrochemických zásahů a tím i ekonomických nákladů v zemědělství. To by pomohlo šetřit životní prostředí a vrátili bychom se tím ke krásné myšlence, kdy věda pomáhá přírodě.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce je vypracovat literární rešerši na téma mikroenkapsulačních technik a potenciálu jejich využití ve vývoji nosičových systémů. Na základě této literární rešerše je třeba navrhnout základní kompozici biopolymerního nosičového systému a jeho možnosti přípravy pomocí techniky mikroenkapsulace. Jedním z hlavních cílů je realizovat sérii experimentů při vývoji navržených nosičových systémů. Tyto experimenty je třeba optimalizovat a charakterizovat pomocí vhodných instrumentálních metod. Na závěr analyzovat získaná data pomocí vhodného fyzikálně-chemického modelu a diskutovat vliv různých faktorů na jejich potenciální využití.

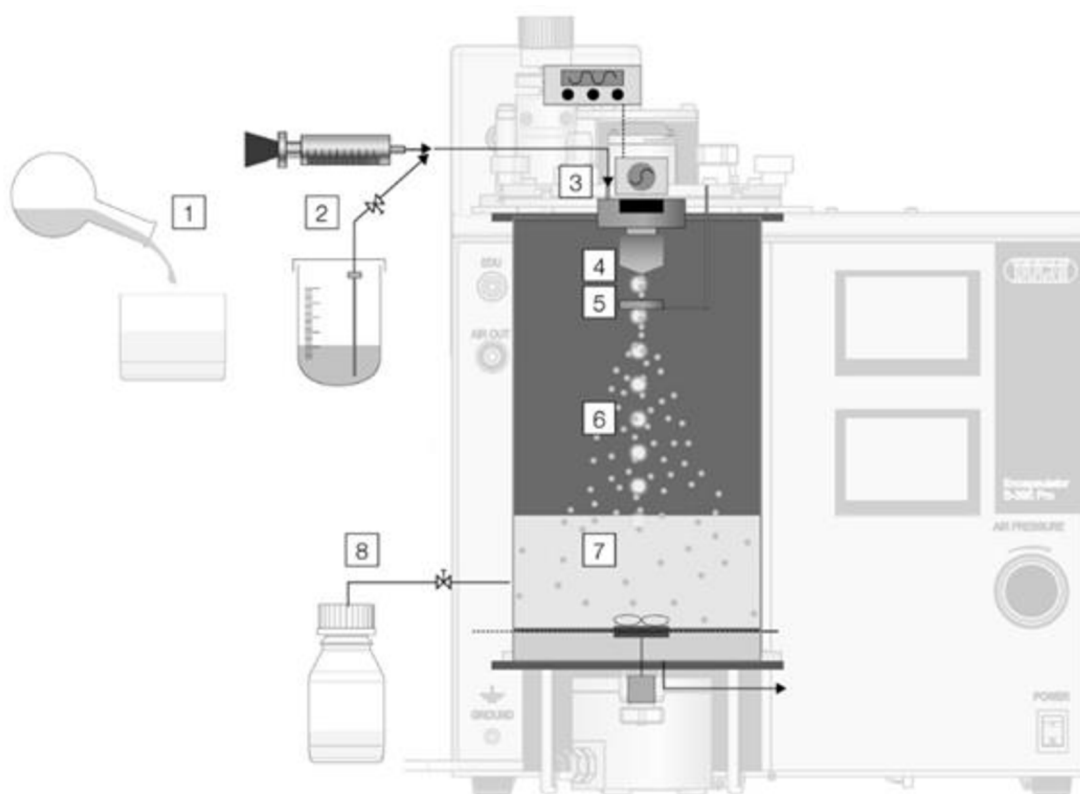
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Enkapsulace

Enkapsulace je imobilizace aktivních složek v polymerní síti. Aktivními složkami mohou být například enzymy, léčiva, vitamíny, oleje, buňky nebo mikroby. Druhů polymerních sítí, které mohou být použity, je mnoho. Slouží jako bariéra, která podléhá difúzi pouze ve specifických podmínkách. Velikost vzniklých částic je přednastavena pomocí volby velikosti trysky. Můžeme rozlišovat formu kapky a formu kapsule. [1]

Systém mikroenkapsulace s řízeným uvolňováním je metoda, při které je jedna nebo více složek distribuováno v malých kapsulích. Ty jsou aplikovány nebo přiloženy k povrchu substrátu. Mikroenkapsule se rozpadá v důsledku různých působení: fyzikálním stlačením, odřením, propíchnutím nebo vymáčknutím. Specifické podmínky, například změna pH nebo teploty, mohou způsobit okamžité uvolnění částic mikroenkapsulí. [2]

V této práci je enkapsulace prováděna pomocí komerčního přístroje Encapsulator B-395 Pro (Obrázek 1).

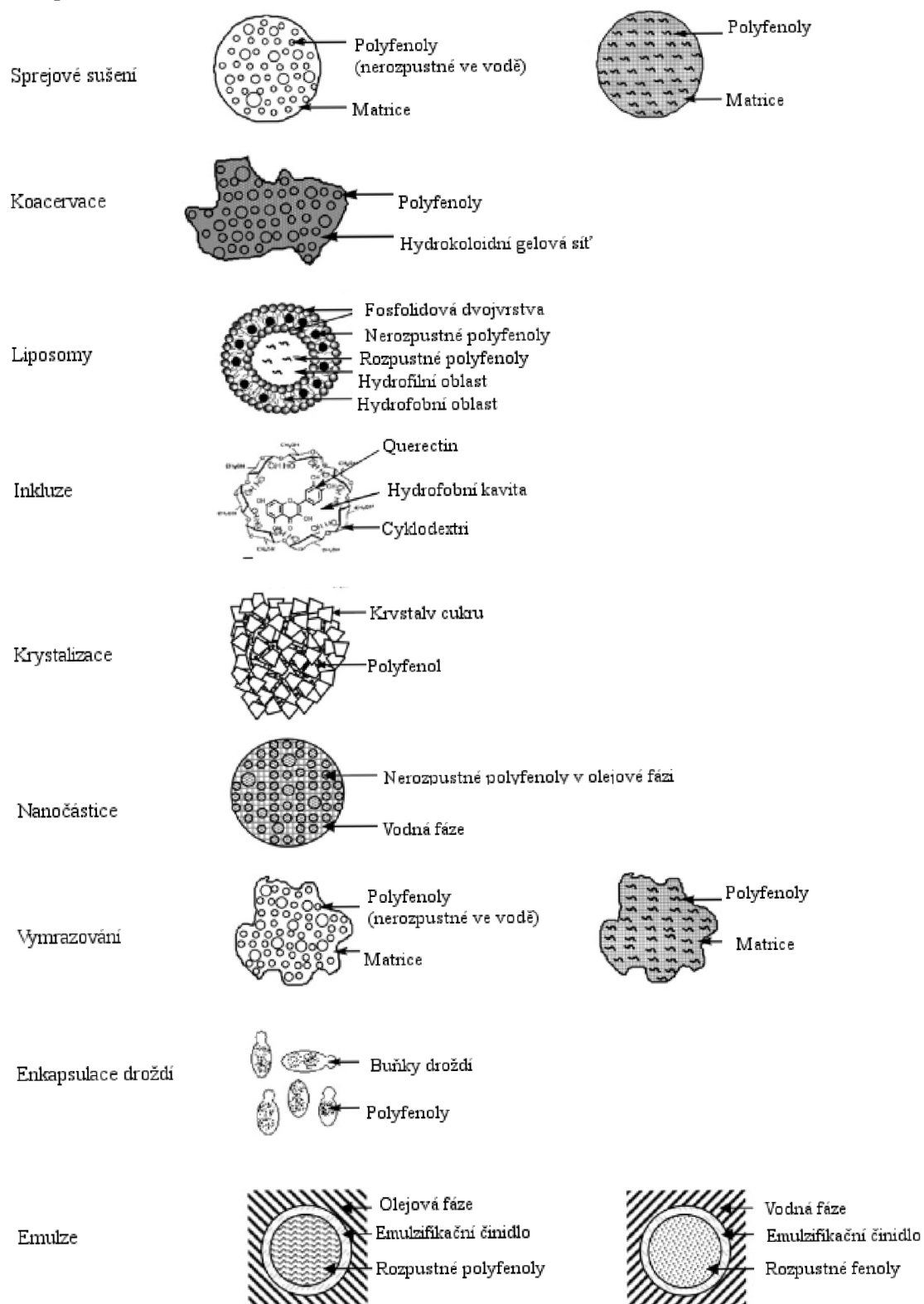


Obrázek 1: Schéma komerčního enkapsulátoru B-395 Pro

Mikročástice můžeme rozdělovat na mikrosféry a mikroenkapsule. U těch je jádro obklopeno materiálem, který se zřetelně liší od jádra. To může být pevné, kapalné nebo dokonce plynné. Termín mikroenkapsule je definován jako sférická částice s rozměry mezi 50 nm a 2 mm a obsahující jádro.

Enkapsulační technika

Ilustrace



Obrázek 2: Typy enkapsulace

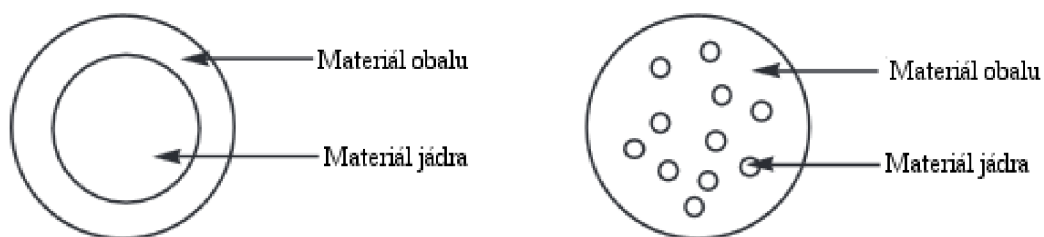
Jako obal se obvykle používají hydrofilní polymery, hydrofobní polymery nebo kombinace obou. Mnoho materiálů již bylo úspěšně použito. Příkladem může být želatina, polyvinylalkohol, ethylcelulóza, acetát celulózy a anhydridy kyseliny maleinové. Materiály pro jádro mohou být ve formě pevných látek, kapek nebo kapalin a disperzí. [3]

Jsou známé látky využívané jako činidla pro mikroenkapsulace v oblasti farmacie a medicíny. Vhodné pro kosmetiku jsou organická i syntetická činidla (například Retinol), krémy a emulze pro péči o pleť, složky pro čištění a bělení zubů, parfémy, opalovací přípravky, barvy na vlasy, chemické peelings a tak dále.

Metody enkapsulace závisí na ceně, aplikaci, fyzikálních vlastnostech a kompatibilitě materiálů. Příklady metod jsou koacervace, spray drying, Wurster coating, fluidized bed nebo co-extrusion a ultrazvuková kavitace. [2]

Enkapsulace bakteriálních buněk je hojně využívána v zemědělství, farmacii, jídle i dalších průmyslových odvětvích s cílem vytvořit ochrannou strukturu nebo kapsuli pro imobilizaci, ochranu a uvolnění funkčních aktivních složek. V některých případech půdního hnojení rostlin se autoři zaměřují na enkapsulaci mikroorganismů. Příkladem jsou rhizobakterie v kombinaci s přírodními nebo syntetickými polymery. [4]

Zajímavou dlouholetou studií je enkapsulace minerálních hnojiv pomocí metody sprejového postřiku. Konkrétně se jednalo o granulovaná hnojiva NPK 6-20-30 a polysulfon jako obalový materiál. Rychlost uvolňování byla měřena při pokojové teplotě a série experimentů potvrdila možnost regulace pomocí počtu vrstev. Výhoda zahrnuje delší účinnost hnojiv, snížení toxicity pro plodiny, redukovanou ztrátu živin a v neposlední řadě nižší aplikační náklady. [5]



Obrázek 3: Dvě hlavní formy enkapsulace: monomukleární kapsule (vlevo) a agregát (vpravo)

3.2. Hydrogely

Počátek hydrogelů datujeme v roce 1960, kdy Wichterle a Lim poprvé navrhli použití hydrogelové sítě poly(2-hydroxyethyl methakrylátu) (PHEMA) pro kontaktní čočky. V porovnání s ostatními syntetickými biomateriály, hydrogely se podobaly živým tkáním více. Obsahovaly vysoký podíl vody a konzistence byla měkká až gumová. Navíc schopnost molekul různých velikosti difundovat a uvolňovat se nabízela možnost využití jako nosiče léčiv pro orální, nosní, bukalní, rektální, vaginální, oční i parenterální cesty. Hydrogely jsou

označovány jako inteligentní materiály, jelikož mohou reagovat na vnější podněty a odpovídat tak na chemické nebo fyzikální změny.

Ačkoliv se gely a hydrogely mohou zdát podobné (chemicky jsou), fyzikálně se značně liší. Gel je obvykle jednodušší poznat než definovat. Technicky se jedná o polotuhé systémy, obsahující malé množství pevné látky, která je dispergována v relativně velkém množství kapaliny. Jejich polymerní síť je již nabotnalá do rovnováhy a jakékoli další přidání kapaliny vede pouze k rozředění polymerní sítě. Oproti tomu hydrogely jsou hydrofilní polymerní sítě, které jsou schopné absorbovat od desítek procent až po tisíce násobky jejich suché hmotnosti a zachovat si svoji 3D strukturu. Fyzikální hydrogely nejsou homogenní. Takto kovalentně síťované sítě jsou nazývány permanentními nebo chemickými gely.[6]

Charakter vody v hydrogelech může určit celý způsob prostoupení živit do gelu a buněčných produktů z gelu. Když suchý hydrogel začne absorbovat vodu, první vstupující molekuly vody hydratují matici nejpolarněji, hydrofilní skupiny vedou k primárně vázané vodě. Jakmile jsou polární skupiny hydratovány, síť bobtná a odhaluje hydrofobní skupiny, které také interagují s molekulami vody, vedou k hydrofobně vázané vodě nebo sekundárně vázané vodě. Primárně a sekundárně vázané vody jsou často kombinovány a nazývají se celkově vázaná voda. Poté síť nasaje další vodu pomocí osmotického tlaku. Přidaná bobtnací voda je nazývána volná voda nebo objemová voda a předpokládá se, že vyplňuje prostor mezi řetězci v síti, póry, makropóry a dutinami. A tak by gely používané pro tkáňové inženýrství by nikdy neměly být suché, ale složené z volné a objemové vody. Měly by obsahovat póry velké tak, aby obsáhly živé buňky. Nebo mohou být navrženy pro degradaci a uvolnění růstových faktorů a vytvoření pórů, do kterých mohou živé buňky penetrovat a množit se.

Tři hlavní metody pro charakterizaci vody v hydrogelech jsou založené na malých molekulárních sondách, diferenciální skenovací kalorimetrii a nukleární magnetické rezonanci.[7] Hydrogelové sítě tradičně vznikají ve vodném roztoku při vzniku polyelektrolytových komplexů. Gelace je základní fázový přechod, který nastává při reakcích polymerů, hydrokoloidů a koloidů. Shlukování monomerů může probíhat mezi rozvětvenými nebo nerozvětvenými řetězci, případně tvorbou sítí. Gelace může být také vratná.[8] Gel je obvykle utvářen ze shluků částic, které dosáhly takového rozměru, že vyplňují celý prostor původní disperze.

Pro vytvoření 3D sítě se musí shluky částic propojit mezi sebou. Mechanismus tohoto spojení se značně liší od shlukování. Nepochází náhodně, ale shluky částic jsou brzděny jejich nejbližšími sousedy.[9] PK vznikají smícháním vodných roztoků polykationtů a polyaniontů. Oba polymery tedy nesou opačný náboj. To znamená, že reakce může proběhnout pouze při hodnotách pH v okolí pK_a intervalu obou polymerů. Pro přípravu nejsou nutné žádné pomocné molekuly jako katalyzátory nebo iniciátory. Srážení je možné se vyhnout přidáním soli, například NaCl, která sníží elektrostatickou přitažlivost.[10]

3.2.1. Řízené uvolňování

U polymerních systémů pro řízené uvolňování tradičně rozlišujeme dva typy: matrice a rezervoáru. Matricové systémy jsou nejčastěji voleny pro jejich jednoduchost vytvoření,

cenovou efektivitu a lepší výkon. Avšak tyto systémy tíhnou k Higuchiovu modelu, kde uvolňování léčiva odpovídá odmocnině z času ($t^{1/2}$). To vede k nestejnomyšlnému uvolňování, nízkému na začátku a vysokému na konci. Klíčovou výhodou hydrogelů je konstantní rychlost uvolňování.

