

Disertační práce

**Příprava a charakterizace polymerních systémů pro
speciální aplikace s využitím biologicky aktivních
látek přírodního původu**

**Preparation and Characterization of Polymer Systems for Special
Application Utilizing Natural Biologically Active Compounds**

Autor: **Ing. Miroslava Dušánková**

Studijní program: Chemie a technologie materiálů (P2808)

Obor: Technologie makromolekulárních látek (2808V006)

Školitel: prof. Ing. Vladimír Sedlařík, Ph.D.

Oponenti: prof. Ing. Petr Slobodian, Ph.D.
doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

Zlín, leden 2022

© Miroslava Dušánková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici Doctoral Thesis.

Publikace byla vydána v roce 2022

Klíčová slova: biologicky aktivní látky, biologicky aktivní polymerní systémy, esenciální oleje, estragol, linalool, nízkohustotní polyethylen, polymer kyseliny mléčné, polymethylmethakrylát, trans-anethol

Key words: Bioactive Polymer Systems, Biologically Active Substances, Essential Oils, Estragole, Lactic Acid Polymer, Linalool, Low-density Polyethylene, Polymethylmethacrylate, Trans-anethole

Tato disertační práce je dostupná v Knihovně Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména svému školiteli prof. Ing. Vladimíru Sedlaříkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytoval po celou dobu doktorského studia. Děkuji mu rovněž za jeho odborný dohled, vstřícnost a trpělivost při zpracování této práce.

Touto cestou bych také ráda vyjádřila poděkování všem svým kolegům za všechny rady, které mi během doktorského studia poskytli.

Zvláštní poděkování patří především mému manželovi, bratrovi a rodičům, kteří mě podporovali v průběhu celého doktorského studia. Děkuji jim za jejich bezmeznou trpělivost při psaní této práce.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	6
ÚVOD.....	7
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	9
1.1 Biologicky aktivní látky	9
1.2 Modifikace polymerních matric pomocí BAL	13
1.2.1 Nemigrující biologicky aktivní polymerní systémy	13
1.2.2 Migrující biologicky aktivní polymerní systémy	15
1.2.3 Enkapsulace BAL.....	18
1.2.4 Kinetika uvolňování BAL z polymerních mikročástic	21
1.3 Imobilizace BAL na pevné nosiče.....	21
1.3.2 Příklady využití plniv jako nosičů BAL.....	23
1.3.3 Adsorpční izotermy	25
1.4 Polymery s inkorporovanými BAL	28
1.4.1 Přehled výzkumů zabývajících se inkorporací EO popř. jejich složek do matrice LDPE	28
1.4.2 Přehled výzkumů zabývajících se enkapsulací EO popř. jejich složek do matrice PLA a PMMA.....	31
1.5 Použití bioaktivních polymerních systémů (BPS).....	32
1.5.1 BPS v potravinářském průmyslu	32
1.5.2 BPS pro textilní a obuvnické aplikace	33
1.5.3 BPS v zemědělství.....	34
1.5.4 BPS v kosmetickém průmyslu.....	35
1.5.5 BPS ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu.....	35
SHRNUTÍ SOUČASNÉHO STAVU	37
CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	38
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
2.1 Polymerní kompozity na bázi LDPE s BAL imobilizovanými na pevných nosičích	40
2.1.1 Použité materiály pro přípravu vzorků kompozitů.....	41

2.1.2	<i>Příprava vzorků polymerních kompozitů</i>	42
2.1.3	<i>Použité metody pro charakterizaci připravených kompozitů</i>	42
2.1.4	<i>Výsledky a diskuze okruhu I</i>	45
2.1.5	<i>Shrnutí okruhu I</i>	56
2.2	<i>Příprava mikrosfér na bázi PLA, PMMA a jejich směsí s obsahem BAL</i>	56
2.2.1	<i>Použité materiály pro přípravu mikrosfér</i>	58
2.2.2	<i>Příprava vzorků polymerních mikrosfér</i>	58
2.2.3	<i>Použité metody pro charakterizaci připravených mikrosfér</i>	59
2.2.4	<i>Výsledky a diskuze okruhu II</i>	62
2.2.5	<i>Shrnutí okruhu II</i>	72
	ZÁVĚR	74
	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
	SEZNAM OBRÁZKŮ	106
	SEZNAM TABULEK	107
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	108
	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	110
	ŽIVOTOPIS	112
	PŘÍLOHY	115

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá výzkumem biologicky aktivních polymerních systémů na bázi syntetických polymerů modifikovaných složkami esenciálních olejů. Hlavní pozornost byla věnována výzkumu a popisu aspektů vedoucích k rozšíření zpracovatelských podmínek zkoumaných systémů, a tedy i k jejich praktické aplikovatelnosti. Experimentální část se primárně zaměřuje na studium procesu imobilizace složek esenciálních olejů na pevný nosič pro následnou termoplastickou přípravu kompozitních systémů. Další část práce popisuje možnosti využití enkapsulačních technik pro tvorbu polymerních mikrosfér. V rámci výzkumu byly definovány metody pro kvantitativní stanovení aktivních látek v polymerních systémech pomocí pokročilých analytických technik. Nedílnou součástí bylo také studium kinetiky uvolňování aktivních látek ze systémů včetně stanovení jejich antibakteriální účinnosti. Získané výsledky ukazují významný potenciál vyvinutých systémů pro uplatnění v praxi.

ABSTRACT

The doctoral thesis deals with the research of biologically active polymer systems based on synthetic polymers, which were modified with components of essential oils. The main attention was paid to the study and description of aspects leading to the extension of processing window of the investigated systems, and thus to their practical application. The experimental part is primarily focused on the study of the process of immobilization of essential oil components on a solid carrier for the subsequent thermoplastic preparation of composite systems. The next part of the thesis describes the possibilities of using encapsulation techniques for the formation of polymer microspheres. As a part of the research, the methods for the quantitative determination of active substances in polymer systems were defined using the advanced analytical techniques. An integral part of the thesis comprises the study of the release kinetics of active substances from the developed systems, including the determination of their antibacterial activity. The obtained results show a significant potential of the developed systems for their application in practice.

ÚVOD

Polymerní materiály se díky svým všestranně výhodným vlastnostem staly neodmyslitelnou součástí našeho každodenního života. Rozsah jejich aplikace je stále intenzivnější a širší, a proto i výzkum a vývoj v oblasti polymerních věd čelí neustále vyšším požadavkům na jejich přidané funkční vlastnosti, a tím i přidanou hodnotu konečného produktu. V této oblasti je tedy důležitý vývoj nových procesů a optimalizace procesů stávajících, především v souvislosti s ohledem na lidské zdraví, potřeby a přání [1].

Jednou z nejproblematictějších vlastností polymerů je jejich náchylnost k osídlení různými patogenními mikroorganismy (MO). Následné infekce jimi zapříčiněné představují zásadní problém týkající se mnoha odvětví lidského působení. Největší problém nastává samozřejmě ve zdravotnictví. Zde může docházet k mikrobiální kontaminaci zařízení, přístrojů, povrchů či implantátů. V tomto smyslu se problémy týkají i potravinářského průmyslu, kde například vlivem mikrobiálního osídlení obalového materiálu dochází ke znehodnocení potravin. To může v konečném důsledku způsobit ohrožení lidského zdraví, ale i zvýšenou ekonomickou zátěž (např. náklady na léčení) [2, 3].

Zajímavým řešením tohoto problému může být vývoj biologicky aktivních polymerních systémů (BPS), tedy systémů, složených z přírodní nebo syntetické polymerní matrice a z biologicky aktivních látek (BAL). Tyto systémy dokáží vyvolat specifickou biologickou odezvu, mezi kterou se mimo jiné řadí i antimikrobiální aktivita polymeru [4].

BAL, které je možno využívat pro modifikaci polymerní matrice, existuje celá řada. Mohou být přírodního i syntetického původu. V případě využití syntetických BAL je spotřebitel vystaven potenciálnímu riziku nežádoucích vedlejších účinků a možného rozvoje rezistence. V posledních letech tedy roste preference využívání BAL přírodního původu. Z důvodu velmi širokého spektra biologických vlastností se jeví jako vhodné využití složek esenciálních olejů (EO). Ty vykazují např. antioxidační, antimikrobiální, insekticidní, protizánětlivé, protinádorové nebo sedativní účinky [5–13].

Využití složek EO je však limitováno jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, především vysokou těkavostí, která znesnadňuje jejich inkorporaci do polymerních matric pomocí termoplastických metod. Proto se výzkum zaměřuje na překonání tohoto problému, přičemž možné řešení lze nalézt v adsorpci složek EO na polymerní plniva a následném zakomponování do matrice polymeru [14]. Dalším možným způsobem ochrany těkavých aktivních látek před vypařováním, oxidací nebo termální degradací může být metoda mikroenkapsulace. Této technice je v posledních letech věnována rozsáhlá část výzkumu, protože její nespornou výhodou je dosažení

kontrolovaného uvolňování BAL, což může být opět využito v různých průmyslových oborech. Polymery tvořící základ mikročástic, jež mají využití ve farmaceutickém průmyslu či zdravotnictví, by měly být biodegradovatelné a/nebo biokompatibilní [15].

Tato disertační práce se zabývá modifikací polymerních materiálů pomocí BAL přírodního původu. Výzkum se zaměřuje na inkorporaci těchto látek do polymerní matrice termoplastickým způsobem a také metodou enkapsulace. Takto modifikované polymery mohou nacházet uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu, např. v potravinářství, zdravotnictví, farmaceutickém, textilním nebo zemědělském průmyslu.

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Biologicky aktivní látky

BAL jsou definovány jako esenciální i neesenciální sloučeniny, které mají prokazatelný vliv na lidské zdraví, a to jak pozitivní, tak i negativní [16]. Pojem BAL zahrnuje velice různorodou skupinu látek rozdílné chemické struktury a fyziologické funkce, které mohou specificky ovlivňovat životní pochody organismů i při nízkých koncentracích [17]. Neustále jsou objevovány nové BAL a stále jsou zkoumány možnosti jejich využití v různých oblastech průmyslu. Nejběžněji jsou identifikovány BAL s cytotoxickou a antimikrobiální aktivitou [18].

BAL je možno rozdělit dle původu na přírodní a syntetické, přičemž syntetické BAL zahrnují např. organické kyseliny, fungicidy, alkoholy nebo antibiotika [2]. V posledních letech však dochází k rapidnímu nárůstu zájmu o otázky týkající se bezpečnosti syntetických BAL, které mohou v konzumentech vzbuzovat určité obavy z potenciálních vedlejších účinků a případné resistance, což je také důvodem, proč se v posledních letech výzkum zaměřuje hlavně na využívání přírodních BAL [7].

V přírodě se BAL vyskytují jako sekundární metabolity rostlin vyvolávající farmakologické nebo toxikologické účinky na člověka nebo zvířata. Rostliny však nejsou jediným zdrojem BAL. Tyto látky se nacházejí také v jiných živých organismech a mikroorganismech, jako jsou např. bakterie a některé skupiny živočichů [19]. Mezi přírodní BAL se konkrétně řadí: probiotika, prebiotika, antioxidanty (např. vitaminy C, E, karotenoidy, flavonoidy, alkaloidy atd.), vláknina, aminokyseliny, proteiny, peptidy (např. kaseiny, nisin, laktoferin), složky tuků (mastné kyseliny, fytosteroly, fosfolipidy), minerální látky (Na, K, Se, Zn), sacharidy a další rostlinné látky (např. esenciální oleje) [20].

EO jsou produktem sekundárního metabolismu rostlin, kdy dochází k degradaci látek metabolismu primárního, tedy cukrů, tuků a bílkovin. Nachází se v různých rostlinách a jejich částech, jako jsou například květy, ovoce, listy, bobule, pryskyřice, šišky, jádro dřeva, oddenky a kořeny trav, a jsou uloženy v sekrečních buňkách, dutinách, kanálcích, epidermálních buňkách nebo žlázových trichomech. EO jsou obvykle extrahovány technikami hydrodestilace, destilace vodní parou, extrakce organickými rozpouštědly, enfleuráž, superkritická fluidní extrakce nebo mikroextrakce tuhou fází. Způsob extrakce je volen s ohledem na jejich předpokládané využití [7, 21–23]. V současné době je známo přes 3 000 EO, z nichž 300 má velký průmyslový význam. EO obsahují 85–99 % těkavých složek (aldehydy, terpenoidy, fenoly, estery, ketony, kyseliny, methoxyderiváty atd.) a 1–15 % netěkavých složek [7, 21–23]. Ačkoliv jsou EO složeny převážně z fenylypropanoidů, terpenoidů a terpenů, představují obrovskou

škálu chemických sloučenin a struktur, díky čemuž mají široké spektrum různých biologických účinků a vlastností, jako jsou např. antibakteriální, antibiotické, antiseptické, antivirové, antioxidační, analgetické, sedativní a jiné účinky [24]. Řadou studií bylo potvrzeno, že volné radikály a reaktivní formy kyslíku mohou být spojovány s mnoha nemocemi, jako jsou např. záněty, rakovina, srdeční choroby, pokles imunitního systému či mozkové dysfunkce [25]. V posledních letech tedy nabývá na významu použití antioxidantů při léčbě a prevenci těchto onemocnění. Mnoho in vitro testů, které byly provedeny na EO extrahovaných z rostlin, poukázaly na jejich antioxidační účinnost při snižování oxidačního stresu díky inhibici reaktivních forem kyslíku/dusíku, včetně jejich schopnosti fungovat jako redukční činidla a lapače volných radikálů [26].

Co se týká fyzikálně-chemických vlastností, EO jsou ve vodě v podstatě nerozpustné, s vodou se nemísí, dobrá je ale jejich rozpustnost v rostlinných olejích, ethanolu, etheru a dalších organických rozpouštědlech [27].

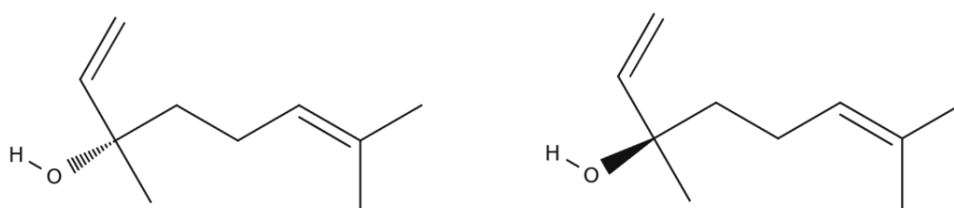
Tato práce se zabývá konkrétně třemi složkami EO, a to linalolem (LIN), estragolem (ALY) a *trans*-anetholem (ANE) [14]. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou zobrazeny v tabulce 1 [28, 29].

Tabulka 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti použitých BAL

	LIN	ALY	ANE
Systematický název	3,7-dimethyl-1,6-oktadien-3-ol	1-methoxy-4-(2propenyl)benzen	1-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)benzen
Sumární vzorec	C ₁₀ H ₁₈ O	C ₁₀ H ₁₂ O	C ₁₀ H ₁₂ O
Molární hmotnost [g.mol ⁻¹]	154,24	148,20	148,20
Hustota při 25 °C [g.cm ⁻³]	0,8622 ((-)-LIN) 0,8733 ((+)-LIN)	0,960	0,983–0,987
Bod varu [°C]	198 ((-)-LIN) 198-200 ((+)-LIN)	214–216	234–237

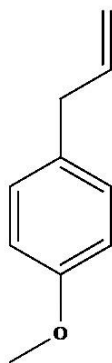
LIN (též jako β-linalool, linalylalkohol, linalyloxid) viz obrázek 1 [30] je acyklický monoterpenoidní alkohol vyskytující se ve více než 200 druzích EO získaných z bylin, listů, květů či dřeva, z nichž mnohé mají široké využití v tradiční medicíně [31–34]. LIN má jedno chirální centrum, a proto existuje ve dvou stereoisomerech. (R) nebo (-) známý jako likareol se běžně vyskytuje v přírodě jako složka např. levandule (*Lavandula angustifolia*), bazalky (*Ocimum basilicum*) či bobkového listu (*Laurus nobilis*). Naproti tomu (S) nebo (+) známý jako koriandrol je hlavní složkou EO koriandru (*Coriandrum sativum*). LIN je bezbarvá až mírně nažloutlá kapalina s příjemnou květinovou vůní. Je dobře rozpustný v ethanolu, v diethyletheru, ale prakticky nerozpustný ve vodě.

Co se týče biosyntézy, LIN je u vyšších rostlin produkován z isopentenyl pyrofosfátu přes univerzální isoprenoidní meziproduct geranyl pyrofosfát při současném působení monoterpen syntázy, která katalyzuje probíhající chemickou reakci [34]. LIN se z rostlinné suroviny získává nejčastěji parní destilací nebo extrakcí rozpouštědly nebo může být chemicky syntetizován [32]. Díky silným biologickým účinkům, včetně cytotoxických, antioxidačních, antimikrobiálních (např. proti *Candida albicans*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*), insekticidních, protizánětlivých, antiepileptických, antihyperglykemických, protinádorových a sedativních účinků, je LIN jako přírodní rostlinný produkt hojně používán v různých odvětvích průmyslu, jako je farmaceutický, kosmetický, potravinářský i zemědělský [5, 6, 8–13].



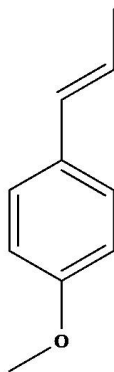
Obr. 1 Strukturní vzorec (-)-LIN (vlevo) a (+)-LIN (vpravo)

ALY (též 4-allylanisol, methylchavikol, isoanethol) je přírodní fenypropen, nacházející se v EO mnohých rostlin, např. estragonu (*Artemisia dracunculus*) (60–75 %), bazalky (*Ocimum basilicum*) (2–43 %), badyánu (*Illicium verum*) (5–6 %) a fenyklu (*Foeniculum vulgare*) (5–20 %). Je to isomer anetholu lišící se pouze v poloze dvojné vazby. Jeho vůně připomíná anýz s odpovídající sladkou chutí, která je však odlišná od anetholu. ALY je bezbarvá kapalina rozpustná ve většině organických rozpouštědel a prakticky nerozpustná ve vodě. Získává se frakční destilací terpentýnového oleje [35]. ALY se využívá v mnoha potravinách a potravinových produktech, parfémtech, mýdlech a detergentech. ALY vykazuje myorelaxační, antikonvulzivní, anestetické, bradykardické, vazodilatorní a antioxidační vlastnosti [36–39]. Významná je jeho silná antimikrobiální aktivita proti širokému spektru MO, včetně grampozitivních i gramnegativních bakterií [40].



Obr. 2 Strukturální vzorec ALY [36]

ANE (též isoestragol nebo p-propenylanisol) je aromatická sloučenina (fenylpropen) přirozeně se vyskytující v EO mnohých rostlin [35, 41, 42]. Ve vysokých koncentracích se vyskytuje hlavně v anýzovém (*Pimpinella anisum*) (80–90 %), badyánovém (*Illicium verum*) (90 %) a fenyklovém (*Foeniculum vulgare*) (80 %) oleji. Existuje ve dvou cis- a trans- isomerech, přičemž v přírodě je více zastoupen *trans*-anethol. Je to čirá, bezbarvá až jantarově zbarvená kapalina se sladkou anýzovou příchutí. ANE je dobře rozpustný v ethanolu, ve vodě je téměř nerozpustný [43]. V přírodě se ANE získává frakční destilací EO anýzu, fenyklu, badyánu atd. Může být také syntetizován esterifikací p-kresolu s methanolem a následnou kondenzací s acetaldehydem [35]. ANE vykazuje výrazně sladkou chuť a je 13x sladší než cukr. ANE pro svou výraznou vůni dokáže překrýt nepříjemný zápach, a proto je využíván jako maskovací prostředek v mnoha výrobcích, např. mýdla, zubní pasty či ústní vody [43]. Je také široce využíván jako přírodní aroma zodpovědné za anýzovou příchut' používanou ve sladkostech, pečivu, alkoholických i nealkoholických nápojích. U ANE byly zjištěny jeho četné farmakologické účinky, a to zejména antimikrobiální aktivita proti růstu bakterií (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), kvasinek (*Candida albicans*) a plísní, antioxidační a insekticidní aktivita. Dále ANE vykazuje analgetické, antikonvulzivní či protizánětlivé vlastnosti [41, 42, 44].



Obr. 3 Strukturální vzorec ANE [43]

EST byl Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration (FDA) přidán na seznam přídatných látek povolených pro použití v potravinách určených k lidské spotřebě [45]. LIN i ANE jsou dle FDA všeobecně považovány za bezpečné (Generally Recognized as Safe, GRAS) [46]. Jejich těkavost a špatná rozpustnost ve vodě však omezují jejich širší využívání v průmyslu. Stabilitu těchto látek též negativně ovlivňují vnější faktory, jako jsou teplo, světlo a přístup kyslíku [20, 28].

1.2 Modifikace polymerních matic pomocí BAL

Biologicky aktivní polymerní systémy (BPS) jsou systémy na bázi přírodních nebo syntetických polymerů modifikovaných pomocí BAL, které vyvolávají specifickou biologickou odezvu. Při výběru metody modifikace polymeru je nutno vzít v potaz několik faktorů a to zejména: vlastnosti daného polymeru (chemické i fyzikální), typ BAL (její toxicita, způsob aplikace, fyzikální a chemické vlastnosti) a také prostředí aplikace (teplota, pH, vlhkost) [4, 47]. BPS je možno rozdělit na migrující a nemigrující polymerní systémy [4].

1.2.1 Nemigrující biologicky aktivní polymerní systémy

Nemigrující BPS jsou polymerní systémy, které vykazují určitou biologickou aktivitu, aniž by BAL migrovala z polymeru do substrátu. U tohoto systému je vyžadován kontakt povrchů polymer/substrát. Z tohoto důvodu, např. při aktivním balení pevných potravin, kde může být kontakt povrchů značně omezen, je využití nemigrujícího BPS nevýhodné, jelikož dochází ke snížení biologického účinku. Absence migrace BAL u těchto systémů však poskytuje regulační výhody z toho důvodu, že se u nich nepředpokládá překročení žádného celkového ani specifického migračního limitu stanoveného pro danou látku. Díky kontaktu povrchů (např. při balení tekutých potravin) tento systém vyžaduje velmi malé množství BAL pro maximální účinek. Tímto může být dosaženo nižších cenových nákladů polymerního systému. Nemigrující polymerní systémy mohou nacházet uplatnění např. v potravinářském průmyslu (balení potravin), v textilním průmyslu či zdravotnictví [48, 49].

Do skupiny nemigrujících BPS lze zařadit:

- přirozeně biologicky aktivní polymery,
- polymery s imobilizovanými BAL.

Přirozeně biologicky aktivní polymery

Existují polymery, které mají přirozeně bioaktivní účinky, aniž by do nich byla nějakým způsobem zabudována BAL. Hlavním a nejvíce využívaným představitelem této skupiny je chitosan [48].

Chitosan je polysacharid, získávaný z MO, hub a skořápek koryšů. Mezi jeho výhodné vlastnosti patří netoxičita, biokompatibilita, biologická rozložitelnost a mírné antimikrobiální vlastnosti (inhibuje růst grampozitivních a gramnegativních bakterií, kvasinek a plísní). Bylo popsáno mnoho způsobů jeho modifikace, vedoucí ke zvýšení jeho antibakteriální aktivity, jako je N-karboxybutylace, Okarboxymethylace, kvarternizace, modifikace cukrů či N-alkylace. Dalším polymerem řadícím se do této skupiny je poly-L-lysin, což je kationtový polymer podporující buněčnou adhezi [48, 49].

Do této skupiny se také řadí polymery, u kterých může být, za použití fyzikálněchemických povrchových modifikací, dosaženo určité biologické aktivity. Jedním z nejznámějších příkladů je UV ozařování polyamidu, u kterého se vlivem ozáření přemění amidy na jeho povrchu na aminy, které zůstávají součástí polymerního řetězce. Antimikrobiální účinek pak závisí na použité vlnové délce či teplotě. Předpokládaný mechanismus antimikrobiální aktivity je podobný u chitosanu, poly-L-lysinu a dalších kationtových polymerů, tedy interakce se záporně nabitými mikrobiálními membránami vedoucí k jejich narušení [48, 50].

Polymery s imobilizovanými BAL

Pevného navázání BAL k polymeru je zde docíleno díky vzniku kovalentní vazby. Podmínkou však je, aby polymer a BAL obsahovaly funkční skupiny, které umožní jejich navázání vůči sobě navzájem. Mezi BAL vhodné pro kovalentní navázání patří např. enzymy (lysozym, chitináza, laktoferrin), peptidy, proteiny nebo organické kyseliny. V některých případech je však povrch polymerů nutno nejprve funkcionalizovat, čímž získáme požadovaný typ a množství funkčních skupin potřebných ke kovalentnímu navázání BAL k povrchu polymeru. Z polymerů vhodných pro funkcionalizaci jejich povrchů se využívají např. polyolefiny, polyethyltereftalát nebo polymethylmethakrylát (PMMA). Funkcionalizace se provádí nejčastěji úpravou povrchu (např. plazmatem, úpravou pomocí koróny, plamenem), roubováním nebo pomocí vazebných činidel (např. glutaraldehyd). Kovalentní imobilizace BAL nabízejí několik výhod tím, že vznikají nejstabilnější vazby mezi BAL a povrchem polymeru. Výhodná je i vyšší stabilita BAL, konkrétně enzymů, které díky kovalentnímu navázání více odolávají podmínkám okolního prostředí. Rovněž může být dosaženo vyšší termální stability peptidů a proteinů kovalentně navázanými k polymerní matici, jelikož tyto látky při běžných termoplastických metodách zpracování podléhají denaturaci [48, 49].

1.2.2 Migrující biologicky aktivní polymerní systémy

U tohoto typu systémů dochází k uvolňování a migraci BAL z polymerní matrice. Je zde tedy nezbytné, aby použitá BAL byla netoxická a schválená příslušnými úřady jako bezpečná pro lidské zdraví [2].

Tento typ systémů se dle povahy inkorporovaných BAL dále dělí na dva podtypy: těkavý a netěkavý. U netěkavého migrujícího polymerního systému je přenos BAL z polymerní matrice na povrch substrátu uskutečněn pomocí difúze. V případě využití těkavých BAL dochází k jejich migraci, aniž by polymer byl v přímém kontaktu se substrátem. Rychlost migrace BAL je zde závislá na interakci mezi polymerní matricí a těkavou BAL. Těkavé BAL jsou většinou přírodního původu (extrakty rostlin), což je i lépe přijímáno spotřebiteli [47, 51]. U migrujících polymerních systémů jsou možnosti modifikace polymerní matrice následující [3]:

- přímá inkorporace BAL do polymerní matrice,
- nanášení BAL na povrch polymerního materiálu.

Přímá inkorporace BAL do polymerní matrice

Začlenění BAL přímo do polymerní matrice (nebo též modifikace v objemu polymerní matrice) se považuje za nejčastěji volenou a velmi účinnou metodu modifikace termoplastů i termosetů. Pro tento způsob modifikace se často využívají stříbrné ionty, enzymy, peptidy, fenoly nebo např. kovy mědi či zinku atd. Míra plnění BAL do polymerní matrice, která vede k efektivní ochraně před MO, se pohybuje v rozmezí od 0,1–3,0 hm. %. Při této metodě jsou BAL do produktu zakomponovány v tavenině nebo pomocí rozpouštědla zamíchány do matrice. Při termoplastickém zpracování polymerů, např. vstřikováním, vyfukováním nebo vytlačováním, je však výhodnější využívat pouze tepelně stabilní BAL. Ovšem i v případě tepelně stabilních BAL (např. bakteriocinů či peptidů), může docházet k částečné ztrátě jejich biologických vlastností [3, 49, 52, 53].

Jak již bylo zmíněno výše, tepelně citlivé BAL lze zakomponovat do matrice polymeru pomocí rozpouštědel, která umožňují zpracovávat polymery, např. litím, odléváním, máčením, nástřikem apod. Zde však musí být splněna podmínka rozpustnosti BAL a polymeru ve stejném rozpouštědle. Tato možnost je vhodnější pro výrobu povlaků a filmů, u kterých není plánována rozsáhlejší produkce [54, 55].

Výhody přímé inkorporace BAL spočívají v technologické nenáročnosti použitých procesů, při kterých také nedochází k významnějším změnám ve vlastnostech polymerů. Problém však může představovat fakt, že dochází k nekontrolovatelnému uvolňování BAL do okolí, což může např. komplikovat

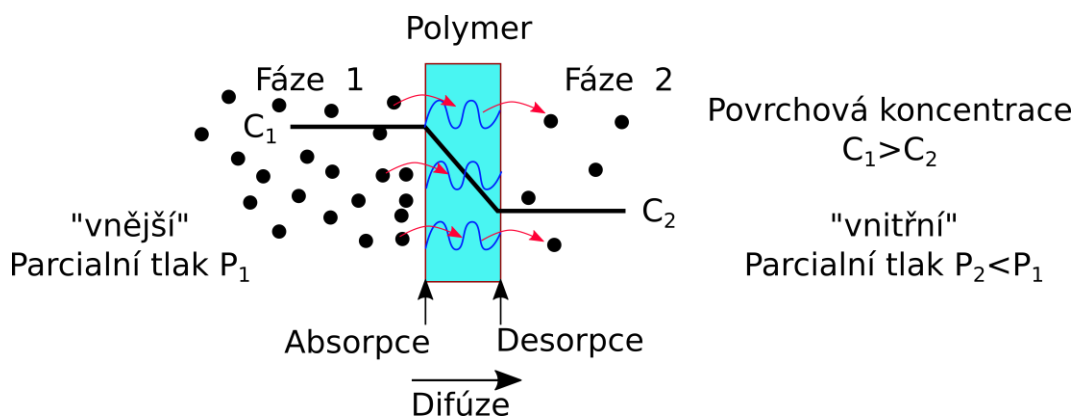
použití takového materiálu v oblasti zdravotnictví [55, 56]. V případě přímé inkorporace složek EO pomocí termoplastických metod představuje problém jejich značná těkavost, a z toho plynoucí jejich nízká zbytková koncentrace ve finálním produktu. Možným řešením je jejich imobilizace na inertní nosiče a následná inkorporace do polymerní matrice, jak je popsáno níže (viz kapitola Imobilizace BAL na pevné nosiče).

Nanášení BAL na povrch polymerního materiálu

V případě, že BAL nemůže být z důvodu vysokých teplot zpracovávána s poly-merní taveninou společně v tvářecím procesu, přistupuje se k možnosti nanášení BAL na povrch polymerního materiálu. Nanášení BAL na povrch polymeru se provádí až na finální výrobek. Jedná se o relativně jednoduchou techniku docílení biologické aktivity polymerního systému. Tento způsob má však velkou nevýhodu, a tou je nízká doba účinnosti [55, 57, 58].

Migrující BPS mohou být navrženy jako systémy kontrolovaně uvolňující BAL, což umožňuje udržení jejich konstantní koncentrace např. v potravinářském nebo farmaceutickém produktu. To může zabránit případům, kdy je migrace antimikrobiální látky z polymerního systému rychlejší, než je růst MO, a tudíž dochází ke snižování její účinné koncentrace před stanoveným časem. Opakem je zase příliš pomalé uvolňování, kdy se koncentrace uvolněné antimikrobiální látky nachází pod minimální inhibiční koncentrací, v důsledku čehož pak dochází k rychlejšímu růstu MO před uvolněním BAL [51].

Prostup látek skrze polymerní matrici je komplexní proces, který je ovlivňován mnoha vnějšími i vnitřními faktory. Migrace nízkomolekulárních látek z polymerního materiálu je převážně řízena difúzními procesy, s nimiž je úzce spjat významný aspekt permeace. Průběh permeace je zobrazen na obrázku 4. Jsou zde dva prostory o rozdílném parciálním tlaku a rozdílné povrchové koncentraci. Tyto prostory jsou od sebe odděleny polymerní membránou. Molekuly nízkomolekulární látky jsou v povrchové vrstvě polymeru rozpuštěny a absorbovány. Na povrchu polymeru je tak vyšší koncentrace permeantu. Molekuly poté difundují polymerem ve směru koncentračního gradientu. V poslední fázi dochází k desorpci nebo odpaření látky z povrchu materiálu [59].



Obr. 4 Schéma permeace a difúzního procesu [60]

Difúze potenciálních migrantů z polymerního materiálu závisí především na teplotě, molární hmotnosti, stupni zesítnění polymeru či chemické afinitě migrantů s polymerem [60, 61].

Na proces difúze BAL z polymerní matrice lze aplikovat Fickovy zákony. Rovnice založené na Fickových zákonech mohou být využívány k modelování transportních procesů např. v potravinách, biopolymerech či léčivech. V případě BPS mohou sloužit parametry získané z rovnic 1.1 a 1.2 pro popis difúze BAL a dalších polymerních přísad z polymerní matrice. Hnací silou pro uvolňování BAL z polymerní matrice je zde koncentrační gradient [47, 62, 63]. První Fickův zákon popisuje lineární vztah mezi tokem hmoty J [$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] procházející přes membránu a koncentračním gradientem mezi oběma stranami membrány. Platí pro ustálenou difúzi, při které se koncentrační gradient látky nemění v čase a tok je konstantní. Pokud difúze probíhá pouze v jednom směru, pak platí vztah [60, 61, 63, 64]:

$$J_d = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1.1)$$

kde: J difúzní tok [$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] představuje množství difundované BAL za jednotku času skrze plochu kolmou na směr proudění, D je difúzní koeficient BAL v polymeru [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$], x je vzdálenost ve směru toku [cm], c je koncentrace BAL [$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$], t je čas.

Tento vztah platí, pokud je tloušťka filmu mnohem menší než ostatní rozměry. Jestliže tato podmínka není splněna, difúzní jev v ostatních směrech nemůže být zanedbán. Dosazením za J z 1. Fickova zákona s předpokladem, že D je konstantní, získáme 2. Fickův zákon, který popisuje nestacionární difúzi (koncentrační gradient se mění s časem a difúzní tok se mění s polohou) [47, 63, 64]:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.2)$$

kde: D je difúzní koeficient BAL v polymeru [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$], x je vzdálenost ve směru toku [cm], c je koncentrace BAL [$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$], t je čas. V ustáleném stavu je $\partial c / \partial t = 0$ a proto nenastává akumulace BAL ve filmu [63, 64].

1.2.3 Enkapsulace BAL

Enkapsulace je technika, při které dochází k uzavření BAL do obalového materiálu (polymerní matrice), jejímž výsledkem jsou částice různých velikostí. Mikroenkapsulace poskytuje velikost částic v rozmezí od 1 do 1000 μm , zatímco částice menší než 1 μm se nazývají nanočástice [65].

Mikročástice lze z morfologického hlediska dále rozdělit na mikrokapsle (resp. mikrotobolky) a mikrosféry. Mikrokapsle jsou složeny z jádra v pevné, kapalné nebo plynné podobě, na které těsně přiléhá polymerní obal. U mikrosfér se nerozlišuje jádro a obal, BAL je zde rozptýlená v matici mikrosféry v pevné formě nebo je přítomna ve formě suspenze či emulze [66]. Hranice tohoto rozdělení však není ostrá. Existují různé typy mikročástic, které leží na pomezí nebo jsou kombinací obou základních přístupů [67].

Mikroenkapsulace je jednou z nejefektivnějších technik, která chrání těkavé látky před vypařováním, oxidací, vlhkostí nebo termální degradací a umožňuje jejich kontrolované uvolňování [68]. Enkapsulovaná látka může být uvolňována řadou mechanismů [68–70]:

- mechanickým působením – uvolnění BAL nastává v okamžiku rozpadu polymerní matrice v důsledku mechanického namáhání (tlak, tření, stříh)
- teplotou a pH – integrita mikročástice může být narušena působením teploty či pH
- difúzí – uvolňování BAL pomocí difúze může být popsáno prostřednictvím Fickova 1. a 2. zákona (viz výše)
- biodegradací – během biodegradace polymerního systému dochází ke štěpení řetězců a k výraznému snižování molární hmotnosti polymeru. Uvolňování BAL je řízeno celkovým rozpadem polymerního systému
- rozpuštěním – dochází k uvolňování látky vlivem osmózy nebo botnání. Při botnání jsou hydrofilní polymery schopny absorbovat velké množství vody, aniž by se zcela rozpustily. Během absorpce vody se BAL postupně šíří směrem ven z polymerního systému. Při osmóze je čisté rozpouštědlo nebo rozpouštědlo s velmi malým množstvím BAL schopno proudit přes semipermeabilní membránu. Tlak vyvolaný rozpouštědlem nutí BAL přestupovat skrz póry v polymeru do rozpouštědla.

Rychlost uvolňování BAL je ovlivněna mnoha faktory, např. polymerní matricí, tvarem a velikostí molekul BAL, polaritou polymerní matrice, ale také

rozpustností, permeabilitou nebo difuzivitou BAL i polymeru. Například BAL rozpustná ve vodě se bude z vodorozpustného polymeru uvolňovat rychleji [47, 71].

Výběr vhodné techniky enkapsulace závisí především na zpracovatelských podmínkách, požadované fyzikální a chemické stabilitě, požadované koncentraci a velikosti částic a na předpokládaném využití a ceně výsledného produktu [68, 72].

V současné době existuje mnoho technik enkapsulace. V zásadě se mohou dělit na dvě skupiny [73]:

- Chemické metody zahrnují emulzní, suspenzní, precipitační nebo disperzní polymerizace a mezifázovou polykondenzaci. U těchto metod enkapsulace probíhá polymerizace během procesu přípravy mikročástic.
- Fyzikální metody mohou být dále rozděleny na fyzikálně-chemické (koacervace nebo sol-gel enkapsulace) a fyzikálně-mechanické (sprejové sušení a chlazení, fluidní nános, elektrostatická enkapsulace nebo metoda odpaření rozpouštědla).

Tato práce se zaměřuje na metodu odpaření rozpouštědla, jejímž výsledkem je vznik mikrosfér. Tato metoda je velmi používaná díky přístrojové nenáročnosti, vysoké účinnosti a snadné proveditelnosti. Je zde však nutné použít organická rozpouštědla. Principem této metody je odpařování části emulze obsahující rozpuštěnou nebo dispergovanou BAL a polymer. Při procesu odpařování rozpouštědla dojde k vysrážení polymerních částic, které ve své struktuře uzavírají BAL.

Metoda odpařování rozpouštědla zahrnuje několik kroků [66, 74, 75]:

- Nejprve je polymer rozpuštěn v rozpouštědle, které je nemísitelné s vodou. V tomto roztoku je dále rozpuštěna nebo dispergována BAL.
- Následně vzniká lipofilní fáze, která je za pomoci tenzidů emulgována do vodné fáze, kde dochází ke vzniku jemné emulze olej/voda.
- Pomocí vysokorychlostního míchání, homogenizačního zařízení nebo ultrazvukové lázně je poté dosaženo požadovaného stupně emulze.
- Organické rozpouštědlo poté difunduje do vodné fáze a vlivem míchání a dalšího úbytku rozpouštědla dochází k formování mikrosfér, které jsou následně zfiltrvány, promyty a vysušeny

Při metodě odpaření rozpouštědla existuje mnoho parametrů, kterými lze ovlivňovat vlastnosti mikrosfér (velikost, povrch, pórovitost nebo enkapsulační účinnost).

Tyto parametry lze rozdělit na [66]:

- formulační proměnné parametry – koncentrace a typ polymeru, koncentrace a typ emulgátoru, poměry fází atd.,
- procesní proměnné parametry – teplota, tlak či rychlost míchání.

Velmi důležitým krokem enkapsulace je výběr vhodného polymeru, který je závislý především na požadovaných fyzikálních vlastnostech. Polymery využívané pro přípravu mikročástic mohou být následující [76, 77]:

- syntetické polymery, které se následně dělí na nebiodegradabilní polymery např. PMMA, epoxy polymery a biodegradabilní polymery např. laktidy, glykolidy a jejich kopolymery, polyanhydridy, polyalkylkyanoakryláty, atd.,
- přírodní polymery získávané z různých zdrojů, např. proteiny (albumin, kolagen), polysacharidy (karagenan, chitosan, škrob, agaróza).

Polymery tvořící základ mikročástic, jež mají využití ve farmaceutickém průmyslu či zdravotnictví, by měly být biodegradovatelné (v těle se rozkládající na neškodné produkty) a /nebo biokompatibilní (bez negativního vlivu na zdraví, nepůsobící v organismu žádné lokální nebo systémové nežádoucí účinky) [15].

Polymer kyseliny mléčné (PLA) je termoplastický, alifatický polyester, jehož výchozí látku pro jeho přípravu (kyselinu mléčnou) lze získat ze zemědělských plodin, jako jsou kukuřice, cukrová řepa, nebo cukrová třtina [78]. Štěpením esterové vazby se PLA rozkládá na netoxické produkty (vodu a CO₂). Je schválen jako bezpečný úřadem FDA a také evropskými regulačními orgány [79, 80]. PLA je v současné době věnována velká pozornost díky jeho širokému využití pro obalové, textilní, biomedicínské a v poslední době také inženýrské aplikace. Mezi jeho nejvýznamnější vlastnosti patří biodegradovatelnost, biokompatibilita a netoxičnost [81, 82]. Další výhodou použití PLA při přípravě mikro- či nanočástic je jeho flexibilita a mechanické vlastnosti (vysoká pevnost v tahu, vysoký Youngův modul), dobrá transparentnost a propustnost pro plyny) [83]. PLA vykazuje ovšem také nevýhodné vlastnosti, a to zejména vysokou křehkost, špatnou houževnatost, vysokou citlivost na vlhkost a případně i nižší teplotu skelného přechodu, což může být nežádoucí pro určité obalové nebo inženýrské aplikace. To je také důvod, proč se stále větší úsilí soustřeďuje na vylepšení vlastností PLA [83–89].

Jednou z takových možností je příprava směsi dvou nebo více kompatibilních polymerů. Díky tomu je možno upravit teplotu skelného přechodu, zlepšit odolnost proti lomu, flexibilitu a zpracovatelnost [90]. PLA může být smíchan s jak biologicky odbouratelnými polymery (polyanhydridy, alifatické polyestery a alifatické-aromatické kopolyestery, tak s biologicky nerozložitelnými polymery

jako jsou polyolefiny, polyakryláty, vinylové polymery, elastomery a kaučuky [91].

PMMA je biokompatibilní, syntetický polymer disponující velmi dobrými chemickými i fyzikálními vlastnostmi [92–94]. Jeho nejtypičtější vlastností je jeho čírost a naprostá bezbarvost. Má vynikající tvarovou paměť, odolnost vůči vodě, zředěným alkáliím a kyselinám, dobré mechanické vlastnosti a obrobiteľnosť. Své uplatnění nachází především ve zdravotnických, kosmetických i konstrukčních aplikacích [95].

1.2.4 Kinetika uvolňování BAL z polymerních mikročastic

Kinetika uvolňování BAL z polymerních mikročastic může být popsána mnoha různými modely, mezi které se řadí zejména kinetika prvního a nultého řádu. Kinetikou nultého řádu se popisují systémy, v nichž matrice, která obklopuje BAL, je neporušena a dochází k pozvolnému rozpouštění BAL při konstantní rychlosti uvolňování. Množství uvolněné BAL za určitý čas lze popsat následující rovnicí 1.3 [96]:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (1.3)$$

kde: Q_t je kumulativní množství BAL uvolněné v čase t , Q_0 je počáteční množství BAL, $K_0 t$ kinetická konstanta rovnice nultého řádu vyjádřená jednotkou koncentrace za čas [96].

Rychlost uvolňování BAL kinetikou prvního řádu je závislá na množství BAL v matrici, které klesá v závislosti na čase, a tedy i rychlost uvolňování BAL s časem exponenciálně klesá. Uvolňování BAL lze popsat rovnicí 1.4:

$$C_{(t)} = C_0 \exp(-kt) \quad (1.4)$$

kde: $C_{(t)}$ je množství BAL uvolněné v čase t , C_0 je počáteční množství BAL v polymerní částici, k je rychlostní konstanta prvního řádu, která se určuje pomocí nelineární regrese [97, 98].

1.3 Imobilizace BAL na pevné nosiče

Jak již bylo zmíněno výše, složky EO jsou vysoce těkavé, což představuje problém při jejich inkorporaci do polymerní matrice. Při zpracování dochází k jejich vysokým úbytkům, ke kterým dále dochází i v průběhu skladování. To představuje nejen ekonomickou ztrátu, ale také jejich nízkou nebo nulovou bioaktivní účinnost. Těkavost složek EO však není jediná vlastnost způsobující pokles jejich biologické aktivity. Potenciálními riziky jsou také degradace vlivem

tepla, světla a mechanické namáhání. Proto bylo vyvinuto mnoho různých metod, chránících BAL v průběhu zpracování [99].

Adsorpce složek EO na povrch porézního plniva, je technika, která imobilizuje těkavé sloučeniny, stabilizuje je a chrání před nežádoucími vlivy zpracování a je možné při ní dosáhnout i jejich uvolňování v čase [14, 100]. Teoreticky můžeme adsorpci popsat jako děj, při kterém se atomy, molekuly nebo částice (adsorbát)

z plynné nebo kapalné fáze přichytávají na povrchu pevné látky (adsorbentu) vlivem přitažlivých sil [101].

Plniva, která mohou sloužit jako nosiče BAL, jsou následující [102]:

- anorganická plniva: oxidy (SiO_2), silikáty (talek, hektorit, slída, wollastonit, montmorillonit, vermiculit) a soli (CaCO_3),
- organická plniva: dřevní moučka, karbonová vlákna atd.

Při výběru plniva pro imobilizaci BAL by měly být brány v potaz jeho fyzikálněchemické vlastnosti, jako je přítomnost funkčních skupin, polarita nebo chemická struktura. Přítomnost a typ funkčních skupin a polarita molekul určuje, zda bude probíhat sorpce chemická (kationtová výměna, výměna ligandů nebo protonace) nebo fyzikální (van der Waalsovy interakce). Existuje také fyzikálně-chemická adsorpce, kdy dochází k navázání adsorbátů slabými interakcemi, a poté dochází k chemické reakci nebo chemické transformaci [99, 101].

Tato práce se konkrétně zabývá adsorpcí složek EO na tři polymerních plnivech: dřevní moučka (WF), molekulová síta (MS) a talek (TC) [14].

Dřevní moučka

WF je jedním z nejvíce a zároveň nejdéle komerčně využívaným organickým polymerním plnivem. Získává se jako vedlejší produkt ve dřevozpracujícím průmyslu a její následné zpracování se obvykle skládá z několika kroků. Prvním krokem je rozdružení dřeva pomocí drtiče a štěpkovače. Poté dochází k mletí ve třecím nebo válcovém mlýnu. Klasifikace WF se provádí na vibračních, rotačních nebo oscilačních sítích. Hlavními složkami WF jsou celulóza (37–45 %), hemicelulóza (19–30 %) a lignin (21–34 %), nicméně přesný poměr těchto hlavní složek je závislý na typu dřeva. WF se řadí mezi polární a hydrofilní plniva. Mezi její výhodné vlastnosti patří hlavně nízká cena, nízká hustota a recyklovatelnost. Slouží hlavně jako plnivo do polyethylenu (PE), polypropylenu (PP) nebo polyvinylchloridu. Při použití v polyolefinech dodává materiálu vyšší tuhost. Konečné vlastnosti kompozitů závisí na typu procesu (vstřikování, lisování, vytlačování) a na podmínkách zpracování. Částice WF mají pórovitou strukturu a disponují velkou specifickou plochou povrchu, s čímž je spojena vyšší adsorpční kapacita WF [103, 104].

Molekulová síta (zeolity)

MS jsou mikroporézní, krystalické aluminosilikáty alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Obecný vzorec zeolitů je $Me_{2/n} \cdot Al_2O_3 \cdot xSiO_2 \cdot zH_2O$, kde: Me je mimoskeletální kovový kation (Na, K, Ca, Mg, aj.) n je náboj kationtu (jednomocný/vícemocný), x je molární poměr SiO_2/Al_2O_3 , z je počet molů vody. Stavební elementy prostorové krystalové mřížky jsou mnohostěny, složené z křemičitanových (SiO_4) a hlinitanových (AlO_4) tetraedrů spojených sdílenými kyslíkovými atomy. Trojrozměrná struktura zeolitů obsahuje kanálky nebo dutiny, jejichž velikost je přibližně 0,3–1,0 nm. Tyto dutiny jsou obvykle vyplněny vodou nebo kationy nepřímo vázanými do struktury. K nejdůležitějším vlastnostem zeolitů patří adsorpční schopnosti, schopnost iontové výměny a hydratační/rehydratační schopnosti. Díky pórům a kanálkům mají zeolity vysoký specifický povrch umožňující adsorpci molekul s nízkou hmotností. Množství molekul, jež může zeolit adsorbovat, závisí na jeho vnitřním volném objemu. Je proto nutné, aby byl zeolit v tzv. aktivní formě, tedy bez sorbované (zeolitové) vody, kterou lze odstranit zvýšením teploty nebo snížením tlaku [105–107].

