

Vliv stabilizačních a aktivních látek na vlastnosti biopolymerních systémů

Kristýna Šebestová

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Šebestová**
Osobní číslo: **T15212**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv stabilizačních a aktivních látek na vlastnosti biopolymerních systémů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část:

1. V rešeršní části klasifikujte biopolymery, jejich vlastnosti a význam. Zaměřte se na potenciální látky používané pro zlepšení stability a antimikrobiálních vlastností biopolymerních systémů v kosmetice.

II. Praktická část:

1. Připravte systémy na bázi biopolymeru chitosanu, stabilizátorů a aktivních látek a vyhodnoťte jejich fyzikální, případně antimikrobiální vlastnosti prostřednictvím dostupných experimentálních metod.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. DUMITRU, S. *Polymeric Biomaterials*, Marcel Dekker, Inc. 2002, ISBN 0-8247-0569-6.
2. WILLIAMS, P. A. *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials - Polysaccharides, Proteins and Polyesters*. Royal Society of Chemistry. 2011, ISBN 978-1-84973-245-1.
3. SZYMANSKA, E., WINNICKA, K. *Stability of Chitosan A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications*. *Marine Drugs* 2015, 13, 18191946.
4. BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. *Handbook of Essential Oils, Science, Technology, and Applications* 2009, CRC Press, ISBN 978-1-4200-6316-5.
5. Databáze elektronických knih a časopisů (Science Direct, Web of Science,).

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2018

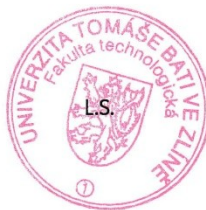
Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 5. února 2018



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



doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠEBESTOVÁ KRISTÝNA


Obor: TVTKD

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit 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 14. 5. 18



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

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

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlázení 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.*

³¹ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

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

³² *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

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

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

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá hodnocením vlivu způsobu homogenizace a inkorporace stabilizačních, resp. aktivních látek na vlastnosti roztoků a filmů na bázi polysacharidu chitosanu. V teoretické části byly definovány a klasifikovány biopolymery, pozornost byla věnována zejména chitosanu a faktorům ovlivňujícím jeho stabilitu. S tím souvisí také výčet potenciálních aktivních a stabilizačních látek, uvedených v další kapitole. Praktická část se v první řadě věnuje roztokům a filmům na bázi chitosanu, konkrétně vlivu podmínek přípravy na vybrané fyzikální vlastnosti. Zároveň byl studován účinek některých aktivních látek (kyselina laurová, esenciální oleje) na výslednou antibakteriální aktivitu. V další části jsou hodnoceny některé fyzikální vlastnosti filmů na bázi chitosan/škrob.

Klíčová slova: biopolymerní film, esenciální olej, fyzikální vlastnosti, chitosan, kyselina laurová, škrob.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with evaluation of homogenization process and incorporation of stabilizing and active agents on the properties of solutions and films based on chitosan polysaccharide. In the theoretical part, biopolymers are classified, with focus on chitosan and factors influencing its stability. This is also related to the list of potential active and stabilizing substances included in the next chapter. The practical part deals primarily with solutions and films based on chitosan, specifically the impact of preparation conditions on selected physical properties. The effect of some active substances (lauric acid, essential oils) on the resulting antibacterial activity was studied. In the consequent section, films based on chitosan/starch were prepared and certain physical properties were evaluated.

Keywords: biopolymer film, chitosan, essential oil, lauric acid, physical properties, starch.

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Janě Sedlaříkové, Ph. D., za její odborné vedení, trpělivost, za velmi vstřícný přístup a poskytnutý čas, který mi při vypracování bakalářské práce věnovala. Děkuji také všem laborantkám, které mi při zpracování experimentální části pomáhaly především pak p. Lence Plechačové. Poděkování patří i mé rodině a kamarádům, kteří mi po celou dobu studia byli velkou oporou.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOPOLYMERY	12
1.1 POLYSACHARIDY	12
1.1.1 Škrob	13
1.1.2 Celulóza.....	15
1.2 PROTEINY	15
1.3 NUKLEOVÉ KYSELINY	17
1.4 POLYTERPENY	19
2 CHITOSAN	20
2.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	20
2.2 VÝROBA CHITOSANU Z CHITINU	20
2.3 VYUŽITÍ CHITOSANU V PRŮMYSLU	21
2.3.1 Chitosan v kosmetice	22
2.3.2 Chitosan v potravinářství	23
2.3.3 Farmaceutické aplikace chitosanu.....	23
2.3.4 Aplikace chitosanu v textilním průmyslu	24
2.4 VLASTNOSTI CHITOSANU	25
2.4.1 Antibakteriální účinky	25
2.4.1.1 Faktory ovlivňující antibakteriální aktivitu chitosanu	26
2.4.2 Antioxidační účinky	26
2.4.3 Protirakovinné účinky	27
2.5 SMĚSI CHITOSANU A DALŠÍCH BIOPOLYMERŮ	27
2.5.1 Směsi chitosanu a škrobu	28
3 STABILITA CHITOSANU	30
3.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ STABILITU CHITOSANU.....	30
3.1.1 Vnitřní faktory ovlivňující stabilitu chitosanu	31
3.1.1.1 Stupeň čistoty.....	31
3.1.1.2 Molekulová hmotnost	31
3.1.1.3 Stupeň deacetylce.....	31
3.1.1.4 Obsah vlhkostí	32
3.1.2 Vnější faktory ovlivňující stabilitu chitosanu	32
3.1.2.1 Vlhkost prostředí.....	32
3.1.2.2 Teplota	32
3.1.3 Zpracovatelské podmínky	33
3.1.3.1 Vliv kyseliny při rozpouštění.....	33
3.1.3.2 Sterilizace.....	33
3.1.3.3 Zahřívání	33
3.1.3.4 Lyofilizace	33
4 STABILIZAČNÍ A AKTIVNÍ LÁTKY	35
4.1 AMFIFILNÍ NEIONICKÉ SLOUČENINY	36
4.1.1 Estery sorbitanu (Spany).....	37
4.1.2 Ethoxylované estery sorbitanu (Tweeny)	37

4.1.1.3	Využití Span a Tween jako emulgátorů.....	38
4.2	MASTNÉ KYSELINY	39
4.2.1	Kyselina laurová.....	39
4.2.2	Kyselina olejová.....	41
4.3	DERIVÁTY KYSELINY MLÉČNÉ.....	42
4.4	ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	42
4.4.1	Techniky výroby esenciálních olejů.....	43
4.4.2	Antimikrobiální účinky esenciálních olejů	43
4.4.3	Antivirové účinky esenciálních olejů.....	44
4.4.4	Protirakovinné účinky esenciálních olejů	44
4.4.5	Antioxidační účinky esenciálních olejů	45
4.4.6	Využití EO v konzervaci potravin.....	46
4.4.7	Využití EO v kosmetice	46
II	PRAKTICKÁ ČÁST	48
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	49
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	49
5.3	METODIKA	50
5.3.1	Stanovení sušiny chitosanu	50
5.3.2	Příprava roztoků a filmů na bázi chitosanu.....	50
5.3.3	Příprava roztoků a filmů na bázi chitosanu a škrobu	51
5.3.4	Měření ζ potenciálu roztoků.....	52
5.3.5	Měření povrchového napětí roztoků	52
5.3.6	Měření tloušťky filmů	53
5.3.7	Stanovení antibakteriálních vlastností filmů.....	53
5.3.8	Stanovení vlhkosti a rozpustnosti filmů.....	54
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	55
6.1	ROZTOKY A FILMY NA BÁZI CHITOSANU	55
6.1.1	Měření ζ potenciálu roztoků.....	55
6.1.2	Měření povrchového napětí roztoků	56
6.1.3	Měření tloušťky filmů	56
6.1.4	Vizuální hodnocení vzhledu filmů	57
6.1.5	Stanovení antibakteriálních vlastností filmů.....	58
6.2	FILMY NA BÁZI CHITOSANU A ŠKROBU	60
6.2.1	Měření tloušťky filmů	60
6.2.2	Vizuální hodnocení vzhledu filmů	61
6.2.3	Stanovení obsahu vlhkosti a rozpustnosti	64
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	67
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	72
	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
	SEZNAM TABULEK.....	75

ÚVOD

Chitosan je biokompatibilní a biodegradabilní přírodní polymer, který je schopen tvořit filmy. Těto vlastnosti se využívá v řadě průmyslových odvětví jako je potravinářství, farmacie nebo kosmetika. Navíc, vzhledem k jeho chemické struktuře, jej lze poměrně snadno modifikovat zavedením různých jiných funkčních polymerů. Vlastnosti chitosanu jako je molekulová hmotnost, stupeň deacetylce a čistota jsou závislé na zdroji, z něhož byl chitosan získán a navíc je velmi citlivý na změny vnějších a zpracovatelských podmínek. Zvýšení stability systémů na bázi chitosanu lze ovlivnit změnou jejich homogenizace, zavedením vhodné stabilizační látky nebo vývojem různých směsí polymerních materiálů.

Biopolymerní matrice na bázi chitosanu se ukázaly jako efektivní nosné systémy pro řízené uvolňování aktivních složek. Mastné kyseliny samy o sobě nacházejí široké využití v kosmetice v podobě mýdel a emulzí. Některé z nich, jako například kyselina kaprinová, laurová a stearová, vykazují i antimikrobiální vlastnosti. Systémy na bázi chitosanu a kyseliny laurové jako aktivní látky mohou být aplikovány do antimikrobiálních obalových materiálů, za účelem zvýšení trvanlivosti a kvality baleného produktu. Kombinace těchto dvou složek má potenciál i pro zvýšení stability výsledných systémů. Z aktivních látek jsou perspektivní esenciální oleje získávané z rostlin různými druhy destilace nebo lisováním za studena. Díky svým antimikrobiálním a antioxidačním účinkům se využívají např. při konzervaci potravin nebo kosmetických přípravků, ovšem kvůli jejich intenzivní vůni a potenciální toxicitě jsou některé jejich aplikace omezeny. Možným řešením tohoto problému je právě jejich inkorporace do polymerní matrice. Filmy na bázi chitosanu a esenciálního oleje se ukázaly jako účinné například při prodloužení doby trvanlivosti některých druhů potravin.

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se chitosanu a možností zvyšování jeho stability, resp. antimikrobiální aktivity, a dále studovat vliv vybraných aktivních nebo stabilizačních látek (kyselina laurová, glycerol a esenciální oleje) na vlastnosti připravených biopolymerních filmů a roztoků na bázi chitosanu, případně jeho směsí s jinými přírodními polymery.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOPOLYMERY

Biologické polymery neboli biopolymery jsou makromolekuly, které lze obecně rozdělit do dvou hlavních kategorií. První skupina je tvořena materiály, které jsou produkovány mikroorganismy, rostlinami nebo živočichy. Do druhé kategorie poté spadají ty, které jsou syntetizovány chemicky, ale jsou odvozeny od biologických materiálů. Strukturu tvoří opakující se jednotky monomerů např. sacharidy, aminokyseliny nebo nukleotidy [1, s. 169].

1.1 Polysacharidy

Polysacharidy neboli glykany jsou přírodní nebo syntetické makromolekuly, které obsahují desítky až statisíce monosacharidových jednotek. Vznikají jejich kondenzací za vzniku α nebo β -glykosidových vazeb. Struktura řetězce může být lineární nebo rozvětvená. Jestliže je monosacharid uprostřed řetězce vázán pouze na dvě monosacharidové jednotky jedná se o lineární glykan, pokud je napojeno jednotek více, hovoříme o rozvětveném [2, s. 128, 129]. Tato schopnost odlišuje polysacharidy od proteinů a nukleových kyselin, které vytvářejí pouze lineární polymery [1, s. 130].

Jestliže polysacharid (glykan) obsahuje pouze jeden druh monosacharidové jednotky, jedná se o tzv. homopolysacharid (homoglykan) a typy s obsahem různých druhů monosacharidů jsou označovány jako tzv. heteropolysacharidy (heteroglykany). Nejběžnější složkou je D-glukóza, dále pak D-fruktóza, D-galaktóza, L-galaktóza, D-manóza, L-arabinóza a D-xylóza [1, s. 130].

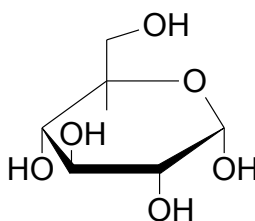
U všech lineárních polysacharidů se na jednom konci nachází redukující jednotka, obsahující volnou hemiacetalovou hydroxylovou skupinu, která může vyvolat mutarotaci a zároveň sloužit jako redukční činidlo. Neredukující jednotka se objevuje na opačném konci. Větvené struktury s n počtem větvení mají $n + 1$ počátečních neredukujících jednotek. Např. pro přírodní sacharidy je typické prostorové uspořádání, které je založeno na opakování určitých strukturních stavebních jednotek, které jsou složeny ze dvou nebo více monosacharidů.

Polysacharidy tvoří v přírodě významnou část všech sloučenin a vyznačují se řadou důležitých funkcí, jako je stavební, zásobní nebo ochranná. Mohou se vyskytovat volně anebo vázané na jiné sloučeniny jako lipidy, proteiny a peptidy, s nimiž tvoří komplexní struktury tzv. konjugované sacharidy [2, s. 128, 129].

Pro všechny glykany je charakteristická velká polarita, schopnost vytvářet vodíkové vazby jak intracelulární tak intercelulární a tvořit s kationty komplexní sloučeniny (kvůli těmto vlastnostem jsou hojně využívány v chemickém, textilním, potravinářském nebo biotechnologickém průmyslu). Mezi jednotlivými druhy se objevují značné rozdíly v rozpustnosti ve vodě. Některé mohou botnat, jiné tvořit viskózní roztoky nebo gely a další mohou být zcela nerozpustné. Podstatné je také pH prostředí, ve kterém se nachází. V kyselém prostředí může za vysokých teplot dojít k degradaci polysacharidů až na monosacharidy. Představují také nepostradatelné složky rostlinných buněk a tkání, kde tvoří jejich buněčné stěny. Pro řadu životně důležitých pochodů jsou polysacharidy klíčovými sloučeninami a nalezneme je jako hlavní součást glykoproteinů, glykolipidů a nukleových kyselin [2, s. 128, 129].

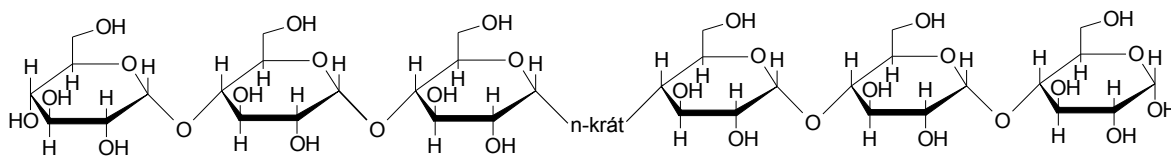
1.1.1 Škrob

Škrob neboli amyllum je zásobní polysacharid rostlin, který je obsažen zejména v bramborách (15–22 % hmotnosti), obilovinách (50–80% hmotnosti – nejvíce rýže a nejméně oves) a v kukuřici. Ve formě granulí je ukládán v plastidech a to zejména v amyloplastech (speciální buňky semen, hlíz oddenků a kořenů). Struktura škrobu je složena z homopolysacharidů amylozy a amylopektinu jejichž základní jednotkou je molekula α -D-glukopyranosy (D-glukózy) (Obr. 1) [3, s. 60].



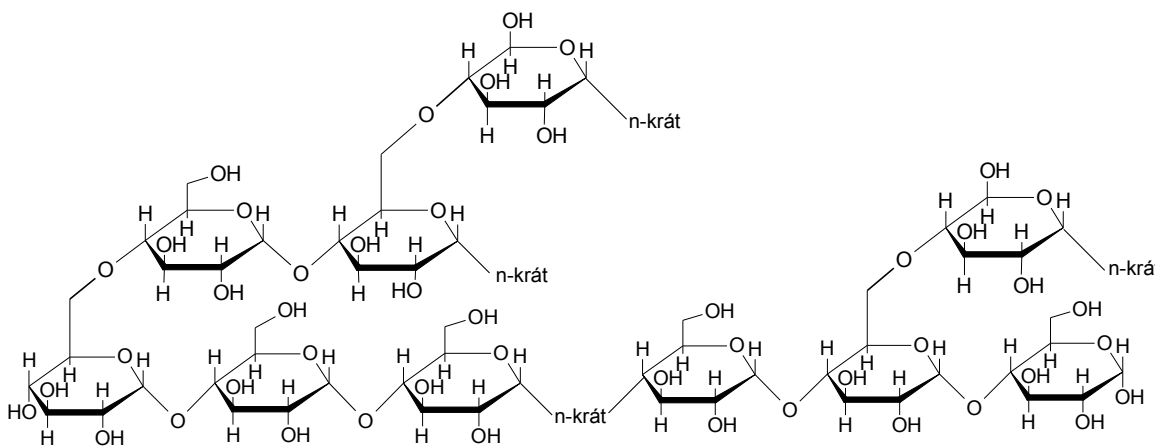
Obr. 1 Vzorec D- glukózy

Amylóza je lineární (1→4)- α -D-glukan (Obr. 2) tvořící 20–30 % všech škrobů nacházejících se v rostlinách a skládá se až z 2000 glukózových zbytků, jež jsou spojeny α -glykosidovými vazbami 1→4. Amylóza se řadí mezi homopolysacharidy, je rozpustná ve vodě a při styku s jodem vytváří modré zbarvení. Vlivem α -glykosidové vazby zaujímají molekuly strukturu α -helix (tvar levotočivé šroubovice), kdy na jeden závit připadá 6 jednotek D-glukózy. Působením enzymu α -amylázy a částečnou hydrolýzou dochází k štěpení amylozy na maltózu.



Obr. 2 Struktura amylozy

Amylopektin je rozvětvený α -D-(1 \rightarrow 4)-D-glukan tvořící hlavní část škrobu (70–80 %), je částečně rozpustný až nerozpustný ve vodě (tvoří gely), váže malé množství jodu za vzniku červeného zbarvení. Vlivem četného větvení nemůže zaujímat strukturu α -helix a navíc obsahuje malé množství esterově vázané kyseliny fosforečné. Na hlavní řetězec, který obsahuje 1 \rightarrow 4 glykosidové vazby, se napojuje vazbou 1 \rightarrow 6 postranní řetězec (Obr. 3), na který se mohou navázat další řetězce a jehož průměrná délka větvení je 20–25 D-glukózových jednotek [2, s. 132][4, s. 124].



Obr. 3 Struktura amylopektinu

Vzhledem ke své poměrně velké hmotnosti je možné zrna škrobu snadno oddělit z biologického materiálu např. vypíráním nebo odstředěním. Tato zrna vážou vodu z ovzduší (okolo 15–20 % své hmotnosti). Ve studené vodě jsou nerozpustná, při zahřátí botnají, přijímají velké množství vody a dochází ke vzniku škrobového mazu. Naopak při ochlazení se zvyšuje viskozita roztoku kvůli obnově vodíkových můstků a vytváří se škrobový gel. Enzym α -amyláza může způsobovat hydrolyzu škrobu díky své schopnosti štěpit vazby 1 \rightarrow 4 na různých místech řetězce za vzniku tzv. lineárních dextrinů (maltóza a glukóza). Naproti tomu enzym β -amyláza štěpí glykosidové vazby od začátku řetězce a vzniká pouze maltóza. Při kyselé hydrolyze se směs škrobu a kyseliny chlorovodíkové přivede

k varu a v závislosti na dalších podmínkách působení poskytuje viskózní maltodextriny a škrobové sirupy, které se používají do potravin, jako sladidla nebo pro úpravu viskozity [3, s. 60, 61].

