

# **Studium biopolymerních nosičů pro účely uvolňování bioaktivních organických látek**

Bc. Monika Matušincová

---

Diplomová práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Matušincová**  
Osobní číslo: **T20135**  
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Studium biopolymerních nosičů pro účely uvolňování bioaktivních organických látek**

## Zásady pro vypracování

### I. Teoretická část:

Provedte rešerši zaměřenou na bioaktivní polymerní systémy, soustředte se zejména na faktory ovlivňující podmínky uvolňování enkapsulovaných látek, jako je smáčivost nosiče, možnosti funkcionalizace, charakter aktivní sloučeniny ( $M_w$ , náboj), a dále vnější faktory, jako je iontová síla nebo teplota.

### II. Praktická část:

V praktické části připravte biopolymerní filmy s obsahem různých aktivních organických sloučenin a studujte vliv jejich inkorporace na povrchové vlastnosti nosičů a podmínky uvolňování. Provedte kritické zhodnocení dosažených výsledků a stanovte závěry.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Embuscado, M. E. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer Science 2009, ISBN 978-0-387-93823-4.
- [2] Mujtaba, M., Morsi, R. E. et al. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 2019, 121, 889-904.
- [3] Li, B., Wang, J. et al. Drug-loaded chitosan film prepared via facile solution casting and air-drying of plain water-based chitosan solution for ocular drug delivery. *Bioactive Materials* 2020, 5, 77-583.
- [4] Becerra, J., Sudre, G. et al. Tuning the hydrophilic/hydrophobic balance to control the structure of chitosan films and their protein release behaviour. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 2016, 18.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.**  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

---

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

---

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

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Teoretická část předložené diplomové práce se zaměřuje na typy nosičů aktivních látek, charakteristiku vybraných biopolymerů, vhodných pro jejich přípravu, a také klasifikaci bioaktivních látek. V závěru teoretické části jsou shrnuty faktory, které mají vliv na kinetiku uvolňování aktivních molekul z nosných systémů.

Praktická část se věnuje přípravě a charakterizaci biopolymerních chitosanových filmů s inkorporovanými bioaktivními látkami, konkrétně kurkuminem a thymolem. U vzorků byly sledovány mechanické, povrchové, strukturní a antibakteriální vlastnosti. Stěžejní část se zabývá studiem faktorů, které uvolňování vybraných fenolických sloučenin ovlivňují, jako je teplota, pH a složení systému.

**Klíčová slova:** nosný systém, biopolymer, aktivní látka, thymol, kurkumin, kinetika uvolňování, teplota, pH

## **ABSTRACT**

The theoretical part of the submitted diploma thesis focuses on the types of active substance carriers, the characteristics of selected biopolymers suitable for their preparation, as well as the classification of bioactive substances. At the end of the theoretical part, the factors that affect the release kinetics of active molecules from carrier systems are summarized.

The practical part deals with the preparation and characterization of biopolymer chitosan films with incorporated bioactive substances, specifically curcumin and thymol. The mechanical, surface, structural and antibacterial properties of the samples were monitored. The main part deals with the study of factors that affect the release of selected phenolic compounds, such as temperature, pH and system composition.

**Keywords:** carrier system, biopolymer, active substance, thymol, curcumin, release kinetics, temperature, pH

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce doc. Ing. Janě Sedlařikové, Ph.D., která byla vždy ochotná se nad jakýmkoli problémem pozastavit a prodiskutovat její, dala mi celou řadu cenných rad a zkušeností. Děkuji jí za skvělé vedení. Dovolím si říct, že její spolupráci se mnou vnímám jako velmi profesionální a nadstandardní, a za to ji moc děkuji. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Pavlovi Plevovi, Ph.D. za jeho pomoc při mikrobiologických zkouškách, a Ing. Lucii Bartošové za pomoc při odběrech testu uvolňování. Na závěr bych chtěla poděkovat i své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK</b> .....	<b>12</b>
1.1 LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE.....	12
1.2 LIPOZOMY .....	12
1.3 MICELY .....	13
1.4 EMULZNÍ SYSTÉMY.....	13
1.4.1 Mikroemulze .....	14
1.4.2 Nanoemulze.....	14
1.5 POLYMERNÍ FILMY .....	14
1.5.1 Odlévání z roztoku .....	15
1.5.2 Vytlačování .....	15
<b>2 BIOPOLYMERY JAKO NOSNÉ SYSTÉMY</b> .....	<b>17</b>
2.1 CELULÓZA.....	17
2.1.1 Deriváty celulózy .....	19
2.2 XANTANOVÁ GUMA.....	19
2.3 KYSELINA HYALURONOVÁ .....	20
2.4 CHITOSAN .....	21
<b>3 BIOAKTIVNÍ LÁTKY</b> .....	<b>24</b>
3.1 KOVOVÉ IONTY .....	24
3.2 VITAMÍNY .....	24
3.2.1 Vitamín C .....	24
3.2.2 Vitamín E .....	24
3.3 ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	25
3.4 THYMOL.....	25
3.5 KURKUMIN.....	26
<b>4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KINETIKU UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK</b> .....	<b>27</b>
4.1 CHARAKTER AKTIVNÍ LÁTKY .....	28

4.1.1	Rozpustnost .....	28
4.1.2	Množství/dávka aktivní látky .....	29
4.1.3	Molekulová hmotnost.....	29
4.2	CHARAKTER POLYMERU .....	29
4.2.1	Smáčivost nosiče .....	30
4.2.2	Velikost částic polymerního roztoku .....	31
4.3	VLASTNOSTI ROZPOUŠTĚDLA .....	32
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY .....</b>	<b>35</b>
6.1	CHEMIKÁLIE.....	35
6.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	35
6.3	METODICKÉ POSTUPY .....	36
6.3.1	Příprava zásobního roztoku 1 % kyseliny octové .....	36
6.3.2	Příprava chitosanového roztoku .....	37
6.3.3	Příprava pufrů.....	37
6.3.4	Příprava směsi Tweenu 80 a thymolu .....	37
6.3.5	Příprava chitosanových filmů s obsahem thymolu jako aktivní látky .....	38
6.3.6	Příprava chitosanových filmů s obsahem kurkuminu jako aktivní látky .....	38
6.3.7	Měření tloušťky připravených filmů .....	38
6.3.8	Měření kontaktního úhlu .....	38
6.3.9	Mechanické vlastnosti .....	38
6.3.10	FTIR-ATR spektroskopie.....	40
6.3.11	Sledování uvolňování aktivní látky ze vzorku .....	40
6.3.12	Mikrobiologické zkoušky.....	41
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>42</b>
7.1	VIZUÁLNÍ HODNOCENÍ CHITOSANOVÝCH FILMŮ .....	42
7.1.1	Chitosanové filmy s obsahem thymolu jako aktivní látky .....	42
7.1.2	Chitosanové filmy s obsahem kurkuminu jako aktivní látky.....	43
7.2	MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU .....	43
7.3	MĚŘENÍ VPICHU .....	45
7.4	TAHOVÁ ZKOUŠKA .....	47
7.5	FTIR-ATR SPEKTROSKOPIE .....	50
7.6	SLEDOVÁNÍ UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍ LÁTKY ZE VZORKU .....	52
7.7	MIKROBIOLOGICKÉ ZKOUŠKY .....	63
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>



<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>79</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>80</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>82</b>

## ÚVOD

Biopolymery jsou v současné době předmětem zájmu mnoha studií, zejména kvůli jejich benefitům v podobě biodegradability, biokompatibility a flexibility. Své uplatnění nacházejí v celé řadě oborů včetně farmaceutického, zemědělského, potravinářského a kosmetického průmyslu. Zejména v oblasti výroby biopolymerních systémů pro enkapsulaci látek probíhá v posledních letech intenzivní vývoj, za účelem optimalizace podmínek uvolňování na dané místo určení. Zvýšená pozornost je věnována tzv. responzivním systémům, které citlivě reagují na změny vnějších podmínek, jako je pH nebo teplota. Mezi perspektivní biopolymerní materiály patří zejména polysacharidy, zahrnující například celulózu, chitosan, nebo jejich deriváty.

Teoretická část je věnována klasifikaci některých typů nosičů aktivních látek, dále se zaměřuje na biopolymery, které jsou vhodné právě pro výrobu nosičů, a vybrané bioaktivní sloučeniny, včetně thymolu a kurkuminu, které byly využity v experimentu. V neposlední řadě je zde uveden přehled faktorů, které ovlivňují kinetiku uvolňování aktivních látek z nosných systémů.

V rámci experimentální části této diplomové práce byly připraveny chitosanové filmy, do nichž byly inkorporovány aktivní fenolické látky. U těchto vzorků byly sledovány fyzikálně-chemické charakteristiky, jako například smáčivost, mechanické vlastnosti a antibakteriální aktivita. Hlavní důraz byl kladen na studium kinetiky kurkuminu a thymolu z chitosanových filmů do fosfátového pufru při různých teplotách a hodnotách pH. Cílem práce bylo zhodnotit možnosti využití formulací na bázi chitosanu a kurkuminu, resp. thymolu pro tzv. responzivní systémy k řízenému uvolňování aktivních látek.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 NOSIČE AKTIVNÍCH LÁTEK

Nosiče pro aktivní molekuly mohou být připraveny z mnoha typů materiálů a mohou existovat v různých formách, jako jsou částice, emulzní systémy, polymerní filmy, micely atd. Při přípravě aktivních nosných systémů je třeba vzít v úvahu řadu faktorů, zejména charakter účinné látky, případné vzájemné interakce s nosičem a/nebo požadované vlastnosti a použití. Optimální nosný systém by měl být stabilní, bezpečný, ekonomicky i environmentálně příznivý.

### 1.1 Lipidové nanočástice

Lipidové nanočástice jsou nanoemulzní systémy typu O/V, ve kterých je kapalný olej nahrazen pevným lipidem nebo směsí pevných a kapalných lipidů. Průměrná velikost lipidových částic je v rozmezí od 40 do 1000 nm a pro stabilizaci se používá koncentrace povrchově aktivní látky od 0,5 do 5 hm.%. Tyto nosiče mohou být vyráběny různými technikami, jako je vysokotlaká homogenizace, mikroemulzní technika, metoda vstříkávání rozpouštědla (nebo vytěsňování), inverze fází nebo ultrazvuku. Lipidové částice mají výhody v zachycení jak hydrofilních, tak hydrofobních aktivních látek ve vysokých koncentracích. Kapacita plnění léčivem je však nižší kvůli lipidové krystalické struktuře [1].

### 1.2 Lipozomy

Lipozomy jsou v dnešní době široce používány ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Tyto sférické vezikuly mají hydrofilní jádro obklopené alespoň jednou dvojrstvou na bázi fosfolipidů. Nejčastěji používaným fosfolipidem je fosfatidylcholin. Do lipozomů lze enkapsulovat hydrofilní, hydrofobní, a dokonce amfifilní molekuly, a to navzdory skutečnosti, že jejich jádro je samo o sobě hydrofilní. Zatímco hydrofobní činidla jsou inkorporována mezi lipidovou dvojrstvou, hydrofilní molekuly jsou zapouzdřeny v jádru a amfifilní látky zůstávají na rozhraní voda/lipid [1], [2].

Lipozomy jsou perspektivními transportními systémy díky jejich biologické rozložitelnosti, biokompatibilitě, nízké toxicitě a snadnému způsobu přípravy. Jedním z negativních aspektů je rychlé uvolňování ve vodě špatně rozpustných léčiv zapouzdřených v lipidové dvojrstvě. Další nevýhodou je nízká fyzikální a chemická stabilita způsobená oxidací a hydrolýzou fosfolipidů [1].

Lipozomy mohou být připraveny disperzí lipidových molekul ve vodné fázi prováděnou mechanickými metodami, jako je metoda hydratace filmu, sonikace, mikrofluidizace, extruze nebo náhrada organických rozpouštědel [3].

### 1.3 Micely

Micely jsou agregáty povrchově aktivních látek, které vznikají až po dosažení určité koncentrace, kterou nazýváme kritická micelární koncentrace (cmc) [4, str. 178].

Micely mohou existovat v různých formách. V závislosti na polaritě prostředí se rozlišují micely klasické a inverzní. Solubilizační kapacita micel surfaktantu závisí na jeho molekulární struktuře, dále pak na typu solubilizované molekuly, mechanismu zapouzdření a fyzikálně-chemických interakcích přítomných složek [5].

Ve vodných roztocích jsou hydrofobní činidla, např. léčiva, zabudována do hydrofobního jádra micel, což zvyšuje jejich rozpustnost. Na druhé straně se polární materiály běžně nacházejí v tzv. palisádové vrstvě micely [6].

Prostřednictvím solubilizace do micel lze do polárního roztoku zabudovat poměrně velká množství špatně rozpustných účinných látek. Navíc díky nízké koncentraci vody v micelárním jádru je potlačena hydrolytická degradace, což zvyšuje chemickou stabilitu solubilizované molekuly. Kinetika uvolňování může být řízena díky rozdělení enkapsulovaného činidla ve struktuře micelárního agregátu, což napomůže zvýšení výsledného účinku aktivní molekuly v požadovaném místě určení [7].

### 1.4 Emulzní systémy

Emulze jsou disperzní systémy, které se skládají ze dvou nemísitelných kapalin, obvykle vody a oleje, přičemž jedna z kapalin je rozptýlena ve formě malých sférických kapiček ve druhé. Emulze lze klasifikovat podle rozložení olejové a vodné fáze na olej ve vodě (O/V), kdy jsou kapky oleje rozptýlené ve vodné fázi, a voda v oleji (V/O), které obsahují kapičky vody rozptýlené v olejové fázi [8].

Existují i emulze složené, například O/V/O nebo V/O/V. Dalším kritériem klasifikace emulzních systémů je velikost kapiček, a to na mikroemulze, nanoemulze a makroemulze [9].

### 1.4.1 Mikroemulze

Mikroemulze jsou transparentní, termodynamicky stabilní izotropní disperzní systémy obsahující částice v rozmezí od 10 do 100 nm. Vznikají spontánně s vyšším podílem kofaktantu, který způsobuje další snížení mezifázového napětí [10].

### 1.4.2 Nanoemulze

Nanoemulze obvykle obsahují částice o velikosti od 20 až 200 nm s vysokou mezifázovou plochou a vykazují vysokou solubilizační kapacitu a nízkou viskozitu. Ve srovnání s mikroemulzemi nejsou termodynamicky stabilní, ale mohou mít vysoký podíl kinetické stability proti sedimentaci, flokulaci a/nebo koalescenci, pokud jsou připraveny za optimálních podmínek [10].

K přípravě nanoemulzí lze využít vysokoenergetické nebo nízkenergetické homogenizační metody. Druhá jmenovaná skupina zahrnuje techniky využívající fázovou inverzi během emulgace, jako je metoda inverzního bodu emulze (EIP) nebo metoda teploty inverze fází (PIT) [9].

## 1.5 Polymerní filmy

Polymerní filmy představují perspektivní nosiče pro enkapsulaci různých aktivních látek, které mohou sloužit mimo jiné jako povlaky a obaly pro konzervaci potravin nebo jako obvazy na rány. Tyto systémy dokážou řídit propustnost plynů, vlhkosti, zabraňovat oxidačním mechanismům, omezovat tvorbu biofilmu, a prodlužovat tak trvanlivost produktu [11].

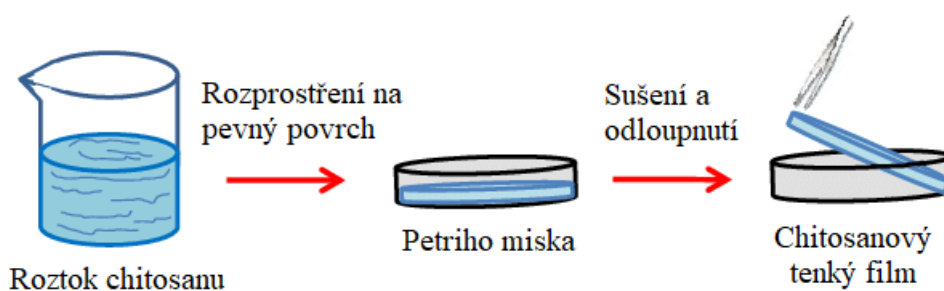
Pro přípravu takových systémů mohou být využity syntetické a/nebo přírodní polymery. Syntetické polymery si získaly velkou část pozornosti v mnoha průmyslových oblastech, zejména díky variabilitě fyzikálních a chemických vlastností, kterých lze dosáhnout na základě charakteru monomerních jednotek, typu polymerační reakce a potenciální tvorby kopolymerů s různými složkami. V bioaktivních systémech se často používají hydrolyticky degradovatelné polymery, zatímco u biopolymerů je preferován proces enzymatické degradace [12].

Filmy lze získávat pomocí různých technik, jako je metoda odlévání, tzv. mokrá metoda, nebo vytlačování, tzv. suchá metoda [13].

### 1.5.1 Odlévání z roztoku

Metoda odlévání z roztoku, také nazývaná jako mokrý proces, zahrnuje tři kroky: dispergaci nebo solubilizaci polymeru v rozpouštědlovém médiu, následné odlévání roztoku na rovný povrch a finální sušení. Film lze po zaschnutí z rovného povrchu lehce sloupnout (Obr. 1). Uvádí se, že tento pomalý proces odlévání/odpařování poskytuje materiály s nejvyšším mechanickým výkonem. To je přičítáno skutečnosti, že během pomalého odpařování rozpouštědla je umožněno přeskupení malých částic v důsledku Brownova pohybu v suspenzi nebo roztoku [14, str. 14-15].

Metoda odlévání je nejčastěji využívána pro tvorbu filmů v laboratorních a pilotních měřeních. Mezi hlavní výhody této techniky patří nenáročné provedení bez nutnosti použití specializovaného vybavení a s tím související nízké náklady. Další výhodou je nižší zpracovatelská teplota, homogenita a optická čistota výsledného produktu. Nevýhody spočívají zejména v limitaci množství a forem pro odlévání filmů, používání toxických rozpouštědel, možná denaturace proteinů a dalších molekul a dlouhá doba schnutí [15].