Talek

TC (též mastek, $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$) je přirozeně se vyskytující minerál široce využívaný jako polymerní plnivo. Vzniká při metamorfóze hornin bohatých na hořčík. TC je tvořen jednou oktaedrickou vrstvou ležící mezi dvěma tetraedrickými vrstvami. TC je na omak mastný a má šupinatý a hydrofobní charakter. Zpracovává se drcením, mletím a následnou klasifikací. Po rozdrcení je TC rozemlet na kladivovém nebo fluidním mlýnu se vzduchovým klasifikačním systémem. Velikost částic TC se pohybuje od 1 do 100 μm . Jako plnivo se využívá převážně v termoplastech, konkrétně nejvíce v PP. Díky své destičkovité struktuře zlepšuje u kompozitů bariérové vlastnosti pro plyny, dále poskytuje vyváženou pevnost a tuhost, zvyšuje tepelnou a chemickou odolnost i odolnost proti tečení. TC je nejměkčí minerál, díky čemuž je málo abrazivní a snižuje tak opotřebení strojů při zpracování polymerů, kde slouží jako plnivo [104].

1.3.2 Příklady využití plniv jako nosičů BAL

Mezoporézní silika je vysoce porézní forma siliky využívána v mnoha aplikacích z důvodu jejího velkého poměru plochy povrchu k objemu a vysokému procentu volného objemu, což může být využito k ochraně BAL. Velikost jejich póru se pohybuje v rozmezí od 2 do 50 nm. Mezoporézní silika je využívána v biomedicině, farmacii či v potravinářských obalových aplikacích. Zajímavou aplikací jsou i systémy kontrolovaného uvolňování [99]. Ve studii Zhanga a kol. byla použita silika jako adsorbent pro aktivní látku menthol. Byly zkoumány

vlastnosti izotermického uvolňování mentholu a korelovány se strukturálními parametry nanoporezních absorbentů. Bylo prokázáno, že velikost póru, struktura a funkční skupiny jsou zásadní parametry ovlivňující izotermické uvolňování mentholu, a že úpravou těchto parametrů lze dosáhnout jeho řízeného uvolňování. U vezikulární siliky se silnými stěnami a hydrofobními funkčními skupinami docházelo k pomalejšímu uvolňování mentholu [108].

Montmorillonit a kaolinit byly testovány jako účinná plniva pro adsorpci sabinenu (složka EO) pro následnou aplikaci do přírodních insekticidů. Bylo zjištěno, že při adsorpci sabinenu na jíly byly uplatňovány elektrostatické i neelektrostatické interakce (vodíkové můstky, hydrofobní interakce, π - π interakce). Dále bylo potvrzeno, že chemická modifikace jílu pomocí zásaditého roztoku NaOH snižuje počet adsorbovaných vrstev na povrchu. Naproti tomu modifikace jílu pomocí slabého roztoku kyseliny (H_2SO_4) podporuje tvorbu více vrstev, čímž zlepšuje jeho specifický povrch, a tím pádem i zvyšuje jeho adsorpční kapacitu [109].

Ve studii publikované Ziyatem a kol. bylo cílem studovat afinitu thymolu k přírodnímu marockému jílu „Rhassoul“ pomocí adsorpční techniky. Byla porovnávána adsorpční kapacita čistého jílu s jílem modifikovaným pomocí cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB). Výsledky ukazují, že množství adsorbovaného thymolu je vyšší u modifikovaného jílu, jelikož čistý jíl je hydrofilní, zatímco po modifikaci pomocí CTAB se jíl stává organofilním. V této studii, křivky znázorňující adsorpční kinetiku thymolu, poukazují na dvě fáze. V první fázi je dosaženo rychlé a maximální adsorpce, naopak druhá fáze je pomalá a souvisí s difúzními jevy [100], což koresponduje s jejich předešlým výzkumem o adsorpci thymolu na hydrotalcit $Mg-Al-CO_3$ [110]. Zde byla porovnávána adsorpční kapacita hydrotalcitu s kalciovým hydrotalcitem. Kalcinace byla provedena při 500 °C. Bylo zjištěno, že termální aktivace hydrotalcitu výrazně zvýšila jeho adsorpční kapacitu, pravděpodobně v důsledku zvětšení jeho specifického povrchu. U obou výzkumů bylo pozorováním adsorpčních izoterm pozorováno, že adsorpci thymolu dokonale popisuje Freundlichův model [100, 110].

Ve výzkumu publikovaném Rondesem a kol. byl sledován vliv různých koncentrací organomodifikovaného montmorillonitového jílu a dvou složek EO (karvakrol a eugenol) při zabudování do matrice nízkohustotního polyethylenu (LDPE). I zde bylo potvrzeno potenciální využití montmorillonitového jílu jako nosiče složek EO. Díky imobilizaci složek EO na jíl se zvýšila jejich tepelná stabilita. Výsledné kompozity vykazovaly i zvýšenou krystalinitu systému, která byla výraznější v případě kompozitu obsahující karvakrol [111].

Byly provedeny i studie zabývající se imobilizací složek EO na jílový bentonit a jejich následná inkorporace do polymerních matic. Bylo zde potvrzeno

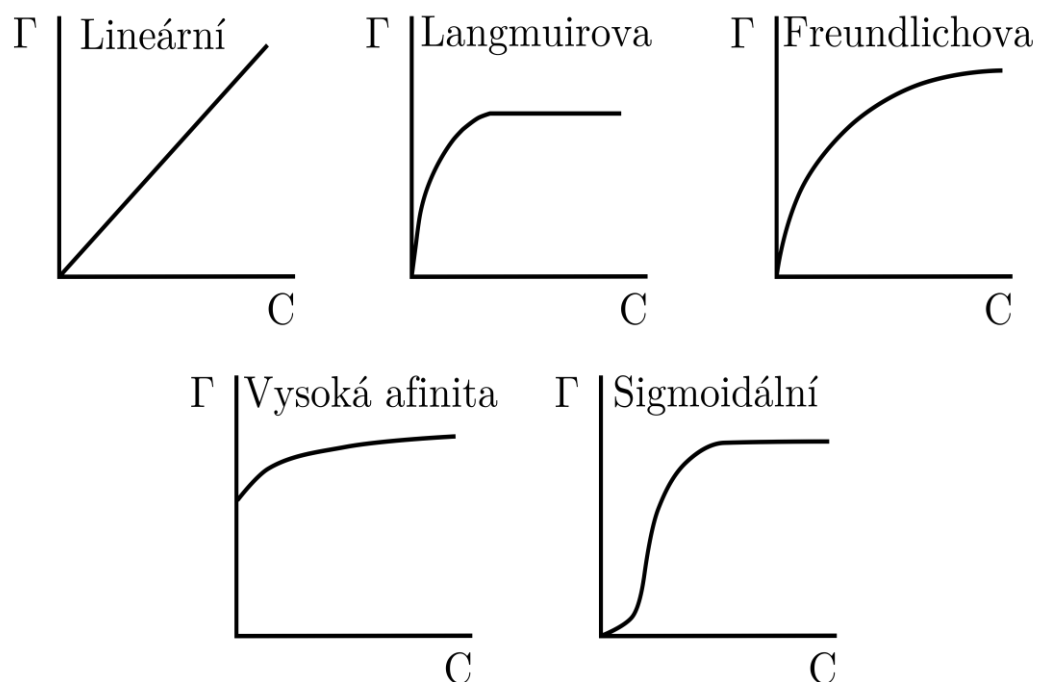
pozvolné uvolňování složek EO z bentonitu. Zároveň zde bylo zjištěno, že jemnější frakce bentonitu adsorbovaly vyšší množství terpenických látek a jejich adsorpce byla také ovlivněna jejich polaritou [112, 113].

Biddeci a kol. publikoval výsledky výzkumu, který byl zaměřen na přípravu bionanokompozitních filmů na bázi pektinu s EO máty peprné (*Mentha piperita*) adsorbované na modifikovaných nanotrubičkách halozitu. Povrch nanotrubiček byl funkcionalizován pomocí kukurbiturilu s cílem zvýšit jeho afinitu k EO. Navíc došlo ke zlepšení mechanických vlastností a povrchové hydrofobicity. Byla prokázána antioxidační i antimikrobiální aktivita připravených kompozitů [114].

1.3.3 Adsorpční izotermy

Adsorpční izotermy popisují závislost adsorbovaného množství dané látky na její rovnovážné koncentraci v roztoku při konstantní teplotě. Mohou sloužit obecně pro základní popis procesu adsorpce a k odvození adsorpční kapacity adsorbentu pro danou látku, čímž predikují její použitelnost na konkrétní typ adsorbentu. Mezi nejčastěji používané izotermy, které mohou sloužit k popisu adsorpce složek EO na inertní nosiče, patří Langmuirova a Freundlichova izoterma.

Na obrázku 5 jsou znázorněny i další základní typy adsorpčních izoterem [115, 116]. C je rovnovážná koncentrace adsorbátu v roztoku [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$], Γ je povrchová koncentrace, tj. množství naadsorbované na adsorbentu [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$] [116].



Obr. 5 Základní typy adsorpčních izoterem [116]

Lineární izotermy

Vyskytují se v počáteční fázi všech izoterem popisujících adsorpci na homogenním povrchu [116].

Langmuirova adsorpční izoterma

Langmuirova adsorpční izoterma je nejjednodušší adsorpční izotermou. Langmuirův model předpokládá, že adsorpce je monovrstvá, všechna adsorpční místa jsou stejná, pravděpodobnost adsorpce je na všech místech povrchu stejná a schopnost látky naadsorbovat se není ovlivněna obsazením sousedních pozic. Langmuirovu adsorpční izotermu vyjadřuje vztah 1.5 [117, 118].

$$\frac{q_e}{q_{max}} = \frac{k_L \cdot C_e}{(1 + k_L \cdot C_e)} \quad (1.5)$$

kde: q_e je adsorbované množství při rovnováze [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$], C_e je rovnovážná koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$], k_L je rovnovážná konstanta mezi adsorpcí a desorpcí [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] a q_{max} je maximální adsorbovatelné množství [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]. Adsorpční schopnost adsorbentů, kdy adsorpční mechanismus je možné popsat Langmuirovou izotermou, lze vyjádřit také pomocí separačního faktoru R_L . Podle toho, jakých hodnot faktor nabývá, lze uvažovat o míře adsorpce na povrchu adsorbentu. Vyjadřuje se vztahem 1.6 [119].

$$R_L = \frac{1}{(1 + K_L \cdot C_0)} \quad (1.6)$$

kde: R_L je separační faktor, C_0 je počáteční koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$] a K_L je Langmuirova adsorpční konstanta [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]. Jestliže $R_L > 1$, izoterma je nepříznivá, $R_L = 1$ poukazuje na lineární model adsorpce a pokud $0 < R_L < 1$ je izoterma příznivá [119].

Langmuirova izoterma je charakteristická pro mikroporézní materiály s relativně malým vnějším povrchem (např. zeolity, nebo některé porézní oxidy). Na počátku adsorpce je pozorován prudký nárůst, než dosáhne svého maxima. V oblasti velmi nízkých koncentrací lze pozorovat lineární část izotermy. V oblasti velmi vysokých koncentrací se pak adsorbované množství blíží limitní hodnotě. Strmost izotermy je dána velikostí pórů [116]. Příkladem může být studie Nguemtchouin a kol., kde zkoumali adsorpci složek EO na kaolin. Hodnoty separačního faktoru R_L poukázaly na příznivou adsorpci složek EO na kaolin. Byla zde potvrzena shoda adsorpční izotermy s Langmuirovým modelem [120].

Freundlichova adsorpční izoterma

Freundlichův model se obvykle aplikuje při adsorpci na heterogenní pevné povrchy a je reprezentován následujícím empirickým vzorcem 1.7 [121]:

$$q_e = K_f \cdot C_e^{\frac{1}{n}} \quad (1.7)$$

Pro zpracování experimentálních dat je vhodný lineární tvar 1.8 [121]:

$$\ln(q_e) = \ln(K_f) + \frac{1}{n} \ln(C_e) \quad (1.8)$$

kde: q_e je koncentrace adsorbátu [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$], C_e je rovnovážná koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$], K_f je konstanta adsorpční kapacity a n je konstanta vztahující se k afinitě mezi adsorbátem a povrchem. Pokud $n = 1$ odpovídá to chemickému adsorpčnímu procesu, zatímco $n > 1$ poukazuje na fyzikální adsorpční mechanismus [121].

Freundlichova izoterma slouží k popisu typického průběhu adsorpce na heterogenním povrchu. Není lineární ani při nízkých koncentracích a při vysokých koncentracích nevykazuje limitní hodnotu adsorbovaného množství [116]. Jako příklad lze uvést studii Ziyata a kol. zabývající se adsorpcí thymolu na hydrotalcit Mg-Al- CO_3 . Adsorpční izotermy thymolu byly simulovány pomocí Langmuirova a Freundlichova modelu. Ze získaných hodnot separačního faktoru R_L bylo zjištěno, že Langmuirův model není vhodný pro popis adsorpčního jevu. Naproti tomu hodnoty K_f , což jsou konstanty Freundlichova modelu, poukázaly na silnou adsorpční kapacitu hydrotalcitu a hodnoty n svědčily o fyzikálním adsorpčním mechanismu. Ze studia adsorpčních izoterem tedy vyplynulo, že adsorpci thymolu na hydrotalcit dokonale popisuje Freundlichův model [110].

Izotermy vysoké afinity

Tyto izotermy se vyznačují velmi strmým počátečním vzestupem, po kterém dochází k ustanovení rovnováhy. K tomuto typu křivky dochází, když adsorbát vykazuje velmi vysokou afinitu k adsorbentu [116, 122].

Sigmoidální izoterma

Týká se především adsorbentů s homogenním povrchem. Křivka sigmoidální izotermy má inflexní bod. Tento typ izotermy je vždy výsledkem minimálně dvou protichůdných mechanismů. Typickým příkladem mohou být nepolární organické sloučeniny, které mají nízkou afinitu k jílu. Avšak jakmile se povrch jílu pokryje

těmito sloučeninami, snadněji se na povrch jílu adsorbují jiné organické molekuly. Tento jev se nazývá „kooperativní adsorpce“ a je pozorován u povrchově aktivních látek [116, 122].

1.4 Polymery s inkorporovanými BAL

Kompozitní polymery obsahující plniva je možno zpracovat metodami jako jsou např. tváření, lisování, vstřikování či vytlačování. Tomuto kroku předchází již zmíněná imobilizace složek EO na adsorbující materiál, sloužící k ochraně před evaporací a degradací [14]. Složky EO mohou smáčet povrch plniva nebo vniknout do jeho pórů, přičemž dochází ke snížení tenze par, což následně usnadňuje plnění zařízení pro zpracování polymeru. A jelikož tento efekt probíhá hlavně na povrchu plniva, jsou preferovány materiály s vysokým poměrem plochy povrchu k objemu. Tímto způsobem může být i snížen obsah plniva v polymerní matici [99].

Plniva jsou do polymerních materiálů běžně přidávána z nejrůznějších důvodů. Oxidy kovů, soli, zeolity či silikáty jsou používány pro modifikaci funkčních vlastností polymerů, kde zlepšují jejich mechanické vlastnosti. V současnosti se hojně využívají smektitové jíly (silikáty) jako je montmorillonit a hektorit nebo syntetická slída, které zlepšují bariérové vlastnosti a tepelnou odolnost kompozitu. Mezi další velmi využívaná plniva patří také TC a WF, která mimo jiné i významně snižují výslednou cenu produktu [99].

1.4.1 Přehled výzkumů zabývajících se inkorporací EO popř. jejich složek do matrice LDPE

Studiem PE filmů potažených tenkou antimikrobiální vrstvou tvořenou halozitovými nanotrubičkami s obsahem účinné látky karvakrolu se zabývali Unal a kol. Antimikrobiální povlaky v tenkých vrstvách výrazně redukovaly životaschopnost potravinového patogenu *Aeromonas hydrophilia* až o 85 % a dále počet aerobních bakterií na povrchu kuřecího masa až o 48 % [123].

Ve studii publikované Suppakulem a kol. byly připraveny fólie na bázi LDPE obsahující LIN nebo ALY. Nejprve byl připraven masterbatch ethylenvinylacetátového (EVA) prášku s uvedenými BAL, který byl posléze zamíchán společně s LDPE ve vytlačovacím stroji. Obě BAL si i po tepelném zpracování do matrice polymeru udržely svoji antimikrobiální aktivitu, která byla v případě fólií s ALY vyšší než u fólií s obsahem LIN. Sensorické hodnocení potravin zabalené v připravených fóliích nepotvrdilo významné ovlivnění jejich organoleptických vlastností ani po šesti týdnech skladování [40].

V navazující studii Suppakula a kol. byla sledována difúze LIN a ALY z připravených LDPE filmů po ponoření do isooktanu, který se používá jako simulant tučných potravin. Kinetika uvolňování LIN a ALY vykazovala při

nejnižší sledované teplotě (4 °C) nefickovské chování. Při zvýšení teploty docházelo ke zvýšení difúzního koeficientu. Bylo rovněž zjištěno, že migrace LIN je vyšší než migrace ALY [124].

Úbytek LIN a ALY inkorporovaných do matrice lineárního nízkohustotního polyethylenu (LLDPE) v průběhu skladování byl zkoumán v dalším výzkumu Suppakula a kol. Byla zde použita odlišná příprava fólií, která spočívala v rozpuštění LIN a ALY v isooktanu a jejich následné imobilizaci na rozdrčené LLDPE. Takto připravený masterbatch byl následně smíchán s LLDPE peletami ve vytlačovacím stroji. U antimikrobiálních filmů byl pozorován úbytek BAL, přičemž nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v jejich antimikrobiální aktivitě proti *Escherichia coli* na začátku a po roce skladování při pokojové teplotě. Byla připravena také série vzorků LDPE-EVA obsahující LIN a ALY, které byly skladovány při teplotě 25 °C a 35 °C. U těchto vzorků byla v určitých intervalech provedena kvantitativní analýza LIN a ALY v závislosti na čase. U filmů LDPE-EVA se množství BAL postupem času pozvolna snižovalo, nicméně antimikrobiální aktivita rovněž zůstala zachována [125].

Stejný způsob přípravy filmů na bázi LDPE-EVA byl použit také ve studii publikované Wattananawinratem a kol., kde jako BAL byly použity EO hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), bazalky (*Ocimum basilicum*) a skořice (*Cinnamomum verum*). Filmy s obsahem EO skořice vykazovaly z použitých EO nejvyšší antimikrobiální účinnost proti růstu *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, ačkoliv u této BAL byla zaznamenána její nižší výsledná koncentrace v matrici polymeru. Rovněž byla testována antimikrobiální aktivita připravených fólií, které byly použity jako obaly pro rajčata. Po uplynutí 2 měsíců zde bylo potvrzeno zpomalení růstu MO [126].

Podobný postup přípravy antimikrobiálních fólií popsali také Herath a kol. a Mistry a kol., kteří studovali možnost přidání polyethylenglykolu (PEG) k matrici LDPE a LDPE/EVA za účelem vyšší retence BAL. V případě vzorků LDPE/PEG nedošlo ke zvýšení retence BAL z důvodu špatné interakce PEG s LDPE matricí. Avšak v případě, kdy byl použit EVA, se interakce PEG s LDPE zvýšila, a tudíž došlo i ke zvýšení koncentrace (o 8 hm. %) thymolu a karvakrolu ve výsledném kompozitu ve srovnání se vzorky LDPE/EVA bez obsahu PEG [127, 128].

V rámci výzkumu Diase a kol. byl vyvinut aktivní film na bázi LDPE s inkorporovaným citronovým EO, za účelem jeho využití pro balení sušenek. Výsledky mechanických vlastností ukázaly snížení pevnosti v tahu i hodnotu prodloužení při přetržení v důsledku inkorporace EO. Dále bylo potvrzeno, že přítomnost EO neovlivňuje propustnost fólií pro vodní páru a ani sensorické hodnocení nepoukázalo na významnější ovlivnění organoleptických vlastností [129].

Využitím aktivních složek EO (karvakrol, eugenol a thymol) za účelem jejich naroubování na montmorillonitové a halozitové nanoplňiva pomocí povrchově aktivního činidla Tween 80 se zabývala studie Tornuka a kol. Nanokompozitní filmy na bázi LLDPE byly připraveny pomocí extruzního vyfukování. Bylo potvrzeno, že aktivní nanokompozitní obal vykazuje antibakteriální aktivitu proti růstu *Escherichia coli* a může být využit k prodloužení trvanlivosti čerstvého i zpracovaného masa [130].

Ve výzkumu Krepkera a kol. byla popsána příprava antimikrobiálních vícevrstvých filmů na bázi LDPE s obsahem karvakrolu. Proces mikrovrstvení byl použit k výrobě filmů až s 65 střídajícími se vrstvami LDPE-karvakrol a kopolymeru ethylenvinylalkoholu (EVOH). Byly také připraveny fólie s mezikrokem imobilizace karvakrolu na halozitové nanotrubičky a následné inkorporace do matrice LDPE pomocí vytlačovacího stroje. U obou výsledných filmů byla zjištěna vysoká koncentrace BAL i navzdory vysokým teplotám zpracování, přičemž vícevrstvé filmy vykazovaly lepší difuzivitu ve srovnání s filmy obsahujícími nanotrubičky halozitu. Oba filmy rovněž vykazovaly vysokou antimikrobiální aktivitu proti růstu *Escherichia coli* a *Alternaria alternata* v *in vitro* testech a také při jejich použití v praxi (balení cherry rajčat) [131].

Karvakrol a trans-cinnamaldehyd byly použity také ve studii Canalese a kol. Ke komplexaci karvakrolu a trans-cinnamaldehydu s β -cyklodextrinem byla úspěšně aplikována metoda koprecipitace s 90% účinností zapouzdření BAL. Enkapsulované BAL byly následně zakomponovány do matrice LDPE. Testování mechanických vlastností ukázalo mírný pokles Youngova modulu a meze kluzu oproti čistému LDPE. U připravených filmů byla potvrzena antifungicidní aktivita proti *Botrytis Cinerea* [132].

Zcela odlišný způsob inkorporace BAL do matrice LDPE a polystyrenu (PS) byl použit ve studii publikované Diazem a kol. Matrice LDPE a PS byly funkcionalizovány pomocí EO mexického oregana (*Lippia berlandieri*). Polymery byly ozařovány UV zářením po dobu 60 minut pro lepší přilnavost EO díky tvorbě polárních skupin (COOH, OH nebo COO-) na jejich povrchu. Pomocí turbidimetrické metody byla prokázána účinnost kompozitů proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím, která rostla se zvyšující se koncentrací EO v polymeru. Rovněž byl pozorován cytotoxický účinek u obou vzorků s koncentracemi EO 1,5 obj. % [133].

Ve další studii byla provedena analýza mechanismu desorpce EO citronu (*Citrus limon*) v PP fólii. Filmy byly připraveny imobilizací EO na TC (nukleační činidlo) a následnou inkorporací do semikrystalického PP pomocí vyfukování. Při desorpční analýze byl pozorován vliv různých parametrů, např. morfologie a povrchová chemie TC, velikost částic a jejich distribuce, přítomnost nečistot,

koncentrace TC v kompozitech či vlastnosti EO. Byl rovněž pozorován vliv přítomnosti TC na morfologické a krystalické změny PP matrice. U PP bez obsahu TC byla pozorována vyšší desorpční rychlost EO než u kompozitů s 5 hm. % talku ale nižší než u kompozitů s obsahem 1 hm. % TC. To bylo pravděpodobně způsobeno v důsledku změn krystalinity dané přítomností nanočástic a procesem přípravy filmu [134].

Kim a kol. provedli výzkum zaměřený na přípravu fólií obsahující enkapsulovaný cinnamaldehyd za účelem ochrany potravin před napadením hmyzem. Cinnamaldehyd byl enkapsulován arabskou gumou, izolátem syrovátkové bílkoviny/maltodextrinem nebo polyvinylalkoholem. LDPE film byl následně potažen PP roztokem obsahujícím mikrokapsle. Hodnoty enkapsulační účinnosti se pohybovaly ve všech třech případech okolo 90 % a byla rovněž potvrzena insekticidní účinnost fólií. Zároveň bylo potvrzeno, že enkapsulace BAL snižovala rychlost jejich uvolňování [135].

1.4.2 Přehled výzkumů zabývajících se enkapsulací EO popř. jejich složek do matrice PLA a PMMA

Martins a kol. se zabývali přípravou mikrokapslí na bázi PLA s obsahem složek EO tymiánu (*Thymus vulgaris*), které by měly využití v kosmetickém průmyslu. Enkapsulace thymolu a p-cymenu byla provedena koacervací s použitím různých povrchově aktivních látek s rozdílnou hydrofobicitou. Bylo zjištěno, že účinnost enkapsulace je závislá na hydrofobním charakteru použité povrchově aktivní látky. Velikost, tvar a stabilita částic byla ovlivněna podmínkami koacervačního procesu a použitím surfaktantu. Vyšší enkapsulační účinnost byla pozorována u apolárních složek tymiánového EO, přičemž nejvyšší enkapsulační účinnost (65 %) vykazovaly vzorky, ve kterých byl použit surfaktant Tergitol 15-S-9 [1].

V navazující studii bylo zkoumáno uvolňování thymolu a p-cymenu z matrice PLA. Výsledky ukázaly, že uvolňování obou BAL je nejrychlejší v první hodině a v následujících dnech je téměř konstantní. V případě thymolu byla v průběhu pěti dní pozorována pomalejší rychlost difúze v porovnání s p-cymenem. Uvolňování BAL z PLA je řízeno difúzními mechanismy a výsledky potvrdily shodu experimentálního měření s matematickým modelem [72].

Ve studii Liakose a kol. byly pomocí nanoprecipitační metody připraveny nanokapsle PLA obsahující EO citronové trávy (*Cymbopogon citratus*), které by nacházely uplatnění ve zdravotnictví. Připravené nanokapsle vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti všem testovaným MO (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*) [136].

Teeka a kol. připravili mikrokapsle PMMA s EO jasmínu (*Jasminum*). Jako stabilizátor byl použit polyvinylalkohol. Byl studován vliv hmotnostního poměru

PMMA:EO na přípravu polymerní mikrokapsle. Nejvíce efektivní poměr PMMA:EO byl zaznamenán v případě 2:1, kdy byly získány sférické mikrokapsle s hladkým povrchem a vysokou enkapsulační účinností (72 %) [137].

Existuje také několik studií zabývajících se přípravou polymerních směsí PLA/PMMA. Směs PLA/PMMA vykazuje dobrou synergii, částečnou rozložitelnost a vylepšené vlastnosti zajímavé pro širokou škálu aplikací např. tkáňové inženýrství [138–140]. Výsledné vlastnosti však velmi ovlivňuje metoda zpracování, krystalinita PLA a složení směsi [88, 94, 138–143].

1.5 Použití bioaktivních polymerních systémů (BPS)

Je všeobecně známo, že EO a jejich složky vykazují širokou škálu biologických vlastností. Avšak jak již bylo zmíněno výše, jejich vysoká těkavost, hydrofobicita a náchylnost k oxidaci často znemožňovala jejich praktickou aplikaci. S příchodem nových technik, jako je např. enkapsulace, se jejich aplikovatelnost rozšířila do mnoha průmyslových odvětví. Níže jsou uvedeny oblasti, kde mohou EO a jejich složky inkorporované do polymerní matrice nacházet uplatnění pro svou biologickou aktivitu.

1.5.1 BPS v potravinářském průmyslu

Mikrobiální kontaminace představuje v potravinářském průmyslu závažný problém. Osídlení potravin či obalového materiálu patogenními MO znamená pro člověka významné ohrožení jeho zdraví. Proto se výzkum zaměřuje na přípravu aktivních obalových systémů, které mají schopnost zvýšit kvalitu zabaleného produktu, prodloužit jeho životnost a zajistit jeho bezpečnost [7]. Jedním z příkladů aktivních obalových systémů jsou antimikrobiální obalové systémy, ve kterých je antimikrobiální látka zabudovaná v matici polymeru z důvodu potlačení nebo zastavení růstu MO (bakterie, kvasinky i plísně) v zabaleném produktu [2, 51]. EO a jejich složky působí proti široké škále bakterií kontaminujících potraviny např. *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enterica* [144].

Aktivní obalový materiál s inkorporovanými EO popř. jejich složkami chrání zabalený produkt také před oxidací živin. Antioxidační aktivní obal může buď uvolňovat antioxidanty do produktu nebo absorbovat kyslík a jiné sloučeniny z potravin a jejího okolí [145]. Oxidace lipidů způsobuje kažení potravin, omezuje jejich trvanlivost a snižuje jejich kvalitu. Mezi potraviny, citlivé vůči oxidaci, se řadí hlavně masné výrobky, u kterých má oxidace za následek změnu chuti, vůně a barvy. Proces oxidace u jedlých olejů nejen že vyvolává nepříjemnou vůni a chuť, ale také způsobuje produkci toxických sloučenin [146]. V důsledku toho je použití antioxidantů nezbytné pro prevenci oxidace složek potravin. V posledních letech řada studií vyzdvihuje účinnost EO a jejich složek

jako přírodních antioxidantů, což představuje velký potenciál pro jejich využití v potravinářském průmyslu [30].

Avšak pro potravinářské aplikace může být použití EO a jejich složek poněkud problematické. Tyto látky se v potravinovém systému mohou vázat na lipidy, bílkoviny či sacharidy, což může i při nízké dávce negativně ovlivnit organoleptické vlastnosti potraviny (barva, chuť a vůně) [147]. Metody enkapsulace BAL představují účinnou možnost zajištění jejich fyzikální stability a ochrany BAL před nežádoucími interakcemi se složkami potravin a také před negativními vlivy okolního prostředí (kyslík, světlo, vlhkost, pH) [7].

1.5.2 BPS pro textilní a obuvnické aplikace

Z důvodu stále větší rezistence patogenních MO vůči antibiotikům se v posledních letech část výzkumu zaměřuje na přípravu funkčních textilií s antimikrobiální aktivitou, které mohou být aplikovatelné např. v domácích textiliích (koberce a záclony) a výrobcích osobní hygieny. Existuje mnoho metod k dosažení antimikrobiálních vlastností textilií a jednou z nich je použití mikročástic s aktivní látkou.

Karagonlu a kol. připravili mikrokapsle s obsahem EO tymiánu (*Thymus vulgaris*), které byly následně inkorporovány do netkaných textilií za účelem dosažení její antimikrobiální aktivity. Výsledky prokázaly antimikrobiální účinnost i při nízkých koncentracích BAL. Výsledné textilie by mohly být využity např. pro výrobu obvazů nebo jiných textilií sloužících k překrytí ran [148]. Velký význam v textilním průmyslu mají také parfémované textilie, které si dokáží udržet vůni po dlouhou dobu a díky obsahu enkapsulované BAL odolávají chemickému čištění a praní. Příkladem je studie, v rámci které byla připravena parfémovaná textilie s mikroenkapsulovaným EO levandule (*Lavandula angustifolia*) [149].

Při výrobě funkčních textilií může být využita také akaricidní aktivita EO popř. jejich složek. Tyto textilie jsou pak odolné vůči roztočům, kteří negativně působí na zdraví člověka z důvodu rozvoje astmatu, atopické dermatitidy či jiných alergií. EO a jejich složky jsou zde využity jako náhrada syntetických akaricidů, které mohou být pro člověka neurotoxické [150]. Mikrokapsle s obsahem EO a jejich složek aplikované do bavlněných či jiných textilií mohou poskytovat rovněž insekticidní a repelentní aktivitu a nahradit tak syntetické repelenty jako je N, N-diethyl-meta-toluamide, které negativně ovlivňují lidské zdraví. Ve studii publikované Specosem a kol. byly mikrokapsle s obsahem EO z citronely (*Cymbopogon nardus*) aplikovány na bavlněné textilie k dosažení repelentní aktivity. Tyto textilie vykazovaly vysokou a dlouhotrvající ochranu před hmyzem ve srovnání s textiliemi, které byly ošetřeny nástřikem neenkapsulovaným

EO [151]. Dalším příkladem může také být repelentní zemědělská textilie, která chrání rostliny před poškozením způsobeným králíky či vysokou zvěří [151].

Mikrokapsle s EO popř. jejich složkami se také využívají pro obuvnické aplikace (např. vložky do bot z netkaného textilu, které mohou uvolňovat aktivní látku během chůze). Sanchez-Navarro a kol. se zabývali studiem mikrokapslí s obsahem EO čajovníku australského (*Melaleuca alternifolia*). Enkapsulační proces zde působil jako ochrana EO před vlhkostí, světlem, kyslíkem a také pro kontrolované uvolňování aktivní látky. Začleněním enkapsulovaných EO do usní a jiných materiálů sloužících k výrobě obuvi bylo možno dosáhnout antimikrobiální aktivity proti MO vyskytujících se na pokožce nohou a obnošené obuvi [152].

1.5.3 BPS v zemědělství

Masivní poškození plodin škůdci negativně ovlivňuje zemědělskou produkci, snižuje kvalitu potravin a způsobuje značné ekonomické ztráty pro zemědělce. Rozklad je jedním ze zásadních faktorů, který ovlivňuje skladovatelnost ovoce a zeleniny po sklizni a rovněž odpovídá za významné finanční ztráty. Z tohoto důvodu se fungicidy a pesticidy běžně využívají k posklizňovému ošetření zemědělských produktů. Avšak kvůli jejich negativním dopadům na životní prostředí a lidské zdraví, a rovněž z důvodu rozvoje rezistence patogenů vůči fungicidům je nutné hledat přírodní alternativy. Možným řešením je aplikace enkapsulovaných EO popř. jejich složek, které vykazují např. fungicidní, insekticidní či pesticidní vlastnosti. Kupaei a kol. prokázali, že posklizňové ošetření plodů manga enkapsulovaným EO tymiánu (*Thymus vulgaris*) a rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) zabránily jeho rozkladu, prodloužilo jeho skladovatelnost a zachovalo jeho přirozené vlastnosti [153].

Dalším problémem v zemědělství, který způsobuje nežádoucí změny kvality produktů během manipulace, zpracování a skladování, je enzymatické hnědnutí zeleniny. Pro zabránění tohoto jevu je nutná inaktivace enzymů např. pomocí BAL. Kupaei se ve své studii zabýval přípravou systémů s enkapsulovaným EO rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) za účelem redukce peroxidů a polyfenoloxidázy (enzymy zodpovědné za enzymatické hnědnutí zeleniny). *In vivo* i *in vitro* testy byla potvrzena antioxidační aktivita připravených systémů [154].

V posledních letech je vývoj zaměřený i na využití enkapsulovaného EO a jejich složek s insekticidní aktivitou pro potravinářské obaly, které kontrolovaně uvolňují aktivní látku a jsou tak odolné vůči napadení hmyzem [150]. Ve studii publikované Chungem a kol. bylo potvrzeno, že mikrokapsle obsahující EO tymiánu (*Thymus vulgaris*) vykazují vysokou repelentní účinnost (cca 90 %) po dobu 4 týdnů [155]. V jiné studii byly připraveny filmy obsahující

enkapsulovaný EO skořice (*Cinnamomum verum*) za účelem ochrany potravin (sušenek) před hmyzem. Byla zde potvrzena insekticidní aktivita EO skořice proti larvám mýry [135].

1.5.4 BPS v kosmetickém průmyslu

Mikroenkapsulace je také důležitým nástrojem pro kosmetický průmysl. Poskytuje jedinečný systém nosičů účinných látek, umožňující jejich kontrolované a cílené uvolňování, jejich izolaci a ochranu před vnějšími vlivy, zlepšení stability a účinnosti a také maskování nežádoucích vlastností účinné látky. Příklady využití enkapsulovaných EO popř. jejich složek lze nalézt při výrobě čistících a pracích prostředků, sprchových a koupelových gelů, krémů, vlasových přípravků, parfémů, mýdel, opalovacích krémů, zubních past, apod. Mikroenkapsulace umožňuje výrobu inovativních produktů a produktů s vysokou přidanou hodnotou v reakci na lidské potřeby a přání [156].

V minulosti využíval kosmetický průmysl EO a jejich složky převážně jako látku dodávající vůni výrobku. V dnešní době jsou však v kosmetickém průmyslu studovány a využívány jejich další vlastnosti. Mnoho studií potvrdilo možnost jejich použití jako konzervační přísady v kosmetice díky jejich antimikrobiálním vlastnostem proti široké škále MO [21]. EO a jejich složky vykazují také antioxidační aktivitu, která se v kosmetických produktech využívá za účelem prodloužení jejich trvanlivosti nebo ochrany pokožky před volnými radikály odpovědnými za stárnutí pleti (změna barvy, ztráta pružnosti a tvorba vrásek) [157, 158].

1.5.5 BPS ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu

Povrchy všech zdravotnických prostředků poskytují vhodné prostředí pro růst MO, což je hlavní příčinou vzniku nozokomiálních infekcí (sekundárních infekcí získaných ve spojitosti s léčebným postupem). To představuje významné riziko pro pacienty a následně i zvýšené ekonomické náklady na léčbu. Vzhledem k tomu, že se polymery hojně používají, například jako implantáty, nosiče léku, ochranné obaly a zdravotnické materiály, je třeba tento nedostatek eliminovat nebo alespoň účinně redukovat. EO a jejich složky mohou být využívány pro inhibici adheze MO a tvorby biofilmu na povrchu invazivních zdravotnických prostředků. Příkladem je výzkum provedený Chifiriucem a kol., kde bylo prokázáno, že EO rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) společně s nanočásticemi magnetitu silně inhiboval tvorbu biofilmu testovaných MO *Candida albicans* a *Candida tropicalis* na povrchu katetru [159].

Další příklad farmaceutického využití je prezentován ve studii, kde byly použity mikrokapsle s obsahem EO citronely (*Cymbopogon nardus*) do repelentních mastí proti komárům. Zejména v tropických oblastech existuje

vysoké riziko nemocí přenášenými komáry, včetně malárie. Mikroenkapsulace zde snížila rychlost odpařování EO a zároveň prodloužila dobu jeho působení [160].

V oblasti moderní biotechnologie představují systémy dávkování léčiv a jiných aktivních látek a mikroenkapsulace velký pokrok. Zaměření na vývoj transdermálního systému dávkování léčiv přináší novou naději pro nahrazení současné vysoce rizikové intravenózní aplikace a dramaticky snižuje nežádoucí vedlejší účinky léků a účinných látek [161]. Např. v lécích sloužících pro léčbu orofaciální bolesti mohou být EO popř. jejich složky využity pro své protizánětlivé a analgetické účinky [162].

SHRNUTÍ SOUČASNÉHO STAVU

Na základě dostupných literárních pramenů lze konstatovat, že je zde potřeba společnosti směřující k vývoji nových polymerních materiálů s přidanými funkčními vlastnostmi, mezi které patří také sensoricky přijatelné charakteristiky finálních výrobků, ale především jejich bezpečnost z pohledu ochrany před nežádoucím mikrobiálním osídlováním polymerních povrchů. BAL na bázi EO splňují výše uvedená kritéria a zároveň jsou environmentálně přijatelné vzhledem k jejich přírodnímu původu.

Významnou překážkou omezující širší uplatnění EO a jejich složek pro modifikaci polymerů je jejich materiálová nekompatibilita s většinou používaných polymerních matric, která se primárně projevuje při zpracovatelských procesech, které většinou probíhají za teplot převyšujících bod varu EO, popř. jejich složek. Jejich další nevýhodou je také nízká odolnost proti podmínkám vnějšího okolí.

Mezi dostupnými složkami EO se jako perspektivní jeví LIN, ANE a ALY, které se přirozeně vyskytují v mnoha rostlinách, kořenech či ovoci. Řadou studií bylo potvrzeno jejich široké spektrum biologických účinků především antimikrobiálních, antioxidačních, insekticidních či protizánětlivých. Polymerní matrice modifikované vybranými BAL pak mohou být široce aplikovatelné např. v potravinářském, kosmetickém, textilním a zemědělském průmyslu nebo při produkci zdravotnických prostředků. Mezi zástupci syntetických polymerů je pro výzkumné účely relevantní LDPE, a to díky svému rozsáhlému průmyslovému využití, dostupnosti a výhodným fyzikálně-chemickým vlastnostem. Překonání problému s těkavostí zvolených BAL je možno řešit začleněním mezikroku adsorpce BAL na běžně dostupná polymerní plniva, která navíc mohou zlepšit výsledné vlastnosti polymerního kompozitu, a případně i jeho cenovou dostupnost.

Další oblastí výzkumu je začlenění BAL do procesu přípravy mikročásticových polymerních systémů. Metody enkapsulace byly vyvinuty za účelem zapouzdření aktivní látky do formy částice pro jejich ochranu před externími vlivy a za účelem kontroly kinetiky jejich uvolňování do prostředí. Mezi perspektivní materiály z hlediska enkapsulace lze zařadit PLA a PMMA hlavně z důvodu jejich biorozložitelnosti (PLA) a biokompatibility (PLA, PMMA), čímž se rozšiřuje možnost i pro uplatnění ve zdravotnictví.

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Na základě získaných poznatků z literárních pramenů byly definovány následující cíle disertační práce.

Primárním cílem této práce je připravit a charakterizovat materiály a procesy pro efektivní modifikaci vybraných polymerů složkami EO pomocí konvenčních zpracovatelských technik.

Pro dosažení tohoto základního cíle byly vydefinovány následující dílčí cíle:

- vývoj a optimalizace metodiky analytického stanovení BAL v polymerním systému,
- optimalizace imobilizace BAL na pevné nosiče,
- inkorporace BAL imobilizovaných na pevných nosičích do matrice polymeru, enkapsulace BAL do PLA, PMMA a PLA/PMMA za vzniku mikrosfér,
- vývoj metodiky pro studium uvolňování BAL z polymerních mikrosfér,
- stanovení biologické aktivity připravených polymerních systémů,
- stanovení vlivu modifikace polymerů zvolenými BAL na výsledné vlastnosti systémů (mechanické, morfologické, termální apod.).

Pro splnění výše stanovených cílů jsou experimentální aktivity rozděleny do dvou okruhů:

- I. Biologicky aktivní polymerní systémy na bázi LDPE s inkorporovanými BAL přírodního původu
- II. Enkapsulace BAL přírodního původu do matrice PLA, PMMA a jejich směsí

Výstupem řešení každého z výše uvedených okruhů je souhrnná práce publikovaná v odborném časopise.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Praktická část disertační práce byla rozdělena do dvou tématických okruhů. Cílem první části praktické práce byl výzkum antibakteriální modifikace polymerů s využitím BAL přírodního původu. Za tímto účelem byly využity složky EO, které vykazují četné biologické účinky. Začlenění těchto látek do matrice LDPE bylo uskutečněno termoplastickým způsobem. Bylo však nutné eliminovat úbytek složek EO způsobený jejich vysokou těkavostí, a proto byly tyto BAL imobilizovány na pevné nosiče, které jsou využívány jako polymerní plniva. Stěžejní částí tohoto výzkumu bylo vytvořit a optimalizovat metodu kvantitativního stanovení BAL jak na pevných nosičích, tak i po jejich inkorporaci do polymerní matrice. Hlavní důraz byl přitom kladen na studium antibakteriální aktivity připravených kompozitů proti patogenním grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Dále byl studován vliv přítomnosti antibakteriální plniva na mechanické vlastnosti. Interakce pevných nosičů a polymerní matrice byla pozorována pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Tato práce navrhuje aktivní antibakteriální filmy vhodné zejména pro potravinářské aplikace.

Druhý okruh praktické části disertační práce je zaměřen na mikroenkapsulaci složek EO do matrice PLA a PMMA a jejich směsí. Mikroenkapsulace zde slouží k ochraně BAL před ztrátami způsobenými faktory vnějšího prostředí. Pro přípravu mikrosfér byla použita metoda odpařování rozpouštědla. Vzniklé mikrosféry byly charakterizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Mísitelnost zvolených polymerních materiálů byla hodnocena pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie. Byla zde rovněž vyvinuta metoda kvantitativní analýzy složek EO pro stanovení účinnosti enkapsulace, která byla zároveň využita i v rámci studie uvolňování BAL z připravených mikrosfér. Nedílnou součástí výzkumu bylo i testování antibakteriální aktivity proti zástupcům grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Statistické vyhodnocení dat

Naměřené výsledky efektivity antibakteriální aktivity, kvantitativní analýzy BAL na pevných nosičích i v polymerní matrici, velikosti mikrosfér, účinnosti enkapsulačního procesu a uvolňování BAL z připravených mikrosfér byly vyhodnoceny ze tří nezávislých měření, a jsou uvedeny jako průměrná hodnota 2.1 se směrodatnou odchylkou (2.2), stejně jako výsledky mechanických vlastností, které byly dle normy ČSN EN ISO 527 měřeny desetkrát.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.1)$$

kde: n je počet měření, x_i jsou naměřené hodnoty

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.2)$$

kde: N je počet vzorků, x_i jsou naměřené hodnoty, \bar{x} je aritmetický průměr

Kalibrační křivky potřebné při chromatografických analýzách byly statisticky vyhodnoceny pomocí lineárních regresí naměřených dat.

2.1 Polymerní kompozity na bázi LDPE s BAL imobilizovanými na pevných nosičích

Polymerní materiály se díky své relativně snadné zpracovatelnosti, recyklovatelnosti a možnosti dosažení požadovaných mechanických a chemických vlastností staly rovnocennou náhradou mnoha materiálů v nejrůznějších průmyslových oblastech. S jejich velkou rozšířeností však rostou i nároky na jejich kvalitu, bezpečnost, ale také přidanou hodnotu. V posledních několika letech nabývají na popularitě polymerní materiály, které vykazují určitou biologickou aktivitou. Tyto biologicky aktivní polymerní systémy mohou např. účinně bojovat proti mikrobiální kontaminaci, a to zejména proti patogenním mikroorganismům [163–165]. Mnohé studie zdůraznily velký potenciál využití biologicky aktivních polymerních systémů, např. při balení potravin, ve farmaceutickém nebo kosmetickém průmyslu [166–168]. Při balení potravin může biologicky aktivní polymerní systém zpomalit nebo zastavit růst MO a tím zajistit bezpečnost, kvalitu a prodloužit trvanlivost balených potravin [169].

Možnosti, jak získat biologicky aktivní polymerní systém, zahrnují především přímou inkorporaci BAL do polymerní matrice, nanášení BAL na povrch polymerního materiálu, imobilizaci BAL k polymeru pomocí chemických vazeb anebo využití polymeru, který sám o sobě vykazuje antimikrobiální aktivitu [170–174].

Mezi velmi využívaný polymerní materiál, zejména v potravinářských nebo zemědělských aplikacích, patří LDPE, a to díky jeho nízké ceně, nízké hmotnosti, flexibilitě, houževnatosti, chemické odolnosti a zdravotní nezávadnosti [175, 176]. Pro jeho modifikaci mohou být použity syntetické BAL (organické nebo anorganické kyseliny, kovy, alkoholy, amonné sloučeniny, aminy), anebo přírodní BAL [177, 178]. Nicméně rostoucí obavy z možných nežádoucích účinků syntetických látek na zdraví člověka vedou k zaměření se výzkumu na přírodní BAL. V posledních několika letech byl zaznamenán zvýšený zájem o využívání EO, těkavých aromatických látek extrahovaných z rostlin, které vykazují určitou biologickou aktivitu [179, 180]. Nevýhodou je

však jejich nekonzistentní složení, pramenící z rozdílů v období sklizně, v podmínkách pěstování a v odlišných zeměpisných oblastech [181, 182]. Vhodným řešením tohoto problému se jeví využití izolované složky EO. LIN, ALY a ANE se vyskytují v mnoha rostlinách, kořenech či ovoci, a vykazují četné biologické účinky, a to především antimikrobiální a antioxidační [183–189].

Hlavní nevýhoda těchto látek spočívá v jejich značné těkavosti, která představuje problém při jejich termoplastické inkorporaci do polymerních matric probíhající za vysokých teplot. Bylo provedeno mnoho studií zabývajících se přímým zabudováním EO a jejich složek do polymeru s cílem dosažení jeho antimikrobiální aktivity [112, 190–195]. Ve většině případů je tato aktivita hodnocena ihned po přípravě filmu [129, 192, 195, 196]. Pro určité aplikace je však žádoucí kontrolovaná a dlouhodobá antimikrobiální aktivita.