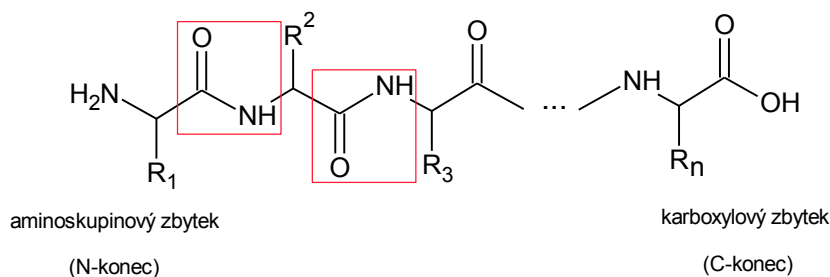
1.1.2 Celulóza

Celulóza je makromolekulární látka, řadící se mezi homopolymery, jejíž lineární řetězec je složen z opakujících se jednotek β -D-glukanu, které jsou vzájemně propojeny β -1 \rightarrow 4-glykosidickými vazbami. Celulóza, tedy (1 \rightarrow 4)- β -D-glukan, byla podrobena parciální hydrolyze, kdy produkty reakce byly sacharidy jako například D-glukóza, cellobióza a celotrióza, které obsahovaly ve struktuře lineární řetězce. Chemickým složením se odlišuje od amylozy pouze přítomností β -glykosidových vazeb.

Jednotlivé makromolekuly celulózy jsou v řetězci navzájem stabilizovány vodíkovými vazbami, které se sdružují v mikrofibrily (micely) a vytvářejí tak uspořádané krystalické komplexy. Elementární mikrofibrily tvoří fibrily, jejichž sloučením vznikají makrofibrily tvořící lamely (úzké vrstvy). Celulóza společně s hemicelulózou a ligninem představuje hlavní složky buněčných stěn dřevin, ze kterých se získává pro průmyslové zpracování. Mohou se také vyskytovat neuspořádané nekystalické oblasti, které se nazývají amorfni. Podíl krystalické oblasti má vliv při reakci s vodou a dalšími rozpouštědly a na řadu dalších vlastností celulózy, jako je např. odolnost, ohyb nebo lámavost. Celulóza je nerozpustná ve vodě, avšak použitím silných alkálií a kyselin dochází k její hydrolyze, a tím ke změně původních vlastností [2, s. 135][5, s. 19, 20][6, s. 18, 20].

1.2 Proteiny

Proteiny neboli bílkoviny jsou makromolekulární sloučeniny, jejichž základní jednotky L- α -aminokyseliny jsou vázány polypeptidovými (amidovými) vazbami (Obr. 4), které vznikají mezimolekulární kondenzací 20 tzv. kódovaných aminokyselin (AMK), a vytváří tak lineární (nerozvětvené) polypeptidové řetězce složené z více než stovek AMK, které se vzájemně liší pouze postranním řetězcem (označován jako $R_1, R_2 \dots R_n$). Jejich pořadí a počet je pro každou bílkovinu specifický a je dán genetickou výbavou buněk [3, s. 22–28][4, s. 177, 193].



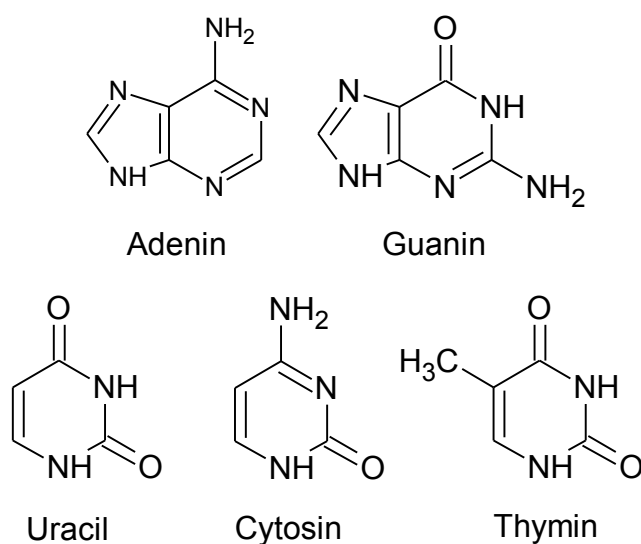
Obr. 4 Peptidová vazba

Struktura, kterou proteiny zaujímají, je složitá a její prostorové uspořádání je členěno do čtyř úrovní – primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární poskytuje údaje o počtu a sekvenci AMK zbytků v řetězci a jejich konfiguraci. Toto pořadí se uvádí vždy od N-konce k C-konci hlavního řetězce ve směru proteosyntézy (Obr. 4) [4, s. 195]. Jako sekundární struktura je označováno prostorové uspořádání (konformace) určitého segmentu hlavního polypeptidového řetězce bílkovin, které je určeno primární strukturou a mezimolekulárními silami. α -helix (šroubovice) vzniká stáčením rovin peptidových vazeb stále ve stejném směru, které jsou mezi sebou fixovány vodíkovými vazbami. Jednotlivé šroubovice se liší průměrem, stoupáním závitů a směrem jeho otáčení (nejběžnější je pravotočivý α -helix). Další důležitou strukturou je tzv. β -sheet (struktura skládaného listu) u níž se roviny peptidových vazeb střídavě naklánějí nahoru a dolů, a spojením dvou paralelně (méně časté) nebo antiparalelně orientovaných řetězců pomocí vodíkových můstku dojde k jejímu vzniku. Jako nepravidelná struktura se označuje β -ohyb, který mění směr hlavního řetězce o 180 °C. Terciární struktura je chápána jako prostorové uspořádání všech řetězců proteinu a udává jeho vnější tvar. Převážná část molekul má tvar kulovitý (globulární) a jsou rozpustné ve vodě ve formě koloidních roztoků. Proteiny plnící konstrukční funkce se nazývají fibrilární (vláknité) a naopak ve vodě rozpustné nejsou. Počet a uspořádání podjednotek v oligomerní molekule (nepřihlíží se k jejich vnitřnímu uspořádání) udávají kvartérní strukturu [3, s. 25].

Bílkoviny zastávají v organismu řadu důležitých funkcí a to zejména strukturní, metabolické a informační. Jsou stavebními složkami buněk, pletiv a tkání (př. kolagen, elastin), plní katalytickou funkci (enzymy a hormony), jejíž účinnost je specifická. Slouží jako tzv. signální proteiny, které mají imunitní význam (rozpoznávání cizorodých antigenů; imunoglobuliny) a regulační proteiny ovlivňující sekreci buněk do vnějšího prostředí [4, s. 193].

1.3 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny patří mezi makromolekulární látky tvořené polynukleotidovými řetězci. Nukleosidy jako hlavní součást nukleových kyselin jsou sloučeniny sacharidu a dusíkaté (nukleové) báze, které jsou vzájemně spojeny N-glykosidovou vazbou. Sacharidovou složkou je buď ribóza anebo deoxyribóza, a dusíkatá báze může být purinová (adenin a guanin) nebo pyrimidinová (uracil, cytosin a thymin) (Obr. 5). Cukerná složka dodává nukleosidům hydrofilní charakter, díky kterému jsou rozpustné ve vodě, dokonce lépe než volné báze. Kvůli jejich polaritě lze N-glykosidovou vazbu hydrolyticky štěpit zředěnými kyselinami, v alkalickém prostředí je naopak velmi stálá [4, s. 135][7, s. 97].



Obr. 5 Vzorce dusíkatých bází

Deriváty nukleosidů jsou nukleotidy, jež vznikají připojením molekuly kyseliny fosforečné na ribózu nebo deoxyribózu esterovou vazbou. Obecně se nazývají jako nukleosid-fosfáty a podle typu navázaného fosfátového zbytku rozlišujeme mono-, di-, tri- nebo polyfosfáty, které jsou navzájem vázány anhydridovou vazbou. Zbytky těchto skupin dodávají nukleotidům kyselý charakter, díky kterému jsou rozpustné ve vodě. V živých organismech zastávají řadu funkcí, např. slouží jako přenašeče energie, aktivují meziproducty v řadě biosyntéz a jsou důležitou součástí kofaktorů enzymů [4, s. 137][7, s. 95, 98].

Nukleové kyseliny jsou polynukleotidy vznikající polymerizací nukleotidů. Jednotlivé nukleotidy se vážou na 3'-OH skupině jednoho nukleotidu a na 5'-fosfátovou skupinou následujícího, a tak vzniká 3'-5'-fosfodiesterová vazba. Postupným napojováním vzniká

polynukleotidový řetězec, jehož lineární struktura má dva konce. Jeden tvoří zbytek s volnou skupinou 5'-OH, která může být esterifikována kyselinou fosforečnou a nazýváme ho 5'-konec, druhý je nukleotid s volnou 3'-OH skupinou označován jako 3'-konec. Specifické uspořádání bází nukleotidů v polynukleotidovém řetězci podává informace o jeho primární struktuře, v níž je obsažena genetická informace [4, s. 141][7, s. 100].

Podle chemického složení jsou rozlišovány dva základní typy nukleových kyselin, deoxyribonukleové kyseliny (DNA), v nichž je sacharidovou složkou deoxyribóza a ribonukleové kyseliny (RNA) obsahující ribózu. Dalším podstatným rozdílem je typ navázaných nukleotidových bází. Adenin, guanin, cytosin a thymin jsou součástí polynukleotidového řetězce DNA, zato RNA řetězce obsahují místo thyminu uracil.

Molekuly DNA jsou nositelem genetické informace a zajišťují její předávání dceřiným buňkám. Jako strukturální geny jsou označovány úseky nesoucí informace o syntéze bílkovin a soubor všech genů je nazýván jako genom, který v lidském organismu nalezneme v jaderném a mitochondriálním DNA. Molekuly DNA jsou složeny ze dvou polydeoxyribonukleotidových řetězců stočených do pravotočivých šroubovic podél pomyslné společné osy za vzniku tzv. dvoušroubovice [4, s. 142, 143][7, s. 101, 106].

Přepisem genetické informace z jaderné nebo mitochondriální DNA procesem transkripce je syntetizována ribonukleová kyselina. Podle funkce jsou rozlišovány tři hlavní druhy ribonukleových kyselin: mediátorová (mRNA), ribozomová (rRNA) a transferová (tRNA), které se vzájemně liší svým složením a velikostí molekuly. Mediátorové RNA přenášejí genetické informace z jádra uložené ve strukturálních genech a na ribozomech slouží jako předloha pro syntézu proteinů (translaci). Trojice (triplet) po sobě jdoucích nukleotidů v polynukleotidovém řetězci je označována jako kodon. Kodony signalizují začátek a ukončení syntézy na ribozomu a také sekvenci AMK v polypeptidovém řetězci. Ribozomové RNA se vyskytují v několika typech, které se odlišují velikostí i složením a tvoří hlavní součásti struktury podjednotek (velké a malé), na které jsou navázány bílkovinné složky ribozomů, na jejichž povrchu probíhá translace. Transferová RNA slouží jako specifický přenašeč aktivované AMK z cytoplazmy na ribozom a její zařazení do polypeptidového řetězce. Bez ohledu na specifitu mají všechny tRNA stejný strukturální charakter [4, s. 144, 145][7, s. 107, 108].

1.4 Polyterpeny

Polyterpeny neboli isoprenoidy patří mezi přírodní látky, které se převážně vyskytují jako sekundární metabolity rostlin, ale mohou být také vytvářeny mikroorganismy nebo živočichy. Základní jednotkou polyterpenů jsou monoterpeny, jejichž struktura je tvořena vzájemně vázanými isoprenoidními jednotkami v *trans*-konfiguraci, díky níž jsou výbornými rozpouštědly. V přírodních směsích jsou téměř vždy doprovázeny řadou látek, od kterých mohou být odděleny destilací nebo extrakcí. Nižší terpeny (mono- a seskviterpeny) bývají u rostlin součástí silic (éterických olejů), které jsou nepolární, těkavé a vyznačují se typickou intenzivní vůní, některé mohou mít baktericidní účinky. Vyskytují se v různých částech rostlin např. v květech, kůře a listech. Ze silic mohou vznikat pryskyřice, což je ztuhlá silice zoxidovaná vzdušným kyslíkem, doprovázená řadou dalších látek odlišného chemického charakteru. Balzámy jsou viskózní polotekuté směsi čistých silic s pryskyřicí. Vyšší terpeny mají nepolární charakter, nejsou těkavé a aromatické [3, s. 75].

Dolichol (14–24 isoprenových jednotek) je polyterpenický alkohol, který se nachází v lipidové dvojvrstvě membrán endoplazmatického retikula živočichů a mikroorganismů a podílí se na biosyntéze glycidové složky N-glykoproteinů. Přírodní kaučuk a gutaperča mají nevětvené lineární řetězce a mohou být volné nebo estericky vázané s vyššími mastnými kyselinami v rostlinách, mikroorganismech nebo živočiších. Dvojně vazby nacházející se v molekule kaučuku mají konfiguraci *cis*, zatímco konfigurace *trans* je typická pro gutaperču. Rozdíl vlastností sloučenin je dán právě jejich odlišnou konfigurací – kaučuk je elastický, zato gutaperča je pevná. Nacházejí se v mléčné šťávě nebo tzv. latexu, ve formě koloidních disperzí. Kaučuk je získáván z latexu, který vytéká z poraněného kaučukovníku a je nejdůležitější surovinou pro výrobu přírodní pryže (gumy) [3, s. 78] [8, s. 126].

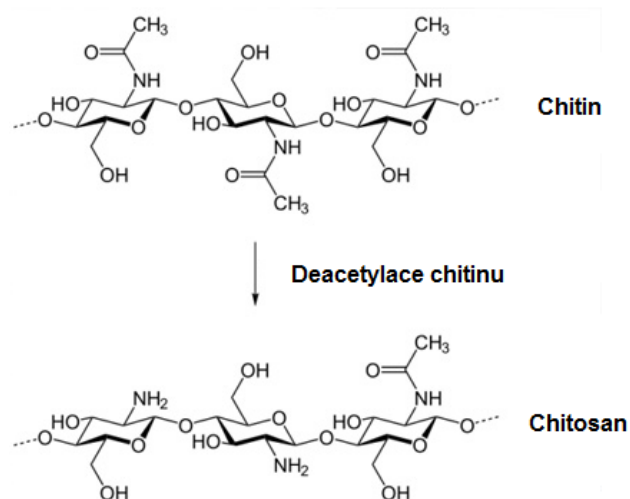
2 CHITOSAN

2.1 Obecná charakteristika

Chitosan je přírodní a netoxický derivát chitinu získaný jeho částečnou N-deacetylací, jehož makromolekula se skládá ze dvou monomerů: glukosaminu a N-acetylglukosaminu. Chitin, tj. β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranóza, je jeden z nejhojnějších polysacharidů na zemi, který je základním prvkem exoskeletu hmyzu, korýšů, měkkýšů aj. Obecně platí, že skořápka obsahuje 30–40 % bílkovin, 30–50 % uhličitanu a fosforečnanu vápenatého a 20–30 % chitinu [1, s. 131]. Chitin je těžce rozpustný i ve velmi polárních rozpouštědlech kvůli své vysoké kohezni energii mezi vodíkovými vazbami (NH-CO), což je také příčinou jeho nedostatečného roztavení, protože teplota, při které by tato fáze proběhla, je vyšší než u nástupu jeho chemické degradace, stejně jako u celulózy. Z toho důvodu jsou potenciální aplikace chitinu silně omezeny [9, s. 82].

2.2 Výroba chitosanu z chitinu

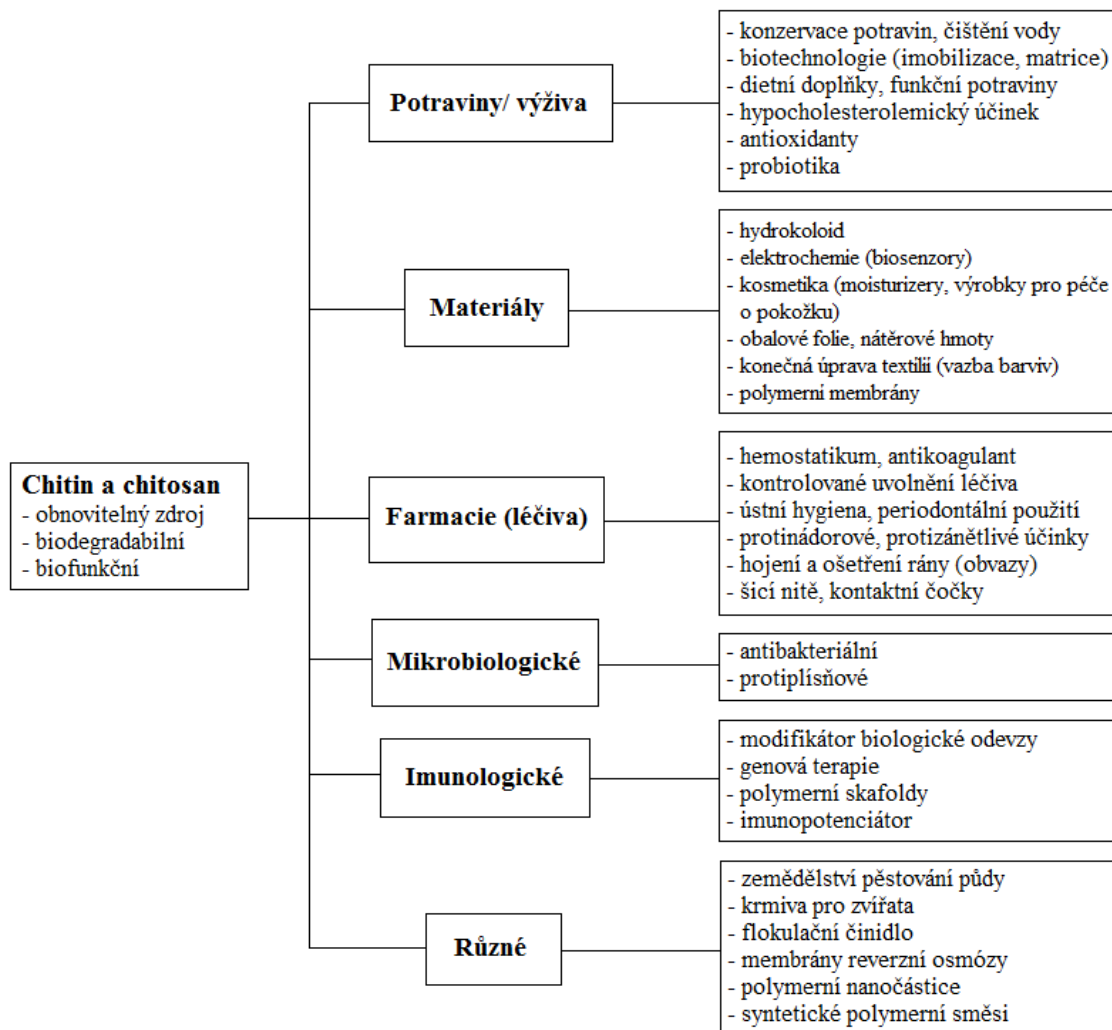
Nejčastější používanou průmyslovou metodou získání chitosanu je deacetylace a depolymerizace chitinu v silně zásaditém prostředí, k čemuž se používá koncentrovaný roztok hydroxidu sodného (Obr. 6). Na prášek rozemletý chitin je smíchán s roztokem NaOH a získaný produkt je promýván deionizovanou vodou do té doby, než je pH neutrální. Následuje sušení při teplotě 80 °C po dobu 48 hodin. Dalším možným způsobem přípravy je enzymatická hydrolýza. Výsledným produktem je směs řetězců chitosanu, vzájemně se lišících svou molekulovou hmotností a stupněm deacetylace, jež určují vlastnosti a funkčnost polymeru. Důležitá je také čistota získaného chitosanu, která je definovaná obsahem popela, proteinů a přítomností mikroorganismů. Vysoká čistota je důležitá především v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Stupeň deacetylace se pohybuje v rozmezí 70–100 % a závisí na teplotě, reakční době a koncentraci použité zásady [10][11].



Obr. 6 Částečná deacetylace chitinu na chitosan [12]

2.3 Využití chitosanu v průmyslu

Díky vlastnostem chitosanu, jako je biokompatibilita, biodegradabilita, schopnost vytvářet filmy, je využíván v různých průmyslových odvětvích, např. v potravinářství, farmaceutickém nebo kosmetickém průmyslu (Obr. 7). Je používán především jako flokulant při čištění odpadních vod, chelatační činidlo (detoxikace nebezpečných odpadů od těžkých kovů) a také jako fungicid. Také je využíván v kosmetickém průmyslu (zubní pasty, výrobky péče o vlasy, materiál pro výrobu kontaktních čoček).