Uvolňování léčiv obecně zahrnuje současně absorpci vody a desorpci léčiva prostřednictvím kontrolovaného mechanismu botnání. Rychlost uvolňování léčiva je regulována faktorem rezistence polymeru ke zvýšení objemu a změně tvaru. Existují různé metody pro předpovězení těchto mechanismů.

Ideální systém pro podání léku by měl odpovídat fyziologickým požadavkům, vycítit změny a odpovídajícím způsobem na ně reagovat mírou uvolňování léčiva. Symptomy většiny chorob mají rytmický model a je třeba jej cítit i při dávkování léčiva, aby nedocházelo ke zbytečnému zatížení metabolického systému. Byly zkoušeny různé formy stimulace hydrogelů, jak naznačuje následující obrázek.

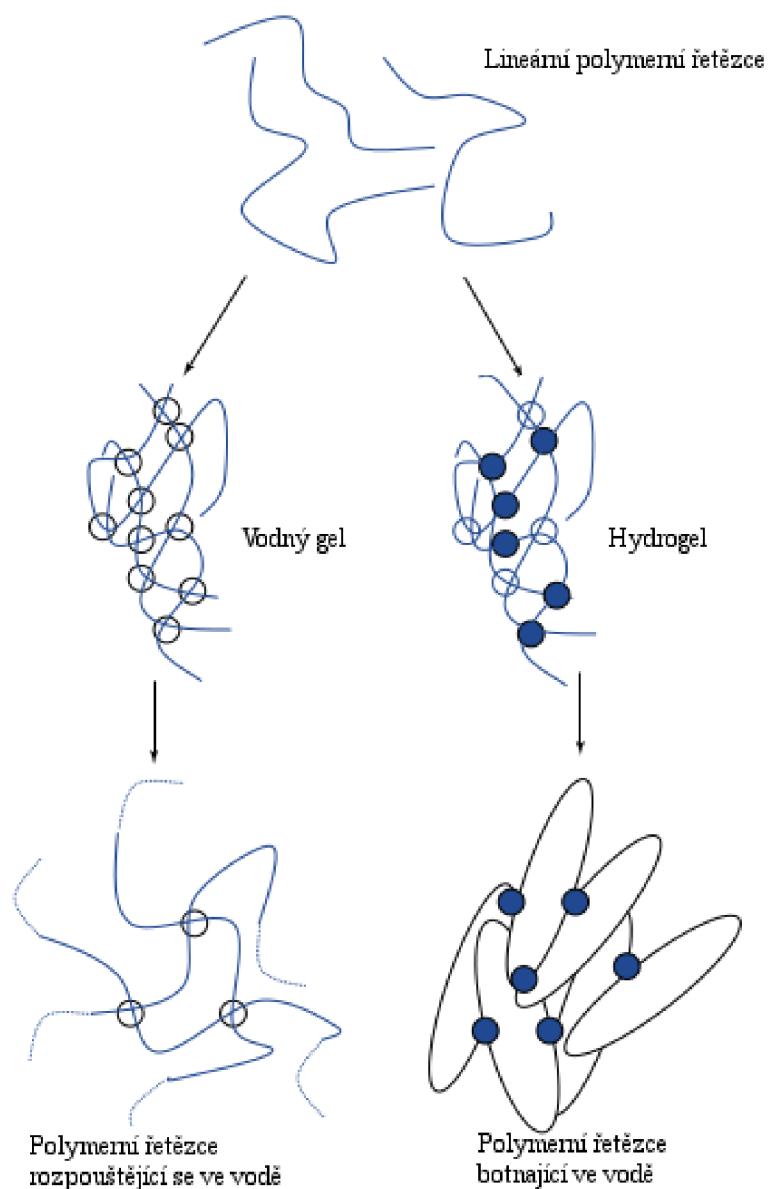
Většinou je uvolňování léčiva pozorováno právě při botnání hydrogelů. Avšak několik případů zaznamenalo tento proces při synerezi hydrogelu jako výsledek mechanismu stlačování.

Gely reagující na změny pH jsou složené z polymerní opory s iontovými postranními skupinami. Ve vodném médiu při vhodném pH a iontové síle tyto skupiny ionizují a vytváří fixní náboj polymerní sítě, který vytváří elektrostatické síly odpovědné za změny hydrogelu, čímž se kontroluje uvolňování léčiva. Malé změny pH mohou znamenat značné změny ve velikosti polymerní sítě. V lidském těle je známo několik míst, kde se změna pH dá takto využít. Jsou jimi gastrointestinální trakt, vagina a cévy.

Aplikace hydrogelů se neomezuje jen na uvolňování léčiv, ale je možné je využít v mnoha směrech biomedicíny. Příkladem mohou být již zmiňované kontaktní čočky, chirurgické implantáty, prsní implantáty, chirurgické katétry, povlaky, obvazy, absorbenty, hybridní orgány, biosenzory a tak dále. [6]

3.2.2. Botnání

Botnání je definováno jako pohlcování nízkomolekulárního rozpouštědla (například vodou) vysokomolekulární látkou (xerogelem), která tak zvětšuje svoji hmotnost i objem. Je to samovolný děj, který spěje k rovnovážnému stavu a může k němu docházet pouze u gelů reverzibilních. Výsledkem je lyogel, ve kterém pohlcená kapalina tvoří disperzní prostředí.



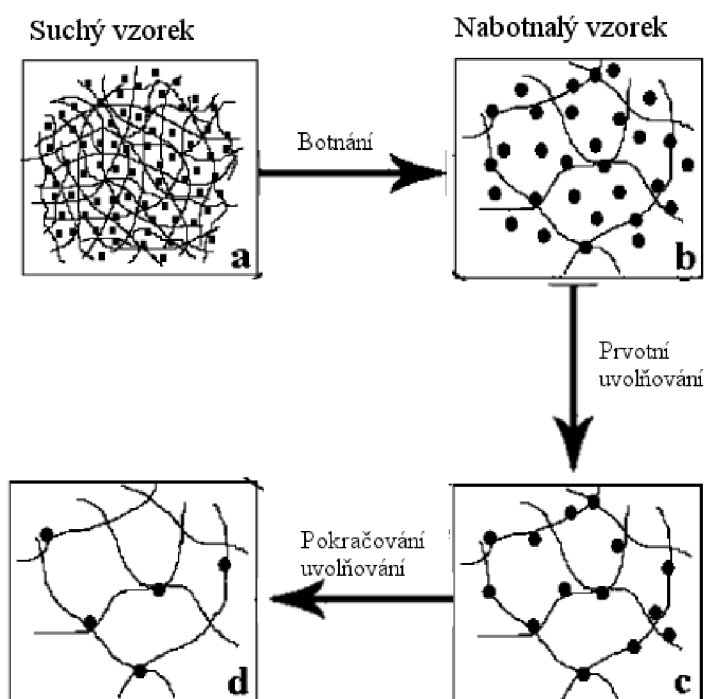
Obrázek 4: Formování gelu a hydrogelu znázorňující odlišné chování ve vodném prostředí

Rozlišujeme botnání omezené a neomezené. Jestliže se botnání xerogelu v přebytku kapaliny zastaví ve stadiu lyogelu (není pohlcována další kapalina), jedná se o omezené botnání. Pokud se ovšem botnání ve stavu lyogelu nezastaví, ale začnou zanikat styčné body, nastává botnání neomezené. Jednotlivé makromolekuly tak přecházejí do roztoku a přidáváním dalšího rozpouštědla je možné roztok dále ředit. [11]

3.2.3. Aplikace hydrogelových nosičových systémů

Polymerní hydrogely byly a jsou využívány jako hnojiva s řízeným uvolňováním. [12] V zemědělství jsou hnojiva velice důležitým aspektem. Jedním z důvodů je 40–70% ztráta v prostředí z důvodu neabsorbce plodinami a stromy. Pokud jsou hnojiva aplikována přímo, nejen, že dochází k velkým ztrátám, ale také k vážnému znečištění životního prostředí. A tak

se hnojiva inkorporovaná v superabsorpčních polymerních sítích stávají efektivním řešením pro vyšší efektivitu využití vody a hnojiv. Právě obsah humátů sodného v polymerech je často zkoumán a měřen. Bylo pozorováno zvýšení absorpce vody se zvyšujícím se obsahem humátů v rozsahu 0–30 hm. %. a s dalším přidáváním humátů naopak snižování absorpce. Právě při třiceti hmotnostních procentech byla absorpce vody nejvyšší. Humát sodný obsahuje velké množství funkčních skupin (karboxylové, hydroxylové, enolové, alkoholové atd.). Díky tomu může vytvářet chemické vazby a vylepšovat tak polymerní síť během procesu polymerizace. Pozorované snížení absorpce vody při 30 % je způsobeno tím, že přebytek humátů se chová jako plnivo a množství hydrofilických skupin se s množstvím humátů snižuje. To způsobuje snížení rozdílu osmotických tlaků a smršťování kompozitu superabsorbentu. Také čas pro dosažení absorpční rovnováhy se liší. Zatímco při 5% množství humátů trvá ustálení 40 minut, při 40% obsahu jsou to dvě hodiny. To je způsobeno změnami rychlosti difuze vody vnikající dovnitř polymerní sítě, která je závislá právě na množství hydrofilních skupin.



Obrázek 5: Schéma botnání

Velkou roli hraje také iontová síla. 10% humát sodný má vyšší absorpce vody v solných roztocích než 30%. Tento fenomén je spojen jednak s iontovou silou, ale také s polyelektrolytovou povahou polymerních sítí.

Uvolňování humátů z kompozitu v destilované vodě je vyšší v prvních dvou dnech. To může být způsobeno výskytem humátů na povrchu a volně uvnitř kompozitu. Poté je difuzi potřeba

více času. Navíc síla nabobtnalého gelu po uvolnění humátu slábne. Některé z vazeb v síti zmizí, což může způsobit disperzi materiálu do prostředí.[13]

S využitím chitosanu pro hnojiva s řízeným uvolňováním se v literatuře setkáváme poměrně často. Jamnongan a Kaewpirom porovnávali hydrogely z chitosanu a polyvinyl alkoholu, případně kombinaci obou. Spojení chitosanu s dalším polymerem totiž pomáhalo zlepšit absorbanci vody do gelu. Právě na této vlastnosti gelů totiž závisí zkoumané řízené uvolňování. Testovali mnoho faktorů a dospěli k závěru, že chitosanové hydrogely vykazují nejvyšší procento uvolněného draslíku (oproti gelům z polyvinyl alkoholu a kombinace obou polymerů). Je to způsobeno excelentní biodegradabilitou materiálu a tady snadnému přístupu pro mikroorganismy a ionty v půdě.[12]

Rashidzadeh a Olad se zabývali enkapsulovanými NPK hnojivy s pomalým uvolňováním. K polymerizaci používali alginát sodný, kyselinu akrylovou, akrylamid a montmorilonit právě v přítomnosti složených hnojiv. Podrobné charakterizace vzniklých materiálů a testování aplikací ukázaly excelentní vlastnosti pro pomalé uvolňování a dobrou retenční kapacitu vody. To redukuje ztrátu hnojiv a vylepšuje využití vody v zemědělských aplikacích.[14] Podobným tématem se již dříve zabývali vědci Wu a Liu, kteří tvořili CS částice z chitosanu, polyakrylamidu a NPK hnojiv. Absorbce vody byla až sedmdesáti násobek vlastní hmotnosti částic (za dobu 90 minut při pokojové teplotě). Cena chitosanu zde byla hodnocena jako příznivě nízká a umožňující klasifikovat techniku jako šetrnou k životnímu prostředí.[15] Komponenty modelových hydrogelů

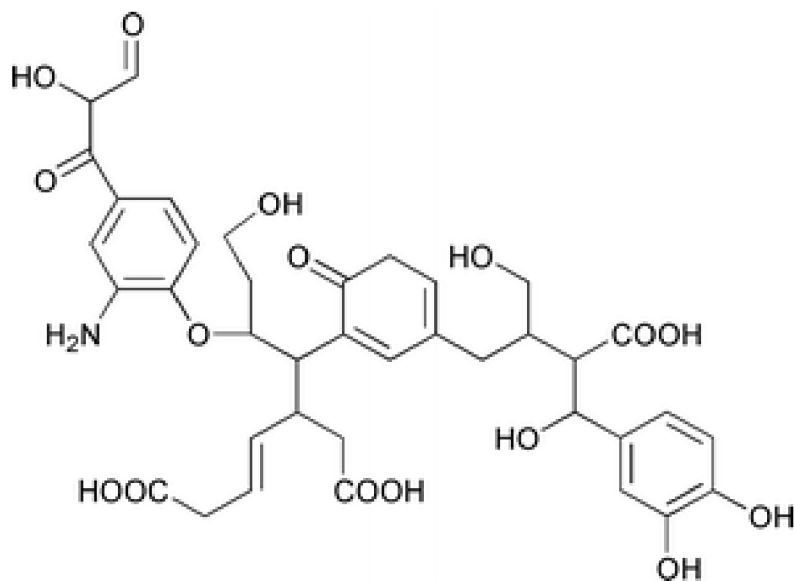
3.2.4. Huminové látky

Huminové látky představují specifickou skupinu látek tmavé barvy, které vznikají v procesu rozkladu organických zbytků v půdě, to znamená v procesu jejich humifikace. Jejich vzniku značně napomáhá i činnost žížal v půdě. [16] HK jsou schopné interagovat s dalšími polymery, s nízkomolekulárními organickými a anorganickými sloučeninami a zejména s kovy (za tvorby chelátových komplexů). Tradičně se využívají jako palivo a organická hnojiva.[17]

HL lze podle fyzikálně-chemických vlastností rozdělit na humusové kyseliny, huminy a humusové uhlí. Humusové kyseliny dále dělíme na huminové kyseliny, fulvokyseliny a humatomelanové kyseliny. Jednotlivé skupiny se liší například molekulovou hmotností, obsahem funkčních skupin, kyselostí. Huminy a humusové uhlí jsou ve vodě prakticky nerozpustné, proto jsou významné především humusové kyseliny. Huminové kyseliny jsou rozpustné v zásadách, ale ne v kyselinách. Fulvokyseliny jsou rozpustné v zásadách i v kyselinách a huminy nejsou rozpustné ani v zásadách ani v kyselinách. Pro svoji vyšší rozpustnost najdeme v přírodních vodách převážně fulvokyseliny. Mají navíc ve srovnání s HK více procent obsahu kyslíku a méně uhlíku. [18]

Jsou to složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností v rozmezí stovek až desítek tisíců. Ve vodě se vyskytují jako jednotlivé molekuly nebo spojené do supramolekulárních struktur pomocí slabých vazebných interakcí. Mohou tvořit i micelární koloidy s hydrofobní částí molekuly uvnitř a hydrofilní částí vně. [18] Jsou to látky

zatím neúplně popsané, mohou se lišit velikostí částic, elementárním složením nebo se dále dělit na frakce. Jedním z návrhů možné struktury je Steelinkův model (Obrázek 6). [19]



Obrázek 6: Steelinkův model HK

Z chemického pohledu se jedná o aromatické jádro s alifatickými řetězci a specifickým obsahem různých funkčních skupin. Nejvíce reaktivní se zdají být skupiny karboxylové, aromatické a fenolické. Díky tomu jsou tyto látky schopné vázat polární i nepolární sloučeniny. V průběhu tvorby huminových kyselin (proces humifikace) se zvyšuje obsah karboxylových a ketonových skupin. Naopak obsah OH a OCH₃ skupin se snižuje. Struktura je také ovlivněna materiálem, ze kterého byly huminové kyseliny izolované. Například po izolaci z ligninu získáváme strukturu bohatší na aromatické struktury a při izolaci z oxyhumolitu strukturu s více nerozvětvenými řetězci.