Řešení lze zde nalézt v imobilizaci složek EO na organická či anorganická polymerní plniva, která navíc zlepšují výsledné mechanické i tepelné vlastnosti kompozitu [197–199]. Dřevní moučka (WF) i mastek (TC) jsou běžně používanými polymerními plnivy. WF snižuje cenové náklady a poskytuje materiálu specifické vlastnosti, jako je nízká hustota nebo vysoká specifická tuhost [200, 201]. TC má zase pozitivní vliv na zpracovatelnost, pevnost, rozměrovou stabilitu i chemickou odolnost [202, 203]. Při balení potravin jsou důležitým faktorem bariérové vlastnosti obalu, které mají přímý dopad na skladovatelnost potravin obsažených uvnitř. TC díky své struktuře v určité míře redukuje přenos vodních par a kyslíku [203]. Hlavním účelem imobilizace složek EO na polymerní plniva je však jejich ochrana před vypařováním a působením vysokých teplot.

Cílem této studie byla příprava biologicky aktivního polymerního systému na bázi LDPE. Jako BAL byly použity složky EO (LIN, ALY, ANE), které z důvodu jejich těkavosti byly imobilizovány na pevné nosiče (WF, TC, MS). Předmětem tohoto výzkumu bylo popsat vzájemné vztahy mezi BAL, pevnými nosiči a výslednými antibakteriálními vlastnostmi kompozitu. Nedílnou součástí práce bylo i studium vlivu přítomnosti pevného nosiče na mechanické vlastnosti a morfologii výsledného kompozitu. Důraz byl kladen také na kvantitativní analýzu BAL pomocí chromatografických metod.

2.1.1 Použité materiály pro přípravu vzorků kompozitů

Pro tento okruh experimentální práce byl použit LDPE (BRALEN RB 03-23), který byl dodán firmou SLOVNAFT, a.s. (Bratislava, Slovenská republika). Dodavatelem složek EO: LIN (97%, CAS: 78-70-6), ALY (98%, CAS: 140-67-0) a ANE (99%, CAS: 4180-23-8) byla Sigma Aldrich. TC ve farmaceutické kvalitě (CAS: 14807-96-6) byl pořízen od firmy IPL Lukeš (Uherský Brod, Česká republika). Molekulová síta (MS) (4 Å, CAS: 70955-01-0)

pocházela rovněž od firmy Sigma Aldrich. WF (velikost částic 75-126 μm) byla získána z vlastních zdrojů.

Bakteriální kmeny, používané při mikrobiologické analýze, *Staphylococcus aureus* (4516) a *Escherichia coli* (4517), byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů (Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika). Použitá mikrobiologická média (Nutrient Broth w/w 1% Peptone, Plate Count Agar, Soybean Casein Digest Broth with Lecitin and Tween 80 (SCDLP)) byla dodána firmou HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., (Indie).

2.1.2 Příprava vzorků polymerních kompozitů

Pevné nosiče (TC, WF, MS) byly nejprve aktivovány za izotermických podmínek (TC při 220 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 16 hodin, MS při 300 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 16 hodin a WF při 40 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 4 hodin). BAL byly imobilizovány na pevné nosiče v poměru 1:1 za teploty 25 $^{\circ}\text{C}$, a následně odpařovány 24 hodin za různých teplot (LIN při 50 $^{\circ}\text{C}$, ALY při 50 $^{\circ}\text{C}$ a ANE 75 $^{\circ}\text{C}$).

Takto vzniklé aditivum bylo v různých koncentracích (5, 10, 15, 20 hm. %) termoplasticky zakomponováno do matrice LDPE za využití míchacího dvouválce (Labtech, Ltd., Thailand) po dobu 8 minut při teplotách válců 155 $^{\circ}\text{C}$ a 135 $^{\circ}\text{C}$. Výsledný produkt byl poté lisován pomocí manuálního lisu při teplotě 140 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut, a následně zchlazen při tlaku 10 MPa po dobu 5 minut. Výsledná tloušťka filmu činila cca 1 mm. Při tomto způsobu zpracování byly získány homogenní vzorky, které byly označeny následovně: LDPE/pevný nosič/BAL/koncentrace.

2.1.3 Použité metody pro charakterizaci připravených kompozitů

Morfologická analýza kompozitů

SEM patří mezi nedestruktivní zobrazovací metody, díky které je možno získat detailní zobrazení sledovaného vzorku. Svazek elektronů (v primárním svazku) řádkově snímá povrch vzorku a detekuje vybuzené signály (elektrony sekundárního svazku), které vznikají po dopadu elektronu z primárního svazku. Pomocí detektoru jsou zachytávány převážně sekundární elektrony o nízké energii vyražené z tenké povrchové vrstvy vzorku, nebo zpětně odražené a prošlé elektrony, které mají srovnatelnou energii s primárními elektrony [204].

Morfologická analýza připravených kompozitů byla provedena na skenovacím elektronovém mikroskopu SEM VEGAII LMU Tescan (Česká republika) při urychlovacím napětí 10 kV a za vysokého vakua. Vzorky pro SEM analýzu byly zlomeny pomocí kapalného dusíku a byl skenován jejich povrch v lomu.

Mechanické vlastnosti kompozitů

Tahová zkouška slouží k charakterizaci mechanických vlastností materiálu. Při tahové zkoušce je vzorek protahován ve směru své hlavní podélné osy konstantní rychlostí až do jeho porušení, anebo do okamžiku, kdy napětí v tahu (zatížení) nebo protažení (poměrné prodloužení) dosáhnou předem zvolené hodnoty. Je sledována závislost tahového napětí na deformaci vzorku [205].

Testování mechanických vlastností kompozitů (Youngův modul, pevnost v tahu a poměrné prodloužení při přetržení) bylo provedeno na trhacím stroji (M3505CT, Testometric Co. Ltd, Velká Británie) podle normy ČSN EN ISO 527 13 [205, 206]. Před samotnou analýzou byly vzorky kondicionovány při 23 °C a 50% relativní vlhkosti po dobu 88 hodin pro dosažení rovnovážného stavu [207]. Tahová zkouška poté probíhala při teplotě 23 °C. Rychlost deformace byla nastavena na 100 mm·min⁻¹. Každý vzorek byl měřen desetkrát, a výsledek je uveden jako průměrná hodnota.

Antibakteriální vlastnosti kompozitů

Stanovení antibakteriální aktivity probíhalo na základě normy ISO 22196: 2011 [208]. Antibakteriální aktivita byla hodnocena proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. Pro testování byly použity kompozity s 20 hm. % aditiva. Bakteriální suspenze byly připraveny v koncentracích 5,6·10⁶ CFU·ml⁻¹ (*Escherichia coli*) a 2,8·10⁷ CFU·ml⁻¹ (*Staphylococcus aureus*). Připravené vzorky kompozitů byly nastříhány na rozměr 2,5 x 2,5 cm a krycí fólie z PE na 2,0 x 2,0 cm. Od každého kompozitu bylo připraveno 6 vzorků. Po nanesení bakteriální suspenze na vzorky a přikrytí krycí fólií, byly vzorky inkubovány při teplotě 35 °C a 90% vlhkosti po dobu 24 hodin. Poté byla nanesená bakteriální suspenze ze vzorků spláchnuta roztokem SCDLP a roztok byl převeden do zkumavky, kde metodou ředění byl kultivačně stanoven počet životaschopných bakterií (CFU·ml⁻¹) po inkubaci při 35 °C a 48 hodinách. Počet přeživší kolonie tvořících jednotek N byl stanoven pomocí rovnice 2.3:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad (2.3)$$

kde: C je součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách, n_1 je počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění, n_2 je počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění, d je faktor prvního pro výpočet použitého ředění.

Výsledná antibakteriální aktivita připravených vzorků byla vypočítána z následující rovnice 2.4:

$$R_a = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (2.4)$$

kde: R_a je antibakteriální aktivita vzorku, U_0 je průměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií ($\text{buněk} \cdot \text{cm}^{-2}$) z neupravených vzorků bez antibakteriální úpravy ihned po inokulaci, U_t je průměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií ($\text{buněk} \cdot \text{cm}^{-2}$) sejmutých z neupravených vzorků bez antibakteriální úpravy 24 hodin po inokulaci, A_t je průměr dekadického logaritmu počtu životaschopných bakterií ($\text{buněk} \cdot \text{cm}^{-2}$) z neupravených vzorků s antimikrobiální úpravou po 24 hodinách.

Kvantitativní analýza BAL

Kvantitativní analýza LIN, ALY a ANE na pevných nosičích a ve výsledných kompozitech byla provedena jednak pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS), ale také metodou pyrolyzní plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (Py/GC/MS).

Plynová chromatografie je analytická metoda sloužící k separaci plynů a par těkavých kapalin a roztoků tuhých látek, které lze do plynného stavu převést. Při separaci využívá dvě heterogenní fáze, a to fázi mobilní (nosný plyn) a fázi stacionární (umístěna v koloně), mezi kterými dochází k opakovanému ustanovování rovnováhy [209].

Pro metodu GC/MS bylo nejprve nutno provést extrakci vzorků (5 g) v Soxhletově extraktoru ve 250 ml methanolu po dobu 18 hodin.

GC/MS analýza byla poté provedena na přístroji Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra device s využitím kapilární kolony SLB-5 MS (30 m \times 0.25 mm, vrstva filmu = 0.25 μm , Supelco). Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1,12 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota injektoru byla zvolena na 200 $^{\circ}\text{C}$ a injektované množství vzorku činilo 1 μl . Splitovací poměr byl nastaven na 1:100. Separace probíhala při teplotním programu začínajícím na teplotě 70 $^{\circ}\text{C}$ držené po dobu 1 minuty, poté se teplota zvyšovala rychlostí 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ až na konečnou teplotu 180 $^{\circ}\text{C}$ (drženo 7 minut). Teplota iontového zdroje byla nastavena na 200 $^{\circ}\text{C}$. Teplota převodníku do MS činila 300 $^{\circ}\text{C}$. Ionizace separovaných látek byla provedena pomocí elektronové ionizace s ionizační energií 70 eV a v režimu scan byla snímána odezva všech iontů v rozmezí $m/z = 35\text{--}350$. Identifikace sloučenin byla provedena na základě srovnání naměřených hmotnostních spekter s knihovnamí spekter.

Metoda pyrolyzní plynové chromatografie s hmotnostní detekcí byla využita pro stanovení BAL ve vzorcích, které nebyly podrobeny extrakci. Výsledky této metody sloužily pro srovnání s metodou GC/MS, u které bylo nutno vzorek extrahovat. Ačkoli je metoda Soxhletovy extrakce velmi oblíbená a relativně jednoduchá, jejími hlavními nevýhodami jsou dlouhé extrakční časy (18 hodin) a velká spotřeba rozpouštědel.

Py/GC/MS je technika, při které je vzorek tepelně rozkládán v inertní atmosféře (nebo vakuu) na menší molekuly, které jsou dále separovány chromatografickou kolonou a detekovány pomocí hmotnostního spektrometru [210]. Py/GC/MS analýza všech vzorků byla provedena pomocí Multi-Shot Pyrolyzéro EGA/PY3030D ve spojení s plynovým chromatografem Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra device. Pro každou analýzu byly do pyrolyzního kelímku naváženy 3 mg vzorku, který byl následně pyrolyzován při 300 °C po dobu 3 minut. Plynový chromatograf byl vybaven kolonou Ultra Alloy-PY2 (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm). Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1,01 ml·min⁻¹. Splitovací poměr byl nastaven na 1:100 a teplota injektoru i interface činila 300 °C. Teplotní program kolony byl započat teplotou 60 °C, která byla držena 3 minuty, dále následoval ohřev rychlostí 6 °C·min⁻¹ na konečnou teplotu 200 °C (držena 10 minut). Teplota MS detektoru činila 250 °C a skenování bylo nastaveno na rozsah $m/z = 33-450$.

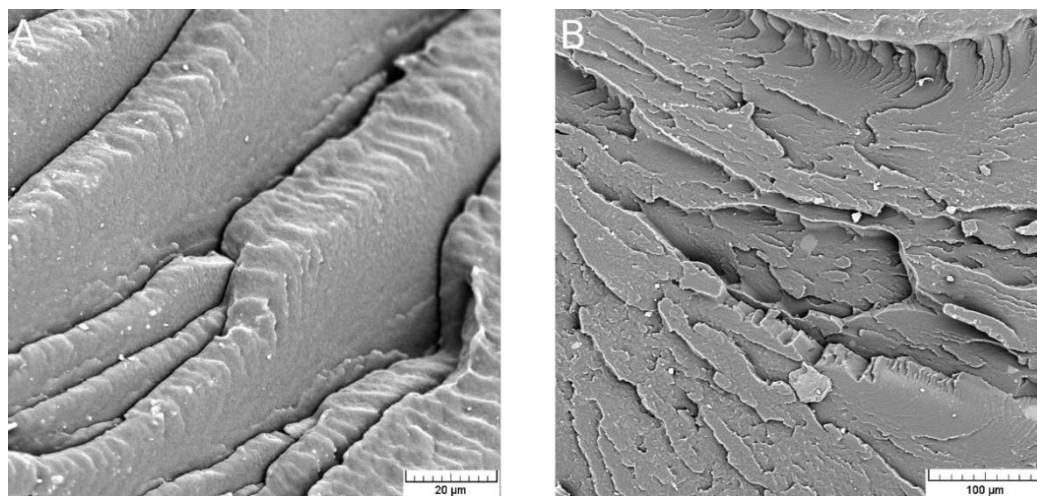
U obou metod byl obsah LIN, ALY a ANE ve vzorcích stanoven pomocí kalibrační křivky a výsledky jsou uvedeny jako průměr ze tří stanovení.

2.1.4 Výsledky a diskuze okruhu I

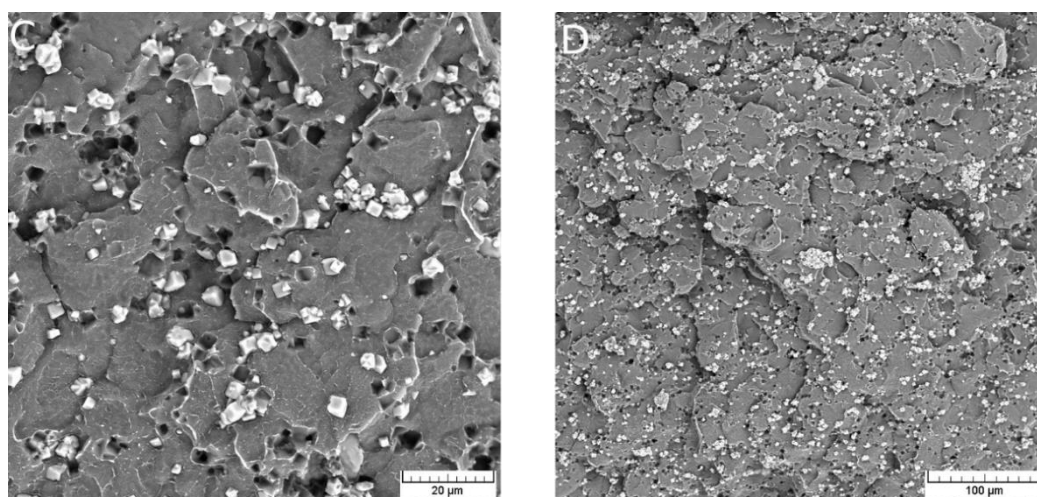
Vliv pevných nosičů na morfologii kompozitu – SEM analýza

Morfologie připravených kompozitů a kompatibilita pevných nosičů s LDPE matricí byla sledována pomocí metody SEM. Obrázky 6, 7, 8, 9 znázorňují čisté LDPE a LDPE kompozity s třemi různými pevnými nosiči (WF, TC, MS) o koncentraci 20 hm. %. Pomocí SEM (obr. 6 A, B) bylo možno pozorovat relativně hladký a homogenní povrch LDPE. V případě kompozitu LDPE s obsahem MS (obr. 7 C, D) byly pozorovány křehlovité částice MS s velikostí od 5 do 10 µm. U kompozitu s obsahem TC (obr. 8 E, F) byl zaznamenán destičkovitý tvar částic TC o velikosti 10–40 µm. SEM analýzou bylo potvrzeno rovnoměrné rozptýlení TC a MS v LDPE matrici bez významnější agregace, ovšem byla také pozorována přítomnost dutinek. Vznik těchto dutinek je pravděpodobně způsoben nižší adhezí částic TC a MS k polymerní matrici, což je v souladu s výsledky podobných studií [211, 212]. Z obrázku 9 G, H je patrné, že částice WF mají nepravidelný tvar, a rovněž jsou zde pozorovány zřetelné mezery mezi WF a matricí LDPE. To poukazuje na nízkou kompatibilitu

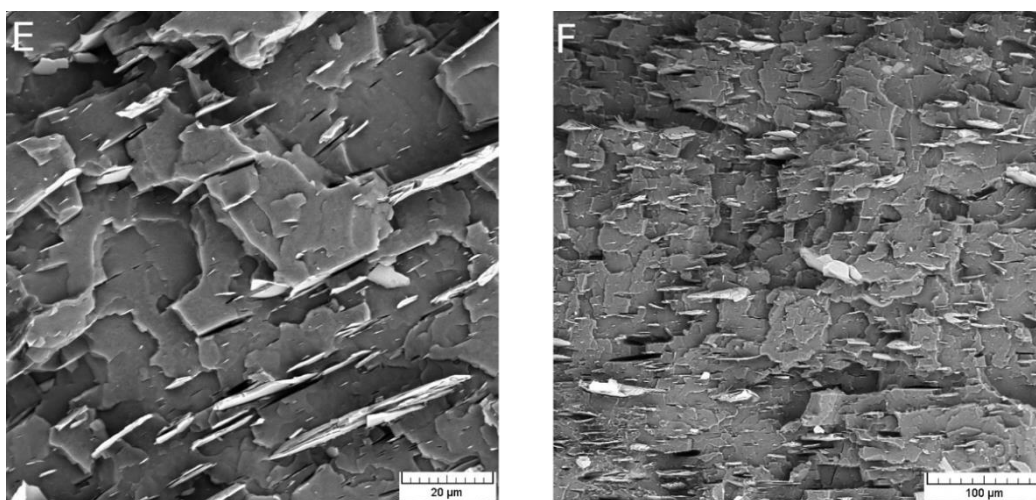
mezi hydrofilními částicemi WF a nepolárním LDPE. Tento závěr se shoduje s výsledky mnoha jiných prací [213–215].



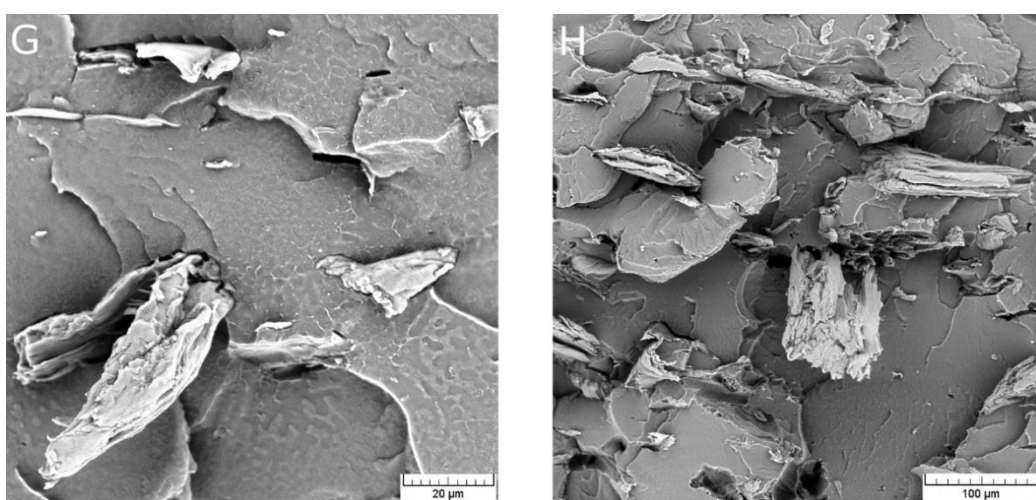
Obr. 6 SEM snímky čistého LDPE (A, B)



Obr. 7 SEM snímky LDPE kompozitů LDPE/MS/20 (C, D)



Obr. 8 SEM snímky LDPE kompozitů LDPE/TC/20 (E, F)



Obr. 9 SEM snímky LDPE kompozitů LDPE/WF/20 (G, H)

Vliv pevných nosičů na výsledné mechanické vlastnosti kompozitů

Tabulka 2 shrnuje hodnoty mechanických charakteristik (Youngův modul, pevnost v tahu a poměrné prodloužení při přetržení) připravených kompozitů. Ve všech případech se směrodatná odchylka pohybovala do 10 %. Mechanická analýza byla provedena u kompozitů s i bez obsahu BAL, bylo však potvrzeno, že přítomnost BAL imobilizovaných na pevných nosičích nemá na výsledné mechanické vlastnosti kompozitu žádný vliv. Jsou zde proto diskutovány pouze kompozity bez obsahu BAL.

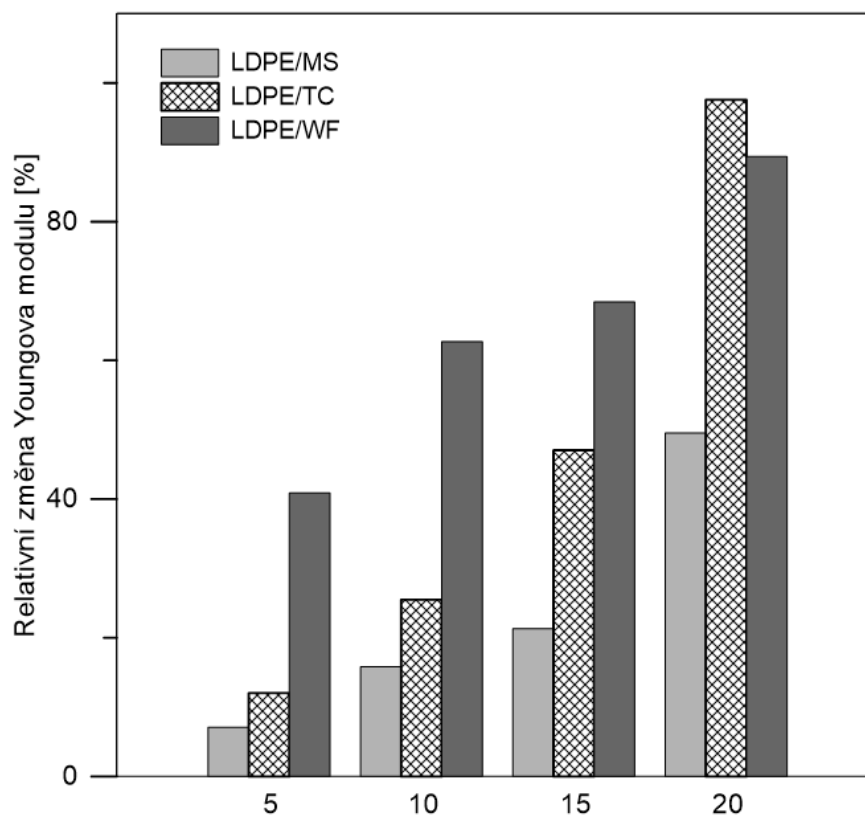
Tabulka 2 Mechanické vlastnosti kompozitů

Vzorek	Koncentrace aditiva (%)	E (MPa) Průměr/SD	σ (MPa) Průměr/SD	ε (%) Průměr/SD
LDPE	0	217/16	16,7/1,3	238/23
LDPE/MS	5	232/27	14,1/1,4	237/15
	10	251/22	13,4/1,2	227/22
	15	263/23	12,6/0,7	197/19
	20	324/24	10,6/0,8	192/12
LDPE/TC	5	243/26	13,8/1,0	218/20
	10	272/27	8,8/0,7	187/21
	15	318/23	8,4/0,6	168/11
	20	428/33	8,4/0,5	145/27
LDPE/WF	5	305/27	9,5/0,5	132/15
	10	352/24	8,2/0,5	39/4
	15	365/46	8,2/0,7	23/2
	20	410/23	8,7/0,9	12/1

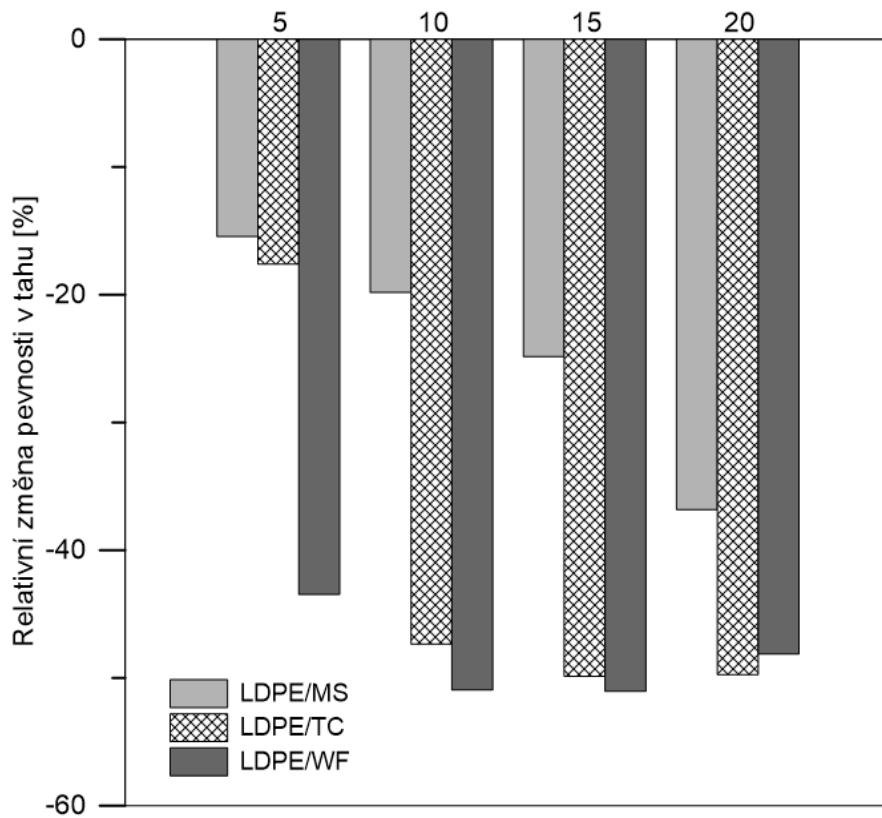
Na obrázcích 10, 11 a 12 je vyobrazen vliv rozdílných pevných nosičů na mechanické vlastnosti kompozitů vyjádřený jako relativní změna (srovnání s nemodifikovaným LDPE). Nemodifikovaný LDPE vykazoval nižší hodnotu Youngova modulu (E), a naopak vyšší hodnoty pevnosti v tahu (σ) a poměrného prodloužení při přetržení (ε) ve srovnání s kompozity obsahujícími pevné nosiče. Rovněž bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací všech pevných nosičů v kompozitech došlo k nárůstu hodnot E , a zároveň k poklesu hodnot σ a ε . Zvýšená tuhost kompozitů je připisována skutečnosti, že částice pevného nosiče omezují pohyblivost polymerních řetězců, což může rovněž způsobit i snížení hodnot deformace [216]. Vzrůstající koncentrace pevných nosičů také způsobuje zvýšení krystalinity polymerních kompozitů [217]. Výsledky se shodují se studií, v níž byl připraven polymerní kompozit na bázi HDPE s obsahem TC. Se zvyšujícím se obsahem TC vzrostla také hodnota E a poklesla hodnota σ [217].

Nejvýraznější nárůst hodnot E byl pozorován u kompozitu s obsahem 20 hm. % TC. U kompozitů s obsahem MS a TC byly zaznamenány podobné hodnoty mechanických charakteristik, pravděpodobně způsobené obdobnými fyzikálněchemickými vlastnostmi těchto polymerních plniv. Zvýšení hodnot E v kompozitech obsahujících WF se shoduje se studií, kde byly zkoumány mechanické vlastnosti kompozitů na bázi LLDPE s inkorporovanou WF [218]. Výrazný pokles hodnot σ a ε u kompozitů s obsahem WF byl pravděpodobně způsoben větší velikostí částic WF, a zároveň určitou nekompatibilitou hydrofilní

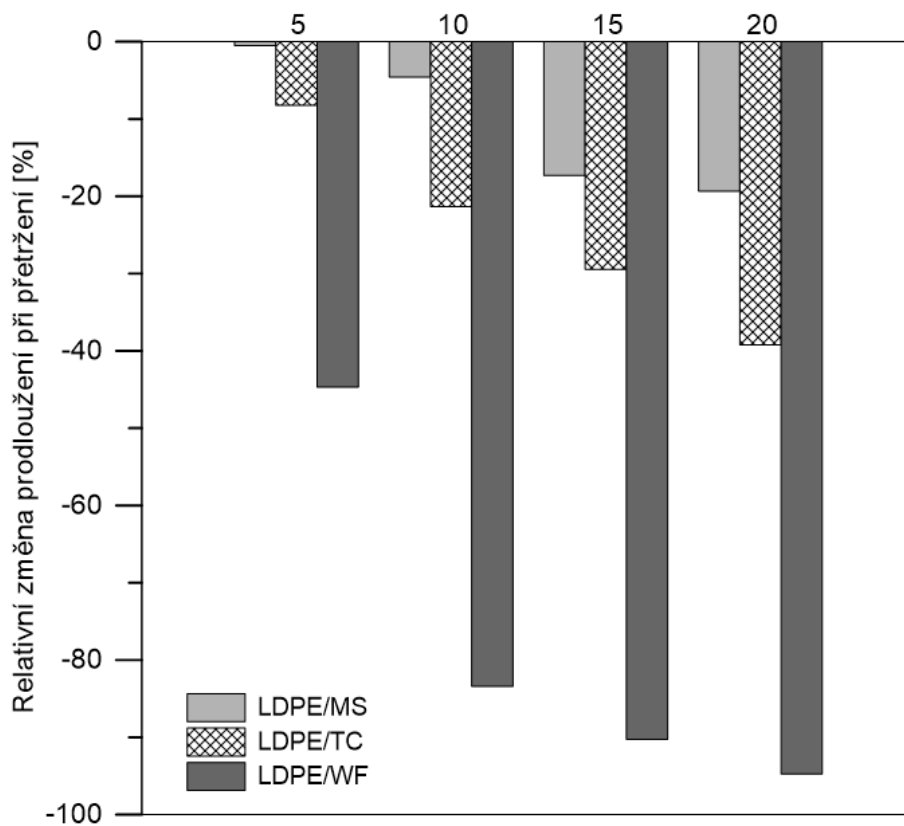
WF s hydrofobní polymerní maticí, což bylo již také potvrzeno mnoha studii [197, 219]. Výsledné mechanické vlastnosti kompozitů jsou tedy dány mírou kompatibility mezi pevným nosičem a polymerní maticí. Kompatibilita s LDPE byla v případě TC a MS vyšší v porovnání s WF, což také koresponduje s výsledky SEM analýzy.



Obr. 10 Relativní změna Youngova modulu kompozitů v porovnání s čistým LDPE. Směrodatná odchylka se pohybovala do 10 %



Obr. 11 Relativní změna pevnosti v tahu kompozitů v porovnání s čistým LDPE. Směrodatná odchylka se pohybovala do 10 %



Obr. 12 Relativní změna poměrného prodloužení při přetržení kompozitů v porovnání s čistým LDPE. Směrodatná odchylka se pohybovala do 10 %

Antibakteriální vlastnosti kompozitů

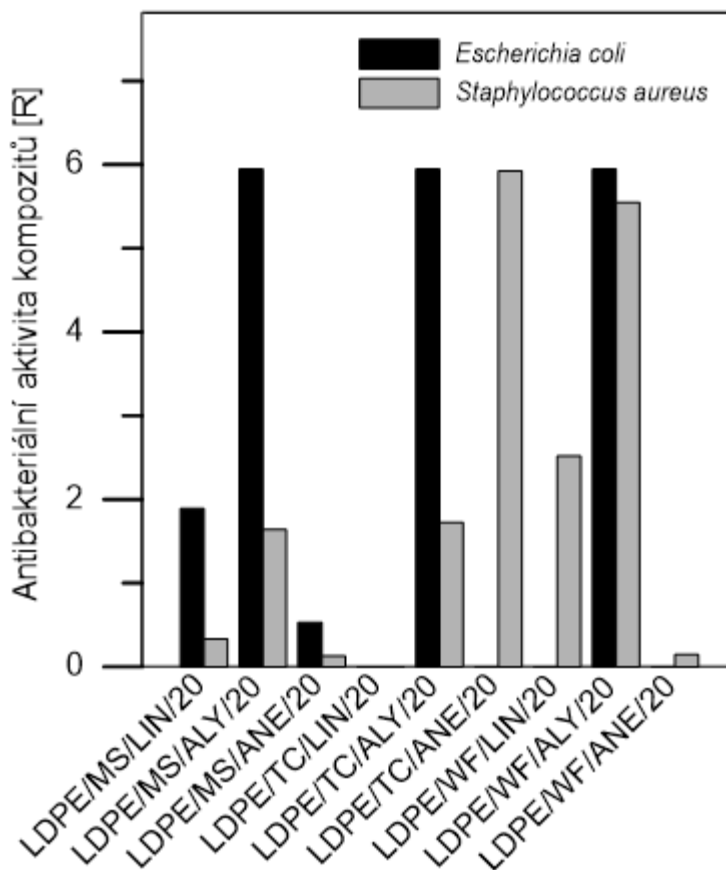
Na obrázku 13 jsou graficky zobrazeny hodnoty antibakteriální aktivity připravených kompozitů, kde obsah aditiva činil 20 hm. %. Nemodifikovaný LDPE a LDPE s inkorporovanými pevnými nosiči (bez obsahu BAL) vykazovaly nulovou antibakteriální aktivitu proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Je všeobecně známo, že jak MS, tak i TC jsou inertní a biologicky neaktivní materiály [220, 221]. WF rovněž vykazuje nulovou antibakteriální aktivitu, avšak může za určitých podmínek podléhat mikrobiální kolonizaci [222].

Při testování antibakteriální aktivity bylo zjištěno, že připravené kompozity lépe inhibovaly růst gramnegativní bakterie s výjimkami kompozitů LDPE/WF/ANE, LDPE/WF/LIN a LDPE/TC/ANE. To je v souladu se studií, kde byla sledována baktericidní aktivita EO bazalky (*Ocimum basilicum*) proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím [223]. Avšak v jiném výzkumu, kde byla rovněž studována antibakteriální aktivita EO bazalky proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, byl popsán opačný jev. Bylo zde uvedeno, že gramnegativní bakterie byly proti působení EO bazalky více odolné ve srovnání s grampozitivními bakteriemi [224]. Joshi a kol. však pro antibakteriální testování využila odlišné zástupce grampozitivních a gramnegativních bakterií, než byly použity pro tento výzkum a výzkum popsany Kogou a kol. [223].

Nejvyšší antibakteriální účinek proti růstu *Escherichia coli* byl zaznamenán u kompozitů LDPE/WF/ALY, LDPE/TC/ALY a LDPE/MS/ALY. Tyto kompozity by pravděpodobně vykazovaly antibakteriální aktivitu i v nižších koncentracích, než je 20 hm. % aditiva. Naproti tomu kompozity obsahující TC/LIN, WF/LIN, TC/ANE a WF/ANE vykazovaly nulovou antibakteriální aktivitu proti růstu *Escherichia coli*. U kompozitů LDPE/TC/ANE a LDPE/WF/ALY byla pozorována vysoká antibakteriální aktivita proti růstu *Staphylococcus aureus*. Tato grampozitivní bakterie však byla rezistentní vůči působení kompozitu LDPE/TC/LIN, pravděpodobně z důvodu neúčinné imobilizace LIN na pevný nosič, což bylo potvrzeno kvantitativní analýzou (viz obr. 14).

Obecně nejvyšší hodnoty antibakteriální aktivity byly pozorovány u kompozitů obsahujících ALY, což koresponduje se studií Suppakula a kol., kde byla rovněž zaznamenána vyšší antibakteriální účinnost kompozitů s obsahem ALY proti růstu *Escherichia coli* ve srovnání s kompozity obsahující LIN [40]. Složky EO s fenolickou strukturou, včetně ALY, jsou vysoce účinné proti růstu bakterií, a to i navzdory jejich relativně nízké rozpustnosti ve vodě [225]. Mechanismus účinku EO a jejich složek proti patogenním bakteriím je poměrně složitý proces, který dosud není zcela vysvětlen a objasněn. Je však zřejmé, že antibakteriální účinky EO a jejich složek úzce souvisejí s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi daných

komponent. Terpeny lipofilního charakteru inaktivují buněčné enzymy katalyzující vznik bakteriálních membrán. Zvýšená propustnost membrány je hlavním faktorem mechanismu antibakteriálního účinku. Antibakteriální sloučeniny mohou tuto membránu narušit a způsobit ztrátu buněčné integrity, a případně buněčnou smrt. Některé složky EO interferují s translokací protonů přes membránové váčky a blokuji fosforylaci adenosin-difosfátu, v důsledku čehož dojde k narušení primárního energetického metabolismu bakteriální buňky [226–228]. EO a jejich složky také mohou inhibovat syntézu DNA, RNA, polysacharidů a proteinů v buněčné stěně bakterií [229].



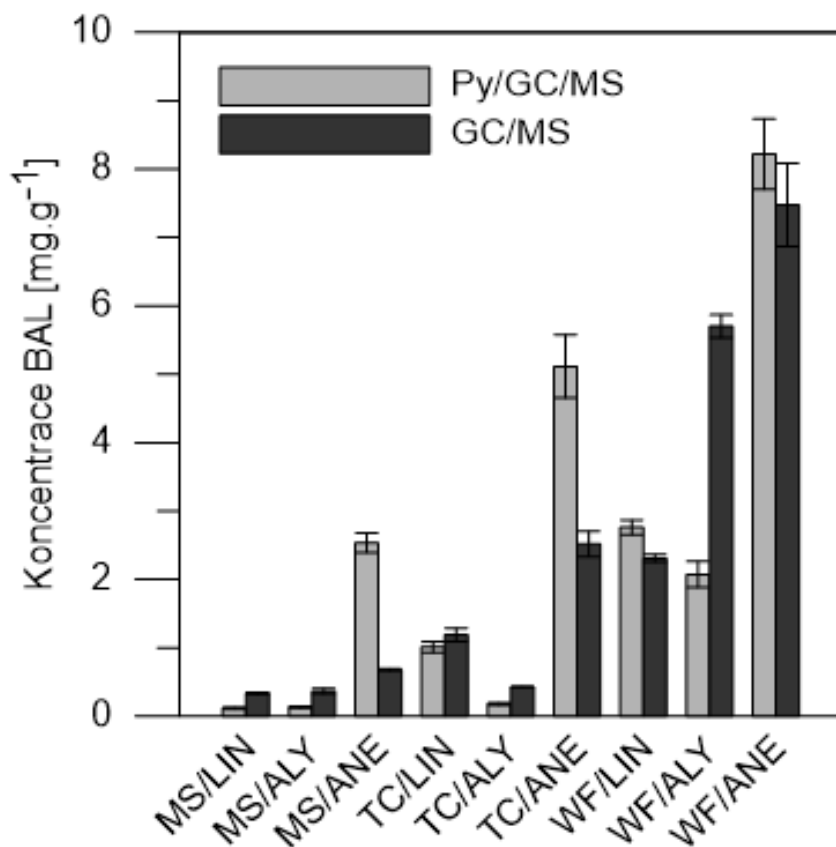
Obr. 13 Antibakteriální vlastnosti kompozitů

Kvantitativní analýza BAL na pevných nosičích a v kompozitech

Na obrázku 14 jsou zobrazena množství BAL imobilizovaných na různých pevných nosičích. Výsledky byly získány pomocí dvou metod: přímou analýzou vzorku pomocí Py/GC/MS a analýzou extrahovaného vzorku pomocí GC/MS. Výsledné koncentrace BAL v pevných nosičích naměřené pomocí Py/GC/MS byly srovnatelné nebo vyšší v porovnání s koncentracemi stanovenými pomocí GC/MS. Nejvyšší rozdíly v koncentracích BAL stanovené oběma metodami byly ve vzorcích WF/ALY, TC/ANE a MS/ANE.

Kvantitativní analýzou byla stanovena koncentrace BAL na pevných nosičích, která se pohybovala v rozmezí 0,1–8,3 mg·g⁻¹. Nejvyšší koncentrace všech BAL

byla zaznamenána v případě jejich imobilizace na WF, zatímco nejnižší množství BAL bylo zaznamenáno u MS. Podle studie Willige a kol., je polarita BAL hlavním faktorem ovlivňujícím jejich sorpci. Autor zde porovnával sorpci LIN a limonenu na PE. Bylo zde zjištěno, že více polární LIN byl méně adsorbován na nepolární polymer [230]. Další obdobná studie porovnávala sorpci dvou podobných terpenů (karvon a limonen) s rozdílnou polaritou na HDPE, LDPE a PP. Bylo prokázáno, že méně polární limonen (ve srovnání s karvonem) vykazoval vyšší rychlost i vyšší míru adsorpce na nepolární polymerní matrice [231]. Další studie rovněž potvrzují, že BAL jsou lépe adsorbovány na pevné nosiče, které vykazují podobnou polaritu [232, 233].

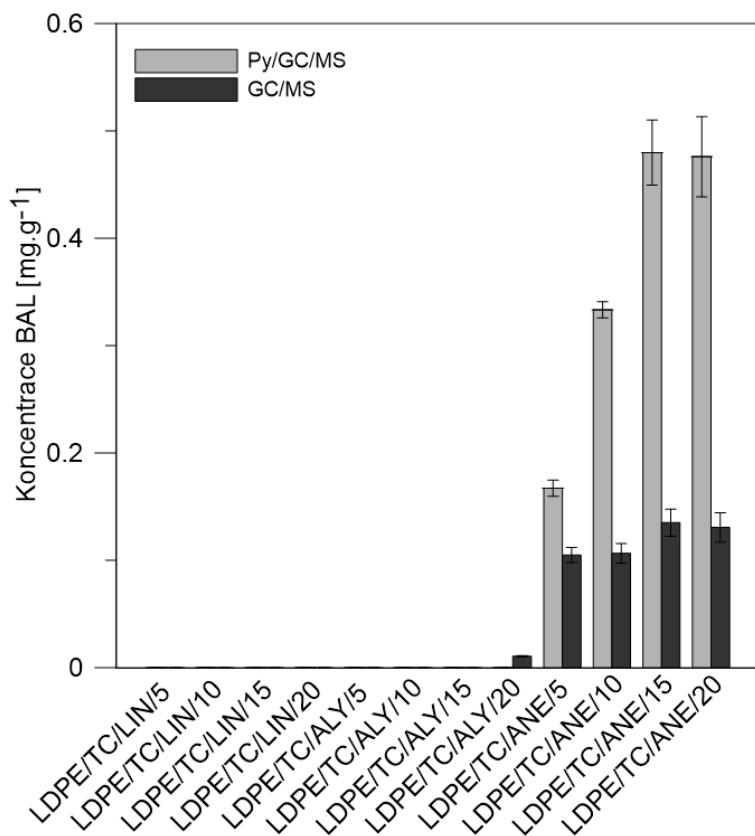


Obr. 14 Koncentrace BAL na pevných nosičích po procesu imobilizace

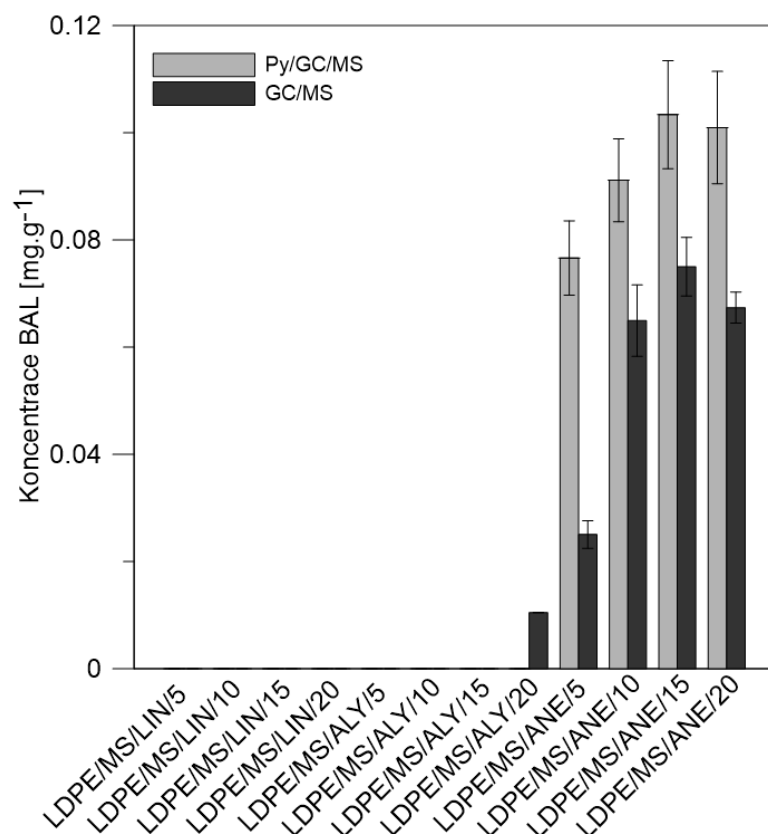
Obrázky 15, 16 a 17 zobrazují koncentraci BAL v LDPE naměřenou opět pomocí Py/GC/MS a GC/MS. Zbytková koncentrace BAL v polymerní matrici činila 0 až maximálně 1,1 mg·g⁻¹, přičemž nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v kompozitech s BAL imobilizovanými na WF (obr. 17). Obsah LIN a ALY byl na všech pevných nosičích i ve výsledných kompozitech velmi nízký až nulový. To mohlo být způsobeno jejich vyšší těkavostí při nižších teplotách ve srovnání s ANE. Tato BAL vykazovala nejvyšší schopnost adsorpce na všechny pevné nosiče, a také byla jedinou BAL, která byla detekována v kompozitech obsahujících MS a TC. Možným zdůvodněním tohoto jevu je pravděpodobně vyšší bod varu ANE. To také koresponduje s výzkumem, ve kterém byla porovnávána koncentrace různých BAL s rozdílnými body varu

v polymerní matrici. Bylo zde potvrzeno, že BAL s vyšším bodem varu mají vyšší schopnost setrávat v polymerní matrici [234].

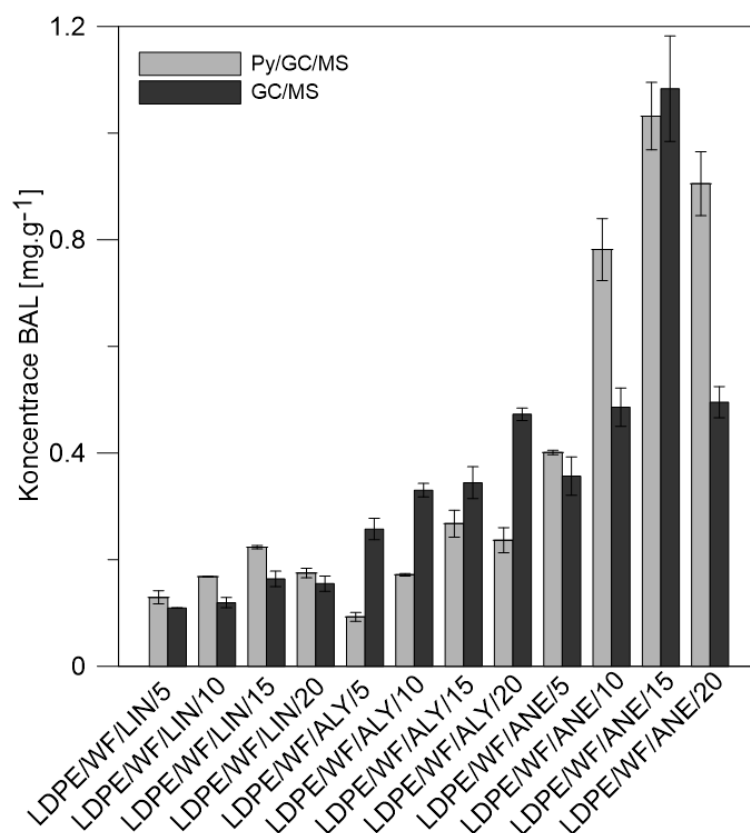
Dle výsledků antibakteriální aktivity však nebyla potvrzena nejvyšší účinnost ANE proti růstu testovaných bakterií, přestože jeho koncentrace v polymerním kompozitu byla podstatně vyšší než ALY. Tento závěr je v souladu se studií, která zkoumala antibakteriální aktivitu ANE a ALY proti vybraným bakteriálním kmenům pomocí stanovení minimální inhibiční koncentrace. Byl zde jednoznačně prokázán vyšší antibakteriální účinek ALY [235].