Obr. 7 Průmyslové aplikace chitinu a chitosanu [1]

2.3.1 Chitosan v kosmetice

Chitosan se používá v řadě kosmetických výrobků, jako jsou výrobky v péči o pleť, vlasové přípravky a tyčinky na rty. V přípravcích pečujících o pokožku vykazuje chitosan hydratační vlastnosti (snížením transepidermální ztráty vody, zvýšením vlhkosti pokožky), zvyšuje odolnost proti vodě a zabraňuje vysychání. Dále může chitosan zvýšit adhezenci UV filtru a zabránit jeho smytí. Používá se také v tyčinkách na rty za účelem ochrany rtů před vysušením, zvlhčení a také přilnutí barvy. Bylo prokázáno, že chitosan může prodloužit působení parfémů a dlouhodobě maskovat zápach [13, s. 18].

V kosmetických aplikacích je chitosan využíván ve formě viskózních roztoků, které vznikají po neutralizaci organickými kyselinami. Tyto materiály se pak používají v krémech,

lotionech a v přípravcích využívaných pro trvalé tvarování vlasů. Některé deriváty chitosanu jsou složkami laků na nehty [14].

Změny reologických vlastností thiolovaných chitosanů při oxidaci se využívá v některých kosmetických přípravcích. Tyto polymery jsou schopné přilnout na kůži a vlasy vytvořením disulfidových vazeb s cysteinovými podjednotkami povrchových proteinů. Této schopnosti se využívá např. v gelech na vlasy nebo v make-upech, kde po nanesení dojde k jejich stabilizaci, aby bylo zabráněno jejich rozmazání a rozpouštění [13, s. 18].

2.3.2 Chitosan v potravinářství

Chitosan je nejčastěji používán jako přídatná a konzervační látka, a to jak ve formě roztoků, tak filmů, tj. jako součást obalového materiálu, za účelem zpomalování růstu mikroorganismů, rovněž ke zlepšení kvality a trvanlivosti potravin. Dále se také používá k odstranění barvy a nerozpuštěných látek nebo jako stabilizátor barvy.

Chitosan je málo rozpustný ve vodě, ale dobře se rozpouští v roztocích zředěných kyselin, jako je např. kyselina octová nebo kyselina mléčná, které se využívají v mnoha potravinových aplikacích. V kyselém prostředí ovšem může docházet k hydrolyze chitosanu a depolymerizaci řetězce. Z toho důvodu je pozornost věnována vývoji chitosanových derivátů, které jsou chemicky stabilnější a ve vodě rozpustné.

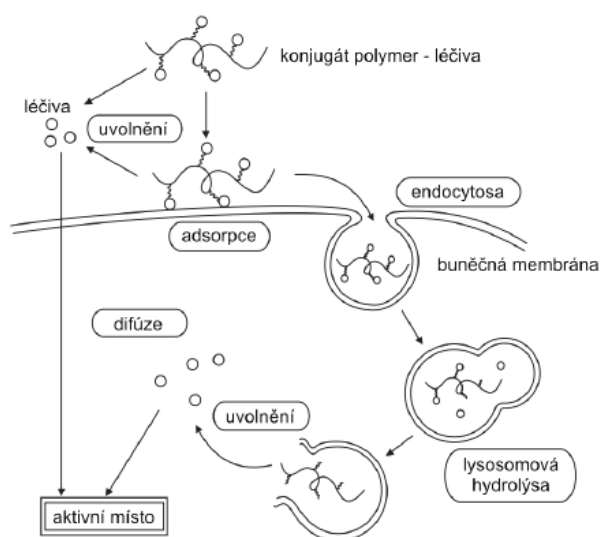
V posledních letech byla vyvinuta řada materiálů na bázi chitosanu a dalších aktivních látek (např. esenciálních olejů, nisinu) za účelem zajištění antimikrobiálních vlastností. Některé studie se zabývají i aplikací chitosanu do žvýkaček, které účinně inhibují růst kariogenních bakterií v ústní dutině [15].

2.3.3 Farmaceutické aplikace chitosanu

V této oblasti mohou být biopolymery aplikovány ve formě vláken, membrán, hydrogelů a dalších, často za účelem vzniku matrice pro transport léčiv (aktivních látek).

Na Obr. 8 je zobrazen průnik aktivní látky k cílovému místu, ke kterému může dojít dvěma způsoby. V prvním případě dojde k uvolnění vazby mezi nosičem a léčivem, které poté difúzí prochází přes buněčnou membránu. Ve druhém případě je celý makromolekulární konjugát polymer-léčivo vpraven do buňky endocytózou a působením enzymů v lysozomech poté dochází k postupnému uvolňování léčiva.

Nejčastěji se využívají biopolymerní konjugáty, které mají nízkou molekulovou hmotnost, při použití projevují minimální vedlejší účinky a jejich hlavním úkolem je transport léčiv do aktivních míst buňky, kde dochází k jejich pomalému uvolňování z nosiče. Dalším požadavkem je zachování určité koncentrace v cílovém místě a prodloužený efekt účinku [16].



Obr. 8 Průnik léčiva do buňky [16]

Chitosan může být aplikován také jako složka obvazového materiálu na rány. Byly připraveny filmy v kombinaci s celulózou, které se kromě antimikrobiálních vlastností vyznačovaly lepšími bariérovými vlastnostmi, díky nimž nedochází k nadměrné dehydrataci rány. Byl také vyvinut obvazový materiál z polyelektrolytových komplexů z chitosanu a sulfonovaného chitosanu. Hojení ran je urychleno oligomery, které vznikají při degradaci chitosanu tkáňovými enzymy, a proto je využíván při regeneraci kůže v oblasti rány [1, s. 152].

2.3.4 Aplikace chitosanu v textilním průmyslu

Přírodní textilie, jako jsou látky vyrobené z celulózy nebo proteinových vláken, jsou v porovnání se syntetickými materiály mnohem citlivější k bakteriálnímu napadení. Ideální textilní antibakteriální úprava by kromě inhibice, případně usmrcení nežádoucích mikroorganismů, měla být bezpečná a ekologicky příznivá [15].

Některé chitosanové deriváty se osvědčily při úpravě textilních materiálů. Například bylo prokázáno, že bavlněná tkanina ošetřená ve vodě rozpustným karboxymethylchitosanem vykazuje dobrou antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli* a *S. aureus* již při 0,1%

koncentraci. Další účinnou látkou byl derivát na bázi chitosan-poly(n-butylakrylátových) částic, který inhiboval růst *S. aureus* o více než 99 % [15].

2.4 Vlastnosti chitosanu

Chitosan jako deacetylovaný produkt chitinu je na rozdíl od něho rozpustný i ve zředěných kyselinách jako je např. kyselina mravenčí nebo octová. Díky intra- a intermolekulárním vodíkovým vazbám má vynikající schopnost vytvářet filmy, která je ovlivněna jeho molekulovou hmotností nebo druhem rozpouštědla. Funkční vlastnosti filmů nebo povlaků jsou výrazně ovlivněny rozdíly ve zdrojích chitinu používaného k výrobě chitosanu, vlastnostmi chitosanu a použitých rozpouštědel, způsoby přípravy filmů a typem použitých plastifikátorů. Filmy na bázi chitosanu mohou sloužit i jako nosiče bioaktivních látek pro kontrolu mikrobiální kontaminace čerstvých nebo zpracovaných potravin. Výhodou je možnost selektivní a postupné migrace aktivní substance z obalu na povrch potraviny. U chitosanu byly také zaznamenány antimikrobiální, antioxidační a emulgační vlastnosti, význam má také jeho kompatibilita s jinými biopolymery a lipidy [1, s. 155][10].

Chitosan má vysokou chelatační schopnost pro různé kovové ionty (př. Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} aj.) v kyselém prostředí a je využíván při odstranění nebo obnovení kovu v různých průmyslových odvětvích. Chelatací vzniká komplex chitosan-kov, který vykazuje silnou antimikrobiální aktivitu [15].

2.4.1 Antibakteriální účinky

Je známo, že chitosan má inhibiční účinek na bakterie a houby, avšak jeho přesný mechanismus antibakteriální aktivity není dosud zcela znám. Jedním z možných vysvětlení je například změna propustnosti bakteriální membrány, rozpad cytoplazmatické membránové bariéry nebo blokování příjmů živin, přičemž výsledkem je lýza buněk. Obecně je mechanismus inhibice závislý na molekulární hmotnosti, stupni deacetylce, druhu bakterie, pH a koncentrace aktivní složky, která je ve směsi s chitosanem [10].

Chitosan s vysokou molekulovou hmotností nemůže projít buněčnou stěnou, a proto zůstává na povrchu buněk, kde vytváří film blokující transport živin do membrány, zatímco nízkomolekulární chitosan jí může procházet a regulovat tak transkripci DNA díky malé velikosti a rozpustnosti ve vodě.

Pro antibakteriální aktivitu je nezbytná aminoskupina chitosanu, která zvyšuje inhibici růstu mikroorganismů s rostoucím stupněm deacetylce této skupiny a ta může „chelato-

vat“ na dvojmocné kationty stabilizující vnější membrány gramnegativních bakterií. Kvůli odlišné stavbě buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií je jejich inhibice různorodá.

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu. Vnější cytoplazmatická membrána se skládá z lipopolysacharidů, lipoproteinů a fosfolipidů, které jsou stabilizované dvojmocnými kationty Mg^{2+} a Ca^{2+} . Pokud je chitosan protonován, jsou karboxylové a sulfátové skupiny na bakteriálním povrchu v „aniontové formě“, čímž dochází ke měně permeability buněčné stěny a snížení osmotické stability.

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je složena převážně z peptidoglykanu. Převládající mechanismus je založen na chitosanu s vyšší molární hmotností, tvořící polymerní membránu na povrchu buňky, která brání vstupu živin.

Další mechanismus je založen na vazbě chitosanu s nízkou molekulovou hmotností na DNA a inhibici syntézy mRNA jeho penetrací do jádra [17].

2.4.1.1 Faktory ovlivňující antibakteriální aktivitu chitosanu

Antibakteriální aktivita chitosanu je závislá na pH prostředí, kdy bylo dokázáno, že chitosan vykazuje silnější inhibiční účinek při nižších hodnotách pH, jelikož je sám rozpustný pouze v kyselém prostředí. Se zvyšujícími se hodnotami pH jeho aktivita klesá. V neutrálním prostředí může dojít k jeho úplné deaktivaci, což může být způsobeno absencí pozitivně nabitých aminoskupin a špatnou rozpustností chitosanu. Dále jeho antibakteriální aktivita může být ovlivněna podmínkami skladování, během něhož může dojít ke specifickým změnám vlastností chitosanu (např. změna viskozity nebo molekulové hmotnosti). Bylo zjištěno, že roztoky chitosanu vykazovaly před uskladněním vyšší antibakteriální účinnost než po 15 týdnech skladování. Chitosanové roztoky skladované při teplotě 25 °C měly slabší účinnost ve srovnání s aktivitou roztoků skladovaných při 4 °C [15].

2.4.2 Antioxidační účinky

Stále více je snaha používat přirozeně odvozené antioxidační látky před těmi syntetického původu. Chitosan a několik jeho derivátů, které jsou bezpečné a netoxické, poskytují ochranu před volnými radikály, čímž např. zpomalují vývoj četných chronických onemocnění. Antioxidační účinek se mění s jeho molekulovou hmotností a viskozitou. Aminoskupiny v molekule vytvářejí elektrostatické odpuzivé síly, které mají zodpovědnost za snížení

vzniku peroxidových radikálů a těkavých aldehydů. Nízká viskozita chitosanu poskytovala nejsilnější antioxidační účinky [1, s. 145].

2.4.3 Protirakovinné účinky

Bylo prokázáno, že intratumorální podávání (vpravování dovnitř nádoru) chitosanových sloučenin podporuje tělu vlastní protinádorové účinky u metastatických nádorů. Také bylo zjištěno, že chitosan aktivuje makrofágy v cytotoxických makrofázích, a potlačuje tak růst nádorů tím, že způsobuje apoptózu nádorových buněk přes aktivaci kaspázy-3. Dále inhibuje růst buněk nádoru tvorbou aerobních laktátů, čímž se sníží příjem glukózy a hladina adenosintrifosfátu (ATP) v nenarušených buňkách. Při podávání chitosanu *in vivo* je fagocytován makrofágy a enzymaticky degradován lysozomem hydrolyzou acetylovaných zbytků [18, s. 272].

2.5 Směsi chitosanu a dalších biopolymerů

Funkční vlastnosti chitosanových filmů mohou být zlepšeny prostřednictvím míchání s dalšími polysacharidy nebo proteiny. Obecně platí, že mechanické a bariérové vlastnosti fólií na bázi proteinů (př. zein, lepek, sójový protein, želatina) jsou lepší než ty na bázi polysacharidů (př. pektin, methylcelulóza, škrob), protože jejich struktura vykazuje vysoký potenciál tvorby intermolekulárních vazeb [19].

Filmy na bázi chitosanu a sójových bílkovin nejsou zcela mísitelné a se zvyšujícím se obsahem bílkovin se stávají křehčí a drsnější, což pravděpodobně souvisí s fázovou separací mezi složkami směsi. Na druhou stranu systémy chitosan-želatina vytváří díky dobré vzájemné mísitelnosti homogenní směs v důsledku tvorby elektrostatických interakcí mezi aminovými skupinami chitosanu a karboxylovými skupinami želatiny. Kombinace těchto dvou biopolymerů vede ke zlepšení materiálových vlastností filmů ve srovnání s těmi získanými z čistých polymerů [20]. V práci Benbettaieba a kol. [21] byly připraveny filmy na bázi chitosanu a želatiny, u nichž byly hodnoceny bariérové a mechanické vlastnosti. Přídavek želatiny v různých poměrech k chitosanu vedl ke zvýšení pevnosti v tahu a snížení propustnosti kyslíku a vodní páry filmů. Na druhou stranu zvyšování obsahu želatiny vedlo ke zvýšení rozpustnosti ve vodě, což může být v některých aplikacích nežádoucí. Tyto filmy mohou být ovšem s výhodou použity pro začlenění antimikrobiálních látek při přípravě systémů s řízeným uvolňováním [21].

2.5.1 Směsi chitosanu a škrobu

Perspektivním přírodním biopolymerem pro výrobu biologicky rozložitelných filmů je škrob, který se vyznačuje dobrou odbouratelností, obnovitelností a nízkými náklady. Ovšem, vzhledem k nevýhodným mechanickým vlastnostem, mají aplikace škrobových filmů svá omezení. Proto je škrob často kombinován s dalšími přírodními biopolymery, jako je například chitosan. Hlavní rozdíl mezi škrobem a chitosanem je patrný ve vazbě mezi jednotlivými molekulami D-glukopyranózy. Vazba α -(1→4) je typická pro polymerní řetězce škrobu, zatímco vazba β -(1→4) je charakteristická pro řetězce chitosanu. Navíc, hydroxylová skupina druhého uhlíku je nahrazena aminovou skupinou v případě chitosanu.

Vzhledem k tomu, že jeden z homopolysacharidů škrobu – amyulóza je lineární polymer, mohou se jednotlivé řetězce mezi sebou vázat prostřednictvím vodíkových vazeb. Tato vlastnost je primárně zodpovědná za gelovací a filmotvornou schopnost škrobu. Oba polymery, škrob i chitosan, jsou hydrofilní, a proto mohou zadržovat značné množství vody, které závisí na relativní vlhkosti prostředí. V molekule chitosanu existují tři dominantní místa pro adsorpci, a to hydroxylová skupina, aminoskupina a konec polymerního řetězce.

Důležitou roli při aplikacích biopolymerních filmů hrají mechanické a bariérové vlastnosti. Bylo zjištěno, že filmy na bázi směsí škrob-chitosan vykazují podstatně vyšší hodnoty tažnosti v porovnání s filmy připravenými jen z jednoho typu polymeru [22]. Velký význam v tomto případě má i poměr jednotlivých biopolymerů ve směsi. U biodegradabilních filmů připravených z rýžového škrobu a chitosanu byl sledován nárůst pevnosti v tahu s rostoucím obsahem chitosanu ve směsi, s maximálními hodnotami u směsi v poměru škrob:chitosan 1:1 a 0,5:1. Tento jev lze přičítat vysoké tvorbě intermolekulárních vodíkových vazeb mezi aminoskupinou chitosanu a hydroxylovou skupinou škrobu. V kyselém prostředí totiž dochází k protonizaci aminoskupiny chitosanu NH_2 na NH_3^+ , zatímco uspořádané krystalické struktury molekul škrobu jsou rozrušeny za vzniku OH^- skupin, což následně usnadňuje vzájemnou vazbu [23].

Rozpustnost biopolymerních filmů je další z velmi důležitých hodnocených vlastností. V některých aplikacích, obzvláště tam, kde film musí být v kontaktu s vodou během zpracování potravin, je vyžadována vysoká odolnost proti vlhkosti. Na druhou stranu, vysoká rozpustnost může být výhodná v případech, kdy je polymerní obal konzumován spolu s výrobkem, který je ohříván před samotnou konzumací, a může být také důležitým faktorem ovlivňujícím biodegradabilitu povlaků [20].

V práci Bangyekana a kol. [24] byly připraveny filmy na bázi škrobu a chitosanu s obsahem glycerolu, jako změkčovadla, u nichž byla hodnocena hydrofobicita, lesk, propustnost a mechanické vlastnosti. Bylo prokázáno, že vlivem přítomnosti chitosanu došlo k zásadnímu nárůstu lesku připravených filmů. Inkorporace chitosanu měla také za následek pokles smáčivosti, měřené prostřednictvím kontaktních úhlů. Tento jev je přičítán hydrofobním vlastnostem acetylových skupin v molekule chitosanu [20].

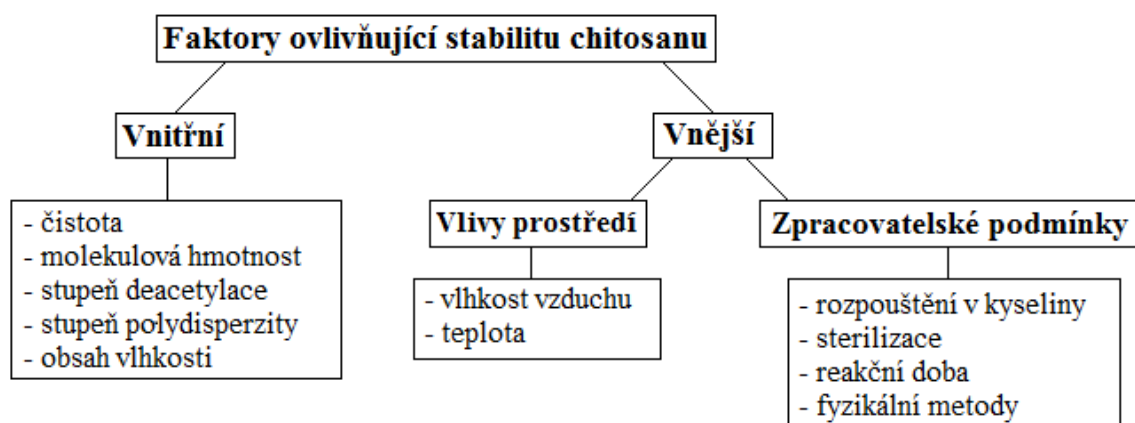
Byly také studovány systémy na bázi chitosan-škrob s obsahem kyseliny ferulové [25]. Kyselina ferulová je sloučenina, vyskytující se v rostlinných buněčných membránách, která se vyznačuje svými antioxidačními účinky a dále také pro-apoptickým účinkem vůči rakovinovým buňkám. Uvedená studie se zabývala analýzou termostability polysacharidových filmů s obsahem kyseliny ferulové, vzhledem k tomu, že při aplikacích fólií v potravinářském a farmaceutickém průmyslu mohou být během jejich přípravy, zpracování nebo spotřeby vystaveny různým tepelným procesům. Bylo prokázáno, že přídavek kyseliny nemá vliv na tepelnou stabilitu. Při studiu mechanických vlastností bylo prokázáno zvýšení pevnosti v tahu u připravených filmů, což lze vysvětlit tvorbou stabilní sítě vytvořené z důvodu zvýšené schopnosti síťování kyseliny ferulové. Zesíťování mezi polysacharidy může být zprostředkováno různými mechanismy, a to například pomocí volných radikálů, nebo esterifikací s hydroxylovými skupinami chitosanu a škrobu. Na druhou stranu vznik těchto nových vazeb zapříčinil pokles tažnosti fólií s rostoucím obsahem kyseliny ferulové [20].