Z pohledu struktury jsou huminové kyseliny vhodné pro sorpční, iontovo-výměnné a biodegradační procesy. Biologická aktivita huminových kyselin závisí na jejich původu a zpracování.[20] Huminové látky mohou být tvořeny jako konečné produkty syntetické činnosti mikroorganismů, degradací a přeměnou produktů v rostlinách, syntetickou oxidací fenolických sloučenin, případně pražením polymerů (například pražením kávy).[17] Zdrojem huminových látek pro průmysl jsou především rašelina, lignit a oxyhumolit (zoxidované hnědé uhlí) u důvodu obsahu huminových látek až v desítkách procent. Ty se přirozeně vyskytují i v dalších materiálech (např. v sedimentech, zeminách, hnědém uhlí), ale jejich obsah kolísá od jednotek po desítky procent.[21]

Z vodohospodářského hlediska rozlišujeme půdní a půdní humus, které se liší svým složením. Vodní humus vzniká rozkladem planktonu a rostlin hromadícího se ve dnových sedimentech nádrží, nebo toků. Vodní humus je méně stabilní než půdní humus a obsahuje méně aromatických struktur, méně uhlíku a dusíku a více kyslíku. HL můžeme nalézt téměř ve všech přírodních vodách, kde často tvoří hlavní podíl organických látek.[22] Huminové látky se dostávají do vody během silných dešťů. HL ve vodě mohou způsobit lidem závažné zdravotní problémy jako atrofickou akrodermatitidu či rakovinu. Koncentrace HK v pitné

vodě by proto neměla překročit 2mg/l. Čištění vody od těchto látek se provádí mimo jiné pomocí membránové separace. Konkrétně byly studovány například membrány z chitosanu a polyakrylonitrilů. Mechanismus odstranění funguje na principu silné elektrostatické interakce mezi pozitivně nabitou membránou a negativní karboxylovou skupinou HK. Molekuly HK jsou primárně vázány k protonovaným aminoskupinám chitosanu.[23]

Jiná zajímavá studie využívala těchto mechanismů při zkoumání vlivu vodných huminových substancí na koloidní stabilitu a toxicitu, kdy byly herbicidy vázány právě chitosanovými nanočásticemi.[24]

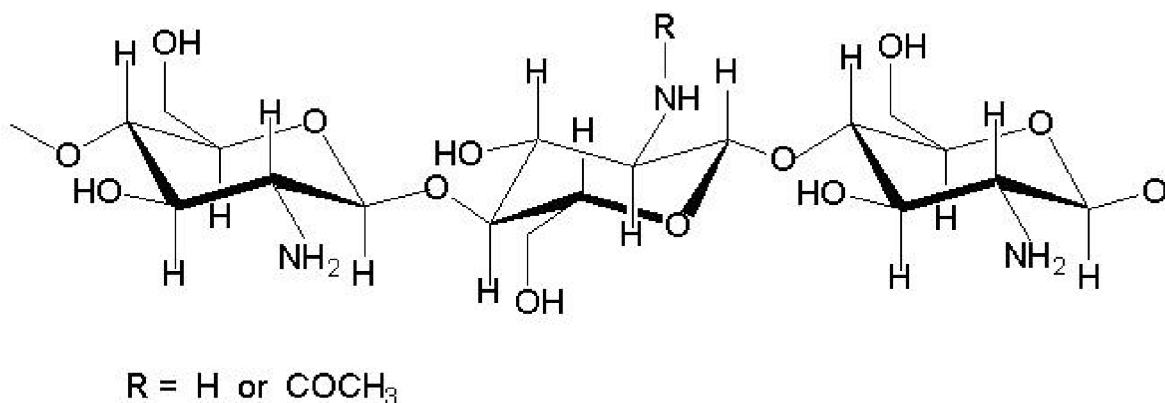
Komplexotvorné vlastnosti HK jsou příčinou větších koncentrací kovů v huminových vodách. Kovy jsou pak snáze vyluhovatelné z půd a sedimentů. V přírodních vodách tvoří HK převážně nabitě koloidní částice, které mohou koagulovat s velkou koncentrací vápníku a hořčíku. K agregaci dochází v kyselém prostředí. [22]

Studie porovnávací aplikační účinky HK extrahovaných z vermikompostu (rostlinné zbytky přeměněné žížalami na organické hnojivo) a komerční růstový hormon kyselinu indolactovou je pro praktickou část této práce velmi zajímavá. Mechanismus účinku HK na růst rostlin je zde popsán jako velmi podobný hormonálním účinkům. Diskutují navíc synergické účinky HK a kyseliny indolactové. Ta je rozpustná ve vodě a degradovatelná na světlo. Právě adsorpce do humátu by mohla způsobit její vyšší odolnost k půdě a delší působení na růst rostlin. Je ovšem třeba dbát na optimální koncentraci těchto hormonů. Pokud se auxiny aplikují v příliš vysokých dávkách, dochází k potlačení růstu a vývoje rostlin.[25]

3.2.5. Chitosan

Chitosan, (poly-D-glukosamin), (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan, má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní a biodegradabilní. Patří mezi přírodní polysacharidové polymery. Je odvozený od přírodního chitinu, což je po celulóze druhý nejrozšířenější polysacharid [26] a je jedním z nejdůležitějších polymerů na světě. Je syntetizován do podoby krystalických mikrovláken značným počtem živých organismů, které ho využívají jako výztuž pro své exoskelety. Přirozeně se vyskytuje částečně deacetylovaný, s malým množstvím glukosaminových jednotek a nerozpustný v obvyklých rozpouštědlech. Právě tato nerozpustnost způsobuje hlavní překážku v širším využití chitinu.[27]

Tento polymer se v přírodě vyskytuje jen v malém množství u několika typů hub.[28] Komerčně se dosud chitin a chitosan získávají z koryšů, například z krabů a krevet.[29] Chitosan se získává alkalickou deacetylací chitinu pomocí varu s 50% NaOH nebo enzymaticky pomocí N-deacetylasy.[26] Často je zařazen i krok odbarvení, kdy je odstraněn přebytečný pigment. Výsledný produkt musí být označen patřičnou čistotou a barvou, protože zbytkový protein a pigment by mohl způsobit problémy při dalším využití (zejména pro biomedicínské potřeby). Tento proces musí být přizpůsoben každému jednotlivému zdroji. [27]



Obrázek 7: Strukturní vzorec chitosanu

Chitosan je tvořený náhodně nebo blokově uspořádanými jednotkami N-acetyl-glukosaminu a N-glukosaminu.[29] Pokud je počet N-acetyl-glukosaminových jednotek vyšší než 50 %, jedná se o chitin. V opačném případě jsou látky souhrnně nazývány chitosan.[30] V pevném stavu je semikrystalický polymer (přechod mezi krystalickou a amorfní fází).[27] Reaktivní aminoskupiny a primární i sekundární hydroxyskupiny mohou chemicky upravit jeho vlastnosti při mírných reakčních podmínkách.[1] Rozpuštění nastává protonací aminoskupin na pozici C2 opakujících se jednotek D-glukosaminu. Polysacharid je přeměněn na polyelektrolyt v kyselém médiu. Pro charakterizaci vzorku chitosanu je nutné určení jeho průměrné molekulové hmotnosti.

Chitosan je jako polyelektrolyt schopný tvořit v kyselém prostředí elektrostatické komplexy. Zvláštní pozornosti se dostává komplexům s opačně nabitými povrchově aktivními látkami a PK.[27] Pokud smícháme polyelektrolyty v takovém poměru, kdy jeden náboj (pozitivní nebo negativní) převažuje, vzniká nestechiometrický komplex, který je většinou rozpustný. Na druhou stranu stechiometrický polyelektrolytový komplex obsahuje stejné množství obou nábojů s výsledným nulovým nábojem. Tyto jsou většinou nerozpustné a srážejí se z roztoku. Polyelektrolytové komplexy chitosanu byly popsány s různými přírodními polymery. Jako příklady bych uvedla alginát, karagenan, pektin, kyselinu hyaluronovou, kondagogová guma, želatina a γ -polyglutamová kyselina. Ze syntetických polymerů jsou zmiňovány polyakrylová kyselina, polymethakrylát a polyalkyloxid maleinové kyseliny. [31]

Hlavní nevýhodou fyzikálně vázaných hydrogelů oproti chemicky vázaným je nižší mechanická stabilita a risk rozpuštění z důvodu vysoce pH senzitivního botnání. Cílem studie, kterou vedla Claudia Silva, bylo vyvinout a charakterizovat PEC filmy založené na chitosanu a PAA s dobrými funkčními vlastnostmi a atraktivitou pro potenciální aplikace v kosmetice a pro podávání léčiv přes kůži. [32]

Biodegradabilní polymery jsou v oblasti zemědělství hojně využívány. Jsou rozlišovány dva způsoby kombinace agrochemické složky (herbicid, pesticidy, nebo hnojiva) s polymerem. První možností je fyzikální kombinace (enkapsulace, nebo heterogenní disperze) kdy je regulována rychlost uvolňování. Druhým způsobem je chemická kombinace, která se chová jako nosič. Polymerní materiály, které fungují jako hnojiva i herbicidy současně byly také zkoumány. Pro tyto účely se použily hydrofilní polymery.

Chitosan je mezi biodegradovatelnými polymery velmi zajímavý z hlediska možnosti využití pro odstraňování těžkých kovů z průmyslových odpadních vod. Díky přítomnosti acetylglukosaminových a glukosaminových jednotek obsahuje mnoho aminových skupin. Tyt jsou zodpovědné za odebírání kovových kationtů chelátovým mechanismem. Dusíkové atomy navíc drží volné elektronové dublety, které mohou reagovat s kationty kovů. Mimo to, aminové skupiny mohou být snadno protonované v kyselých roztocích.[33]

3.2.6. Modelová hnojiva

Ročně je aplikováno okolo 2 milionů metrických tun pesticidů, z kterých je 90 % nevyužito (ztraceno v průběhu aplikace do vzduchu). To navíc způsobuje značný nárůst používání hnojiv v již tak dost křehkém přírodním systému.[34] Růst rostlin a jejich kvalita jsou především funkcí kvantity hnojiv a vody. Proto je velmi důležité vylepšovat využití vodních zdrojů a živin z hnojiv. Avšak 40–70 % dusíku, 80–90 % fosforu a 50–70 % draslíku aplikovaných klasickými hnojivy je ztraceno v prostředí a nemůže být absorbováno rostlinami. To způsobuje nejen obrovské ekonomické ztráty a ztráty zdrojů, ale také vážné znečištění životního prostředí. V posledních letech se objevil trend šetřit spotřebu hnojiv a minimalizovat znečištění prostředí.

Tyto problémy dávají příležitost stále více se rozvíjejícímu odvětví – nanomateriálům. Právě ty by mohly pomoci při řízeném uvolňování výživy rostlin a k ochraně proti pesticidům a patogenům. Jedním z příkladů a testovaných materiálů jsou právě polymerní chitosanové nanočástice (78nm), které prokázaly pomalé uvolňování enkapsulovaných pesticidů a hnojiv.[34]

Superabsorbenty jsou volně vázané hydrofilní polymery, které mohou absorbovat a uchovat kapaliny až do tisícnásobků jejich vlastní hmotnosti. Absorbovanou vodu je možné uvolnit pouze pod tlakem. Optimalizovaná kombinace hnojiv s pomalým uvolňováním a superabsorbentních polymerů může zlepšit výživu rostlin, zmírnit dopad vodě-rozpustných hnojiv na životní prostředí, redukovat ztráty vody odpařováním a snížit frekvenci zavodňování.[15]

NPK je přímé minerální vícesložkové hnojivo, které obsahuje dusík, fosfor a draslík (tedy všechny tři základní biogenní prvky). Jejich funkcí je zajistit základní výživu půdy. Poměr zastoupení jednotlivých prvků závisí na požadavcích. Například NPK hnojivo 20-8-8 (využívané v této práci) obsahuje 20 % dusíku, 8 % fosforu a 8 % draslíku. Dusíkaté složky se v hnojivu vyskytují formou močovinoformaldehydu.

Půda slouží jako zásobárna pro živiny rostlin a obvykle poskytuje značné množství živin, které rostliny potřebují. Některé půdy poskytují potřebné množství živin, u jiných je třeba doplnění formou hnojiv. Hnojivo je jakýkoli materiál, obsahující jednu nebo více esenciálních živin, který je přidán do půdy, média nebo aplikován na rostlinu za účelem náhrady její výživy.

Dělíme je do typů podle hlavní složky – dusíkaté, fosforečné a tak dále. Jednou z čím dál populárnějších skupin jsou hnojiva s pomalým uvolňováním. Do této kategorie patří i enkapsulovaná hnojiva.

Tento pojem charakterizuje produkty, u kterých je granule vodě-rozpustného hnojiva potažená vrstvou. Množství obsaženého materiálu se liší v závislosti na metodě a materiálu. Čtyři kategorie jsou následující:

- použití síry jako potahovacího materiálu,
- využití polymerního materiálu,
- hybridní produkty s potahovací multivrstvou – kombinace síry a polymeru,
- použití kondenzovaného fosforečnanu hořečnatého jako potahovacího materiálu.

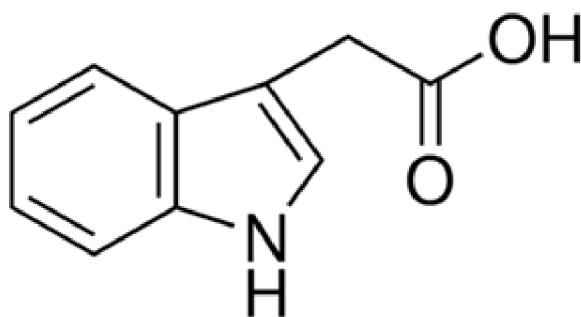
Polymer-coated fertilizer (PCF) jsou vytvářeny pomocí tepla k obalení hnojiva substrátem. Využíváme je k obalování jednosložkových hnojiv nebo NPK substrátů založených na dusíku. Sekundární výživové látky mohou být inkorporovány do částic v průběhu procesu.

Uvolňování probíhá podle mechanismu difuze. Voda musí prostoupit přes polymerní membránu, kdy míra difuze závisí na tloušťce a složení obalu. Voda poté rozpustí hnojivo a difunduje zpět přes membránu díky rozdílným osmotickým tlakům. Tento difuzně-kontrolovaný mechanismus umožňuje jednotnost uvolňování v období od 3 do 36 měsíců. Množství uvolněného hnojiva se zvyšuje s rostoucí teplotou. [35]

Hlavními prvky, které rostliny potřebují pro výživu, jsou dusík, fosfor a draslík. Právě dusíku a draslíku potřebují více, než kteréhokoli jiného esenciálního prvku (mimo uhlík, vodík a kyslík, které získávají ze vzduchu). Jako sekundární jsou uváděny vápník, hořčík a síra. [36]

3.2.7. Modelová biologicky aktivní molekula

Jako modelová biologicky aktivní molekula byla pro naše potřeby zvolena kyselina indolactová (IAA) je bílá až narůžovělá krystalická látka, ne zcela rozpustná ve vodě. [37] Je nejnámějším, přirodně se vyskytujícím rostlinným hormonem z třídy auxinů (další dvě



Obrázek 8: Strukturální vzorec kyseliny 3-indolactové

primární třídy jsou cytokininy a gibereliny). [38] IAA je z auxinů navíc nejvíce fyziologicky aktivní. Běžně je produktem metabolismu L-tryptofanu, který je produkován několika mikroorganismy včetně PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Při experimentech s kyselinou indolactovou byl prokázán pozitivní efekt na růst rostlin a je tedy považována za látku podporující růst. [39] Tento objev byl uskutečněn při zkoumání vzorků lidské moči, jelikož v nízkých koncentracích se zde IAA přirozeně vyskytuje. Je toxická pouze po oxidativní dekarboxylaci. [38]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této práce se zabývá tvorbou navržených nosičových systémů, dále optimalizací metody enkapsulace a v neposlední řadě analýzou uvolňování jednotlivých složek. Byla zkoumána a proměřena rychlost uvolňování huminových látek z enkapsulovaných částic metodou UV-VIS spektrofotometrie. Dále bylo využito kapalinové chromatografie pro stanovení uvolňování kyseliny 3-indolactové z jádra částic v závislosti na čase. Bylo pozorováno také chování částic při opakovaném sušení a botnání ve vodě.

4.1. Použité chemikálie

Chitosan medium molecular weight (Sigma-Aldrich)

Lihnohumát (Amagro)

Alginát sodný (

Kyselina octová (Lach-Ner, s.r.o.)