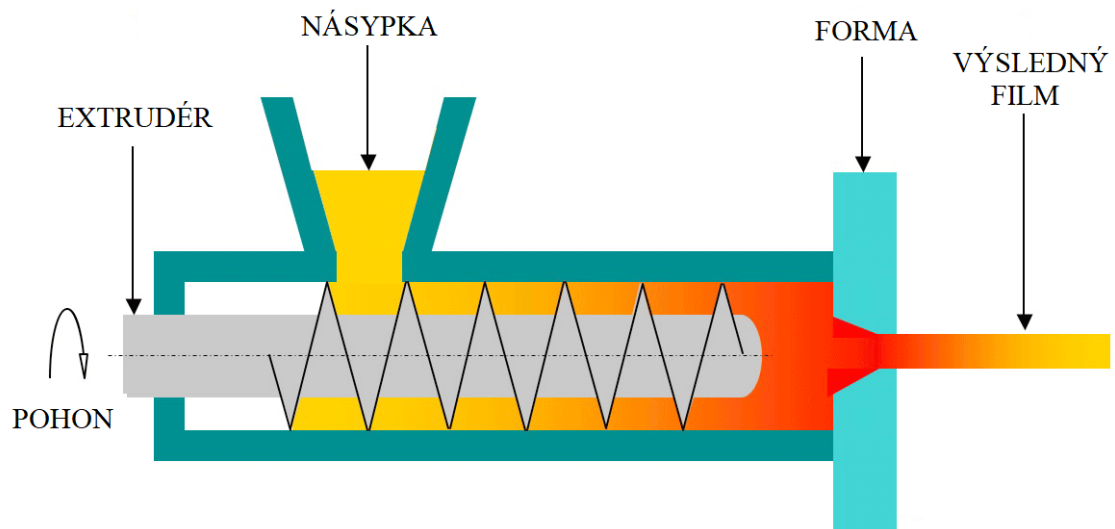


Obrázek 1 Schéma techniky odlévání (upraveno dle [16, str. 4])

### 1.5.2 Vytlačování

Metoda vytlačování se označuje jako suchý proces, jelikož se využívá jen omezené nebo žádné množství rozpouštědla. Hlavní výhodou této metody je kratší doba přípravy, a to z důvodu eliminace kroku odpaření rozpouštědla. K vytlačování jsou využívány extrudery. Proces extruze zahrnuje tři kroky. Prvním je přidavek polymeru a dalších přísad do extruderu, v dalších dvou krocích dochází k hnětení a ohřevu směsi. Na konci extruderu je fixována matrice, jejíž typ rozhoduje o tvaru a tloušťce extrudovaného filmu (Obr. 2). Z důvodu aplikace vysokých teplot může docházet ke změně struktury polymeru a k degradaci teplotně citlivých materiálů [13].

Filmy získané metodou vytlačování se vyznačují dobrými mechanickými a optickými vlastnostmi. Vzhledem k vysoké efektivitě se proces extruze využívá v komerčním měřítku při velkovýrobě například v potravinářství. Mezi nevýhody této metody patří především omezení zpracování pouze na teplotně tolerantní směsi surovin s nízkou vlhkostí, také vyšší počáteční náklady na specializované vybavení a náklady na údržbu [15].



Obrázek 2 Schéma procesu extruze (upraveno dle [17])



## 2 BIOPOLYMERY JAKO NOSNÉ SYSTÉMY

Polymerní materiály nacházejí své uplatnění v celé řadě oborů včetně farmaceutického, zemědělského, potravinářského a kosmetického průmyslu. Polymery lze klasifikovat podle struktury, a to na lineární, rozvětvené a zesíťované typy. Podle původu se polymery dělí na přírodní a syntetické. Mezi syntetické polymerní materiály řadíme polymery připravené v laboratoři, jako je například polyethylen, polystyren, polyvinylchlorid, syntetický kaučuk atd. Přírodní polymery jsou izolovány z přírodních materiálů (rostlinných a/nebo živočišných zdrojů) a jsou v dnešní době velmi perspektivní vzhledem k rostoucímu trendu eliminace množství syntetických látek v životním prostředí. Mezi zástupce přírodních polymerů patří polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny a přírodní kaučuk [18].

Různé přírodní, ale i syntetické polymery, které jsou biologicky rozložitelné a ve vodě rozpustné mají velký význam při výrobě nosných systémů pro uvolňování a dodávání léčiv a jiných aktivních látek.

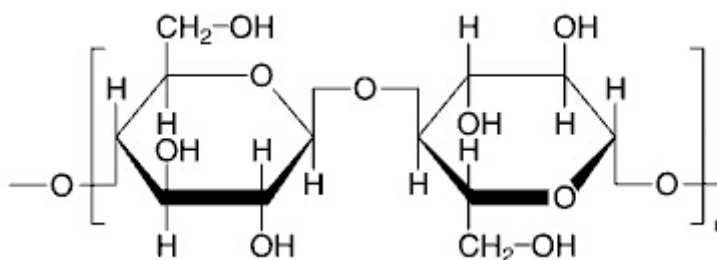
Mezi stěžejní výhody těchto materiálů patří zejména:

- schopnost zlepšit rozpustnost různých hydrofobních nízkomolekulárních sloučenin ve vodě
- prodloužení doby jejich cirkulace v krevním oběhu
- zlepšení biologické dostupnosti aktivních molekul
- ochrana nestabilní aktivní sloučeniny před degradací a znehodnocením [19, str. 37]

Z přírodních polymerních materiálů jsou pro nosiče aktivních látek často využívány různé typy polysacharidů, z nichž některé budou klasifikovány v následujících kapitolách.

### 2.1 Celulóza

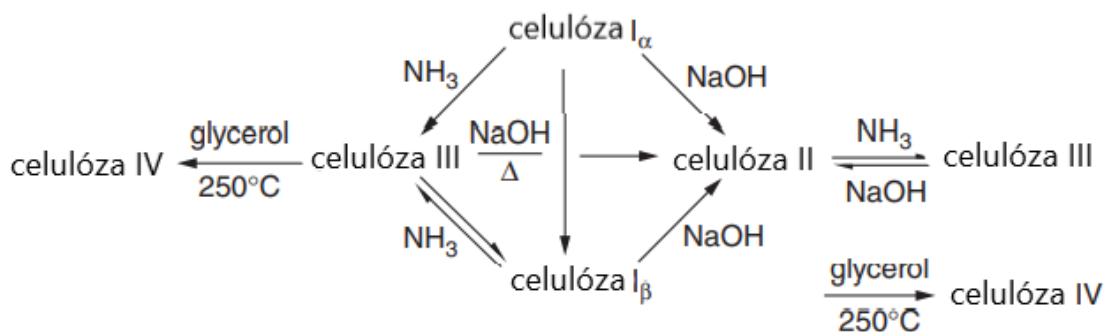
Celulóza je přirozeně se vyskytující biopolymer přítomný zejména v buněčných stěnách mnoha organismů, jako jsou bakterie, sinice, houby, zelené řasy, améby, kapradiny, mechy a krytosemenné rostliny. Celulóza je tvořena anhydro-D-glukopyranosovými jednotkami spojenými 1,4 vazbami (Obr. 3). Primárně je tento biopolymer nerozpustný ve vodě a ve většině rozpouštědel, a to z důvodu silných inter a intramolekulárních vodíkových vazeb v molekule [20, str. 10-11].



Obrázek 3 Strukturální vzorec celulózy [21]

Díky supramolekulární struktuře celulózy může existovat v krystalické i amorfní formě. Stupeň krystalinity se může podle typu předúpravy a původu celulózy pohybovat od 40 % do 60 %.

Morfologie celulózy má významný vliv na její reaktivitu. Rostlinná celulóza se nachází ve dvou nativních formách: celulóza I a celulóza II, přičemž obě tyto formy jsou krystalické. Celulóza II se tvoří z celulózy I po smíchání s vodným roztokem hydroxidu sodného. Existují celkem čtyři různé krystalické polymorfy celulózy – I, II, III, a IV, z nichž nejstabilnější je celulóza II. Zpracování celulózy I a II kapalným amoniakem vede ke vzniku celulózy typu III, jejímž zahříváním se získá celulóza IV. Obrázek 4 ukazuje vývojový diagram přeměny celulózy na její různé polymorfy.



Obrázek 4 Diagram přeměny celulózy (upraveno dle [20, str. 11])

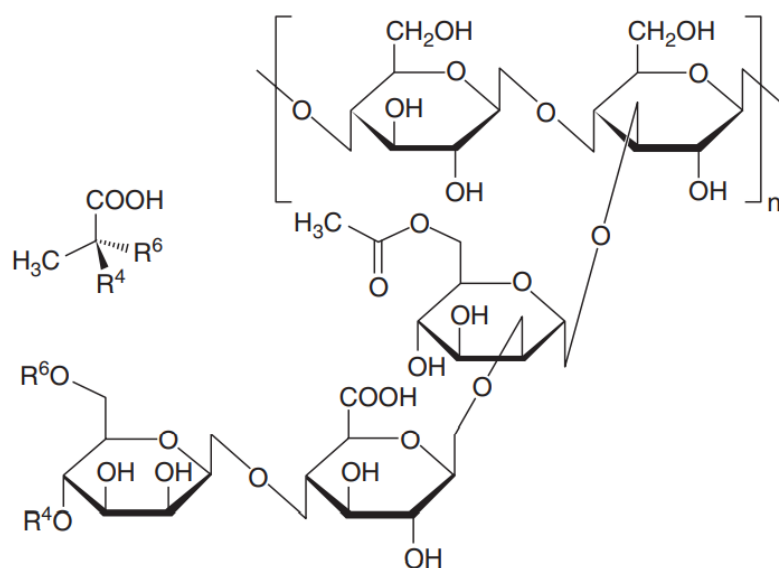
I přes svou špatnou rozpustnost má celulóza široké využití, a to například v průmyslu nátěrových hmot, papírenském průmyslu, zdravotnictví, ale i potravinářství [20, str. 10-11].

### 2.1.1 Deriváty celulózy

Modifikace celulózy, například esterifikací a etherifikací na hydroxylové skupině, umožňuje získat deriváty s lepšími zpracovatelskými vlastnostmi, které lze s výhodou využít v systémech pro řízené dodávání léčiv a jiných aktivních látek. Jedná se o biokompatibilní, reprodukovatelné a recyklovatelné materiály vhodné pro různé farmaceutické aplikace. Mezi typické příklady patří methylcelulóza, ethylcelulóza, hydroxyethylcelulóza, hydroxyethylmethylcelulóza, hydroxypropylcelulóza a ethery karboxymethylcelulózy. Ethery celulózy vznikají hydroxylovou etherifikací za použití specifického alkyhalogenidu s použitím celulózy získané z buničiny. Průměrný počet alkylových skupin R představuje stupeň substituce, přičemž maximální stupeň substituce je tři na každou glukonovou jednotku. Ve farmaceutických aplikacích se s výhodou využívá možnost měnit stupeň substituce pro získání derivátů s různými vlastnostmi. Deriváty celulózy bojují ve vodě a usnadňují uvolnění aktivních látek z matrice prostřednictvím mechanismů difúze [20, str. 12].

## 2.2 Xantanová guma

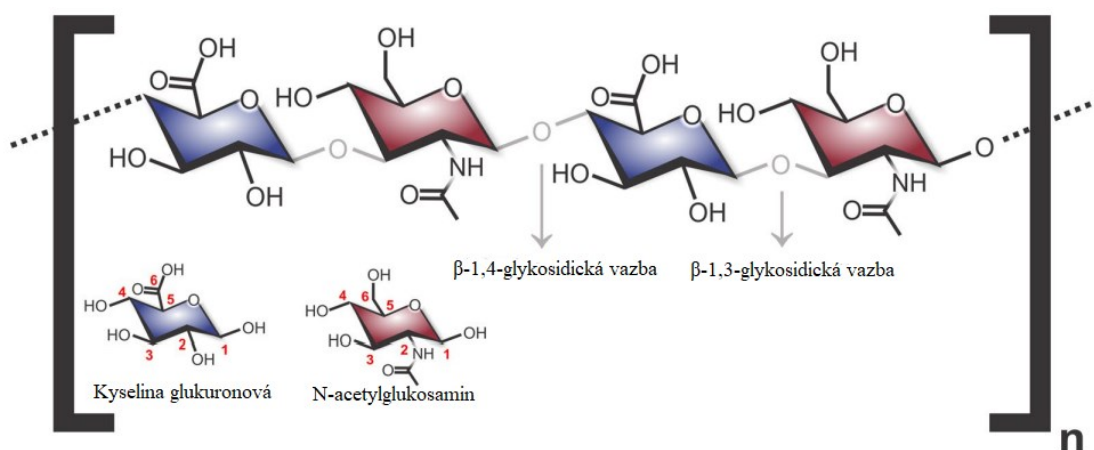
Xantranová guma se skládá z opakujících se jednotek pentasacharidu sestávajících ze dvou molekul D-glukopyranosylu, dvou molekul D-mannopyranosylu a jedné D-glukopyranosyluronové jednotky (Obr. 5). Xantranová guma se rozpouští v horké i studené vodě. Má značný průmyslový význam při řízení reologie ve vodě rozpustných polymerních systémech dodávání léčiv. Ve srovnání s jinými polysacharidy poskytuje xantran vysoce viskózní roztoky i při nízkých koncentracích, z toho důvodu jsou tyto systémy využívány často jako stabilizátory a zahušťovadla. Nosiče léčiv na bázi xantranové gumy nejsou nijak zásadně ovlivňovány pH a jsou stabilní v alkalickém i kyselém prostředí v rozmezí 1–13. Xantran lze použít v kombinaci s karboxymethylcelulózou, škrobem a alginátem sodným [19, str. 38-39].



Obrázek 5 Struktura xantanové gummy [19, str. 38]

### 2.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová, někdy také nazývána jako hyaluronan nebo hyaluronát, je přirozeně se vyskytující lineární glykosaminoglykan sestávající z pravidelných jednotek nesulfatovaného disacharidu kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu [22, str. 1-7] spojených  $\beta$ 1  $\rightarrow$  3 a  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4 glykosidickými vazbami (Obr. 6).



Obrázek 6 Struktura kyseliny hyaluronové (upraveno dle [23])

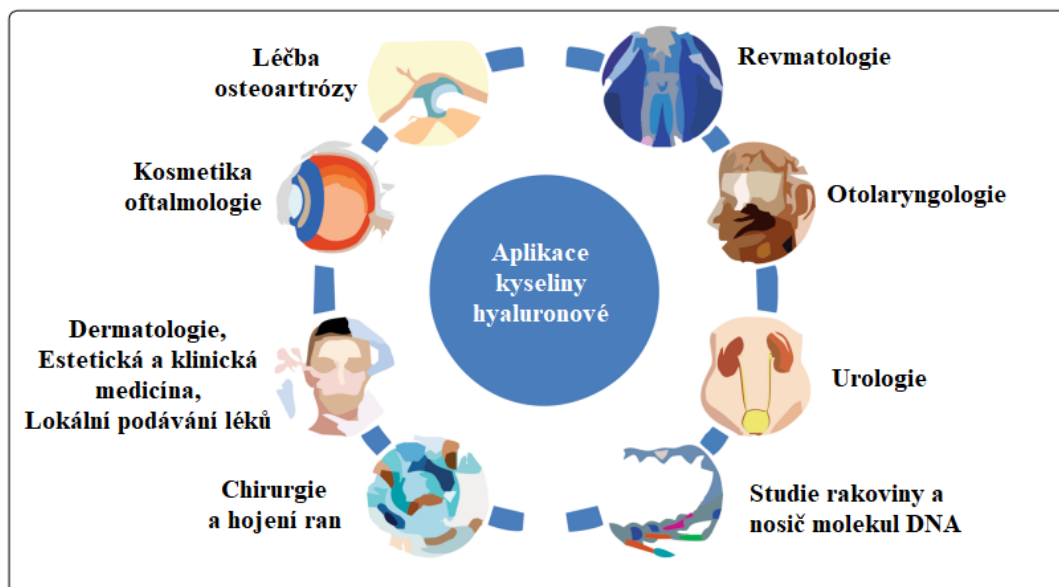
Na rozdíl od jiných glykosaminoglykanů je kyselina hyaluronová jediným nesulfatovaným polymerem, který umožňuje, aby byla molekula rigidní a přímá. Bývá produkována

v plazmatické membráně všech savčích buněk, obojživelníků a bakterií integrálními membránovými enzymy nazývanými syntázy kyseliny hyaluronové.

U lidí je kyselina hyaluronová přítomna ve všech orgánech, nejvíce však v pojivové tkáni, chrupavčité tkáni ve sklivci, synoviální tekutině kloubů a v pupečníku a je zodpovědná za udržování tkáňové homeostázy.

Mezi hlavní charakteristiky kyseliny hyaluronové, které z ní činí velmi atraktivní molekulu, patří vysoká hygroskopicita, viskoelastická povaha, biokompatibilita a netoxičita (při rozkladu nevytváří toxické produkty).

Kyselina hyaluronová nachází své uplatnění v mnoha odvětvích. Využívá se například v kosmetickém průmyslu, chirurgii, v tkáňovém inženýrství, jako nosný systém pro dodávání léčiv, dále v revmatologii, otolaryngologii a urologii (Obr. 7), kde napomáhá k ochraně a obnově tkání. V oblasti dermatologie se HA aplikuje jako dermální výplň pro léčbu vrásek, v tkáňovém inženýrství pak jako mechanická podpora pro tkáň, která může být implantována do organismů, aniž by způsobovala alergické nebo imunitní reakce [23].

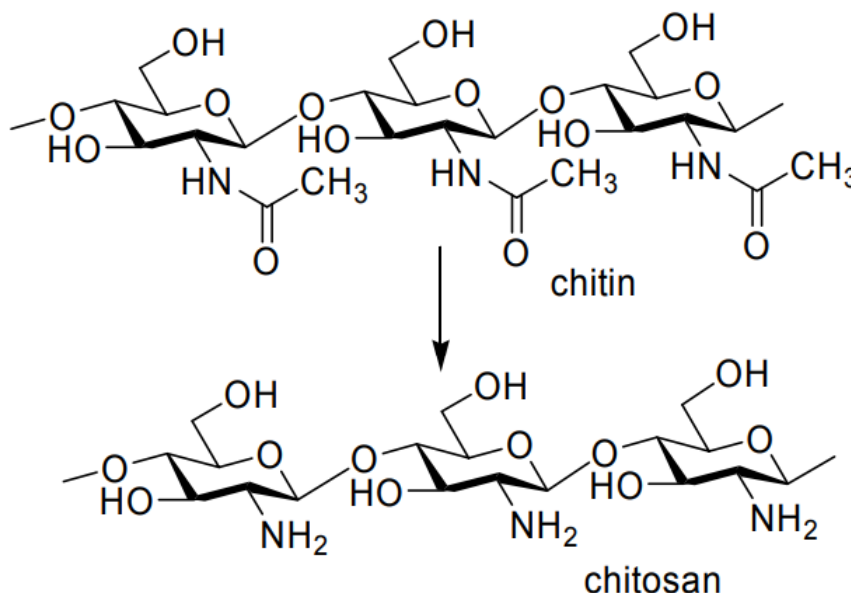


Obrázek 7 Aplikace kyseliny hyaluronové (upraveno dle [23, str. 3])

## 2.4 Chitosan

Chitosan je přírodní polysacharid živočišného původu rozpustný v kyselém prostředí. Je odvozen z chitinu, druhého nejrozšířenějšího polymeru po celulóze, a je obsažen v epidermis nebo exoskeletech korýšů, jako jsou krabi a krevety, u hmyzu, jako jsou kobylinky a vážky, v buněčných stěnách hub a v bakteriích [24, str. 117-118]. Jedná se v podstatě o N-acetylovaný

derivát chitinu, který je získáván po alkalické deacetylaci chitinu. Chemická struktura chitosanu se skládá ze dvou podjednotek, D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou vzájemně lineárně propojeny 1,4-glykosidickými vazbami (Obr. 8) [25, str. 890].