Obr. 15 Koncentrace BAL v kompozitech obsahujících TC



Obr. 16 Koncentrace BAL v kompozitech obsahujících MS



Obr. 17 Koncentrace BAL v kompozitech obsahujících WF

2.1.5 Shrnutí okruhu I

Byly připraveny polymerní kompozity na bázi LDPE s termoplasticky inkorporovanými BAL (LIN, ALY, ANE). Stěžejním mezikrokem inkorporace těchto látek byla jejich imobilizace na pevné nosiče (WF, TC, MS).

U takto připravených kompozitů byla sledována jejich antibakteriální aktivita (norma ISO 22196) proti patogenním bakteriím. Bylo zjištěno, že připravené filmy lépe inhibovaly růst gramnegativní bakterie *Escherichia coli* ve srovnání s grampozitivní bakterií *Staphylococcus aureus*. Nejvyšší antibakteriální aktivitu přitom vykazovaly kompozity s obsahem ALY imobilizovaného WF, nicméně vysoká antibakteriální aktivita byla zaznamenána i v případě ostatních pevných nosičů (TC i MS).

Pomocí dvou metod (GC/MS a Py/GC/MS) byla také provedena kvantitativní analýza BAL v polymerním kompozitu i v pevných nosičích. Nejvyšší koncentrace BAL na pevných nosičích, i ve výsledných kompozitech, byla dosažena v případě ANE. Bylo rovněž zjištěno, že množství inkorporovaných BAL je dáno jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi (bod varu, polarita) a také polaritou pevných nosičů a polymeru.

Byl také hodnocen vliv pevných nosičů na mechanické vlastnosti kompozitů, kde bylo potvrzeno, že zvyšující se koncentrace pevných nosičů v polymerním kompozitu způsobuje nárůst Youngova modulu, a zároveň pokles pevnosti v tahu a poměrného prodloužení při přetržení. Výsledky SEM analýzy prokázaly nízkou kompatibilitu mezi WF a polymerní maticí.

Zvolené BAL jsou účinnou antibakteriální látkou vhodnou pro modifikaci LDPE, což představuje jejich potenciál pro uplatnění např. v potravinářských či zdravotnických aplikacích.

2.2 Příprava mikrosfér na bázi PLA, PMMA a jejich směsí s obsahem BAL

EO a jejich složky se díky svému přírodnímu původu, relativní bezpečnosti, širokému přijetí ze strany spotřebitelů a rozsáhlým možnostem jejich aplikace stávají předmětem zájmu mnoha vědeckých studií [150]. EO jsou obsaženy v mnoha druzích rostlin, ze kterých jsou izolovány různými extrakčními postupy. Z chemického hlediska představují EO bohatou směs těkavých a netěkavých sloučenin s nízkou molární hmotností. Obsahují terpenoidy, zejména monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny, spolu s řadou různých alifatických uhlovodíků, kyselin, alkoholů, aldehydů a esterů [236, 237]. Vědecké publikace poukazují na fakt, že účinky EO jsou připisovány jednak jejich majoritním ale také minoritním složkám [238]. Aktivní složky EO (např. LIN, ALY, ANE) vykazují mnoho biologických účinků, a to hlavně myorelaxační, sedativní,

anxiolytické, analgetické, protizánětlivé, antikonvulzivní, anestetické, bradykardické, vazodilatorní, antimikrobiální a antioxidační vlastnosti [37, 39, 183, 184, 239–247]. Využití složek EO je však v mnoha aplikacích limitováno jejich vysokou těkavostí a citlivostí vůči teplu, světlu, kyslíku či vlhku [248].

Možností, jak ochránit tyto látky před nežádoucími vlivy prostředí, je využití mikroenkapsulačního procesu, který spočívá v zapouzdření kapalin, tuhých látek nebo plynů do polymerního obalu. Při mikroenkapsulaci dochází ke vzniku mikročástic o velikosti od 1–1000 μm . Mikročástice se pak dále dělí na mikrotobolky (obsahují polymerní obal a jádro) a mikrosféry [249]. Mikrosféry jsou tvořeny makromolekulární sítí, ve které je rozptýlena aktivní látka ve formě roztoku, suspenze, nebo emulze [250]. Účelem mikroenkapsulace je poskytovat ochranu aktivním látkám proti okolnímu prostředí, zvýšit jejich stabilitu a účinnost, zachovat biologické a funkční vlastnosti, prodloužit skladovatelnost nebo dosáhnout jejich řízeného uvolňování [251]. Průmyslové využití enkapsulovaných složek EO je velmi široké, a to převážně v oblastech potravinářských, textilních, kosmetických nebo farmaceutických [150]. Konkrétními příklady aplikací jsou pak např. „inteligentní textilie“, léčiva s postupným uvolňováním, pesticidy, přísady do čistících a pracích prostředků a jiných kosmetických produktů.

V současné době existuje mnoho technik mikroenkapsulace, mezi které se řadí metody chemické (polymerizace, polykondenzace), fyzikálně-chemické (extrakce a odpaření rozpouštědla, jednoduchá či komplexní koacervace) a mechanické (extruze, sprejové sušení či chlazení, fluidní obalování) [150]. Jednou z nejpoužívanějších metod přípravy mikročástic je metoda odpaření rozpouštědla, jejímž výsledkem je vznik mikrosfér [252]. Tato metoda je velmi oblíbená pro svou jednoduchost a nenáročnost na přístrojové vybavení, a je vhodná pro BAL, které mají omezenou rozpustnost ve vodě [74, 253]. Je hojně využívána ve farmaceutickém průmyslu pro přípravu léčiv s kontrolovaným uvolňováním [254].

Důležitým krokem při přípravě mikročástic je výběr polymeru [255]. PLA je biorozložitelný polymer, který je vhodnou alternativou polymerům na bázi ropy. PLA se připravuje polykondenzací kyseliny mléčné, která se získává fermentací obnovitelných zemědělských surovin, např. kukuřičného škrobu, pšenice, cukrové třtiny nebo brambor. PLA je známý už po mnoho desetiletí a v posledních letech rapidně roste možnost jeho uplatnění. Nespornými výhodami je jeho nízká cena, netoxičnost, biodegradovatelnost a biokompatibilita [256–258].

PLA má však také několik nevýhod, které omezují jeho širší aplikovatelnost. Mezi tyto nevýhody se řadí křehkost, omezená houževnatost, hydrofobicitá

a nízká tepelná odolnost [259, 260]. Možností, jak modifikovat některé fyzikálně-chemické vlastnosti PLA, je jeho smíchání s jinými polymery [90]. Zde se jako vhodný polymer jeví PMMA, tedy amorfní termoplastický polymer, který disponuje velmi ceněnými vlastnostmi, jako je vysoká chemická stabilita, biokompatibilita, netoxičita a dobré mechanické vlastnosti, včetně vysokého Youngova modulu pružnosti a nízké hodnoty prodloužení při přetržení. Pro tyto vlastnosti je považován za vhodný materiál pro výrobu mikročástic pro různé aplikace [261, 262]. Bylo již provedeno několik studií zabývajících se přípravou polymerních směsí PLA/PMMA, kde bylo pozorováno zlepšení vlastností polymerů, které pak umožňovalo jejich širší využití, např. v tkáňovém inženýrství apod. [88, 142, 143, 263].

Tato studie je zaměřena na přípravu a charakterizaci mikrosfér na bázi PLA, PMMA nebo jejich směsí s obsahem složek EO. Hlavní důraz byl kladen na studium vzájemných vztahů mezi typem polymeru, složkami EO a výslednými vlastnostmi připravených mikrosfér, především antibakteriálních a termálních. Nedílnou součástí bylo také hodnocení morfologie mikrosfér, stanovení enkapsulační účinnosti a sledování kinetiky uvolňování BAL pomocí chromatografické metody.

2.2.1 Použité materiály pro přípravu mikrosfér

Pro přípravu mikrosfér byl použit PLA (Ingeo 2003D, $M_w \sim 182\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) od firmy NatureWorks a PMMA (Altuglas V046, $M_w \sim 159\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) od firmy Arkema. Jako emulgátor byl při přípravě mikrosfér využit polyvinylalkohol (PVA) (Mowiol 8-88, $M_w \sim 67\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a stupni hydrolýzy 86,7-88,7 mol. %, CAS: 9002-89-5) a byl obdržen od firmy Sigma Aldrich. Dodavatelem dichlormethanu a chloroformu byla Penta chemicals. Složky EO a jejich dodavatelé jsou shodné s okruhem I. Rovněž typ i dodavatel bakteriálních kmenů použitých pro mikrobiologickou analýzu jsou shodné s okruhem I. Média pro mikrobiologická testování (Nutrient Broth, Plate Count Agar obsahující neutralizátory (Tween $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a Lecitin $0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a Mueller-Hinton Agar (MHA) byla dodána firmou HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., (Indie).

2.2.2 Příprava vzorků polymerních mikrosfér

Polymerní mikrosféry byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla. V prvním kroku byl polymer (PLA) rozpuštěn v rozpouštědle nemísitelném s vodou (chloroform). Do vzniklého polymerního roztoku (10 hmotnostně-objemových %) byly přidány BAL o koncentraci 20 hm. %. Vzniklá směs byla emulgována do kontinuální vodné fáze obsahující 0,5 hmotnostně-objemových % PVA pomocí homogenizéru (IKA Ultra Turrax T 18 basic) při 24 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Poměr vodné a olejové fáze činil 10:1. Vzniklá emulze (olej ve vodě) byla dále

sonifikována ultrazvukovým homogenizátorem (UZ Sonopuls HD 2070) po dobu 5 minut při amplitudě 50 %. Mikrosféry byly formovány při odpařování organického rozpouštědla, které probíhalo za míchání po dobu 24 hodin. Poté byly mikrosféry centrifugovány při 20 °C, po dobu 20 minut při 14 500 otáčkách za minutu. Následně byly mikrosféry promyty 30 ml destilované vody. Proces centrifugace a promytí byl třikrát opakován. Mikrosféry byly následně lyofilizovány po dobu 24 hodin. Slepé vzorky byly připraveny stejným způsobem ovšem bez přídavku BAL. Všechny připravené mikrosféry byly skladovány v temnu při 8±2 °C. Mikrosféry na bázi směsi PLA/PMMA byly připraveny výše uvedeným způsobem s výjimkou rozpuštění polymerů v dichlormethanu. Procentuální zastoupení PLA v polymerní směsi bylo 100 % (čisté PLA), 75 %, 50 %, 25 % a 0 % (čisté PMMA). Při přípravě mikrosfér na bázi směsi PLA/PMMA byl z BAL použit pouze ALY. Pro ověření absence zbytkového rozpouštědla byla využita technika headspace (HS) GC. Nebylo zde potvrzeno překročení přípustné zbytkové koncentrace chloroformu nebo dichlormethanu v připravených mikrosférách.

2.2.3 Použité metody pro charakterizaci připravených mikrosfér

Velikost mikrosfér

Velikost mikrosfér (D_p) a index jejich polydisperzity (PDI) byl stanoven metodou laserové difrakce. Principem této metody je stanovení úhlu rozptylu světla částicemi, jež závisí na jejich velikosti. Úhel difrakce je nepřímo úměrný velikosti částic [264]. K tomuto účelu byl využit přístroj Mastersizer E-3000 (Malvern, UK). PDI byl vypočítán z následující rovnice 2.5:

$$PDI = \left(\frac{SD}{D_p} \right)^2 \quad (2.5)$$

kde: SD je standardní odchylka, D_p je průměrná velikost částice.

SEM připravených mikrosfér

Morfologie připravených mikrosfér byla zkoumána pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (VEGA-II, Tescan) pracujícího ve vysokém vakuu a při urychlovacím napětí 10 kV. Před analýzou byly vzorky pokoveny zlatem.

Tepelné vlastnosti mikrosfér

Tepelné vlastnosti vzorků byly testovány pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). DSC je termická analýza, díky které lze získat informace o charakteristických teplotách materiálu, jako jsou např. teplota tání (T_m), teplota

skelného přechodu (T_g), či specifické teplo tání. DSC sleduje kompenzační tepelný tok, potřebný k udržení nulového rozdílu pro vzorek a referenční látku, které se zahřívají konstantní rychlostí [265].

DSC analýza byla provedena na přístroji Mettler Toledo DSC STARe (Belgie). Vzorky (5 mg) byly naváženy do jednotlivých hliníkových pánviček. Všechna měření byla provedena v atmosféře dusíku o průtoku cca $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplotní podmínky byly nastaveny následovně: 0-240 °C při rychlosti ohřevu $10 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota 240 °C byla udržována po dobu 2 minut. Následovalo chlazení vzorku z 240 °C na 0 °C rychlostí $10 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$. Po udržení této teploty po dobu 2 minut následoval druhý ohřev (0-240 °C) při rychlosti ohřevu $10 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$.

Stanovení účinnosti enkapsulace BAL

Pro stanovení účinnosti enkapsulačního procesu mikrosfér byla polymerní matrice rozpuštěna v chloroformu a následně vysrážena pomocí methanolu. Uvolněné BAL byly poté přefiltrovány přes stříkačkový filtr (PTFE, $0,22 \mu\text{m}$) a podrobeny GC/MS analýze (princip popsán v okruhu I), která probíhala na přístroji Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra device. Separace byla provedena s využitím kapilární kolony Rxi-5ms, Restek (30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu $0,25 \mu\text{m}$). Jako nosný plyn sloužilo hélium s průtokem $1,12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota injektoru byla nastavena na 200 °C a objem nástřiku vzorku činil 1 μl . Splitovací poměr byl 1:100. Teplotní program kolony byl následující: počáteční teplota 70 °C (držena 1 min), poté nárůst teploty rychlostí $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ až na konečnou teplotu 180 °C (drženo 4 min). Teplota iontového zdroje a interface teplota činily 200 °C. Byla použita elektronová ionizace při 70 eV a měření probíhalo v rozsahu hmot $m/z = 35\text{--}350$. Množství BAL bylo stanoveno z kalibrační křivky. Každý vzorek byl měřen třikrát a výsledky jsou uvedeny jako průměrná hodnota.

Stanovení antibakteriální aktivity polymerních mikrosfér

Antibakteriální aktivita (AA) připravených mikrosfér byla testována proti bakteriím *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Bakterie kultivované na TSA agaru (inkubace při $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 24 hodin) byly přeneseny do 1/500 NB média a standardizovány na $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Testovaná suspenze obsahující 1,5 ml mikrosfér (0,15 g ve 1/500 NB) byla přidána do 1,5 ml bakteriální kultury a ponechána k inkubaci při $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 hodin. Testování bylo provedeno třikrát pro každý vzorek mikrosfér a každý bakteriální kmen. Po inkubaci byla zkumavka obsahující vzorek a bakteriální suspenzi řádně protřepána a počet životaschopných bakterií byl stanoven pomocí metody počítání na pevných půdách. Po uplynutí inkubace ($35 \text{ }^\circ\text{C}$, 48 hodin) byla stanovena hodnota CFU.

AA připravených mikrosfér byla poté vyhodnocena pomocí následující rovnice 2.6:

$$AA (\%) = \left(1 - \frac{CFU_{vzorek}}{CFU_{blank}}\right) \cdot 100 \quad (2.6)$$

kde: CFU_{vzorek} představuje počet $CFU \cdot ml^{-1}$ pro mikrosféry obsahující BAL, CFU_{blank} představuje počet $CFU \cdot ml^{-1}$ pro kontrolní vzorek (bez obsahu BAL).

Testování AA mikrosfér proti výše uvedeným bakteriím bylo provedeno také diskovou difúzní metodou. Disková difúzní metoda je jednou z nejstarších a nejpoužívanějších metod, běžně využívanou k vyšetřování většiny bakteriálních patogenů. Velkou výhodou této metody je nenáročnost na vybavení. Suspenze bakteriální kultury (1 ml) o koncentraci 10^6 – 10^7 $CFU \cdot ml^{-1}$ byla rozetřena na MHA agar. Připravené mikrosféry (ve formě prášku) a/nebo vodní suspenze mikrosfér byly umístěny na naočkovaný MHA. Po 24 hodinách inkubace (35 °C) byly změřeny inhibiční zóny v mm. Každé stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe.

Strukturní charakterizace mikrosfér

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je nedestruktivní analytická metoda, při které dochází k interakci infračerveného záření se zkušebním vzorkem. Pro identifikaci chemických struktur mají největší význam absorpční signály v intervalu vlnové délky 4000 až 200 cm^{-1} . Po excitaci vzorku infračerveným zářením jsou detekovány valenční a deformační vibrace atomů, které jsou popsány svými charakteristickými absorpčními pásy [266].

Pro měření spekter byla využita metoda FTIR se zeslabenou úplnou reflektancí za použití přístroje Nicolet iS5 opatřeném Ge krystalem (Nicolet, USA). Celkový odraz světla od povrchu byl měřen v rozsahu vlnové délky 4000 – 750 cm^{-1} . Každé spektrum se skládalo ze 64 skenů se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} .

Studium uvolňování BAL z polymerních mikrosfér

Pro sledování kinetiky uvolňování BAL z mikrosfér byla použita metoda GC/MS.

Celý proces studia uvolňování BAL sestával z následujících kroků:

- Nejprve byly připravené mikrosféry (10 mg) přidány do 10 ml H_2O .
- Inkubace probíhala při 25 °C za neustálého protřepávání (100 otáček za minutu) po dobu 628 hodin.

- V určitých časových intervalech byl odebrán 1 ml vzorku (nahrazen 1 ml H₂O) a umístěn do HS vialek. Množství uvolněné BAL (R_{BAL}) v % bylo vypočítáno z následující rovnice 2.7.

$$R_{BAL}(\%) = \left(\frac{D_t}{D_0} \right) \cdot 100 \quad (2.7)$$

kde: D_t je množství uvolněné BAL v čase t [mg], D_0 je původní množství BAL v mikrosférách [mg].

Pro stanovení množství uvolněných BAL byla u odebraného vzorku v HS vialkách provedena mikroextrakce tuhou fází (SPME). SPME je technika sloužící k zakoncentrování analytů ze vzorku. Při kontaktu vlákna se vzorkem jsou analyty absorbovány nebo adsorbovány na stacionární fázi vlákna až do doby, kdy je dosaženo rovnováhy. Po provedení sorpce jsou analyty uvolněny desorpčním procesem (v případě GC tepelně) v nástřikovém prostoru plynového chromatografu, pomocí kterého je následně provedena jejich separace a detekce [267, 268].

Pro extrakci těkavých sloučenin bylo použito vlákno PDMS/DVB 65 (polydimethylsiloxan/divinylbenzen 65 μm), Supelco. Extrakce sloučenin probíhala při teplotě 80 °C po dobu 30 minut, po jejímž uplynutí byla provedena GC/MS analýza. Desorpce probíhala v nástřikovém prostoru plynového chromatografu při teplotě 200 °C po dobu 1 minuty.

GC/MS analýza byla provedena na přístroji Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra device a separace byla provedena na kapilární koloně Rxi-5ms, Restek (30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm). Jako nosný plyn bylo použito hélium s průtokem 1,35 ml·min⁻¹. Teplota injektoru činila 200 °C. Dávkování vzorků probíhalo v režimu splitless. Počáteční teplota kolony byla nastavena na 60 °C, následovaná nárůstem teploty na 160 °C (drženo 1 minutu) rychlostí 10 °C·min⁻¹ a poté na konečnou teplotu 220 °C (rychlost 28 °C·min⁻¹). Teplota iontového zdroje a interface teplota činila 200 °C a skenování probíhalo v rozsahu $m/z=35-350$. Měření byla provedena třikrát pro každý vzorek.

2.2.4 Výsledky a diskuze okruhu II

Stanovení velikosti mikrosfér

V tabulce 3 jsou uvedeny velikosti připravených mikrosfér a hodnoty PDI. Průměrná velikost mikrosfér se pohybovala v rozmezí 1,5–9,5 μm a hodnoty PDI činily 1,6–2,7. PDI přesahující hodnotu 0,7 poukazují na širokou distribuci velikostí mikrosfér v daném vzorku [269]. Cardoso a kol. se zabývali přípravou mikrosfér na bázi PLA s olejovitou BAL pro systémy cíleného podávání léčiv,

přičemž získali mikrosféry s PDI v rozmezí 1,0–2,7 [270]. To by mohlo souviset se zvýšenou viskozitou média. S rostoucí M_w polymeru roste viskozita vnitřní fáze emulze, což ztěžuje možnost desintegrace kapiček. Díky tomu pak dojde k formování větších mikrosfér [270, 271]. V jiné studii byly syntetizovány monodisperzní částice PMMA s úzkou distribucí M_w (PDI 1,73–3,02) [272].

Při stanovení velikosti mikrosfér bylo zjištěno, že mikrosféry na bázi PLA vykazovaly nepatrně větší průměrnou velikost v porovnání s mikrosférami na bázi PMMA (viz tabulka 3). Ve studii Perese a kol., která zkoumala vliv zpracovatelských metod na vlastnosti nanočástic PLLA/PMMA, bylo zjištěno, že zvýšení množství PMMA ve směsi PLLA/PMMA způsobuje větší velikost nanočástic, což je ovšem v rozporu s výsledky této studie. Je však třeba zmínit, že Peres a kol. použili při přípravě nanočástic PMMA s $M_w \sim 68\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, což je téměř pětikrát vyšší M_w ve srovnání s použitým PLLA ($M_w \sim 13\,700\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) [273]. V naší studii však byl použit PLA s $M_w \sim 182\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a PMMA s $M_w 159\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, což by mohlo vysvětlovat rozdíly ve výsledcích obou studií. Přítomnost BAL v mikrosférách mírně ovlivnila jejich výslednou velikost. Tento jev je tedy pravděpodobně způsoben rozdílnými viskozitami polymerních roztoků s a bez obsahu BAL, což koresponduje s dříve publikovanými pracemi [270, 271].

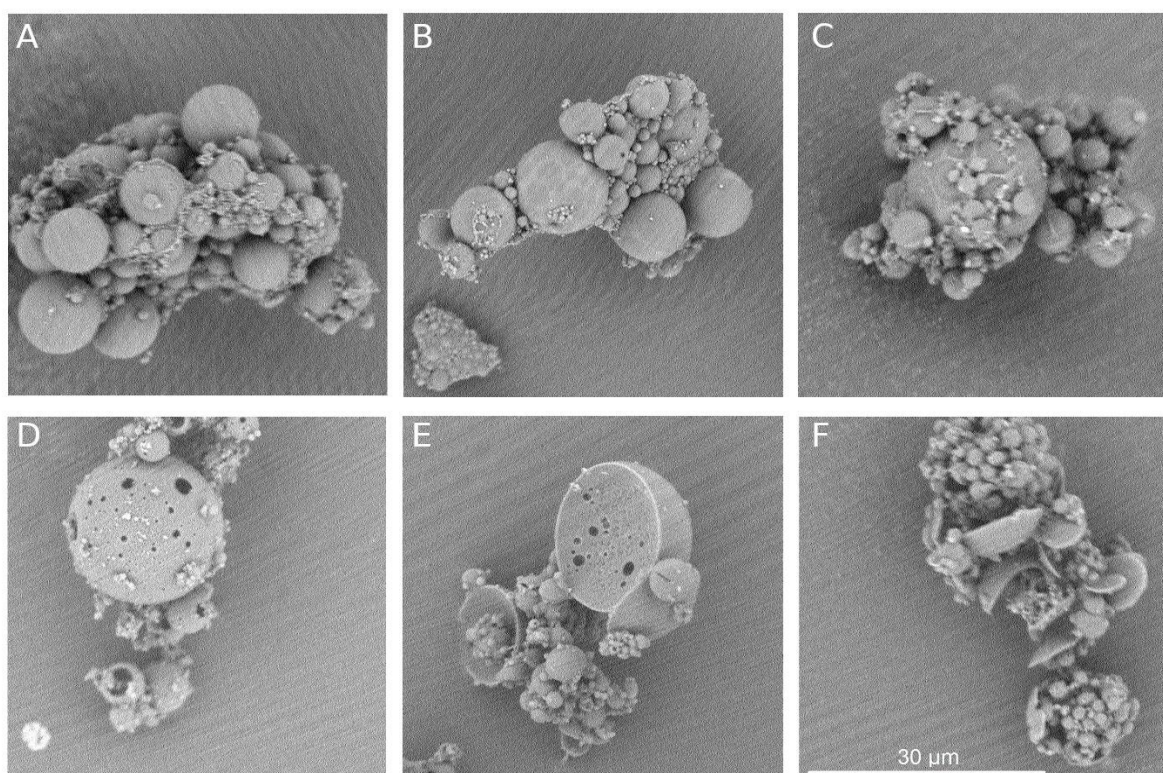
Tabulka 3 Charakterizace připravených mikrosfér

Vzorek	PDI	Dx50 (μm)	EE (%w/w)	Koncentrace BAL ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
PLA	2,14	9,50 \pm 0,09	-	-
PLA/LIN	2,41	7,58 \pm 0,06	81,7 \pm 10,0	163,5 \pm 19,9
PLA/ALY	2,12	7,71 \pm 0,07	64,4 \pm 8,0	128,9 \pm 16,0
PLA/ANE	2,10	8,28 \pm 0,06	45,5 \pm 5,5	91,0 \pm 11,1
PMMA	1,98	1,47 \pm 0,01	-	-
PMMA/LIN	2,08	1,51 \pm 0,00	76,0 \pm 3,3	151,9 \pm 6,5
PMMA/ALY	2,29	1,66 \pm 0,01	69,7 \pm 9,2	139,3 \pm 18,4
PMMA/ANE	1,99	2,10 \pm 0,01	44,5 \pm 4,3	88,9 \pm 8,7
PLA/PMMA 25:75	1,57	2,51 \pm 0,01	-	-
PLA/PMMA/ALY 25:75	2,67	6,50 \pm 0,05	68,0 \pm 2,8	135,9 \pm 5,7
PLA/PMMA 50:50	1,90	4,91 \pm 0,02	-	-
PLA/PMMA/ALY 50:50	1,91	3,09 \pm 0,02	62,1 \pm 2,0	124,3 \pm 4,1
PLA/PMMA 75:25	1,64	3,97 \pm 0,02	-	-
PLA/PMMA/ALY 75:25	2,21	4,63 \pm 0,01	61,5 \pm 1,4	123,0 \pm 2,8

Studium morfologie mikrosfér

Na obrázku 18 jsou zobrazeny snímky připravených mikrosfér před a po hydrolyze. Pomocí SEM bylo možno pozorovat sférický tvar a hladký povrch mikrosfér, nicméně u každého vzorku byla vidět určitá míra jejich aglomerace (viz obr. 18 A-F). U vzorků mikrosfér (obr. 18 A-C) nebyl pozorován významný vliv rozdílného poměru PLA/PMMA na jejich morfologii.

Na obrázku 18 D-F jsou zobrazeny mikrosféry po hydrolyze, která probíhala po dobu 96 hodin, při 37 °C v 1M NaOH. Bylo potvrzeno, že s rostoucím množstvím PLA v polymerní směsi dochází k vyššímu rozpadu mikrosfér, což je viditelné zejména na obrázku 18 F. Tato skutečnost má významný vliv na kinetiku uvolňování enkapsulované BAL (viz diskuze níže).



Obr. 18 SEM snímky mikrosfér s různými poměry PLA a PMMA. Mikrosféry PLA/PMMA 25:75 (A), PLA/PMMA 50:50 (B) a PLA/PMMA 75:25 (C) a mikrosféry po hydrolyze v 1M NaOH, (PLA/PMMA 25:75 (D), PLA/PMMA 50:50 (E) a PLA/PMMA 75:25 (F)). Měřítka je shodné pro všechny snímky (viz F).

Termická analýza mikrosfér

Vzájemné interakce obou polymerů a ANE byly sledovány metodou DSC, pomocí které lze detekovat nadmolekulární změny v systému. Ty mohou mít významný dopad na výsledné chování mikrosfér (např. kinetiku uvolňování).

Pomocí DSC (tabulka 4) byla u PLA mikrosfér bez obsahu BAL zjištěna hodnota přechodové oblasti T_{g1} 55,29 °C, následovaná píkem studené krystalizace při 116,84 °C a rovněž byl pozorován maximální endotermický pík při 149,87 °C (T_m PLA). Naproti tomu mikrosféry PMMA bez obsahu BAL byly zcela amorfní a hodnota T_{g2} činila 104,79 °C.

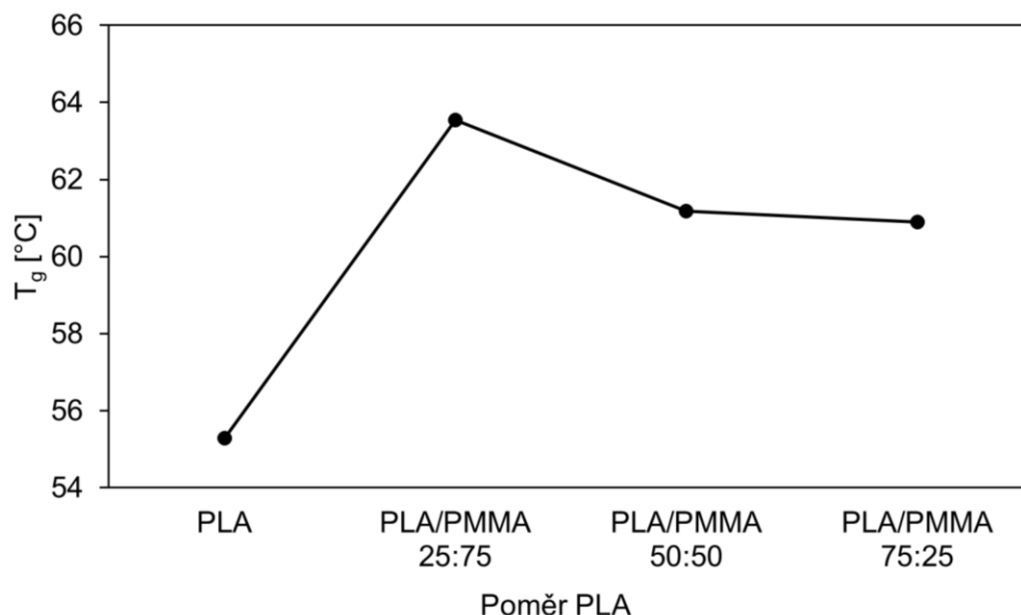
Bylo rovněž zjištěno, že v důsledku přítomnosti ANE v mikrosférách došlo ke snížení hodnoty T_g u obou polymerů, přičemž u PMMA byl pozorován výraznější pokles této hodnoty (o 46,7 %), zatímco u PLA došlo k poklesu T_{g1} o 30,2 % (viz tabulka 4). Možným zdůvodněním může být fakt, že složky EO působí jako plastifikátor a zvyšují tak volný objem polymerních řetězců. Tato zjištění jsou v souladu se studií, kde EO inkorporované v PLA nanovláčkách zapříčinily pokles hodnot T_g i T_m [256]. U vzorku s obsahem ANE byl rovněž zaznamenán posun nástupu studené krystalizace PLA směrem k nižší teplotě, což opět poukazuje na plastifikační efekt ANE, který umožňuje PLA snáze krystalizovat.

Při DSC analýze (viz tabulka 4) byly pozorovány hodnoty T_g PLA (T_{g1}) i PMMA (T_{g2}), což poukazuje na nemísitelnost obou polymerů. Tento závěr se koreluje s výsledky výzkumu Perese a kol. v rámci kterého byly připraveny nanočástice PLLA/PMMA [273]. U vzorků PLA/PMMA 25:75, 50:50 a 75:25 lze pozorovat hodnoty T_m PLA, který se nepatrně posouval k vyšším teplotám spolu s rostoucím množstvím PLA v systému. Se zvyšujícím se poměrem PLA byl rovněž pozorován nárůst hodnoty entalpie ΔH_c a ΔH_m . Velikost ΔH_m je přímo úměrná obsahu krystalického podílu ve struktuře materiálu. Tyto hodnoty však byly výrazně nižší než u čistého PLA. U vzorků polymerních směsí je rovněž patrné zvýšení hodnot T_{g1} a T_{cc} v porovnání s čistým PLA. PMMA totiž mohl pravděpodobně iniciovat nukleační proces. Z výsledků DSC analýzy (obr. 19) také vyplývá, že při zvyšující se koncentraci PMMA v polymerních směsí dochází ke zvýšení hodnot T_{g1} . PMMA má ve srovnání s PLA vyšší teplotu T_g a zvyšuje tak tuhost systému.

Tabulka 4 Termické vlastnosti mikrosfér (DSC analýza)

Vzorek	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)	T_m (°C)	T_{cc} (°C)	ΔH_m (J·g ⁻¹)	ΔH_c (J·g ⁻¹)
PLA	55,29	-	149,87	116,84	-25,81	25,85
PLA/ANE	38,62	-	146,54	92,02	-28,54	20,79
PMMA	-	104,79	-	-	-	-
PMMA/ANE	-	55,87	-	-	-	-
PLA/PMMA 25:75	63,54	107,43	151,97	129,32	-1,97	2,48
PLA/PMMA 50:50	61,18	103,94	152,80	128,48	-3,33	3,45
PLA/PMMA 75:25	60,89	*	153,62	128,16	-5,82	6,16

* Nelze jednoznačně určit, jelikož T_g je pravděpodobně překryta T_{cc}



Obr. 19 Závislost T_g na množství PLA v polymerní směsi

Stanovení účinnosti enkapsulačního procesu u připravených mikrosfér

Tabulka 3 zobrazuje koncentrace složek EO, a zároveň procentuální účinnost enkapsulačního procesu (EE) v polymerních mikrosférách, která se pohybovala mezi 44,5 a 81,7 hm. %. Nejvyšší hodnota EE byla pozorována u mikrosfér s obsahem LIN, zatímco nejnižší hodnotu EE vykazovaly mikrosféry s enkapsulovaným ANE. To je důsledkem rozdílných fyzikálně-chemických vlastností použitých EO. LIN vykazuje částečnou rozpustnost ve vodě ($1,589 \text{ g.l}^{-1}$) oproti nerozpustným ANE a ALY [274, 275]. To ukazuje na zvýšenou polaritu LIN, a tedy i na potenciálně vyšší kompatibilitu s relativně polárními polymerními maticemi PLA a PMMA. Tyto výsledky korespondují se zjištěními uváděnými na straně 53-55 (obr. 14-17) této práce.

Z výsledků stanovení EE také vyplývá, že s rostoucím obsahem PLA ve směsi PLA/PMMA dochází k poklesu hodnot EE. Jednou z příčin tohoto jevu může být přítomnost krystalických oblastí PLA, které mohou snižovat sorpci BAL, nebo fungovat jako nepropustné bariéry pro difúzi skrze polymer [276]. Jak bylo publikováno v jiných výzkumech, míra sorpce pro danou látku často souvisí s množstvím amorfního polymeru ve směsi [233, 277]. Již v roce 1994 publikoval Nielsen výsledky poukazující na lepší sorpci limonenu a myrcenu polykarbonátem ve srovnání s polyethyltereftalátem a polyethylennaftalátem. Důvodem jsou chybějící krystalické oblasti polykarbonátu (amorfni polymer) [278].

Antibakteriální vlastnosti mikrosfér

Tabulka 5 shrnuje hodnoty AA připravených mikrosfér. Jako slepý pokus byly využity mikrosféry s poměrem 50:50 PLA/PMMA.

V případě stanovení AA u slepého vzorku byla zjištěna nulová AA, čímž bylo zároveň potvrzeno, že při přípravě mikrosfér došlo k úplnému odpaření rozpouštědla. U ostatních mikrosfér byla zaznamenána 100% AA proti testovaným bakteriím pouze s výjimkou vzorku PLA/LIN. U tohoto vzorku nedošlo k inhibici růstu bakterie *Staphylococcus aureus*, což je v souladu se studií Suppakula a kol., kde byla testována AA kompozitů na bázi PE s obsahem LIN a ALY. Byla zde potvrzena vyšší AA kompozitu obsahujícího ALY [40]. Tyto výsledky rovněž korespondují s výsledky z okruhu I a i s výsledky dalších studií [225, 279, 280]. Podobné výsledky je také možno zaznamenat ve studii, která se zabývala přípravou PLA mikrosfér s enkapsulovaným eugenolem a LIN. I zde byla potvrzena vyšší rezistence gram pozitivních bakterií vůči působení připravených mikrosfér ve srovnání s gram negativními bakteriemi [281].

Tabulka 5 Antibakteriální aktivita mikrosfér (n=3)

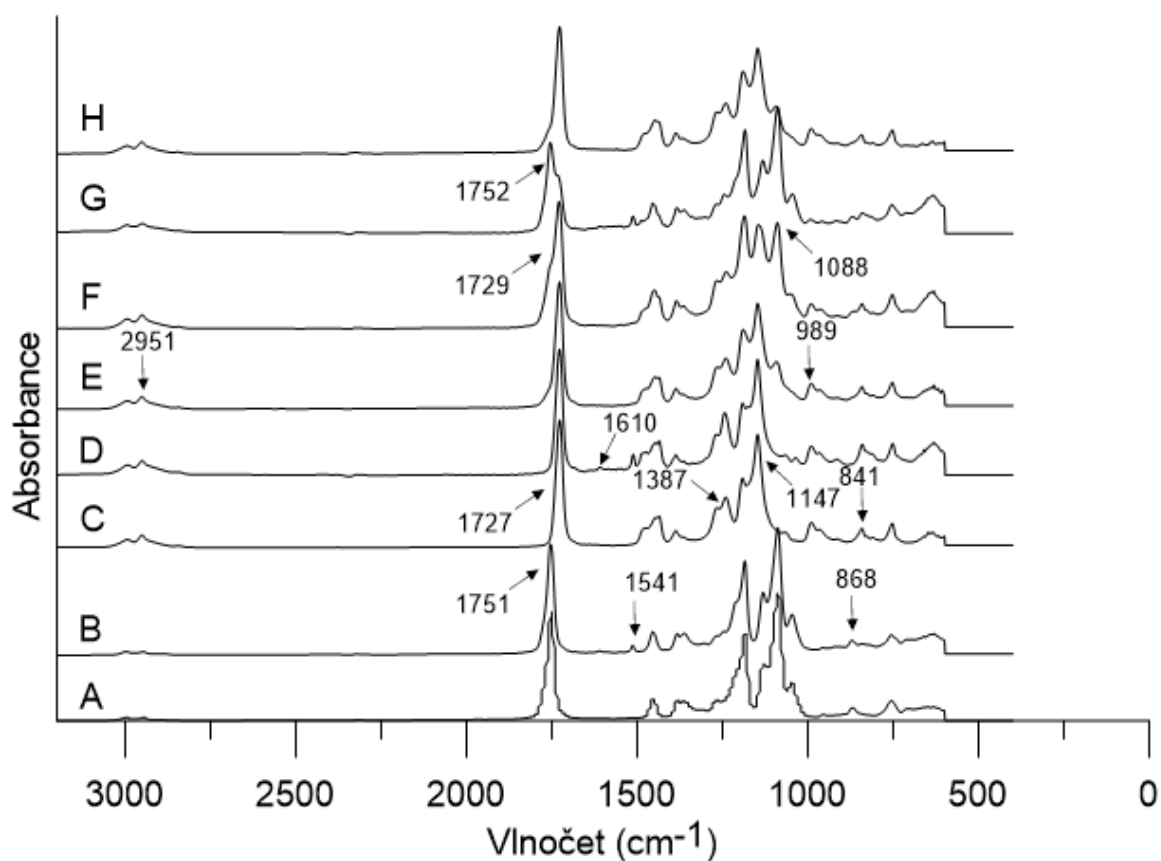
Vzorek	AA (%) proti <i>Staphylococcus aureus</i>	AA (%) proti <i>Escherichia coli</i>
PLA/PMMA 50:50	0	0
PLA/LIN	0	96,5
PLA/ALY	100	100
PLA/ANE	100	99,7
PMMA/LIN	100	100
PMMA/ALY	100	100
PMMA/ANE	100	100
PLA/PMMA/ALY 25:75	100	100
PLA/PMMA/ALY 50:50	100	100
PLA/PMMA/ALY 75:25	100	100

Byla také provedena analýza AA pomocí difúzní diskové metody. Nebyly zde pozorovány zóny inhibice, z čehož lze usuzovat, že použité BAL nedifundovaly z připravených mikrosfér, ani ze suspenze mikrosfér.

Strukturní analýza mikrosfér

Pro studium struktury připravených mikrosfér byla provedena FTIR analýza. Obrázek 20 zobrazuje FTIR-ATR spektra čistého PLA, čistého PMMA, PLA nebo PMMA s obsahem ALY a směsi PLA/PMMA před a po hydrolyze, která probíhala 4 dny při 37 °C v 1M NaOH. U čistého PLA byly pozorovány charakteristické absorpční pásy na vlnočtech 1751 cm⁻¹ odpovídající vibraci

skupiny C=O v esterech, 1454 cm^{-1} charakteristické pro asymetrické deformační vibrace –CH– a 1363 cm^{-1} , který je typický pro symetrické deformační vibrace –CH₃ skupiny. V oblasti 1300 a 1040 cm^{-1} byly zaznamenány 4 intenzivní absorpční pásy při vlnočtech 1184 , 1130 , 1088 cm^{-1} náležící valenční vibraci C–O–C a 1047 cm^{-1} odpovídající deformační vibraci –OH skupiny. Dosažené výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými studiemi [282–284]. Valenční vibrace karbonylových skupin se u PLA projevují absorpčními pásy na vlnočtu 1751 cm^{-1} a u PMMA na 1727 cm^{-1} . Další absorpční pásy byly v případě PMMA pozorovány na vlnočtu 989 cm^{-1} odpovídající C–C valenčním a CH₂ deformačním vibracím a na vlnočtu 841 cm^{-1} , kde se nachází pás kolébové vibrace CH₂. Žádný z těchto pásů nebyl ve spektru PLA nalezen. Tato zjištění jsou v souladu s výsledky jiných studií [285–287]. Naproti tomu u vzorku PLA byl pozorován absorpční pás při 868 cm^{-1} (skeletální valenční a CH₃ kolébová vibrace), který nebyl přítomen ve spektru vzorku PMMA, což opět koresponduje s výzkumem publikovaným Zhangem a kol. [288]. Charakteristické absorpční pásy pro PMMA byly pozorovány na 1387 cm^{-1} (CH₃ deformační vibrace ze skupiny –OCH₃) a na vlnočtu 1147 cm^{-1} (–O–C– valenční vibrace ze skupiny –OCH₃). Obdobné výsledky byly publikovány ve výzkumu Gupty a kol. [289]. IR spektrum PMMA obsahuje na vlnočtu 2951 cm^{-1} absorpční pás asymetrické valenční vibrace –CH₃. Bylo zjištěno, že intenzita tohoto pásu klesá společně se snižujícím se obsahem PMMA ve směsi. Byl rovněž zaznamenán posun absorpčních pásů karbonylové skupiny PMMA z vlnočtu 1727 cm^{-1} na vlnočet 1729 cm^{-1} pro směs PLA/PMMA 50:50, a na vlnočet 1752 cm^{-1} pro směs PLA/PMMA 75:25. Zvýšení obsahu PMMA v polymerních směsích (viz obr. 20) vyvolalo zvýšení intenzity pásu na vlnočtu 989 cm^{-1} a naopak zvýšení obsahu PLA ve směsích způsobilo zvýšení intenzity pásu s vlnočtem 1088 cm^{-1} , který náleží C–OH valenční vibraci sekundárních alkoholů. Po čtyřech dnech hydrolyzy se spektrum každé směsi shodovalo se spektrem čistého PMMA, což je v souladu s výsledky SEM analýzy (PLA byl zcela hydrolyzován). Ve vzorcích obsahujících ALY byla dále pozorována přítomnost dalších absorpčních pásů na vlnočtech 1514 cm^{-1} a 1610 cm^{-1} , které náleží vibraci aromatického kruhu [290].



Obr. 20 Porovnání FTIR spekter připravených mikrosfér (A) PLA, (B) PLA/ALY, (C) PMMA, (D) PMMA/ALY, (E) PLA/PMMA 25:75, (F) PLA/PMMA 50:50, (G) PLA/PMMA 75:25 a (H) PLA/PMMA 25:75 (po hydrolyze)

Uvolňování BAL z polymerních mikrosfér

Na obrázcích 21 a 22 jsou zobrazeny grafy uvolňování BAL z připravených mikrosfér. Datové body v grafu byly proloženy logaritmickou regresní křivkou funkce $f(x)=B \cdot \ln(x)+A$. Koeficienty logaritmické regrese jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 6 Koeficienty logaritmické regrese dat prezentovaných na obrázcích 21 a 22

Vzorek	A	B	R ²
PLA/LIN	19,31	2,14	0,95
PLA/ALY	35,07	5,74	0,94
PLA/ANE	16,73	3,54	0,89
PMMA/LIN	16,88	3,40	0,91
PMMA/ALY	24,09	10,97	0,92
PMMA/ANE	1,88	7,56	0,95
PLA/PMMA/ALY 25:75	9,44	8,69	0,89
PLA/PMMA/ALY 50:50	36,46	10,15	0,81
PLA/PMMA/ALY 75:25	25,68	13,06	0,79

Během experimentu bylo pozorováno počáteční rychlé uvolnění BAL tzv. „burst“ efekt [291, 292], ke kterému došlo v důsledku absorpce BAL na povrchu mikrosfér a v jeho blízkosti (obr. 21 a 22). Nicméně ve druhé fázi již bylo zaznamenáno pomalé pozvolné uvolňování BAL rozptýlených v matrici polymeru, které může být způsobováno obecně několika mechanismy: difúzí BAL skrz polymer, bobtnáním polymeru nebo degradací polymeru [263, 293, 294].

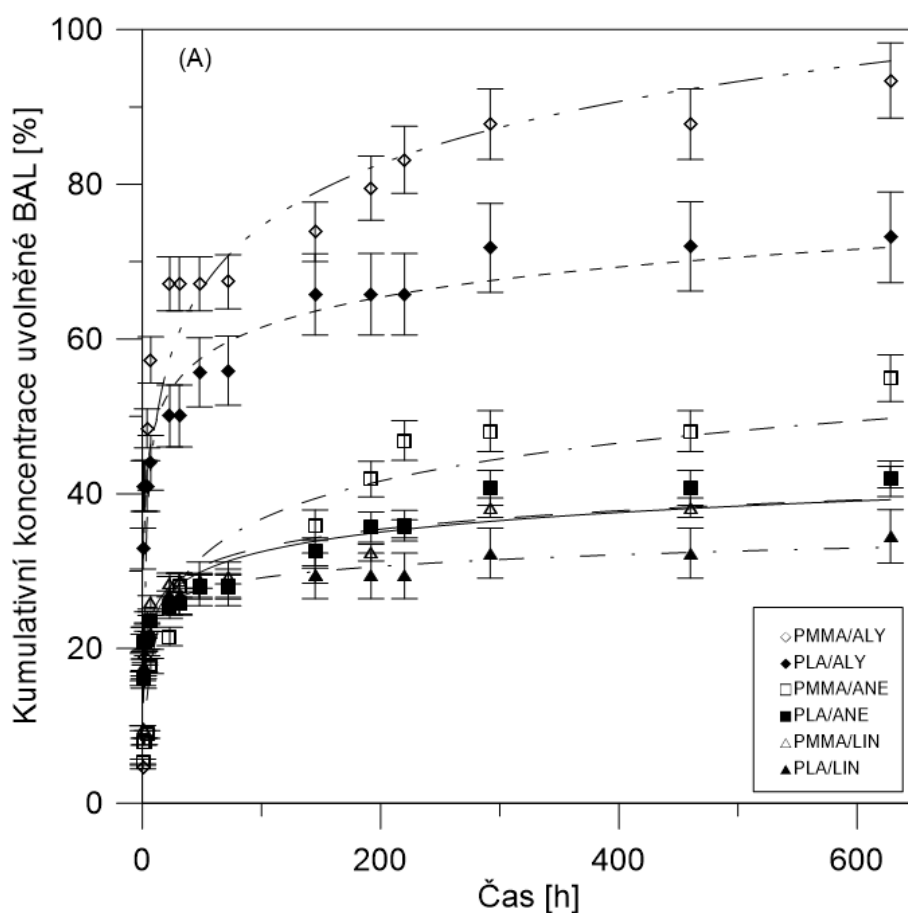
Porovnáváním uvolňovacích profilů BAL (viz Obr. 21) bylo zjištěno, že mikrosféry s nižší EE (viz tabulka 3) uvolňují tyto látky rychleji než mikrosféry s vyšší EE (mikrosféry s obsahem LIN). U mikrosfér PMMA/ALY došlo po 7 hodinách k uvolnění zhruba 57 hm. % enkapsulovaného ALY. Naproti tomu za stejný čas bylo ze vzorku PMMA/LIN uvolněno 25 hm. % enkapsulovaného LIN. Hosseiny a kol., kteří se zabývali enkapsulací EO v mikrosférách na bázi alginátu publikovali ve své studii obdobné výsledky. V případě, že se koncentrace EO v mikrosférách zvýšila z 1 hm. % na 3 hm. %, došlo ke snížení kumulativního uvolňování EO z 78 hm. % na 60 hm. % po 9 hodinách [295]. V případě polymerní směsi PLA/PMMA byla rychlost uvolňování ALY pomalejší u mikrosfér s vyšší koncentrací enkapsulovaného ALY (vyšší EE) (viz obr. 22).