TPP – sodium triphosphate pentabasic (Sigma-Aldrich)

Chlorid vápenatý dihydrát (Penta)

3-Indolacetic acid (Sigma Aldrich)

Vícesložkové hnojivo LOVOFERT NPK 20-8-8 (Lovochemie a.s. Lovosice)

Vícesložkové granulované hnojivo LOVOFERT NPK je složeno z KNO_3 , NH_4Cl , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, CaHPO_4 , NH_4NO_3 , CaF_2 , nerozpustné fosforečnany, H_2O . Tvoří šedobílé granule o velikosti 2 až 5 mm.

4.2. Použité přístroje

Enkapsulátor B-395 Pro BUCHI

Magnetické míchačky Variomag Poly a Heidolph MR HEI-Standard

Předvážky Scaltec SBC 31, Scaltec SBC 42

Lednička Gorenje

Analytické váhy Boeco DEU

Stereomikroskop SteREO Discovery v12 ZEISS

Spektrometr UV-VIS HITACHI

HPLC Agilent 1260 Infinity

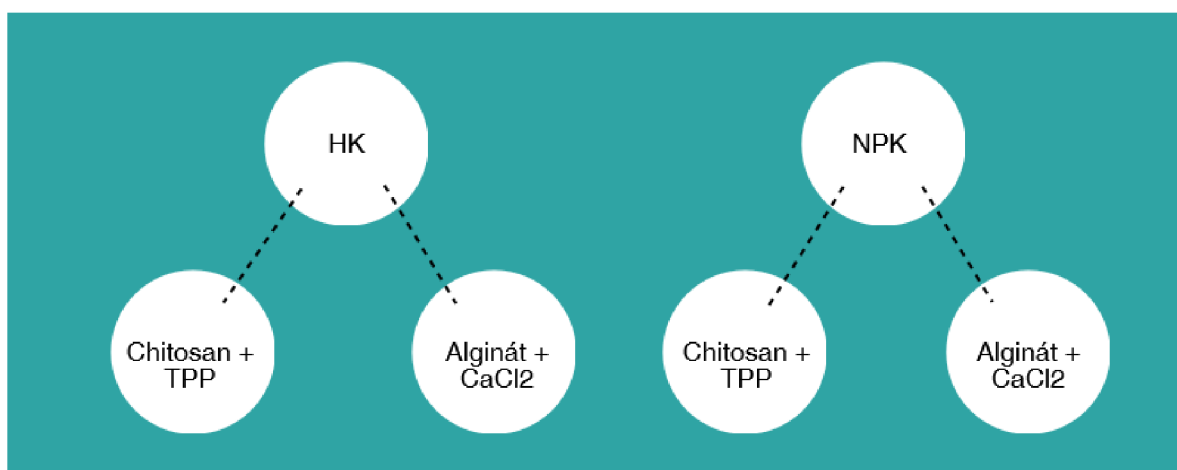
Lyofilizátor BenchTop 4K ZL

Rotační míchačka RW 16 basic IKA® – WERKE

TA Instruments Q5000

Tensiometr KSV SIGMA 701

4.3. Příprava mikroskopických perel



Obrázek 9: Logický rámeček přípravy částic

Myšlenkou návrhu složení připravovaných částic (Obrázek 9) bylo porovnat vícesložkové komerční hnojivo (NPK) s huminovými látkami. Práce se zabývala především možností přípravy a studiem fyzikálních vlastností enkapsulovaných částic.

Zásobní roztok chitosanu byl připravován rozpuštěním naváženého množství v 5% kyselině octové a mícháním minimálně 24 hodin. Perly byly připravovány pomocí enkapsulace na přístroji Encapsulator B-395 Pro. Pro přípravu částic byly používány tyto roztoky:

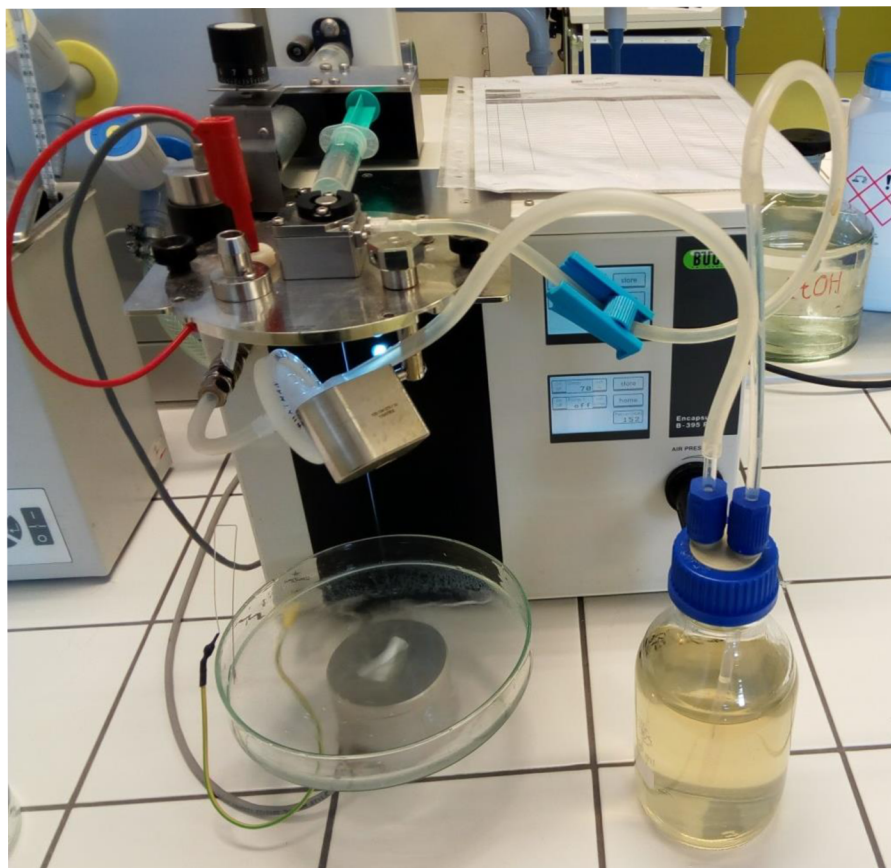
- 1% chitosan v 5% CH₃COOH
- 2% chitosan v 5% CH₃COOH
- 1% alginát sodný ve vodě
- 1% HK ve vodě
- 1% HK + 2% TPP ve vodě
- 1% HK + 2% CaCl₂ ve vodě

Trifosfát sodný byl použit jako vhodné síťovací činidlo chitosanu a chlorid vápenatý pro alginát. Roztoky chitosanu nebo alginátu byly protlačeny tryskou do druhého míchaného roztoku (Obrázek 10). Velikost trysky a nastavení enkapsulátoru bylo voleno na základě dlouhého procesu optimalizace. Bylo třeba dlouhého procesu pokus-omyl pro uzpůsobení procesu daným roztokům. Finální nastavení bylo s následujícími parametry:

Tabulka 1: Parametry enkapsulátoru

Parametr	Konkrétní nastavení
Frekvence	1 200 Hz
Elektroda	1 000 Hz
Míchání	70 %
Pumpa (třetí tryska)	19,5 ml/min
Tlak	350–400 mbar

Částice byly před další manipulací vždy ponechány minimálně 24 hodin v původních roztocích, do kterých byly enkapsulovány. Poté byly zfiltrány a uloženy do vody.



Obrázek 10: Ukázka enkapsulace

Byly provedeny následující kombinace enkapsulací:

VZ1: 1% HK + 2% CH

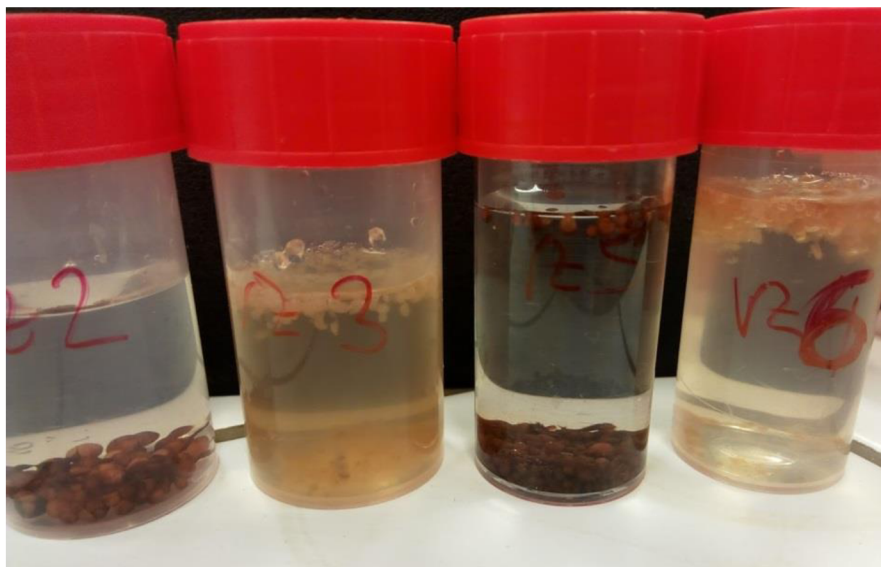
VZ2: 1% HK + 2% TPP + 2% CH

VZ3: 1% HK + 2% CaCl₂ + 2% Alg

VZ4: 1% HK + 1% CH

VZ5: 1% HK + 2% TPP + 1% CH

VZ6: 1% HK + 2% CaCl₂ + 1% Alg



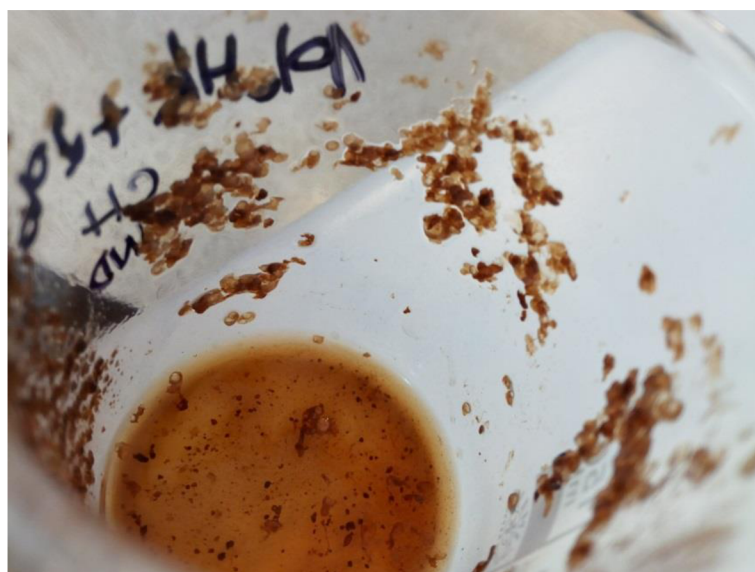
Obrázek 11: Vzorke enkapsulovaných částic uložených ve vodě

Pro vzorky s alginátem a 1% chitosanem byla použita tryska o průměru 450 mm. Pro 2% chitosan bylo třeba použít trysku o průměru 750 mm. Vizuálně nejlepší (pevnost a kompaktnost) byly vyhodnoceny vzorky VZ2 a VZ5. Z důvodu zachování jednotné velikosti perel byly pro další enkapsulace používány roztoky 1% chitosanu a tryska o průměru 450 mm. Vzorky bez síťovacích činidel byly pro svoji nekompaktnost z další činnosti také vyřazeny.

Kromě různých koncentrací, složení a nastavení enkapsulátoru byla vyzkoušena též příprava částic z nízkomolekulárního chitosanu. Pokud by docházelo k síťování polyelektrolytových komplexů jako u chitosanu se střední molekulovou hmotností, mohla by se ve fázi enkapsulace použít tryska s menším průměrem. To by mohlo značně ovlivnit další testované parametry.



Obrázek 12



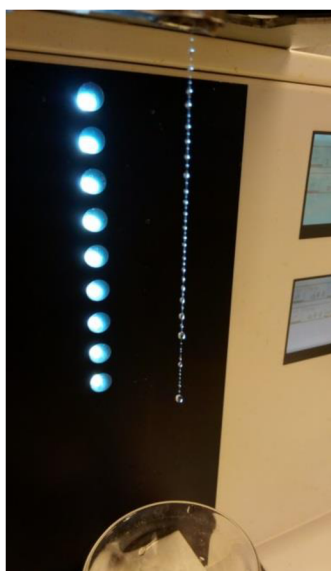
Obrázek 13: Částice z nízkomolekulárního chitosanu

Tato možnost se bohužel ukázala jako nepřijatelná, jelikož nízkomolekulární chitosan netvořil při enkapsulaci dostatečně pevné částice a vznikala sraženina, případně velmi nekompaktní a nepevné částice (Obrázek 12 a 13).

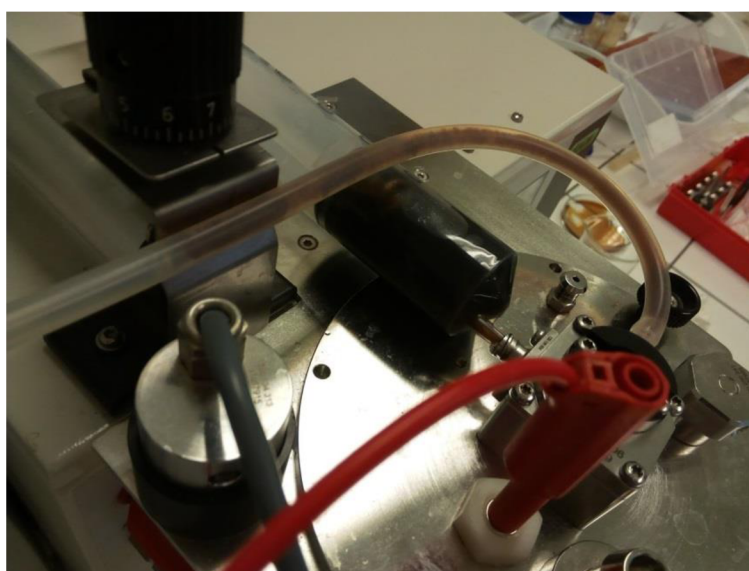
Dalším krokem bylo otestování využití třetí trysky a tvorba CS částic. Roztok huminových kyselin byl přiváděn pístovou stříkačkou do prostoru trysky. Byly otestovány tyto dvě kombinace:

- 1% HK + 2% TPP + 1% CH
- 1% HK + 2% CaCl₂ + 1% Alg

V tomto případě docházelo k síťování a tvorbě polyelektrolytových komplexů ještě uvnitř trysky (Obrázek 14 a 15). Tato varianta se tedy ukázala jako slepá ulička, nicméně třetí tryska byla otestována a funkční pro další experimenty.



Obrázek 15



Obrázek 14: Nežádoucí síťování a ucpávání trysky

4.4. Přídavek vícesložkového hnojiva

Vzhledem k potencionálnímu využití v zemědělství jsme pro porovnání účinku a chování huminových látek (viz Obrázek 9: Logický rámec přípravy částic) vyzkoušeli použití vícesložkového hnojiva LOVOFERT NPK 20-8-8. Granule NPK hnojiva bylo nutné před použitím rozmělnit v třecí misce s tloučkem a poté byly rozpouštěny ve vodě. Enkapsulací byly připravené následující kombinace perel:

- 1% NPK + 2% TPP + 1% CH
- 3% NPK + 2% TPP + 1% CH
- 1% NPK + 2% CaCl₂ + 1% Alg
- 3% NPK + 2% CaCl₂ + 1% Alg

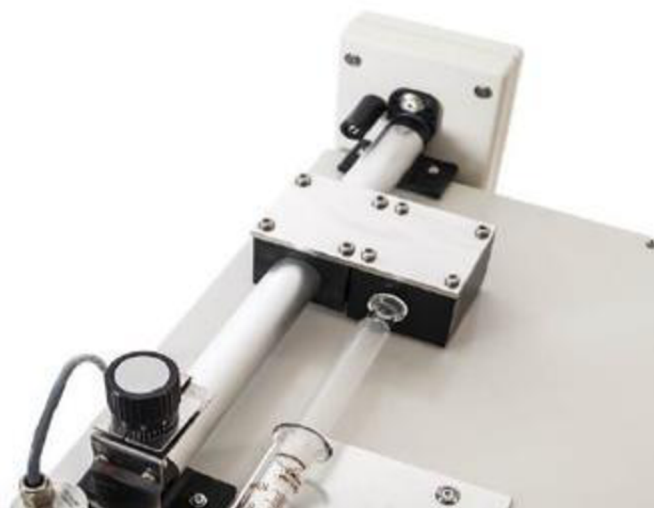
Mezi 1% a 3% koncentrací NPK nebyl pozorován vizuální rozdíl perel. Dále byly používány 1% roztoky NPK pro zachování stejné koncentrace jako u HK.