Obrázek 8 Deacetylace a chemická struktura chitosanu [26, str. 56]

Chitosan je dostupný o různých molekulových hmotnostech (700–1000 kDa) a stupních deacetylace (66–95 %). Aminová funkční skupina chitosanu je zodpovědná za jeho rozpustnost ve vodných kyselých roztocích. K solubilizaci dochází protonací funkčních skupin -NH<sub>2</sub> na pozici C2 D-glukosaminových zbytků. Rozpustnost je relativně nízká při fyziologickém pH 7,4 nebo vyšším, protože jde o slabou bázi s pKa (6,2–7,0). V kyselém prostředí se rozpustnost zvyšuje s rostoucím stupněm deacetylace. V roztoku existuje v expandované konformaci díky odpuzivému účinku kladně nabitých aminových skupin na sousedních glukosaminových jednotkách. Elektrolyty, jako jsou sodné soli, snižují odpuzování mezi řetězci a podporují interakce, které vyvolávají v molekulách chitosanu náhodné uspořádání řetězců, vedoucí k vysolování a vysrážení chitosanu.

Funkční skupina -NH<sub>2</sub> na chitosanu může podporovat specifické interakce s kovy. Intenzita chelace závisí na různých faktorech, jako je například obsah a distribuce -NH<sub>2</sub> skupin, stupeň polymerace, pH a množství kationtů. Chitosan je schopen tvořit v kyselém prostředí elektrostatické komplexy s opačně nabitými povrchově aktivními látkami, polysacharidy,

polymery a tuky, jako jsou například kyselina polyakrylová, sodná sůl kyseliny polyakrylové, karboxymethylcelulóza, xanthan, karagenan, alginát, pektin, heparin, hyaluronan, dextransulfát a chondroitinsulfát. Komplexace polyelektrolytu často probíhá jako mezifázová reakce a může být prováděna v jednom nebo více cyklech [24, str. 117-118].

Chitosan patří v poslední době k nejoblíbenějším biopolymerům, a to zejména díky jeho unikátním vlastnostem, jako je biokompatibilita, biodegradabilita, netoxičita, antioxidační a antimikrobiální aktivita, a protirakovinné účinky [25, str. 890].

Chitosan se používá jako primární matrice ve farmaceutických systémech pro doručování léčiv, peptidů, proteinů a genů k léčbě rakoviny žaludku, jater, prsu, vaječnicků, plic, kolorektálního karcinomu, slinivky břišní, leukémie, nosu a ledvin. Lékové formy na bázi chitosanu jsou obohaceny prvky s jak pasivním (zvýšená permeabilita a retenční efekt), tak aktivním zacílením (receptorem zprostředkovaná endocytóza) [24, str. 117-118].

### 3 BIOAKTIVNÍ LÁTKY

Bioaktivní látky inkorporované do nosných polymerních systémů jsou aplikovány za účelem zajištění biologických účinků do příslušného prostředí. Obecně mohou být klasifikovány na přírodní a chemické, organické a anorganické, dále je lze dělit podle spektra aktivity a účinku. Vybrané typy aktivních látek budou uvedeny v následujících podkapitolách [27, str. 3-4].

#### 3.1 Kovové ionty

Kovové ionty, jako jsou ionty stříbra, mědi nebo zinku patří mezi anorganické aktivní látky, a jsou význačné svou antimikrobiální aktivitou. Principem působení kovových iontů je ovlivnění elektrochemického potenciálu mezi vnitřním a vnějším prostředím, případně pronikáním do buněk, čímž dojde k narušení jejich funkce. Výhodou anorganických antimikrobiálních látek je jejich dlouhodobá účinnost a odolnost vůči vysokým teplotám [28].

#### 3.2 Vitamíny

Vitamíny jsou nízkomolekulární látky podílející se na metabolických procesech a jsou nezbytné také pro správné fungování organismu. Vitamíny obecně působí jako přírodní antioxidanty, tedy látky, které jsou schopny zpomalit oxidační reakce. Jejich stabilita je významně ovlivněna okolními podmínkami, jako je pH, světlo, teplota, vlhkost a zpracovatelské podmínky a skladování [1, str. 403-405].

##### 3.2.1 Vitamín C

Vitamín C (kyselina askorbová) je využíván pro své farmaceutické a biologické funkce. Má také fotoprotektivní vlastnosti, je chopen vychytávat volné radikály a obecně zvyšovat imunitu. Vitamín C je rozpustný ve vodě a nerozpustný v tucích, což vede k problémům jeho penetrace přes pokožku z kosmetických a farmaceutických formulací. Z toho důvodu se kyselina askorbová upravuje, a to většinou pomocí zapouzdření do vhodného nosiče, jako např. lipozomu [29, str. 1-6].

##### 3.2.2 Vitamín E

Termín vitamín E zahrnuje osm antioxidantů, a to čtyři tokoferoly a čtyři tokotrienoly. U lidí je za biologicky nejaktivnější formu obecně považován alfa-tokoferol, který je také



nejběžnější. Nejvýznamnějším zdrojem vitamínu E jsou rostlinné oleje, dále pak zelená listová zelenina, pšeničné klíčky, některé ořechy a vejce. Lze jej ovšem vyrábět i synteticky. Vitamín E je nezbytný pro zajištění normální funkce buněčných membrán a imunitního systému [30, str. 973].

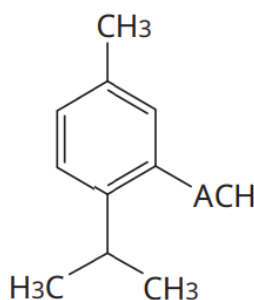
Jedná se o vitamín rozpustný v tucích, jehož nevýhodou je zvýšená citlivost na světlo a teplo. Z toho důvodu jsou, podobně jako u výše zmíněného vitamínu C, studovány možnosti jeho inkorporace do vhodné matrice [31].

### 3.3 Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou těkavé aromatické složky především rostlinného původu. Mezi jejich hlavní funkce v kosmetickém průmyslu patří parfemace výrobků. Mimoto vykazují některé z esenciálních olejů i antimikrobiální a antioxidační aktivitu. Mezi nejznámější esenciální oleje využívané pro tyto vlastnosti patří oleje z tymiánu, majoránky nebo oregana [32].

### 3.4 Thymol

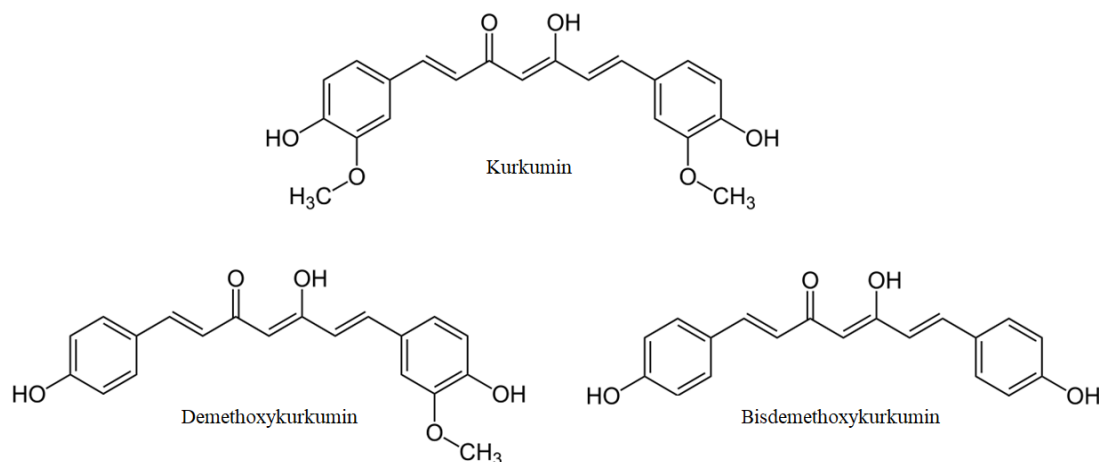
Kromě zmíněných esenciálních olejů jsou využívány i jejich konkrétní složky, jako je například thymol. Chemický název thymolu je 2-isopropyl-5-methylfenol a jeho strukturní vzorec je znázorněn na Obrázku 9. Jedná se o bílou krystalickou látku, která má velmi silné aroma. Získává se především extrakcí z rostliny *Thymus vulgaris* (česky tymián obecný), ale vyskytuje se i v několika jiných rostlinách, například *Ocimum gratissimum* (53,2 %), *Trachyspermum ammi L.* (49,6 %), *Origanum compactum* (29,7 %), *Origanum vulgare*, a *Thymus eriocalyx* (63,8 %). Thymol je zajímavý díky svým antibakteriálním, antifungálním, antivirovým, antiseptickým, protinádorovým a protizánětlivým vlastnostem [33, str. 554]. Působí také jako antioxidant a biocidní činidlo tím, že narušuje bakteriální membrány [33, str. 554], [34].



Obrázek 9 Chemická struktura thymolu [33, str. 556]

### 3.5 Kurkumin

Mezi nejdůležitější složky kurkumy, známé pod názvem *Curcuma longa*, patří skupina sloučenin nazývaných kurkuminoidy, do nichž se řadí kurkumin (diferuloylmethan), demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin (BMC). Chemická struktura kurkuminu a jeho derivátů je uvedena na Obrázku číslo 10.



Obrázek 10 Chemická struktura kurkuminu a jeho derivátů [35, str. 436]

Kurkumin tvoří asi 3,14 % sušiny a představuje hlavní aktivní složku kurkumy [36, str. 139-140]. Jedná se o žlutooranžově zbarvený krystalický prášek, který je vzhledem k hydrofobnímu charakteru molekuly špatně rozpustný ve vodě. Rozpouští se v ethanolu, acetonu nebo dimethylsulfoxidu (DMSO). Jeho významnou nevýhodou je vysoká citlivost vůči světlu, teplu, enzymům, vysokému pH. Kurkumin je znám pro své terapeutické a protizánětlivé účinky, ale i antioxidační aktivitu. Jde o detoxikační prostředek, který stimuluje imunitní systém a snižuje hladinu špatného cholesterolu. Kurkumin tedy působí v našem těle více než jedním způsobem. Z těchto důvodů je využíván pro léčbu rakoviny, mrtvice, Alzheimerovy choroby, epilepsie, deprese a cukrovky [35, str. 435-443].

## 4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KINETIKU UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK

Systemy s kontrolovaným uvolňováním aktivních látek zaznamenávají v posledních letech významný vzestup, ať už se jedná o průmysl farmaceutický, či potravinářský. Mezi základní požadavky patří doručení aktivní látky kontrolovanou rychlostí na konkrétní definované místo určení. V současné době je vyvíjena řada sofistikovaných systémů, které využívají různé mechanismy, jako je například difúze, botnání, nebo eroze.

Nejběžnějším mechanismem pro uvolňování léčiv je proces, kdy léčivo nebo účinná látka prochází polymerní matricí, která funguje jako rezervoár směrem do okolního média. Difúzní bariéra je tvořena polymerními řetězci, které omezují pohyb aktivní látky. Matematicky je difúze popsána Fickovým zákonem difúze, který popisuje vztah mezi koncentrací látky a difúzním koeficientem.

Dalším potenciálním mechanismem uvolňování je proces botnání, kdy dochází k rozpadu polymerních řetězců při interakci polymeru s okolním médiem a následným uvolněním aktivní látky z polymerní matrice. Před rozkladem polymerní struktury dochází k jejímu nabotnání. Uvolnění aktivní látky je pak ovlivněno hydrofilitou a hustotou polymerních řetězců. Botnání polymerní matrice zahrnuje současně proces eroze a difúze a řídí se matematickým modelem dle Weibulla. Důležitou roli hraje relaxační konstanta; čím je větší, tím pomaleji se lék uvolňuje z matrice.

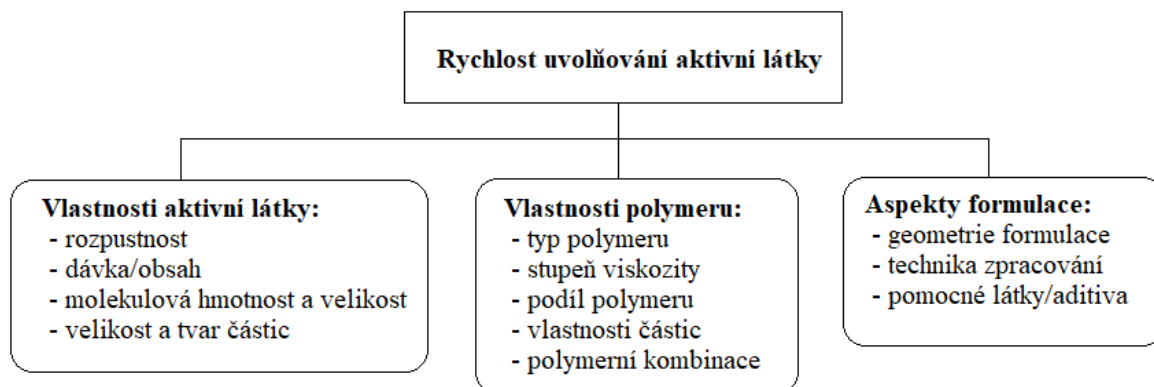
Podmínky uvolňování aktivních molekul lze řídit i prostřednictvím eroze polymeru, který zahrnuje botnání, difúzi a rozpouštění. Proces eroze se dělí na homogenní, která nastává, když polymery erodují rovnoměrně v celé matrici, a heterogenní, k němuž dochází, když polymery erodují směrem z povrchu do vnitřního jádra. Rozpad polymeru může být vyvolán okolním médiem nebo přítomností enzymů a pH média, obsahem polymeru a absorpcí vody. Kinetika uvolňování léčiva je regulována typem polymeru, vnitřní strukturou a typem vnitřních vazeb, tvarem a velikostí částic. Biologicky odbouratelné polymerní systémy jsou v tomto ohledu upřednostňovány, protože výsledné degradační složky mohou být bezpečně odstraněny z těla bez poškození v dlouhodobém horizontu. Farmaceutické konjugáty léčivo-polymer se uvolňují hydrolytickým nebo enzymatickým štěpením v cílových tkáních. Rychlost štěpení pak řídí kinetiku uvolňování léčiva [37].

Jak již bylo zmíněno výše, difúze rozpuštěné látky do média je většinou definována Fickovými zákony, které tvoří základ pro různé matematické modely, jež jsou využívány

k hodnocení kinetiky uvolňování aktivních látek. Například Higuchi vztahoval rychlost uvolňování léčiva dispergovaného v masťových základech k příslušným fyzikálním konstantám. Tento model byl modifikován tak, aby koreloval s faktory pro řízení rychlosti uvolňování léčiva z homogenních matic.

V posledních několika desetiletích byla vyvinuta řada dalších matematických modelů pro analýzu uvolňování léčiv, tj. kromě zmíněného Higuchiho a Weibullova modelu lze dále využít například kinetiku prvního řádu, Weibullův, Hixson-Crowellův, Korsmeyer-Peppasův a Peppas-Sahlinův model [38], [39, str. 217-223].

Mezi základní faktory ovlivňující kinetiku uvolňování aktivních molekul z nosných systémů patří vlastnosti aktivní látky, jako je rozpustnost a koncentrace, a dále charakter nosiče, např. jeho molekulová hmotnost nebo povrchové vlastnosti (Obr. 11).



Obrázek 11 Faktory ovlivňující kinetiku a mechanismus uvolňování léčiva z polymerních systémů (upraveno dle [38])

## 4.1 Charakter aktivní látky

### 4.1.1 Rozpustnost

Rozpustnost aktivní látky ve vodě závisí na její chemické struktuře, fyzikálně-chemické povaze funkčních skupin a strukturní variabilitě. Difuzivita rozpuštěné látky závisí na chemickém gradientu napříč prostředím, který je funkcí rozpustnosti. Aktivní látka s vysokou rozpustností tedy vykazuje rychlejší uvolňování, zatímco molekuly špatně rozpustné ve vodě často vedou k neúplnému uvolňování z matrice. Mezi možnosti zmírnění problémů s rozpustností aktivních sloučenin patří využití povrchově aktivních látek, příprava komplexů aktivních látek s různými polysacharidy nebo využití nosných systémů [38].

#### 4.1.2 Množství/dávka aktivní látky

Zvýšením obsahu aktivní látky při konstantním množství polymeru dochází k nárůstu rychlosti uvolňování, v důsledku vyšší koncentrace aktivní sloučeniny a tím i vyššího chemického gradientu [40].

#### 4.1.3 Molekulová hmotnost

Podle klasického Higuchiho modelu je rychlost uvolňování úměrná druhé odmocnině difúzního koeficientu, který závisí na molekulové hmotnosti, průměru molekuly rozpuštěné látky a viskozitě difúzního média [38, str. 49].

### 4.2 Charakter polymeru

Typ polymeru, jeho struktura, stupeň substituce a molekulová hmotnost, patří mezi další významné faktory, které je nutno zohlednit při přípravě nosných systémů pro aktivní látky. Difuzivita léčiva se zvyšuje přímo úměrně se zvětšujícím se volným objemem polymeru vůči jeho rozměrům, a také závisí na termodynamických interakcích mezi polymerem a rozpuštěnou látkou. K difúzi léčiva dochází jak přes póry, tak i z důvodu zbotnění polymerní matrice [38, str. 49].

Molekulová hmotnost polymerů významně ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické, funkční a biologické vlastnosti. Co se týká chitosanu, který byl používán v praktické části diplomové práce, je známo, že jeho rozpustnost ve vodných roztocích se zvyšuje se snižující se molekulovou hmotností. Například chitosan s molekulovou hmotností 9kDa vykazuje mnohem lepší rozpustnost ve vodě, oproti chitosanu s molekulovou hmotností nad 30 kDa, který vyžaduje kyselé prostředí. Mezi nejběžněji používané kyseliny patří kyselina octová [41]. Nízkomolekulární chitosan je oproti vysokomolekulárnímu typu také méně viskózní, méně krystalický, rychleji degraduje a má vyšší elasticitu. Obecně platí, že polymery s nízkou molekulovou hmotností produkují menší částice, což vede ke změně kinetiky uvolňování aktivní látky a obecně k účinnějšímu dodávání látky do určitého místa [42].