Bylo rovněž zřejmé (obr. 21), že BAL byly rychleji uvolňovány z PMMA mikrosfér. V případě migrace BAL z polymeru do vodného média hrají zásadní roli parametry zahrnující afinitu BAL k matrici polymeru a afinitu BAL k vodnému médiu. Hildebrandovy parametry rozpustnosti poskytují odhad stupně interakce mezi jednotlivými materiály. Materiály s podobnými hodnotami vykazují vyšší míru interakce. Avšak porovnáváním parametrů rozpustnosti dle Hildebranda (tabulka 6) nebyl sledován významný vliv chemické struktury BAL a polymerní matrice.

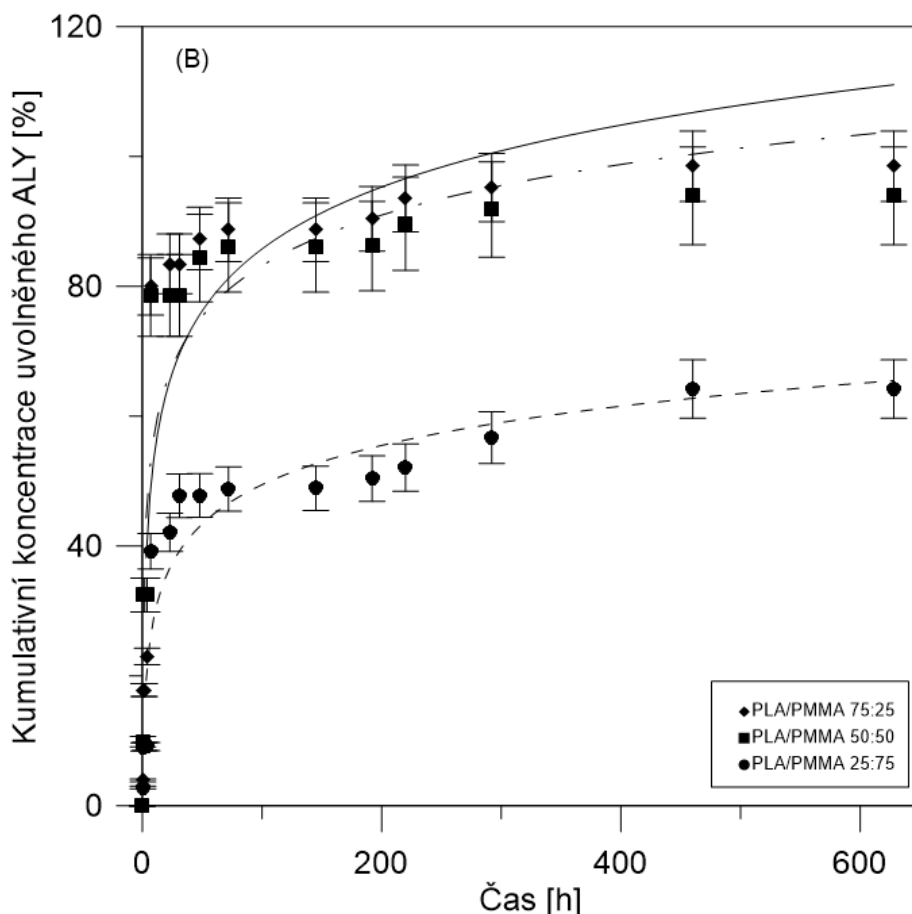
Tabulka 7 Hildebrandovy parametry rozpustnosti [296-298]

BAL/Polymer	δ [MPa ^{1/2}]
LIN	18.1
ALY	19.2
ANE	19.7
PMMA	19.5
PLA	20.7

Rychlost uvolňování BAL mohla být také ovlivněna fyzikálními faktory, mezi které lze zařadit např. podmínky při vlastní přípravě mikrosfér, a nebo jejich velikost. Obecně totiž platí, že menší mikrosféry uvolňují enkapsulovanou BAL rychleji a v kratším čase, a to z důvodu jejich většího poměru povrch:objem. Podobný výsledek byl popsán studií zabývající se přípravou chitosanových nanočástic s obsahem EO získého extrakcí oregána (*Origanum vulgare*) [263].



Obr. 21 Uvolňování BAL z PLA a PMMA mikrosfér do vodného média



Obr. 22 Uvolňování ALY z PLA/PMMA mikrosfér do vodného média

Kompletní uvolnění BAL však nebylo zaznamenáno u žádného vzorku, což naznačuje silnou interakci mezi složkami EO a polymerní matricí. Stejný závěr byl prezentován ve studii zabývající se enkapsulací thymolu do PLA [299].

2.2.5 Shrnutí okruhu II

Byly připraveny mikrosféry na bázi PLA, PMMA a jejich směsí s obsahem BAL (LIN, ALY, ANE) přírodního původu. Pro jejich přípravu byla použita metoda odpařování rozpouštědla.

Pomocí metody laserové difrakce byla určena velikost mikrosfér, která se pohybovala v rozmezí 1,5 až 9,5 μm . Nepatrně vyšší velikost mikrosfér byla pozorována v případě PLA, což mohlo být způsobeno jeho vyšší molekulovou hmotností v porovnání s PMMA.

SEM analýzou byl pozorován sférický tvar a hladký povrch připravených mikrosfér. S rostoucím množstvím PLA v PLA/PMMA směsi byl pomocí SEM pozorován také vyšší stupeň rozpadu mikrosfér, což mělo za následek rychlejší uvolňování BAL z polymerní směsi. Tyto výsledky se shodují s výsledky FTIR analýzy, která rovněž potvrdila kompletní hydrolýzu PLA po 4 dnech.

Výsledky stanovení efektivity enkapsulačního procesu pomocí metody GC/MS ukazují hodnoty EE v rozmezí 44,5–81,7 hm. %, přičemž nejvyšší hodnoty byly pozorovány v případě mikrosfér s obsahem LIN. Bylo potvrzeno, že EE BAL může být ovlivněna polaritou polymeru a jeho krystalizačními oblastmi.

DSC analýza připravených polymerních směsí potvrdila přítomnost dvou přechodových oblastí T_g , což poukazuje na nemísitelnost PLA s PMMA. Rovněž byl pozorován pokles hodnot T_g a T_m u mikrosfér s obsahem BAL, která zde pravděpodobně působila jako plastifikátor.

Z výsledků mikrobiologického testování byla zjištěna vysoká AA připravených mikrosfér proti růstu *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*.

ZÁVĚR

Disertační práce byla zaměřena na přípravu a charakterizaci materiálových systémů a procesů pro efektivní modifikaci vybraných polymerů pomocí přírodních složek EO (linalool, *trans*-anethol, estragol) za použití konvenčních zpracovatelských technik (termoplastické zpracování, enkapsulace v polymerním roztoku) s cílem získání nových a aplikačně relevantních polymerních systémů vykazujících antibakteriální a senzorycky přijatelné vlastnosti. Experimentální aktivity byly zaměřeny na dvě stěžejní oblasti zahrnující využití polyolefinické matrice (LDPE) a polymerů na bázi biorozložitelného polyesteru (PLA) a polymeru akrylátového typu (PMMA). Materiálová nekompatibilita složek EO a jejich nízká odolnost vůči vysokým teplotám a vůči oxidaci byla vyřešena pomocí zpracovatelského mezikroku jejich imobilizace na pevné nosiče a popřípadě jejich enkapsulací.

V rámci dílčích experimentálních aktivit bylo dosaženo následujících výstupů:

- byla vyvinuta a optimalizována metoda GC/MS a Py/GC/MS pro analytické stanovení BAL v polymerním systému,
- byly imobilizovány tři složky EO (LIN, ANE, ALY) na tři různá plniva (MS, TC, WF), přičemž byly popsány faktory, které tuto imobilizaci ovlivňují a dále byly termoplastickým způsobem inkorporovány do LDPE,
- byla provedena technika enkapsulace složek EO do matric PLA, PMMA a jejich směsí,
- pro účely popisu kinetiky uvolňování složek EO (LIN, ANE, ALY) z polymerních mikrosfér do vodného prostředí byla vyvinuta metoda jejich stanovení pomocí metody GC v kombinaci s metodou SPME,
- u připravených BPS byla stanovena antibakteriální aktivita proti grampozitivním (*Staphylococcus aureus*) i gramnegativním bakteriálním (*Escherichia coli*) kmenům,
- vliv modifikace polymerních matric pomocí složek EO byl hodnocen mechanickou, termickou, morfologickou a strukturní analýzou.

Získané výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech a využity pro návazné projekty aplikovaného výzkumu.

PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Předložená disertační práce přináší možné přístupy k antibakteriální modifikaci polymerů za využití v současnosti preferovaných BAL přírodního původu. Tato práce představuje multidisciplinárně orientovanou výzkumnou práci zasahující obory makromolekulární a analytické chemie, materiálové inženýrství a mikrobiologie.

Připravené polymerní systémy mají vysoký potenciál pro různé oblasti průmyslu, především však pro obalový průmysl. Obalové systémy s vysokou užitnou hodnotou umožní efektivnější a delší uskladnění např. potravin a kosmetických produktů při zachování jejich vysoké kvality.

Praktický přínos této práce lze nalézt v metodě a popisu imobilizace složek EO na pevné nosiče. Poznatky z této metody přispěly k dosažení výstupů aplikovaného výzkumu, který vznikl v rámci projektu TAČR TG03010052. V průběhu dílčího projektu 04/1/2016/GAMA s názvem “Aditiva pro hygienizaci zpracovatelských procesů polymerních recyklátů a pryží“, byl získán užitečný vzor “Termoplastická předsměs k aromatizaci a antibakteriální modifikaci polymerních recyklátů“. Dalšími výstupy byly funkční vzorek a stať ve sborníku. V roce 2018 byla k danému výsledku uzavřena licenční smlouva s průmyslovým partnerem.

Dalším projektem, ve kterém byla využita metoda adsorpce BAL na pevné nosiče, byl projekt ZÉTA TJ01000329 zabývající se přípravou senzorycky aktivních polymerních koncentrátů obsahujících produkty pokročilých extrakcí vybraných rostlin. V rámci tohoto projektu byly získány 2 užité vzory týkající se přípravy polymerních koncentrátů a plniv na bázi extraktu z *Carum carvi* pro specifickou modifikaci polymerních matic (termoplastů i elastomerů). Dalším výstupem byly i 2 funkční vzorky.

V rámci projektu ZÉTA TJ01000330 s názvem “Nové stabilizátory pro plasty na bázi přírodních bioaktivních látek“ byly využity poznatky publikované v rámci této disertační práce. Projekt byl zaměřen na využití BAL betainu izolovaného z červené řepy, který má po jeho imobilizaci na pevný nosič sloužit k antioxidační ochraně elastomerů a polyesterů. Výstupy z tohoto projektu jsou 2 užité vzory, 2 funkční vzorky a stať ve sborníku.

Další přínos lze nalézt také v zavedení metodiky stanovení použitých BAL pomocí metody Py/GC/MS, díky které není nutno podrobit vzorky časově velmi náročné extrakci.

Díky současné zvýšené poptávce po biodegradovatelných polymerech se PLA stává jednou z velmi zajímavých alternativ plastů na bázi ropy. Vylepšení vlastností PLA pomocí antibakteriální přísady, popř. jeho smísením s dalším

polymerem (PMMA) může dále zvýšit jeho použitelnost na trhu. Lze tedy konstatovat, že připravené mikrosféry s antibakteriální aktivitou a možností dosažení řízeného uvolňování mohou být potenciálně aplikovatelné např. ve farmaceutickém průmyslu nebo i ve zdravotnictví.

Přínosem pro školitelské pracoviště jsou i publikační aktivity vzniklé v rámci této práce a prezentace dosažených výsledků na odborných konferencích.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Martins, I. M.; Rodrigues, S. N.; Barreiro, M. F.; aj.: Release of thyme oil from polylactide microcapsules. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, ročník 50, č. 24, 2011, ISSN 08885885, doi:10.1021/ie200791r.
- [2] Ahvenainen, R.: *Novel Food Packaging Techniques*. Cambridge: Elsevier, jun 2003, ISBN 9781855737020, 379–379 s.
- [3] Kenawy, E. R.; Worley, S. D.; Broughton, R.: The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules*, ročník 8, č. 5, 2007, ISSN 15257797, doi:10.1021/bm061150q.
- [4] West, J. L.; Hubbell, J. A.: Bioactive Polymers. In *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*, editace A. Atala; D. J. Mooney, Boston: Birkhäuser Boston, 1997, ISBN 9781461241546, s. 83–95.
- [5] Bagamboula, C. F.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.: Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, ročník 21, č. 1, 2004, ISSN 07400020, doi:10.1016/S0740-0020(03)00046-7.
- [6] Beier, R. C.; Allen Byrd, J.; Kubena, L. F.; aj.: Evaluation of linalool, a natural antimicrobial and insecticidal essential oil from basil: Effects on poultry. *Poultry Science*, ročník 93, č. 2, 2014, ISSN 00325791, doi: 10.3382/ps.2013-03254.
- [7] Dini, I.: Use of Essential Oils in Food Packaging. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, editace V. R. Preedy, London: Elsevier, 2016, ISBN 9780124166448, s. 139–147.
- [8] Jana, S.; Patra, K.; Sarkar, S.; aj.: Antitumorigenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: An in vivo study in sarcoma-180 solid tumor model. *Nutrition and Cancer*, ročník 66, č. 5, 2014, ISSN 15327914, doi:10.1080/01635581.2014.904906.
- [9] More, T. A.; Kulkarni, B. R.; Nalawade, M. L.; aj.: Antidiabetic activity of linalool and limonene in streptozotocin- induced diabetic rat: A combinatorial therapy approach. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, ročník 6, č. 8, 2014, ISSN 09751491.
- [10] Peana, A. T.; D'Aquila, P. S.; Panin, F.; aj.: Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, ročník 9, č. 8, 2002, ISSN 09447113, doi:10.1078/094471102321621322.
- [11] Re, L.; Barocci, S.; Sonnino, S.; aj.: Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacological Research*, ročník 42, č. 2, 2000, ISSN 10436618, doi:10.1006/phrs.2000.0671.

- [12] Weaver, D. K.; Dunkel, F. V.; Ntezurubanza, L.; aj.: The efficacy of linalool, a major component of freshly-milled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), for protection against postharvest damage by certain stored product Coleoptera. *Journal of Stored Products Research*, ročník 27, č. 4, 1991, ISSN 0022474X, doi:10.1016/0022-474X(91)90003-U.
- [13] Yang, F.; Long, E.; Wen, J.; aj.: Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum*. *Parasites and Vectors*, ročník 7, č. 1, 2014, ISSN 17563305, doi:10.1186/1756-3305-7-407.
- [14] Urbánková, M.: *Imobilizace přírodních biologicky aktivních látek v matrici polymeru pro obalové aplikace*. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2012.
- [15] Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D.: Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, ročník 363, č. 1-2, 2008, ISSN 03785173, doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.018.
- [16] Biesalski, H. K.; Dragsted, L. O.; Elmadfa, I.; aj.: Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, ročník 25, č. 11-12, 2009, ISSN 08999007, doi:10.1016/j.nut.2009.04.023.
- [17] Dřimalová, D.: Růstové regulátory v řasách. *Czech Phycology*, ročník 5, č. 1, 2005: s. 101–112, ISSN 1805-4927.
- [18] Yi, Z.; Yin-shan, C.; Hai-sheng, L.: Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, ročník 19, č. 4, 2001, ISSN 0254-4059, doi:10.1007/bf02850736.
- [19] Guaadaoui, A.; Benaicha, S.; Elmajdoub, N.; aj.: What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, ročník 3, č. 3, 2014, ISSN 14653478, doi:10.11648/j.ijnfs.20140303.16.
- [20] Segura Campos, M. R.: *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing, dec 2018, ISBN 9780128147757.
- [21] Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; aj.: Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, ročník 46, č. 2, 2008, ISSN 02786915, doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.

- [22] Burt, S.: Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, ročník 94, č. 3, 2004, ISSN 01681605, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- [23] Damian, P.; Damian, K.: *Aromatherapy: Scent and Psyche: Using Essential Oils for Physical and Emotional Well-Being*. Rochester: Healing Arts Press, sep 1995, ISBN 9780892815302.
- [24] Aumeeruddy-Elalfi, Z.; Lall, N.; Fibrich, B.; aj.: Selected essential oils inhibit key physiological enzymes and possess intracellular and extracellular antimelanogenic properties in vitro. *Journal of Food and Drug Analysis*, ročník 26, č. 1, 2018, ISSN 10219498, doi:10.1016/j.jfda.2017.03.002.
- [25] Kamatou, G. P.; Viljoen, A. M.: A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, ročník 87, č. 1, 2010, ISSN 0003021X, doi:10.1007/s11746-009-1483-3.
- [26] Mahomoodally, F.; Aumeeruddy-Elalfi, Z.; Venugopala, K. N.; aj.: Antiglycation, comparative antioxidant potential, phenolic content and yield variation of essential oils from 19 exotic and endemic medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, ročník 26, č. 7, 2019, ISSN 1319562X, doi:10.1016/j.sjbs.2018.05.002.
- [27] Asgher, M.; Qamar, S. A.; Bilal, M.; aj.: Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemicalbased packaging materials. *Food Research International*, ročník 137, 2020, ISSN 18737145, doi:10.1016/j.foodres.2020.109625.
- [28] Burdock, G. A.: *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Boca Raton: CRC Press, páté vydání, dec 2004, ISBN 9780429124976.
- [29] Li, S.: *Manufacture of Fine Chemicals from Acetylene*. 2021, doi:10.1515/9783110714999.
- [30] Jugreet, B. S.; Suroowan, S.; Rengasamy, R. R.; aj.: Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends in Food Science and Technology*, ročník 101, 2020, ISSN 09242244, doi:10.1016/j.tifs.2020.04.025.
- [31] Elisabetsky, E.; Marschner, J.; Onofre Souza, D.: Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*, ročník 20, č. 4, 1995, ISSN 03643190, doi:10.1007/BF00973103.
- [32] Peana, A. T.; Moretti, M. D. L.: Linalool in essential plant oils: pharmacological effects. In *Botanical medicine in clinical practice*, editace R. R. Watson; V. R. Preedy, Wallingford: CABI, nov 2008, ISBN 9781845934132, s. 716–724.

- [33] Peana, A. T.; Marzocco, S.; Popolo, A.; aj.: (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences*, ročník 78, č. 7, 2006, ISSN 00243205, doi:10.1016/j.lfs.2005.05.065.
- [34] Sarkar, A. K.: *Emerging Trends of Bioscience Researches*. Dwarka: Educreation Publishing, sep 2019, ISBN 9788193308172.
- [35] Burdock, G. A.: *Encyclopedia of Food & Color Additives*. Boca Raton: CRC Press, jul 2014, ISBN 9781498711081.
- [36] De Vincenzi, M.; Silano, M.; Maialetti, F.; aj.: Constituents of aromatic plants: II. Estragole. *Fitoterapia*, ročník 71, č. 6, 2000, ISSN 0367326X, doi:10.1016/S0367-326X(00)00153-2.
- [37] De Siqueira, R. J. B.; Magalhães, P. J. C.; Leal-Cardoso, J. H.; aj.: Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. *Life Sciences*, ročník 78, č. 20, 2006, ISSN 00243205, doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.042.
- [38] Smith, R. L.; Adams, T. B.; Doull, J.; aj.: Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances - Methyl eugenol and estragole. *Food and Chemical Toxicology*, ročník 40, č. 7, 2002, ISSN 02786915, doi:10.1016/S0278-6915(02)00012-1.
- [39] Soares, P. M. G.; Lima, R. F.; de Freitas Pires, A.; aj.: Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. *Life Sciences*, ročník 81, č. 13, 2007, ISSN 00243205, doi:10.1016/j.lfs.2007.08.027.
- [40] Suppakul, P.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; aj.: Efficacy of polyethylenebased antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT - Food Science and Technology*, ročník 41, č. 5, 2008: s. 779–788, ISSN 00236438, doi:10.1016/j.lwt.2007.06.006.
- [41] De, M.; De, A. K.; Sen, P.; aj.: Antimicrobial properties of Star anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytotherapy Research*, ročník 16, č. 1, 2002, ISSN 0951418X, doi:10.1002/ptr.989.
- [42] Knio, K. M.; Usta, J.; Dagher, S.; aj.: Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. *Bioresource Technology*, ročník 99, č. 4, 2008, ISSN 09608524, doi:10.1016/j.biortech.2007.01.026.
- [43] Marinov, V.; Valcheva-Kuzmanova, S.: Review on the pharmacological activities of anethole. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, ročník 2, č. 2, 2015, ISSN 2367-6000, doi:10.14748/ssp.v2i2.1141.

- [44] Oktay, M.; Gülçin, I.; Küfreviođlu, Ö. I.: Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT Food Science and Technology*, ročník 36, č. 2, 2003, ISSN 00236438, doi: 10.1016/S0023-6438(02)00226-8.
- [45] CFR - Code of Federal Regulations Title 21 - Part 172 Food and additives permitted for direct addition to food for human consumption [online]. [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.515>
- [46] CFR - Code of Federal Regulations Title 21 - Part 182 Substances Generally Recognized as Safe [online]. © [cit. 2022-01-03]. Dostupné z: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=182.60>
- [47] Otgonzul, O.: *Bioactive polymeric systems for food and medical packaging applications*. Doctoral thesis, Tomas Bata University, Zlin, 2010.
- [48] Steven, M. D.; Hotchkiss, J. H.: Non-migratory bioactive polymers (NMBP) in food packaging. In *Novel Food Packaging Techniques*, editace R. Ahvenainen, Boca Raton: Woodhead Publishing, jun 2003, ISBN 9781855737020, s. 71–102.
- [49] Sun, Y.; Sun, G.: Surface modification of poly(styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide. *Journal of Applied Polymer Science*, ročník 81, č. 3, 2001, ISSN 00218995, doi:10.1002/app.1476.
- [50] Paik, J. S.; Dhanasekharan, M.; Kelly, M. J.: Antimicrobial Activity of UV-Irradiated Nylon Film for Packaging Applications. *Packaging Technology and Science*, ročník 11, č. 4, 1998, ISSN 08943214, doi:10.1002/(SICI) 1099-1522(199807/08)11:4<179::AID-PTS429>3.0.CO;2-J.
- [51] Han, J.: Antimicrobial packaging systems. In *Innovations in Food Packaging*, editace J. H. Han, Winnipeg: Elsevier, jul 2005, ISBN 9780080455174, s. 80–101.
- [52] Coma, V.; Sebti, I.; Pardon, P.; aj.: Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, ročník 64, č. 4, 2001, ISSN 0362028X, doi:10.4315/0362-028X-64.4.470.
- [53] Ishitani, T.: Active packaging for food quality preservation in Japan. In *Food and food packaging materials—chemical interactions*, editace P. Ackerman; M. Jägerstad; T. Oglsson, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1995, ISBN 9780854047208, s. 177–188.

- [54] Hotchkiss, J. H.: Food-packaging interactions influencing quality and safety. *Food Additives and Contaminants*, ročník 14, č. 6-7, 1997, ISSN 14645122, doi:10.1080/02652039709374572.
- [55] Sedlařík, V.: *Antimicrobial modifications of polymers*. Habilitation theses, Tomas Bata University, Zlin, 2011.
- [56] Bílek, F.; Sulovská, K.; Lehocký, M.; aj.: Preparation of active antibacterial LDPE surface through multistep physicochemical approach II: Graft type effect on antibacterial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, ročník 102, 2013, ISSN 09277765, doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.026.
- [57] Gollwitzer, H.; Ibrahim, K.; Meyer, H.; aj.: Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, ročník 51, č. 3, 2003, ISSN 03057453, doi:10.1093/jac/dkg105.
- [58] Mokrejš, P.; Langmaier, F.: *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, ISBN 9788073186746.
- [59] Slabotinský, J.: *Studium difúzních pochodů otravných látek vrstvenými polymerními materiály prostředků ochrany kůže*. Kandidátská disertační práce, Vojenská akademie Antonína Zápotockého, Brno, 1981.
- [60] Dvořáková, J.: *Využití plynové chromatografie ke studiu permeace toxických látek bariérovými materiály*. Disertační práce, Vysoké učení technické v Brně, Brno, jun 2009.
- [61] Bhunia, K.; Sablani, S. S.; Tang, J.; aj.: Migration of chemical compounds from packaging polymers during microwave, conventional heat treatment, and storage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, ročník 12, č. 5, 2013, ISSN 15414337, doi:10.1111/1541-4337.12028.
- [62] Campbell, F. C.: *Elements of Metallurgy and Engineering Alloys*. ASM International, jun 2008, ISBN 9781615030583.
- [63] Van Milligen, B. P.; Bons, P. D.; Carreras, B. A.; aj.: On the applicability of Fick's law to diffusion in inhomogeneous systems. *European Journal of Physics*, ročník 26, č. 5, 2005, ISSN 01430807, doi:10.1088/0143-0807/26/5/023.
- [64] Grote, J.; Reneau, D.; Thews, G.: *Oxygen transport to tissue - II*. Boston: MA: Springer US, 1976, ISBN 978-146-8432-732.
- [65] da Silva, P. T.; Fries, L. L. M.; de Menezes, C. R.; aj.: Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, ročník 44, č. 7, 2014, ISSN 0103-8478, doi: 10.1590/0103-8478cr20130971.

- [66] Vysloužil, J.; Dvořáčková, K.; Kejdušová, M.; aj.: Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické Listy*, ročník 107, č. 1, 2013, ISSN 00092770.
- [67] Lengyel, M.; Kállai-Szabó, N.; Antal, V.; aj.: Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. 2019, doi:10.3390/scipharm87030020.
- [68] Martins, I. M.; Barreiro, M. F.; Coelho, M.; aj.: Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. 2014, doi:10.1016/j.cej.2014.02.024.
- [69] Shokri, J.; Adibki, K.: Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. In *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*, editace T. van de Ven, InTech, 2013, ISBN 9789535111917, doi:10.5772/55178.
- [70] Van Parys, M.: Smart Textiles Using Microencapsulation Technology. In *Functional Coatings: By Polymer Microencapsulation*, editace S. K. Ghosh, Weinheim: John Wiley & Sons, jul 2006, ISBN 9783527312962, s. 221–258.
- [71] Romero-Cano, M. S.; Vincent, B.: Controlled release of 4-nitroanisole from poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, ročník 82, č. 1, 2002, ISSN 01683659, doi:10.1016/S0168-3659(02)00130-X.
- [72] Martins, I. M.; Rodrigues, S. N.; Barreiro, M. F.; aj.: Release studies of thymol and p -cymene from polylactide microcapsules. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, ročník 51, č. 35, 2012, ISSN 08885885, doi: 10.1021/ie301406f.
- [73] Ghosh, S. K.: Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. In *Functional Coatings*, editace S. K. Ghosh, Weinheim: John Wiley & Sons, jul 2006, ISBN 9783527312962, s. 1–28, doi:10.1002/3527608478.ch1.
- [74] Freitas, S.; Merkle, H. P.; Gander, B.: Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, ročník 102, č. 2, 2005, ISSN 01683659, doi:10.1016/j.jconrel.2004.10.015.
- [75] Tabata, Y.; Gutta, S.; Langer, R.: Controlled Delivery Systems for Proteins Using Polyanhydride Microspheres. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, ročník 10, č. 4, 1993, ISSN 1573904X, doi:10.1023/A:1018929531410.
- [76] Alagusundaram, M.; Madhu Sudana Chetty, C.; Umashankari, K.; aj.: Microspheres as a novel drug delivery system - A review. *International Journal of ChemTech Research*, ročník 1, č. 3, 2009, ISSN 09744290.

- [77] Brannon-Peppas, L.: Polymers in controlled drug delivery. *Medical Plastic and Biomaterials*, ročník 2, č. 4, 1997.
- [78] Strbak, O.; Antal, I.; Gogola, D.; aj.: Measurement of the magnetite nanoparticles' relaxivity during encapsulation into polylactide carriers. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, ročník 104, 2017, ISSN 02632241, doi:10.1016/j.measurement.2017.03.019.
- [79] Costa Lima, S.; Rodrigues, V.; Garrido, J.; aj.: In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against *Leishmania infantum* protozoa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, ročník 39, č. 5, 2012, ISSN 09248579, doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.01.003.
- [80] Lee, W. C.; Li, Y. C.; Chu, I. M.: Amphiphilic poly(D,L-lactic acid)/poly(ethylene glycol)/poly(D,L-lactic acid) nanogels for controlled release of hydrophobic drugs. *Macromolecular Bioscience*, ročník 6, č. 10, 2006, ISSN 16165187, doi:10.1002/mabi.200600101.
- [81] Gorrasi, G.; Pantani, R.: Hydrolysis and Biodegradation of Poly(lactic acid). *Advances in Polymer Science*, ročník 279, 2018: s. 119–151, ISSN 00653195.
- [82] Lee, B. K.; Yun, Y.; Park, K.: PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, ročník 107, 2016, ISSN 18728294, doi:10.1016/j.addr.2016.05.020.
- [83] Castro-Aguirre, E.; Iñiguez-Franco, F.; Samsudin, H.; aj.: Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*, ročník 107, 2016, ISSN 18728294, doi:10.1016/j.addr.2016.03.010.
- [84] Hamad, K.; Kaseem, M.; Deri, F.: Effect of recycling on rheological and mechanical properties of poly(lactic acid)/polystyrene polymer blend. *Journal of Materials Science*, ročník 46, č. 9, 2011, ISSN 00222461, doi: 10.1007/s10853-010-5179-8.
- [85] Lim, L. T.; Auras, R.; Rubino, M.: Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, ročník 33, č. 8, 2008, ISSN 00796700, doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004.
- [86] Murariu, M.; Dubois, P.: PLA composites: From production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*, ročník 107, 2016, ISSN 18728294, doi: 10.1016/j.addr.2016.04.003.
- [87] Rasal, R. M.; Janorkar, A. V.; Hirt, D. E.: Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*, ročník 35, č. 3, 2010, ISSN 00796700, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003.

- [88] Vano-Herrera, K.; Misiun, A.; Vogt, C.: Preparation and characterization of poly(lactic acid)/poly(methyl methacrylate) blend tablets for application in quantitative analysis by micro Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, ročník 46, č. 2, 2015, ISSN 10974555, doi: 10.1002/jrs.4603.
- [89] Yu, L.; Dean, K.; Li, L.: Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science*, ročník 31, č. 6, 2006, ISSN 00796700, doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.03.002.
- [90] Imre, B.; Pukánszky, B.: Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. *European Polymer Journal*, ročník 49, č. 6, 2013, ISSN 00143057, doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.01.019.
- [91] Auras, R.; Lim, L. T.; Selke, S. E.; aj.: *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons, sep 2010, ISBN 9780470293669.
- [92] Ferreira, S. A.; Gama, F. M.; Vilanova, M.: Polymeric nanogels as vaccine delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, ročník 9, č. 2, 2013, ISSN 15499634, doi:10.1016/j.nano.2012.06.001.
- [93] Shimko, D. A.; Nauman, E. A.: Development and characterization of a porous poly(methyl methacrylate) scaffold with controllable modulus and permeability. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, ročník 80, č. 2, 2007, ISSN 15524973, doi:10.1002/jbm.b. 30605.
- [94] Shirahase, T.; Komatsu, Y.; Tominaga, Y.; aj.: Miscibility and hydrolytic degradation in alkaline solution of poly(l-lactide) and poly(methyl methacrylate) blends. *Polymer*, ročník 47, č. 13, 2006, ISSN 00323861, doi: 10.1016/j.polymer.2006.04.012.
- [95] Mleziva, J.; Šňupárek, J.: *Polymery - výroba, struktura, vlastnosti a použití*. Praha: Sobotáles, druhé vydání, 2000, ISBN 80-85920-72-7.
- [96] Dash, S.; Murthy, P. N.; Nath, L.; aj.: Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, ročník 67, č. 3, 2010, ISSN 00016837.
- [97] Huang, X.; Brazel, C. S.: On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, ročník 73, č. 2-3, 2001, ISSN 01683659, doi:10.1016/S0168-3659(01) 00248-6.
- [98] Mamy, L.; Barriuso, E.; Gabrielle, B.: Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosateresistant crops. *Pest Management Science*, ročník 61, č. 9, 2005, ISSN 1526498X, doi:10.1002/ps.1108.

- [99] Gavara, R.; López Carballo, G.; Hernández Munoz, P.; aj.: *Practical Guide to Antimicrobial Active Packaging*. Shawbury: Smithers Pira, oct 2015, ISBN 9781910242100.
- [100] Ziyat, H.; Naciri Bennani, M.; Hajjaj, H.; aj.: Adsorption of Thymol onto Natural Clays of Morocco: Kinetic and Isotherm Studies. *Journal of Chemistry*, ročník 2020, 2020, ISSN 20909071, doi:10.1155/2020/4926809.
- [101] Keller, J. U.; Staudt, R.: *Gas Adsorption Equilibria*. New York: SpringerVerlag, jan 2005, ISBN 978-0387235974.
- [102] Xanthos, M.: Polymers and Polymer Composites. In *Functional Fillers for Plastics*, editace M. Xanthos, Weinheim: John Wiley & Sons, druhé vydání, sep 2010, ISBN 9783527629855, s. 1–18.
- [103] Gunjal, J.; Aggarwal, P.; Chauhan, S.: Changes in colour and mechanical properties of wood polypropylene composites on natural weathering. *Maderas: Ciencia y Tecnologia*, ročník 22, č. 3, 2020, ISSN 0718221X, doi:10.4067/S0718-221X2020005000307.
- [104] Rother, R.: *Fillers for Polymer Applications - Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Chester: Springer International Publishing, mar 2017, ISBN 9783319281162, – s.
- [105] Ahmadi, B.; Shekarchi, M.: Use of natural zeolite as a supplementary cementitious material. *Cement and Concrete Composites*, ročník 32, č. 2, 2010, ISSN 09589465, doi:10.1016/j.cemconcomp.2009.10.006.
- [106] Auerbach, S. M.; Carrado, K. A.; Dutta, P. K.: *Handbook of Zeolite Science and Technology*. New York: CRC Press, jul 2003, ISBN 9780203911167.
- [107] Lee, J. Y.; Shim, M. J.; Kim, S. W.: Effect of natural zeolite on the mechanical properties of epoxy matrix. *Polymer Engineering and Science*, ročník 39, č. 10, 1999, ISSN 00323888, doi:10.1002/pen.11592.
- [108] Zhang, J.; Yu, M.; Yuan, P.; aj.: Controlled release of volatile (-)-menthol in nanoporous silica materials. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, ročník 71, č. 3-4, 2011, ISSN 09230750, doi:10.1007/s10847-011-9996-4.
- [109] Nakhli, A.; Mbouga, M. G. N.; Bergaoui, M.; aj.: Modeling of essential oils adsorption onto clays towards a better understanding of their interactions. *Journal of Molecular Liquids*, ročník 249, 2018, ISSN 01677322, doi:10.1016/j.molliq.2017.11.012.
- [110] Ziyat, H.; Naciri Bennani, M.; Hajjaj, H.; aj.: Synthesis and characterization of crude hydrotalcite Mg–Al–CO₃: study of thymol adsorption. *Research on*

Chemical Intermediates, ročník 44, č. 7, 2018, ISSN 15685675, doi:10.1007/s11164-018-3361-9.

[111] Torin, R. F. d. S.; Camani, P. H.; da Silva, L. N.; aj.: Effect of clay and clay/essential oil in packaging films. *Polymer Composites*, ročník 39, č. 11, 2018, ISSN 15480569, doi:10.1002/pc.24457.

[112] Cerisuelo, J. P.; Alonso, J.; Aucejo, S.; aj.: Modifications induced by the addition of a nanoclay in the functional and active properties of an EVOH film containing carvacrol for food packaging. *Journal of Membrane Science*, ročník 423-424, 2012, ISSN 03767388, doi:10.1016/j.memsci.2012.08.021.

[113] El Miz, M.; Sahli, S.; El Bachiri, A.; aj.: Adsorption of essential oil components of *Lavandula angustifolia* on sodium modified bentonite from Nador (North-East Morocco). *African Journal of Biotechnology*, ročník 13, č. 33, 2014: s. 3413–3425, ISSN 1684-5315, doi:10.5897/AJB2013.13450.

[114] Biddeci, G.; Cavallaro, G.; Di Blasi, F.; aj.: Halloysite nanotubes loaded with peppermint essential oil as filler for functional biopolymer film. *Carbohydrate Polymers*, ročník 152, 2016, ISSN 01448617, doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.041.

[115] Letterman, R.: *Water Quality & Treatment Handbook*. McGraw-Hill Companies, páté vydání, oct 1999, ISBN 9780070016590.

[116] Moreno-Castilla, C.: Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon*, ročník 42, č. 1, 2004, ISSN 00086223, doi:10.1016/j.carbon.2003.09.022.

[117] Langmuir, I.: The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, ročník 40, č. 9, 1918, ISSN 15205126, doi:10.1021/ja02242a004.

[118] Mančík, P.: *Příprava a charakterizace karbon-silikátových nanosorbentů s vysokým specifickým povrchem*. Disertační práce, Vysoká škola báňská Technická univerzita Ostrava, Ostrava, 2018.

[119] Hall, K. R.; Eagleton, L. C.; Acrivos, A.; aj.: Pore- and solid-diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, ročník 5, č. 2, 1966, ISSN 01964313, doi:10.1021/i160018a011.

[120] Nguemtchouin, M. M.; Ngassoum, M. B.; Ngamo, L. S.; aj.: Adsorption of essential oil components of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae) by kaolin from Wak, Adamawa province (Cameroon). *Applied Clay Science*, ročník 44, č. 1-2, 2009, ISSN 01691317, doi:10.1016/j.clay.2008.10.010.

- [121] Freundlich, H. M. F.: Over the adsorption in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, ročník 57, č. 385, 1906.
- [122] Limousin, G.; Gaudet, J. P.; Charlet, L.; aj.: Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. 2007, doi:10.1016/j.apgeochem.2006.09.010.
- [123] Alkan Tas, B.; Sehit, E.; Erdinc Tas, C.; aj.: Carvacrol loaded halloysite coatings for antimicrobial food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, ročník 20, 2019, ISSN 22142894, doi:10.1016/j.fpsl.2019.01.004.
- [124] Suppakul, P.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; aj.: Diffusion of linalool and methylchavicol from polyethylene-based antimicrobial packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, ročník 44, č. 9, 2011: s. 1888–1893, ISSN 00236438, doi:10.1016/j.lwt.2011.03.024.
- [125] Suppakul, P.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; aj.: Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of Food Engineering*, ročník 105, č. 2, 2011: s. 270–276, ISSN 02608774, doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.02.031.
- [126] Wattananawinrat, K.; Threepopnatkul, P.; Kulsetthanchalee, C.: Morphological and thermal properties of LDPE/EVA blended films and development of antimicrobial activity in food packaging film. *Energy Procedia*, ročník 56, č. C, 2014, ISSN 18766102, doi:10.1016/j.egypro.2014.07.125.
- [127] Herath, L. S. R.: *Development and evaluation of low density polyethylenebased antimicrobial food packaging films containing natural agents*. Phd thesis, Victoria University, Melbourne, sep 2010.
- [128] Mistry, Y.: *Development of LDPE-based antimicrobial films for food packaging*. Research master thesis, Victoria University, Melbourne, jul 2006.
- [129] Dias, M. V.; de Medeiros, H. S.; Soares, N. d. F. F.; aj.: Development of low-density polyethylene films with lemon aroma. *LWT - Food Science and Technology*, ročník 50, č. 1, 2013, ISSN 00236438, doi:10.1016/j.lwt.2012.06.005.
- [130] Tornuk, F.; Hancer, M.; Sagdic, O.; aj.: LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. *LWT- Food Science and Technology*, ročník 64, č. 2, 2015, ISSN 00236438, doi:10.1016/j.lwt.2015.06.030.
- [131] Krepker, M.; Zhang, C.; Nitzan, N.; aj.: Antimicrobial LDPE/EVOH layered films containing carvacrol fabricated by multiplication extrusion. *Polymers*, ročník 10, č. 8, 2018, ISSN 20734360, doi:10.3390/polym10080864.
- [132] Canales, D.; Montoille, L.; Rivas, L. M.; aj.: Fungicides films of lowdensity polyethylene (LDPE)/inclusion complexes (Carvacrol and Cinnamaldehyde)

against botrytis cinerea. *Coatings*, ročník 9, č. 12, 2019, ISSN 20796412, doi:10.3390/coatings9120795.

[133] Diaz, E.; Olivas-Armendariz, I.; Rodriguez, C.; aj.: Polyestylene and Low Density Polyethylene Oregano's Essential Oil Functionalization for Possible Antimicrobial Active Packaging Applications. *The Journal of Applied Packaging Research*, ročník 10, sep 2018: s. 70–82.

[134] Alonso, Y. N.; Grafia, A. L.; Castillo, L. A.; aj.: Lemon essential oil desorption from polypropylene/talc nanocomposite films. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, ročník 25, č. 12, 2016, ISSN 17355265, doi:10.1007/s13726-016-0485-x.

[135] Kim, I. H.; Han, J.; Na, J. H.; aj.: Insect-Resistant Food Packaging Film Development Using Cinnamon Oil and Microencapsulation Technologies. *Journal of Food Science*, ročník 78, č. 2, 2013, ISSN 00221147, doi:10.1111/1750-3841.12006.

[136] Liakos, I. L.; D'autilia, F.; Garzoni, A.; aj.: All natural cellulose acetate—Lemongrass essential oil antimicrobial nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, ročník 510, č. 2, 2016, ISSN 18733476, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.060.

[137] Teeka, P.; Chaiyasat, A.; Chaiyasat, P.: Preparation of poly (methyl methacrylate) microcapsule with encapsulated jasmine oil. *Energy Procedia*, ročník 56, č. C, 2014, ISSN 18766102, doi:10.1016/j.egypro.2014.07.147.

[138] Hao, X.; Kaschta, J.; Pan, Y.; aj.: Intermolecular cooperativity and entanglement network in a miscible PLA/PMMA blend in the presence of nanosilica. *Polymer*, ročník 82, 2016, ISSN 00323861, doi:10.1016/j.polymer.2015.11.029.

[139] Samuel, C.; Barrau, S.; Lefebvre, J. M.; aj.: Designing multiple-shape memory polymers with miscible polymer blends: Evidence and origins of a triple-shape memory effect for miscible PLLA/PMMA blends. *Macromolecules*, ročník 47, č. 19, 2014, ISSN 15205835, doi:10.1021/ma500846x.

[140] Velasco, D.; Benito, L.; Fernández-Gutiérrez, M.; aj.: Preparation in supercritical CO₂ of porous poly(methyl methacrylate)-poly(l-lactic acid) (PMMA-PLA) scaffolds incorporating ibuprofen. *Journal of Supercritical Fluids*, ročník 54, č. 3, 2010, ISSN 08968446, doi:10.1016/j.supflu.2010.05.012.

[141] Cossement, D.; Gouttebaron, R.; Cornet, V.; aj.: PLA-PMMA blends: A study by XPS and ToF-SIMS. *Applied Surface Science*, ročník 252, č. 19, 2006, ISSN 01694332, doi:10.1016/j.apsusc.2006.02.225.

[142] Eguiburu, J. L.; Iruin, J. J.; Fernandez-Berridi, M. J.; aj.: Blends of amorphous and crystalline polylactides with poly(methyl methacrylate) and

poly(methyl acrylate): A miscibility study. *Polymer*, ročník 39, č. 26, 1998, ISSN 00323861, doi:10.1016/S0032-3861(98)00182-7.

[143] Zhang, G.; Zhang, J.; Wang, S.; aj.: Miscibility and phase structure of binary blends of polylactide and poly(methyl methacrylate). *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, ročník 41, č. 1, 2002, ISSN 08876266, doi:10.1002/polb.10353.

[144] Friedman, M.; Henika, P. R.; Mandrell, R. E.: Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of food protection*, ročník 65, č. 10, 2002: s. 1545–60, ISSN 0362-028X.

[145] Domínguez, R.; Barba, F. J.; Gómez, B.; aj.: Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Research International*, ročník 113, 2018, ISSN 18737145, doi:10.1016/j.foodres.2018.06.073.

[146] Hashemi, S. M. B.; Khorram, S. B.; Sohrabi, M.: Antioxidant Activity of Essential Oils in Foods. In *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*, editace S. M. B. Hashemi; A. M. Khaneghah; A. d. S. Sant'Ana, Oxford: John Wiley & Sons, 2017, ISBN 9781119149347, s. 247–265.

[147] Noori, S.; Zeynali, F.; Almasi, H.: Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*, ročník 84, 2018, ISSN 09567135, doi:10.1016/j.foodcont.2017.08.015.

[148] Karagönlü, S.; Başal, G.; Özyıldız, F.; aj.: Preparation of Thyme Oil Loaded Microcapsules for Textile Applications. *International Journal of New Technology and Research*, ročník 4, č. 3, 2018, ISSN 2454-4116.

[149] Khajavi, R.; Ahrari, M.; Toliyat, T.; aj.: Molecular encapsulation of lavender essential Oil by β -Cyclodextrin and dimethyl dihydroxy ethylene urea for fragrance finishing of cotton fabrics. *Asian Journal of Chemistry*, ročník 25, č. 1, 2013, ISSN 09707077, doi:10.14233/ajchem.2013.13173.

[150] Bakry, A. M.; Abbas, S.; Ali, B.; aj.: Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, ročník 15, č. 1, 2016, ISSN 15414337, doi:10.1111/1541-4337.12179.

[151] Specos, M. M.; García, J. J.; Tornesello, J.; aj.: Microencapsulated citronella oil for mosquito repellent finishing of cotton textiles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, ročník 104, č. 10, 2010, ISSN 00359203, doi:10.1016/j.trstmh.2010.06.004.

- [152] Sánchez-Navarro, M. M.; Cuesta-Garrote, N.; Arán-Áis, F.; aj.: Microencapsulation of melaleuca alternifolia (tea tree) oil as biocide for footwear applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, ročník 32, č. 12, 2011, ISSN 01932691, doi:10.1080/01932691.2011.616126.
- [153] Kupaei, M. A.; Garmakhany, A. D.: Effect of microencapsulated essential oils on the storage life of mango fruit (*Mangifera indica* L, cv Chaunsa). *Minerva Biotechnologica*, ročník 26, č. 1, 2014, ISSN 11204826.
- [154] Alikhani-Koupaei, M.: Liposome-entrapped essential oils on in vitro and in vivo antioxidant activity in leafy vegetables. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, ročník 7, č. 3, 2015, ISSN 1757837X, doi:10.3920/QAS2013.0298.
- [155] Chung, S. K.; Seo, J. Y.; Lim, J. H.; aj.: Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system. *Journal of Food Science*, ročník 78, č. 5, 2013, ISSN 00221147, doi:10.1111/1750-3841.12111.
- [156] Suraweera, R.; Pasansi, H. G. P.; Herath, H.; aj.: Formulation and stability evaluation of ketoprofen loaded virgin coconut oil based creamy emulsion. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, ročník 6, č. 8, 2014: s. 249–254, ISSN 0975-1491.
- [157] Kirk, R. E.; Othmer, D. F.; Newburger, S. H.: *Kirk - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, ročník 36. New York: John Wiley & Sons, Čtvrté vydání, dec 2000, ISBN 9780471484943, 1190a–1191 s.
- [158] Mukherjee, P. K.; Maity, N.; Nema, N. K.; aj.: Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, ročník 19, č. 1, 2011, ISSN 1618095X, doi:10.1016/j.phymed.2011.10.003.
- [159] Chifiriuc, C.; Grumezescu, V.; Grumezescu, A. M.; aj.: Hybrid magnetite nanoparticles/rosmarinus officinalis essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. *Nanoscale Research Letters*, ročník 7, 2012, ISSN 1556276X, doi:10.1186/1556-276X-7-209.
- [160] Solomon, B.; Sahle, F. F.; Gebre-Mariam, T.; aj.: Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, ročník 80, č. 1, 2012, ISSN 09396411, doi:10.1016/j.ejpb.2011.08.003.
- [161] Yechiel, E.; Coste, R. L.: From Ancient Potions to Modern Lotions. In *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products*, editace M. Rosen, Norwich: William Andrew, sep 2005, ISBN 9780815516828, s. 119–134.
- [162] Santana, M. F.; Quintans-Júnior, L. J.; Cavalcanti, S. C.; aj.: PCymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Revista Brasileira de*

Farmacognosia, ročník 21, č. 6, 2011, ISSN 0102695X, doi: 10.1590/S0102-695X2011005000156.