3 STABILITA CHITOSANU

Zvýšení stability lze ovlivnit regulací environmentálních faktorů, změnou zpracovatelských podmínek (např. teploty), zavedením vhodné stabilizační látky, vývojem různých směsí polymerních materiálů, nebo modifikací pomocí chemických či ionických činidel [26].

3.1 Faktory ovlivňující stabilitu chitosanu

Vlastnosti chitosanu (molekulová hmotnost, stupeň deacetylce, čistota) se liší v závislosti na zdroji, z něhož byl materiál získán. Navíc je chitosan velmi citlivý na změny vnějších a zpracovatelských podmínek. Faktory ovlivňující stabilitu chitosanu jsou shrnuty ve schématu (Obr. 9) [26].



Obr. 9 Faktory ovlivňující stabilitu produktů na bázi chitosanu [26]

Chitosan je přírodní biodegradabilní polymer, který se rozkládá na základní netoxické složky. Degradace *in vivo* probíhá pomocí enzymů a to především lysozomů. S přípravou nízkomolekulárního chitosanu za kontrolovaných podmínek souvisí *in vitro* degradace, která se běžně provádí enzymatickou hydrolyzou nebo oxidací. Zásadní roli při určování mechanismu a rychlosti degradace hraje molekulová hmotnost, polydisperzita, stupeň deacetylce, čistoty a obsah vlhkosti. Bez ohledu na způsob degradace proces obvykle začíná náhodným rozštěpením β -(1→4)-glykosidových vazeb (depolymerizace) a poté následují N-acetylové vazby (deacetylce). Současně se štěpením chitosanového řetězce dochází ke štěpení funkčních skupin (amino-, karbonyl-, amido-, hydroxyl-). Důsledkem degradačního procesu je pokles průměrné molekulové hmotnosti a zvýšení stupně deacetylce. Mecha-

nismus degradace může zásadně ovlivnit stabilitu při skladování u systémů na bázi chitosanu [26].

3.1.1 Vnitřní faktory ovlivňující stabilitu chitosanu

3.1.1.1 *Stupeň čistoty*

Komerčně dostupný chitosan může zahrnovat materiály o různých stupních čistoty, molekulových hmotnostech a stupních deacetylce. Široká škála zdrojů a rozmanitost výrobních procesů vedou k velkým rozdílům v kvalitě a vlastnostech chitosanových produktů. Úroveň čistoty chitosanu má vliv na jeho biologické vlastnosti, jako je imunogenicita nebo biologická odbouratelnost, ale také zásadně ovlivňuje jeho rozpustnost a stabilitu. Vysoký obsah popela a zbytkových bílkovin může způsobit potíže při rozpouštění a ztěžovat přípravu chitosanových systémů pro doručování aktivních látek. Mikrobiologická kontaminace biopolymeru může na druhou stranu podpořit degradaci enzymatickou hydrolýzou.

3.1.1.2 *Molekulová hmotnost*

Na molekulové hmotnosti chitosanu je závislá řada jeho fyzikálně-chemických a biologických vlastností, jako je hydrofilita, viskozita, schopnost vytvářet vodíkové vazby, tepelná stabilita, biologická odbouratelnost a mukoadheze. Molekulová hmotnost (M_w) je vyjádřena jako průměr všech molekul přítomných ve vzorku. S ohledem na počáteční zdrojový materiál a typ způsoby přípravy se M_w komerčního chitosanu pohybuje v rozmezí 10–100 000 kDa. Chitosan s vysokou molekulovou hmotností je obecně považován za stabilnější [26].

3.1.1.3 *Stupeň deacetylce*

Stupeň deacetylce (DA) je definován jako poměr *N*-acetylglukosaminových a glukosaminových jednotek, kdy distribuce těchto skupin v polymerním řetězci udává tzv. schéma deacetylce. Oba tyto parametry, spolu s M_w , zásadně ovlivňují vlastnosti chitosanu. Při studiu vlivu stupně deacetylce na snadnost a rychlost degradace bylo zjištěno, že chitosan s nízkým deacetylačním stupněm v důsledku rychlého rozkladu vyvolává akutní zánětlivou odezvu, kdežto chitosan s vysokými hodnotami DA způsobuje minimální zánět. Dále bylo zpozorováno, že s rostoucím stupněm deacetylce se zvyšuje stupeň čistoty vzorku polymeru. Stupeň deacetylce ovlivňuje také hydrolytické a termální vlastnosti polymeru. Chitosan s vyšší hodnotou DA má méně porézní strukturu a nižší schopnost vázat vodu, což

omezuje rychlost degradace v kyselém prostředí. Na druhou stranu, pomalejší rychlost tepelné depolymerace může být výsledkem vzájemného řetězového zesílení mezi volnými aminoskupinami, což má stabilizační vliv na strukturu polymeru, jehož nevýhodou je ovšem vyšší náchylnost k fotodegradaci.

3.1.1.4 Obsah vlhkosti

Chitosan má hygroskopický charakter, a proto vykazuje ve srovnání s chitinem větší schopnost interagovat s vodou za vzniku vodíkových vazeb. Množství absorbované vody závisí na počátečním obsahu vlhkosti a podmínkách skladování (zejména na teplotě a relativní vlhkosti vzduchu). Schopnost chitosanových filmů vázat vodu klesá se zvyšováním stupně deacetylace. Přítomnost absorbované vody hraje významnou roli zejména u pevných chitosanových formulací, jelikož ovlivňuje tokové vlastnosti a stlačitelnost. V průběhu skladování ovšem může docházet ke kolísání hladiny vlhkosti, což se projeví na změnách fyzikálně-chemických a mechanických vlastností [26].

3.1.2 Vnější faktory ovlivňující stabilitu chitosanu

3.1.2.1 Vlhkost prostředí

Přítomnost a distribuce vlhkosti v chitosanovém materiálu je silně závislá na relativní vlhkosti okolí. Rychlost sorpce vody je dána také stupněm deacetylace. Bylo prokázáno, že při vysokých vlhkostních podmínkách (relativní vlhkost je vyšší než 60 %) molekuly vody pronikají intenzivněji do jeho struktury, což vede k zásadnímu nárůstu obsahu vlhkosti. Dlouhodobé skladování chitosanu při vysoké vlhkosti může urychlit hydrolytické štěpení vazeb, ale také měnit fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti.

3.1.2.2 Teplota

Bylo zjištěno, že vystavení chitosanových systémů vyšším teplotám (40 °C) způsobilo významnou ztrátu vlhkosti, což vedlo ke snížení jejich tvrdosti a mechanické síly. Teplota vzduchu může ovlivnit degradaci polymeru a to zejména v kapalných a polotuhých produktech [26].

3.1.3 Zpracovatelské podmínky

3.1.3.1 Vliv kyseliny při rozpouštění

Chitosanové formulace jsou běžně připravovány v roztocích kyselin, přičemž může docházet k degradaci způsobené hydrolýzou. Během hydrolýzy působí kyselina jako katalyzátor, který štěpí polymerní řetězce. Výsledkem je pokles průměrné molekulové hmotnosti, viskozity a oslabení mechanických vlastností. Mezi hlavní faktory ovlivňující rychlost hydrolýzy patří stupeň deacetylace, koncentrace polymeru, druh a koncentrace kyseliny, doba zpracování a teplota. Je třeba zdůraznit, že zvýšená teplota urychluje rozklad polymeru bez ohledu na druhu použité kyseliny.

3.1.3.2 Sterilizace

Vnější faktory ovlivňující stabilitu chitosanu zahrnují i procesy sterilizace, které musí být prováděny v případě farmaceutických chitosanových systémů pro dávkování léčiv a hojení ran, jež vyžadují vysokou mikrobiologickou čistotu. Mezi používané sterilizační metody patří sterilizace pomocí filtrů, sterilizace nasycenou párou, vystavení působení suchého tepla a etylenoxidu nebo γ -záření. Tyto metody však mohou vést k nevratné změně chitosanové struktury a její funkce [26].

3.1.3.3 Zahřívání

Zahřívání se často používá při přípravě systémů na bázi chitosanu. Jsou-li vystaveny vysokým teplotám, může dojít ke změně jejich polymerních vlastností, včetně rozpustnosti ve vodě, viskozity a vzhledu. Bylo zjištěno, že rozklad chitosanu se zrychluje s rostoucí teplotou a délkou trvání ohřevu. Doba zahřívání potřebného k rozpuštění chitosanu v kyselém roztoku by měla být pečlivě kontrolována, protože přehřátí vzorku by mohlo způsobit nejen změnu barvy, ale také reologických vlastností a paradoxně i zpomalovat rychlost jeho rozpouštění. V důsledku tepelného zpracování dochází ke ztrátě části vody, čímž se zvyšuje citlivost chitosanu na teplotu a snižuje jeho stabilita během skladování.

3.1.3.4 Lyofilizace

Lyofilizace (sušení mrazem) je způsob sušení, ve kterém je zmrazený materiál sušen sublimací ledu. Tento proces je využíván v mnoha aplikacích, jako například při přípravě mikro a nanočástic. Nicméně, lyofilizace může způsobit poškození polymeru z důvodu tvorby silných inter- a intramolekulárních vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí, které mo-

hou negativně ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je viskozita, ζ -potenciál a schopnost vázat vodu [26].

4 STABILIZAČNÍ A AKTIVNÍ LÁTKY

Při aplikacích biopolymerů v oblasti biomedicíny, potravinářství a kosmetiky hraje primární roli bezpečnost, minimální iritační potenciál a efektivita používaných látek. Je nutno vyvíjet materiály s dostatečnou stabilitou a bioaktivitou. V souvislosti s tím jsou v současné době rozsáhle studovány potenciální stabilizační a aktivní substance s širokým spektrem aplikovatelnosti a možnosti jejich zakomponování do polymerní matrice.

Atraktivní řešením je v dnešní době enkapsulace (zapouzdření) aktivní složky do „obalu“ tvořeného jiným materiálem. Tyto kapsle lze definovat podle velikosti, která se pohybuje od 1 μm až po 1 mm, a rozeznáváme nano-, mikro- a makrokapsle. Dále je lze dělit podle struktury, kdy mohou zaujímat kulovitý až nepravidelný tvar, mít jedno nebo více jader či povlaků. Mezi požadované vlastnosti patří dobrá snášenlivost s pokožkou, zajištění průniku látky do pokožky tak, aby na ní nezůstaly zbytky, dobrá stabilita aktivní látky a její biodegradabilita zajištěná enzymy v pokožce [27, s. 274].

Biopolymerní matrice na bázi chitosanu se prokázaly jako efektivní nosné systémy pro pomalé uvolňování aktivní složky. Byly studovány například částice s obsahem kyseliny retinové, která byla pomalu a postupně uvolňována. Z kationických polysacharidů je navíc chitosan jedinečný v tom, že má jak hydrofobní neionickou, tak i hydrofilní kationickou část, a je schopen interagovat s keratinem nacházejícím se v pokožce [27, s. 275, 278].

Enkapsulace zajistí cílené specifické a řízené uvolňování aktivních látek, zvýšení jejich účinnosti a permeability do pokožky nebolestivým způsobem. Dále pak zvýšení stability různých kosmetických přísad, které jsou nestabilní nebo citlivé na teplotu, vlhkost, pH, světlo nebo oxidaci, jako jsou nenasycené mastné kyseliny, vitaminy nebo antioxidanty. Také zabraňuje odpařování těkavých látek nebo oddělení jednotlivých složek směsi [28, s. 173][29].

Mezi běžné funkční složky používané v kosmetice patří UV filtry, antioxidanty, močisturizery, složky sloužící k zesvětlení pokožky a molekuly s anti-aging vlastnostmi. Tyto látky působí buď na povrchu pokožky, nebo v jednotlivých vrstvách pokožky. Enkapsulace lze využít v kosmetických aplikacích, jako je výroba sprchových gelů a mýdel, lotionů, pleťových a opalovacích krémů, produktů na vlasy, make-upů, zubních past atd. [29] V Tab. 1 jsou uvedeny příklady některých chitosanových aktivních systémů a jejich aplikací v biomedicínské oblasti.

Tab. 1 Systémy dodávání aktivních látek na bázi chitosanu a jejich aplikace [26]

Materiál	Aktivní látka	Forma dávkování	Aplikace
Nemodifikovaný chitosan	Bimatoprost	Vložky s prodlouženým uvolňováním	Oční léčba glaukomu
	Chloramfenikol	Lipozomální hydrogel s prodlouženým uvolňováním	Léčba ran
	Metrodinazol	Hydrogel	Parodontální léčba
Zesítěný chitosan s glukóza-1-fosfátem	Diklofenak draselný	<i>In situ</i> tvořící hydrogel	Injekce
Zesítěný chitosan s kyselinou citronovou	Cisplatin	Mikročástice	Systém inhalace suchého prášku pro léčbu rakoviny
Komplex chitosanu a dextran sulfátu	Insulin	Nanočástice	Perorální podáním pro léčbu insulinem/diabetu
Směs chitosanu a alginátu	Fucoidan	Lyofylizovaný scaffold	Inženýrství kostní tkáně

Další část práce je věnována vybraným stabilizačním a aktivním látkám s potenciálem pro aplikace v kombinaci s chitosanovou maticí.

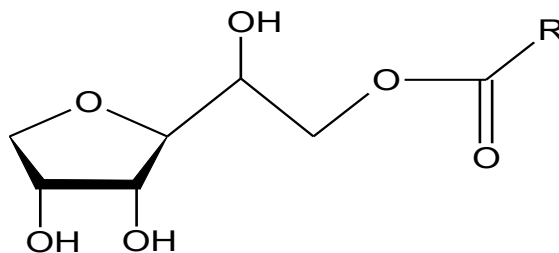
4.1 Amfifilní neionické sloučeniny

Neionické emulgátory Span a Tween vykazují řadu výhod oproti anionickým povrchově aktivním činidlům, včetně zvýšené stability vytvářející flexibilitu a širší kompatibilitu. Jsou stabilní ve slabých kyselinách, zásadách a elektrolytech a nereagují s přísadami a aktivními látkami. Kombinací těchto dvou emulgátorů v různých poměrech je možné vyrábět systémy s širokým rozsahem hodnot hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB) pro emulgaci většiny olejů a vosků. Řadí se také mezi vysoce účinná rozpouštědla, dispergační činidla a pomocné látky při zvlhčování. Všeobecně patří mezi nejvíce uznávané, bezpečné a schválené emulgátory používané nejen v potravinářském průmyslu, ale také v kosmetickém, textilním a farmaceutickém [30][31, s. 163].

Směs emulgátorů s nízkou a vysokou HLB hodnotou je často účinnější než použití pouze jednoho druhu. Kombinací Tween a Span lze připravit stabilní emulze olej ve vodě (O/V) a voda v oleji (V/O) různých sloučenin. Velmi důležité je stanovit požadovanou hodnotu HLB materiálů, které mají být emulgovány, a směs vhodných typů emulgátorů [30].

4.1.1.1 Estery sorbitanu (Spany)

Jedná se o estery MK, které vznikají esterifikací sorbitolu (sorbitu) s vyššími MK při teplotě 200–250 °C v inertní atmosféře a za přítomnosti kyselého nebo alkalického katalyzátoru. Sorbitol patří do skupiny sloučenin nazývaných jako cukerné alkoholy nebo také polyoly, které mají podobné vlastnosti jako emulze glycerolu. Sorbitanové estery MK jsou neiontové lipofilní emulgátory s nízkou hodnotou HLB (2–8). S rostoucím stupněm esterifikace a klesající délkou řetězce MK se snižuje hodnota HLB, což zajišťuje vynikající rozpustnost lipofilních materiálů. Rovněž estery sorbitanu obsahující nenasycené a rozvětvené mastné kyseliny působí jako účinné emulgátory pro systém V/O. Zavedením polyoxyethylenových řetězců do molekuly sorbitanového esteru lze zvýšit jeho špatnou dispergovatelnost ve vodě [30][31, s. 163, 167][32, s. 297, 298].



Obr. 10 Struktura monoesteru sorbitanu

Tab. 2 Názvosloví a fyzikální vlastnosti esterů sorbitanu [31]

Obecný název	Obchodní název	Skupenství (25 °C)	HLB (± 1)
Sorbitan monolaurát	Span 20	Kapalné	8,6
Sorbitan monopalmitát	Span 40	Pevné	6,7
Sorbitan monostearát	Span 60	Pevné	4,7
Sorbitan tristearát	Span 65	Pevné	2,1
Sorbitan monooleát	Span 80	Kapalné	4,3

4.1.1.2 Ethoxylované estery sorbitanu (Tweeny)

Sloučeniny spadající do skupiny polysorbátů mají hydrofilní povahu. Patří tedy mezi emulgátory rozpustné ve vodě a zředěných roztocích elektrolytů. S rostoucím počtem esterových skupin se však snižuje jejich rozpustnost ve vodě. Vyrábějí se modifikací sorbitanového esteru s kapalným ethylenoxidem při teplotách 100–160°C v přítomnosti methanolátu sodného, který slouží jako katalyzátor. Ethylenoxid je schopen vázat volné hydro-

xyskupiny a vzniklý produkt obsahuje průměrně 20 molekul ethylenoxidu na 1 mol esteru a jeho HLB hodnota se zvyšuje o 5–10 jednotek, čímž se stává rozpustným ve vodě. Po přidání malého množství polysorbátových emulgátorů do vody, lze zaznamenat pokles mezifázového napětí.

Typ a stabilita emulzí připravených za použití polysorbátů je silně závislá na teplotě. Přestože jsou považovány za hydrofilní, s rostoucí teplotou jejich rozpustnost ve vodě klesá a stávají se více lipofilními [30][31, s. 168][32, s. 298].

Tab. 3 Názvoslovní a fyzikální vlastnosti ethoxylovaných esterů sorbitanu [31]

Další název	Obchodní název	Obecný název	Skupenství (25 °C)	HLB (± 1)
Polysorbate 20	Tween 20	Polyoxyethylen (PEG-20) sorbitan monolaurát	Kapalné	16,7
Polysorbate 40	Tween 40	Polyoxyethylen (PEG-20) sorbitan monopalmitát	Kapalné	15,6
Polysorbate 60	Tween 60	Polyoxyethylen (PEG-20) sorbitan monostearát	Gel	14,9
Polysorbate 65	Tween 65	Polyoxyethylen (PEG-20) sorbitan tristearát	Pevné	10,5
Polysorbate 80	Tween 80	Polyoxyethylen (PEG-20) sorbitan monooleát	Kapalné	15,0
Polysorbate 85	Tween 85	Polyoxyethylen (PEG-20) sorbitan trioleát	Kapalné	11,0

4.1.1.3 Využití Span a Tween jako emulgátorů

Většina esterů sorbitanu a polysorbáty se uplatňují v produkci kvalitních pekařských výrobků. Lze je využít také v mlékárenství, zpracování oleje nebo pro výrobu cukrovinek. Estery sorbitanu jsou považovány za chuťově nevýrazné, za to polysorbáty se vyznačují jedinečnou hořkou chutí. Tween 60 vykazuje nejvíce příjemnou chuť ve srovnání s Tween 20 a 80. Díky své povaze napomáhá vzniku disperze spolu s emulgátory s nízkou hodnotou HLB jako jsou monoglyceridy nebo estery sorbitanu. Při použití mono- a diglyceridů na výrobu koláčů lze zvýšit jejich účinnost přidávkem Tween 60. Monoglyceridy jsou přidávány do těsta převážně ke zlepšení nadýchanosti, zatímco Tween 60 se přidává do pečiva ke zpevnění těsta a prodloužení jeho čerstvosti [32, s. 175, 176].