Kromě molekulové hmotnosti je významnou charakteristikou chitosanu i stupeň deacetylce (DD) [42]. Jedná se o poměr mezi jednotkami N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukosaminu, který indikuje úroveň protonace funkční skupiny  $-NH_2$  [41], [43]. Na stupeň deacetylce mají vliv zejména výrobní podmínky, přičemž dnes se na trhu nejčastěji vyskytuje chitosan s DD mezi 70 % a 85 %, který je rozpustný v kyselém prostředí, ale nerozpustný v neutrálním prostředí [37].

Stupeň deacetylace chitosanu lze určit různými technikami včetně elementární analýzy, titrace, hydrolytické, HPLC–UV a NMR techniky, z nichž každá představuje určité výhody a nevýhody a výsledky stanovení se mohou lišit. Titrační metody lze rozdělit na acidobazické, potenciometrické, koloidní a konduktometrické titrace. Například při acidobazické titraci se hodnoty DD odhadují z titrační křivky pomocí inflexních bodů a klíčovou roli hraje viskozita roztoku vzorku. Při potenciometrické titraci se hodnoty DD odhadují měřením počtu aminoskupin ve dvou inflexních bodech. Tato metoda je velmi citlivá na čistotu testovaných vzorků. V případě koloidní titrace se měření DD provádí pomocí stechiometrických výpočtů založených na přítomnosti iontů. Tato metoda není vhodná pro vzorky s nízkým stupněm DD, protože koncový bod je v některých případech obtížné detekovat. V současnosti je často využívána metoda nukleární magnetické rezonance (NMR), která je velmi spolehlivá a poskytuje vysokou reprodukovatelnost výsledků.

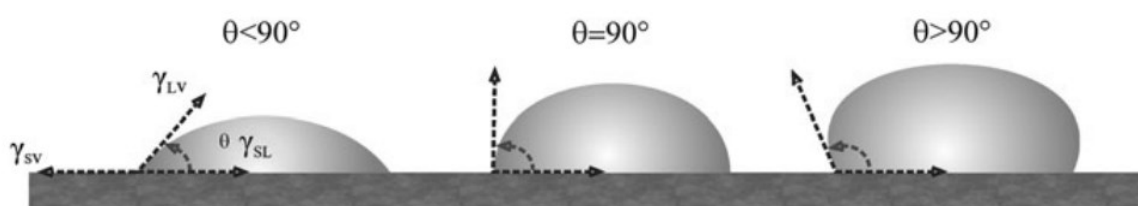
Stupeň deacetylace (DD) je jedním z důležitých faktorů, které řídí změny vlastností chitosanu jako je rozpustnost, zesíťování, velikost a tvar částic. Kromě toho významně ovlivňuje degradační profil a podmínky uvolňování látek z chitosanové matrice. Rychlost degradace a radiační stabilita chitosanu závisí na krystalinitě, která souvisí se stupněm deacetylace. Polymer s vyšším stupněm deacetylace vykazuje nižší krystalinitu, tj. i volnější strukturu, což má za následek vysokou míru degradace. Vyšší stupeň deacetylace související s přidavkem volných aminoskupin také vede k lepší rozpustnosti chitosanu a vyššímu stupni zesíťování bez změny molekulové hmotnosti. Tento faktor také ovlivňuje velikost a morfologii částic, což následně hraje roli i v procesu uvolňování látek z polymerní matrice [44, str. 648].

#### 4.2.1 Smáčivost nosiče

Smáčivost pevného povrchu kapalinou je kvantifikována tzv. kontaktním úhlem pomocí Youngovy rovnice. Jakýkoliv pevný (S), kapalný (L) a plynný (G) systém při dané teplotě a tlaku bude mít jedinečný rovnovážný kontaktní úhel. V praxi je však pozorována hystereze kontaktního úhlu v rozsahu od tzv. postupujícího (maximálního) kontaktního úhlu až po ustupující (minimální) kontaktní úhel. Mezi těmito hodnotami leží rovnovážný kontakt a lze jej z nich vypočítat (Rovnice 1). Rovnovážný kontaktní úhel odráží relativní sílu molekulární interakce kapaliny, pevné látky a plynné fáze.

$$\cos\theta = \frac{\sigma_s - \sigma_{SL}}{\sigma_L} \quad (1)$$

Kontaktní úhel lze vysvětlit jako fyzikálně-chemickou odezvu kapky čistého rozpouštědla na povrchu. Rozpouštědlo i pevný povrch musí být čisté z důvodu vysoké citlivosti kontaktních úhlů vůči kontaminaci. Kontaktní úhel úzce souvisí s povrchovým napětím, které je vytvářeno nevyváženými silami molekul kapaliny na tomto povrchu. Studium smáčivosti povrchu se obvykle provádí stanovením kontaktních úhlů pomocí destilované a deionizované vody. Je obecně známo, že kontaktní úhel vody se zvyšuje s rostoucí hydrofobicitou povrchu (Obr. 12) [45, str. 133-134].



Obrázek 12 Kontaktní úhel [45, str. 133-134]

Míra smáčivosti polymerního nosiče je důležitým parametrem, který je třeba vzít v úvahu při navrhování systémů pro řízené uvolňování léčiv. Stupeň hydrofility daného substrátu může významně ovlivnit mechanismus a kinetiku uvolňování léčiva. Autoři studie [46] zjistili, že rychlost uvolňování je nepřímo úměrná velikosti kontaktního úhlu. Vyšší smáčivost povrchu nosiče tedy může vést, v závislosti na charakteru rozpouštědla, k rychlejšímu uvolňování.

#### 4.2.2 Velikost částic polymerního roztoku

Velikost částic polymeru, distribuce velikosti a počet částic přímo ovlivňuje dostupnost kontaktních míst na částici, porozitu, viskozitu a tortuozitu matric. Rychlost penetrace vodného média roste exponenciálně se zvyšující se objemovou hustotou matrice. V závislosti na velikosti částic polymerního roztoku může docházet k různým mechanismům uvolňování. Zatímco středně velké částice jsou uvolňovány difúzí, menší částice se uvolňují kombinací mechanismů difúze a eroze [38].

V případě chitosanu bylo zjištěno, že velikost částic má významný vliv na jeho vlastnosti a význam ve farmaceutických aplikacích. Menší velikost částic může zajistit vyšší koncentraci terapeutických činidel, zlepšit stabilitu léčiva, jeho biologickou dostupnost a prodloužit dobu dodávání [38].

### 4.3 Vlastnosti rozpouštědla

pH rozpouštědla je jedním z důležitých faktorů, které mohou ovlivnit změny ve struktuře polymeru. V případě chitosanu může dojít k protonaci či deprotonaci molekuly, což nakonec vede ke změně velikosti, tvaru, zeta potenciálu, stability a profilu uvolňování látek. V médiu s nízkým pH molekulární struktura chitosanu expanduje v důsledku významného odpuzování způsobeným vysoce protonovanými aminoskupinami. Na druhou stranu, v prostředí s vyšším pH mají chitosanové řetězce tendenci „se sbalit“ v důsledku deprotonace a nízkých odpudivých sil. Hodnota pH média tedy významně ovlivňuje profil uvolňování aktivních látek, přičemž obecně lze konstatovat, že aktivní látky se lépe uvolňují v médiu s nižším pH [44, str. 650-651].

Další důležitou vlastností rozpouštědla je teplota. Test uvolňování aktivní látky by tedy měl být prováděn za podmínek, které jsou očekávány při konkrétní aplikaci. Některé nádorové tkáně například vykazují různé teploty ve srovnání s bazální teplotou hostitele kvůli zvýšené rychlosti metabolismu. Kromě toho mohou být další teplotní rozdíly vyvolány vnějším ohřevem oblasti nádoru, např. ultrazvukovou léčbou, magnetickým polem nebo zobrazovacími technikami citlivými na světlo, jako je radiologie a optické zobrazování. Většinou platí, že se zvyšující se teplotou okolního prostředí roste i rychlost uvolňování aktivní látky. Použití tepla jako podnětu ke zvýšení uvolňování léčiv je v dnešní době běžným přístupem v mnoha lékařských aplikacích [47, str. 873-874], [48].



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce lze shrnout následovně:

- připravit biopolymerní nosiče na bázi nízkomolekulárního chitosanu s obsahem bioaktivních organických látek,
- charakterizovat připravené systémy (mechanické, povrchové vlastnosti),
- zhodnotit vliv inkorporace aktivních molekul na antibakteriální vlastnosti,
- sledovat vliv vnějších faktorů (teplota, pH) na kinetiku uvolňování inkorporovaných bioaktivních sloučenin.

## 6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY

### 6.1 Chemikálie

Destilovaná voda

Kyselina octová 99,8 % (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Nízkomolekulární chitosan (Sigma-Aldrich)

Chlorid sodný (IPLUB)

Chlorid draselný (IPLUB)

Hydrogenfosforečnan disodný (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný kyselý p. a. (molární hmotnost 136,09 g·mol<sup>-1</sup>, Lachema N.P.Brno)

Tween 80 (Lach-Ner)

Thymol (Sigma-Aldrich)

Kurkumin (Merck Spol. s. r. o.)

Glycerol bezvodý p.a. (molární hmotnost 92,10 g·mol<sup>-1</sup>, obsah 99,70 %, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich)

Mikroorganismy (*Escherichia coli* (CCM 3954), *Staphylococcus aureus* (CCM 3953))

### 6.2 Přístroje a pomůcky

Laboratorní předvážky (KERN 572)

Analytické váhy (Sartorius Basic 110 S)

Laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, odměrný válec, tyčinky, pipety, lžičky ...)

Magnetické míchadlo s funkcí ohřevu (Hei-Standard, Heidolph)

Parafilm M

Petriho misky

Buchnerova nálevka

Frita P3

pH metr (CPH 51)

Automatická pipeta

Desintegrator (IKA® T25 digital ULTRA-TURAX®)

Centrifugační zkumavky

Sušárna (Mettler ULM 400, Mettler UN)

UV-VIS spektrofotometr (PhotoLab 6600)

Třepačka (Heathrow Scientific)

Termostat (Mettler INE 600)

Pravítko, nůžky

Texturometr (AMETEK –TA1, Lloyd Instruments)

FTIR spektrometr (Thermo Scientific Nicolet Summit)

Tenziometr (Attension Theta by Biolin Scientific) Vývěva

Filtrační papír KA 2

Sterilní disky (průměr 9 mm)

UV lampa (Ecoplanet 1X11W)

Digitální mikrometr (Schut Geometrical Metrology)

## 6.3 Metodické postupy

### 6.3.1 Příprava zásobního roztoku 1 % kyseliny octové

Do odměrné baňky bylo odpipetováno vypočtené množství kyseliny octové (dle Rovnice 2), a následně doplněno destilovanou vodou po rysku. Tento roztok byl dále použit při přípravě chitosanového roztoku z důvodu rozpustnosti chitosanu v kyselém prostředí.

$$V_{CH_2COOH} = \frac{m}{\rho} \quad (2)$$

Kde  $V_{CH_2COOH}$  je objem kyseliny octové [ml],  $m$  je hmotnost kyseliny octové [g] a  $\rho$  je hustota kyseliny octové [ $g \cdot cm^{-3}$ ].

### 6.3.2 Příprava chitosanového roztoku

Byl připraven roztok chitosanu o koncentraci 1,5 hm.%. Vypočtená navážka chitosanu s přesností na 0,0001 g byla rozpuštěna v 1%ním roztoku kyseliny octové. Homogenizace probíhala 24 hodin za kontinuálního míchání na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Po úplném rozpuštění byl roztok přefiltrován přes fritu (pórovitost P3).

### 6.3.3 Příprava pufrů

Pro přípravu 1 l fosfátových pufrů byly naváženy všechny složky uvedené v Tabulce 1 a 2 v požadovaném množství s přesností na 0,0001 g. Po smíchání všech surovin se směs kvantitativně převedla do litrové odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku destilovanou vodou. K pufrům byl přidán Tween 80 (0,5 hm.%) pro zajištění lepší rozpustnosti testovaných aktivních látek. Hodnota pH pufrů byla přeměřena pomocí pH metru.

Tabulka 1 Navážky pro 1 litr pufru o hodnotě pH 7,5

Surovina	Navážka	Molarita
NaCl ( $M_w = 58,4$ g/mol)	8 g	0,137 M
KCl ( $M_w = 74,551$ g/mol)	200 mg	0,0027 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ( $M_w = 141,96$ g/mol)	1,44 g	0,01 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( $M_w = 136,086$ g/mol)	240 mg	0,0018 M

Tabulka 2 Navážky pro 1 litr pufru o hodnotě pH 6,5

Surovina	Navážka	Molarita
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ( $M_w = 141,96$ g/mol)	13,3236 g	0,0269 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( $M_w = 119,98$ g/mol)	11,5988 g	0,0731 M

### 6.3.4 Příprava směsi Tweenu 80 a thymolu

Byla připravena směs Tweenu 80 a thymolu v poměru 1 : 2 (1,5 g : 3 g) navážením příslušných množství a následným mírným zahřátím (cca 1 minutu) pro lepší homogenitu.

### 6.3.5 Příprava chitosanových filmů s obsahem thymolu jako aktivní látky

Filmotvorné roztoky s obsahem aktivní látky byly připraveny ze zásobního 1%ního chitosanového roztoku, do nějž byla přidána směs Tweenu a thymolu, připravená dle postupu v kapitole 6.3.4. tak, aby výsledná koncentrace činila 1, 2 a 3 hm.%. Disperze byly homogenizovány pomocí přístroje ULTRA-TURAX při 15600 rpm po dobu 5 minut. Výsledné roztoky byly odlity do Petriho misek a sušeny v sušárně při teplotě 32 °C přibližně 24 hodin.

### 6.3.6 Příprava chitosanových filmů s obsahem kurkuminu jako aktivní látky

K 35 ml 1,5% chitosanového roztoku v 1 % kyselině octové bylo přidáno 30 hm.% (hmotnost glycerolu byla vztažena k hmotnosti chitosanu). Tato směs byla homogenizována za současného zahřívání na 65 °C po dobu 30 minut. Poté se směs nechala samovolně vychladnout na laboratorní teplotu, následně bylo přidáno požadované množství kurkuminu (0,1, 0,3 a 0,5 hm.%) a opět probíhala homogenizace při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Následně byla takto připravená směs přefiltrována pomocí Büchnerovy nálevky (přes filtrační papír KA 2), odlita do Petriho misek a sušena při teplotě 32 °C po dobu 24 hodin.

### 6.3.7 Měření tloušťky připravených filmů

Každý film byl pomocí digitálního mikrometru změřen na sedmi náhodných místech. Výsledná tloušťka filmu se počítala jako průměrná hodnota ze všech měření s přesností na 0,0001 mm.

### 6.3.8 Měření kontaktního úhlu

Smáčivost připravených chitosanových filmů byla hodnocena pomocí měření kontaktního úhlu metodou přisedlé kapky. Pro toto měření byl použit tenziometr Attension Theta (Bilion Scientific). Na tenký proužek vzorku filmu byl dávkován přesný objem (3 $\mu$ l) destilované vody. Celý proces byl zaznamenán pomocí videokamerky, která je součástí přístroje. Získaná data byla zpracována pomocí softwaru OneAttension. Výsledné hodnoty kontaktních úhlů byly získány z časového intervalu 4 – 6 s. Pro každý vzorek byla tato zkouška provedena třikrát vedle sebe.

### 6.3.9 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti filmů byly hodnoceny pomocí tahových a vpichových zkoušek prováděných na texturometru AMETEK TA1. Před samotným měřením byly připraveny

vzorky o daných rozměrech (4x4 cm pro vpich a 6x1 cm pro tah) a následně pomocí mikrometru byla změřena jejich tloušťka.

#### *Zkouška tahem*

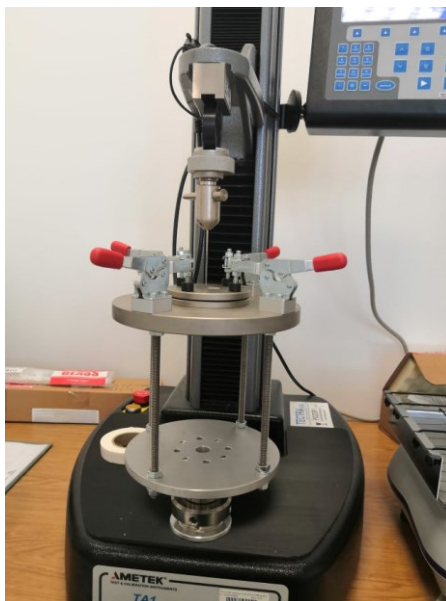
Vzorky filmů byly vloženy do nástavce texturometru (Obr. 13) tak, aby exponovaná plocha vzorku byla 1x4 cm. Po spuštění testu byla získaná data vyhodnocena pomocí softwaru NexygenPlus. Ze získaných dat byla následně zpracována závislost pevnosti v tahu a prodloužení při přetržení na koncentraci aktivní látky.



Obrázek 13 Texturometr při měření tahových zkoušek

#### *Zkouška vpichem*

Připravené vzorky filmů byly umístěny mezi dvě desky s kruhovým otvorem o průměru 2 cm a po zajištění svorkami byla pomocí patřičného nástavce (penetrační sondy) měřena pevnost a deformace při vpichu (Obr. 14). Data byla vyhodnocena s využitím softwaru NexygenPlus.



Obrázek 14 Nástavec pro zkoušku vpichem

### 6.3.10 FTIR-ATR spektroskopie

Infračervená spektroskopie je technika, pomocí které je možné identifikovat a charakterizovat organické a anorganické sloučeniny v daném zkoumaném vzorku. Analýza byla prováděna na FTIR spektrometru Nicolet 6700 v rozsahu 4000 až 400  $\text{cm}^{-1}$  a rozlišení 2  $\text{cm}^{-1}$ . Pomocí softwaru OMNIC Paradigm byla následně vyhodnocena spektra jednotlivých vzorků.

### 6.3.11 Sledování uvolňování aktivní látky ze vzorku

Před samotnou analýzou byly připraveny vzorky filmů o rozměrech 2x2 cm, které byly zváženy s přesností na 0,0001 g. Následně byly vzorky vloženy do skleněných lahviček, naplněny pufrem (20 ml), umístěny na třepačku (120 rpm) a vloženy do termostatu nastaveného na požadovanou teplotu. Vzorky byly sledovány po dobu 168 hodin při dvou různých teplotách (37 °C a 25 °C) a dvou různých hodnotách pH prostředí (7,5 a 6,5). V definovaných časových intervalech se odebíraly vzorky o objemu 1,5 do mikrozkušavek Eppendorf a následně, po příslušném zředění, byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru. V případě vzorků obsahujících thymol byla měřena absorbance při vlnové délce 284 nm, v případě kurkuminu při vlnové délce 426 nm. Testování proběhlo ve dvou opakováních.