4.5. Příprava CS částic s kyselinou 3-indolactovou

0,1% roztok kyseliny 3-indolactové byl přiváděn pístovou stříkačkou do odlišného typu trysky o průměru 400 μm rychlostí 29,5 ml/min. Byly připravené následující kombinace:

- 1% HK + 2% TPP + 1% CH
- 1% HK + 2% CaCl_2 + 1% Alg
- 1% NPK + 2% TPP + 1% CH
- 1% NPK + 2% CaCl_2 + 1% Alg

Částice se na první pohled nijak vizuálně nelišily od předchozích experimentů. Dalším krokem bylo testování uvolňování kyseliny 3-indolactové z částic do vody. Tato problematika je podrobně popsána v kapitole 5.3.2.



Obrázek 16: Stříkačková pumpa pro přípravu CS částic

4.6. Optimalizované vzorky

Po sérii optimalizačních experimentů byly pro podrobné analýzy vybrány částice s obsahem chitosanu pro svoji kompaktnost. Konkrétní složení vzorků je znázorněno níže. Byl vybrán zástupce bez obsahu aktivní látky (VZ7), částice s obsahem NPK (VZ8), částice s obsahem huminových látek (VZ9) a částice pouze s kyselinou 3-indolactovou bez jakékoli formy hnojiva (VZ10).

VZ7: 1% CH + 2% TPP + 1% HK

VZ8: 1% CH + 2% TPP + 1% NPK + IND

VZ9: 1% CH + 2% TPP + 1% HK + IND

VZ10: 1% CH + 2% TPP + IND

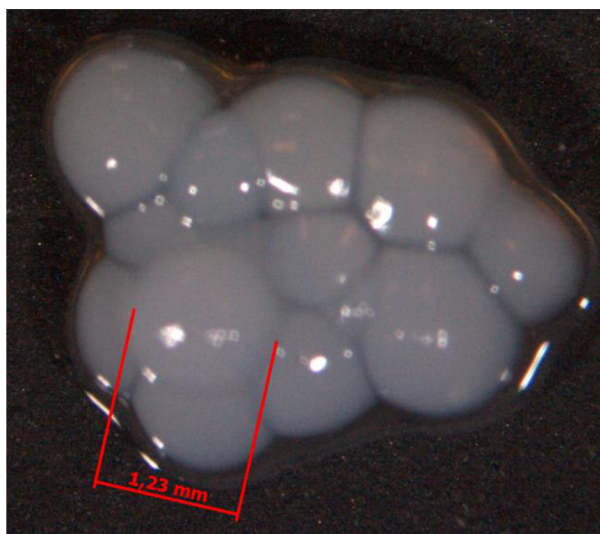
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Strukturní charakterizace

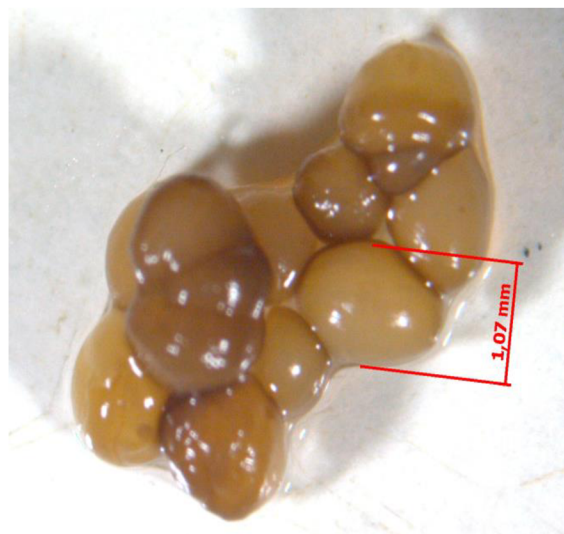
K vizualizaci připravených částic byla využita metoda stereomikroskopie, která umožňuje získávat vysoce kontrastní obraz s minimem odlesků a geometrických zkreslení. Lidské oči a mozek fungují společně a vytvářejí to, čemu říkáme stereoskopické vidění (3D obraz). Je to z důvodu interpretace dvou trochu odlišných obrázků, které mozek obdrží z obou sítnic. Průměrně jsou od sebe lidské oči vzdálené 64–65 milimetrů a každé z nich vidí objekt z trochu jiného úhlu. V mozku jsou obrázky spojeny do jednoho a vidíme prostorově. Právě toho využívá stereomikroskop.

Stereomikroskopy můžeme rozdělit do dvou základních skupin, z nichž každá má své výhody i nevýhody. Nejstarší systém stereomikroskopu, pojmenovaný po jeho vynálezci Greenough, využívá oddělené tubusy, které produkují stereo efekt. Novější systém spojuje jeden velký objektiv, který je sdílen párem tubusů a systémem čoček. Oba druhy mohou být vybaveny individuálními čočkami pro různá zvětšení.[40]

Vzorky byly foceny pomocí stereomikroskopu SteREO Discovery v12 ZEISS. Snímky byly pořizovány v mokřém i suchém stavu, kterého bylo dosaženo sušením na vzduchu, nebo lyofilizací.

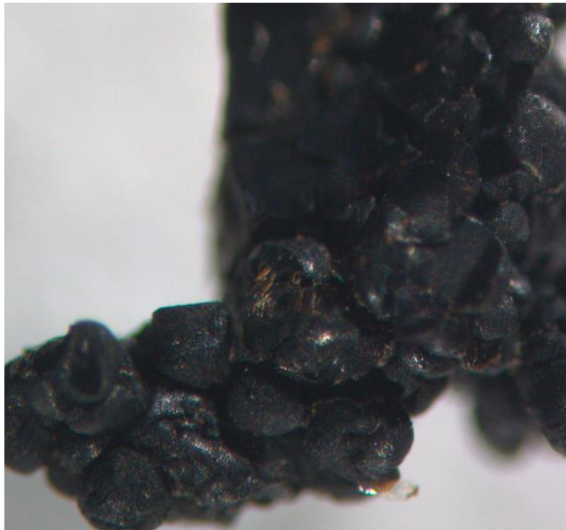


Obrázek 18: VZ10 v mokřém stavu

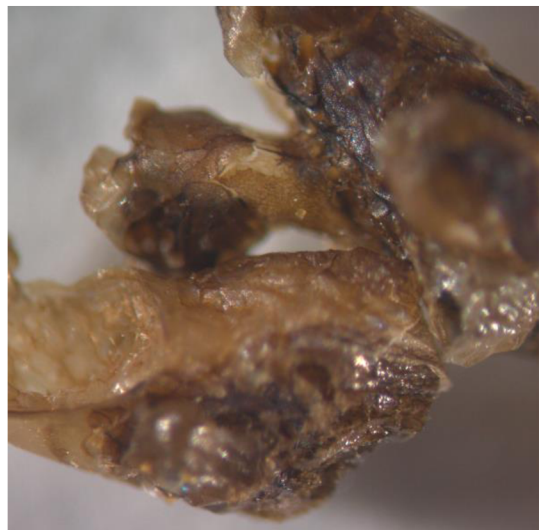


Obrázek 17: VZ7 v mokřém stavu

Obrázek 17 a 18 znázorňuje ukázkou vzorků v mokřém stavu po enkapsulaci. Rozměry jednotlivých částic se liší v závislosti na složení. Homogenita částic je úzce spjata s nastavením parametrů enkapsulátoru a udržení takzvaného ideálního kuželu roztoku chitosanu.

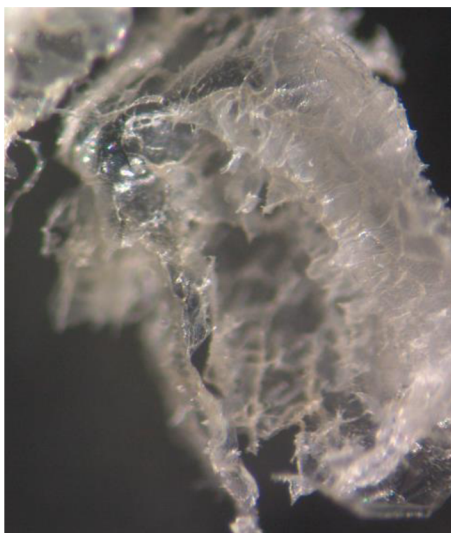


Obrázek 21: Sušení na vzduch VZ9

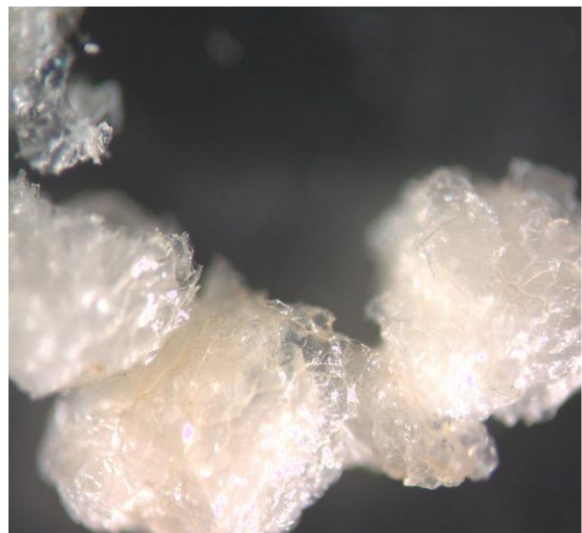


Obrázek 19: Lyofilizace vzorek VZ9

Na Obrázku 19 a 21 vidíme porovnání sušení na vzduchu a lyofilizace u vzorků s obsahem huminových kyselin a kyseliny indolactové. Vzorky se již na první pohled liší. Lyofilizované částice mají světlejší barvu, nicméně dochází k rozsáhlejšímu vizuálnímu poškození struktury. U vzorku sušeného na vzduchu můžeme jasně identifikovat jednotlivé enkapsulované částice. Bohužel nebylo možné získat rozměry jednotlivých částic (jako u vzorků v mokřém stavu), jelikož při požáru laboratoře došlo k nenávratnému poškození počítače s příslušným softwarem. Tato skutečnost zapříčinila i velmi omezený výběr fotografií pro tuto diplomovou práci. Většina záznamů byla zničena.



Obrázek 22: Sušení na vzduchu VZ10



Obrázek 20: Lyofilizace VZ10

U vzorků bez huminových látek (Obrázky 20 a 22) nejsou patrné po sušení na vzduchu a po lyofilizaci tak zásadní vizuální rozdíly.

5.2. Sušení a botnání

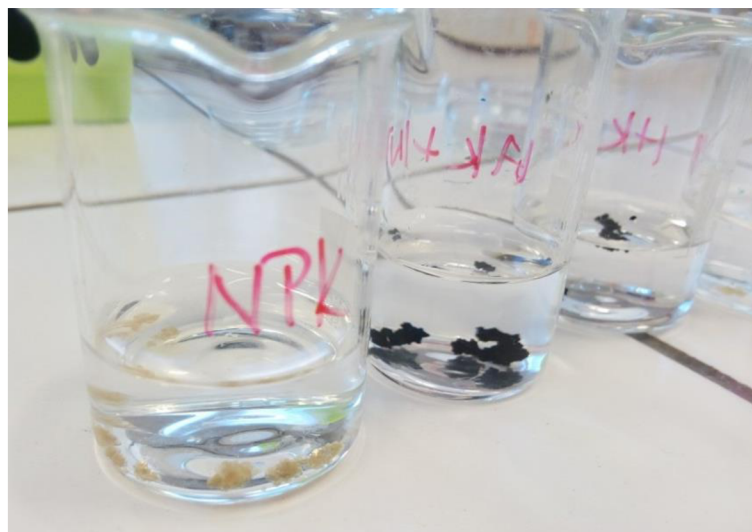
5.2.1. Vzorčky sušené na vzduchu

Z důvodu očekávaného aplikačního potenciálu v půdách bylo testováno opakované sušení a botnání částic ve vodě. Tak jak by k tomu mohlo docházet v přírodních podmínkách. Vzorčky byly zváženy (hmotnost m_0), umístěny na petriho misky a vloženy do sušárny. Tam byly ponechány při 40 °C po dobu minimálně 12 hodin. Poté byly opět zváženy a uloženy do 10 ml vody (Obrázek 23). Po dalších minimálně 12 hodinách byly z vody odfiltrovány a opět zváženy. Tento postup byl několikrát opakován. Naměřené hodnoty znázorňuje tabulka níže.

Tabulka 2: Sušení na vzduchu a botnání

Sušení a botnání							
vzorek	m_0 [g]	1. sušení [g]	1. botnání [g]	%	2. sušení [g]	2. botnání [g]	%
VZ8	0,94	0,07	0,14	14,9	0,07	0,11	11,7
VZ10	0,94	0,05	0,14	14,9	0,05	0,11	11,7
VZ9	1,11	0,08	0,15	13,5	0,07	0,11	9,9
VZ7	0,96	0,07	0,13	13,5	0,07	0,11	11,5

Jak je patrné ze získaných dat, vzniklé částice se chovají jako ireverzibilní gely. K zpětnému botnání nedochází téměř vůbec. Vysušené vzorčky svoji hmotnost sice přibližně čtyřikrát znásobí, ale při porovnání s hmotností původního vzorku získáváme pouze 10–15 % (Tabulka 2). Jednotlivé částice s různým složením se v této vlastnosti nijak výrazně neliší.

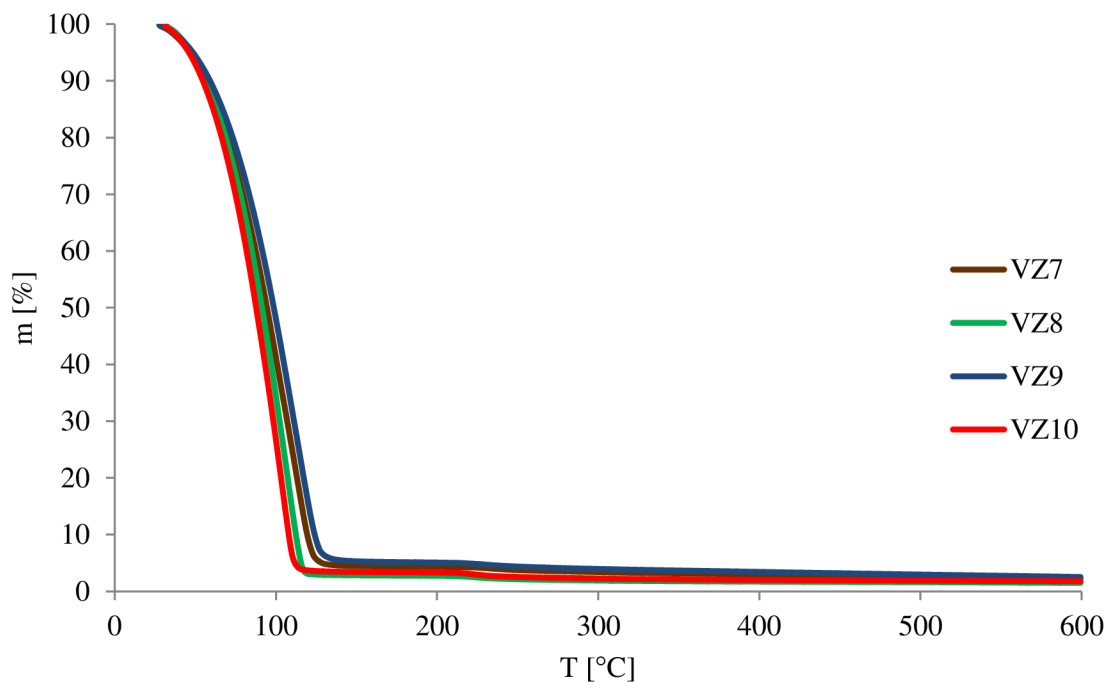


Obrázek 23: Botnání enkapsulovaných částic

5.2.2. Termogravimetrická analýza

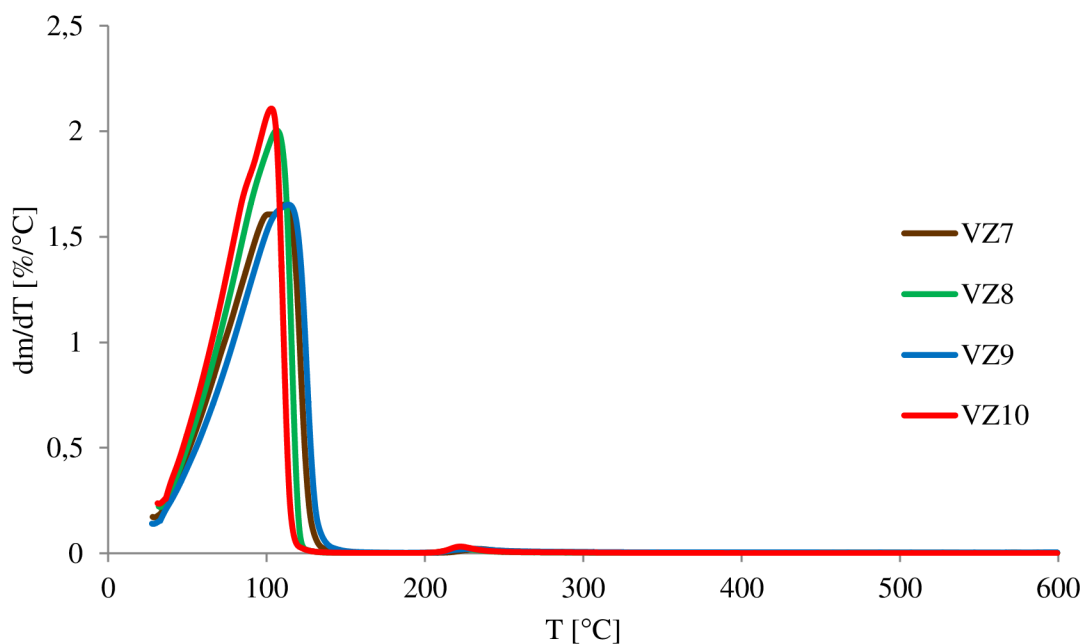
Pro jasnější představu o průběhu procesu sušení jsme provedli dynamickou termogravimetrickou analýzu. Probíhala v prostředí oxidační atmosféry (vzduchu) a teplota byla zvyšována rychlostí 10 °C/min v rozmezí 25–600 °C. Po této teplotě již nedochází u vzorků k žádným dalším změnám.