Span 80 (sorbitan monooleát) je vynikající pro přípravu emulze V/O a obzvláště je užitečný v aerosolovém systému, jako jsou leštící spreje a čisticí prostředky. Přípravky využívané k leštění na bázi V/O se při použití samotného Span 80 při rozprašování rychle rozpada-

jí a to i ve směsi s vosky a silikony. Při použití emulgátorů Span 60 a 80 v kombinaci s Tween 60 a 80 se vytvoří vynikající emulgační systém pro silikonové kapaliny, které lze využívat jako prostředky k leštění nábytku nebo bot.

Emulgátory typu Tween jsou všestranné solubilizátory pro všechny typy vonných látek a parfémů využívaných v osvěžovačích vzduchu a jiných výrobcích pro domácnost. Tween 20 a 80 mají vysoké HLB hodnoty a jsou zvláště vhodné při rozpouštění těkavých složek. Nejčastěji používaný je Tween 80 kvůli malému zápachu. Typický poměr emulgátoru a vůně je 1:1, který se však může měnit v závislosti na složení a vůni, která má být rozpuštěna [30].

Pro rychlé a snadné odstranění mastných skvrn mohou být použity emulgátory skupiny Tween do ubrousků a netkaných tkanin. Tween 20, 80 a 85 jsou používány kvůli rychlé tvorbě emulze s mastnotou a napomáhají tak udržovat čistý povrch. Výhodou Tween 20 je jeho mírnost k pokožce, a proto je vhodný pro aplikaci do vlhčených ubrousků, kde zabráňuje jejich vysoušení. Dále se také používá směs Tween 21 a 60, která vytváří mikroemulzní gely na bázi rozpouštědel a slouží jako přírodní alternativa. Smísením těchto emulgátorů lze vytvořit film, který chrání pokožku před oleji a vodou. Kombinací Span 60 a Tween 60 nebo Span 80 a Tween 80 lze získat emulgační systémy zvyšující odolnost vůči olejům a vodě. Tuto směs lze použít např. pro odstranění rostlinných olejů a lanolinových derivátů [30].

4.2 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (dále jen MK) se řadí mezi hlavní složky lipidů a mohou být charakterizovány jako karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem nejméně se čtyřmi a více atomy uhlíků. V lipidech se nacházejí různé druhy MK, které se dělí podle přítomnosti dvojně vazby, a to na nasycené (neobsahují žádnou dvojnou vazbu), nenasyčené (monoenoové obsahují jednu dvojnou vazbu a MK se dvěma a více vazbami jsou polyenoové) a MK s trojnou vazbou (trienové). Dále se v lipidech vyskytují MK s rozvětvenou nebo cyklickou strukturou a také MK s kyslíkatými, sírnými nebo dusíkatými funkčními skupinami [33, s. 88].

4.2.1 Kyselina laurová

Kyselina laurová (kyselina dodekanová, KL) je nasycená MK se středně dlouhým řetězcem s 12 atomy uhlíku. Přirozeně se vyskytuje v různých rostlinných a živočišných tucích a

olejích a je hlavní složkou kokosového oleje a oleje z palmových jader. Má velmi malou toxicitu, a proto se běžně používá v mýdlech a šamponech [34].

Kyselina laurová je základní kyselinou kokosového oleje, kde zaujímá 45–53 % z obsahu všech kyselin a zastupuje tak mnoho vlastností tohoto oleje. Díky její snadné absorpci je kokosový olej snadno metabolizován a patří mezi MK, které nejméně přispívají k akumulaci tuku v těle. Kokosový olej je levný, netoxický má dlouhou životnost a je používán jako součást potravinových obalů. Dále se používá jako mazivo a přísada v průmyslových přípravcích, k výrobě léčiv, mýdel nebo jako změkčovadlo a dispergační činidlo v kaučuku [35][36].

Kyselina laurová a její derivát 1-monolaurin vykazují pozitivní účinek proti grampozitivním bakteriím, plísním a virům. Jejich antimikrobiální působení může být založeno na destrukci buněčné membrány bakterií pomocí fyzikálně-chemických procesů, ovlivnění signální transdukce a transkripce buněk nebo stabilizace lidských buněčných membrán. V přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů byla aktivita kyseliny snížena, zatímco nižší pH její aktivitu neovlivnilo. Bylo dokázáno, že z nasycených MK má kyselina laurová největší antimikrobiální účinnost. Derivát 1-monolaurin vykazuje ještě větší schopnost inhibovat mikroorganismy, má největší účinnost ze všech monoglyceridů a po hydrolýze je schopen uvolňovat kyselinu laurovou. Obecně bylo prokázáno, že sloučeniny obsahující laurylestery vykazují antimikrobiální aktivitu [35].

Monolaurin je přírodní látka, která vzniká esterifikací glycerolu a kyseliny laurové, a vykazuje potenciální antimikrobiální účinky. Při porovnání inhibiční schopnosti samotného monolaurinu a esenciálního oleje oba vykazují mnohem menší účinnost než při jejich kombinaci. Byl prokázán jejich synergický účinek v léčbě proti bakteriální infekci (př. *S. aureus*). Obrovskou výhodou použití esenciálních olejů před antibiotiky je, že si bakterie vůči nim nevyvíjejí odolnost. Dilaurin na rozdíl od monolaurinu neproказuje inhibiční vlastnosti v růstu bakterií. Obecně je známo, že diglyceridy a triglyceridy kyseliny laurové jsou neúčinné proti růstu mikroorganismů [37].

Filmy založené na bázi chitosanu a kyseliny laurové jsou používány jako antimikrobiální obaly a povlaky. Tyto aktivní filmy prokázaly inhibici růstu *Bacillus subtilis* a *E. coli*, což dokazuje synergický antimikrobiální účinek těchto dvou látek. Bylo zjištěno, že kyselina laurová má antibakteriální účinek ke grampozitivním bakteriím, zatímco při zakomponování do chitosanu inhibuje růst gramnegativních bakterií [36].

Bylo prokázáno, že kyselina laurová je jedna z typických volných MK, které se nacházejí v kožním lidském mazu. Má silnější antimikrobiální aktivitu proti *Propionibacterium acnes* (grampozitivní bakterie zodpovědná za vznik akné) než benzoylperoxid, který má navíc řadu vedlejších účinků jako je vznik erytémů, šupinatění nebo pálení pokožky. Výhodou je, že nezpůsobuje cytotoxicitu lidských sebocytů naopak její nevýhodou je špatná rozpustnost ve vodě, a proto se jako rozpouštědlo často používá dimethylsulfid. Tato látka zlepšuje rychlost transportu přes kožní bariéru, ale na druhou stranu má dráždivé a toxické účinky. Kromě toho obvyklé lékové formy jako jsou krémy, gely nebo masti neprocházejí účinně přes pilosebaceozní jednotku a koncentrace léčiva prošlého do pokožky je tedy menší. Jednou z možností je zapouzdření kyseliny laurové do lipozomů, které tak mohou zajišťovat léčbu proti akné přirozenou cestou [38].

4.2.2 Kyselina olejová

Kyselina olejová (kyselina *cis*-oktadek-9-enová) se řadí mezi monoenoové MK, které patří k hlavním složkám přírodních lipidů. Její uhlovodíkový řetězec je tvořen 18 atomy uhlíku, dvojná vazba má *cis*-konfiguraci a nachází se na 9. atomu uhlíku řetězce od karboxylové skupiny. Tato kyselina se prakticky vyskytuje ve všech tucích a olejích. V živočišných tucích je obvykle doprovázena kyselinou palmitolejovou. Vzniká během částečné hydrogenace vícesytných nenasycených MK a zároveň může být přírodními nebo syntetickými procesy přeměněna na jiné MK. Kvůli jedinému dlouhému uhlovodíkovému řetězci je hydrofobní a tudíž nerozpustná ve vodě. Kyselina olejová je při použití *in vitro* cytotoxická vůči bakteriím, plísním, savčím buňkám včetně B-lymfocytů, T-lymfocytů, epitelových buněk a tumorům [32, s. 19][39, s. 4].

Kyselina olejová se používá k modifikaci mechanických a bariérových vlastností jedlých filmů a povlaků. Chitosanové povlakové fólie jsou průhledné s vhodnou mechanickou odolností a nízkou propustností pro kyslík. Nicméně kvůli jejich hydrofilní povaze tvoří špatnou bariéru proti vlhkosti, což omezuje jejich použití. Jedna z možností, jak vylepšit tento nedostatek je zabudování hydrofobní sloučeniny, jako jsou lipidy (MK, rostlinné oleje, éterické oleje a vosky) do emulgovaných filmů. Začlenění kyseliny olejové jako hydrofobní fáze disperze, kladně ovlivní vlastnosti přenosu vodní páry, jelikož je schopna díky svému hydrofobnímu charakteru snížit vodní afinitu biopolymerní matrice. Rozpustnost biopolymerních filmů ve vodě určuje jejich biodegradabilitu, avšak vysoká rozpustnost fólií by mohla být nevýhodou pro použití v prostředí s vysokou relativní vlhkostí. Jednou

z nevýhod filmů na bázi chitosanu a kyseliny olejové může být jejich mírně žlutozelená barva. S rostoucím obsahem kyseliny se zvyšuje i intenzita zbarvení [39, s. 4][40].

4.3 Deriváty kyseliny mléčné

Estery monoacylglycerolů kyseliny mléčné bývají také označovány jako laktoglyceridy. Vyrábějí se esterifikací monoacylglycerol kyselinou mléčnou v poměru 1:1 za teplot nad 100 °C a sníženého tlaku. Laktoglyceridy se používají jako emulgátory při tvorbě emulze typu V/O a mají sklon krystalizovat v α -formě a v této formě stabilizovat i monoacylglyceroly. Lze je použít samotné nebo v kombinaci s 2-stearoyl laktáty (2-stearoyl mléčnany) při přípravě mražených krémů a šlehačkových výrobků. Dále mohou být součástí některých druhů pečiva. Výborné uplatnění našly při výrobě keksů, kde zvětšují jejich objem a pórovitost [32, s. 295].

Soli kyseliny 2-stearomléčné vznikají reakcí kyseliny stearové s kyselinou mléčnou v inertním prostředí při teplotách 180–200 °C. Jako katalyzátory se používají zásadité vápenaté nebo sodné sloučeniny. Karboxylová skupina kyseliny stearové reaguje s hydroxylem kyseliny mléčné, jejíž karboxylová skupina zůstává nezměněna. Tato skupina však může reagovat s hydroxylem další molekuly kyseliny mléčné za vzniku esteru. Ve výsledném produktu reakce se proto vždy nacházejí polymerované estery. Obchodní produkty jsou vyráběny převážně ze směsi kyseliny stearové a palmitové, které se získávají ze ztužených tuků. Sodné i vápenaté soli se používají ke zlepšení jakosti pečiva kvůli své schopnosti tvořit komplexy s amylozou. Častěji se však používá sodná sůl, jelikož prodlužuje čerstvost pečiva. Při zakomponování těchto solí do těsta lze snížit množství tuku v receptuře v některých druzích pšeničného pečiva, nebo jej úplně vynechat. Obě soli slouží jako účinné emulgátory pro emulze typu O/V [32, s. 299].

4.4 Esenciální oleje

Esenciální oleje (dále jen EO) neboli silice jsou komplexní směsi těkavých sloučenin, které jsou získávány z rostlinného materiálu destilací, extrakcí nebo lisováním za studena. Většina z nich se skládá ze směsi terpenů, terpenoidů a dalších aromatických a alifatických složek, jejichž složení se může výrazně lišit v závislosti na specifickém oleji. Všechny rostliny mají schopnost produkovat tyto těkavé sloučeniny, často však jen ve stopovém množství. Pro komerční účely jsou využívány rostliny, které mají schopnost akumulovat těkavé látky ve speciálních anatomických strukturách, což vede k vyšším koncentracím

EO. Rozdíly ve složení esenciálního oleje jednoho druhu rostliny může být odlišné, a to v závislosti na části rostliny, ze které je silice izolována, na vnějším prostředí nebo lokalizaci výskytu [10][41, s. 41].

4.4.1 Techniky výroby esenciálních olejů

Převážná většina silic se vyrábí z rostlinného materiálu, ze kterých se získávají různými druhy destilace nebo lisováním za studena v případě olejů získávaných ze slupek citrusových plodů. Při tzv. hydrodestilaci je nasekaný rostlinný materiál v přímém styku s vařící vodou. Při parní destilaci se pára vyrábí v kotli, ze kterého je odváděna do nádoby s rostlinnou hmotou. Tato metoda probíhá za atmosférického tlaku. Kromě toho existuje také vysokotlaká parní destilace, která sníží dobu potřebnou pro destilaci. Kondenzovaný destilát se rozděluje na dvě vrstvy, vodnou a olejovou, které lze následně samostatně odseparovat. Obecně je proces destilace párou nejrozšířenějším způsobem výroby EO ve velkém měřítku [41, s. 5].

Ve výzkumných laboratořích se používají převážně techniky, které slouží k zachycení malého množství těkavých látek z aromatických rostlin a částečně také pro stanovení obsahu EO v rostlinné hmotě. Nejčastěji používaným zařízením je cirkulační destilační aparatura. Toto zařízení se skládá z vyhřívané kulaté nádoby, do které je umístěn nasekaný materiál a voda, a je spojeno s kondenzátorem a odměrnou trubicí. Tato trubice slouží k objemovému stanovení oleje. Jelikož se jedná o kontinuální destilační zařízení s uzavřeným okruhem, nachází se ve spodní části třicestný ventil, který umožňuje nasměrovat vodu zpátky do nádoby. Na konci destilačního procesu je EO oddělen od vodní fáze. Doba destilace závisí na rostlinném materiálu, ale obvykle trvá 3–4 hodiny [41, s. 5, 6].

4.4.2 Antimikrobiální účinky esenciálních olejů

Antimikrobiální aktivita různých EO se přičítá malým terpenoidům a fenolickým sloučeninám. Čisté sloučeniny jsou schopny významně snížit počet patogenních bakterií v potravinách. Tyto účinky jsou vysvětlovány pomocí kombinace různých mechanismů působících na různých úrovních v buňce. Hydrofobicita EO jim umožňuje rozpouštět se v bakteriální buněčné membráně a mitochondriích, narušovat jejich struktury a činit je propustnějšími. Může také dojít k úniku iontů a jiných látek z buňky, inhibici přenosu elektronů, přemístění proteinů. Navíc jsou schopny interagovat s adenosintrifosfatázami cyto-

plazmatické membrány, tyto interakce a následný únik buněčných složek, jako je například ATP, pak vedou ke smrti buněk [10].

Bylo zjištěno, že tymiánový EO obsahuje více než 60 sloučenin, kdy většina z nich vykazuje antioxidační a antimikrobiální vlastnosti proti širokému spektru gramnegativních i grampozitivních bakterií. Mezi nejdůležitější aktivní složky tohoto oleje patří fenoly, tymol, rozmarýnová kyselina a karvakrol. Dalším významným olejem je bazalkový EO, který vykazuje antimikrobiální účinek proti různým bakteriím, jako je např. *E. coli* a proti plísním *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo* aj. Začleněním těchto EO do chitosanových filmů lze získat aktivní film s řízeným uvolňováním, který by mohl být použit pro konzervování potravin, kde vůně olejů jsou kompatibilní s potravinou, jako je maso nebo zelenina [42].

4.4.3 Antivirové účinky esenciálních olejů

Kromě antimikrobiálních a antifungálních vlastností téměř všech EO, vykazuje tato skupina přírodních sloučenin také antivirové účinky. Viry jsou submikroskopické částice (v rozmezí od 20 do 300 nm), které mohou infikovat buňky biologického organismu. Reprodukují se pouze infikováním hostitelské buňky. Na rozdíl od živých organismů, viry nereagují na změny ve svém prostředí. EO jsou schopny potlačit působení virů různými způsoby. Mohou zabránit jejich replikaci nebo šíření z buňky na buňku. Byla prokázána antivirová aktivita santalového a eukalyptového oleje proti viru Herpes simplex typu 1 a 2. Při opakované herpetické infekci je doporučována aplikace obou olejů [41, s. 244].

4.4.4 Protirakovinné účinky esenciálních olejů

Některé typy EO nebo jejich hlavní složky a metabolity se považují za přírodní protirakovinnou terapii, která se využívá po celém světě. Jedna z nejvýznamnějších sloučenin je buď *d*-limonen (hlavní složka EO ze slupek sladkého pomeranče a jiných citrusů) nebo perillylalkohol (nejdůležitější metabolit tohoto monoterpenového uhlovodíku). Bylo zjištěno, že perillylalkohol vykazuje zvýšenou apoptózu nádorových buněk a je tedy účinným chemoterapeutickým činidlem. Dále bylo prokázáno, že tento monoterpenový alkohol potenciálně zeslabuje oxidaci indukovanou nitrilotriacetátem železnatým a množení nádorových buněk. Další terpenické alkoholy jako geraniol, linalool, menthol a β -citronellol vykazovaly rovněž inhibiční aktivitu. Dieta založená na konzumaci ovoce a zeleniny, která je

bohatá na monoterpeny jako je *d*-limonen, snižuje riziko rozvoje rakoviny tlustého střeva, mléčné žlázy, pankreatu a plic [41, s. 236, 237].

4.4.5 Antioxidační účinky esenciálních olejů

Volné radikály jsou agresivní, nestabilní a vysoce reaktivní atomy nebo sloučeniny obsahující jeden volný elektron. Vznikají v důsledku různých metabolických aktivit. Velké množství radikálů se vyskytuje v důsledku vnějších vlivů, například vlivem působení některých chemických látek, rentgenového nebo UV záření, mohou být přijímány prostřednictvím cigaretového kouře, smogu, z pesticidů, organických rozpouštědel, lepidel apod. Napadány jsou převážně nukleové kyseliny DNA a RNA, proteiny a zejména polynenasycené mastné kyseliny membránových lipidů [41, s. 256].

Antioxidanty nazýváme látky, které jsou schopné i v relativně malých koncentracích chránit organismy před „oxidačním stresem“. Ten může způsobit řadu závažných onemocnění jako je rakovina nebo nemoci kardiovaskulárního systému. To znamená, že jsou schopny oddálit nebo inhibovat oxidační destrukci způsobenou kyslíkovými (ROS) nebo dusíkovými (NOS) radikály. Známým přirozeně se vyskytujícím antioxidantem je vitamin C (kyselina askorbová), který je obsažen v mnoha citrusových plodech. Dále pak vitamin E, který lze nalézt v oříšcích a slunečnicových semenech. Také β -karoten a lykopin, které patří do skupiny karotenoidů, jsou dalšími příklady přírodních antioxidantů. Na druhé straně existuje mnoho syntetických látek, jako je butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT) a derivát vitaminu E trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová), které jsou rovněž známy pro svou antioxidační aktivitu. Jelikož existují domněnky o potenciálním vzniku onemocnění v důsledku použití syntetických antioxidantů, je stále větší zájem o přirozeně se vyskytující alternativy [43][44].

Antioxidační aktivita EO zásadně závisí na jejich složení. Hlavní složky silic představují fenolické sloučeniny, které mohou být rozděleny podle jejich uhlovodíkové kostry na terpenoidy a fenylypropanoidy. Obecně platí, že antioxidační účinek přírodních i syntetických fenolických sloučenin je založen na reakci jejich atomu vodíku s volnými peroxylovými radikály. Při této reakci dochází k zániku těchto radikálů, avšak nově vznikají radikály fenoxylvé. Tyto molekuly mohou reagovat s peroxylovými radikály a vytvářet tak nereaktivní produkty [44].

4.4.6 Využití EO v konzervaci potravin

Esenciální oleje mohou díky svým vlastnostem sloužit ke konzervaci potravin. Tyto aplikace jsou však často omezeny z důvodu jejich intenzivní vůně a potenciální toxicity. Možné řešení tohoto problému představuje enkapsulace EO do polymerní matrice/filmu. Rychlost uvolňování enkapsulovaného EO z polymerní matrice může být kontrolována, čímž se zvýší její antimikrobiální působení na výrobek přímým kontaktem. Filmy na bázi chitosanu a EO se ukázaly jako účinné při prodloužení doby trvanlivosti některých druhů ovoce a zeleniny, jako je sladká paprika nebo bobule hroznového vína [10].