### 6.3.12 Mikrobiologické zkoušky

Chitosanové filmy byly podrobeny antibakteriálnímu testu prostřednictvím agar-difúzní metody. Ze vzorků filmů byly vyseknuty disky o průměru 9 mm, které byly před samotným testem umístěny pod UV záření po dobu 60 minut, za účelem eliminace případné mikrobiální kontaminace během manipulace se vzorky. Do Petriho misek s Mueller Hilton živnou půdou byly naočkovány mikroorganismy, konkrétně bakterie *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, o koncentracích 0,5McF. Následně se disky vložily na naočkovanou půdu a po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C probíhala kultivace. Po daném čase byly odečítány případné inhibiční zóny kolem disků.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Vizuální hodnocení chitosanových filmů

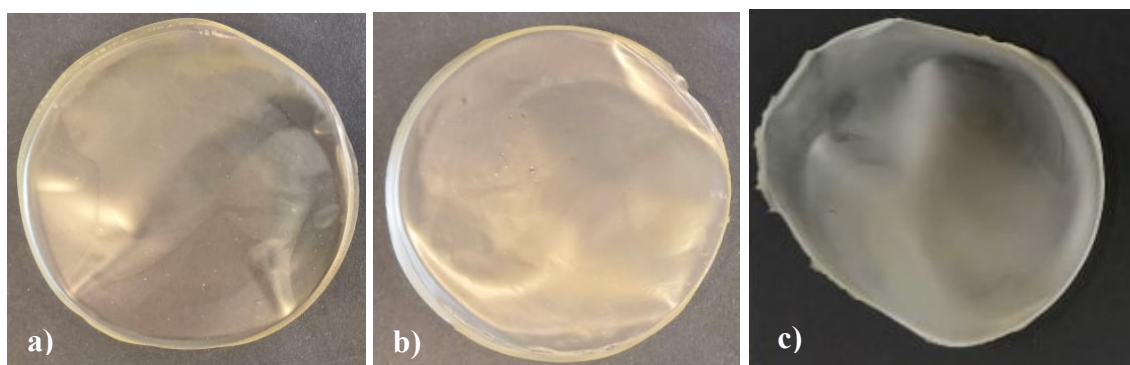
Kontrolní vzorek, který neobsahoval žádnou aktivní látku, byl průhledný, lesklý, dostatečně homogenní a flexibilní (Obr. 15).



Obrázek 15 Kontrolní chitosanový film bez přídavku aktivní látky

#### 7.1.1 Chitosanové filmy s obsahem thymolu jako aktivní látky

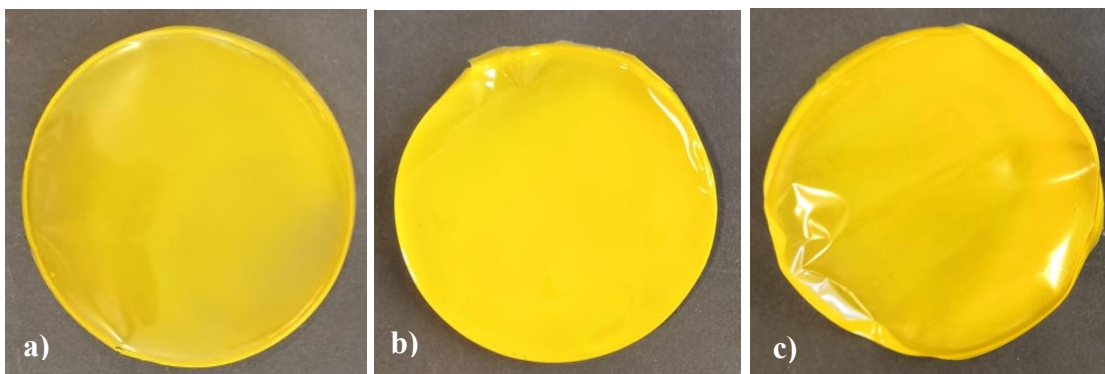
Filmy s obsahem thymolu byly neprůsvitné, mléčné až světle nažloutlé, přičemž se zvyšující se koncentrací aktivní látky se zákal zvyšoval (Obr. 16). Filmy byly homogenní, neobsahovaly žádné nerozpuštěné částice. Se zvyšující se koncentrací aktivní látky klesala pružnost filmu, film se zdál křehčí a méně pevný.



Obrázek 16 Chitosanový film s a) 1 hm.%, b) 2 hm.% a c) 3 hm.% thymolu

### 7.1.2 Chitosanové filmy s obsahem kurkuminu jako aktivní látky

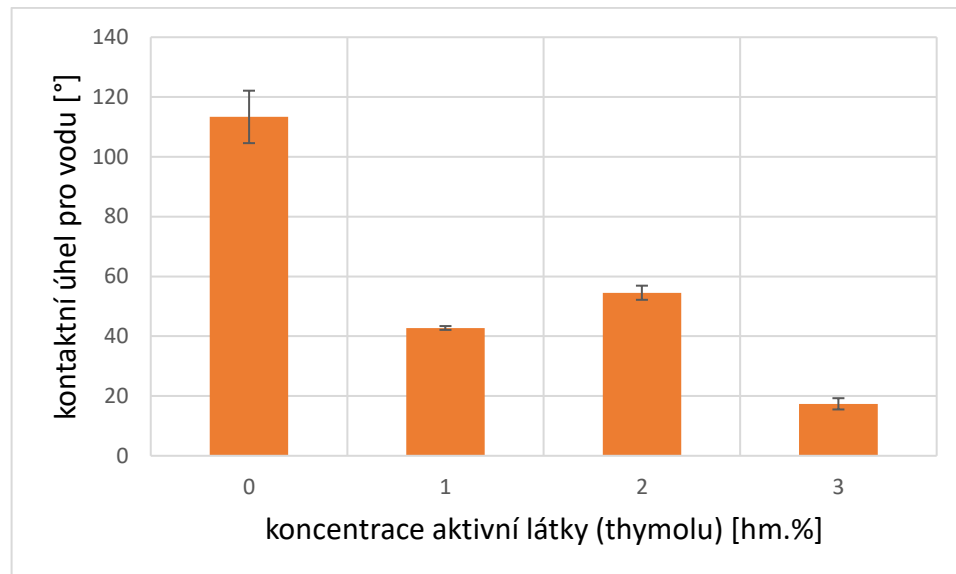
Vzorky filmů s obsahem kurkuminu měly sytě žlutou barvu, byly lesklé a homogenní (Obr. 17). Bez ohledu na přidanou koncentraci aktivní látky byly filmy velmi pružné a relativně pevné, neměly tendenci k lámání.



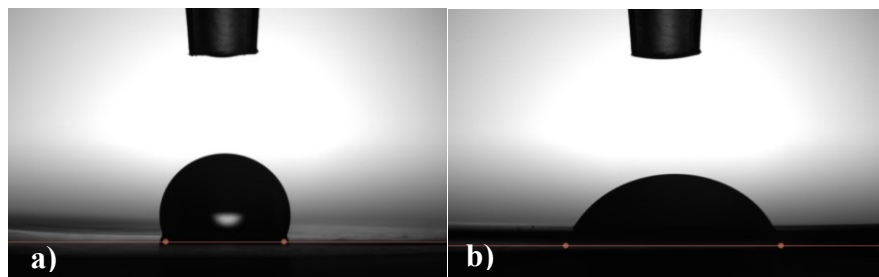
Obrázek 17 Chitosanový film s a) 0,1 hm.%, b) 0,3 hm.% a c) 0,5 hm.% kurkuminu

## 7.2 Měření kontaktního úhlu

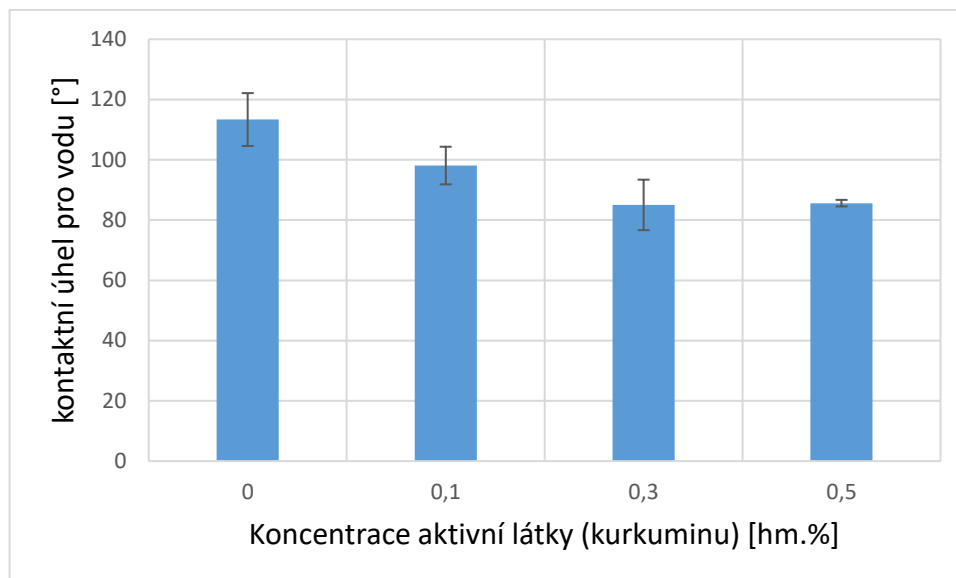
Z naměřených dat bylo zjištěno, že obsah aktivních látek má vliv na hydrofilitu povrchu. Přídavkem aktivní látky se smáčivost povrchu zvýšila, čili kontaktní úhel vody na chitosanovém filmu byl s rostoucí koncentrací aktivní látky nižší. Tento závěr potvrzuje i studie [49], kde byly studovány chitosanové filmy s přídavkem kurkuminu jako aktivní látky a jedním z výsledků této studie bylo tvrzení, že chitosanový film se po přidání kurkuminu stal hydrofilnějším. Na Obrázku 18 jsou znázorněny průměrné hodnoty kontaktního úhlu pro vodu při měření na chitosanovém filmu s obsahem thymolu. Je zřejmé, že kontrolní vzorek, který neobsahoval aktivní látky, vykazoval nejvyšší kontaktní úhel. Podobně je tomu i u aktivní látky kurkuminu (Obr. 20), kde ale není rozdíl tak výrazný. Změnu charakteru povrchu vlivem modifikace aktivními látkami lze pozorovat i z přiložených fotografií kapek (Obr. 19 a 21).



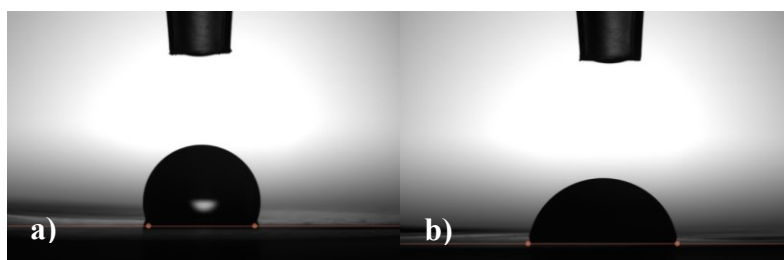
Obrázek 18 Průměrné hodnoty kontaktního úhlu vody na povrchu filmu s obsahem thymolu



Obrázek 19 Přisedlá kapka vody na a) kontrolním vzorku, b) vzorku s obsahem 1 hm.% thymolu



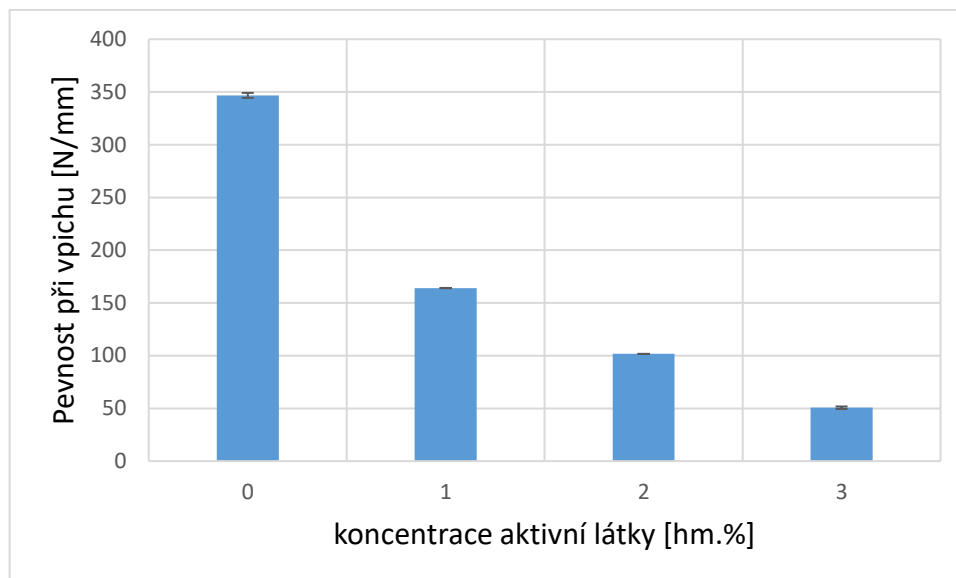
Obrázek 20 Průměrné hodnoty kontaktního úhlu vody na povrchu filmu s obsahem kurkuminu



Obrázek 21 Přisedlá kapka vody na a) kontrolním vzorku, b) vzorku s obsahem 0,5 hm.% kurkuminu

### 7.3 Měření vpichu

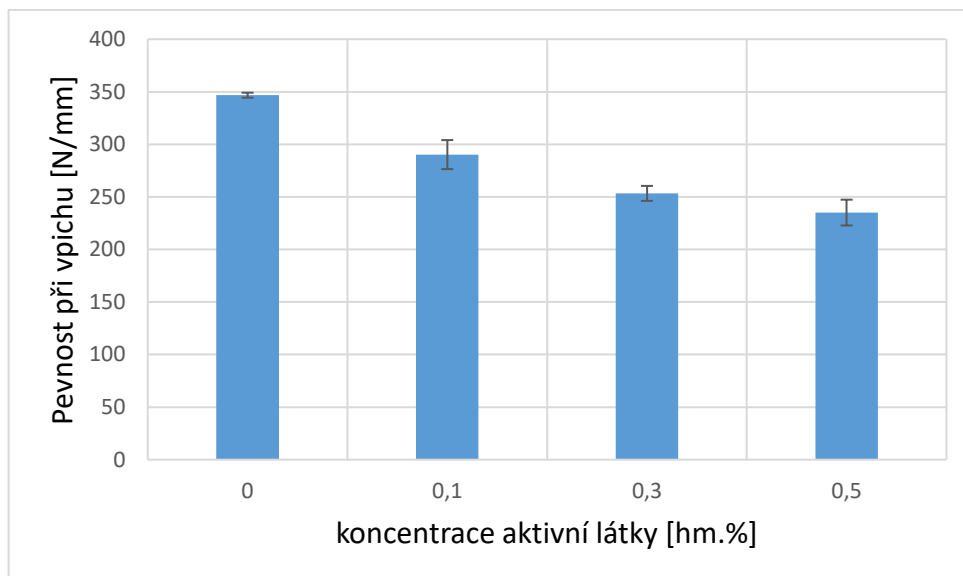
Pevnost při vpichu, nebo také odolnost proti vpichu je velmi důležitou charakteristikou pro praktické využití polymerních filmů. Pevnost při vpichu chitosanového filmu bez aktivní látky dosahovala hodnoty téměř 350 N/mm. Ze získaných dat je zřejmé, že pevnost chitosanových vzorků je výrazně ovlivněna koncentrací aktivní látky. Bylo prokázáno, že jak thymol, tak kurkumin způsobují se zvyšující se koncentrací snížení pevnosti filmu. V případě thymolu je snížení pevnosti výraznější, u vzorku s obsahem 3 hm.% došlo k poklesu až 85 % v porovnání s referenčním vzorkem bez aktivní látky (Obr. 22).



Obrázek 22 Pevnost při vpichu chitosanových filmů s thymolem

Modifikace chitosanu kurkuminem způsobila s jeho rostoucí koncentrací pozvolnější pokles pevnosti při vpichu, který činil 32 % při srovnání kontrolního filmu a vzorku s nejvyšší testovanou koncentrací 0,5 hm.% (Obr. 23).

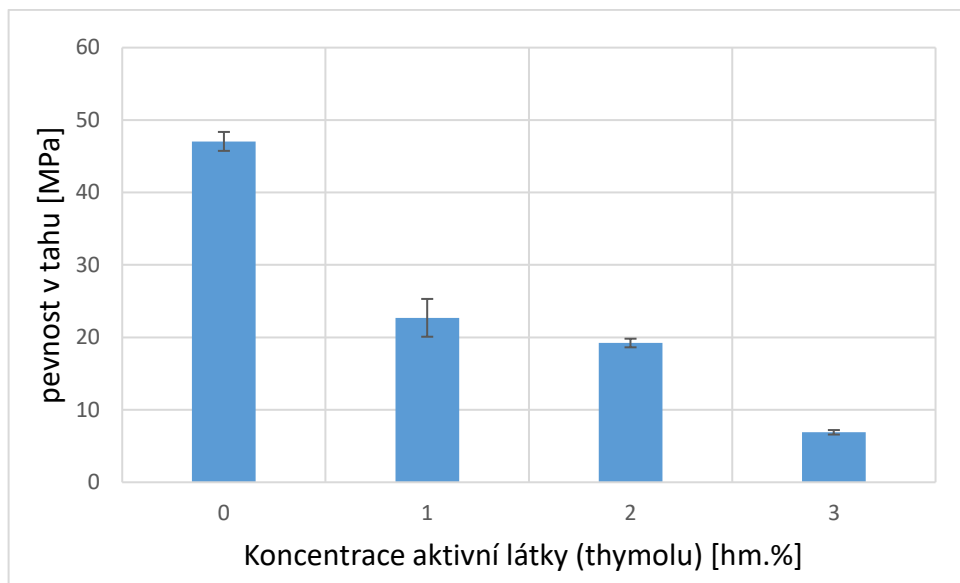
Autoři studie [50] sledovali změnu pevnosti při vpichu u filmů na bázi směsi chitosanu a polyethylenoxidu (PEO) v různých poměrech. Výsledky této studie ukazují, že se zvyšujícím se obsahem PEO pevnost při vpichu klesala, přičemž čistý chitosanový film měl pevnost při vpichu 416 N/mm a směs chitosanu s PEO v poměru 50/50 vykazovala pevnost při vpichu pouhých 159 N/mm. Je zřejmé, že v našem případě vykazovaly vzorky s kurkuminem vyšší hodnoty pevnosti při vpichu, a to i při nejvyšší testované koncentraci (0,5 hm.%).