Při vizuálním hodnocení závislosti hmotnosti jednotlivých vzorků na teplotě (Obrázek 24) se jeví průběh sušení u všech stejný. To potvrzuje první experiment sušení v sušárně.



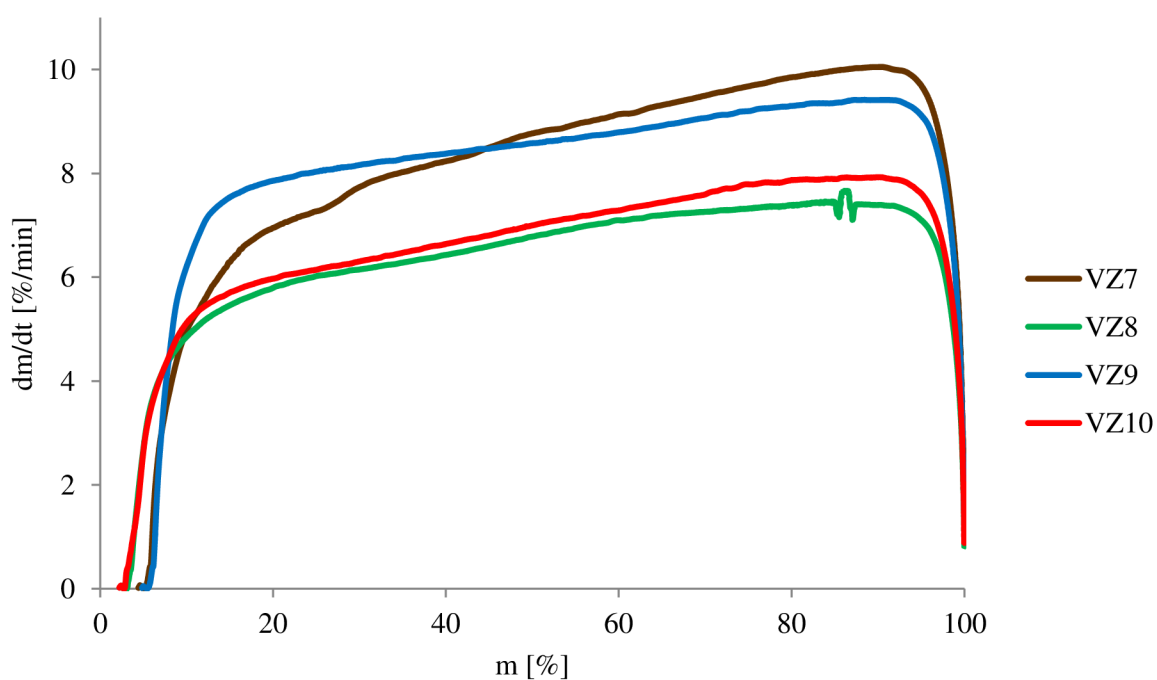
Obrázek 24: Úbytek hmotnosti se zvyšující se teplotou

Nicméně při vynesení závislosti derivace hmotnosti podle teploty vidíme, že nějaké odlišnosti v rychlosti sušení jednotlivých vzorků tam jsou (Obrázek 25). Vzorky bez huminových kyselin dosahují vyšších hodnot již při nižších teplotách. Je tedy možné, že drží vodu pevněji, případně obsahovaly již na počátku více vody. Mez stability je u všech vzorků téměř stejná. To je dáno nejlabilnější složkou částic (pravděpodobně chitosanem). Počátek termického rozkladu je možné pozorovat v oblasti okolo 230 °C.



Obrázek 25: Rychlost úbytku hmotnosti částic o různém složení

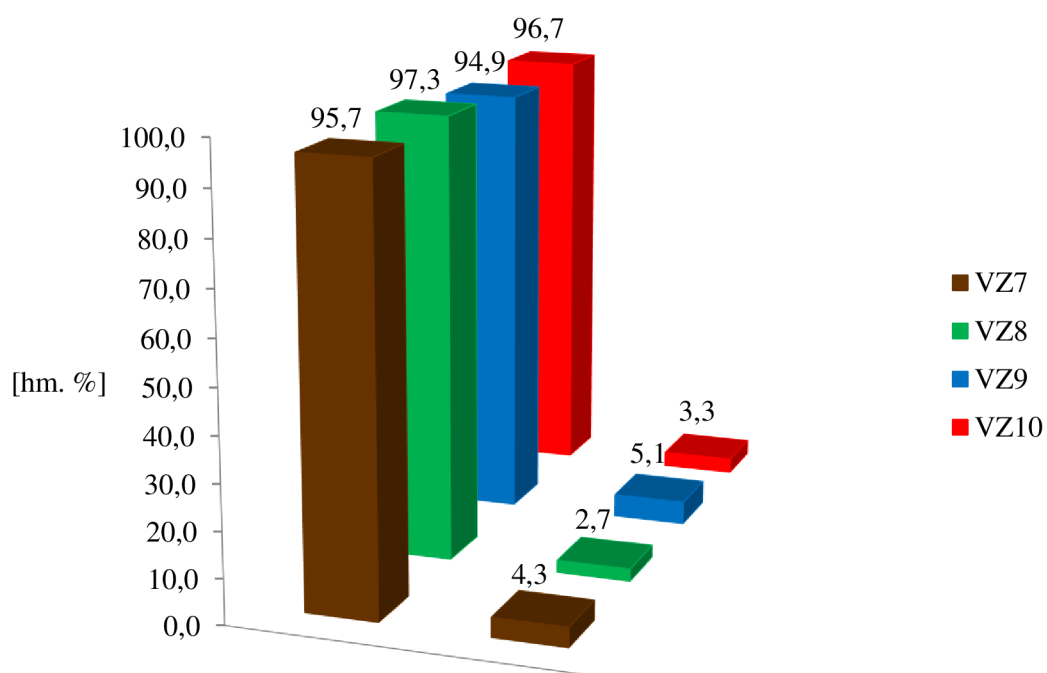
Pro kompletní představu o vázané vodě v připravených částicích byla provedena statická termogravimetrická analýza. Vzorky byly měřeny izotermálně při 70 °C po dobu 40 minut. Jak je vidět v grafu (Obrázek 26), složení částic zásadním způsobem hydrataci neovlivňuje. Odpověděli jsme si navíc na otázku, proč je rychlost úbytku hmotnosti některých vzorku vyšší. Je to způsobeno odlišným celkovým množstvím vody ve vzorku, ale voda není pevněji vázána (Tabulka 3).



Obrázek 26: Statická termogravimetrická analýza

Tabulka 3: Výsledné parametry jednotlivých vzorků

	Obsah sušiny [hm. %]	Obsah vody [%]
VZ7	4,3	95,7
VZ8	2,7	97,3
VZ9	5,1	94,9
VZ10	3,3	96,7

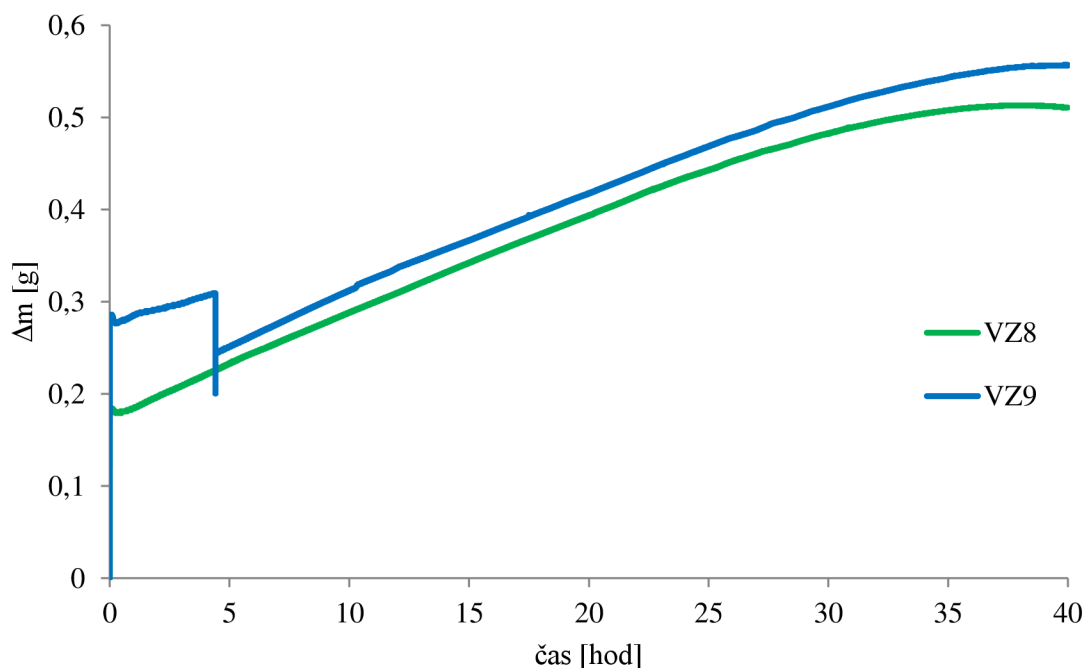


Obrázek 27: Grafické znázornění Tabulky 3 (množství sušiny a vody v jednotlivých vzorcích)

Vzorky bez huminových kyselin (VZ8 a VZ10) prokazují o něco menší množství sušiny než vzorky s huminovou složkou (VZ7 a VZ9). Z tohoto důvodu prokazují i o něco málo vyšší množství vody.

5.2.3. Vzorky sušené lyofilizací

Lyofilizované vzorky bylo nutné proměřit jinou metodou, jelikož neznáme počáteční hmotnost, a protože vzorků bylo omezené množství velmi malých hmotností. Analýzou stejnou metodou by vznikla velká chyba při vážení. Z tohoto důvodu byla pro lyofilizované vzorky zvolena metoda tenziometrie. Vzhledem k náročnosti lyofilizace byly vybrány pouze dva reprezentativní vzorky.



Obrázek 28: Přírůstek hmotnosti systému s lyofilizovanými vzorky

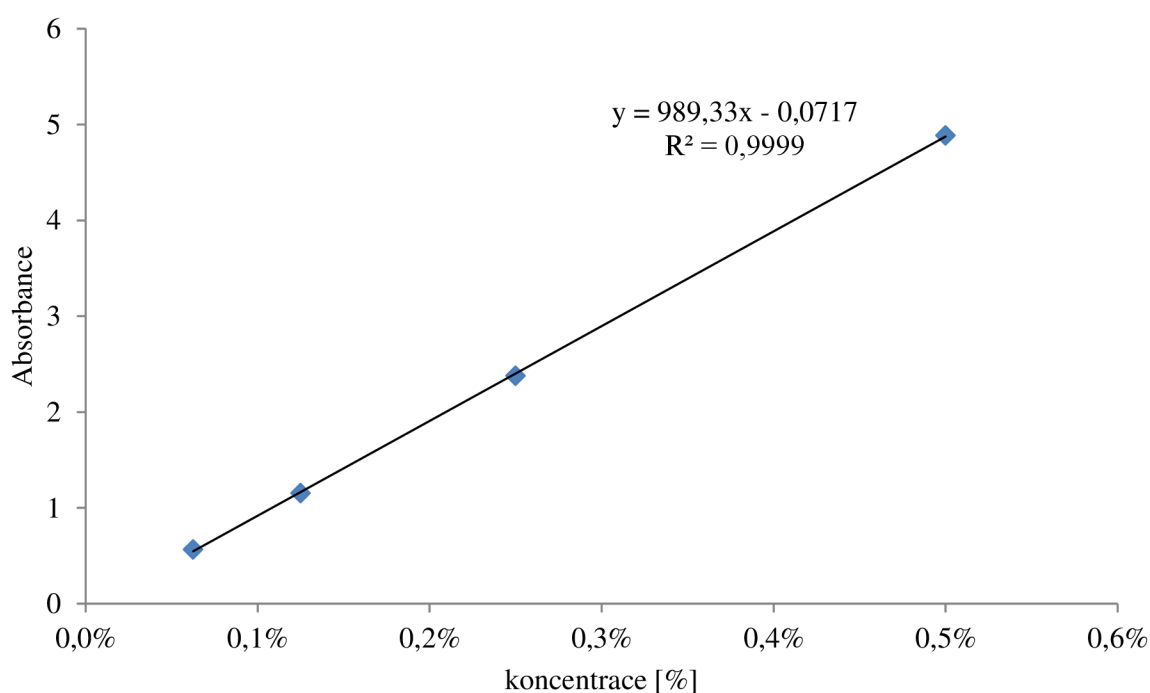
Na analytických vahách bylo 0,4 mg lyofilizovaných vzorků s kyselinou 3-indoloctovou. Tyto vzorky byly umístěny na fritu ponořenou do vody a byla zaznamenávána jejich narůstající hmotnost pomocí tenziometru po dobu 40 hodin. Rozdíl v nasákavosti vzorků s NPK a HK není výrazný, nicméně ve srovnání s botnáním vzorků sušených na vzduchu je rozdíl značný. Obrázek 28 znázorňuje přírůstek hmotnosti celého systému (frity i částic). V prvních pěti hodinách je u vzorku s HK vidět dvojitě ustalování. K tomuto jevu došlo důsledkem posunu vzorku pro optimalizaci výšky hladiny vody.

Vzorek s NPK navýšil svoji hmotnost o 0,511 g a vzorek s HK o 0,556 g. Tímto experimentem jsme potvrdili předpoklad o výrazně vyšší schopnosti botnání gelů při vysušení pomocí lyofilizace.