V následující tabulce jsou uvedeny příklady potravin, u nichž byly aplikovány antimikrobiální obaly s obsahem různých typů esenciálních olejů.

Tab. 4 Esenciální oleje součástí antimikrobiálních filmů pro konzervaci ryb [45]

Produkty	Povlakový materiál	Druh EO	Cílový mikroorganismus
Za studena uzená sardinka	Želatinové filmy	Oregano, rozmarýn	Organismy produkující H ₂ S, luminiscenční bakterie a <i>Enterobacteriaceae</i>
Za studena uzený losos	Filmy z odpadů při zpracování brambor	Oregano	<i>L. monocytogenes</i>
Losos	Proteiny ječmenných otrub a želatinové filmy	Semena grapefruitu	<i>E. coli</i> a <i>L. monocytogenes</i>
Treska	Želatina v kombinaci s chitosanovým filmem	Hřebíček	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> a bakterie kyseliny mléčné

4.4.7 Využití EO v kosmetice

Rostoucí zájem o přírodní kosmetiku je důvodem snahy nahrazovat syntetické látky i v této oblasti. Esenciální oleje zde mohou být využívány za účelem zajištění antibakteriálních, antioxidačních, konzervačních a částečně i hojivých účinků. Antibakteriální účinek silice závisí na obsahu, koncentraci a interakcích mezi hlavními účinnými složkami. Konzervační látky by měly mít široké spektrum inhibiční aktivity při minimální koncentraci. I přes to, že většina EO je považována za bezpečné látky, některé z nich představují riziko kontaktní alergie. Navíc bylo prokázáno, že pokud je olej aplikován samostatně, jeho konzervační účinek je obvykle nedostatečný, a je nutné jej použít ve vyšší koncentraci. Kombinace syntetických konzervačních látek a EO umožňuje snížit koncentraci obou složek v důsledku jejich synergické aktivity a přesto vykazují biostatický účinek [46].

V péči o ústní dutinu mají EO podobnou účinnost proti bakteriím, které vytvářejí zubní plak, jako běžně dostupné ústní vody na bázi alkoholu. Mátový a eukalyptový EO může sloužit k navození chladícího pocitu na kůži nebo v ústech. Navíc esenciální oleje mohou sloužit jako bioaktivní kosmetické přísady k ochraně pokožky před volnými radikály, které jsou zodpovědné za stárnutí pokožky, její změnu barvy, ztrátu elasticity a tvorbu vrásek. Esenciální oleje se používají také ve výrobcích v péči o vlasy, zvyšují jejich lesk, mají kondičionální účinky, mohou zlepšit zdravý růst vlasů nebo snížit tvorbu lupů [47]. V Tab. 5 jsou uvedeny typy aplikací kosmetických produktů s obsahem esenciálních olejů.

Tab. 5 Příklady esenciálních olejů použitých v různých kosmetických produktech [47]

Použití	Druh EO	Použití	Druh EO
Emoliencia Moisturizery Anti-ageing produkty	Heřmánkový Vanilín Santalové dřevo Pupalkový Olivový	Proti popraskání pokožky a vzniku vrásek	Kamélie Pupečník asijský Rakytníkový
Opalovací krémy	Levandule Oragáno	Krémy po opalování	Tea tree Mentol Heřmánek Pačuli
Zubní pasty	Hřebíček Eukalypt Peppermin Menthol	Šampony Mýdla	Rozmarýn Levandule Sladký pomeranč
Proti akné	Rozmarýnový Tea tree	Proti lupům	Tymián Bergamot Tea tree

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

- Chitosan nízkomolekulární (50–190 kDa, Sigma-Aldrich)
- Škrob rozpustný p.a. (Lachema n. p., Brno)
- Tween 80 (polyoxyethylenesorbitan monooleát, CMC = 0,012 mM, Sigma-Aldrich)
- Glycerin bezvodý p.a. (molární hmotnost 92,10 g·mol⁻¹, obsah 99,5 % min, PENTA – Ing. Petr Švec)
- Kyselina laurová čistá (molární hmotnost 200,32 g·l⁻¹, Lachema n. p., Brno)
- Kyselina octová p.a. (M_R = 60,05; obsah 99,8 % min, IPL – Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Éterický olej oregano (origanum vulgare, Nobilis Tilia)
- Éterický olej máta peprná (mentha piperin, Nobilis Tilia)
- Éterický olej citronela (cymbopogon winterianus, Nobilis Tilia)
- Hydrofilní olej levandulový (Nobilis Tilia)

5.2 Použité přístroje a pomůcky

- Magnetická míchačka s ohřevem MM4 (200–800 ot/min, MAX 370 °C, Lavat Chotutice)
- Ultrazvuková lázeň K-10LE (termostat 20–80 ± 2°C, Merci s.r.o)
- Ultra Turrax T25 Digital (3 000–25 000 ot/min, IKA)
- Elektrická sušárna
- Třepačka Meast 25 (~220 V/50 Hz, VD Lověna Praha)
- Analytické váhy Sartorius (Sartalex – Ivo Šebesta)
- Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Instruments Ltd, součástí je kyveta 1070 pro měření ζ potenciálu)
- Tenziometr K20 EasyDyne (Krüss GMBH Germany)
- pH/mV metr CPH 51 (ELTECA – Zdeněk Jursík, Turnov)
- Digitální třmenový mikrometr (rozsah 0–25 mm, Schut Geometrical Metrology)
- Filtrační zařízení dle Mortona (pórovitost frity S3/P40 SIMAX, Merci s.r.o.)

- Stříkačkové filtry Millipore Millex GS/Optex GS (pórovitost filtru 0,22 μm , MCE membrána, Merci s.r.o)
- Laboratorní sklo a plasty (Petriho miska, vialka)
- Plynový kahan
- Exsikátor ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

5.3 Metodika

5.3.1 Stanovení sušiny chitosanu

Do předem vysušených váženek byl navážen 1 gram nízkomolekulárního chitosanu. Vzor-ky byly sušeny při teplotě 102 °C v elektrické sušárně po dobu 24 hodin a sušina byla vy-počítána podle vzorce:

$$DM = \frac{M_D}{M_W} [\%] \quad (1)$$

M_D ...hmotnost vzorku po vysušení [g]

M_W ...hmotnost vzorku před vysušením [g]

Průměrný podíl sušiny chitosanu byl stanoven na 99,56%.

5.3.2 Příprava roztoků a filmů na bázi chitosanu

Základní roztok chitosanu o koncentraci 1 % hm. byl připraven navážením vypočítaného množství s přesností na 0,0001 g a rozpuštěním v předem připraveném 1% roztoku kyseliny octové. Po 24 hodinách míchání byla získána homogenní směs, která byla filtrována přes fritu (typ S3).



Obr. 11 Ultra Turrax T25 Digital [48]

První série vzorků (označení H1) byla připravena tak, že k základnímu roztoku chitosanu byla přidána kyselina laurová, Tween 80, glycerol a esenciální olej citronela. Vzorky byly homogenizovány pomocí Ultra Turraxu 2 minuty při 12 600 ot./min. Složení vzorků je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6 Složení vzorků H1

Vzorek	Chitosan [%]	KL [%]	Glycerol [%]	EO [%]	Tween 80 [%]
H1-1	1	0,05	0,5	-	-
H1-2	1	-	-	3	1
H1-3	1	-	0,5	3	1
H1-4	1	0,05	0,5	3	1
H1-5	1	0,05	0,5	3	2
H1-6	1	0,05	0,5	3	3

Druhá série vzorků (označení H2) byla připravena modifikací postupu dle [51] smícháním glycerolu, základního roztoku chitosanu a kyseliny laurové. Směs byla míchána na magnetickém míchadle při cca 500 ot./min za současného postupného zahřívání na teplotu 70 °C, při které homogenizace pokračovala po dobu 40 minut. Následně byl přidán vybraný esenciální olej, a to máta (vzorek 2), resp. a citronela (vzorek 3) a homogenizace pokračovala další hodinu. Složení roztoků je uvedeno v Tab. 7.

Tab. 7 Složení vzorků H2

Vzorek	Chitosan [%]	KL [%]	Glycerol [%]	EO [%]
H1-1	2	0,07	1	-
H1-2	2	0,07	1	3
H1-3	2	0,07	1	3

Po homogenizaci byla část roztoků ponechána pro další zkoušky, část byla odlita na sterilní Petriho misky a sušena při 35°C po dobu 24 hodin. Před dalšími experimenty byly filmy uloženy v exsíkátoru při vlhkosti cca 60 % a laboratorní teplotě 25 ± 1 °C.

5.3.3 Příprava roztoků a filmů na bázi chitosanu a škrobu

Základní roztok chitosanu o koncentraci 3 % hm. byl připraven navážením vypočteného množství s přesností na 0,0001g a smícháním s 5% roztokem kyseliny octové. Takto připravená směs byla vložena do ultrazvukové lázně na 30 minut při teplotě 30 °C. Základní

roztok škrobu byl připraven následovně. Do kádinky bylo naváženo 5 g škrobu, 2,5 g glycerolu a 92,5 g destilované vody. Směs byla míchána za mírného zahřívání na magnetickém míchadle při cca 500 ot./min do rozpuštění a vyčeření roztoku. Dále byl připraven 5% roztok kyseliny laurové v hydrofilním levandulovém esenciálním oleji. Podle zadaných poměrů (Tab. 8) se roztoky chitosanu a škrobu smíchaly za postupného zahřívání na teplotu 70–80 °C, při této teplotě byly míchány 5 minut. Poté byly jednotlivé roztoky odlity na Petriho misky (o průměru 90 mm) ve výšce 0,5 cm a sušeny při teplotě 30–35 °C po dobu 48 hodin.

Tab. 8 Složení vzorků směsi škrobu a chitosanu

Vzorek	Škrob:Chitosan	Obsah KL [%]
1	1:1	-
2	1:1	0,1
3	2:8	-
4	2:8	0,1
5	2:8	0,2
6	4:6	-
7	4:6	0,2

5.3.4 Měření ζ potenciálu roztoků

Zeta potenciál filmotvorných roztoků byl měřen pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS90. Před vlastním měřením bylo provedeno ředění měřeného roztoku, a to 6 μ l vzorku do 1 ml destilované vody přefiltrované přes stříkačkový filtr Millipore Millex GS/Optex GS. Vzorek byl přemístěn do speciální kyvety typu 1070 a ζ potenciál byl vyhodnocen pomocí příslušného softwaru v souladu s modelem Smouchlowského. Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě 25 ± 1 °C ve třech opakováních.

5.3.5 Měření povrchového napětí roztoků

Povrchové napětí vybraných vzorků bylo měřeno pomocí tenziometru K20 Easy Dyne (Obr. 12) metodou Wilhelmyho destičky. K vlastnímu měření byly použity čisté a suché skleněné misky, do kterých bylo nalito přiměřené množství roztoku vzorku. Miska byla poté umístěna na měřicí panel tenziometru. Platinová destička byla před měřením vyžeháná v plameni a po vychladnutí zavěšena na háček nad miskou. Měření probíhalo při laboratorní teplotě a povrchové napětí bylo přístrojem automaticky vyhodnoceno s přesností na $0,01 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ jako průměr z 10 měření.



Obr. 12 Tenziometr K20 EasyDyne

5.3.6 Měření tloušťky filmů

Tloušťka připravených filmů byla měřena pomocí digitálního mikrometru s přesností na 0,001 mm. Výsledná hodnota byla průměrem z 10 měření provedených na náhodně zvolených místech vzorku.

5.3.7 Stanovení antibakteriálních vlastností filmů

Antimikrobiální aktivita filmů byla zjišťována pomocí agar difúzního testu, na základě jejich schopnosti inhibovat růst bakterií *E. coli* a *S. aureus*. Ke kultivaci obou bakterií byl používán Mueller–Hintonův agar (dále jen MH).

Složení MH agaru (g/l destilované vody)

Masová infúze	4,0
Kaseinový hydrolyzát	17,5
Kukuřičný škrob	1,5
Agar	12,0

Podle návodu byl přichystán MH agar, který se po nalití na Petriho misku nechal ztuhnout pro testování. Poté byl připraven fyziologický roztok smícháním 8,5 g NaCl do 1 l destilované vody, který byl před dalšími experimenty sterilizován v autoklávu. Ředěním čisté bakteriální kultury fyziologickým roztokem do požadované hodnoty koncentrace 0,5 McF bylo připraveno inokulum, které bylo následně nanášeno na misky s agarem. Poté byly na každou misku umístěny 2 předem vyseknuté kruhové vzorky filmů (o průměru 9 mm) a následně se misky nechaly kultivovat při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Míra antibakteriálních účinků filmů pak odpovídala velikosti vytvořené inhibiční zóny.

5.3.8 Stanovení vlhkosti a rozpustnosti filmů

Vlhkost a rozpustnost filmů byla stanovena podle postupu v [48]. Nejprve byl ze vzorku filmu vyříznut čtvereček o velikosti 1,5×1,5 cm, který byl vložen do předem zvážené váženky a sušen při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Obsah vlhkosti (MC) byl následně vypočten podle vzorce (2).

$$MC = \frac{M_0 - M_d}{M_0} \cdot 100 \quad [\%] \quad (2)$$

M_0počáteční hmotnost vzorku [g]

M_dhmotnost vysušeného vzorku [g]

Pro stanovení rozpustnosti byly filmy vysušené do konstantní hmotnosti v předchozím experimentu zváženy (hmotnost M_i) a poté vloženy do skleněných baněk obsahujících 50 ml destilované vody, které byly třepány při laboratorní teplotě 25 °C na třepačce (Obr. 13). Po 24 hodinách byly vzorky filmů opatrně opláchnuty destilovanou vodou a odebrány do připravených váženek, které byly opět sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti za účelem získání konečné hmotnosti (M_f). Všechna měření byla třikrát opakována a výsledná rozpustnost (S) byla vypočítána podle vzorce (3).

$$S = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100 \quad [\%] \quad (3)$$

M_ipočáteční hmotnost suchého vzorku [g]

M_fhmotnost sušiny [g]



Obr. 13 Třepačka Meast 25

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Roztoky a filmy na bázi chitosanu

Podle kap. 5.3.2 byly připraveny směsi na bázi chitosanu a 1% roztoku kyseliny octové, případně různých aktivních a stabilizačních látek. Vybrané filmotvorné roztoky byly charakterizovány pomocí stanovení ζ potenciálu, dále pak měření povrchového napětí. U vzorků filmů byl vizuálně hodnocen vzhled a barva, měřena tloušťka a stanoveny antibakteriální účinky. Všechna měření byla prováděna nejméně ve dvou opakováních při laboratorní teplotě 25 ± 1 °C.

6.1.1 Měření ζ potenciálu roztoků

Zeta potenciál samotného chitosanového roztoku v kyselině octové byl podle [49] téměř 59 mV, což je v souladu se skutečností, že při nižším pH (~ cca 4) jsou aminoskupiny chitosanu kladně nabité. V Tab. 9 jsou uvedeny hodnoty zeta potenciálu vybraných vzorků v závislosti na použité homogenizační metodě. Je zřejmé, že vzorky připravené na Ultra Turaxu vykazují nižší potenciál v porovnání s roztoky ze série H2. Vliv homogenizační metody na ζ potenciál filmotvorných roztoků na bázi chitosanu v kombinaci s kyselinou olejovou byl sledován i v práci Perdonese a kol. [10]. Bylo prokázáno, že intenzivnější homogenizace způsobila pokles povrchového náboje částic, z důvodu elektrostatických interakcí mezi částicemi olejové kyseliny a chitosanem. Dalším faktorem, který má vliv na velikost částic, je samozřejmě složení vzorků. V našem případě lze potvrdit vyšší ζ potenciál u série H2 obsahující vyšší koncentraci chitosanu. U vzorku H2-3 bylo dosaženo dokonce vyšší hodnoty ζ potenciálu (67 mV) než v případě samotného chitosanu. Tento fakt se v rámci práce nepodařilo zdůvodnit.

Tab. 9 ζ potenciál roztoků při 25 °C

Vzorek	ζ potenciál [mV]
H1-2	$32,6 \pm 0,4$
H1-3	$44,6 \pm 2,0$
H1-4	$37,4 \pm 0,7$
H2-2	$51,0 \pm 2,0$
H2-3	$67,0 \pm 2,0$

6.1.2 Měření povrchového napětí roztoků

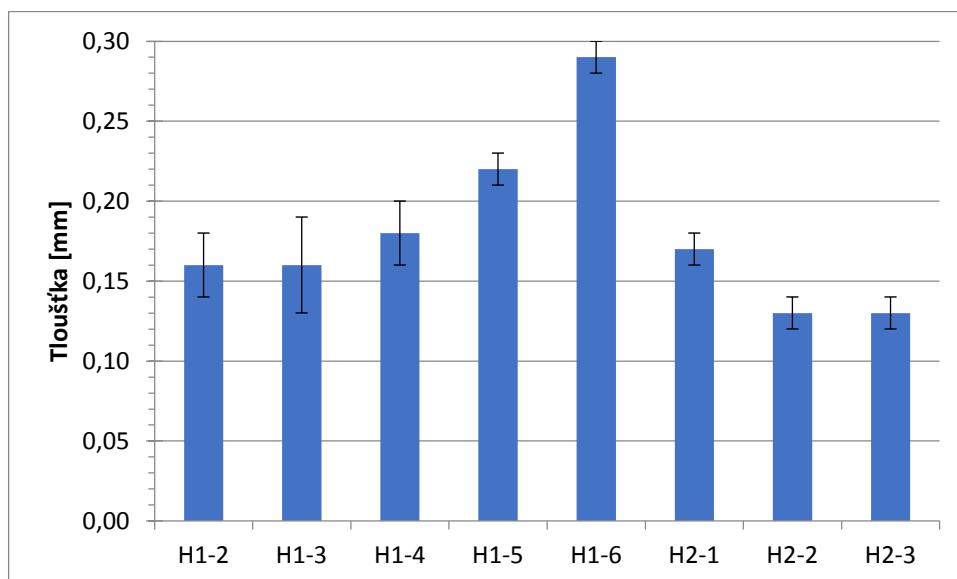
Hodnoty povrchového napětí chitosanových roztoků jsou uvedeny v Tab. 10. Povrchové napětí vzorků série H1 se pohybovalo v průměru okolo $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. V porovnání s hodnotou samotného 1% roztoku chitosanu ($41 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) stanovenou v [49], došlo k poklesu asi o 22 %. Důvodem může být přítomnost povrchově aktivního emulgátoru Tweenu 80. Vzorky ze série H2 prokázaly povrchové napětí vyšší, zejména pak vzorek H2-2, jehož hodnota $43,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ je srovnatelná s hodnotou samotného chitosanu.

Tab. 10 Povrchové napětí roztoků na bázi chitosanu při 25 °C

Vzorek	Povrchové napětí [$\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$]
H1-2	$32,5 \pm 0,05$
H1-3	$32,7 \pm 0,10$
H1-4	$32,5 \pm 0,08$
H2-2	$43,1 \pm 0,04$
H2-3	$34,8 \pm 0,09$

6.1.3 Měření tloušťky filmů

Tloušťka filmů připravených na Ultra Turraxu (série H1) se pohybuje v rozsahu 0,16 až 0,29 mm, v závislosti na složení, zejména pak na množství emulgátoru Tween 80. Z Obr. 14 vyplývá, že s jeho rostoucí koncentrací dochází ke zvětšování tloušťky, v případě 3 % Tweenu nárůst činí až 41 % ve srovnání s průměrnou tloušťkou filmů obsahující pouze 1 % emulgátoru. U série vzorků H2, které neobsahují Tween 80, je patrný pokles hodnot v přítomnosti esenciálního oleje, bez ohledu na použitý typ (máta, resp. citronela).