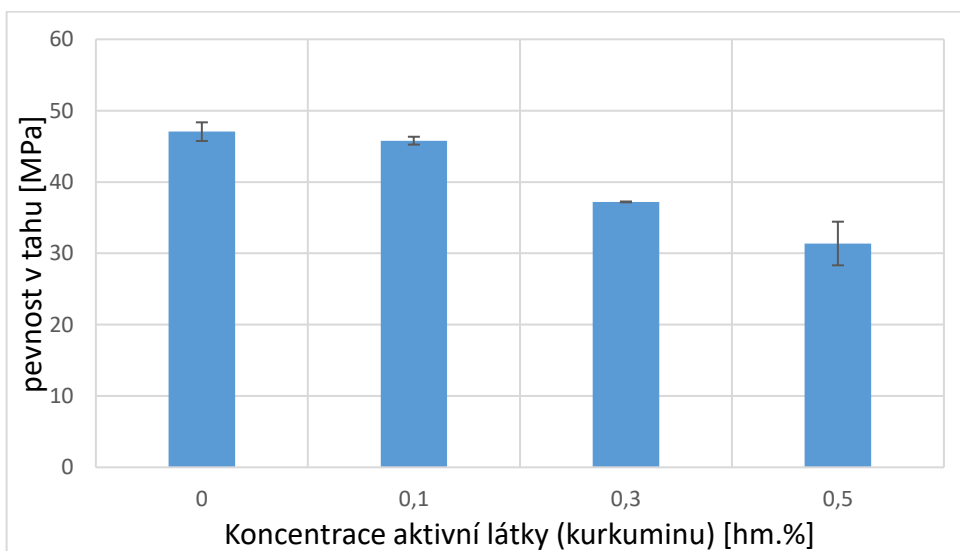
Obrázek 23 Pevnost při vpichu chitosanových filmů s kurkuminem

#### 7.4 Tahová zkouška

Tahové charakteristiky hrají významnou roli pro praktické aplikace polymerních filmů v oblasti obalových technologií. Z Obr. 24 je patrné, že vlivem inkorporace aktivních látek do polymerní matrice došlo k poklesu tahové pevnosti. V případě vzorků s obsahem thymolu byl největší pokles pozorován u směsi s obsahem 3 hm.% thymolu a to až o 85 %. Tento trend byl sledován i ve studii [51], kdy přidáním 1,5 hm.% thymolu do chitosanových filmů došlo k významnému snížení pevnosti v tahu z 13,7 MPa na 5,1 Mpa (tj. 63 %). Nordina a kol. [53], kteří inkorporovali thymol a glycerol do chitosanové matrice, také zjistili pokles pevnosti v tahu až o 96% ve srovnání s referenčními vzorky. V důsledku přidavku fenolické aktivní látky došlo ke snížení interakcí mezi biopolymerními monomery, což způsobilo potlačení vzájemných interakcí mezi polymerními řetězci a následný pokles pevnosti. V případě vzorků s kurkuminem došlo také ke snížení tahové pevnosti, i když ne tak razantně, jako u thymolových formulací (Obr. 25). Největší rozdíl (33 %) oproti kontrolnímu filmu byl pozorován u směsi s obsahem 0,5 hm.% kurkuminu.



Obrázek 24 Pevnost v tahu chitosanových filmů s thymolem



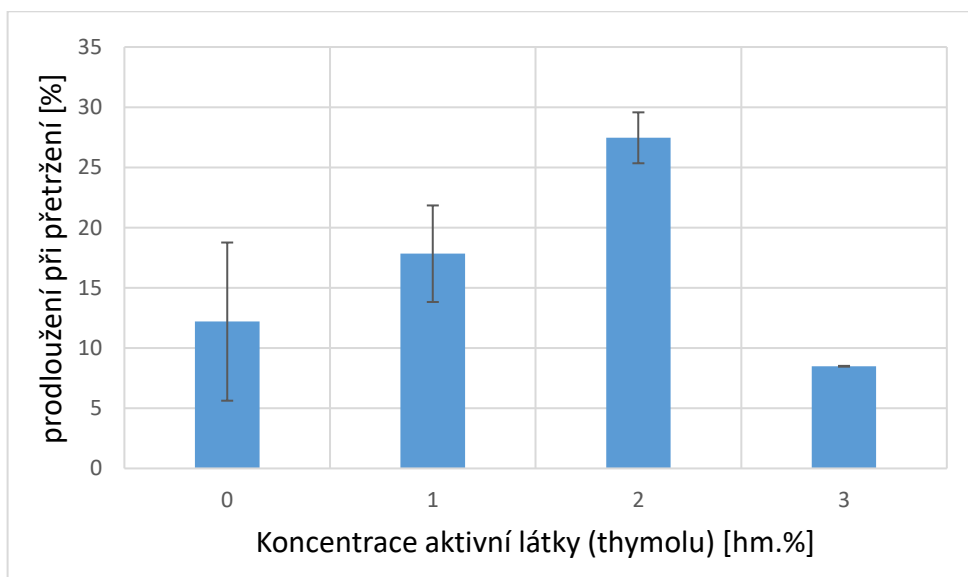
Obrázek 25 Pevnost v tahu chitosanových filmů s kurkuminem

Prodloužení při přetržení určuje pružnost filmů a schopnost obalové fólie udržet si svou integritu při namáhání v tahu během zpracování, manipulace a skladování [53]. Z našeho měření vyplývá, že modifikace chitosanu jak prostřednictvím thymolu, tak kurkuminu, způsobila zvýšení parametru prodloužení při přetržení. V případě thymolu došlo k nárůstu hodnoty oproti kontrole, a to o 32 % u vzorku s obsahem 1 hm.%, a dokonce o 56 % u formulace s 2 hm.% aktivní látky. Zajímavým faktem je, že vzorek s nejvyšší koncentrací thymolu (3 hm.%) vykazoval naopak pokles hodnoty prodloužení (o 44 %). U vzorků s obsahem kurkuminu byl pozorován nárůst prodloužení u všech tří testovaných koncentrací,

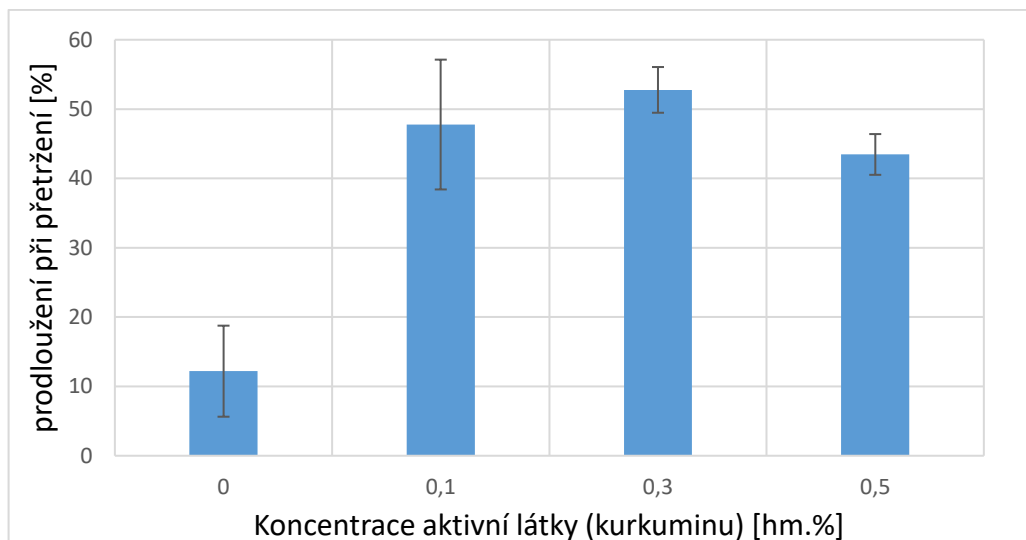


a to v průměru okolo 74 %. Podobně ve studii [51] došlo ke zvýšení prodloužení při přetržení chitosanového filmu přidávkem thymolu a glycerolu, a to až na desetinásobek. Přítomnost glycerolu vedla ke zvýšené mobilitě chitosanového polymerního řetězce, čímž se při aplikovaném namáhání výrazně zvýšila pružnost filmu. V práci autorů Rachtanapun a kol. [52], byly také studovány chitosanové filmy s obsahem kurkuminu připravené metodou odlévání z roztoku. Měřením elasticity bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací kurkuminu v chitosanovém filmu rostla i hodnota prodloužení při přetržení.

Na základě výsledků mechanických zkoušek lze tedy konstatovat, že inkorporace thymolu i kurkuminu jako aktivních látek způsobila snížení pevnosti filmů, ale současně vedla ke zvýšení jejich elasticity, s výjimkou vzorku s 3 hm.% thymolu (Obr. 26 a 27).



Obrázek 26 Prodloužení při přetržení chitosanových filmů s thymolem



Obrázek 27 Prodloužení při přetržení chitosanových filmů s kurkuminem

## 7.5 FTIR-ATR spektroskopie

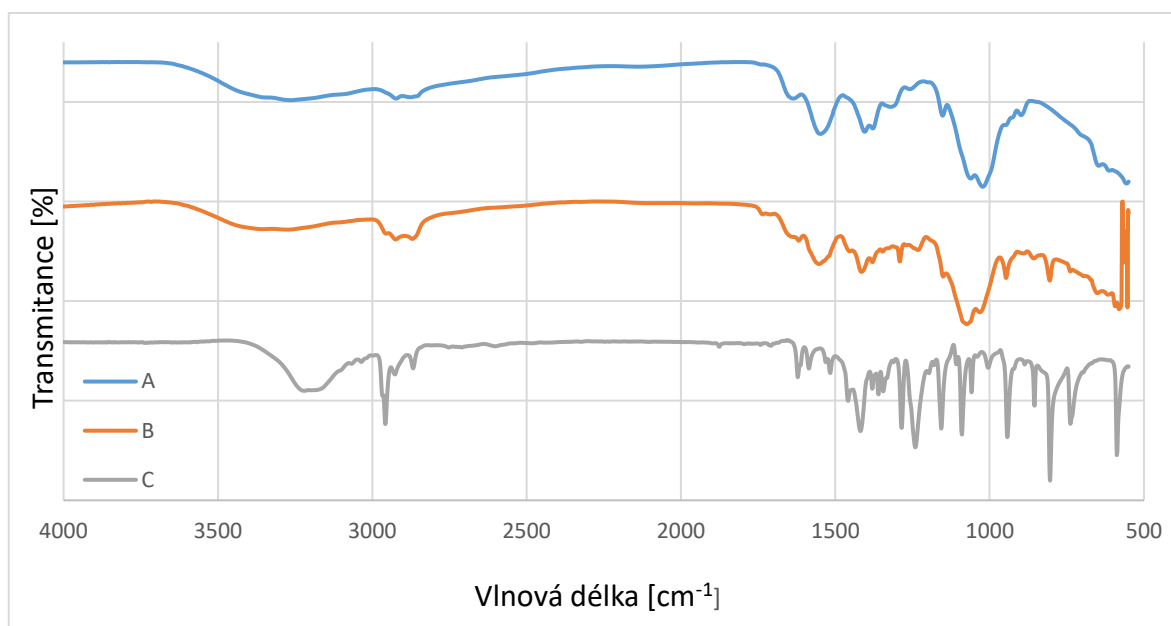
FTIR analýza byly využita k posouzení funkčních skupin přítomných ve filmech chitosanu, a to jak bez, tak s obsahem aktivní látky. Pro srovnání a lepší interpretaci byly změřeny i čisté látky, thymol a kurkumin.

U spektra kontrolního vzorku, tj. chitosanového filmu bez obsahu aktivních látek, lze pozorovat píky charakteristické pro tento polymer (Obr. 28A). Absorpční pásy kolem  $2921$  a  $2877\text{ cm}^{-1}$  lze připsat C-H vazbám, které jsou typické pro polysacharidy a nacházejí se i v jiných polysacharidových polymerech, jako je xylan [54], glukany [55] a karagenany [56]. Přítomnost zbytků N-acetylové skupiny byla potvrzena píky kolem  $1645\text{ cm}^{-1}$  (C = O protahování amidu I) a  $1325\text{ cm}^{-1}$  (C-N protahování amidu III). Úzký pík  $1550\text{ cm}^{-1}$  odpovídá N-H vazbě amidu II, což je třetí pík charakteristický pro N-acetylové skupiny.  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$  symetrické deformace byly potvrzeny přítomností píků kolem  $1408$  a  $1398\text{ cm}^{-1}$ . Absorpční pík při  $1153\text{ cm}^{-1}$  lze připsat asymetrickému protažení vazby C-O-C. Pásy na  $1063$  a  $1022\text{ cm}^{-1}$  odpovídají vazbě C-O [57], [58], [59].

Jak lze vidět z Obr. 28C, spektrum thymolu vykazuje charakteristické signály v oblasti  $700$  až  $1650\text{ cm}^{-1}$ , z nichž píky při  $1380$ ,  $1459$ ,  $1621\text{ cm}^{-1}$  odpovídají aromatickému kruhu thymolu [60], [61].

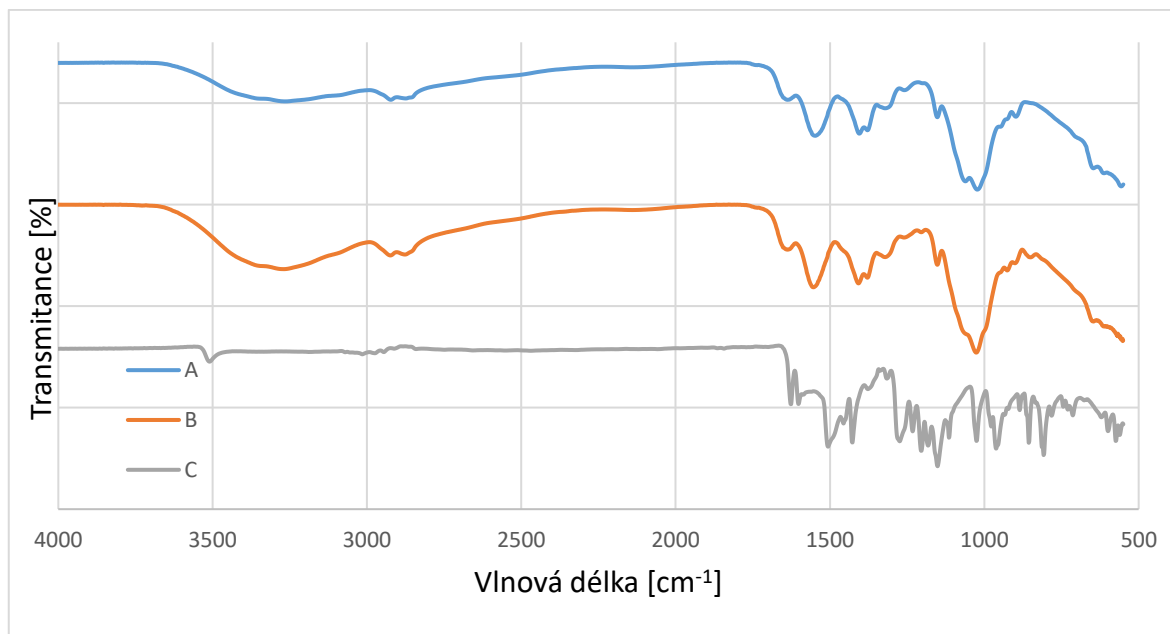
Spektrum chitosanového filmu s obsahem thymolu (Obr. 28B) prokázalo změny v porovnání s kontrolním chitosanovým filmem v oblasti  $550$  až  $650\text{ cm}^{-1}$ , což odpovídá skupinám  $\text{CH}_3$

a OH. Dále jsou zde evidentní nové píky při 1620, 1290, 946 a 804  $\text{cm}^{-1}$ , odpovídající CH, OH a  $\text{CH}_2$  skupinám, a také menší píky v oblasti 1736 a 1739  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{C}$ ) [62]. U modifikovaného filmu tedy jednoznačně došlo ke strukturálním změnám, které by mohly indikovat vzájemné interakce mezi jednotlivými složkami, tj. chitosanem a thymolem.



Obrázek 28 FTIR-ATR spektra pro A kontrolní vzorek, B vzorek s obsahem thymolu (3 hm.%), C čistý thymolový prášek

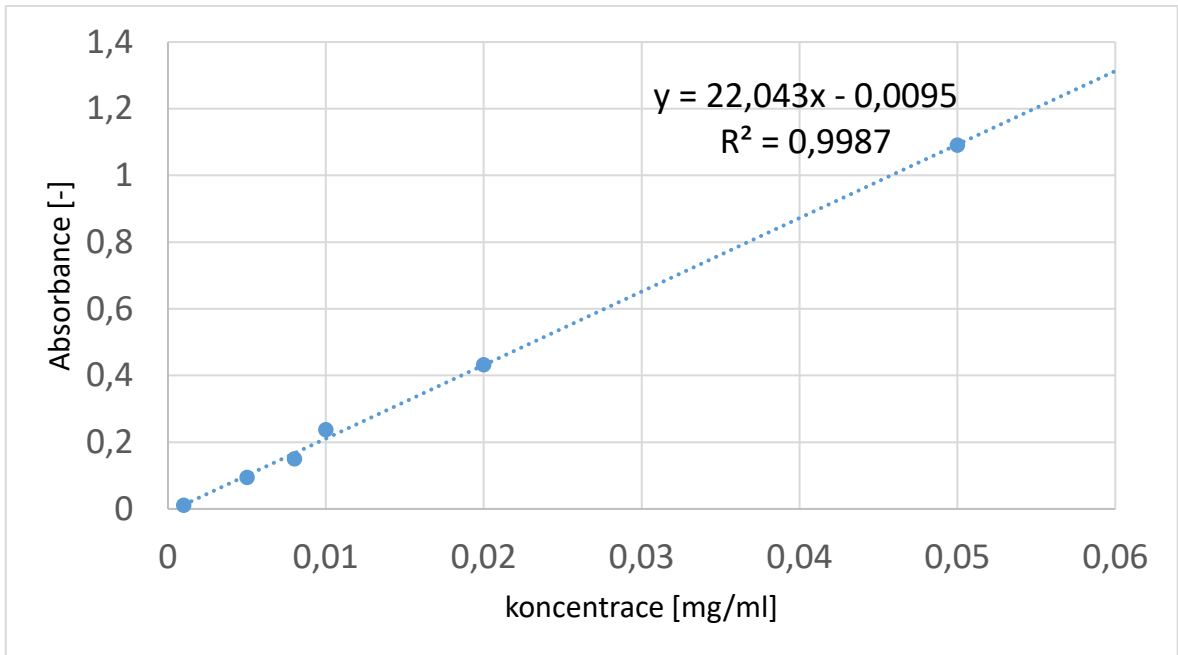
Na Obr. 29 jsou zobrazeny výsledky FTIR analýzy vzorků s obsahem aktivní látky kurkumin. Spektrum kurkuminu obsahovalo charakteristické píky pro tuto sloučeninu, při 1639  $\text{cm}^{-1}$  (aromatická část  $\text{C}=\text{C}$ ), 1550  $\text{cm}^{-1}$  (vibrace benzenového kruhu), 1509  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  a  $\text{C}=\text{C}$  vibrace), 1408  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{H}$  vibrace), 1278  $\text{cm}^{-1}$  (aromatické  $\text{C}-\text{O}$  vibrace), 1022  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  vibrace) (Obr. 29C) [63], [64]. Spektrum vzorku modifikovaného kurkuminem neodhalilo významnější změny v porovnání s referenčním chitosanovým filmem, kromě slabého posunu píku v oblasti 1026  $\text{cm}^{-1}$ , což by mohlo značit  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  vazby indikující přítomnost kurkuminu. Na rozdíl od vzorků s thymolem ovšem nebyly strukturální změny tak průkazné.