5.3. Sledování uvolňování aktivních látek

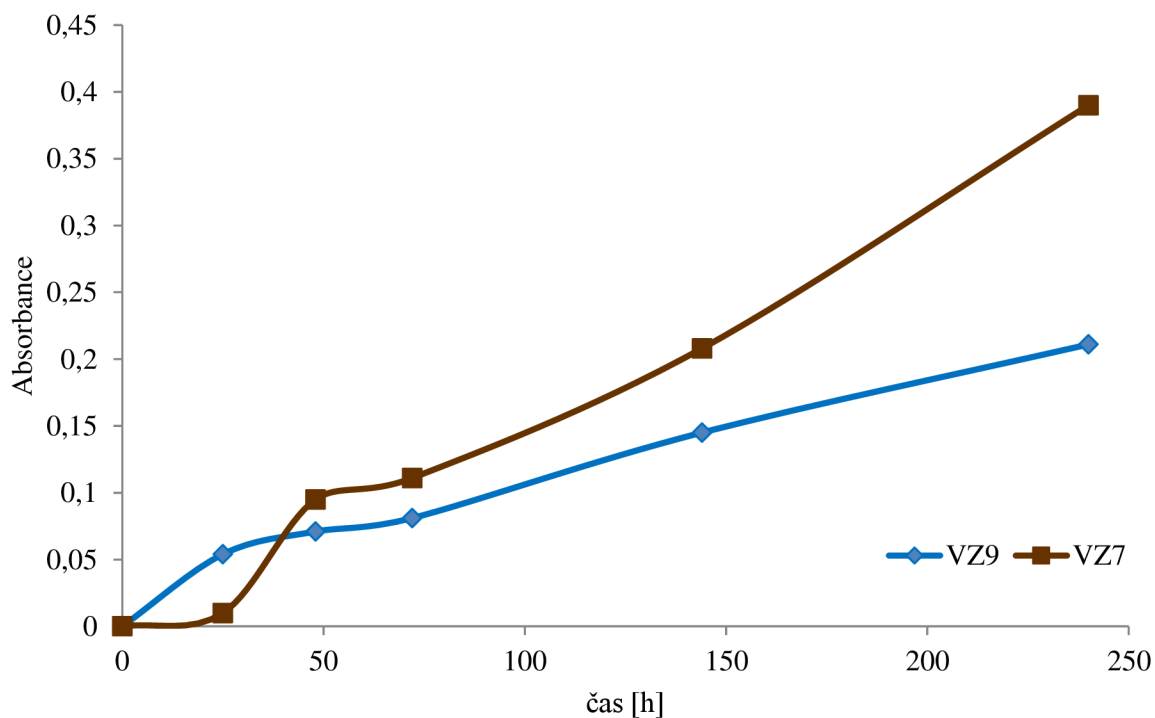
5.3.1. Uvolňování huminových kyselin

Metodou studia uvolňování lignohumátu z připravených gelových částic byla zvolena UV-VIS spektroskopie. Pro vyhodnocení uvolněného množství bylo třeba sestavit kalibrační řadu. Byly připraveny kalibrační roztoky s definovaným množstvím lignohumátu ve vodě. Práškový lignohumát byl rozpuštěn ve 100 ml vody, tak aby výsledná koncentrace roztoku byla 0,2 g/l. Další kalibrační roztoky byly připraveny postupným ředěním. Takto připravené roztoky byly proměřené na spektrofotometru. V programu MS Excel byl sestaven graf závislosti absorbance (při 465 nm) na koncentraci a byla získána rovnice regresní přímky. Pomocí té se následně určovaly koncentrace uvolněného lignohumátu v jednotlivých vzorcích.



Obrázek 29: Kalibrační řada HK ve vodě

Jednotlivé vzorky byly postupně umísťovány do mikrokyvety. Byla proměřená spektra v rozsahu vlnových délek 400–800 nm. Hodnoty absorbance byly odečítány při vlnové délce 465 nm a dále zpracovávány pomocí programu MS Excel. Výsledky jsou diskutované níže.



Obrázek 30: Uvolňování HK z enkapsulovaných částic v čase

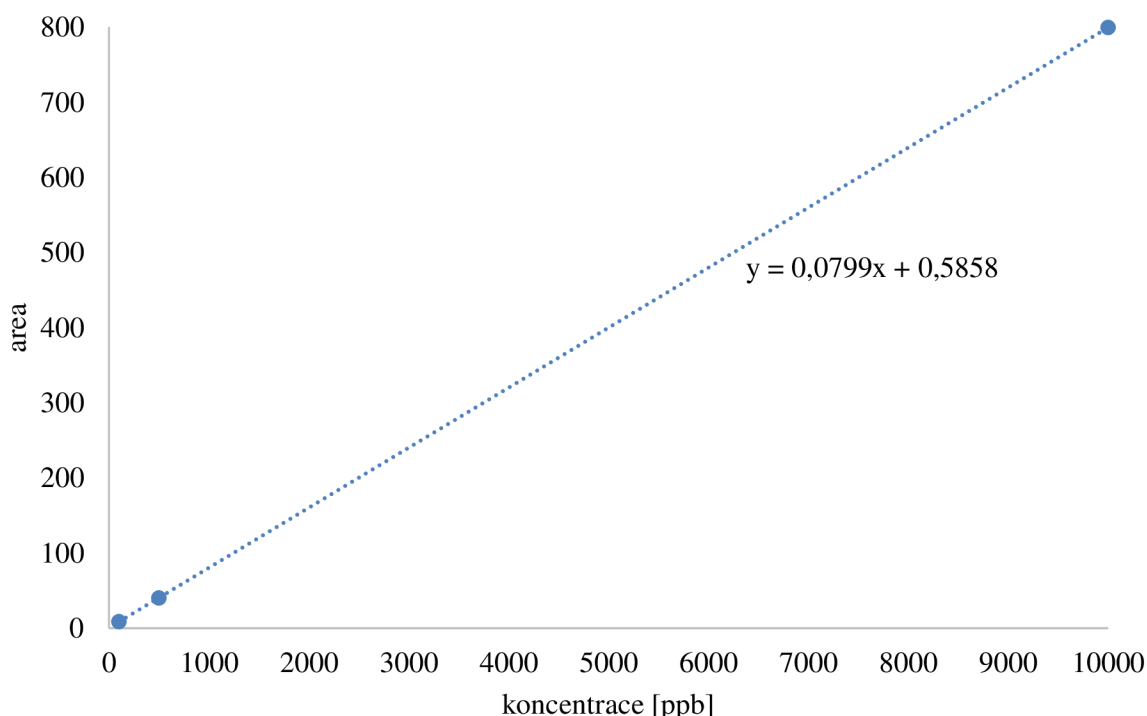
Po přibližně dvou dnech pozorujeme ustálení rychlosti uvolňování u obou typů měřených částic. Při ukončení experimentu bylo množství uvolněných huminových látek ve vodě přibližně 0,05 hmotnostních procent. Důležitým poznatkem plynoucím z tohoto experimentu je schopnost částic uvolňovat huminové látky do vody v módu pozvolného dlouhodobého uvolňování.

5.3.2. Uvolňování kyseliny 3-indoloctové

Pro stanovení množství uvolněné kyseliny 3-indoloctové byla zvolena metoda využívající HPLC s DAD detekcí prostřednictvím UV-VIS spektrofotometru. HPLC Agilent 1260 Infinity, na kterém byly separace realizovány, je sestavený z 10 mm absorbní cely, kvarterní pumpy, heliového degaséru, chlazeného autosampleru a z detektoru s diodovým polem. Vlastní analýza proběhla při laboratorní teplotě (25 °C) na koloně typu Kinetex EVO C18, velikosti 150 mm x 4,6 mm s velikostí částic 2,6 µm.

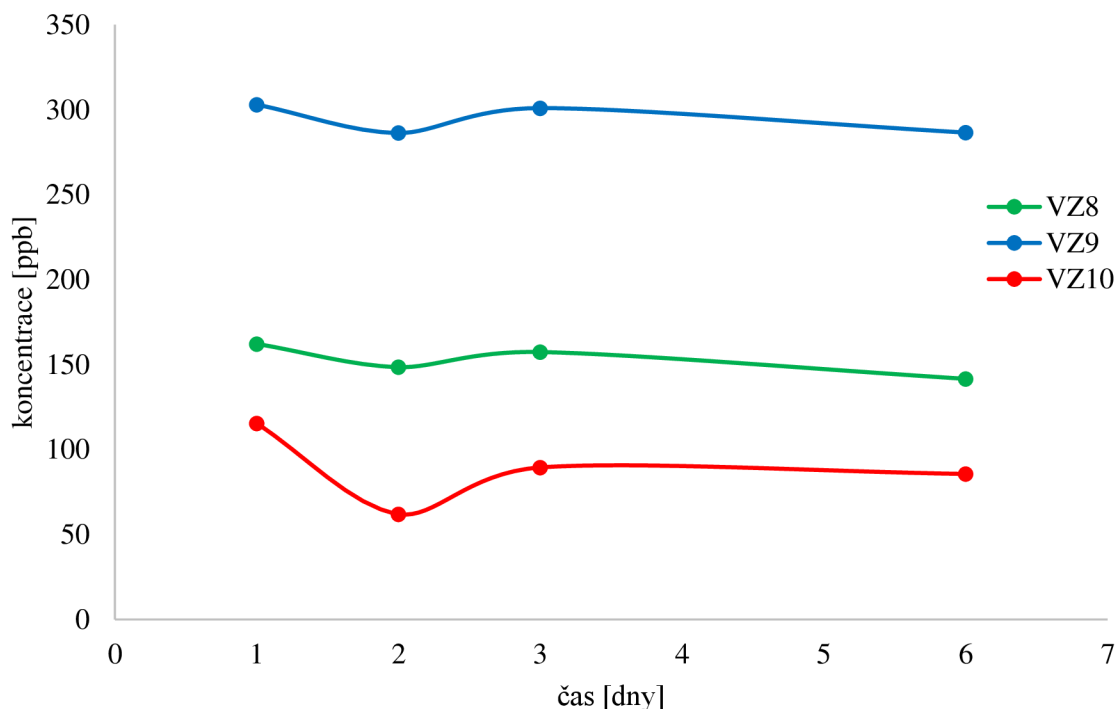
Mobilní fáze byla směsí vody a methanolu v poměru 55:45. Každý vzorek byl před chromatografií přefiltrován přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm. Pro zpracování získaných dat byl použit software Agilent Chemstation a vyhodnocení bylo provedeno v programu MS Excel.

Pro získání výsledků bylo nutné připravit a proměřit standardizovaný roztok a kalibrační řadu. Jako standard byla zvolena koncentrace 100mg/l. Přesně definované množství kyseliny 3-indoloctové bylo naváženo na analytických vahách a rozpuštěno ve vodě. Takto připravený roztok byl proměřen pomocí HPLC. Z naměřených dat byly odečítané plochy píků, které odpovídaly retenčnímu času kyseliny 3-indoloctové při charakteristické vlnové délce $\lambda=282$ nm. Poté byla v programu MS Excel vynesena závislost ploch píků na koncentraci příslušného vzorku kalibrační řady a získali jsme rovnici lineární regrese, která byla použita k dalším výpočtům.



Obrázek 31: Kalibrační řada kyseliny 3-indoloctové

Byla měřeno uvolňování kyseliny 3-indoloctové do vody z enkapsulovaných perel o různém složení. Vzorke byly odebrány v průběhu šesti dnů z nádobek umístěných na rotační míchačce. V každé nádobce bylo 2,5 g enkapsulovaných částic a 25 ml destilované vody. Průběh uvolňování je znázorněn v následujících grafech.



Obrázek 32: Uvolňování kyseliny 3-indoloctové z částic o různém složení

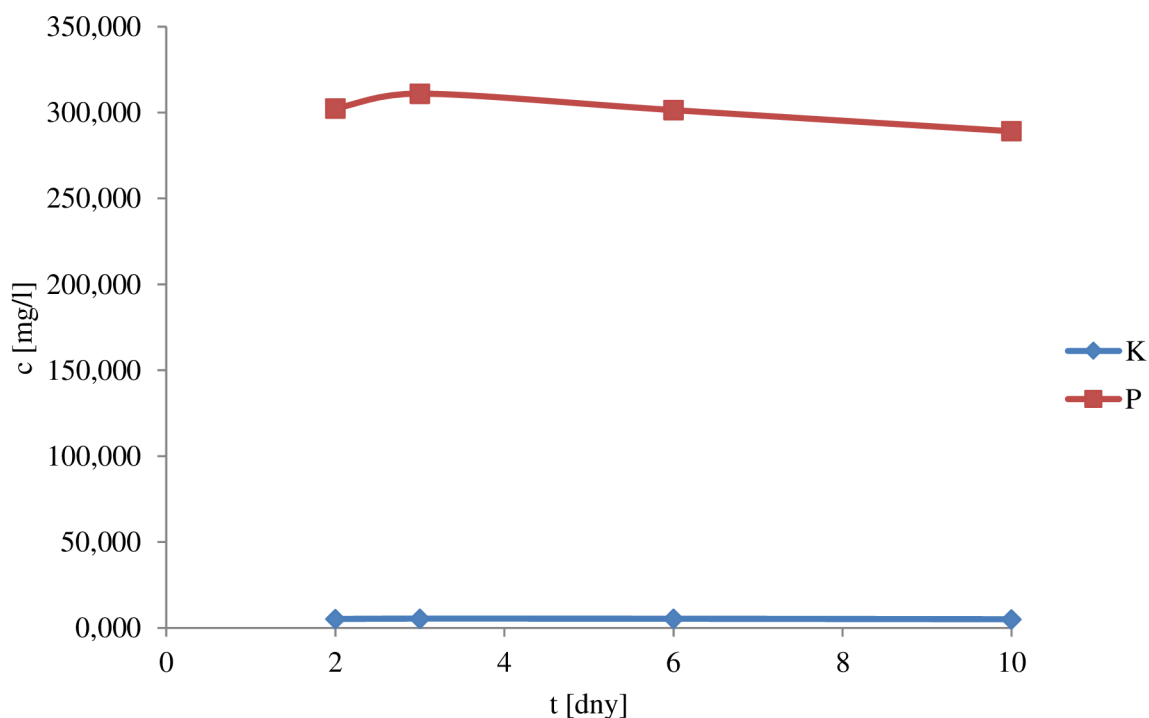
Jak je patrné, kyselina 3-indoloctová je v částicích velmi pevně vázaná a k uvolňování dochází v čase zcela minimálně. Nepozorujeme tedy mód postupného uvolňování. Mezi vzorky bez NPK a s NPK nejsou patrné žádné zásadní rozdíly. NPK částečně napomáhá uvolňování modelové aktivní látky. U částic obsahujících huminové látky sice nedochází ke změně průběhu uvolňování, nicméně je zde patrný synergický efekt s kyselinou indoloctovou. Naměřené hodnoty se totiž řádově liší. To je velmi zajímavý jev, který nabádá k hlubšímu zkoumání mechanismu uvolňování.

Jako další krok bych navrhovala otestovat jaké bude uvolňování aktivní látky v přítomnosti půdních enzymů. Je možné, že námi pozorovaný jev byl způsoben právě čistě vodným prostředím. Celá tato část je hledáním správné cesty, jak připravené částice analyzovat, abychom mohli metodu přípravy ještě lépe optimalizovat.

Není možné určit efektivitu uvolňování, protože neumíme stanovit celkovou koncentraci kyseliny 3-indoloctové v konkrétních částicích. Avšak bylo by možné využít poměru koncentrací dávkovacího roztoku kyseliny 3-indoloctové a uvolněného množství z připravených částic (které zůstává přibližně stejné v rozmezí 1–6 dnů). Tato informace nám dává představu o tom, jak je třeba upravit koncentraci kyseliny 3-indoloctové v dávkovacím roztoku, aby bylo dosaženo požadované koncentrace při uvolňování. Případně jaké množství částic bychom měli do půdy umístit, aby se uvolňovalo ideální množství aktivní látky.

5.3.3. Uvolňování draslíku a fosforu

Zajímavým parametrem, kterým jsme chtěli tuto analýzu připravených částic doplnit, je uvolňování draslíku a fosforu ze vzorků obsahující NPK hnojivo. Měření byla prováděna na přístroji ICP-OES Horiba Jobin Yvone, typ Ultima 2 s radiálním uložením plazmového hořáku pro částice uložené ve vodě v intervalech 2, 3, 6 a 10 dní. Plazmovým plynem byl argon. Draslík byl měřen na vlnové délce 766,49 nm, fosfor na vlnové délce 213,62 nm. Výkon radiofrekvenčního generátoru byl 1250 W, otáčky peristaltické pumpy 18 ot./min, průtok plazmového plynu 14 l/min a průtok stínícího plynu 0,7 l/min. Kalibrace byla v rozsahu koncentrací 0,5 - 1 - 5 - 10 - 50 mg/l.