Obr. 14 Tloušťka filmů na bázi chitosanu

6.1.4 Vizuální hodnocení vzhledu filmů

Připravené chitosanové filmy byly neprůsvitné s béžovým až žlutavým nádechem. Většinou byly měkké, pružné, kromě vzorku H1-2, který byl spíše křehčí. Důvodem je pravděpodobně nepřítomnost glycerolu jako plastifikátoru. Tento fakt byl potvrzen i ve studii [51]. Bohužel, ve většině případů byla struktura filmů nehomogenní s patrnými agregáty, bez ohledu na typ homogenizačního postupu při přípravě. Lepší homogenity bylo dosaženo pouze u vzorků H2-2 a z první série pak H1-5 a H1-6 se 2, resp. 3 % Tweenu 80 (Tab. 11) Tento fakt napovídá o primární roli emulgátoru při přípravě vzorků.

Tab. 11 Vzhled a struktura chitosanových filmů

Vzorek	Barva	Homogenita	Průsvitnost	Flexibilita
H1-1	Béžová	-	-	+
H1-2	Žlutavá	-	-	-
H1-3	Žlutavá	-	-	+
H1-4	Žlutavá	-	-	+
H1-5	Béžová	+	-	+
H1-6	Světle žlutá	+	-	+
H2-1	Zlatavá	-	-	+
H2-2	Zlatavá	+	-	+
H2-3	Zlatavá	-	-	+

6.1.5 Stanovení antibakteriálních vlastností filmů

Chitosan sám o sobě vykazuje antimikrobiální účinky, přičemž jejich nejvíce pravděpodobným mechanismem jsou interakce mezi jeho pozitivně nabitými skupinami a negativně nabitými buněčnými membránami, což vede ke změnám propustnosti membrán a následné inhibici jejich růstu [50]. Pokud se ovšem chitosan vyskytuje například ve formě filmu, může být jeho antimikrobiální aktivita zásadně zeslabena, což bylo potvrzeno ve studii [49]. Laurová kyselina a její odpovídající estery, patří mezi látky, u nichž byla prokázána antimikrobiální aktivita. Výhodou je také fakt, že KL je relativně stabilní, netoxická a snadno odbouratelná [51].

Testování antibakteriálních vlastností bylo v rámci naší práce prováděno agar difúzním testem, který je považován za základní a rychlou metodu ke zjištění antibakteriální aktivity vzorků se zabudovanými antimikrobiálními látkami [36].

V Tab. 12 jsou uvedeny inhibiční zóny vybraných vzorků série H1, získané agar difúzním testem. Z hodnot je patrné, že lepší antibakteriální účinnost byla sledována proti grampozitivní bakterii *S. aureus*, kdy inhibiční zóna vzorku H1-6 byla 19 mm. Vzorek H1-1 s nejnižší účinností odpovídá směsi bez přídavku esenciálního oleje a Tweenu 80. Gram negativní *E. coli* prokázala rezistenci v případě všech testovaných vzorků.

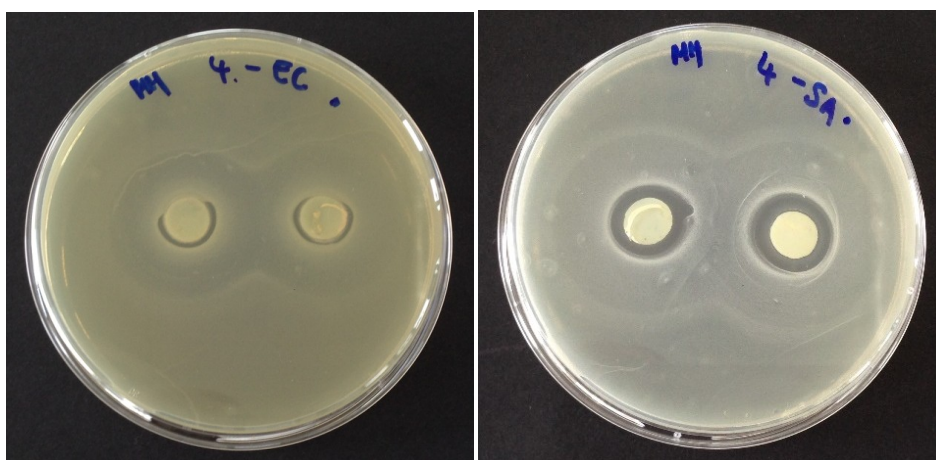
Tab. 12 Výsledky antibakteriálních účinků filmů H1

Vzorek	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	Inhibiční zóna průměr [mm]	Inhibiční zóna průměr [mm]
H1-1	-	11,0 ± 0,5
H1-4	-	14,5 ± 0,5
H1-5	-	13,5 ± 0,5
H1-6	-	19,0 ± 1,0

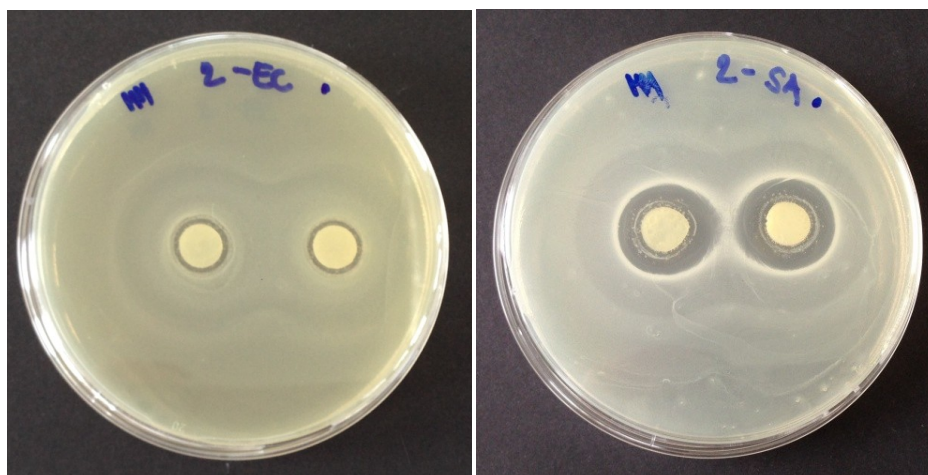
Muhamad a kol. [51] se zabývali vlivem kyseliny laurové na antibakteriální účinky chitosanových filmů vůči G^+ a G^- bakteriím *B. subtilis* a *E. coli*. Jejich výsledky indikují synergický efekt mezi laurovou kyselinou a chitosanem, vzorky prokázaly antibakteriální účinky vůči sledovaným mikroorganismům, přičemž G^- bakterie *E. coli* se, podobně jako u našich vzorků, ukázala jako více rezistentní. Nejúčinnější koncentrace KL byla $0,625 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, ovšem, inhibiční zóny byly sledovány již od koncentrací $0,125 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, což je zhruba poloviční koncentrace než v námi připravených vzorcích. Potenciální antibakteriální účin-

ky filmů na bázi chitosan/škrob/kyselina laurová proti bakteriím *S. aureus* a *B. subtilis* byly sledovány také ve studii Salleha a kol. [36]. Film tvořený pouze škrobem sloužil jako kontrolní vzorek, který nevykazoval žádné inhibiční zóny vůči testovaným mikroorganismům. Na druhou stranu, film připravený pouze z chitosanu prokázal antibakteriální aktivitu, přičemž větší inhibiční zóna byla naměřena proti G^- *E. coli*. Tento účinek byl ještě zesílen po přidání kyseliny laurové do směsi chitosan/škrob. Výsledky poukázaly na fakt, že směsi s vyšším obsahem chitosanu inhibují převážně růst gramnegativních bakterií, zatímco vyšší koncentrace kyseliny laurové vedla k inhibici grampozitivní *B. subtilis*. Na základě výsledků v Tab. 13 lze konstatovat, koncentrace kyseliny laurové v našich vzorcích byla dostačující pro inhibici grampozitivní bakterie *S. aureus*, ovšem pro zajištění univerzálního antibakteriálního účinku je nutno složení vzorků dále optimalizovat.

Na Obr. 15 a 16 jsou výsledky agar difúzního testu s viditelnými inhibičními zónami kolem vzorků H1-4 a H1-6 proti vybraným mikroorganismům.



Obr. 15 Výsledky antibakteriálních účinků vzorku H1-4 proti *E. coli* (vlevo) a *S. aureus* (vpravo)



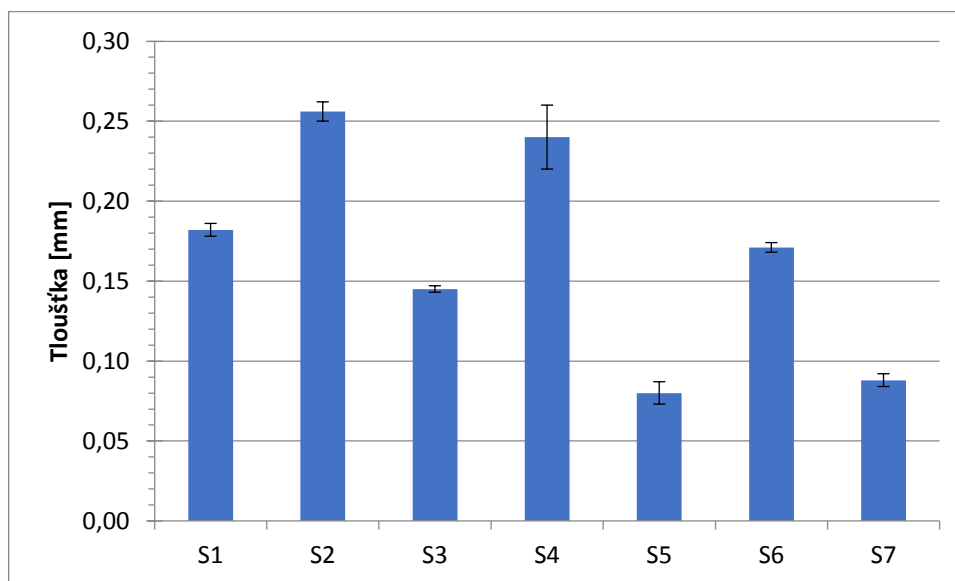
Obr. 16 Výsledky antibakteriálních účinků vzorku H1-6 proti *E. coli* (vlevo) a *S. aureus* (vpravo)

6.2 Filmy na bázi chitosanu a škrobu

Vzhledem k výsledkům první části BP bylo dalším cílem ověřit vliv přidavku dalšího přírodního polymeru do chitosanové matrice, zejména za účelem zlepšení homogenity a stability vzorků. Filmy na bázi škrobu vykazují fyzikální vlastnosti podobné syntetickým polymerům. Jsou transparentní, bez zápachu a chuti, polopropustné pro CO_2 a rezistentní vůči přenosu O_2 . Často se kombinují s jinými biopolymery, za účelem zlepšení fyzikálních a funkčních vlastností. Začlenění lipidních hydrofobních sloučenin, jako např. kyseliny laurové, do škrobového filmu ovlivňuje bariérové vlastnosti a snižuje propustnost pro vlhkost [52].

6.2.1 Měření tloušťky filmů

Z obr. 17 je patrné, že vzorky bez obsahu kyseliny laurové (S1, S3 a S6) mají přibližně stejnou tloušťku (v průměru 0,17 mm), nezávisle na poměru škrobu a chitosanu. Další srovnatelné hodnoty byly naměřeny u vzorků S2 a S4, tedy filmů obsahujících škrob:chitosan v poměru 1:1, resp. 2:8 a 0,1 % kyseliny laurové v obou případech. Nejmenší hodnoty (průměrně 0,09 mm) byly naměřeny u vzorků S5 a S7, které obsahovaly opět různý poměr škrobu a chitosanu a stejné množství kyseliny laurové, a to 0,2 %. Na základě těchto výsledků lze předpokládat primární roli kyseliny laurové na měřenou tloušťku.



Obr. 17 Tloušťka filmů na bázi škrobu a chitosanu

6.2.2 Vizuální hodnocení vzhledu filmů

Barevný charakter filmů má primární význam, jelikož přímo ovlivňuje celkový vzhled produktu a ohlas u spotřebitele. Barva filmů na bázi chitosanu a škrobu byla většinou v odstínech světle až středně žluté. Na rozdíl od filmů připravených z chitosanu a aktivních látek (viz kapitola 6.1.4) bylo dosaženo lepší homogenity. Jak je patrné z Tab. 13, transparentnost se lišila v závislosti na obsahu kyseliny laurové. Filmy s obsahem chitosan:škrob 1:1 (vzorky S1, S2) byly pružné, s rostoucím zastoupením chitosanu byly spíše pevnější.

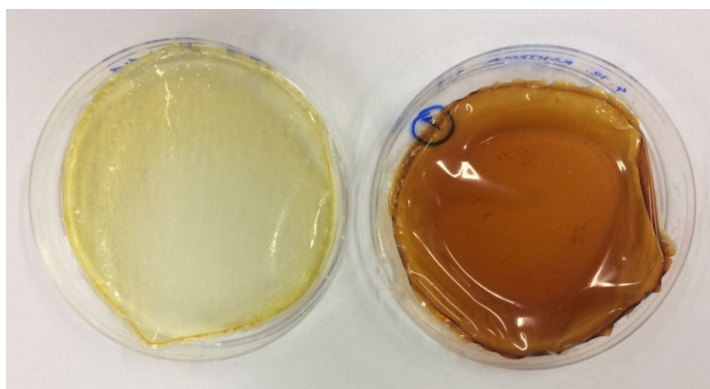
Tab. 13 Vzhled a struktura filmů na bázi škrobu a chitosanu

Vzorek	Barva	Homogenita	Průsvitnost	Flexibilita
S1	Žlutá	+	+	+
S2	Žlutá	+	-	+
S3	Nažloutlá	+	+	-
S4	Nažloutlá	+	-	-
S5	Nažloutlá	+	-	+
S6	Nažloutlá	+	+	+
S7	Žlutá	+	-	+

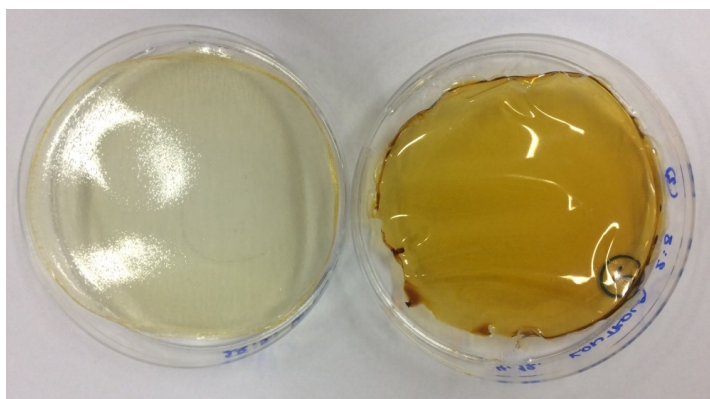
Dále byly vizuálně hodnoceny barevné změny filmů v čase, a to ihned po vysušení a po 80 dnech od přípravy (skladování probíhalo při 25°C a 60 % relativní vlhkosti). Z Obr. 18 až 20 je zřejmé, že skladováním došlo k zásadní změně barvy, ze světle žluté na tmavě žlutou až hnědou (v případě vzorku S1 s vyšším zastoupením škrobu). U filmu S4 s obsahem ky-

seliny laurové jsou patrné značné nehomogenity na povrchu filmu (Obr. 20). Zároveň také došlo ke změně mechanických vlastností, filmy sledované po necelých 3 měsících byly měkčí, pružnější.

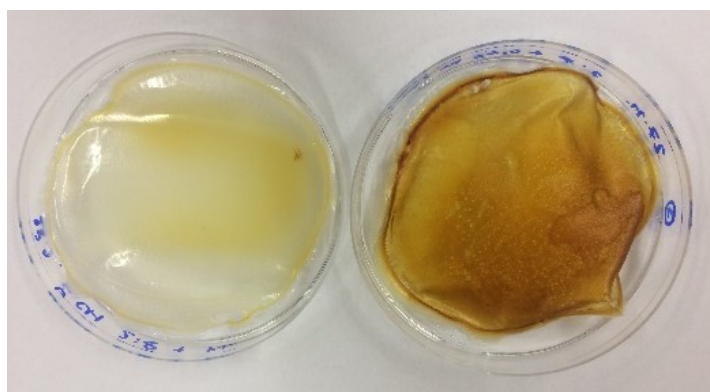
Vliv skladovacích podmínek a typu rozpouštědla na vlastnosti chitosan/škrobových filmů byl sledován v [53]. U vzorků byly po 15, 30 a 60 dnech skladování zaznamenány změny v obsahu vlhkosti, propustnosti a mechanických vlastnostech, a dále změna barvy na tmavší. Bylo prokázáno, že barevné změny mohou být důsledkem některých neenzymatických reakcí, založených na kondenzaci redukujícího sacharidu se sloučeninou, která obsahuje volnou aminoskupinu (Maillardova reakce), během níž dochází aminoskupiny a cukry degradují. Vzhledem k charakteru molekul škrobu a chitosanu mohou jejich směsi podléhat této reakci, při níž vzniká řada meziproduktů, které jsou zodpovědné za změnu barvy výsledného produktu. Vznik a intenzita hnědé barvy závisí na tepelných parametrech při zpracování, pH a kvantitativním poměru aminového dusíku a redukujícího sacharidu. Stupeň hnědnutí se často používá k posouzení, v jakém rozsahu Maillardova reakce proběhla. Změna barvy může být považována jako negativní důsledek ztráty kvality filmů [53] [54].



Obr. 18 Srovnání vzhledu filmů S1 první (vlevo) a 80. (vpravo) den přípravy



Obr. 19 Srovnání vzhledu filmů S3 první (vlevo) a 80. (vpravo) den přípravy



Obr. 20 Srovnání vzhledu filmů S4 první (vlevo) a 80. (vpravo) den přípravy

Barevné změny byly sledovány i ve studii [55], kde byly připraveny filmy na bázi chitosan/škrob s obsahem různých přírodních extraktů (jako například z brusinky, granátového jablka, červené řepy). Již po 15 dnech docházelo k poměrně výrazným změnám barvy, přičemž více patrné byly u vzorků s obsahem přírodních extraktů. Kontrolní film měl jen slabě žlutý nádech a po 15 dnech se barva zásadně nezměnila. Sledování po delším časovém intervalu autoři neprováděli, a proto výsledky nemůžeme zcela porovnávat. Důvodem světlejší barvy filmů v uvedené práci by ale mohla být i skutečnost, že byly připraveny z méně koncentrovaných roztoků chitosanu a škrobu, ve srovnání s našimi vzorky.

Lze ovšem předpokládat, že na barevné změně se primárně podílel obsah škrobu, jelikož u filmů připravených pouze z chitosanu tento jev nebyl pozorován ani během skladování delšího než 3 měsíce (viz studie [49]).

6.2.3 Stanovení obsahu vlhkosti a rozpustnosti

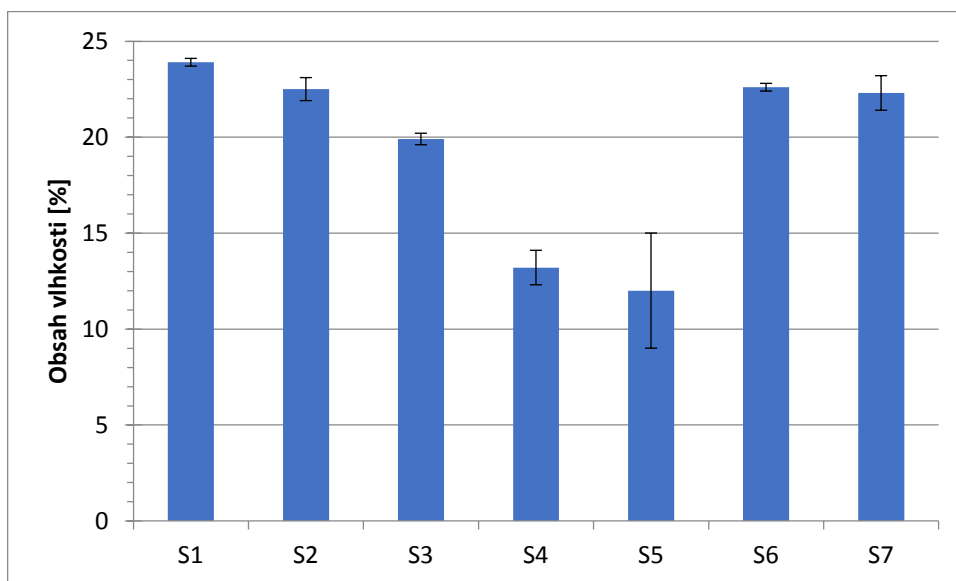
Odolnost proti vlhkosti je významná charakteristika biodegradabilních filmů, zejména v aplikacích, kde je film v kontaktu s vodou během zpracování, nebo v prostředí, kde je výrazná aktivita vody. Obecně platí, že vyšší rozpustnost indikuje nižší rezistenci vůči vlhkosti.