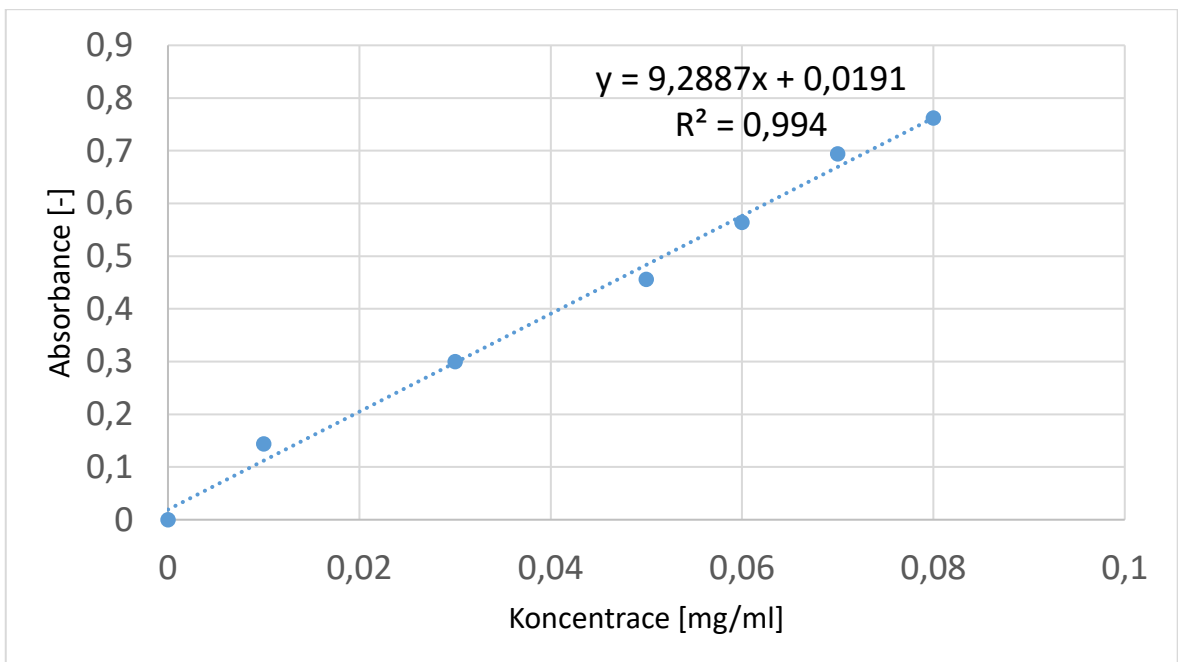
Obrázek 29 FTIR-ATR spektra pro A kontrolní vzorek, B vzorek s obsahem kurkuminu (0,5 hm.%), C čistý kurkuminový prášek

## 7.6 Sledování uvolňování aktivní látky ze vzorku

Uvolňování aktivních látek (thymolu a kurkuminu) bylo měřeno pomocí dialyzační metody *in vitro* v prostředí fosfátového pufru (PBS) o dvou různých hodnotách pH a teplotách, s cílem vyhodnotit vliv změny okolních podmínek na kinetiku. Do pufru bylo přidáno 0,5 hm.% Tweenu 80 z důvodu lepší rozpustnosti. Po samotném testu se odebrané vzorky podrobily měření koncentrace aktivní látky pomocí UV-VIS spektrofotometru. Nejdříve bylo nutné stanovit maximální vlnovou délku pro kurkumin (426 nm) a thymol (284 nm) a následně byla provedena kalibrace, přičemž kalibrační přímky jsou na Obrázku 30 a 31.



Obrázek 30 Kalibrační přímka pro kurkumin (měřeno při 426 nm)

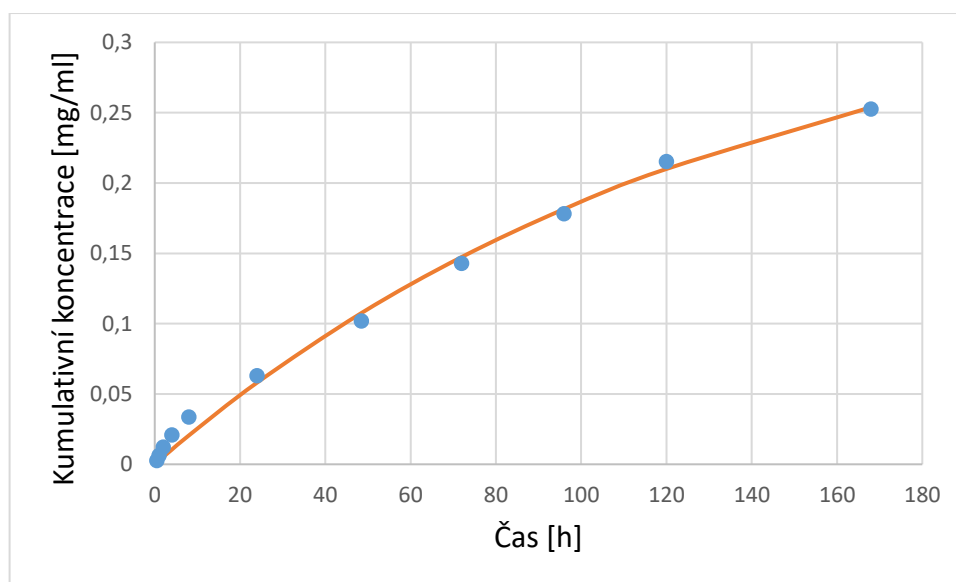


Obrázek 31 Kalibrační přímka pro thymol (měřeno při 284 nm)

Získaná data kumulativních koncentrací byla následně zpracována dle rovnice kinetiky prvního řádu (Rovnice 3). Regrese křivek byla zpracována pomocí metody nejmenších čtverců.

$$C_{REL} = C_{MAX} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (3)$$

Kde  $C_{REL}$  je relativní koncentrace aktivní látky uvolněné v čase  $t$ ,  $C_{MAX}$  je maximální teoretická koncentrace aktivní látky,  $k$  je rychlostní konstanta. Příklad závislosti kumulativního uvolněného množství na koncentraci aktivní látky s proloženou funkcí je na Obr. 32. Hodnoty získané na základě této rovnice jsou uvedeny v Tabulkách 3 a 4 pro aktivní látku kurkumin a v Tabulkách 5 a 6 pro aktivní látku thymol [65].

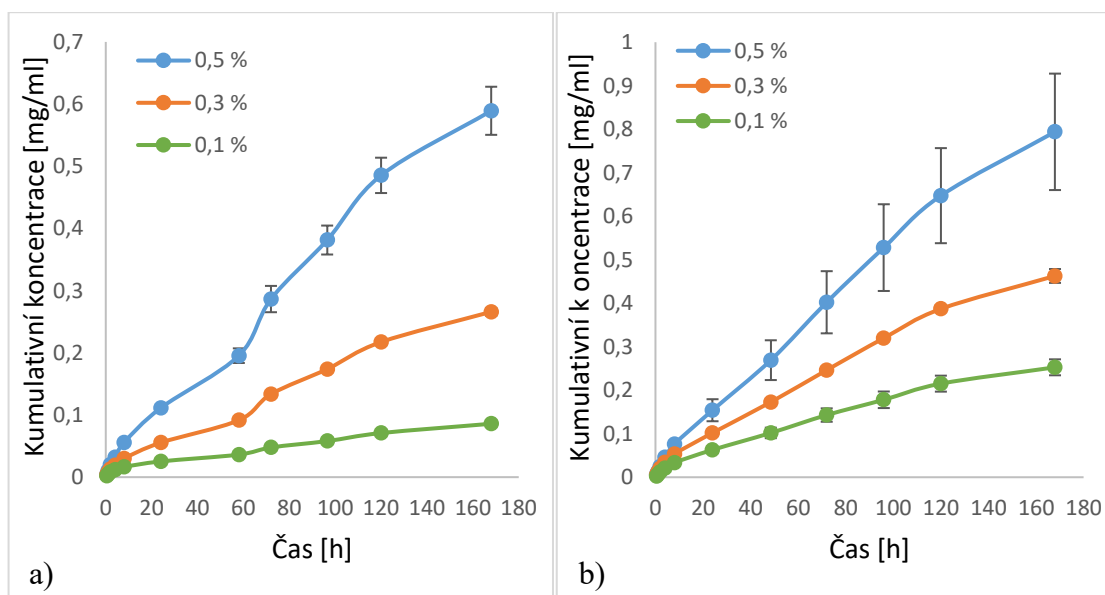


Obrázek 32 Závislost kumulativní koncentrace na čase pro vzorek obsahující 0,1 hm.% kurkuminu proložená fitovaným modelem dle rovnice (3)

### 7.6.1 Test uvolňování kurkuminu

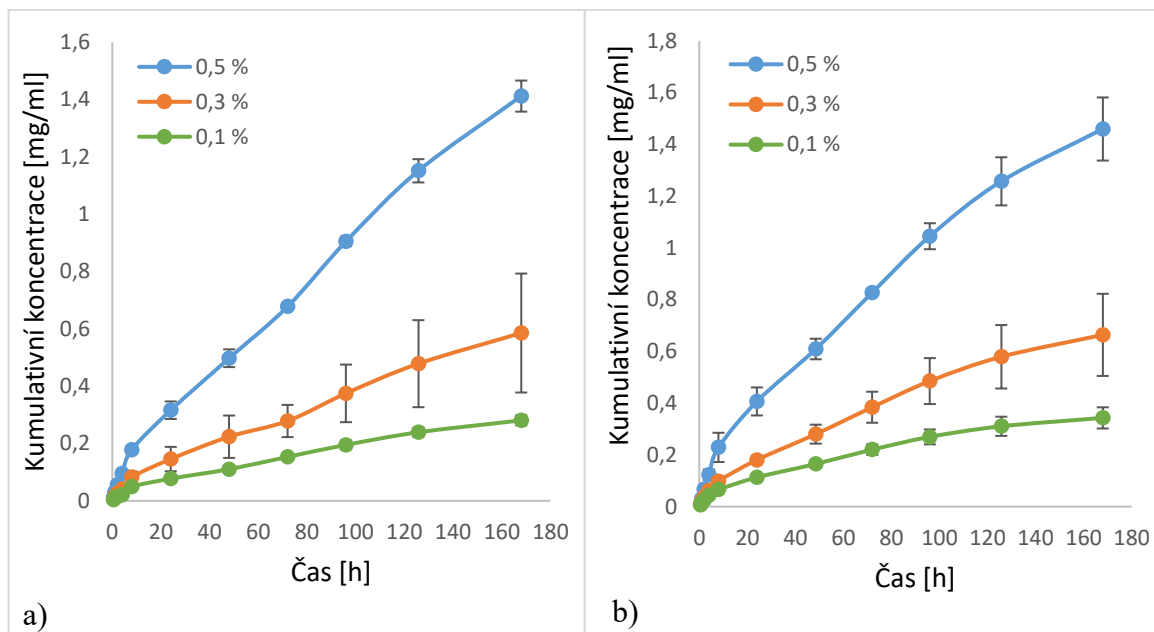
Průběhy závislostí kumulativního uvolněného množství kurkuminu na čase při různých podmínkách jsou shrnuty na Obr. 33 a 34. Je patrné, že kumulativní uvolněné množství rostlo nejstrměji u filmů s nejvyšší koncentrací kurkuminu (0,5 hm.%), bez ohledu na použitou teplotu, nebo pH. Lze také potvrdit, že v počáteční fázi (cca do 8 hodin od začátku testu) byl zaznamenán rychlejší nárůst, po němž došlo ke zpomalení kinetiky uvolňování. Podobně ve studii [66], kde bylo sledováno uvolňování kurkuminu z lipozomů při pH 7,4, bylo zjištěno, že přibližně 90 % volného kurkuminu bylo uvolněno v prvních 12 hodinách.

Autoři studie [67] analyzovali vliv teploty (23 a 60 °C) na chování uvolňování kurkuminu z lipozomů na bázi chitosanu během 360 minut. V počátečních 120 minutách došlo k uvolnění asi 90% kurkuminu. Zvýšení teploty vedlo k rychlejšímu uvolňování, a tedy k vyšší rychlostní konstantě, což je, až na jednu výjimku, korelující s výsledky této diplomové práce.



Obrázek 33 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (kurkumin) na čase při pH 6,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C

Z Tabulky 3 a 4 vyplývá, že koncentrace uvolněného kurkuminu je závislá na složení směsi, resp. obsahu aktivní látky ve vzorku. S rostoucí koncentrací aktivní látky ve vzorku docházelo i k nárůstu stanoveného maximálního uvolněného množství. Překvapivě ovšem docházelo s rostoucí koncentrací kurkuminu k poklesu rychlostní konstanty.



Obrázek 34 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (kurkuminu) na čase při pH 7,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C

Tabulka 3 Konstanty Rovnice (3) získané pro test uvolňování kurkuminu při pH 6,5 a teplotě 25 a 37 °C

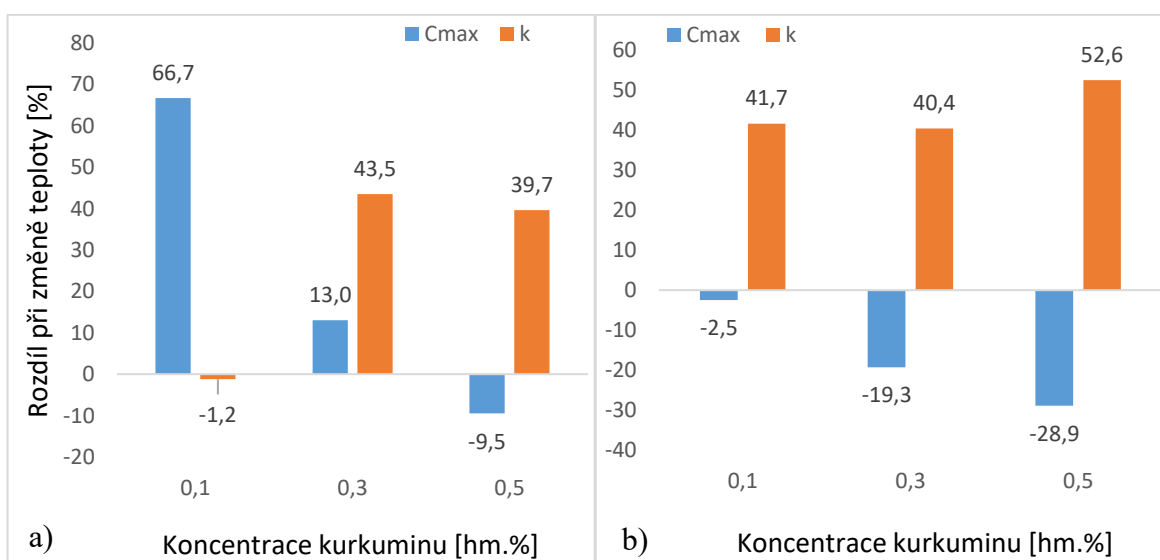
Teplota [°C]	Koncentrace kurkuminu [hm.%]	pH 6,5		
		$C_{\max}$ [mg/ml]	$-k \cdot 10^{-3}$ [1/h]	$R^2$
25	0,1	$0,12 \pm 0,0019$	$7,49 \pm 0,35$	0,99
	0,3	$0,65 \pm 0,092$	$3,26 \pm 0,51$	1,00
	0,5	$1,79 \pm 0,17$	$2,45 \pm 0,10$	1,00
37	0,1	$0,36 \pm 0,00074$	$7,40 \pm 1,03$	1,00
	0,3	$0,75 \pm 0,060$	$5,77 \pm 0,48$	1,00
	0,5	$1,62 \pm 0,23$	$4,06 \pm 0,15$	1,00



Tabulka 4 Konstanty Rovnice (3) získané pro test uvolňování kurkuminu při pH 7,5 a teplotě 25 a 37 °C

Teplota [°C]	Koncentrace kurkuminu [hm.%]	pH 7,5		
		$C_{\max}$ [mg/ml]	$-k \cdot 10^{-3}$ [1/h]	$R^2$
25	0,1	$0,39 \pm 0,031$	$7,58 \pm 0,21$	1,00
	0,3	$1,09 \pm 0,67$	$5,42 \pm 2,47$	1,00
	0,5	$2,80 \pm 0,21$	$4,15 \pm 0,24$	1,00
37	0,1	$0,38 \pm 0,058$	$13,00 \pm 1,26$	1,00
	0,3	$0,88 \pm 0,33$	$9,10 \pm 2,89$	1,00
	0,5	$1,99 \pm 0,58$	$8,75 \pm 3,6$	1,00

V dalších grafech jsou shrnuty výsledky hodnocení kinetiky uvolňování dle uvedené Rovnice 3, kdy byly analyzovány procentuální rozdíly daného parametru ( $C_{\max}$  a  $k$ ) v závislosti na změně jedné proměnné, tj. pH nebo teploty. Cílem bylo vyhodnotit vliv různých faktorů na kinetiku uvolňování aktivních látek z chitosanové matrice.