Obrázek 33: Uvolňování draslíku a fosforu z připravených částic v čase

Naměřené hodnoty (Tabulka 4 i Obrázek 33) vypovídají o téměř totožném uvolňování složek draslíku a fosforu v průběhu deseti dnů. Tohoto poznatku by bylo možné využít obdobně jako u kyseliny 3-indolactové. Tedy na základě poměru koncentrace výchozího roztoku a uvolněného množství navrhnout optimální dávkování pro požadované koncentrace.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty uvolněného draslíku a fosforu

čas [dny]	Draslík [mg/l]	Fosfor [mg/l]
2	5,235	302,457
3	5,429	311,047
6	5,359	301,456
10	5,076	289,127

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala návrhem modelů hydrogelových nosičových systémů a jejich přípravou pomocí metody enkapsulace. Byla provedena literární rešerše týkající se této metody a použití vybraných modelových materiálů. Konkrétně se jednalo o huminové látky, chitosan, vícesložkové NPK hnojivo a kyselinu 3-indolactovou. Výzkum navazoval na bakalářskou práci zabývající se podobnými hydrogely v makroměřítku. Na základě těchto zkušeností a zmíněné rešerše byl vytvořen návrh logického rámce experimentů.

Postupnou optimalizací metody a práce s komerčním enkapsulátorem byly připraveny vybrané hydrogelové částice. Ty byly dále analyzovány především ve třech směrech. Prvním z parametrů byla vizuální stránka připravených částic, která byla hodnocena prostřednictvím fotografií ze stereomikroskopu. Bohužel většina dat byla zničena při požáru v laboratoři a nebylo možné je do diplomové práce zahrnout.

Dalším směrem byla analýza vlastností částic při sušení a botnání. Sušení bylo prováděno na vzduchu i pomocí lyofilizace. Botnání částic sušených na vzduchu bylo pozorováno v nádobkách s vodou a následným vážením. Pro komplexnější analýzu průběhu sušení na vzduchu byla proměřena statická i dynamická termogravimetrická spektra. Průběh sušení se v závislosti na složení částic nijak zásadně nemění. Pro lyofilizované vzorky byla zvolena metoda tenziometrie z důvodu předpokládané velké chyby při vážení. Výsledkem těchto experimentů bylo ověření výrazně vyšší nasákavosti částic vysušených metodou lyofilizace.

Poslední důležitou částí byla analýza uvolňování jednotlivých komponentů z připravených částic. Bylo studováno množství huminových látek uvolňovaných zpět do vody pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie. Dále bylo analyzováno množství uvolněné kyseliny indolactové do vody. Tato měření byla prováděna prostřednictvím metody HPLC s DAD detektorem. Uvolňování obou těchto složek bylo studováno v časovém intervalu 1–6 dní. Na rozdíl od uvolňování huminových látek je kyselina 3-indolactová v částicích pevně vázána a k postupnému uvolňování nedochází. Zajímavým faktem je synergický efekt huminových kyselin a kyseliny 3-indolactové, která se v jejich přítomnosti uvolňuje v řádově vyšším množství. V částicích obsahujících NPK hnojivo bylo proměřeno uvolňované množství draslíku a fosforu v čase. Oba tyto prvky se uvolňují v průběhu deseti dnů téměř konstantně. Tohoto jevu by bylo možné využít pro přípravu částic s uvolňováním aktivních látek v požadovaném množství pro konkrétní aplikační využití.

Přínos práce vidím především v optimalizaci vybrané metody a fyzikálně-chemickém zhodnocení připravených částic. Zmíněné analýzy přirozeně nepokrývají všechny parametry nutné pro aplikaci do praxe, nicméně poskytují důležitý přehled o možných dalších směrech výzkumu. Jako jeden z následných vhodných kroků bych navrhovala otestování enzymatického rozkladu částic a uvolňování jednotlivých složek při těchto podmínkách.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] **Lee, Kuen Yong, Park, Win Ho a Ha, Wan Shik.** *Polyelectrolyte Complexes of Sodium Alginate with Chitosan or Its Derivatives for Microcapsules.* 1996. str. 8.
- [2] **Celeste, Salvatore Albert.** *Microencapsulated delivery system.* US 2011/0177141 A1 US, 21. Jul 2011.
- [3] **Singh, M. N., a další, a další.** Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences.* 2010, 5, stránky 65-77.
- [4] **Schoebitz, Mauricio, Lopéz, Maria D. a Roldán, Antonio.** Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agron.Sustain.Dev.* 2013, 33, stránky 751-765.
- [5] **Tomaszewska, Maria a Jarosiewicz, Anna.** Encapsulation of mineral fertilizer by polysulfone using a spraying method. *Desalination.* 2006, 198.
- [6] **Gupta, Piyush, Vermani, Kavita a Garg, Sanjay.** Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug discovery today.* 2002, Sv. 7, 10.
- [7] **Hoffman, Allan S.** Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012, 64.
- [8] **Madras, Giridhar a Mccoy, Benjamin J.** Kinetics and dynamics of gelation reactions. *Chemical engineering Science.* 2007, 62, stránky 5257-5263.
- [9] **Sefcik, J., a další, a další.** Kinetics of aggregation and gelation in colloidal dispersions. *Chemical Engineering Research and Design.* 2005, 83, stránky 926-932.
- [10] **Berger, J., a další, a další.** Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2004, 57, stránky 35-52.
- [11] **Bartovská, Lidmila a Šišková, Marie.** *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav.* Praha : Vydavatelství VŠCHT, 1999. 80-7080-337-1.
- [12] **Jamnonkan, Tongchai a Kaewpirom, Supranee.** *Potassium Release Kinetics and Water Retention of Controlled-Release Fertilizers Based on Chitosan Hydrogels.* 18, Springer Science+Business Media, 2010, J Polym Environ, stránky 413-421.
- [13] **Junping, Zhang, a další, a další.** Preparation, Swelling Behaviors, and Slow-Release Properties of a Poly(acrylic acid-co-acrylamide)/Sodium Humate Superabsorbent Composite. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2006, 45, stránky 48-53.

- [14] **Rashidzadeh, Azam a Olad, Ali.** Slow-released NPK fertilizer encapsulated by NaAlg-g-poly(AA-co-AAm)/MMT superabsorbent nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 114, stránky 269-278.
- [15] **Wu, Lan a Mingzhu, Liu.** Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. *Carbohydrate Polymers*. 2008, 72, stránky 240-247.
- [16] **Atiyeh, R.M., a další, a další.** The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*. 2002, Sv. 84.
- [17] **Klocking, Renate a Helbig, Bjorn.** *Medical Aspects and Applications of Humic Substances*. Weinheim : WILEY-VCH, 2005. 3-527-31154-8.
- [18] **Pivokonský, Martin, a další, a další.** Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy*. 2010, 104, stránky 1015-1022.
- [19] **Davies, Geoffrey, Ghabbour, Elham A. a Steelink, Cornelius.** Products of Soil Chemistry. *Journal of Chemical Education*. 2001, 12.
- [20] **Skokanová, Marianna a Dercová, Katarína.** Huminové kyseliny. Interakce huminových kyselin s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, 102, stránky 338-345.
- [21] **Skokanová, Marianna a Dercová, Katarína.** Huminové kyseliny, povod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, 102, stránky 262-268.
- [22] **Pitter, Pavel.** *Hydrochemie*. Praha : SNTL Nakladatelství technické literatury, 1990. 80-03-00525-6.
- [23] **Panda, Swapna Rekha, Mukherjee, Munmun a De, Sirshendu.** Preparation, characterization and humic acid removal capacity of chitosan coated iron-oxide-polyacrylonitrile mixed matrix. *Journal of Water Process Engineering*. 2015, 6, stránky 93-104.
- [24] **Grillo, Renato, a další, a další.** Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: The influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity. *Journals of Hazardous Materials*. 2015, 286, stránky 562-572.
- [25] **Arancon, Norman Q., a další, a další.** Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *European Journal of Soil Biology*. 2006, Sv. 42.
- [26] **Vavříková, Eva a Vinšová, Jarmila.** Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, 103, stránky 56-65.
- [27] **Marguerite, Rinaudo.** Chitin and chitosan: Properties and Applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, 31, stránky 603-632.
- [28] **Dash, M, a další, a další.** Chitosan - A versatile semi - synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011, 36, stránky 981-1014.

- [29] **Khor, Eugene a Lim, Lee Yong.** Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003, 24, stránky 2339-2349.
- [30] **Shi, Chunmeng, a další, a další.** Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research*. 2006, 31, stránky 603-632.
- [31] **Hamman, Josias H.** Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*. 2010, 8, stránky 1305-1322.
- [32] **Silva, Cláudia L., a další, a další.** Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *Journal of Membrane Science*. 2008, 320, stránky 268-279.
- [33] **Puoci, Francesco, a další.** *Polymer in Agriculture: a Review*. 1, Arcavacata di Rende : American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 2008, Sv. 3. 1557-4989.
- [34] **Ghormade, Vandana, Deshpande, Mukund V. a Paknikar, Kishore M.** Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*. 2011, 29.
- [35] **Pier, Jerome a Barlow, Dave.** *Western fertilizer handbook*. Sacramento : Western Plant Health Association, 2012.
- [36] **Tisdale, Samuel L., Beaton, James D. a Nelson, Werner L.** *Soil fertility and fertilizers*. New York : Macmillan Publishing Company, 1985.
- [37] 3-Indoleacetic acid. *SIGMA - ALDRICH*. [Online] Sigma-Aldrich Co. LLC, 2017. [Citace:24.2.2017.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i2886?lang=en®ion=CZ&gclid=CPH7ypTqqNICFQ8W0wodnLEKQg>.
- [38] indole-3-acetic acid . *PubChem*. [Online] National Center for Biotechnology Information. [Citace: 24.2.2017.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/indole-3-acetic_acid#section=Top.
- [39] **Mohite, B.** Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2013, Sv. 13, 3, stránky 638-649.
- [40] Introduction to Stereomicroscopy. *Microscopy*. [Online] Nikon Instruments Inc., 2016. [Citace:24.2.2017.] <https://www.microscopyu.com/techniques/stereomicroscopy/introduction-to-stereomicroscopy>.
- [41] **Matalanis, Alison, Jones, Owen Griffith a McClements, David Julian.** Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*. 2011, 25.

- [42] **Gouin, Sébastien.** Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*. 2004, 15, stránky 330-347.
- [43] **Kumari, Avnesh, Yadav, Sudesh Kumar a Yadav, Subhash C.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, 75, stránky 1-18.
- [44] **Solanki, Himanshu K., a další, a další.** *Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent*. Hindawi Publishing Corporation, 2013. str. 21. 620719.
- [45] **Lorenzo-Lamosa, M. L., a další, a další.** Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998, 52, stránky 109-118.
- [46] **Cook, Michael T., a další, a další.** Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012, 162, stránky 56-67.
- [47] **Al-Qadi, S., a další, a další.** Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *Journal of Controlled Release*. 157, stránky 383-390.

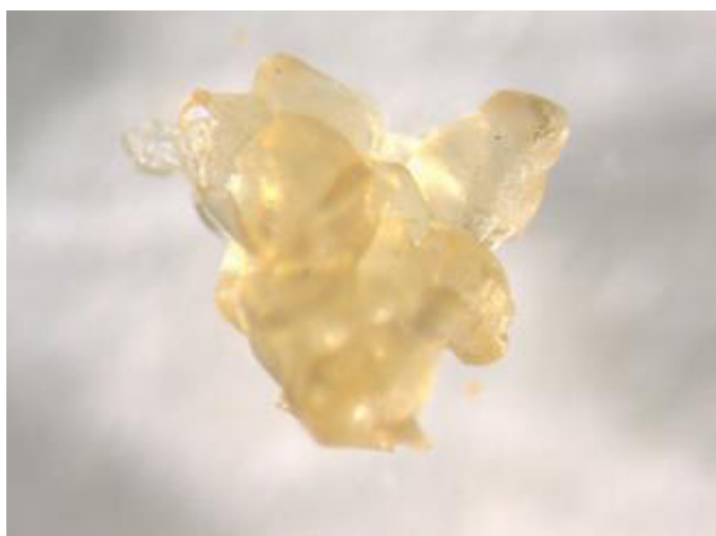
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>zkratka</i>	<i>význam</i>
HK	humínové kyseliny
CH	chitosan
TPP	trifosfát sodný
NPK	vícesložkové hnojivo NPK
IND	kyselina 3-indolactová
ALG	alginát
CS	core-shell
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
DAD	detektor s diodovým polem

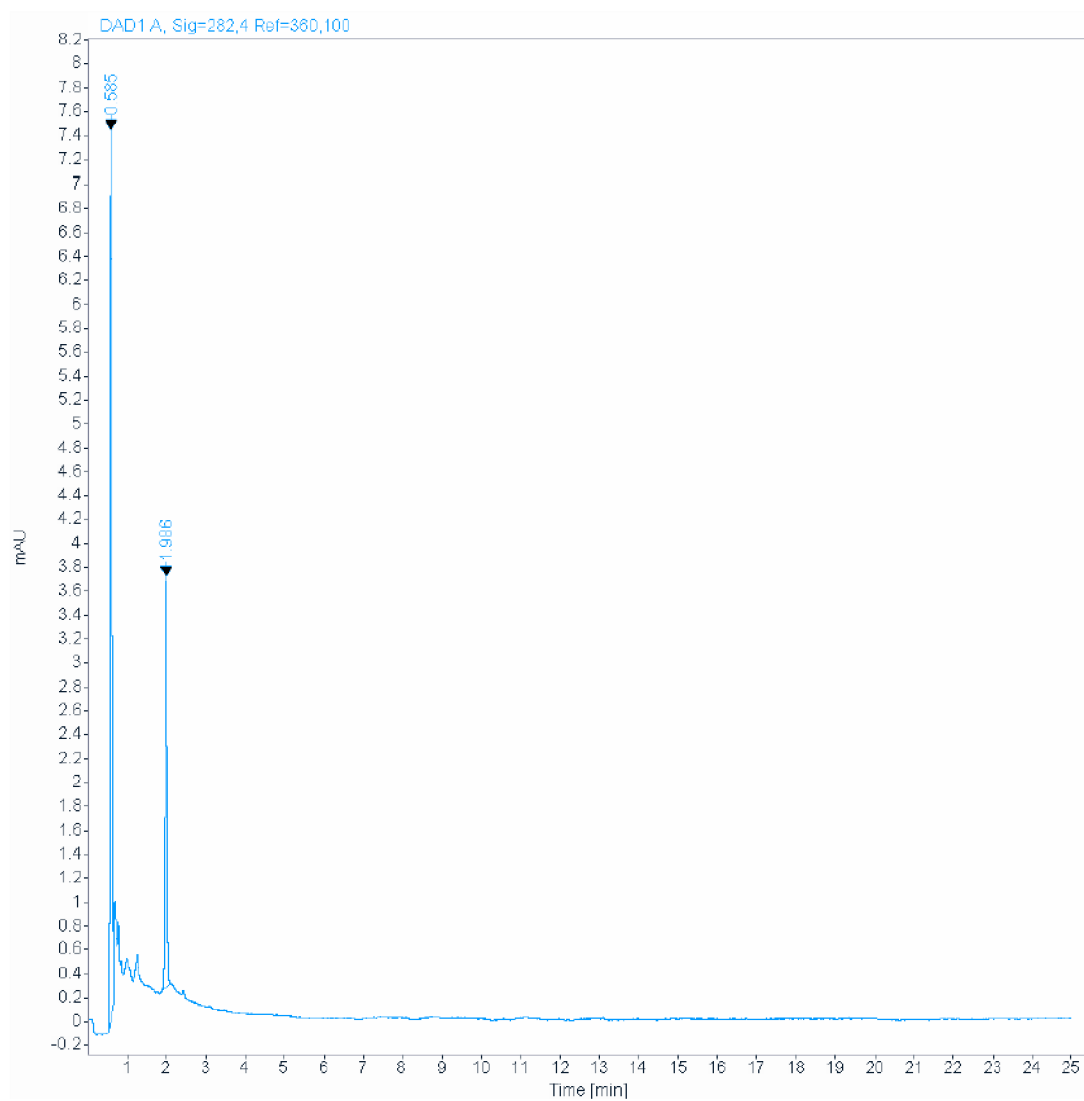
9. PŘÍLOHY



Příloha 1: Suchý VZ7 (humínové kyseliny bez přídavku kyseliny indolactové)



Příloha 2: Suchý VZ8 (NPK hnojivo a kyselina indolactová)



Příloha 3: Ukázka spektra uvolňování kyseliny 3-indoloctové měřeného pomocí HPLC s DAD detekcí