Z výsledků měření vlhkosti (Obr. 21) je patrné, že vlivem inkorporace kyseliny laurové došlo většinou k poklesu vlhkosti, například u vzorků S1 a S2 (pokles 5,9 %), S3 a S4 (pokles 33,7 %). U filmů S6 a S7 bylo dosaženo srovnatelných hodnot.

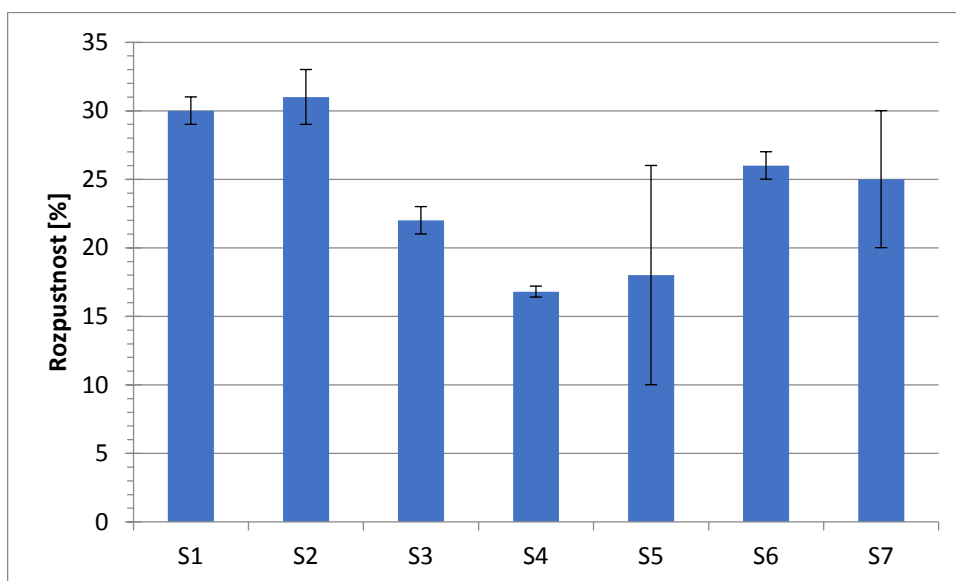
Stejný trend byl zaznamenán při měření rozpustnosti ve vodě (Obr. 22), kdy ve většině případů došlo k poklesu rozpustnosti v porovnání s kontrolním vzorkem bez obsahu kyseliny laurové. Nejnižší rozpustnost (16,8 %) byla naměřena u vzorku S4.

Při srovnání výsledků se studií [49], můžeme konstatovat, že vzorek S3 připravený ze škrobu a chitosanu v poměru 2:8 se hodnotami blíží filmu na bázi samotného chitosanu, jehož vlhkost a rozpustnost činila 20,9 % a 22,3 %. Se zvyšujícím se obsahem škrobu hodnoty obou měřených parametrů narůstají.

Rozpustnost filmů na bázi škrobu a chitosanu byla studována i autory [56] a podobně jako v našem případě se rozpustnost snižovala s narůstajícím obsahem chitosanu ve směsi. Důvodem mohou interakce mezi oběma složkami s vyšší koncentrací chitosanu.



Obr. 21 Obsah vlhkosti filmů na bázi škrobu a chitosanu



Obr. 22 Rozpustnost filmů na bázi škrobu a chitosanu

ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byly připraveny vzorky na bázi chitosanu, resp. chitosan/škrobu a různých aktivních nebo stabilizačních látek.

U první řady vzorků (na bázi chitosanu) byl sledován vliv homogenizace a složení vzorků na některé fyzikální vlastnosti, jako ζ potenciál, povrchové napětí roztoků, vzhled a tloušťku filmů. Můžeme konstatovat, že lepší homogenita byla získána u vzorků připravených na Ultra Turraxu, v přítomnosti neionického emulgátoru Tween 80. Optimalizaci reakčních poměrů a podmínek bude ovšem nutno věnovat více času v rámci dalších experimentů.

Filmy obsahující chitosan/škrob prokázaly některé zajímavé charakteristiky, například v důsledku inkorporace kyseliny laurové do směsi došlo k poklesu vlhkosti a rozpustnosti ve vodě, což má příznivý vliv zejména na aplikace s předpokládaným nadměrným výskytem vlhkosti. Měření odhalilo také vliv reakčních poměrů chitosan : škrob, kdy hodnota rozpustnosti ve vodě klesala s rostoucí koncentrací chitosanu ve směsi. Vizuální hodnocení filmů během skladování prokázalo zásadní barevné změny, zejména pak u vzorků s vyšším podílem škrobu.

Nicméně, vzhledem k problémům, které se objevily v průběhu realizace bakalářské práce, nebylo možno provést všechny původně plánované experimenty. Aby bylo možno vytvořit komplexnější závěry, měly by být výsledky určitě rozšířeny o další testy, zaměřené na charakterizaci dalších fyzikálních parametrů filmů, jako jsou například bariérové, strukturní a povrchové vlastnosti, a jejich sledování v čase za účelem doplnění stabilitní studie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KALIA, S. and Luc AVÉROUS, ed. *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*. Scrivener publishing, 2011, 644 p. ISBN 978-0-470-63923-8
- [2] ČERNÝ, Miloslav, Tomáš TRNKA a Miloš BUDĚŠÍNSKÝ. *Sacharidy*. 1. vyd. Praha: Česká společnost chemická, 2010, 178 s. Chemické listy. ISBN 978-80-86238-81-4.
- [3] KALAČ, Pavel. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2001, 120 s. ISBN 80-7040-520-1.
- [4] DOSTÁL Jiří, Petr KAPLAN a kolektiv. *Lékařská chemie II*. Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2003, 223 s. ISBN 80-210-2731-2
- [5] ŠIMŮNKOVÁ, Eva a Ivana KUČEROVÁ. *Dřevo*. Praha: Společnost pro technologie ochrany památek, 2000, 134 s. ISBN 80-902668-4-3
- [6] EISNER Karel, Miloš OSTEN a Vladimír HAVLÍČEK. *Dřevo a plasty*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983, 383 s. ISBN 0-4805-83
- [7] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie I*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992, 184 s. ISBN 80-200-0438-6.
- [8] DOSTÁL, Jiří a kol. *Lékařská fakulta II*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2012, 165 s. ISBN 978-80-210-5538-4
- [9] EBNESAJJAD, Sina, ed. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*. William Andrew Publishing, 2012, 472 p. ISBN 978-1-4557-2834-3
- [10] PERDONES-MONTERO, Ángela. *Antifungal Chitosan-based Films and Coatings Containing Essential Oils for Fruit Applications*. Doctoral thesis, Valencia, 2015.
- [11] KLÍMOVÁ, Zuzana. *Využití chitosanu při úpravě pitné vody*. Brno: FCH VUT.
- [12] Částečná deacetylace chitinu na chitosan. [online]. [cit. 2017-12-10-] Dostupné z: <http://www.drpetry.com.cn/Upload/Images/20130621/201306211700587810002.jpg>
- [13] KIM, Se-Kwon, ed. *Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments*. CRP Press, 2014, 493 p. ISBN 978-1-4665-6628-6
- [14] KUMAR, Majeti N. V. Ravi. *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and functional polymers, 2000, vol. 46, 1–27 p. ISSN 1381-5148
- [15] KONG, Ming, Xi Guan CHEN, Ke XING, Hyun Jin PARK. *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. International Journal of Food Microbiology, 2010, vol. 144, 51–63 p. ISSN 0168-1605

- [16] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. *Chitosan a jeho farmaceutické aplikace*. Chemické listy, 2009, č. 103, 56–65 s.
- [17] VAVŘÍKOVÁ, Eva. *Design of new antibacterial active molecules*. Doctoral thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Doctoral Thesis, 2010.
- [18] KIM, Se-Kwon, ed. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and their Derivatives: Biological Activities and applications*. CRP Press, 2011, 633 p. ISBN 978-1-4398-1603-5
- [19] GUILBERT, S. N. GONTARD, L. G. M. GORRIS. *Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings*. LWT – Food Science and Technology, 1996, vol. 29. ISSN 0023-6438
- [20] ELSABEE, Maher and Enstar ABDOU. *Chitosan based edible films and coatings*. Materials Science and Engineering, 2013, vol. 33, 1819–1841 p. ISSN 0928-4931
- [21] BENBETTAÏEB, N., M. KUREK, S. BORNAZ, F. DEBEAUFOR. *Barrier, structural and mechanical properties bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions*. Science of Food and Agriculture, 2014, vol. 94, 2409–2419 p. ISSN 1097-0010
- [22] MATHEW, S., M. BRAHMAKUMAR, T. E. ABRAHAM. *Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films*. Biopolymers, 2006, vol. 82, 176–187 p. ISSN 1097-0282
- [23] Y.X. Xu, K.M. Kim, M.A. Hanna, D. Nag. *Chitosan-starch composite film: preparation and characterization*. Industrial Crops and Products, 2005, vol. 21, 185–192 p. ISSN 0926-6690
- [24] BANGYEKAN, C., D. AHT-ONG, K. SRIKULKIT. *Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films*. Carbohydrate polymers, 2005, vol. 63, 1–11 p. ISSN 0144-8617
- [25] MATHEW, S. and E. T. ABRAHAM. *Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films*. Food hydrocolloids, 2008, vol. 22, 826–835 p. ISSN 0268-005X
- [26] SZYMAŃSKA, Emilia and Katarzyna WINNICKA. *Stability of Chitosan – A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications*. Marine Drugs, 2015, vol. 13, 1819–1846 p. ISSN 1660-3397

- [27] ROSEN, Meyer R, ed. *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products: Technology, Application and Formulation*. William Andrew publishing, 2005, 1095 p. ISBN 978-0-8155-1504-3
- [28] PERIS-ORTIZ, Marta and Josí ÁLVAREZ-GARCIÁ. *Health and Wellness Tourism: Emergence of a New Market Segment*. 1st Edition, Springer International Publishing Switzerland, 2015, 183 p. ISBN 978-3-319-11489
- [29] CASANOVA, Francisca and Lúcia SANTOS. *Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application*. *Journal of Microencapsulation*, 2016, vol 33, 1–17 p. ISSN 1464-5246
- [30] *Span and Tween*. [online]. [cit. 2018-02-19] Dostupné z: <http://chemagent.ru/prodavtsy/download/849/968/19>
- [31] WHITEHURST, Robert J. ed. *Emulsifiers in food technology*. Blackwell publishing, 2004, 247 p. ISBN 1-4051-1802-4
- [32] ZAJÍC, Jiří a Miloslav MALENICKÝ. *Technologie tuků*. Praha: VŠCHT, 1988, 450 s. ISBN 04-833-86
- [33] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I*. 3. vyd. Tábor: Osis, 2009, 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2
- [34] *Lauric acid*. [online]. [cit. 2018-02-25] Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lauric_acid#section=Top
- [35] DAYRIT, Fabian M. *The Properties of Lauric Acid and Their Signification in Coconut Oil*. *Journal of the American oil Chemists' society*, 2015, vol. 92, 1–15 p. ISSN 0002-7863
- [36] SALLEH, Eraricar Binti. *Antibacterial spectrum activity of lauric acid and chitosan*. Research management centre UTM. Bioprocess engineering department. Final report, (n. d).
- [37] PREUSS, H. G., B. ECHARD, M. ENIG, I. BROOK and T. B. ELLIOTT. *Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2005, vol. 272, 29–34 p. ISSN 1573-4919
- [38] YANG D., D. PORNPATTANANANGKUL, T. NAKATSUJI, M. CHAN, D. CARSON, CM HUANG and L. ZHANG. *The antimicrobial activity of liposomal lauric acid against Propionibacterium acnes*. *Biomaterials*. 2009, vol. 30 6035–6040 p. ISSN 0142-9612

- [39] SILVA, Luciano Paulino, ed. *Oleic acid: Dietary Sources, Functions and Health Benefits*. Nova Science Publishers, 2013, 205 p. ISBN 978-1-62618-387-2
- [40] AGUIRRE-LOREDO, Rocio Yaneli, Adriana Inés RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ and Norberto CHAVARRIA-HERNANDEZ. *Physical properties of emulsified film based on chitosan and oleic acid*. *Journal of Food*. 2014, vol. 12, 305–312 p. ISSN 1750-3841
- [41] BASER, K. Hüsnü Can, Gerhard BUCHBAUER, ed. *Handbook of essential oils: Science, Technology and Application*. CRC Press, 2010, 675 p. ISBN 978-1-4200-6315-8
- [42] PERDONES, Ángela, Amparo CHIRALT and Maria VARGAS. *Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil of thyme essentials oil*. *Food Hydrocolloids*. 2016, vol. 57, 271–279 p. ISSN 0268-055X
- [43] *Metody stanovení antioxidantu*. [online]. [cit. 2018-02-20] https://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi5220c/um/9_Metody_stanoveni_antioxidantu.pdf
- [44] AMORATIN, R., M. C. FOTI and L. VALGIMIGLI. *Antioxidant Activity of Essential oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, vol. 61, 10835–10847 p. ISSN 1520-5118
- [45] *Use of antimicrobial films and coatings in fish and seafood*. [online] [cit. 2018-24-2] Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/248935/tab3/>
- [46] DREGER, Mariola and Karolina WIELGUS. *Application of Essential Oils as Natural Cosmetic Preservatives*. *Herba polonica*. 2013, vol. 59, 142–156 p.. ISSN 2449-8343
- [47] CARVALHO, I. T., B. N. ESTEVINHO and L. SANTOS. *Application of microencapsulated essential oils in cosmetic personal healthcare product*. *International Journal of Cosmetic Science*. 2016, vol. 38, 109–119 p. ISSN 1468-2494
- [48] *Ultra Turrax T25 Digital* [online] [cit. 2018-04-28] Dostupné z: http://static.davis.com/large_images/04739_01app.jpg
- [49] SEDLAŘÍKOVÁ, J. M. Doležalová, P. Egner a kol. *Effect of Oregano and Marjoram Oils on the Physical and Antimicrobial Properties of Chitosan Based Systems*. *International Journal of Polymer Science*, 2017.
- [50] SINHA, N., B. K. SINGH, P. K. DUTTA. *Preparation and Characterization of Chitosan-Lauric Acid Derivative: Antibacterial Activity and Drug Delivery Study*. *Journal of Polymer Materials*. 2016, vol. 33, 479–489 p. ISSN 0970-0838

- [51] MUHAMAD, Ida Idayu, Nozieana KHAIRUDDIN, Law Hoi LING. *Effect Of Lauric Acid Addition On The Microbial Efficacy Of Chitosan-Based Film*. Jurnal Teknologi, 2011, vol. 54, 101–109 p.
- [52] SALLEH, E., I. I. MUHAMAD, N. KHAIRUDDIN. *Structural Characterization and Physical Properties of Antimicrobial (AM) Starch-Based Films*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2009, vol. 3. ISSN 20103778
- [53] ZHONG, Yu and Li YUNFEI. *Effects of storage conditions and acid solvent types on structural, mechanical and physical properties of kudzu starch (Pueraria lobata)-chitosan composite films*. Starch. 2011, vol. 63, 579–586 p. ISSN 0038-9056
- [54] MARTINS, Sara I.F.S., Wim M.F. JONGEN, Martinus A.J.S. van BOEKEL. *A review of Maillard reaction in food implications to kinetic modelling*. Trend in Food Science and Technology. 2000, vol. 11, 364–373. ISSN 0023-6438
- [55] LOZANO-NAVARRO, Jessica I a kol. *Chitosan-Starch Films with Natural Extracts: Physical, Chemical, Morphological and Thermal Properties*. Journal of Materials Science. 2018, vol. 11, 1–20. ISSN 1996-1944
- [56] BOURTOOM, Thawien and Manjeet S. CHINNAN. *Preparation and properties of rice starch-chitosan biodegradable film*. LWT – Food Science and Technology. 2008, vol. 41, 1633–1641 p. ISSN 0023-6438

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyselina
ATP	Adenosintrifosfát
<i>B.</i>	Bacillus
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluen
DA	Stupeň deacetylace
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	Escherichia
EO	Esenciální olej
G ⁺	Grampozitivní
G ⁻	Gramnegativní
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
KL	Kyselina laurová
MC	Obsah vlhkosti
MH	Mueller-Hinton
MK	Mastná kyselina
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
M _w	Molekulová hmotnost
NOS	Dusíkový radikál
O/V	Olej ve vodě
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomová ribonukleová kyselina
ROS	Kyslíkový radikál
<i>S.</i>	Staphylococcus

S Rozpustnost

tRNA Transferová ribonukleová kyselina

V/O Voda v oleji

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Vzorec D- glukózy</i>	13
<i>Obr. 2 Struktura amylozy</i>	14
<i>Obr. 3 Struktura amylopektinu</i>	14
<i>Obr. 4 Peptidová vazba</i>	16
<i>Obr. 5 Vzorce dusíkatých bází</i>	17
<i>Obr. 6 Částečná deacetylace chitinu na chitosan [12]</i>	21
<i>Obr. 7 Průmyslové aplikace chitinu a chitosanu [1]</i>	22
<i>Obr. 8 Průnik léčiva do buňky [16]</i>	24
<i>Obr. 9 Faktory ovlivňující stabilitu produktů na bázi chitosanu [26]</i>	30
<i>Obr. 10 Struktura monoesteru sorbitanu</i>	37
<i>Obr. 11 Ultra Turrax T25 Digital [48]</i>	50
<i>Obr. 12 Tenzimetr K20 EasyDyne</i>	53
<i>Obr. 13 Třepačka Meast 25</i>	54
<i>Obr. 14 Tloušťka filmů na bázi chitosanu</i>	57
<i>Obr. 15 Výsledky antibakteriálních účinků vzorku HI-4 proti E. coli (vlevo) a S. aureus (vpravo)</i>	59
<i>Obr. 16 Výsledky antibakteriálních účinků vzorku HI-6 proti E. coli (vlevo) a S. aureus (vpravo)</i>	60
<i>Obr. 17 Tloušťka filmů na bázi škrobu a chitosanu</i>	61
<i>Obr. 18 Srovnání vzhledu filmů S1 první (vlevo) a 80. (vpravo) den přípravy</i>	62
<i>Obr. 19 Srovnání vzhledu filmů S3 první (vlevo) a 80. (vpravo) den přípravy</i>	63
<i>Obr. 20 Srovnání vzhledu filmů S4 první (vlevo) a 80. (vpravo) den přípravy</i>	63
<i>Obr. 21 Obsah vlhkosti filmů na bázi škrobu a chitosanu</i>	65
<i>Obr. 22 Rozpustnost filmů na bázi škrobu a chitosanu</i>	65

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Systémy dodávání aktivních látek na bázi chitosanu a jejich aplikace [26].....</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 2 Názvosloví a fyzikální vlastnosti esterů sorbitanu [31].....</i>	<i>37</i>
<i>Tab. 3 Názvosloví a fyzikální vlastnosti ethoxylovaných esterů sorbitanu [31].....</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 4 Esenciální oleje součástí antimikrobiálních filmů pro konzervaci ryb [45].....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 5 Příklady esenciálních olejů použitých v různých kosmetických produktech [47].....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 6 Složení vzorků H1</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 7 Složení vzorků H2</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 8 Složení vzorků směsi škrobu a chitosanu.....</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 9 ζ potenciál roztoků při 25 °C.....</i>	<i>55</i>
<i>Tab. 10 Povrchové napětí roztoků na bázi chitosanu při 25 °C.....</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 11 Vzhled a struktura chitosanových filmů.....</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 12 Výsledky antibakteriálních účinku filmů H1</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 13 Vzhled a struktura filmů na bázi škrobu a chitosanu</i>	<i>61</i>