[163] Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M.: Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, ročník 37, č. 2, 2012, ISSN 00796700, doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005.

[164] Santos, M. R.; Fonseca, A. C.; Mendonça, P. V.; aj.: Recent developments in antimicrobial polymers: A review. *Materials*, ročník 9, č. 7, 2016, ISSN 19961944, doi:10.3390/MA9070599.

[165] Ravensdale, J. T.; Coorey, R.; Dykes, G. A.: Integration of Emerging Biomedical Technologies in Meat Processing to Improve Meat Safety and Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, ročník 17, č. 3, 2018, ISSN 15414337, doi:10.1111/1541-4337.12339.

[166] Calo, J. R.; Crandall, P. G.; O'Bryan, C. A.; aj.: Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, ročník 54, 2015, ISSN 09567135, doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040.

[167] Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. L.: Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, ročník 3, č. JAN, 2012, ISSN 1664302X, doi:10.3389/fmicb.2012.00012.

[168] Bassolé, I. H. N.; Juliani, H. R.: Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, ročník 17, č. 4, 2012, ISSN 14203049, doi:10.3390/molecules17043989.

[169] Aguirre, A.; Borneo, R.; Leon, A. E.: Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, ročník 1, 2013, ISSN 22124292, doi:10.1016/j.fbio.2012.12.001.

[170] Sorrentino, A.; Gorrasi, G.; Vittoria, V.: Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, ročník 18, č. 2, 2007, ISSN 09242244, doi:10.1016/j.tifs.2006.09.004.

[171] Theapsak, S.; Watthanaphanit, A.; Rujiravanit, R.: Preparation of chitosan-coated polyethylene packaging films by DBD plasma treatment. *ACS Applied Materials and Interfaces*, ročník 4, č. 5, 2012, ISSN 19448244, doi:10.1021/am300168a.

[172] Tang, R.; Muhammad, A.; Yang, J.; aj.: Preparation of antifog and antibacterial coatings by photopolymerization. *Polymers for Advanced Technologies*, ročník 25, č. 6, 2014, ISSN 10991581, doi:10.1002/pat.3267.

- [173] Dhende, V. P.; Samanta, S.; Jones, D. M.; aj.: One-step photochemical synthesis of permanent, nonleaching, ultrathin antimicrobial coatings for textiles and plastics. *ACS Applied Materials and Interfaces*, ročník 3, č. 8, 2011, ISSN 19448244, doi:10.1021/am200324f.
- [174] Yao, W. H.; Chen, J. C.; Chen, C. C.: Excellent anti-bacterial activity and surface properties of polyamide-6 films modified with argon-plasma and methyl diallyl ammonium salt-graft. *Polymers for Advanced Technologies*, ročník 19, č. 11, 2008, ISSN 10427147, doi:10.1002/pat.1156.
- [175] Durairaj, R. B.: Resorcinol additives for packaging extend product life for food and drink. *Plastics, Additives and Compounding*, ročník 1, č. 5, 1999, ISSN 1464391X, doi:10.1016/s1464-391x(99)80115-9.
- [176] Appendini, P.; Hotchkiss, J. H.: Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, ročník 3, č. 2, 2002, ISSN 14668564, doi:10.1016/S1466-8564(02)00012-7.
- [177] Liang, Z.; Zhu, M.; Yang, Y. W.; aj.: Antimicrobial activities of polymeric quaternary ammonium salts from poly(glycidyl methacrylate)s. *Polymers for Advanced Technologies*, ročník 25, č. 1, 2014, ISSN 10427147, doi:10.1002/pat.3212.
- [178] Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; aj.: Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, ročník 68, č. 2, 2003, ISSN 00221147, doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x.
- [179] Bajpai, V. K.; Sharma, A.; Baek, K. H.: Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, ročník 32, č. 2, 2013, ISSN 09567135, doi:10.1016/j.foodcont.2013.01.032.
- [180] Basak, S.; Guha, P.: Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: Characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *LWT - Food Science and Technology*, ročník 75, 2017, ISSN 00236438, doi:10.1016/j.lwt.2016.10.021.
- [181] Huang, B.; Ban, X.; He, J.; aj.: Comparative analysis of essential oil components and antioxidant activity of extracts of *Nelumbo nucifera* from various areas of China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ročník 58, č. 1, 2010, ISSN 00218561, doi:10.1021/jf902643e.
- [182] Hussain, A. I.; Anwar, F.; Hussain Sherazi, S. T.; aj.: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, ročník 108, č. 3, 2008, ISSN 03088146, doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.010.

- [183] Atsumi, T.; Tonosaki, K.: Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. *Psychiatry Research*, ročník 150, č. 1, 2007, ISSN 01651781, doi:10.1016/j.psychres.2005.12.012.
- [184] Park, S. N.; Lim, Y. K.; Freire, M. O.; aj.: Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, ročník 18, č. 3, 2012, ISSN 10759964, doi:10.1016/j.anaerobe.2012.04.001.
- [185] Gharib, R.; Haydar, S.; Charcosset, C.; aj.: First study on the release of a natural antimicrobial agent, estragole, from freeze-dried delivery systems based on cyclodextrins and liposomes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, ročník 52, 2019, ISSN 17732247, doi:10.1016/j.jddst.2019.05.032.
- [186] Domiciano, T. P.; Dalalio, M. M. H. D. O.; Silva, E. L.; aj.: Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, ročník 386, č. 4, 2013, ISSN 00281298, doi: 10.1007/s00210-012-0820-5.
- [187] Newberne, P.; Smith, R. L.; Doull, J.; aj.: The FEMA GRAS assessment of trans-anethole used as a flavouring substance. 1999, doi:10.1016/S0278-6915(99)00037-X.
- [188] Bickers, D.; Calow, P.; Greim, H.; aj.: A toxicologic and dermatologic assessment of linalool and related esters when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, ročník 41, č. 7, 2003, ISSN 02786915, doi: 10.1016/S0278-6915(03)00016-4.
- [189] Cohen, S. M.; Eisenbrand, G.; Fukushima, S.; aj.: GRAS 28 flavoring substances. *Food Technology*, ročník 72, č. 7, 2018, ISSN 00156639.
- [190] Ramos, M.; Beltran, A.; Valdes, A.; aj.: Carvacrol and thymol for fresh food packaging. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, ročník 5, č. 4, 2013, ISSN 09750851, doi:10.4172/jbb.1000151.
- [191] Muriel-Galet, V.; Cerisuelo, J. P.; López-Carballo, G.; aj.: Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad. *Food Control*, ročník 30, č. 1, 2013, ISSN 09567135, doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.032.
- [192] Solano, A. C. V.; de Gante, C. R.: Two Different Processes to Obtain Antimicrobial Packaging Containing Natural Oils. *Food and Bioprocess Technology*, ročník 5, č. 6, 2012, ISSN 19355130, doi:10.1007/s11947-011-0626-3.
- [193] Sanla-Ead, N.; Jangchud, A.; Chonhenchob, V.; aj.: Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into

cellulose-based packaging films. *Packaging Technology and Science*, ročník 25, č. 1, 2012, ISSN 08943214, doi:10.1002/pts.952.

[194] Dias, M. V.; Melo, N. R.; Soares, N. D. F. F.; aj.: Application of flavoring active films of low-density polyethylene in sugar biscuits. *Journal of Food Process Engineering*, ročník 36, č. 5, 2013, ISSN 01458876, doi:10.1111/jfpe.12029.

[195] Ramos, M.; Jiménez, A.; Peltzer, M.; aj.: Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, ročník 109, č. 3, 2012, ISSN 02608774, doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.10.031.

[196] Nostro, A.; Scaffaro, R.; D'Arrigo, M.; aj.: Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: Mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, ročník 96, č. 4, 2012, ISSN 01757598, doi:10.1007/s00253-012-4091-3.

[197] Yang, H. S.; Kim, H. J.; Park, H. J.; aj.: Water absorption behavior and mechanical properties of lignocellulosic filler-polyolefin bio-composites. *Composite Structures*, ročník 72, č. 4, 2006, ISSN 02638223, doi:10.1016/j.compstruct.2005.01.013.

[198] Lee, S. Y.; Yang, H. S.; Kim, H. J.; aj.: Creep behavior and manufacturing parameters of wood flour filled polypropylene composites. *Composite Structures*, ročník 65, č. 3-4, 2004, ISSN 02638223, doi:10.1016/j.compstruct.2003.12.007.

[199] Colom, X.; Carrasco, F.; Pagès, P.; aj.: Effects of different treatments on the interface of HDPE/lignocellulosic fiber composites. *Composites Science and Technology*, ročník 63, č. 2, 2003, ISSN 02663538, doi: 10.1016/S0266-3538(02)00248-8.

[200] Clemons, C.: Wood-plastic composites in the United States: The interfacing of two industries. *Forest Products Journal*, ročník 52, č. 6, 2002, ISSN 00157473.

[201] Ichazo, M. N.; Albano, C.; González, J.; aj.: Polypropylene/wood flour composites: Treatments and properties. *Composite Structures*, ročník 54, č. 2-3, 2001, ISSN 02638223, doi:10.1016/S0263-8223(01)00089-7.

[202] Noel, O.; Clark, R.: Recent Advances in the use of Talc in Wood-plastic Composites. In *8th International Conference on Wood Fiber-plastic Composites*, Madison, may 2005.

[203] Zhou, Y.; Mallick, P. K.: Effects of melt temperature and hold pressure on the tensile and fatigue properties of an injection molded talc-filled polypropylene. *Polymer Engineering and Science*, ročník 45, č. 6, 2005, ISSN 00323888, doi:10.1002/pen.20301.

- [204] Ehrenstein, G.; Engel, L.; Klingele, H.; aj.: *SEM of Plastics Failure REM von Kunststoffschäden*. 2010, doi:10.3139/9783446426658.
- [205] ČSN EN ISO 527-1: *Plasty: Stanovení tahových vlastností - Část 1: Obecné principy*. Praha: Český normalizační institut, 2012.
- [206] ČSN EN ISO 527-3: *Plasty – Stanovení tahových vlastností – Část 3: Zkušební podmínky pro fólie a desky*. Praha: Český normalizační institut, 2019.
- [207] ČSN EN ISO 291: *Plasty: Standardní prostředí pro kondicionování a zkoušení*. Praha: Český normalizační institut, 2009.
- [208] ISO 22196: *Plasty - Měření antimikrobiální aktivity na povrchu plastů*. Ženeva, 2007.
- [209] Churáček, J.: *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, ISBN 80-03-00569-8, 384 s.
- [210] Crawford, C. B.; Quinn, B.: Microplastic identification techniques. In *Microplastic Pollutants*, 2017, doi:10.1016/b978-0-12-809406-8.00010-4.
- [211] Alshabanat, M.: Characterization and Mechanical Properties Study of Intercalated Talc/Polypropylene Nanocomposites. *Journal of American Science*, ročník 9, 2013: s. 322–326.
- [212] Huang, R.; Kim, B. J.; Lee, S.; aj.: Co-extruded wood-plastic composites with talc-filled shells: Morphology, mechanical, and thermal expansion performance. *BioResources*, ročník 8, č. 2, 2013, ISSN 19302126, doi: 10.15376/biores.8.2.2283-2299.
- [213] Ndiaye, D.; Verney, V.; Askanian, H.; aj.: Morphology, Thermal Behavior and Dynamic Rheological Properties of Wood Polypropylene Composites. *Materials Sciences and Applications*, ročník 04, č. 11, 2013, ISSN 2153117X, doi:10.4236/msa.2013.411092.
- [214] Singh, A. P.; Anderson, R.; Park, B. D.; aj.: A novel approach for FESEM imaging of wood-matrix polymer interface in a biocomposite. *Micron*, ročník 54-55, 2013, ISSN 09684328, doi:10.1016/j.micron.2013.08.011.
- [215] Bhaskar, J.; Haq, S.; Pandey, A. K.; aj.: Evaluation of properties of propylene-pine wood plastic composite. *Journal of Materials and Environmental Science*, ročník 3, č. 3, 2012, ISSN 20282508.
- [216] Mallik, A.; Barik, A. K.; Pal, B.: Comparative studies on physicomechanical properties of composite materials of low density polyethylene and raw/calced kaolin. *Journal of Asian Ceramic Societies*, ročník 3, č. 2, 2015, ISSN 21870764, doi:10.1016/j.jascers.2015.03.001.

- [217] Parvin, N.; Ullah, M. S.; Mina, M. F.; aj.: Structures and mechanical properties of talc and carbon black reinforced high density polyethylene composites : Effects of organic and inorganic fillers. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, ročník 37, č. 1, 2013, ISSN 0378-8121, doi:10.3329/jbas.v37i1.15675.
- [218] Marcovich, N. E.; Villar, M. A.: Thermal and mechanical characterization of linear low-density polyethylene/wood flour composites. *Journal of Applied Polymer Science*, ročník 90, č. 10, 2003, ISSN 00218995, doi: 10.1002/app.12934.
- [219] Zaini, M. J.; Ismail, Z.; Fuad, M. Y.; aj.: Application of oil palm wood flour as fillers in polypropylene. *Polymer Journal*, ročník 26, č. 5, 1994, ISSN 13490540, doi:10.1295/polymj.26.637.
- [220] Kneuer, C.; Sameti, M.; Haltner, E. G.; aj.: Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA. *International Journal of Pharmaceutics*, ročník 196, č. 2, 2000, ISSN 03785173, doi:10.1016/S0378-5173(99)00435-4.
- [221] Ibrahim, F.; El-Enany, N.; Shalan, S.; aj.: Second-derivative synchronous spectrofluorimetric determination of neбиволол hydrochloride and amlodipine besylate in their combined dosage form. *Luminescence*, ročník 30, č. 7, 2015, ISSN 15227243, doi:10.1002/bio.2852.
- [222] Kumar, V.; Tyagi, L.; Sinha, S.: Wood flour-reinforced plastic composites: A review. *Reviews in Chemical Engineering*, ročník 27, č. 5-6, 2011, ISSN 01678299, doi:10.1515/REVCE.2011.006.
- [223] Koga, T.; Hirota, N.; Takumi, K.: Bactericidal activities of essential oils of basil and sage against a range of bacteria and the effect of these essential oils on *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiological research*, ročník 154, č. 3, dec 1999: s. 267–73, ISSN 0944-5013, doi:10.1016/S0944-5013(99)80024-X. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10652788>
- [224] Joshi, R.: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) from Western Ghats of North West Karnataka, India. *Ancient Science of Life*, ročník 33, č. 3, 2014, ISSN 0257-7941, doi:10.4103/0257-7941.144618.
- [225] Kim, J.; Marshall, M. R.; Wei, C. i.: Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ročník 43, č. 11, 1995, ISSN 15205118, doi: 10.1021/jf00059a013.
- [226] Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C. S.; aj.: Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free*

Radical Research, ročník 40, č. 2, 2006, ISSN 10715762, doi: 10.1080/10715760500473834.

[227] Hassan, S. T. S.; Majerová, M.; Šudomová, M.; aj.: Antibacterial activity of natural compounds - essential oils. *Ceska a Slovenska farmacie : casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, ročník 64, č. 6, 2015: s. 243–253, ISSN 1210-7816.

[228] Naksang, P.; Tongchitpakdee, S.; Thumanu, K.; aj.: Assessment of antimicrobial activity, mode of action and volatile compounds of *Etilingera pavieana* essential oil. *Molecules*, ročník 25, č. 14, 2020, ISSN 14203049, doi:10.3390/molecules25143245.

[229] Nowak, A.; Kalemba, D.; Krala, L.; aj.: The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiology*, ročník 32, č. 1, 2012, ISSN 07400020, doi:10.1016/j.fm.2012.05.001.

[230] van Willige, R.: *Effects of flavour absorption on foods and their packaging materials*. Dissertation, Wageningen University, may 2002.

[231] W. Halek, G.; Luttmann, J. P.: Sorption Behavior of Citrus-Flavor Compounds in Polyethylenes and Polypropylenes. In *In Food and Packaging Interactions II; ACS Symposium Series 473*, editace S. J. Risch; J. H. Hotchkiss, Washington: American Chemical Society, sep 1991, ISBN 08412-2122-7, s. 212–226, doi:10.1021/bk-1991-0473.ch018.

[232] Arora, D. K.; Hansen, A. P.; Armagost, M.: Sorption of flavor compounds by polypropylene. In *Food and Packaging Interactions II; ACS Symposium Series 473*, editace S. J. Risch; J. H. Hotchkiss, kapitola 17, Washington: American Chemical Society, 1991, ISBN 978-0841221222, s. 203–211.

[233] CHARARA, Z. N.; WILLIAMS, J. W.; SCHMIDT, R. H.; aj.: Orange Flavor Absorption Into Various Polymeric Packaging Materials. *Journal of Food Science*, ročník 57, č. 4, 1992, ISSN 17503841, doi:10.1111/j. 1365-2621.1992.tb14334.x.

[234] Roland, A. M.; Hotchkiss, J. H.: Determination of Flavor—Polymer Interactions by Vacuum-Microgravimetric Method. In *Food and Packaging Interactions II; ACS Symposium Series 473*, editace S. Risch; J. H. Hotchkiss, Washington: American Chemical Society, 1991, ISBN 978-0841221222, s. 149–160, doi:10.1021/bk-1991-0473.ch013.

[235] Osei-Safo, D.; Addae-Mensah, I.; Garneau, F. X.; aj.: A comparative study of the antimicrobial activity of the leaf essential oils of chemo-varieties of

Clausena anisata (Willd.) Hook. f. ex Benth. *Industrial Crops and Products*, ročník 32, č. 3, 2010, ISSN 09266690, doi:10.1016/j.indcrop.2010.07.016.

[236] Silvestre, W. P.; Livinalli, N. F.; Baldasso, C.; aj.: Pervaporation in the separation of essential oil components: A review. *Trends in Food Science and Technology*, ročník 93, 2019, ISSN 09242244, doi:10.1016/j.tifs.2019.09.003.

[237] Majeed, H.; Bian, Y.-Y.; Ali, B.; aj.: Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. *RSC Advances*, ročník 5, č. 72, 2015, ISSN 20462069, doi:10.1039/c5ra06556a.

[238] Grande-Tovar, C. D.; Chaves-Lopez, C.; Serio, A.; aj.: Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science and Technology*, ročník 78, 2018, ISSN 09242244, doi:10.1016/j.tifs.2018.05.019.

[239] Guzmán-Gutiérrez, S. L.; Gómez-Cansino, R.; García-Zebadúa, J. C.; aj.: Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of β -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology*, ročník 143, č. 2, 2012, ISSN 03788741, doi:10.1016/j.jep.2012.07.026.

[240] Huo, M.; Cui, X.; Xue, J.; aj.: Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of Surgical Research*, ročník 180, č. 1, 2013, ISSN 00224804, doi:10.1016/j.jss.2012.10.050.

[241] Batista, P. A.; De Paula Werner, M. F.; Oliveira, E. C.; aj.: The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *Journal of Pain*, ročník 11, č. 11, 2010, ISSN 15265900, doi:10.1016/j.jpain.2010.02.022.

[242] Elisabetsky, E.; Brum, L. F.; Souza, D. O.: Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, ročník 6, č. 2, 1999, ISSN 09447113, doi:10.1016/S0944-7113(99)80044-0.

[243] Linck, V. M.; da Silva, A. L.; Figueiró, M.; aj.: Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*, ročník 17, č. 8-9, 2010, ISSN 09447113, doi:10.1016/j.phymed.2009.10.002.

[244] Narusuye, K.; Kawai, F.; Matsuzaki, K.; aj.: Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neural Transmission*, ročník 112, č. 2, 2005, ISSN 03009564, doi:10.1007/s00702-004-0187-y.

[245] Shin, S.; Kang, C. A.: Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*, ročník 36, č. 2, 2003, ISSN 02668254, doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01271.x.

- [246] Shin, S.: Essential oil compounds from *Agastache rugosa* as antifungal agents against Trichophyton species. *Archives of Pharmacal Research*, ročník 27, č. 3, 2004, ISSN 02536269, doi:10.1007/BF02980063.
- [247] Andrade, T. C.; Lima, S. G.; Freitas, R. M.; aj.: Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of croton zehntneri (euphorbiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, ročník 87, č. 1, 2015, ISSN 16782690, doi:10.1590/0001-3765201520140111.
- [248] Turek, C.; Stintzing, F. C.: Stability of essential oils: A review. 2013, doi:10.1111/1541-4337.12006.
- [249] Jang, I. B.; Sung, J. H.; Choi, H. J.: Synthesis of microcapsule containing oil phase via in-situ polymerization. *Journal of Materials Science*, ročník 40, č. 4, 2005: s. 1031–1033, ISSN 00222461, doi:10.1007/ s10853-005-6527-y.
- [250] Burgesss, D.; Hickey, A.: Microsphere Technology and Applications. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, editace B. J. C. Swarbrick, J., New York: Marcel Dekker Inc., druhé vydání, 2002, s. 1783–1793.
- [251] Peanparkdee, M.; Iwamoto, S.; Yamauchi, R.: MICROENCAPSULATION: A REVIEW OF APPLICATIONS IN THE FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRIES. *Reviews in Agricultural Science*, ročník 4, č. 0, 2016, ISSN 2187-090X, doi:10.7831/ras.4.56.
- [252] Benoit, J. P.: Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology. In *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, editace S. Benita, New York: Marcel Dekker Inc., 1996, s. 35–72.
- [253] Kumar Das, S.; Rajabalaya, R.; Rani David, S.: Microencapsulation techniques and its practices. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, ročník 6, č. 2, 2011: s. 1–23.
- [254] Freiberg, S.; Zhu, X. X.: Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, ročník 282, č. 1-2, 2004, ISSN 03785173, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.013.
- [255] Gurny, R.; Peppas, N. A.; Harrington, D. D.; aj.: Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, ročník 7, č. 1, 1981, ISSN 03639045, doi:10.3109/03639048109055684.
- [256] de Oliveira Mori, C. L. S.; dos Passos, N. A.; Oliveira, J. E; aj.: Nanostructured Polylactic Acid/Candeia Essential Oil Mats Obtained by Electrospinning. *Journal of Nanomaterials*, ročník 16, č. 1, 2015, doi:10.1155/2015/439253

- [257] Sin, L. T.; Rahmat, R. R.; Rahman, W. A. W. A.: *Poly(lactic Acid): PLA Biopolymer Technology and Applications*. 2012, doi:10.1016/C2010-0-65966-9.
- [258] Pistner, H.; Gutwald, R.; Ordnung, R.; aj.: Poly(l-lactide): a long-term degradation study in vivo. I. Biological results. *Biomaterials*, ročník 14, č. 9, 1993, ISSN 01429612, doi:10.1016/0142-9612(93)90066-B.
- [259] Nagarajan, V.; Mohanty, A. K.; Misra, M.: Perspective on Poly(lactic Acid (PLA) based Sustainable Materials for Durable Applications: Focus on Toughness and Heat Resistance. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, ročník 4, č. 6, 2016, ISSN 21680485, doi:10.1021/acssuschemeng.6b00321.
- [260] Farah, S.; Anderson, D. G.; Langer, R.: Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, ročník 107, 2016, ISSN 18728294, doi:10.1016/j.addr.2016.06.012.
- [261] Ali, U.; Karim, K. J. B. A.; Buang, N. A.: A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews*, ročník 55, č. 4, 2015, ISSN 15583716, doi:10.1080/15583724.2015.1031377.
- [262] Ahangaran, F.; Navarchian, A. H.; Picchioni, F.: Material encapsulation in poly(methyl methacrylate) shell: A review. *Journal of Applied Polymer Science*, ročník 136, č. 41, 2019, ISSN 10974628, doi:10.1002/app.48039.
- [263] Hosseini, S. F.; Zandi, M.; Rezaei, M.; aj.: Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, ročník 95, č. 1, 2013, ISSN 01448617, doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.031.
- [264] Skotnicová, K.; Kursá, M.: *Prášková metalurgie VŠB*. Ostrava: Technická univerzita Ostrava, 2013, ISBN 978-80-248-3378-1, 153 s.
- [265] Höhne, G. W. H.; Hemminger, W. F.; Flammersheim, H.-J.: *Differential Scanning Calorimeters*. Berlin: Springer, 2003, ISBN 9783662067109, doi:10.1007/978-3-662-06710-9_3.
- [266] Chalmers, J. M.; Edwards, H. G.; Hargreaves, M. D.: *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. 2012, doi:10.1002/9781119962328.
- [267] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.: Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, ročník 62, č. 19, 1990, ISSN 15206882, doi:10.1021/ac00218a019.
- [268] Rouseff, R. L.; Cadwallader, K. R.: *Headspace Analysis of Foods and Flavors*, ročník 488. Boston, MA: Springer US, 2001, ISBN 978-1-4613-5460-4, doi:10.1007/978-1-4615-1247-9.

- [269] dos Santos, P. P.; Andrade, L. d. A.; Flôres, S. H.; aj.: Nanoencapsulation of carotenoids: a focus on different delivery systems and evaluation parameters. *Journal of Food Science and Technology*, ročník 55, č. 10, 2018, ISSN 09758402, doi:10.1007/s13197-018-3316-6.
- [270] Cardoso, J. J.; Ricci-Júnior, E.; Gentili, D.; aj.: Influence of cardanol encapsulated on the properties of poly(lactic acid) microparticles. *Quimica Nova*, ročník 41, č. 3, 2018, ISSN 16787064, doi:10.21577/0100-4042.20170165.
- [271] Ding, A.; Teng, L.; Zhou, Y.; aj.: Synthesis and characterization of bovine serum albumin-loaded microspheres based on star-shaped PLLA with a xylitol core and their drug release behaviors. *Polymer Bulletin*, ročník 75, č. 7, 2018, ISSN 01700839, doi:10.1007/s00289-017-2197-6.
- [272] Song, Y.; Shang, M.; Zhang, H.; aj.: Process Characteristics and Rheological Properties of Free Radical Polymerization in Microreactors. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, ročník 57, č. 32, 2018, ISSN 15205045, doi:10.1021/acs.iecr.8b02314.
- [273] Peres, L. B.; Peres, L. B.; De Araújo, P. H. H.; aj.: Preparation of PLLA/PMMA and PLLA/PS binary blend nanoparticles by incorporation of PLLA in methyl methacrylate or styrene miniemulsion homopolymerization. *Polimeros*, ročník 25, č. 1, 2015, ISSN 01041428, doi: 10.1590/0104-1428.1707.
- [274] Rodríguez-López, M. I.; Mercader-Ros, M. T. ; Lucas-Abellán, C.; Pellicer, J. A.; aj.: Comprehensive Characterization of Linalool-HP- β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Molecules*, ročník 25, č. 21, 2020, doi: 10.3390/molekuly25215069.
- [275] Kfoury, M.; Landy, D.; Auezov, L.; aj.: Effect of cyclodextrin complexation on phenylpropanoids' solubility and antioxidant activity. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, ročník 10, 2014, doi: 10.3762/bjoc.10.241.
- [276] Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; aj.: PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, ročník 47, č. D1, 2019, ISSN 13624962, doi:10.1093/nar/gky1033.
- [277] Letinski, J.; Halek, G. W.: Interactions of Citrus Flavor Compounds with Polypropylene Films of Varying Crystallinities. *Journal of Food Science*, ročník 57, č. 2, 1992, ISSN 17503841, doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb05521.x.
- [278] Nielsen, T. J.: Limonene and Myrcene Sorption into Refillable Polyethylene Terephthalate Bottles, and Washing Effects on Removal of Sorbed Compounds. *Journal of Food Science*, ročník 59, č. 1, 1994, ISSN 17503841, doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb06936.x.
- [279] Urbánková, M.; Hrabalíková, M.; Poljanšek, I.; aj.: Antibacterial polymer composites based on low-density polyethylene and essential oils immobilized on

various solid carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, ročník 132, č. 47, 2015, ISSN 10974628, doi:10.1002/app.42816.

[280] Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B.; aj.: Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, ročník 1, č. 3, 1989, ISSN 10412905, doi:10.1080/10412905.1989.9697767.

[281] Silva, C. G.; Yudice, E. D.; Campini, P. A.; aj.: The performance evaluation of Eugenol and Linalool microencapsulated by PLA on their activities against pathogenic bacteria. *Materials Today Chemistry*, ročník 21, 2021, ISSN 24685194, doi:10.1016/j.mtchem.2021.100493.

[282] Aso, Y.; Yoshioka, S.; Li Wan Po, A.; aj.: Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(D,L-lactide) microspheres. *Journal of Controlled Release*, ročník 31, č. 1, 1994, ISSN 01683659, doi:10.1016/0168-3659(94)90248-8.

[283] Garlotta, D.: A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, ročník 9, č. 2, 2001, ISSN 15662543, doi:10.1023/A:1020200822435.

[284] Panyam, J.; Dali, M. M.; Sahoo, S. K.; aj.: Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoand microparticles. *Journal of Controlled Release*, ročník 92, č. 1-2, 2003, ISSN 01683659, doi:10.1016/S0168-3659(03)00328-6.

[285] Shuai, X.; Porbeni, F. E.; Wei, M.; aj.: Formation of and coalescence from the inclusion complex of a biodegradable block copolymer and α -cyclodextrin: A novel means to modify the phase structure of biodegradable block copolymers. *Macromolecules*, ročník 34, č. 21, 2001, ISSN 00249297, doi:10.1021/ma0109626.

[286] Varela-Rizo, H.; Bittolo-Bon, S.; Rodriguez-Pastor, I.; aj.: Processing and functionalization effect in CNF/PMMA nanocomposites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, ročník 43, č. 4, 2012, ISSN 1359835X, doi:10.1016/j.compositesa.2011.12.017.

[287] Anakabe, J.; Zaldua Huici, A. M.; Eceiza, A.; aj.: Melt blending of polylactide and poly(methyl methacrylate): Thermal and mechanical properties and phase morphology characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, ročník 132, č. 42, 2015, ISSN 10974628, doi:10.1002/app.42677.

[288] Zhang, J.; Tsuji, H.; Noda, I.; aj.: Weak intermolecular interactions during the melt crystallization of poly(L-lactide) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, ročník 108, č. 31, 2004, ISSN 15206106, doi:10.1021/jp048308q.

- [289] Gupta, A. K., and Sah, G. K.: Miscibility studies of PC/PMMA blends in tetrahydrofuran by viscometry, ftir and sem analysis. *Nanosystems: physics, chemistry, mathematics*, ročník 4, č. 5, 2013, ISSN 2305-7971.
- [290] Yang, Z.; Huang, L.; Yao, X.; aj.: Host-guest complexes of estragole with β -cyclodextrin: an experimental and theoretical investigation. *Flavour and Fragrance Journal*, ročník 32, č. 2, 2017, ISSN 10991026, doi:10.1002/ffj. 3358.
- [291] Herrmann, J.; Bodmeier, R.: The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *Journal of Controlled Release*, ročník 36, č. 1-2, 1995, ISSN 01683659, doi:10.1016/0168-3659(95)00051-9.
- [292] Jain, A. K.; Jain, C. P.; Tanwar, Y. S.; aj.: Formulation, characterization and in vitro evaluation of floating microspheres of famotidine as a gastro retentive dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutics*, ročník 3, č. 3, 2009, ISSN 09738398, doi:10.4103/0973-8398.56302.
- [293] Gomes, C.; Moreira, R. G.; Castell-Perez, E.: Poly (DL-lactide-coglycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. *Journal of Food Science*, ročník 76, č. 2, 2011, ISSN 00221147, doi:10.1111/j.1750-3841. 2010.01985.x.
- [294] Faisant, N.; Siepmann, J.; Richard, J.; aj.: Mathematical modeling of drug release from bioerodible microparticles: Effect of gamma-irradiation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, ročník 56, č. 2, 2003, ISSN 09396411, doi:10.1016/S0939-6411(03)00104-8.
- [295] Hosseini, S. M.; Hosseini, H.; Mohammadifar, M. A.; aj.: Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, ročník 62, 2013, ISSN 01418130, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054.
- [296] Li, Y.; Fabiano-Tixier, A. S.; Ginies, C.; aj.: Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study. *LWT - Food Science and Technology*, ročník 59, č. 2P1, 2014, ISSN 00236438, doi:10.1016/j.lwt.2014.05.064.
- [297] Hansen, C. M.: *Hansen solubility parameters: A user's handbook: Second edition*. 2007, doi:10.1201/9781420006834.
- [298] Ding, Y.; Feng, W.; Huang, D.; aj.: Compatibilization of immiscible PLAbased biodegradable polymer blends using amphiphilic di-block copolymers. *European Polymer Journal*, ročník 118, 2019, ISSN 00143057, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.05.036.
- [299] Biswal, A. K.; Vashisht, I.; Khan, A.; aj.: Synthesis, characterization and antibacterial activity of thymol-loaded polylactic acid microparticles entrapped

with essential oils of varying viscosity. *Journal of Materials Science*, ročník 54, č. 13, 2019, ISSN 15734803, doi:10.1007/s10853-019-03593-7.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Strukturní vzorec (-)-LIN (vlevo) a (+)-LIN (vpravo).....	11
Obr. 2	Strukturní vzorec ALY [36]	12
Obr. 3	Strukturní vzorec ANE [43]	12
Obr. 4	Schéma permeace a difúzního procesu [60].....	17
Obr. 5	Základní typy adsorpčních izoterem [116].....	25
Obr. 6	SEM snímky čistého LDPE (A, B)	46
Obr. 7	SEM snímky LDPE kompozitů LDPE/MS/20 (C, D)	46
Obr. 8	SEM snímky LDPE kompozitů LDPE/TC/20 (E, F)	47
Obr. 9	SEM snímky LDPE kompozitů LDPE/WF/20 (G, H)	47
Obr. 10	Relativní změna Youngova modulu kompozitů v porovnání s čistým LDPE. Směrodatná odchylka se pohybovala do 10 %.....	49
Obr. 11	Relativní změna pevnosti v tahu kompozitů v porovnání s čistým LDPE. Směrodatná odchylka se pohybovala do 10 %.....	50
Obr. 12	Relativní změna poměrného prodloužení při přetržení kompozitů v porovnání s čistým LDPE. Směrodatná odchylka se pohybovala do 10 %	50
Obr. 13	Antibakteriální vlastnosti kompozitů	52
Obr. 14	Koncentrace BAL na pevných nosičích po procesu imobilizace.....	53
Obr. 15	Koncentrace BAL v kompozitech obsahujících TC.....	54
Obr. 16	Koncentrace BAL v kompozitech obsahujících MS.....	55
Obr. 17	Koncentrace BAL v kompozitech obsahujících WF.....	55
Obr. 18	SEM snímky mikrosfér s různými poměry PLA a PMMA. Mikrosféry PLA/PMMA 25:75 (A), PLA/PMMA 50:50 (B) a PLA/PMMA 75:25 (C) a mikrosféry po hydrolyze v 1M NaOH, (PLA/PMMA 25:75 (D), PLA/PMMA 50:50 (E) a PLA/PMMA 75:25 (F)). Měřítka je shodné pro všechny snímky (viz F).....	64
Obr. 19	Závislost T_g na množství PLA v polymerní směsi.....	66
Obr. 20	Porovnání FTIR spekter připravených mikrosfér (A) PLA, (B) PLA/ALY, (C) PMMA, (D) PMMA/ALY, (E) PLA/PMMA 25:75, (F) PLA/PMMA 50:50, (G) PLA/PMMA 75:25 a (H) PLA/PMMA 25:75 (po hydrolyze)	69
Obr. 21	Uvolňování BAL z PLA a PMMA mikrosfér do vodného média	71
Obr. 22	Uvolňování ALY z PLA/PMMA mikrosfér do vodného média.....	72

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti použitých BAL	10
Tabulka 2 Mechanické vlastnosti kompozitů.....	48
Tabulka 3 Charakterizace připravených mikrosfér	63
Tabulka 4 Termické vlastnosti mikrosfér (DSC analýza).....	65
Tabulka 5 Antibakteriální aktivita mikrosfér	67
Tabulka 6 Koeficienty logaritmické regrese	70
Tabulka 7 Hildebrandovy parametry rozpustnosti.....	71

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ΔH_m	Entalpie tání
ΔH_c	Entalpie studené krystalizace
ε	Poměrné prodloužení při přetržení
σ	Pevnost v tahu
AA	Antibakteriální aktivita
BAL	Biologicky aktivní látky
BPS	Biologicky aktivní polymerní systémy
CCM	Česká kolekce mikroorganismů
CFU	Kolonie tvořící jednotka
CTAB	Cetyltrimethylamoniumbromid
D_p	Velikost mikrosfér
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
E	Youngův modul pružnosti
EE	Enkapsulační účinnost
EO	Esenciální oleje
EVA	Ethylenvinylacetát
EVOH	Ethylenvinylalkohol
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GRAS	Generally Recognized As Safe (Všeobecně považovaný za bezpečný)
HDPE	Vysokohustotní polyethylen
HS	Headspace
LDPE	Nízkohustotní polyethylen
LLDPE	Lineární nízkohustotní polyethylen
MHA	Mueller-Hinton Agar
MO	Mikroorganismy

MS	Molekulová síta
PDI	Index polydisperzity
PEG	Polyethylenglykol
PE	Polyethylen
PLA	Polymer kyseliny mléčné
PMMA	Polymethylmethakrylát
PP	Polypropylen
PS	Polystyren
PVA	Polyvinylalkohol
Py/GC/MS	Pyrolyzní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
R	Antimikrobiální aktivita (dle normy ISO 22196)
SCDLP	Soybean Casein Digest Broth with Lecitin and Tween 80
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
TC	Talek
T_{cc}	Teplota studené krystalizace
T_g	Teplota skelného přechodu
T_{g1}	Teplota skelného přechodu PLA
T_{g2}	Teplota skelného přechodu PMMA
T_m	Teplota tání
WF	Dřevní moučka

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem

Dušánková, M., Pummerová, M. and Sedlařík, V. Microspheres of essential oil in polylactic acid and poly(methyl methacrylate) matrices and their blends. *Journal of Microencapsulation*. 2019, 36, 3. ISSN 14645246.

Urbánková, M., Hrabalíková, M., Poljanšek, I., Miskolczi, N. and Sedlařík, V. Antibacterial polymer composites based on low-density polyethylene and essential oils immobilized on various solid carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, 132, 47. ISSN 10974628.

Kucharczyk, P., **Urbánková, M.**, Stloukal, P., Koutný, M. and Sedlařík, V. Influence of natural inorganic impurity on the synthesis of poly(L -lactic acid), properties and nanofabrication. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013, 130, 1. ISSN 10974628.

Duřpeková, S., Martino, A. Di, **Dušánková, M.**, Dröhsler, P., Sedlařík, V. Biopolymer hydrogel based on acid whey and cellulose derivatives for enhancement water retention capacity of soil and slow release of fertilizers. *Polymers*. 2021, 13. ISSN 2073-4360.

Příspěvky v časopisech bez impakt faktoru

Hrabalíková, M., Valášek, P., **Urbánková, M.** and Sedlařík, V. Antibacterial modification of plastics with natural bioactive compounds. *Plasty a kaučuk*, Zlín, Česká republika, 2012. ISSN 0322-7340.

Příspěvky ve sbornících z konferencí

Hurajová, A., **Urbánková, M.** and Sedlařík, V. Aditivum pro hygienizaci zpracovatelských procesů polymerních recyklátů. *Plastko*, Zlín, Česká republika, 2018. ISBN 978-80-7454-727-0.

Urbánková, M., Hrabalíková, M., Poljanšek, I. and Sedlařík, V. Imobilizace biologicky aktivních látek esenciálních olejů na inertních nosičích pro antimikrobiální modifikaci polymerů. *Plastko*, Zlín, Česká republika, 2014. ISBN 978-80-7454-335-7.

Urbánková, M. Využití pyrolýzní plynové chromatografie s hmotnostní detekcí při kvantitativní analýze polymerních přísad, *Chemické listy*, 2014, Česká republika. ISSN 0009-2770.

Urbánková, M., Sedlařík, V., Valášek, P. and Hrabalíková, M. Antimikrobiální vlastnosti aromatických látek zabudovaných v polymerní matici. *Plastko*, Zlín, Česká republika, 2012. ISBN 978-80-7454-137-7.

Urbánková, M. Antimikrobiální modifikátory plastů: Studium imobilizace biologicky aktivních látek na inertních nosičích a jejich vliv na bariérové vlastnosti. Studentská vědecká konference Fakulty technologické, Zlín, Česká republika, 2012. ISBN 978-80-7454-152-0.

Užitný vzor

Hurajová, A., **Urbánková, M.** and Sedlařík, V. Termoplastická předsměs k aromatizaci a antibakteriální modifikaci polymerních recyklátů, užitný vzor č. 31894, 2. července 2018.

ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Miroslava Dušánková (roz. Urbánková)
Datum narození: 20. 05. 1988
Místo narození: Zlín, Česká republika
Bydliště: Kvítková 690, 760 01 Zlín
Mobil: +420 602 594 567
E-mail: dusankova@utb.cz
Národnost: Česká

VZDĚLÁNÍ

2012 – dosud Doktorské studium, Ph.D.
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Studijní program: Chemie a technologie materiálů
(2015 – dosud – mateřská a rodičovská dovolená, péče o děti)

2010 – 2012 Magisterské studium, Ing.
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Studijní program: Technologie, hygiena a ekonomika výroby
potravin

2007 – 2010 Bakalářské studium, Bc.
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Studijní program: Chemie a technologie potravin

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Anglický jazyk Aktivní znalost

ZAHRANIČNÍ STUDIUM

2013 (2 měsíce) Slovinsko, univerzita v Lublani, Biotechnologická fakulta

ODBORNÉ KURZY

2012 Absolvování semináře Systémy managementu bezpečnosti
potravin se zaměřením na požadavky referenčních norem:
HACCP (Věstník Mze č. 2/2010), ČSN EN ISO 22000:2006,
IFS, BRC, PAS 220:2008, ČSN EN 15593:2008

- 2012 Absolvování semináře Systémy managementu se zaměřením na normy: ČSN EN ISO 9001:2009, ČSN EN ISO 14001:2005, ČSN OHSAS 18001:2008
- 2012 Absolvování kurzu: Interní auditor systému managementu bezpečnosti potravin se zaměřením na požadavky referenčních norem: HACCP (Věstník Mze č. 2/2010), ČSN EN ISO 22000:2006, IFS, BRC a ČSN EN ISO 19011:2003
- 2013, 2014 Absolvování Odborného semináře instrumentace firmy Shimadzu, Praha
- 2014 Absolvování Kurzu hmotnostní spektrometrie, Pragolab, Praha

SPOLUPRÁCE NA PROJEKTECH

Interní grantová agentura UTB

- 2012 Grant UTB IGA/2012/005
Vývoj a aplikace metodiky pro výzkum vlastností mikrosfér na bázi nově syntetizovaných biorozložitelných blokových kopolymerů
- 2013 Grant UTB IGA/2013/004
Příprava a charakterizace nových biologicky aktivních polymerních systémů na bázi přírodních látek
- 2014 Grant UTB IGA/2014/012
Výzkum biologicky rozložitelných a antimikrobiálních polymerních systémů

Projekty externích poskytovatelů

- 2013-2015 Projekt Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LE12002 – „Centrum pro podporu mezinárodní spolupráce v oblasti výzkumu a vývoje v technických oborech“
- 2014-2015 Projekt Centrum polymerních systémů CZ.1.05/2.1.00/03.0111
- 2014-2015 Projekt Centra kompetence TE02000006 - “Centrum alternativních ekologicky šetrných vysoce účinných

antimikrobiálních prostředků pro průmyslové aplikace“ v konsorciu UTB a 7 partnerů (SYNPO, akciová společnost, Centrum organické chemie s.r.o., Fatra, a.s., Státní zdravotní ústav, Univerzita Palackého v Olomouci – Přírodovědecká fakulta, INOTEX spol. s r.o., Biomedica, spol. s r.o.)

2017-2018

Projekt Technologické Agentury České Republiky-04/1/2016/GAMA – Aditivum pro hygienizaci zpracovatelských procesů polymerních recyklátů a pryží

PŘÍLOHY

Publikace I

- **Urbánková, M.**, Hrabalíková, M., Poljanšek, I., Miskolczi, N. and Sedlařík, V. Antibacterial polymer composites based on low-density polyethylene and essential oils immobilized on various solid carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015, 132, 47. ISSN 1097462

Publikace II

- **Dušíanková, M.**, Pummerová, M. and Sedlařík, V. Microspheres of essential oil in polylactic acid and poly(methyl methacrylate) matrices and their blends. *Journal of Microencapsulation*. 2019, 36, 3. ISSN 14645246.

Publikace I

Antibacterial polymer composites based on low-density polyethylene and essential oils immobilized on various solid carriers

Miroslava Urbankova,¹ Martina Hrabalikova,¹ Ida Poljansek,² Norbert Miskolczi,³ Vladimir Sedlarik¹

¹Center of Polymer Systems, University Institute, Tomas Bata University in Zlin, T. Bati 5678, Zlin 76001, Czech Republic

²Department of Wood Science and Technology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Ljubljana 1000, Slovenia

³Chemical Engineering and Process Engineering Institute, University of Pannonia, 10 Egyetem, Veszprem 8200, Hungary

Correspondence to: V. Sedlarik (E-mail: sedlarik@ft.utb.cz)

ABSTRACT: In this study, we investigated the antibacterial modification of polymers with biologically active substances in essential oils [EOs; linalool, 4-allylanisole (ALY), and *trans*-anethole]. These compounds were thermoplastically incorporated into a low-density polyethylene matrix via solid inert carriers [wood flour (WF) and talc and molecular sieves] with physically immobilized EOs. The concentrations of the antibacterial modifiers on the carriers and in the resulting composites were determined with three chromatographic techniques (gas chromatography with mass spectrometry, pyrolysis and gas chromatography with mass spectrometry, and high-performance liquid chromatography). The effects of such modifications to the mechanical properties of the prepared composites were studied by stress–strain analysis. Interactions on the polymer matrix carriers were observed by scanning electron microscopy. The prepared composites were also tested for antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacterial strains. The highest efficiency of isothermal immobilization was found for systems consisting of ALY and WF. This finding was in accordance with microbiological studies. The phase of immobilizing the EOs did not influence the mechanical properties of the studied composites. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 42816.

KEYWORDS: biopolymers and renewable polymers; composites; packaging

Received 25 March 2015; accepted 6 August 2015

DOI: 10.1002/app.42816

INTRODUCTION

Polymers are common in everyday life because of their superior physicochemical properties.¹ Widely used forms include polyolefins (polyethylene, polypropylene, and their copolymers) because of their low cost, great flexibility, good impact strength, oil and chemical resistance, high transparency, ease of manufacture, ability to be heat-sealed, and ease on which they can be printed.^{2,3} Increasing demands on polymer materials have led to further development. Recently, the most emphasis has been put on the development of polymer composites that exhibit a required active function.⁴ A polymer with resistance to microbial colonization is one such example of this active material function. The microbial contamination of food, cosmetic products, or medical devices is of great importance both economically and environmentally. An antibacterial polymer is a system consisting of a polymer matrix and an antibacterial agent that inhibits the growth of targeted microorganisms.² The antibacte-

rial properties of the composite can be achieved by the direct incorporation of the antibacterial agent in the polymer matrix or through the immobilization of the antimicrobial agents on an inert carrier and their subsequent assimilation into the polymer. The resulting composites are now used in food packaging, medical devices, cosmetics, textile fibers, construction materials, and so on.

Antibacterial agents that are applicable as modifiers of polymer matrices include natural or synthetic-based substances. The past few decades have witnessed the development of various synthetic antibacterial agents for the antimicrobial modification of polymer materials.⁵ Synthetic antibacterial agents used to modify low-density polyethylene (LDPE) and provide antibacterial activity against a wide range of microorganisms include organic acids (benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid), acid anhydrides (benzoic anhydride and propionic anhydride), chelating agents (ethylenediaminetetraacetic acid), sorbates and

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

propionates, sanitizers (triclosan), parabens (ethyl paraben and propyl paraben), fungicides (benomyl and imazalil), and various metals, for example, silver (silver zeolite, silver nitrate).^{5–7}

However, in recent years, because of great consumer awareness and concern regarding synthetic antibacterial agents, composites with natural compounds have gained potential.^{8,9} The primary natural compounds used to modify LDPE include essential oils (EOs) derived from plants (e.g., basil, thyme, oregano, cinnamon, clove), enzymes obtained from animal sources (lysozyme), and bacteriocins from microbial sources (nisin, lactacin).^{10,11} The active components of EO [e.g., linalool (LIN), methyl chavicol, thymol, and carvacrol] display a wide spectrum of antimicrobial activities exceeding many microorganisms; examples of the former include Gram-negative and Gram-positive bacteria,^{12–15} forms of yeast,^{11,16} and mold.^{17,18}

It has been already reported that the natural antibacterial components of basil [basil EOs primarily contain LIN and 4-allylanisole (ALY) as the active volatile components responsible for their antibacterial activity] can be incorporated into LDPE-based polymers and retain their inhibitory effect against microbial growth (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, and *Saccharomyces cerevisiae*) on culture media and on the surface of cheddar cheese. A preblended master batch of an ethylene vinyl acetate powder containing LIN or ALY has successfully been mixed with virgin LDPE pellets and manufactured into films with the same extruder.¹¹ It has also been demonstrated that LIN coated onto LDPE and nylon films exhibited inhibitory activity against the growth of *E. coli* in a liquid culture and on cheddar cheese.⁹

However, many antibacterial agents are not easily incorporated into polymer matrices because of their volatility. For example, the effectiveness of the antibacterial modification of common polymer matrices with biologically active substances (BASs) of EO is low; hence, this modification requires special and expensive technologies. This drawback can be solved by the immobilization of antibacterial agents on inert carriers commonly used as fillers of plastics.^{19–21} For instance, wood plastic composites are becoming important materials in industry, as they are a sustainable resource and are low in cost and recyclable. Numerous studies have been carried out on the influences of forms of wood flour (WF) incorporated in plastic matrices.^{20,22} Talc (TC) has been used for many years as an appealing filler in a wide range of industries and in products such as pharmaceuticals, polymers, paint, lubricants, ceramics, and cosmetics.^{23,24}

In this study, we focused on preparing and characterizing LDPE-based antibacterial composites with BAS [LIN, ALY and *trans*-anethole (ANE)] immobilized on three different inert carriers [molecular sieves (MSs), TC, and WF]. To the best of the authors' knowledge, research on the technology required for the immobilization of BAS on these inert carriers has never previously been published.

The main objective of this study was to find an interrelationship between the type of filler, BAS, and the resulting characteristics of the composite properties, primarily antibacterial ones. Additionally, the morphological characteristics and mechanical prop-

erties, such as the tensile strength, strain at break, and Young's modulus, were observed via scanning electron microscopy (SEM). Furthermore, emphasis was put on the quantitative analysis of BAS. This was measured with three techniques: pyrolysis and gas chromatography with mass spectrometry (Py/GC/MS), gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS), and high-performance liquid chromatography (HPLC).

EXPERIMENTAL

Materials

LDPE (BRALEN RB 03-23) was produced by SLOVNAFT, a. s. (Bratislava, Slovak Republic). LIN (97%, CAS: 78-70-6), ALY

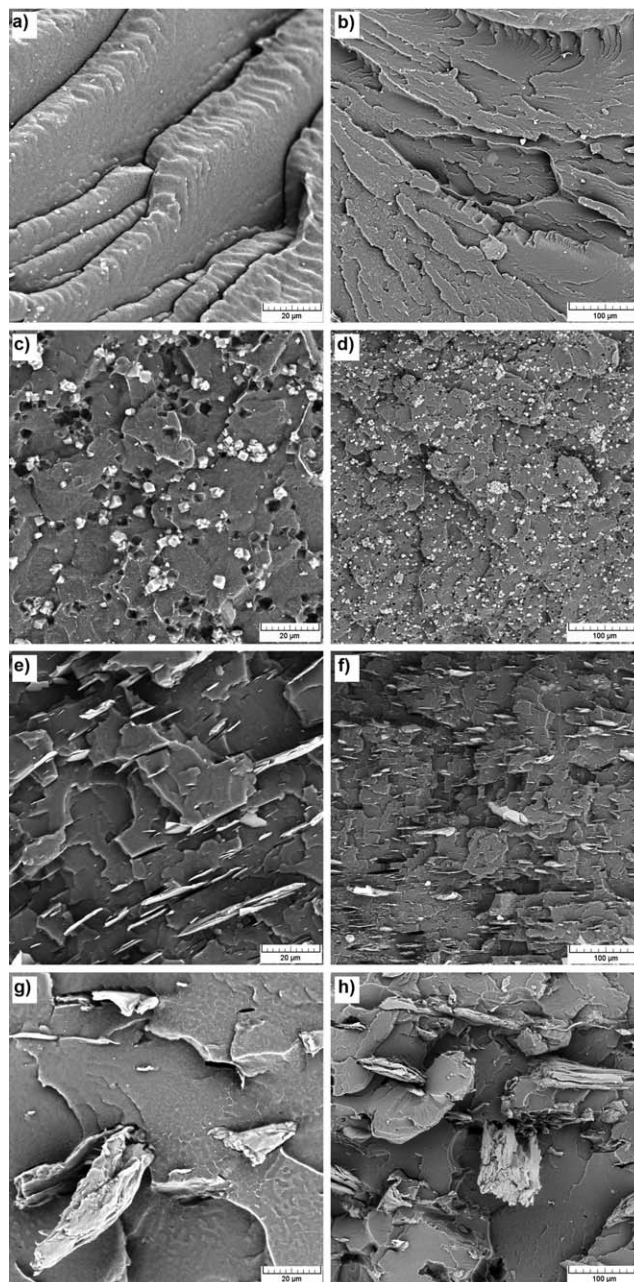


Figure 1. SEM images of the LDPE and LDPE composite samples at various resolutions: (a,b) pure LDPE, (c,d) LDPE/MS/20, (e,f) LDPE/TC/20, and (g,h) LDPE/WF/20.

Table I. Mechanical Properties of the Composites

Sample	Additive concentration (%)	Young's modulus (MPa)	Tensile strength (MPa)	Strain at break (%)
LDPE	0	217/16	16.7/1.3	238/23
LDPE/MS	5	232/27	14.1/1.4	237/15
	10	251/22	13.4/1.2	227/22
	15	263/23	12.6/0.7	197/19
	20	324/24	10.6/0.8	192/12
LDPE/TC	5	243/26	13.8/1.0	218/20
	10	272/27	8.8/0.7	187/21
	15	318/23	8.4/0.6	168/11
	20	428/33	8.4/0.5	145/27
LDPE/WF	5	305/27	9.5/0.5	132/15
	10	352/24	8.2/0.5	39/4
	15	365/46	8.2/0.7	23/2
	20	410/23	8.7/0.9	12/1

^aThe values are shown as averages/standard deviations.

(98%, CAS: 140-67-0), ANE (99%, CAS: 4180-23-8), and MSs (4Å (CAS: 70955-01-0) were obtained from Fluka and Sigma Aldrich. TC-Ph Eur quality (CAS: 14807-96-6) was supplied by IPL Lukes (Uhersky Brod, Czech Republic). WF (spruce) was sourced independently. A fraction, with particle sizes ranging from 75 to 126 μm , was used in this study. The bacterial species, *S. aureus* (4516) and *E. coli* (4517) were obtained from the Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University (Brno, Czech Republic). The media required for the microbiological studies (1% w/w peptone nutrient broth, plate count agar, soybean casein digest broth with lecithin and Tween 80) were purchased from HiMedia Laboratories Pvt., Ltd. (India).

Sample Preparation

First, the carriers were activated under isothermal conditions (MSs at 300°C for 16 h, TC at 220°C for 16 h, and WF at 40°C for 4 h). Afterward, BAS was immobilized onto the carriers by an isothermal process (25°C) in a closed glass flask containing the carriers and BAS in a ratio of mix equaling 1 : 1 w/v. Any unabsorbed BAS was evaporated for 24 h at various temperatures (LIN at 50°C, ALY at 50°C, and ANE at 75°C).

Samples of LDPE with various concentrations of additives (BAS immobilized on carriers) were prepared by a thermoplastic process in the following way: the virgin LDPE pellets were compounded with additives at concentrations of 0, 5, 10, 15, and 20 wt % in two-roll mills (Labtech, Ltd., Thailand) for 8 min. The temperatures of the rolls were set to 155 and 135°C, respectively. Then, the obtained products were compression-molded at 140°C for 5 min in a manual press into a film (up to 1 mm thick) and subsequently cooled under the pressure of 10 MPa for 5 min. A two-roll mill compounding technique was selected to prevent high shear stress and the subsequent dissipation of mechanical energy that could influence the immobilized highly volatile BAS. The prepared samples were homogeneous in all cases.

Samples were designated as LDPE/carrier/BAS, where the carrier is the type of inert carrier (MS, TC, or WF) and BAS is LIN, ALY, or ANE.

Characterization

SEM. SEM was carried out on the VEGAII LMU (TESCAN, Czech Republic) operating in a high-vacuum/secondary electron imaging mode at an accelerating voltage of 10 kV. Samples for performing We prepared the SEM analysis by breaking the test specimen in liquid nitrogen and then scanning the fractured surfaces.

Stress–Strain Analysis. The mechanical properties (Young's modulus, tensile strength, and strain at break) were tested with the aid of a tensile testing machine (M350-5CT, Testometric Co., Ltd., United Kingdom) according to the ČSN EN ISO 527-1-3:1997 standard at 23°C. The speed of the moving clamp was 100 mm/min. The specimens were conditioned at 50% relative humidity at 23°C for 88 h to reach equilibrium before further investigation. The values were calculated as averages determined over 10 specimens for each plastic film.

Additive Quantification. The amounts of LIN, ALY, or ANE in both carriers and LDPE composites were arrived at via three techniques: (1) GC/MS, (2) Py/GC/MS, and (3) HPLC. Initially, 5 g of sample was extracted by a Soxhlet extractor in 250 mL of methanol for 18 h. This extract was used for GC/MS and HPLC analysis.

GC/MS was performed on a Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra device equipped with a fused silica capillary column (SLB-5 MS, 30 m \times 0.25 mm, film thickness = 0.25 μm , Supelco). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.12 mL/min. The injector temperature was maintained at 200°C; the volume of the injected sample was 1 μL . Split injection was conducted at a split ratio of 1 : 100. The column temperature was initially held at 70°C for 1 min and then increased from 70 to 180°C at a rate of 10°C/min and held at 180°C for 7 min. The ion source was set at

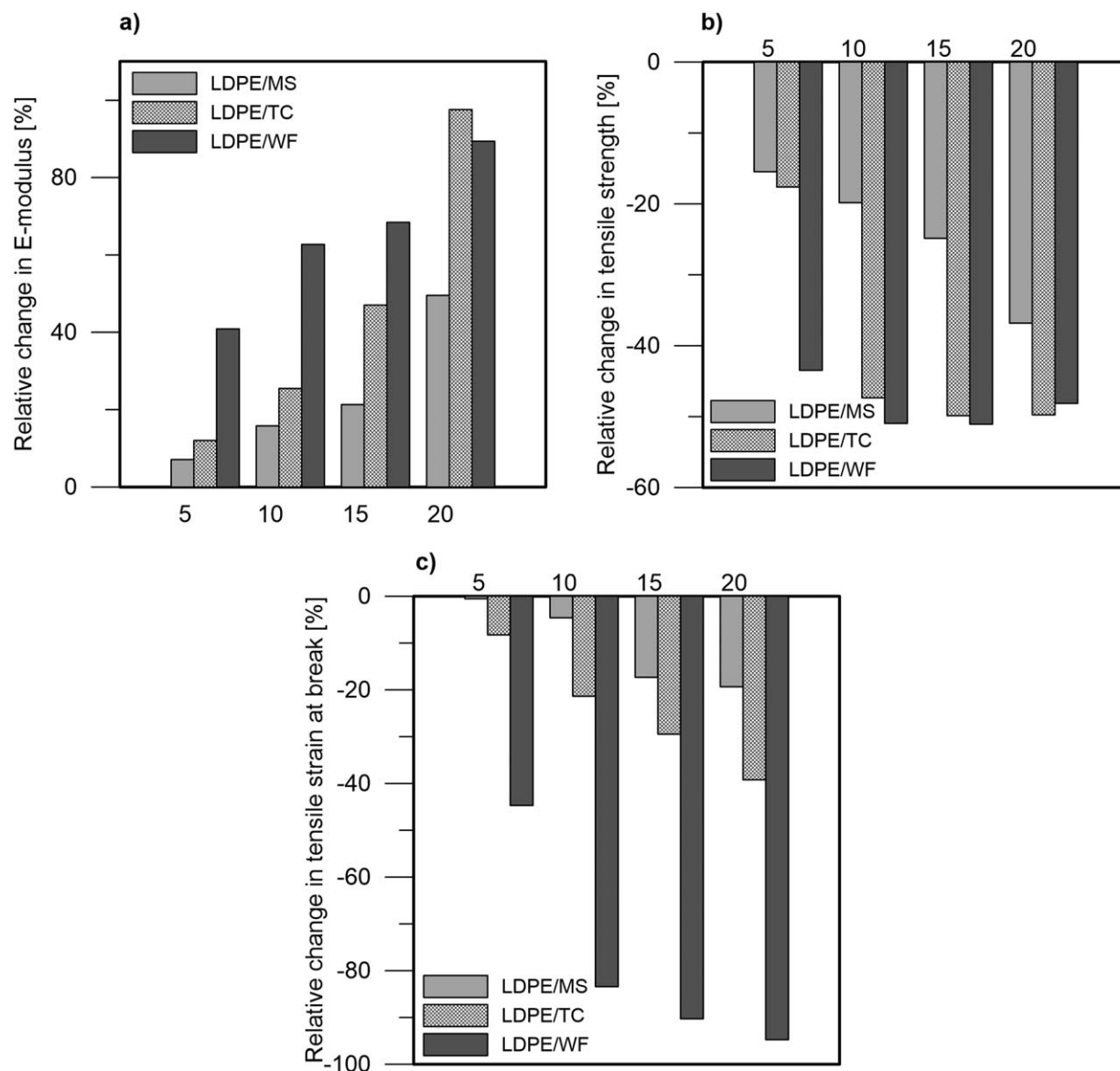


Figure 2. Relative changes in the mechanical properties of the prepared composites in comparison with the unmodified LDPE: (a) Young's modulus, (b) tensile strength, and (c) strain at break.

200°C. The scan range was 35–350 m/z (mass/charge). The GC/MS interface temperature was set at 300°C.

HPLC analysis was carried out as a complementary technique for LIN, ALY, and ANE determination in the extracts of the LDPE composites. HPLC analysis was performed on a Thermo Fischer Scientific Accela HPLC modular system (Waltham, MA) equipped with an Accela 600 quarter pump and an Accela photodiode array detector. Chromatographic separation was carried out on a Thermo Scientific Accucore PFP analytical column ($2.1 \times 150 \text{ mm}^2$, $2.6 \mu\text{m}$). The mobile phase was acetonitrile–water (55 : 45 v/v) with a flow rate of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, and the wavelength of detection was set at 210 nm. The column temperature was maintained at 22°C, and the injection volume for each sample and standard solution was 3 μL .

Unextracted samples were used for Py/GC/MS analysis. Py/GC/MS analysis was conducted via a Multi-Shot Pyrolyzer EGA/PY-

3030D connected to the Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra device. In this case, the sample was pyrolytically decomposed, and evolved gas analysis was carried out by the GC/MS technique. Samples of approximately 3 mg were weighed into a pyrolysis cup. The samples were pyrolyzed at 300°C; the pyrolysis time was fixed at 3 min. Separation was carried out on an Ultra Alloy-PY2 capillary column ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.5 \mu\text{m}$). The GC injector temperature was 300°C, and the interface between the pyroprobe and GC was maintained at 300°C. The mass spectrometry temperature was maintained at 250°C, and it scanned over a range of 33–450 m/z . The oven temperature of the GC was held at 60°C for 3 min; this was followed by continuous heating (6°C/min) to 200°C. Then, the final temperature was held for 10 min to ensure that no heavy molecules remained in the column. Helium was used as a carrier gas with a column flow of 1.01 mL/min, and the split injector ratio equaled 1 : 100.

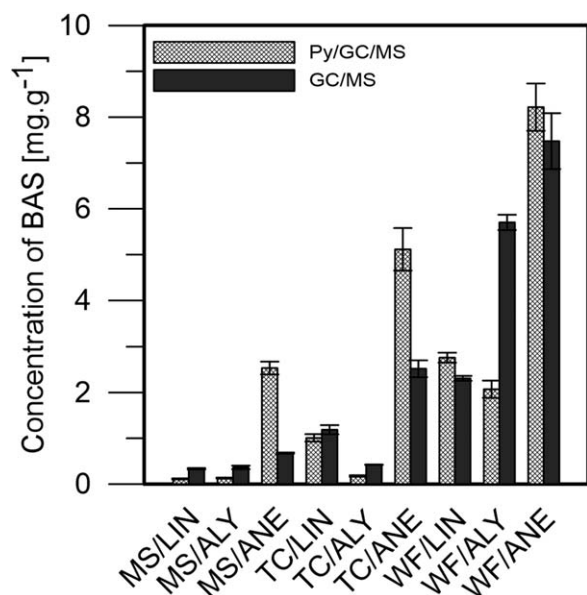


Figure 3. Concentration of BAS on inert carriers after the immobilization process.

The LIN, ALY, and ANE contents of the samples were calculated from standard calibration dependences.

All of the chromatography results represent averages from three independent analyses.

Study of the Antibacterial Properties. Testing was carried out with a procedure based on ISO 22196:2007. The bacteria used in this study were *S. aureus* and *E. coli*. For these measurements, only the LDPE/inert carrier/BAS 20 composites were used. Bacterial suspensions were prepared at concentrations of 5.6×10^6 and 2.8×10^7 cfu/mL for *E. coli* and *S. aureus*, respectively. The dimensions of each specimen were $25 \times 25 \text{ mm}^2$, and the cover polyethylene film dimensions were $20 \times 20 \text{ mm}^2$.

The effectiveness of the plastic films was evaluated according to the following equation:

$$R_a = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (1)$$

where R_a is the antibacterial activity, U_0 is the average of the common logarithm for the viable bacteria in cells·(cm⁻²) recovered from the untreated test specimens (pure LDPE) immediately after inoculation, U_t is the average of the common logarithm for the viable bacteria in cells·(cm⁻²) recovered from untreated test specimens after 24 h, and A_t is the average of the common logarithm for the viable bacteria in cells·(cm⁻²) recovered from treated test specimens after 24 h.

RESULTS AND DISCUSSION

SEM

Figure 1 presents SEM images of the pure LDPE sample and its prepared composites. The pure LDPE [Figure 1(a,b)] had a homogeneous morphology and fractured surface. Three different carriers/fillers of differing shapes and properties were used in this studies. We found that MS was cubic in shape [Figure 1(c,d)] and ranged in size from 5 to 10 μm . In the case of TC, plate-type particles [Figure 1(e,f)] were observed with lengths

of approximately 1 μm to over 40 μm . Figure 1(c–f) indicates that TC and MS were uniformly dispersed in the LDPE matrix without obvious aggregates. Nevertheless, some voids were identified in all of the LDPE/TC or LDPE/MS composites. These voids could be induced by the debonding of the TC or MS particles from the LDPE matrix as a consequence of their poor adhesion. These findings were in agreement with the results of other authors.^{25,26} We observed that the particles of WF appeared to be irregular in shape. Distinct gaps between the WF and LDPE matrix are clearly shown in Figure 1(g,h). This phenomenon indicates that there was poor adhesion between the two phases; this might have been due to the low dispersion of hydrophilic WF in the nonpolar LDPE. Similar results have been reported in many research papers.^{22,27,28}

Stress–Strain Analysis

Table I summarizes values for the mechanical properties of the prepared composites. As shown, the standard deviation was below 10% in all cases.

A complex stress–strain analysis of the prepared composites (without and with immobilized BAS on fillers used) was done. The results reveal that there was no effect of the BAS (immobilized on the MS, TC, or WF) presence on the mechanical properties of the composites. Thus, only the composites with immobilized BAS will be discussed further. Moreover, the direct immobilization of highly volatile BAS into the LDPE matrix would be difficult and ineffective. The effect of various carriers is expressed as a relative change (in comparison with unmodified LDPE) in the mechanical properties in Figure 2. The unmodified LDPE was characterized by a lower Young's modulus value and higher tensile strength and strain at break values than the modified composites. All of the composites with various carriers showed enhanced Young's modulus values throughout the concentration range. However, we observed that increasing the concentration of fillers on the composites caused a reduction in the values for the tensile strength and strain at break. A similar result was observed herein when the effect of TC on the mechanical properties of high-density polyethylene composites was investigated. An increase in the Young's modulus was observed alongside a rise in the TC content. The tensile strength value decreased in conjunction with an increase in the filler content in the composite.²⁹

The most significant increase in the Young's modulus was observed for the system LDPE with a content of 20% TC. Composites with MS and TC exhibited similar mechanical properties; this was caused by their physical and chemical similarity. The rise in Young's modulus in the composites containing WF corresponded with studies that have investigated the properties of composites made from linear low-density polyethylene (LLDPE) reinforced with WF.³⁰ The LDPE/WF composites displayed significant drops in the tensile strength and strain at break values; this was likely to have been caused by the high particle size and incompatibility of WF with the polymer matrix, as reported in many studies.³¹ We affirmed that the resulting mechanical properties were set by the compatibility of the filler and the polymer matrix. MS and TC were more

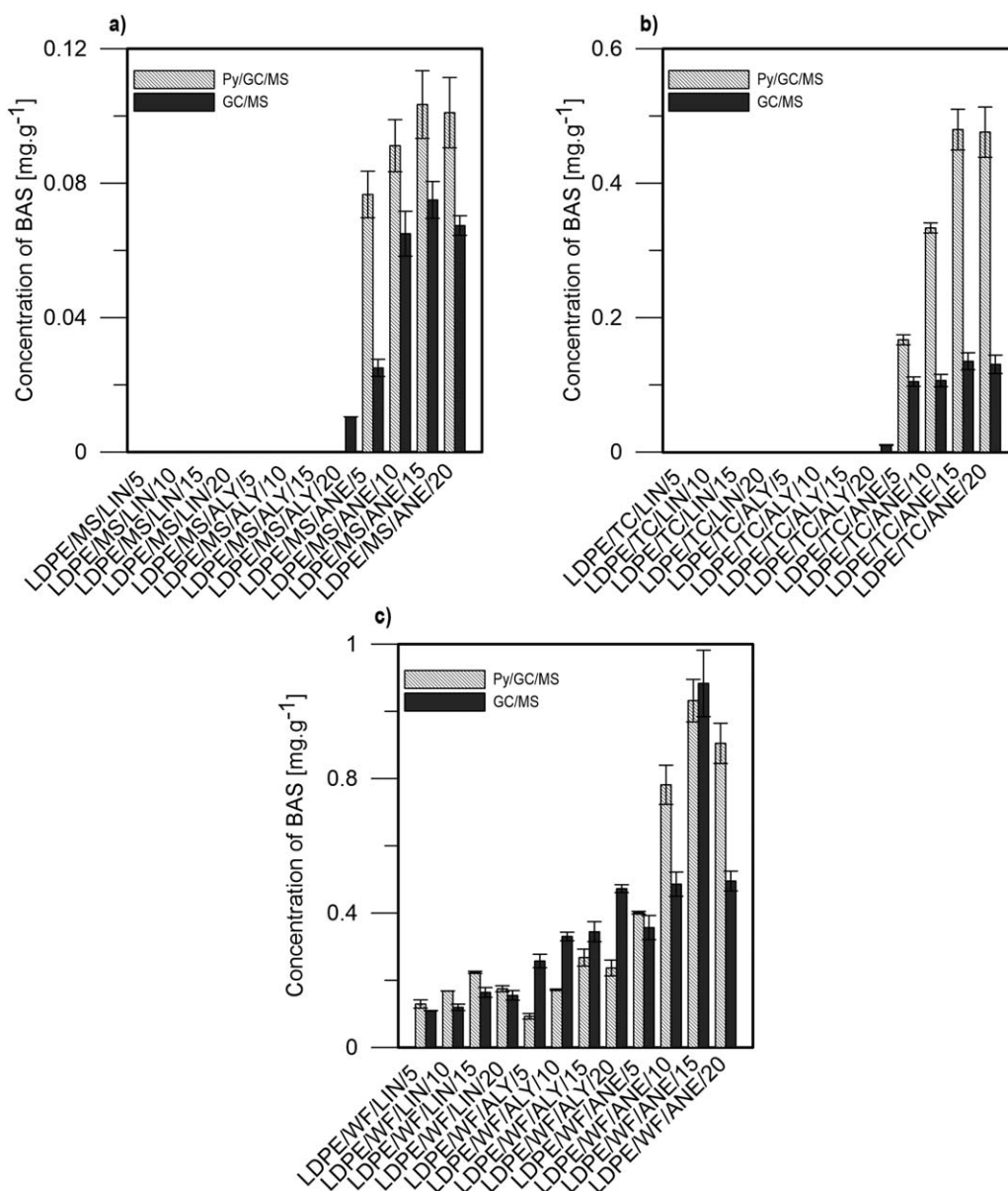


Figure 4. Concentration of BAS in the LDPE composites with a 20 wt % concentration of (a) MS, (b) TC, and (c) WF.

compatible with the polymer matrix than WF; this was also confirmed by SEM.

EO Quantification

Figure 3 presents the concentrations of BAS in various inert carriers. As shown in Figure 3, data were obtained by two methods: (1) the direct analysis of solid samples by Py/GC/MS and (2) GC/MS analysis of the extracted sample. The concentration of BAS was measured in the range from 0.1 mg/g to a maximum of 8.3 mg/g. The resulting concentrations of BAS measured by Py/GC/MS were comparable or higher than GC/MS, as these two methods had different yields. The highest differences in the concentrations of BAS measured by both methods were observed in samples of W/ALY, TC/ANE, and MS/ANE.

The highest concentration of all of the BAS was identified in the case of WF, whereas the lowest concentration of BAS was recognized in MS. According to this study, the solute polarity is a predominant controlling factor that influences sorption. The authors compared LIN and limonene; because of the higher polarity of LIN, it was less well adsorbed by nonpolar polymers such as polyethylene.³² Other studies have also recognized that sorption by nonpolar polymers increases in conjunction with the hydrophobicity of the carrier.^{33,34} Herein, confirmation was made that BAS absorbed more easily in inert carriers of similar polarity. The concentration of all of the BAS in hydrophilic WF was higher than in hydrophobic MS and TC.

Figure 4(a–c) shows the concentration of BAS in LDPE determined by two techniques (GC/MS and Py/GC/MS). The residual BAS concentration in LDPE registered from approximately 0 to a maximum

of 1.1 mg/g. Composites with WF [Figure 4(c)] were detected to contain the highest concentration of each selected BAS.

An interesting comparison of BAS determination with GC-based techniques (GC/MS and Py/GC/MS) with HPLC is presented in the Supporting Information (Figure S1).

The presence of LIN and ALY in all of the inert carriers and composites was generally low; this was probably caused by the higher volatility at low temperatures. The opposite effect was identified in the case of ANE, which exhibited the greatest ability to bind with all of the carriers. ANE was also the only BAS that was detected in composites containing MS and TC after incorporation into LDPE. The likely reason for this phenomenon was that ANE possessed a higher boiling point than LIN and ALY. This notion corresponded with research in which an observation was made that samples of BAS with higher boiling points were more capable of condensing and remaining within the polymer matrix.³⁵ In addition, this explanation for the highest concentration of ANE in inert carriers and composites was supported by the fact that ANE had a higher cohesive energy density (511 J/cm³) than LIN (273 J/cm³) and ALY (344 J/cm³). These findings were in agreement with the study herein, where two similar terpenes were compared (carvone and limonene) with different polarities. It has been shown that the less polar limonene is not only absorbed at a faster rate but also diffuses more rapidly; this is probably due to its lesser cohesive forces.³⁶

The cohesive energy density of BAS was calculated according to the following equation:³⁷

$$e_{\text{coh}} = (H_{\text{vap}} - RT)V_m^{-1} \quad (2)$$

where e_{coh} is the cohesive energy density of BAS (J/cm³), H_{vap} is the enthalpy of vaporization of BAS (J/mol), R is the ideal gas constant (J/K.mol), T is thermodynamic temperature (K), and V_m is the molar volume of BAS (cm³/mol).

However, according to the results of antibacterial tests, it was not noticeable that ANE demonstrated the highest inhibitory activity against the selected bacteria, even though its concentration was higher than that of ALY. These conclusions corresponded with a study that examined the antibacterial activity of compounds of EO against standard tested strains and isolated strains of microorganisms expressed as minimum inhibitory concentrations. We found that ALY exhibited more antibacterial activity than ANE and LIN.³⁸

Studies of the Antibacterial Properties

The antibacterial activity of the prepared samples was studied via a procedure based on ISO 22196:2007. The samples were tested against representatives of both Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacterial strains. The pure LDPE showed no antibacterial activity in both cases. The same results were observed for all of the BAS-free LDPE composites (LDPE/MS, LDPE/TC, and LDPE/WF). It is known that both MS and TC are biologically inert inactive materials.^{39,40} On the other hand, WF is a suitable substrate for a microbial colonization under certain conditions, but it does not possess any antimicrobial activity.⁴¹

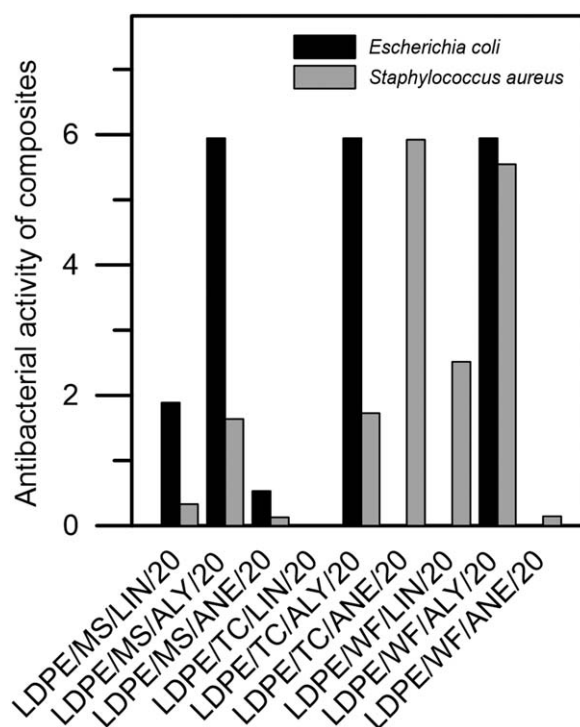


Figure 5. Antibacterial activity of the prepared composites against *S. aureus* and *E. coli*.

The results from the antimicrobial assessment are given in Figure 5.

We observed that the prepared composites were better at inhibiting the growth of the Gram-negative strain, with the exception of LDPE/WF/ANE, LDPE/WF/LIN, and LDPE/TC/ANE. Similar results were reported by Koga *et al.*,⁴² who studied the bactericidal activities of EOs from basil against a range of bacteria. In contrast, Joshi⁴³ investigated the antibacterial activity of EOs from basil against various Gram-positive and Gram-negative bacteria. He reported that the Gram-negative bacteria were more resistant to such EOs than the Gram-positive ones. However, this particular study applied different representatives of Gram-positive and Gram-negative strains than in the research detailed herein and in the work by Koga *et al.*⁴²

The LDPE/TC/ALY, LDPE/WF/ALY, and LDPE/MS/ALY composites proved the most effective against the growth of *E. coli*. It might have been that these composites exhibited antimicrobial activity even at concentrations below 20%. Nevertheless, the composites containing additives (TC/LIN, WF/LIN, TC/ANE, and WF/ANE) displayed no antibacterial activity against the growth of *E. coli*.

We observed that the LDPE/TC/ANE composite showed the greatest inhibitory effect against Gram-positive bacteria. In contrast, *S. aureus* was even not affected by LDPE/TC/LIN because of the low concentration caused by the ineffective immobilization of LIN, as shown in Figure 4.

Generally, R_a was observed at its height in composites containing ALY. These results were ascribed to its physical properties. Components with phenolic structures, including ALY, were

highly active against the test microorganisms, despite their relatively low solubility in water.⁴⁴ The antimicrobial action of phenolic compounds was related to the inactivation of cellular enzymes, which depended on the rate of penetration of the substance into the cell or was caused by changes in the membrane permeability. Increased membrane permeability is a major factor in the mechanism of antimicrobial action, where compounds may disrupt membranes and cause a loss of cellular integrity and eventual cell death.⁴⁵ In accordance with a study performed by Suppakul *et al.*,¹¹ the LDPE/ALY composites exhibited a greater efficiency of inhibition against *E. coli* than the composites with LIN.

CONCLUSIONS

Natural BASs (LIN, 4-allylanisole and *trans*-anethole) were thermoplastically incorporated into the matrix of LDPE. The crucial step of incorporating these substances was based on their immobilization on various carriers (WF, MSs, and TC). The antibacterial activity investigated, in accordance with ISO 22196, showed that the Gram-negative *E. coli* was more inhibited than the Gram-positive *S. aureus*. The greatest antimicrobial activity was exhibited by composites with ALY immobilized on WF, although promising results were observed even for the MSs and TC. The results from SEM and the mechanical properties of composites confirmed little compatibility existed between WF and the polymer matrix.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by projects of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic within the NPU I program (contract grant number LO1504) and EUPRO (contract grant number LE12002) and by the Internal Grant Agency of Tomas Bata University in Zlín (contract grant number IGA/CPS/2015/003). One of the authors (I.P.) acknowledges cofunding from the Ministry of Higher Education, Science, and Technology of the Republic of Slovenia within the P4-0015 program.

REFERENCES

1. Manohar, C. M.; Prabhawathi, V.; Sivakumar, P. M.; Doble, M. *J. PLoS One* **2015**, *10*, 1.
2. Sung, S.; Sin, L.; Tee, T.; Bee, S.; Rahmat, A.; Rahman, W.; Tan, A.; Vikhrman, M. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *33*, 110.
3. Appendini, P.; Hotchkiss, J. H. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2002**, *3*, 113.
4. Shemesh, R.; Goldman, D.; Krepker, M.; Danin-Poleg, Y.; Kashi, Y.; Vaxman, A.; Segal, E. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 41261.
5. Kuplennik, N.; Tchoudakov, R.; Ben-Barak Zelas, Z.; Sadovski, A.; Fishman, A.; Narkis, M. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 278.
6. Emamifar, A.; Kadivar, M.; Shahedi, M.; Soleimani-Zad, S. *Innov. Food Sci. Emerg.* **2010**, *11*, 742.
7. Soysal, Ç.; Bozkurt, H.; Dirican, E.; Güçlü, M.; Bozhüyük, E. D.; Uslu, A. E.; Kaya, S. *Food Control* **2015**, *54*, 294.
8. Kuorwel, K. K.; Cran, M. J.; Sonneveld, K.; Miltz, J.; Bigger, S. W. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 164.
9. Rardniyom, C. Ph.D. thesis, Victoria University, **2009**.
10. Sung, S.; Sin, L. T.; Bee, S.; Rahmat, A. R. *Innov. Food Sci. Emerg.* **2014**, *26*, 406.
11. Suppakul, P.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; Miltz, J. *LWT Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 779.
12. Friedman, M.; Henika, P. R.; Levin, C. E. *Food Control* **2015**, *50*, 652.
13. Vergis, J.; Gokulakrishnan, P.; Agarwal, R. K.; Kumar, A. *CRC Crit. Rev. Food Sci.* **2015**, *55*, 1320.
14. Alvarez, M. V.; Ortega-Ramirez, L. A.; Gutierrez-Pacheco, M. M.; Bernal-Mercado, A. T.; Rodriguez-Garcia, I.; Gonzalez-Aguilar, G. A.; Ponce, A.; Moreira, M. D. R.; Roura, S. I.; Ayala-Zavala, J. F. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 699.
15. Suppakul, P.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; Miltz, J. *J. Food Eng.* **2011**, *105*, 270.
16. Kuorwel, K.; Cran, M.; Sonneveld, K.; Miltz, J.; Bigger, S. *Packag. Technol. Sci.* **2011**, *24*, 299.
17. Passone, M. A.; Girardi, N. S.; Ferrand, C. A.; Etcheverry, M. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **2012**, *70*, 82.
18. Rodriguez-Lafuente, A.; Nerin, C.; Batlle, R. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6780.
19. Pedrazzoli, D.; Pegoretti, A.; Thomann, R.; Kristof, J.; Karger-Kocsis, J. *Polym. Compos.* **2015**, *36*, 869.
20. Das, O.; Sarmah, A. K.; Bhattacharyya, D. *Waste Manage.* **2015**, *38*, 132.
21. Baldi, F.; Briatico-Vangosa, F.; Franceschini, A. *Polym. Eng. Sci.* **2013**, *54*, 364.
22. Ndiaye, D.; Verney, V.; Askanaian, H.; Commereuc, S.; Tidjani, A. *Mater. Sci. Appl.* **2013**, *4*, 730.
23. Prado, M. A.; Dias, G.; Carone, C.; Ligabue, R.; Dumas, A.; Le Roux, C.; Micoud, P.; Martin, F.; Einloft, S. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 1.
24. Ulusoy, U. *Powder Technol.* **2008**, *188*, 133.
25. Alshabanat, M. *J. Am. Sci.* **2013**, *9*, 322.
26. Huang, R.; Kim, B.; Lee, S.; Zhang, Y.; Wu, Q. *BioResources.* **2013**, *8*, 2283.
27. Singh, A.; Anderson, R.; Park, B.; Nuryawan, A. A. *Micron.* **2013**, *54*, 87.
28. Bhaskar, J.; Haq, S.; Pandey, A. K.; Srivastava, M. *J. Mater. Environ. Sci.* **2012**, *3*, 605.
29. Parvin, N.; Ullah, M.; Mina, M.; Gafur, M. *J. Bangladesh Acad. Sci.* **2013**, *37*, 11.
30. Marcovich, N.; Villar, M. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *90*, 2775.
31. Zaini, M.; Ismail, Z.; Fuad, M.; Mustafah, J. *Polym. J.* **1994**, *26*, 637.
32. Willige, R. W. G. Ph.D. thesis, Wageningen University, **2002**.
33. Arora, D. K.; Hansen, A. P.; Armagost, M. S. In *Food and Packaging Interactions II*; ACS Symposium Series 473; Risch, S. J., Hotchkiss, J. H., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, **1991**; p 203.

34. Charara, Z. N.; Williams, J. W.; Schmidt, R. H.; Marshall, M. R. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 963.
35. Roland, A. M.; Hotchkiss, J. H. In *Food and Packaging Interactions II*; ACS Symposium Series 473; Risch, S. J., Hotchkiss, J. H., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, **1991**; p 149.
36. Halek, G. W.; Luttmann, J. P. In *Food and Packaging Interactions II*; ACS Symposium Series 473; Risch, S. J., Hotchkiss, J. H., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, **1991**; p 212.
37. Krevelen, D. W.; Nijenhuis, K. In *Properties of Polymers: Their Correlation with Chemical Structure; Their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions*, 4th ed.; Krevelen, D. W., Nijenhuis, K., Eds.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, **2009**; Chapter 7, p 189.
38. Orhan, I. E.; Özçelik, B.; Kartal, M.; Kan, Y. *Turk. J. Biol.* **2012**, *36*, 239.
39. Kneuer, C.; Sameti, M.; Haltner, E. G.; Schiestel, T.; Schirra, H.; Schmidt, H.; Lehr, C. M. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 257.
40. Inrahim, F.; El-Enany, N.; Shalan, S. H.; Abo Shabana, R. A. *Luminescence to appear*. DOI: 10.1002/BIO.2852.
41. Kumar, V.; Tyagi, L.; Sinha, S. *Rev. Chem. Eng.* **2011**, *27*, 253.
42. Koga, T.; Hirota, N.; Takumi, K. *Microbiol. Res.* **1999**, *154*, 267.
43. Joshi, R. K. *Anc. Sci. Life.* **2014**, *33*, 151.
44. Kim, J.; Marshall, M.; Wei, C. *J. Agric. Food. Chem.* **1995**, *43*, 2839.
45. Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C.; Vojnov, A. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 223.

Publikace II

Microspheres of essential oil in polylactic acid and poly(methyl methacrylate) matrices and their blends

Miroslava Dusankova, Martina Pummerova and Vladimir Sedlarik

Centre of Polymer Systems, University Institute, Tomas Bata University in Zlin, tr. T, Czech Republic

ABSTRACT

This study is focussed on micro-encapsulation of essential oils in polylactic acid (PLA) and a poly(methyl methacrylate) (PMMA) matrix as well as blends of the same. Microspheres were prepared by the solvent evaporation technique and characterised by scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infra-red spectroscopy (FTIR). The encapsulation efficiencies and release profiles of the essential oils were studied by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and head-space solid-phase microextraction GC-MS, respectively. Furthermore, the microspheres were tested for antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacterial strains.

The results showed that the microspheres compositions (PLA/PMMA ratio) have significant effect on their characteristics. The process adopted for preparing the microspheres promoted formation of spherical particles at the sizes of 1.5–9.5 μm . The highest encapsulation efficiency of the prepared microspheres was observed in systems consisting of linalool (81.10 ± 10.0 wt. % for PLA system and 76.0 ± 3.3 wt. % for PMMA system). Confirmation was also made that the release rate of the microspheres was affected by the size of the same.

ARTICLE HISTORY

Received 28 December 2018
Accepted 20 May 2019

KEYWORDS

Microspheres; linalool; 4-allylanisole; trans-anethole; essential oils; optical properties; antibacterial properties; polylactic acid; poly(methyl methacrylate); release study; oil-in-water solvent evaporation technique

Introduction

The demand for products with added value has significantly influenced trends in the international marketplace. As a consequence, the act of developing new and innovative techniques – such as micro-encapsulation and nano-encapsulation – has gained in importance (Jyothi *et al.* 2010, Jyothi *et al.* 2012, Sulu *et al.* 2017).

The encapsulation technique was devised to design and formulate procedures for stabilising, solubilising and delivering active substances in cosmetics, pharmaceuticals and foodstuffs (Maresca *et al.* 2016). Micro-encapsulation has been applied in industry to produce items such as carbon-less paper, 'scratch and sniff' fragrance sampling, 'intelligent' textiles, the controlled release of drugs, pesticides and cosmetic active agents (Martins *et al.* 2014).

Microspheres can be composed by two parts – the core and shell. Of these, the core contains the active agent (e.g. essential oils), while the shell isolates and protects the core from the external environment (Castro-Rosas *et al.* 2017).

Choosing a suitable material for the shell is crucial to the entire micro-encapsulation process (Gurny *et al.*

1981), with such decision-making being informed by the intended application of the microspheres (Teeka *et al.* 2014). Recently, a great deal of attention has been paid to PLA due to its flexible utilisation in packaging, textiles and the biomedical or engineering sectors. In comparison with conventional petroleum-based polymers, PLA is considered a material with immense potential for further development (Auras *et al.* 2010; Bugatti *et al.* 2017; Gorrasi and Pantani 2017).

PLA is a type of thermoplastic, aliphatic polyester produced from renewable resources – corn starch, tapioca roots, sugar cane and others (Strbak *et al.* 2017). It is a polymer of great strength with a high modulus, also boasting good transparency and the capacity for gas permeability. Following widespread testing in clinical trials, it has received approval from the US Food and Drug Administration (FDA) and European regulatory authorities (Lima *et al.* 2012). Apart from being biocompatible, biodegradable and non-toxic (Lassalle and Ferreira 2007; Allouche 2013), the degradation behaviour of PLA is very important property in medicinal drug delivery systems (Castro-Rosas *et al.* 2017).

However, PLA possesses some disadvantages, among them brittleness (hence limited toughness) and strong hydrophobicity. Moreover, PLA shows a lower transition temperature than similar materials, thereby rendering it inapplicable for utilizations requiring resistance to high temperatures. Consequently, efforts have been made to improve the properties of PLA (Yu *et al.* 2006; Lim *et al.* 2008; Rasal *et al.* 2010; Hamad *et al.* 2011; Vano-Herrera *et al.* 2015; Castro-Aguirrea *et al.* 2016; Murariu and Dubois 2016), with numerous approaches for heightening the same being devised. Such an example is polymer blending, whereby superior flexibility and processability of polymers can be achieved (Imre and Pukánszky 2013).

A biocompatible synthetic polymer that possesses good chemical and physical properties is PMMA (Anakabe *et al.* 2015), a material applied in medicine, optics, cosmetics, building supplies and so on. (El-Bashir and Hendi 2009; Bettencourt and Almeida 2012; Doerdelmann *et al.* 2014; Song *et al.* 2016; Brock *et al.* 2016).

Some works in the literature report on blending PLA with PMMA (Zhang *et al.* 2003; Hosseini *et al.* 2013; Vano-Herrera *et al.* 2015). Indeed, PLA/PMMA blends show improved properties that facilitate usage of the same in shape memory materials, tissue engineering and other areas (Eguiburu *et al.* 1998; Hosseini *et al.* 2013). The exact composition of the blend significantly affects its compatibility and synergistic qualities (Zhang *et al.* 2003; Suppakul *et al.* 2008; Vano-Herrera *et al.* 2015). Notably, increasing the proportion of PMMA in such blends results in the same displaying higher glass transition temperature (T_g) values (Anakabe *et al.* 2015).

As core active substances, it is possible to utilise essential oils (EOs) in microspheres. EOs are organic compounds naturally produced by plants, in parts such as the flower, leaf and stem (Sansukcharearnpon *et al.* 2010). EOs and their components (EOCs) have proven very popular as natural antimicrobial agents in numerous products – for example, foodstuffs, cosmetics and pharmaceuticals (Akhtar *et al.* 2014; Swamy and Sinniah 2016). Immense interest has been shown in EOs globally due to the unique flavour and aroma they boast, in addition to their biological activities (Swamy *et al.* 2015; Swamy and Sinniah 2016).

Active components in EOs (e.g. linalool, 4-allylanisole, thymol and carvacrol) exhibit a wide range of antimicrobial activity against a host of microorganisms, including Gram-negative and Gram-positive bacteria (Weng and Hotchkiss 1993; Friedman *et al.* 2002; López *et al.* 2007; Gutierrez *et al.* 2009), forms of yeast

(Weng and Hotchkiss 1992; Suppakul *et al.* 2011) and types of mould (López-Malo *et al.* 2007; Rodriguez-Lafuente *et al.* 2010).

However, a lot of EOCs are unstable compounds that can be impacted by oxidation or volatilisation (Leimann *et al.* 2009). The method adopted in recent years to overcome such issues is to encapsulate them, thereby increasing the stability the compounds exhibit (Beyki *et al.* 2014). Through such encapsulation, the volatile rate of the oils is reduced and controlled (Hu *et al.* 2011).

A range of methods have been devised for micro-encapsulating EOs or EOCs, among them spray-drying, solvent evaporation, polymerisation, extrusion, single and double emulsion techniques, the supercritical fluid method, the coacervation process, the coaxial electro-spray system and fluidized-bed-coating (Bakry *et al.* 2016). Choosing between them for the most effective encapsulation process of the drug is a decision informed by the hydrophilicity or hydrophobicity it displays.

The solvent evaporation technique facilitates efficient encapsulation of most compounds, especially insoluble drugs or those with minimal solubility in water (Li *et al.* 2008). It is a well-established and popular procedure for microencapsulation, since it has proven simple and does not require high temperatures (Gurny *et al.* 1981; Jaeghere *et al.* 1999; Barba *et al.* 2014). Indeed, it is widely employed in the pharmaceutical sector to obtain controlled release of a drug (Berkland *et al.* 2002).

This study focuses on preparing and characterising microspheres – based on PLA or a PMMA matrix or blends of the two – containing EOCs. The main objective of this study was to find an interrelationship between the type of polymer, the EOCs and the resulting characteristics of the prepared microspheres, that is antibacterial or thermal. Additionally, the morphology of the microspheres, the release kinetics of the EOCs and their encapsulation efficiency were determined.

Experimental

Materials

The polymers utilised in the study comprised PLA (Ingeo 2003 D; Nature works; $M_w \sim 181\,744\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and PMMA (Altuglas V046; Altuglas International, Arkema; $M_w \sim 158\,552\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Poly(vinyl alcohol) (PVA Mowiol 8–88; $M_w \sim 67\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; degree of hydrolysis 86.7–88.7 mol %; CAS:9002–89-5) was purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

Dichloromethane and chloroform were supplied by Penta Chemicals, Czech Republic. The EOCs used for encapsulation – linalool (LIN, 97 wt. %; CAS: 78–70-6), 4-allylanisole (ALY; 98 wt. %; CAS: 140–67-0) and *trans*-anethole (ANE; 99 wt. %; CAS: 4180–23-8) were also obtained from Sigma-Aldrich, MO. The bacterial species – *Staphylococcus aureus* (4516) and *Escherichia coli* (4517) – were sourced from the Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic. The media required for the microbiological studies – Nutrient Broth (NB) Plate Count Agar contained neutralisers (PCA, with Tween 5 g/L and Lecithin 0.7 g/L) and Mueller-Hinton Agar (MHA) – came from HiMedia Laboratories, India.

Sample preparation

The authors employed the oil-in-water solvent evaporation method to microencapsulate the EOCs. Initially, the PLA was dissolved in chloroform (10% w/v). The EOCs were added to this solution to the concentration of 20 wt. %. Subsequently, this mixture was emulsified in an aqueous phase, containing 0.5% (w/v) PVA for 5 min. at 24 000 rpm, by a dispersion homogeniser (IKA Ultra Turrax T 18 basic). The ratio between the water and oil phases equalled 10:1. The emulsion was further sonicated by an ultrasound homogeniser (UZ Sonopuls HD 2070) for 5 min. at the amplitude of 50%. The organic solvent was evaporated by stirring; the resultant microspheres were formed following such evaporation (24 h). Said microspheres were collected via a centrifuge (20 min., 20 °C, 14 500 rpm), washed with 30 ml of distilled water at least three times and lyophilised for 24 h. Blank samples were prepared in the same way but without the EOCs. The PLA/PMMA blend microspheres were prepared by dissolving the polymers in dichloromethane, after which the above-mentioned procedure for preparation was adhered to. The final compositions studied were as follows, expressed in terms of weight percent of PLA: 100%, 75%, 50%, 25% and 0% (the latter comprising 100% PMMA). Note that the PLA/PMMA microspheres were only prepared with ALY. The absence of residual solvent was confirmed by GC/MS technique described below. Both chloroform and dichloromethane were not detected in all microsphere samples.

Characterisation

Size of the microspheres

The sizes of the microspheres (D_p) and their polydispersity index (PDI) were gauged by laser diffraction on

a Mastersizer E-3000 device (Malvern, UK). The PDI was calculated as the square of the standard deviation (SD) divided by the square of the mean (D), as in Equation (1):

$$PDI = \left(\frac{SD}{D} \right)^2 \quad (1)$$

Scanning electron microscopy (SEM)

The morphologies of the microspheres after the two steps of production and washing were examined by scanning electron microscopy (SEM; VEGA-II, Tescan); the device operated in high vacuum/secondary electron imaging mode at an acceleration voltage of 10 kV. The samples that underwent SEM analysis had been coated with a layer of gold and platinum.

Thermal properties

Thermal analyses were carried out on a DSC1 differential scanning calorimeter (Mettler Toledo DSC STARE, Belgium) with nitrogen purging set to 50 ml·min⁻¹. Approximately 5 mg of sample was prepared in aluminium pan in an ambient atmosphere. The programme for DSC was as follows: first heating scan of 0–240 °C (10 K·min⁻¹); annealing at 240 °C for 2 min.; cooling scan of 240–0 °C (10 K·min⁻¹); annealing at 0 °C for 2 min.; and a second heating scan of 0–240 °C (10 K·min⁻¹). From the second heating scan, the region of T_g was determined, this being recorded as the temperature midpoint.

Encapsulation efficiency

Microspheres were dissolved in chloroform and polymer matrix was precipitated by methanol, subsequently. Released EOCs were then filtered by syringe filters (PTFE, 0.22 μm) and used for analysis. Quantification of the EOCs was performed by GC-MS. Analysis took place on a Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra device equipped with a Rxi-5ms capillary column (length 30 m, 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness; Restek). Helium was employed as the carrier gas at a flow rate of 1.12 ml·min⁻¹. The temperature of the injector was maintained at 200 °C, and the volume of injected sample equalled 1 μl. Split injection was conducted at the split ratio of 1:100. The temperature of the column was initially held at 70 °C for 1 min., then increased from 70 °C to 180 °C at a rate of 10 °C·min⁻¹, and it remained at 180 °C for 4 min. The ion source and interface were both set to 200 °C. The mass spectrometer scanned the mass range of 35–350 *m/z*.

The LIN, ALY and ANE contents of the samples were calculated from standard calibration curves.

Studies of antibacterial properties

The antibacterial activity of the prepared microspheres was measured against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Bacteria were grown in TSA agar at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. The resultant culture was then transferred to 1/500 NB medium and standardised to 10^6 CFU·mL⁻¹. A tested sample suspension comprising 1.5 ml of microspheres (0.15 g in 1/500 NB) was added into 1.5 ml of bacteria culture and allowed to cultivate at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 h. The testing was performed in triplicate for each sample and bacteria strain. After incubation, the test-tubes containing samples and bacterial suspension were shaken (1000 rpm, 30 s) and the viable bacteria count was determined by the pour plate culture method (Sedlarik *et al.* 2010) in duplicate. Colony-forming units (CFU) were counted after incubation at 35°C for 48 h. The microspheres without the EOCs (blanks) were designated with the uppermost colony count, that is, the value of 100%; thus the antibacterial activity (AA) they exhibited was equal to 0%. The AA of the samples was then expressed as reduction in bacterial growth in per cent through Equation (2) below.

$$\text{AA (\%)} = \left(1 - \frac{\text{CFU}_{\text{sample}}}{\text{CFU}_{\text{blank}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Second test of the antibacterial activity of the microspheres was investigated by disc diffusion technique against both bacteria strains mentioned above (Holcapkova *et al.* 2018). The bacterial cultures (1 ml of suspension, 10^6 – 10^7 CFU·mL⁻¹) were spread onto the MHA plate. The microspheres powder and/or microspheres water suspensions (5 mg/mL, 100 μL) was placed on the previously inoculated MHA and incubated at 35°C for 24 h. All disc diffusion tests were performed in triplicate and the diameters (mm) of the inhibition zone were measured after incubation.

Fourier transform infrared spectroscopy

The FTIR-ATR spectra of the prepared microspheres were obtained on a Fourier transform infra-red spectrometer (Nicolet i55) equipped with a Ge crystal (Nicolet, USA); the scanning range encompassed 4000 – 750 cm⁻¹. The data were collected at the resolution of 4 cm⁻¹, and averaged over 64 scans.

Release study

GC-MS was employed to measure the amount of EOCs released from all the formulations, from which the authors derived values for release kinetics.

The process involved the following steps. 10 mg of the microspheres were added into 10 ml H₂O and allowed to incubate at 25°C , under stirring at 100 rpm, for 628 h. At certain time intervals, a sample of 1 ml solution was removed and placed in head-space vials. The amount of collected media was replaced with the same amount of it in fresh form to maintain constant volume. The amount released EOC (R_{EOC}) in percentage was calculated as the amount of EOC released at time t D_t (mg) divided by the amount of EOC loaded and D_0 (mg) according Equation (3). All studies were conducted in triplicate.

$$R_{\text{EOC}} (\%) = \left(\frac{D_t}{D_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

Then the appropriate SPME fibre of $65 \mu\text{m}$ polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB 65) from Supelco was exposed to the liquid sample in head-space vial. After extraction (80°C for 30 min.), the SPME fibre was removed from the vial and immediately inserted into the gas chromatograph. Conditions for fibre desorption constituted 1 min. at 200°C .

The GC-MS system was equipped with an Rxi-5ms capillary column (length 30 m, 0.25 mm id and 0.25 μm film thickness; Restek). Helium was employed as the carrier gas at the constant flow rate of 1.35 ml·min⁻¹. The heat of the oven rose from 60°C to 160°C (1 min.) at $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, and then increased to 220°C at a rate of $28^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The temperature of the injector was maintained at 200°C , and the mode of injection utilised was splitless. The ion source and the interface were set both at 200°C . The subsequent chromatograms were recorded through monitoring the flow of total ion current in the mass range of 35–350.

Results and discussion

Size of microspheres

Table 1 shows that the mean size of the microspheres ranged between 1.5 – $9.5 \mu\text{m}$, while polydispersity (PDI) indices measured 1.6 – 2.7 . Only minor differences were observed in values for the dispersity of the microspheres. PDI values higher than 0.7 indicate that the sample has broad particle size distribution (Dos Santos *et al.* 2018). In drug delivery applications using PLA and oily active agent, Jaciene J. F. Cardoso *et al.*

Table 1. Characteristics of the prepared microspheres.

Sample	PDI	SPAN	Dx50 (μm)	EE (% w/w)	EOC (mg/g)
PLA	2.14	2.41	9.50 \pm 0.09	–	–
PLA/LIN	2.41	2.83	7.58 \pm 0.06	81.7 \pm 10.0	163.5 \pm 19.9
PLA/ALY	2.12	2.30	7.71 \pm 0.07	64.4 \pm 8.0	128.9 \pm 16.0
PLA/ANE	2.10	2.19	8.28 \pm 0.06	45.5 \pm 5.5	91.0 \pm 11.1
PMMA	1.98	2.33	1.47 \pm 0.01	–	–
PMMA/LIN	2.08	2.38	1.51 \pm 0.00	76.0 \pm 3.3	151.9 \pm 6.5
PMMA/ALY	2.29	2.68	1.66 \pm 0.01	69.7 \pm 9.2	139.3 \pm 18.4
PMMA/ANE	1.99	2.13	2.10 \pm 0.01	44.5 \pm 4.3	88.9 \pm 8.7
PLA/PMMA 25:75	1.57	1.75	2.51 \pm 0.01	–	–
PLA/PMMA/ALY 25:75	2.67	2.67	6.50 \pm 0.05	68.0 \pm 2.8	135.9 \pm 5.7
PLA/PMMA 50:50	1.90	2.28	4.91 \pm 0.02	–	–
PLA/PMMA/ALY 50:50	1.91	2.42	3.09 \pm 0.02	62.1 \pm 2.0	124.3 \pm 4.1
PLA/PMMA 75:25	1.64	1.87	3.97 \pm 0.02	–	–
PLA/PMMA/ALY 75:25	2.21	2.96	4.63 \pm 0.01	61.5 \pm 1.4	123.0 \pm 2.8

PDI – Polydispersity index; Span – The algebraic difference between the upper and lower range values; Dx50 – The diameter of the microspheres that 50% of a sample's mass is smaller than and 50% of a sample's mass is larger than; EE – Encapsulation efficiency; EOC – content of EOC in the microspheres. Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$).

obtained the PDI in range 1.0–2.7. This effect can be related to the increased viscosity of the medium, since the greater the polymer's molar mass, the higher the viscosity is of the emulsion's internal phase, making it harder to break up the droplets, thus allowing the formation of larger particles (Cardoso *et al.* 2018; Ding *et al.* 2018). Other study described that the synthesised PMMA particles exhibited monodispersed properties with narrow molecular weight distributions (PDI 1.73–3.02) (Song *et al.* 2018).

Referring again to Table 1, the PLA microspheres demonstrated slightly larger diameters than those prepared from PMMA. In the literature, a study reported by Luana Becker Peres *et al.* described the influence of processing methods on the properties of PLLA/PMMA nanoparticles. Therein, it was found that increasing the ratio of PMMA in the nanoparticles resulted in them being greater in size at the end of the experiment, a finding which is inconsistent with the results of this study. Herein, PMMA possessed a molecular weight ($M_w = 68\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) that was almost five times higher than that of PLLA ($M_w = 13\,700\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Peres *et al.* 2015). However, in our study, the PLA had a molecular weight of $181\,744\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, whereas the figure for PMMA was $158\,552\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. This could explain the variation in results in both studies.

The presence of EOCs in the microspheres did particularly affect their eventual size. These findings are in agreement with other studies which described the differences in viscosities of samples with and without incorporated active agent (Cardoso *et al.* 2018; Ding *et al.* 2018).

As detailed in Table 1, the blend ratios exerted a slight effect on the sizes of the microspheres, although no significant difference was observed in

dispersity; similar results were reported by Luana Becker Peres *et al.* (Peres *et al.* 2015).

Scanning electron microscopy

As seen in Figure 1, which juxtaposes SEM micrographs from before hydrolysis and afterwards, all the microspheres look spherical in appearance and have smooth surfaces. However, the presence of agglomerates is always visible. The effect of polymer blend (PLA/PMMA) composition is not obvious in the SEM micrographs (Figure 1(A–C)). The series of images in Figures 1(D–F) shows microspheres after the hydrolysis process that was carried out for 96 h, at 37 °C in 1 M NaOH and caused decomposition of PLA. The hydrolysis process showed the structure of microspheres in terms of the distribution of individual polymer matrices. Said images reveal that the PLA/PMMA microspheres disintegration that is more apparent with increasing PLA amount in the PLA/PMMA systems. This phenomenon is visible especially in the Figure 1(F). This could have significant effect on the release profile of the encapsulated substance as discussed further.

Fourier transform infrared spectroscopy

The authors performed FT-IR analyses to determine any interactions between the EOCs and PLA/PMMA microspheres. Figure 2 shows the FTIR-ATR spectra for pure PLA, pure PMMA, PLA or PMMA with or without said EOCs, and PLA/PMMA blends with or without ALY before and after hydrolysis (4 days, 37 °C, 1 M NaOH).

The pure PLA demonstrated characteristic signals at 1751 cm^{-1} (attributed to a C=O bond in the esters), 1454 cm^{-1} (typical for CH_3 bending), 1363 cm^{-1} (asymmetric –CH– bending) and the region between 1300 and 1040 cm^{-1} , with four intensive absorption peaks at 1184 , 1130 , 1088 (C–O–C stretching) and 1047 cm^{-1} (–OH bending). These values were in agreement with results previously published (Aso *et al.* 1994; Garlotta 2001; Panyam *et al.* 2003).

The stretching mode of the carbonyl groups exhibited absorption bands at 1751 cm^{-1} and 1727 cm^{-1} for PLA and PMMA, respectively. A band for the latter of the two samples appeared at 989 cm^{-1} due to C–C stretching influenced by CH_2 bending, and a band at 841 cm^{-1} (CH_2 rocking band) was also visible, neither of which were present in the spectra for PLA. These findings were in accordance with those of other studies (Shuai *et al.* 2001; Varela-Rizo *et al.* 2012; Anakabe *et al.* 2015). The band at 868 cm^{-1} pertained to

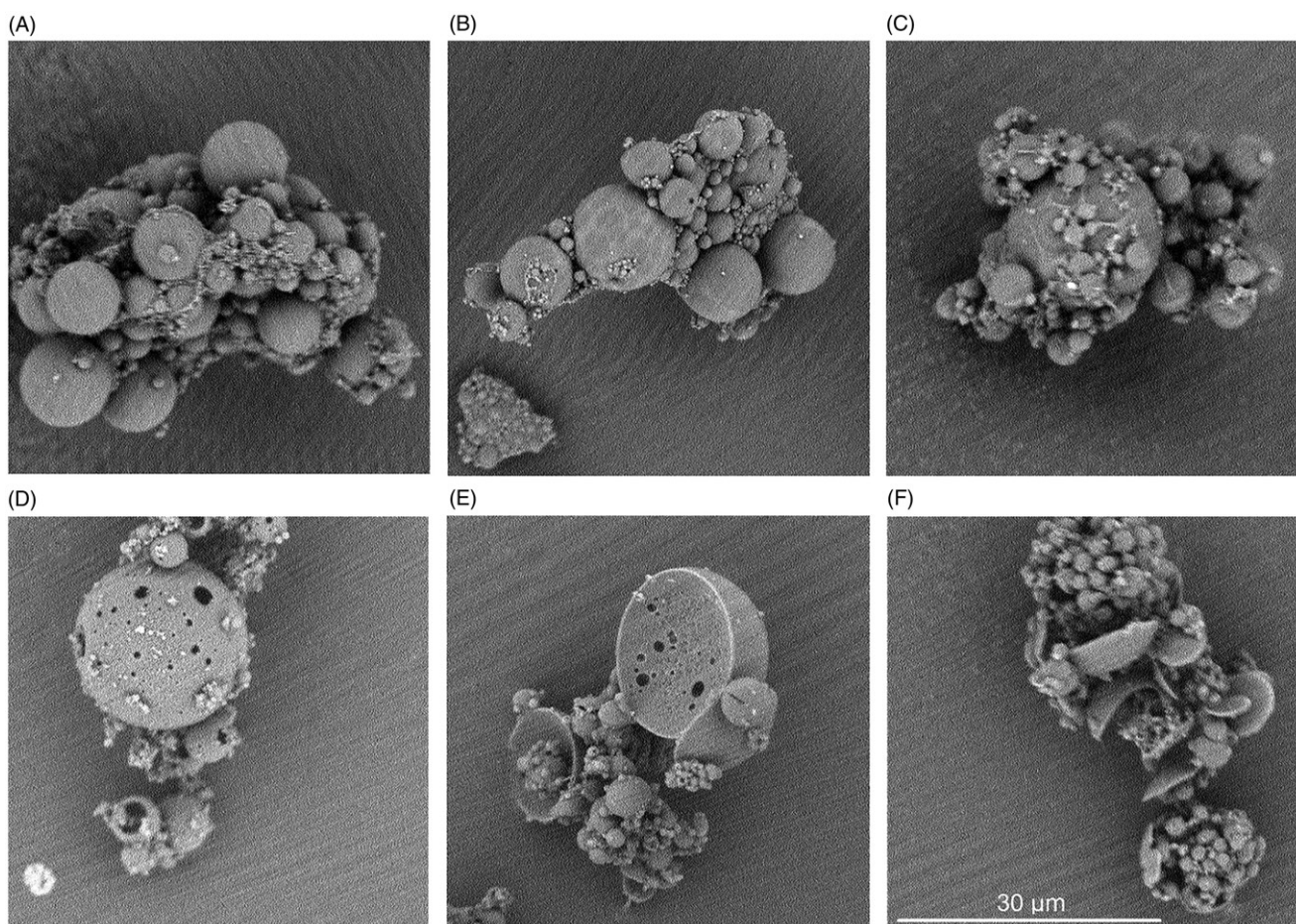


Figure 1. SEM micrographs of microspheres with various ratios of PLA/PMMA (25:75 (A), 50:50 (B) and 75:25 (C)) and the same after hydrolysis in 1 M NaOH, 37 °C, 96 h (25:75 (D), 50:50 (E) and 75:25 (F)). The scale bar shown in the (F) is identical for all micrographs.

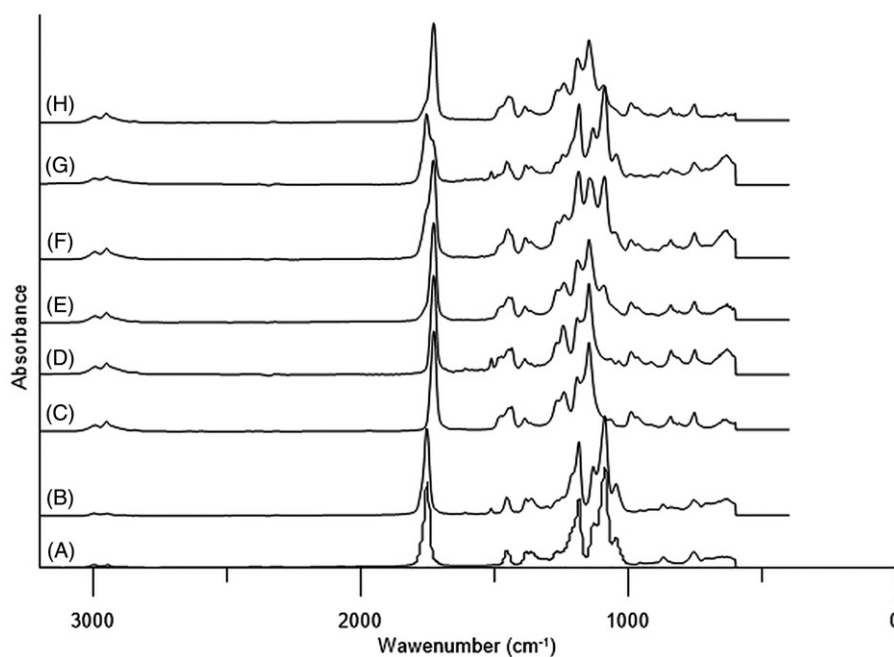


Figure 2. FTIR-ATR spectra of microspheres comprising (A) PLA, (B) PLA/ALY, (C) PMMA, (D) PMMA/ALY, (E) PLA/PMMA 25:75, (F) PLA/PMMA 50:50, (G) PLA/PMMA 75:25, and (H) PLA/PMMA 25:75 (following hydrolysis).

skeletal stretching and CH₃ rocking of the amorphous PLA; this was not present in the spectra for PMMA, in agreement with a work by Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2004). A characteristic peak for PMMA was revealed at 1387 cm⁻¹, caused by O-CH₃ deformation, in addition to a typical peak at 1147 cm⁻¹ (O-CH₃ stretching). Similar results were presented by Gupta and Sah (2013).

The IR spectrum for PMMA exhibited absorption bands at 2951 cm⁻¹ due to -CH₃ asymmetric stretching. It was observed that the intensity of this peak decreased in parallel with decline in PMMA content in the blend. For PMMA, the peaks for the carbonyl group at 1727 cm⁻¹ were transferred into the wave numbers of 1729 cm⁻¹ for PLA/PMMA 50:50 and 1752 cm⁻¹ for PLA/PMMA 75:25. Figure 2 also shows that increasing the content of PMMA in the blends triggered a rise in the intensity of a peak at 990 cm⁻¹ (CH=CH-), and adding more PLA into the blends heightened bands at 1088 cm⁻¹ (C-OH in secondary alcohols). The spectrum for every blend matched identically that for pure PMMA after 4 days of hydrolysis, which was in agreement with the results from SEM (PLA was completely hydrolyzed).

Furthermore, several new peaks arose between 1751 cm⁻¹ and 1454 cm⁻¹ in samples where to ALY and ANE had been added. The presence of other peaks at 1514 and 1610 cm⁻¹ were ascribed to framework vibration of the aromatic ring (Yang *et al.* 2017).

Encapsulation efficiency

Table 1 presents the concentrations of EOCs and recalculated percentages of EE in the EOCs encapsulated in the microspheres, which ranged between 44.5 wt. % and 81.7 wt. %. The highest value for EE was observed for microspheres with LIN, whereas EE was discerned to be at its lowest for those with ANE. This could have been caused by LIN possessing a greater area of topological polar surface area (20.2 Å²) than either ANE or ALY (9.2 Å²). The polarities of the EOCs and polymer represent an important factor in the absorption process, since the former are absorbed easily by the latter if the polarities of both are similar. Our results confirm that the PLA (a polar material) allowed for greater absorption of LIN (also polar) than ALY and ANE, respectively. These findings agree with those of another study, wherein two similar terpenes with different polarities (LIN and limonene) were compared. LLDPE and oriented polypropylene (both non-polar) were seen to absorb limonene more easily than LIN. Although LIN and limonene have similar structures,

the latter is a non-polar terpene, while LIN is an oxygenated polar terpene. Hence, limonene was absorbed more readily than LIN (Willige and van 2002).

We also observed a drop in values for EE alongside rise in the content of PLA in the blends. This was likely due to fact that crystalline regions can reduce sorption or act as impermeable barriers for diffusion through the polymer. The degree of sorption for a given solute is often related to the amount of amorphous polymer present (Charara *et al.* 1992; Letinski and Halek 1992). The literature reports that limonene and myrcene are absorbed far better by polycarbonate than polyethylene terephthalate and polyethylene naphthalate, despite the T_g of polycarbonate being much higher than the same for polyethylene terephthalate and polyethylene naphthalate. This is attributed to the lack of crystalline regions in polycarbonate, which is a totally amorphous polymer (Nielsen, 1994).

Release study

Plots of the release behaviour of the EOCs from the prepared microspheres are given in Figures 3 and 4. Each graph is interleaved with a logarithmic regression curve of the function $f(x) = B \cdot \ln(x) + A$. Coefficients of logarithmic regression are displayed in Table 2.

We observed an initial release (burst effect), which occurred as a result of the amount of EOCs absorbed on and near the surface of the microspheres (Herrmann and Bodmeier 1995; Jain *et al.* 2009). Nevertheless, a slow release in the second stage was also recorded, probably caused by the diffusion of any EOCs which had been dispersed into the PLA (PMMA) microspheres over time (Faisant *et al.* 2003; Hosseini *et al.* 2013).

Comparing the release profiles of the microspheres revealed that the release rates for those with lesser concentrations (lower EE) of EOCs (ALY) were more rapid than the same for others containing LIN. The samples of PMMA/ALY released about 57 wt. % of the encapsulated ALY after 7 h. In contrast, PMMA/LIN released about 25 wt. % of the encapsulated LIN during the same period. Similar results were reported by Hosseini *et al.*, who studied the incorporation of an EO within alginate microspheres. When the content of said EOCs was increased from 1% to 3% (w/w), cumulative release decreased from 78% to 60% after 9 h (Hosseini *et al.* 2013).

It was also found that the release rate for the PMMA microspheres was faster than those of PLA, most likely an effect of the size of said microspheres. Generally, the smaller microspheres released the

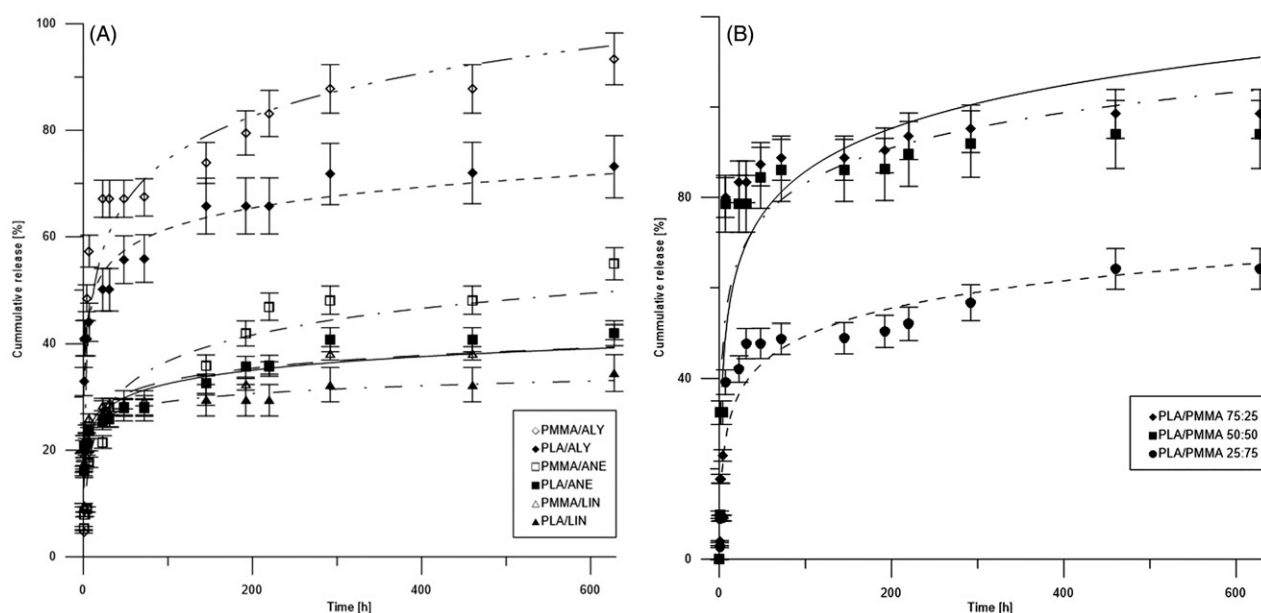


Figure 3. Cumulative release of the EOCs from the PLA and PMMA microspheres (A) and cumulative release of ALY from the PLA/PMMA microspheres (B) (error bars constitute SD).

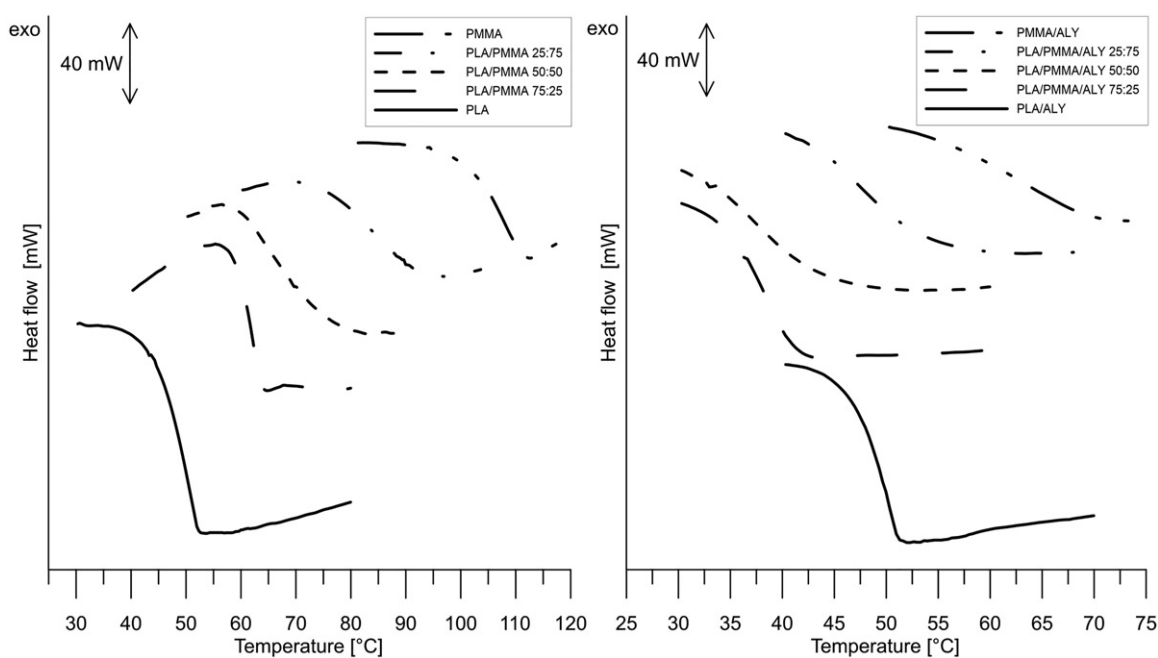


Figure 4. Relevant parts of DSC curves depicting the T_g areas of the microspheres without ALY (left) and with ALY (right).

Table 2. Coefficients of logarithmic regressions of the release data presented in Figure 3.

Sample	A	B	R^2
PLA/LIN	19.307	2.135	0.95
PLA/ALY	35.069	5.739	0.94
PLA/ANE	16.727	3.541	0.89
PMMA/LIN	16.878	3.397	0.91
PMMA/ALY	24.087	10.971	0.92
PMMA/ANE	1.884	7.563	0.95
PLA/PMMA/ALY 25:75	9.438	8.691	0.89
PLA/PMMA/ALY 50:50	36.464	10.15	0.81
PLA/PMMA/ALY 75:25	25.683	13.056	0.79

encapsulated EO more rapidly and over shorter time periods, due to their greater surface-to-volume ratios. Indeed, a similar finding was described for oregano EO-loaded chitosan nanoparticles by Hosseini *et al.* (2013).

Notably, in the case of the PLA/PMMA blends, release rates were slower for microspheres wherein higher concentrations of ALY had been incorporated (higher EE; Figure 3).

Table 3. Antibacterial activity (AA) of the microspheres ($n = 3$).

Sample	AA (%) against <i>Staphylococcus aureus</i>	AA (%) against <i>Escherichia coli</i>
PLA/PMMA 50:50	0	0
PLA/LIN	0	96.5
PLA/ALY	100	100
PLA/ANE	100	99.7
PMMA/LIN	100	100
PMMA/ALY	100	100
PMMA/ANE	100	100
PLA/PMMA/ALY 25:75	100	100
PLA/PMMA/ALY 50:50	100	100
PLA/PMMA/ALY 75:25	100	100

Studies of antibacterial properties

Table 3 summarises values recorded for the antibacterial activity of the prepared microspheres. The PLA/PMMA 50:50 blend served as a blank. Since no AA was observed for the blank, complete evaporation of the solvent occurred when preparing said sample.

Noticeably, most of the other samples exhibited 100% AA against both bacterial strains, with the exception of PLA/LIN. This sample demonstrated no reduction in the growth of *Staphylococcus aureus*, in accordance with a study performed by Suppakul *et al.* Therein, low density polyethylene/ALY composites exhibited a higher efficiency of inhibition against microorganisms than composites with LIN (Suppakul *et al.* 2008). These results can be ascribed to the physical properties of the given material. Elsewhere in the literature, components with phenolic structures, such as ALY, have proven highly activity against the same test microorganisms (Knobloch *et al.* 1989; Kim *et al.* 1995).

We also carried out disk diffusion analysis. No zones of inhibition were observed, thus the EOCs had not diffused from the microspheres as well as microspheres suspensions.

Thermal properties

A common method for judging the miscibility or compatibility of blends is to measure glass transition temperature. In terms of polymer miscibility, a peak for T_g is visible in the first-heating curve of DSC, while the presence of two T_g values (one each for PLA and PMMA) indicates the immiscibility of the materials. Relevant parts of DSC curves are presented in Figure 4.

As detailed in Table 4, the pure PLA microspheres displayed a T_g of around 50.1 °C, followed by a cold crystallization peak at 116.34 °C. In contrast, the pure PMMA film was completely amorphous, and its T_g was determined as 103.81 °C.

Table 4. Thermal properties of the microspheres determined by DSC analysis.

Sample	T_g midpoint (°C)	T_m (°C)	T_{ccc} (°C)
PLA	50.10	149.87	116.34
PLA/ALY	49.13	148.71	93.35
PMMA	103.81	–	–
PMMA/ALY	57.96	–	–
PLA/PMMA 25:75	82.50	151.80	–
PLA/PMMA/ALY 25:75	52.80	143.79	–
PLA/PMMA 50:50	67.75	152.92	–
PLA/PMMA/ALY 50:50	36.54	145.11	–
PLA/PMMA 75:25	61.69	153.45	–
PLA/PMMA/ALY 75:25	37.73	146.75	–

In the second heating scans for the PLA/PMMA blends, after removing the aspect of thermal history, we observed a single T_g at a temperature lying between the values for pure PLA and pure PMMA. Hence, the blends of PLA/PMMA formed a thermodynamically miscible system in the amorphous state. This result corresponds with research carried out by Eguiburu *et al.* (1998) and Zhang *et al.* (2003) showing that the evolution of a single T_g for miscible amorphous PLA/PMMA blends obtained by solvent evaporation technique at different compositions is in a range between the respective T_g of the individual components except samples with ALY. In addition, Table 4 shows that the value for T_g decreased alongside rise in the content of PLA.

Moreover, Table 4 presents evidence that both T_g and T_m decreased due to change of ALY content in the microspheres. This could have been due to ALY acting as a plasticiser in the polymer matrix. These findings are consistent with a study in the literature wherein the EO (Candeia) diminished values for T_g and T_m of the given PLA nanofibers (Mori *et al.* 2015).

As can be seen, semi-crystalline PLA presented a maximum endothermic peak at 150 °C pertaining to its melting temperature, whereas PMMA was totally amorphous. Indeed, similar results were described by Luana Becker Peres *et al.* (2015). Furthermore, the first-heating curves for PLA/PMMA 25:75, 50:50 and 75:25 reveal that the PLA/PMMA mixtures demonstrated an endothermic event (at about 150 °C) corresponding with the melting point of pure PLA. Table 4 also shows that the crystallization of PLA in the PLA/PMMA blends was restricted by the presence of the PMMA, again in agreement with Luana Becker Peres *et al.* (2015).

Conclusions

Microspheres loaded with essential oils were successfully prepared via the solvent evaporation technique.

PLA, PMMA or PLA/PMMA blends were utilised materials of the microspheres. Their average sizes were recorded as ranging between 1.5 and 9.5 μm on a laser diffraction particle size analyser. The release rate for the smaller ones was observed to be faster and occurred over shorter time periods due to the greater surface-to-volume ratios they possessed. DSC measurement of the PLA/PMMA blends showed a single T_g (in the second heating scan), thereby indicating their miscibility. It was also found that the encapsulation efficiency of the EOCs was affected by the given topological polar surface area. Notably, the microspheres exhibited an inhibitory effect against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. As a consequence, it may be stated that said microspheres have the potential to be applied as antibacterial agents with the capacity for controlled release, as applicable in the pharmaceutical or medical industries.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was financially supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic [grant nos. LO1504 and CZ.1.05/2.1.00/19.0409], and the Internal Grant Agency of TBU in Zlín [grant no. IGA/CPS/2018/003].

References

- Akhtar, M.S., Degaga, B., and Azam, T., 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Biological sciences and pharmaceutical research*, 2 (1), 1–7.
- Allouche, J., 2013. Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods. In: R. Brayner, F. Fiévet, T. Coradin, eds. *Nanomaterials: A danger or a promise?* London: Springer, 27–74.
- Anakabe, J., et al., 2015. Melt blending of polylactide and poly(methyl methacrylate): Thermal and mechanical properties and phase morphology characterization. *Journal of applied polymer science*, 132 (42), 42677.
- Aso, Y., et al., 1994. Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(D,L-lactide) microspheres. *Journal of controlled release*, 31 (1), 33–39.
- Auras, R., et al., 2010. *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Hoboken: John Wiley.
- Bakry, A.M., et al., 2016. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15 (1), 143–182.
- Barba, A.A., et al., 2014. Biocompatible nano-micro-particles by solvent evaporation from multiple emulsions technique. *Journal of materials science*, 49 (14), 5160–5170.
- Berkland, C., et al., 2002. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *Journal of controlled release: official journal of the controlled release society*, 82 (1), 137–147.
- Bettencourt, A., and Almeida, A.J., 2012. Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. *Journal of microencapsulation*, 29 (4), 353–367.
- Beyki, M., et al., 2014. Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial crops and products*, 54, 310–319.
- Bodmeier, R., and Huagang, C., 1990. Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfuidization. *Journal of controlled release*, 12 (3), 223–233.
- Brock, A., et al., 2016. *Cosmetic composition comprising a silicone oil and polymethylmethacrylate particles*. *European patent application 2996671 A1*, 2016-03-23.
- Bugatti, V., Sorrentino, A., and Gorrasi, G., 2017. Encapsulation of Lysozyme into halloysite nanotubes and dispersion in PLA: Structural and physical properties and controlled release analysis. *European polymer journal*, 93, 495–506.
- Cardoso, J.J.F., et al., 2018. Influence of cardanol encapsulated on the properties of poly(lactic acid) microparticles. *Química nova*, 41 (3), 273–3283.
- Castro-Aguirrea, E., et al., 2016. Poly (lactic acid)–mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 333–366.
- Castro-Rosas, J., et al., 2017. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. *Food research international*, 102, 575–587.
- Charara, Z., et al., 1992. Orange Flavor Absorption Into Various Polymeric Packaging Materials. *Journal of food science*, 57 (4), 963–968.
- De Oliveira Mori, C.L.S., et al., 2015. Nanostructured Poly(lactic acid)/Candeia Essential Oil Mats Obtained by Electrospinning. *Journal of nanomaterials*, 2015, 1–9.
- Ding, A., et al., 2018. Synthesis and characterization of bovine serum albumin-loaded microspheres based on star-shaped PLLA with a xylitol core and their drug release behaviors. *Polymer bulletin*, 75 (7), 2917–2931.
- Doerdelmann, G., Kozlova, D., and Epple, M., 2014. A pH-sensitive poly(methyl methacrylate) copolymer for efficient drug and gene delivery across the cell membrane. *Journal of material chemistry B*, 2 (41), 7123–7131.
- Dos Santos, P.P., et al., 2018. Nanoencapsulation of carotenoids: a focus on different delivery systems and evaluation parameters. *Journal of food science and technology*, 55 (10), 3851–3860.
- Eguiburu, J., et al., 1998. Blends of amorphous and crystalline polylactides with poly(methyl methacrylate) and poly(methyl acrylate): a miscibility study. *Polymer*, 39 (26), 6891–6897.
- El-Bashir, S.M., and Hendi, A., 2009. A decorative construction material prepared by making use of marble waste granules and PMMA/SiO₂ nanocomposites. *Polymer-plastics technology and engineering*, 49 (1), 78–82.
- Faisant, N., et al., 2003. Mathematical modelling of drug release from bioerodible microparticles: effect of gamma-irradiation. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 56 (2), 271–279.

- Friedman, M., Henika, P.R., and Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of food protection*, 65 (10), 1545–1560.
- Garlotta, D., 2001. A literature review of poly(lactic acid). *Journal of polymers and the environment*, 9 (2), 63–84.
- Gorrasi, G., and Pantani, R., 2017. Hydrolysis and biodegradation of poly(lactic acid). In: *Synthesis, structure and properties of poly(lactic acid)*. Cham: Springer.
- Gupta, A. K., and Sah, G. K., 2013. Miscibility Studies of PC/PMMA Blends in Tetrahydrofuran by Viscometry, FTIR and SEM Analysis. *Nanosystems: physics, chemistry, mathematics*, 4 (5), 670–679.
- Gurny, R., et al., 1981. Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug development and industrial pharmacy*, 7 (1), 1–25.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., and Bourke, P., 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food microbiology*, 26 (2), 142–150.
- Hamad, K., Kaseem, M., and Deri, F., 2011. Effect of recycling on rheological and mechanical properties of poly(lactic acid)/polystyrene polymer blend. *Journal of materials science*, 46 (9), 3013–3019.
- Herrmann, J., and Bodmeier, R., 1995. The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *Journal of controlled release*, 36 (1–2), 63–71.
- Holcapkova, P., et al., 2018. Thermal stability of bacteriocin nisin in polylactide-based films. *Polymer degradation and stability*, 158, 31–39.
- Hosseini, S.F., et al., 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate polymers*, 95 (1), 50–56.
- Hosseini, S.M., et al., 2013. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International journal of biological macromolecules*, 62, 582–588.
- Hu, J., et al., 2011. Properties of aroma sustained-release cotton fabric with rose fragrance nanocapsule. *Chinese journal of chemical engineering*, 19 (3), 523–528.
- Imre, B., and Pukánszky, B., 2013. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. *European polymer journal*, 49 (6), 1215–1233.
- Jaeghere, D., Doelker, E., and Gurny, R., 1999. Nanoparticles. In: E. Mathiowitz, ed. *The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. New York: Wiley and Son, Inc., 641–664.
- Jain, A., et al., 2009. Formulation, characterization and in vitro evaluation of floating microspheres of famotidine as a gastro retentive dosage form. *Asian journal of pharmaceuticals*, 3 (3), 222.
- Jyothi, N.V.N., et al., 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, 27 (3), 187–197.
- Jyothi, S.S., et al., 2012. Microencapsulation: a review. *International journal of pharma and bio science*, 3 (1), 509–531.
- Kim, J., Marshall, M.R., and Wei, C.I., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five food-borne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43 (11), 2839–2845.
- Knobloch, K., et al., 1989. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *Journal of essential oil research*, 1 (3), 119–128.
- Lassalle, V., and Ferreira, M.L., 2007. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. *Macromolecular bioscience*, 7 (6), 767–783.
- Leimann, F.V., et al., 2009. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials science and engineering: C*, 29 (2), 430–436.
- Letinski, J., and Halek, G.W., 1992. Interactions of citrus flavor compounds with polypropylene films of varying crystallinities. *Journal of food science*, 57 (2), 481–484.
- Li, M., Rouaud, O., and Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International journal of pharmaceuticals*, 363 (1–2), 26–39.
- Lim, L.T., Auras, R., and Rubino, M., 2008. Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in polymer science*, 33 (8), 820–852.
- Lima, S.C., et al., 2012. In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against *Leishmania infantum* protozoa. *International journal of antimicrobial agents*, 39 (5), 424–430.
- López, P., et al., 2007. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (21), 8814–8824.
- López-Malo, A., et al., 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food control*, 18 (11), 1358–1362.
- Maresca, D., et al., 2016. Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT - Food science and technology*, 66, 436–443.
- Martins, I.M., et al., 2014. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical engineering journal*, 245, 191–200.
- Murariu, M., and Dubois, P., 2016. PLA composites: From production to properties. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 17–46.
- Nielsen, T.J., 1994. Limonene and myrcene sorption into refillable polyethylene terephthalate bottles, and washing effects on removal of sorbed compounds. *Journal of food science*, 59 (1), 227–230.
- Panyam, J., et al., 2003. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of controlled release*, 92 (1–2), 173–187.
- Peres, L.B., et al., 2015. Preparation of PLLA/PMMA and PLLA/PS binary blend nanoparticles by incorporation of PLLA in methyl methacrylate or styrene miniemulsion homopolymerization. *Polímeros*, 25 (1), 23–28.
- Plard, J.-P., and Bazile, D., 1999. Comparison of the safety profiles of PLA50 and Me.PEG-PLA50 nanoparticles after single dose intravenous administration to rat. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 16 (1–4), 173–183.
- Rasal, R.M., Janorkar, A.V., and Hirt, D.E., 2010. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in polymer science*, 35 (3), 338–356.

- Rodriguez-Lafuente, A., Nerin, C., and Batlle, R., 2010. Active paraffin-based paper packaging for extending the shelf life of cherry tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (11), 6780–6786.
- Sánchez, A., Vila-Jato, J., and Alonso, M.J., 1993. Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporin A. *International journal of pharmaceuticals*, 99 (2-3), 263–273.
- Sansukcharearnpon, A., et al., 2010. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: Preparation and release behavior. *International journal of pharmaceuticals*, 391 (1-2), 267–273.
- Sedlarik, V., et al., 2010. The effect of preparation temperature on the mechanical and antibacterial properties of poly(vinyl alcohol)/silver nitrate films. *Polymer degradation and stability*, 95 (3), 399–404.
- Shuai, X., et al., 2001. Formation of and coalescence from the inclusion complex of a biodegradable block copolymer and α -cyclodextrin: a novel means to modify the phase structure of biodegradable block copolymers. *Macromolecules*, 34 (21), 7355–7361.
- Song, J., et al., 2016. A note on the optic characteristics of daylighting system via PMMA fibers. *Solar energy*, 136, 32–34.
- Song, Y., et al., 2018. Process characteristics and rheological properties of free radical polymerization in microreactors. *Industrial and engineering chemistry research*, 57 (32), 10922–10934.
- Strbak, O., et al., 2017. Measurement of the magnetite nanoparticles' relaxivity during encapsulation into polylactide carriers. *Measurement*, 104, 89–92.
- Sulu, E., et al., 2017. Synthesis, characterization, and drug release properties of macroporous dual stimuli responsive stereo regular nanocomposites gels of poly(N-isopropylacrylamide) and graphene oxide. *Journal of porous materials*, 24 (2), 389–401.
- Suppakul, P., et al., 2008. Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *LWT - Food science and technology*, 41 (5), 779–788.
- Suppakul, P., et al., 2011. Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of food engineering*, 105 (2), 270–276.
- Swamy, M.K., and Sinniah, U.R., 2016. Patchouli (Pogostemon cablin Benth.): Botany, agrotechnology and biotechnological aspects. *Industrial crops and products*, 87, 161–176.
- Swamy, M.K., et al., 2015. Evaluation of patchouli (pogostemon cablinbenth.) cultivars for growth, yield and quality parameters. *Journal of essential oil bearing plants*, 18 (4), 826–832.
- Teeka, P., Chaiyasat, A., and Chaiyasat, P., 2014. Preparation of poly (methyl methacrylate) microcapsule with encapsulated jasmine oil. *Energy procedia*, 56, 181–186.
- Vano-Herrera, K., Misiun, A., and Vogt, C., 2015. Preparation and characterization of poly(lactic acid)/poly(methyl methacrylate) blend tablets for application in quantitative analysis by micro Raman spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy*, 46 (2), 273–279.
- Varela-Rizo, H., et al., 2012. Processing and functionalization effect in CNF/PMMA nanocomposites. *Composites part A: Applied science and manufacturing*, 43 (4), 711–721.
- Weng, Y.M., and Hotchkiss, J.H., 1992. Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film containing the antimycotic imazalil. *Journal of food protection*, 55 (5), 367–369.
- Weng, Y.M., and Hotchkiss, J.H., 1993. Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Packaging technology and science*, 6 (3), 123–128.
- Willige, R.W.G.van, 2002. *Effects of flavour absorption on foods and their packaging materials*. Thesis (PhD). Wageningen University.
- Yang, Z., et al., 2017. Host-guest complexes of estragole with β -cyclodextrin: an experimental and theoretical investigation. *Flavour and fragrance journal*, 32 (2), 102–111.
- Yu, L., Dean, K., and Li, L., 2006. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in polymer science*, 31 (6), 576–602.
- Zhang, G., et al., 2003. Miscibility and phase structure of binary blends of polylactide and poly(methyl methacrylate). *Journal of polymer science part B: Polymer physics*, 41 (1), 23–30.
- Zhang, J., et al., 2004. Weak Intermolecular Interactions during the Melt Crystallization of Poly(l-lactide) Investigated by Two-Dimensional Infrared Correlation Spectroscopy. *The journal of physical chemistry B*, 108 (31), 11514–11520.

Miroslava Dušánková

Příprava a charakterizace polymerních systémů pro speciální aplikace s využitím biologicky aktivních látek přírodního původu

Preparation and characterization of polymer systems for special application
utilizing natural biologically active compounds

Disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín

Sazba: Miroslava Dušánková

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2022