Obrázek 35 Vliv změny teploty z 25 °C na 37 °C při a) pH 6,5, b) pH 7,5 na uvolňování kurkuminu

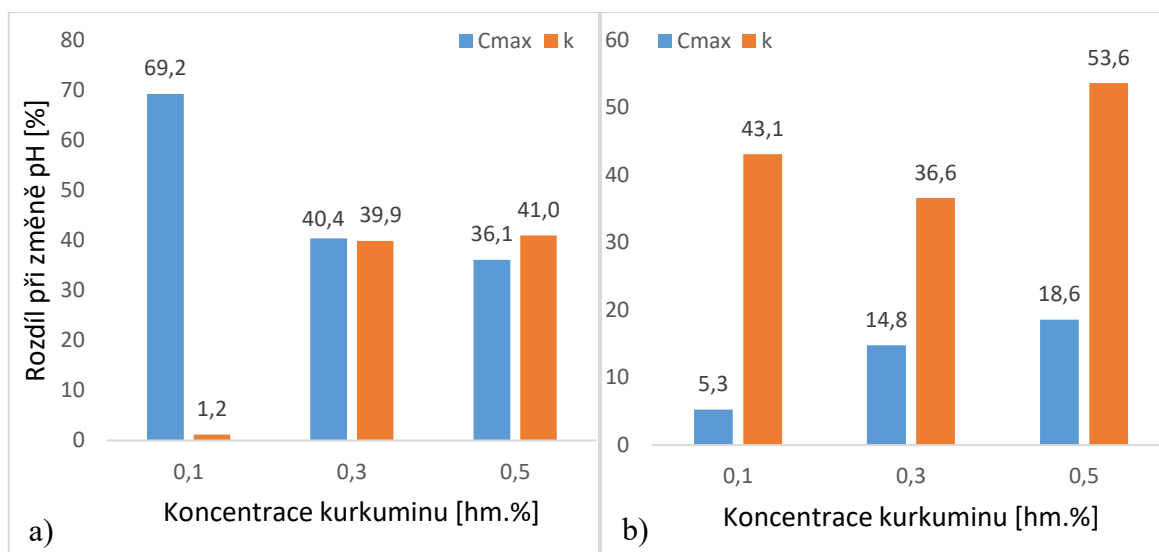
*Vliv změny teploty*

Vliv změny teploty uvolňovacího média při konstantním pH 6,5 je zřetelně vidět z Obrázku 35a). Je patrné, že zvýšením teploty z 25 °C na 37 °C došlo k nárůstu maximální koncentrace uvolněného kurkuminu, a to o 67 % (0,1 hm.%) a 13 % (0,3 hm.%). Naopak u vzorku s nejvyšší koncentrací kurkuminu (0,5 hm.%) byl sledován pokles maximálního uvolněného množství o zhruba 10 %. Co se týká rychlosti uvolňování, lze potvrdit zrychlení procesu se zvýšením teploty, přičemž nejmarkantnější nárůst (téměř 44 %) byl pozorován u směsi s koncentrací 0,3 hm.% kurkuminu (Obr. 35a).

Na Obr. 35b) je znázorněn vliv změny teploty na kinetiku uvolňování pro roztok o pH 7,5. Jak lze vidět, byl pozorován opačný trend, ve srovnání s výsledky v nižším testovaném pH. Maximální teoretická koncentrace uvolněného kurkuminu se totiž s rostoucí teplotou snižovala, přičemž největší změna (29 %) byla pozorována u vzorku s nejvyšším obsahem aktivní látky (0,5 hm.%). V případě rychlostní konstanty byl, podobně jako při nižším pH, pozorován nárůst hodnot, a to 40 až 53 %.

*Vliv změny pH*

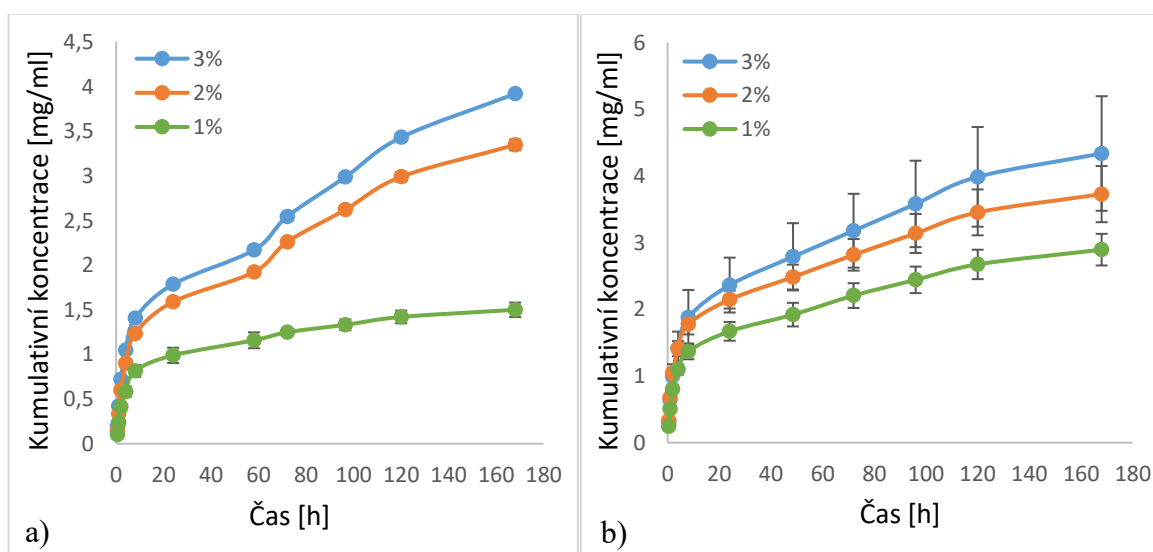
Vliv pH na kinetiku uvolňování je znázorněn na Obrázku 36. Bylo zjištěno, že změna pH z 6,5 na 7,5 způsobila zvýšení hodnoty maximálního teoretického uvolněného množství kurkuminu i rychlosti procesu, a to při obou testovaných teplotách, tj. 25 a 37 °C. Při teplotě 25 °C byl nejvyšší nárůst  $C_{\max}$  (69 %) zaznamenán u vzorku s obsahem 0,1 hm.%, zatímco při vyšší testované teplotě byl odhalen opačný trend, tj. největší změna byla monitorována u filmu s nejvyšším obsahem kurkuminu. Co se týká rychlostní konstanty, se zvýšením pH došlo k nárůstu hodnot u všech formulací při obou testovaných teplotách. Největší změna byla zjištěna u vzorků s nejvyšším přídatkem kurkuminu 0,5 hm.%).



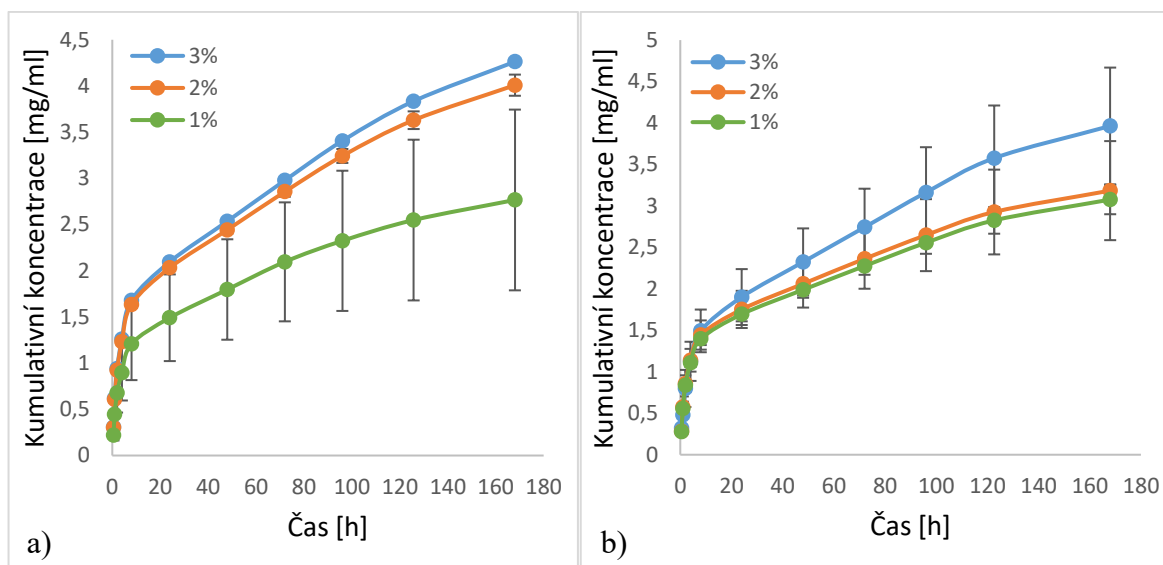
Obrázek 36 Vliv změny pH při teplotě a) 25 °C, b) 37 °C na uvolňování kurkuminu

### 7.6.2 Test uvolňování thymolu

Druhou testovanou aktivní látkou byl thymol. Z obrázků 37 a 38 je zřejmé, že k nejrychlejšímu uvolnění thymolu došlo během prvních deseti hodin, což potvrzuje nejstrmější část křivky. Následně se kinetika uvolňování zpomalovala. Podobně ve studii [68], která byla zaměřena na zkoumání potenciálu chitosanu pro zapouzdření a uvolňování thymolu, bylo nejrychlejší uvolnění (až 69 %) prokázáno během prvních devíti hodin.



Obrázek 37 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (thymolu) na čase při pH 6,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C



Obrázek 38 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (thymolu) na čase při pH 7,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C

Podobně jako v případě kurkuminu i thymolové vzorky vykazovaly závislost koncentrací uvolněného thymolu na obsahu aktivní látky v chitosanové matici, tedy s rostoucí koncentrací thymolu ve vzorku rostla i koncentrace uvolněné látky do prostředí. Rychlostní konstanta se s rostoucím obsahem snižovala, s výjimkou vzorků s 1 a 2 hm.% thymolu testovaných při pH 6,5 a teplotě 37°C, kdy došlo k mírnému nárůstu (Tab. 5 a 6).

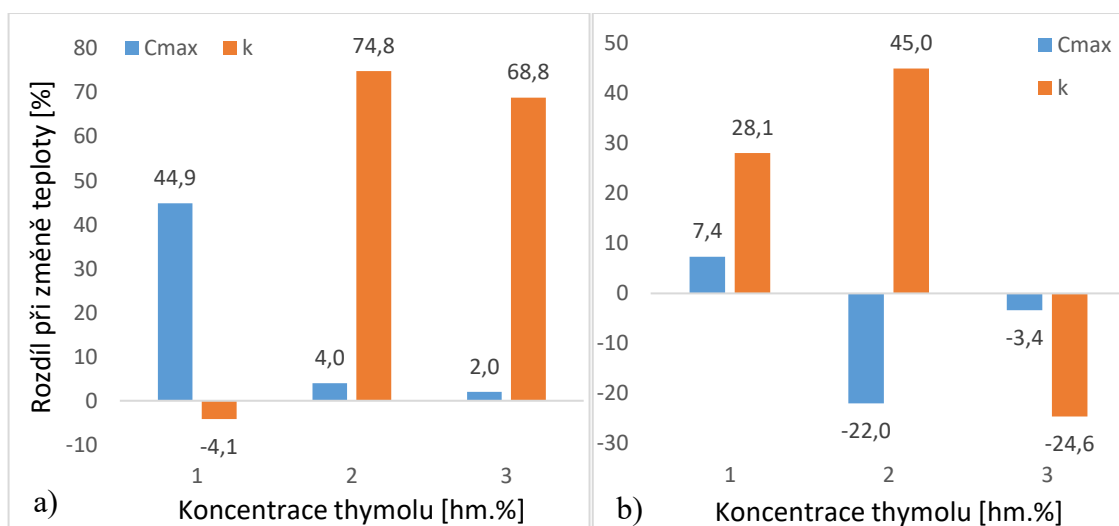
Tabulka 5 Konstanty rovnice (3) získané pro test uvolňování thymolu při pH 6,5 a teplotě 25 a 37 °C

Teplota [°C]	Koncentrace thymolu [hm.%]	pH 6,5		
		$C_{\max}$ [mg/ml]	$-k \cdot 10^{-3}$ [1/h]	$R^2$
25	1	$1,29 \pm 0,065$	$135,11 \pm 12,38$	0,97
	2	$2,88 \pm 0,091$	$32,92 \pm 2,73$	0,96
	3	$3,45 \pm 0,14$	$27,01 \pm 5,11$	0,96
37	1	$2,34 \pm 0,20$	$129,52 \pm 4,60$	0,93
	2	$3,00 \pm 0,28$	$132,05 \pm 6,43$	0,93
	3	$3,52 \pm 0,64$	$86,55 \pm 3,54$	0,94

Tabulka 6 Konstanty rovnice (3) získané pro test uvolňování thymolu při pH 7,5 a teplotě 25 a 37 °C

Teplota [°C]	Koncentrace thymolu [hm.%]	pH 7,5		
		$C_{\max}$ [mg/ml]	$-k \cdot 10^{-3}$ [1/h]	$R^2$
25	1	$2,27 \pm 0,76$	$85,52 \pm 6,01$	0,95
	2	$3,27 \pm 0,12$	$64,49 \pm 8,29$	0,94
	3	$3,54 \pm 0,017$	$48,92 \pm 2,88$	0,95
37	1	$2,45 \pm 0,13$	$118,96 \pm 1,09$	0,93
	2	$2,55 \pm 0,44$	$117,32 \pm 21,59$	0,93
	3	$3,42 \pm 0,57$	$36,88 \pm 1,79$	0,96

Z příložených grafů (Obr. 39 a 40) lze opět názorně vidět vliv sledovaných faktorů na změny v kinetice uvolňování thymolu.



Obrázek 39 Vliv změny teploty při a) pH 6,5, b) pH 7,5 na uvolňování thymolu

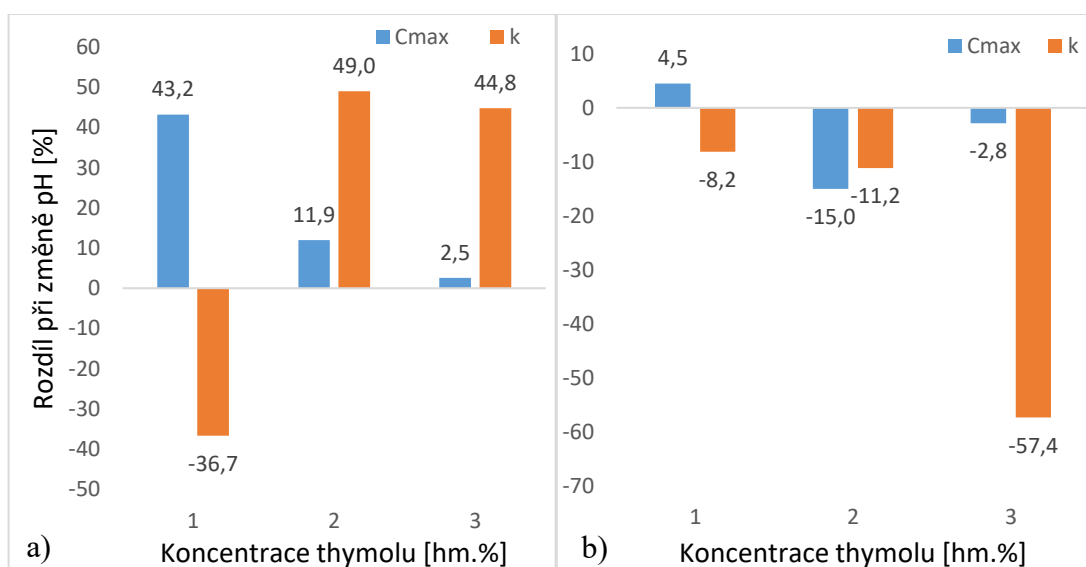
### Vliv změny teploty

Na Obrázku 39a) je znázorněn vliv teploty na test uvolňování při pH 6,5. Se zvýšením teploty bylo potvrzeno, že maximální teoretická koncentrace uvolněného thymolu roste, konkrétně až o téměř 45 % v případě vzorku s obsahem 1 hm.%. Rychlostní konstanta se

vlivem změny teploty na 37 °C také zvýšila, a to nejvíce o 7 % u vzorku s obsahem 2 hm.% thymolu. Jedinou výjimkou byl film s 1 hm.% thymolu, kde naopak došlo k poklesu rychlosti uvolňování (o 4,14 %).

V případě testu při pH 7,5 došlo se změnou teploty z 25 °C na 37 °C vzorku s obsahem thymolu 1 hm.% k nárůstu koncentrace uvolněného thymolu o 7 % (Obr. 39b). Na druhou stranu, vzorky s vyšším obsahem thymolu vykazovaly pokles maximálního teoretického uvolněného množství. Nejednoznačný trend byl pozorován také u rychlosti procesu uvolňování, kdy se rychlostní konstanty u vzorků s obsahem 1 a 2 hm.% thymolu zvýšily (o 28 a 45 %), zatímco u filmu s nejvyšší koncentrací byl zaznamenán pokles o 25 %.

Vliv teploty na mechanismus uvolňování modelového léčiva (5-fluorouracil) z hydroxyapatitového gelu *in vitro* byl studován ve studii [48] při teplotách 32 °C, 37 °C a 42 °C v médiu PBS o hodnotě pH 4,0. Bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou rychlostní konstanta uvolňování postupně klesala.



Obrázek 40 Vliv změny pH při teplotě a) 25 °C, b) 37 °C na uvolňování kurkuminu

### Vliv změny pH

Při teplotě 25 °C způsobila změna pH nárůst koncentrace uvolněného thymolu u všech vzorků, nejvíce však u vzorku s obsahem thymolu 1 hm.%, a to o 43 %. Zároveň se však jednalo o jediný vzorek, u kterého došlo ke snížení rychlosti uvolňování. V ostatních případech se rychlostní konstanta naopak zvýšila (Obr. 40a).

Při teplotě 37 °C vlivem změny pH vzrostla hodnota  $C_{\max}$  nepatrně pouze u vzorku s obsahem 1 hm.% thymolu. U ostatních filmů došlo k poklesu hodnot. Rychlost procesu uvolňování se se změnou pH při této teplotě snížila, nejvíce (57 %) u vzorku s obsahem 3 hm.% thymolu (Obr. 40b).

Autoři Milovanovic a kol. [69] testovali uvolňování thymolu z acetátu celulózy jako nosného systému, a to do prostředí kyseliny chlorovodíkové, která simulovala žaludeční šťávy (pH 1,1), a fosfátového pufru (pH 7,0), který simuloval prostředí střev. Výsledky této studie ukázaly, že thymol byl uvolněn během 1 až 3 dnů a kinetiku uvolňování lze stimulovat prostřednictvím pH okolního média. .

Vlivem pH (3; 4; 5; 6; 7,4) fosfátového pufru na uvolňování 5-fluorouracilu z chitosanových nanočástic se zabývala studie [70]. Výsledky ovšem ukázaly, že množství aktivní látky se uvolňovalo v tomto pořadí  $\text{pH } 3 < 7,4 < 4 < 6 < 5$ .

## 7.7 Mikrobiologické zkoušky

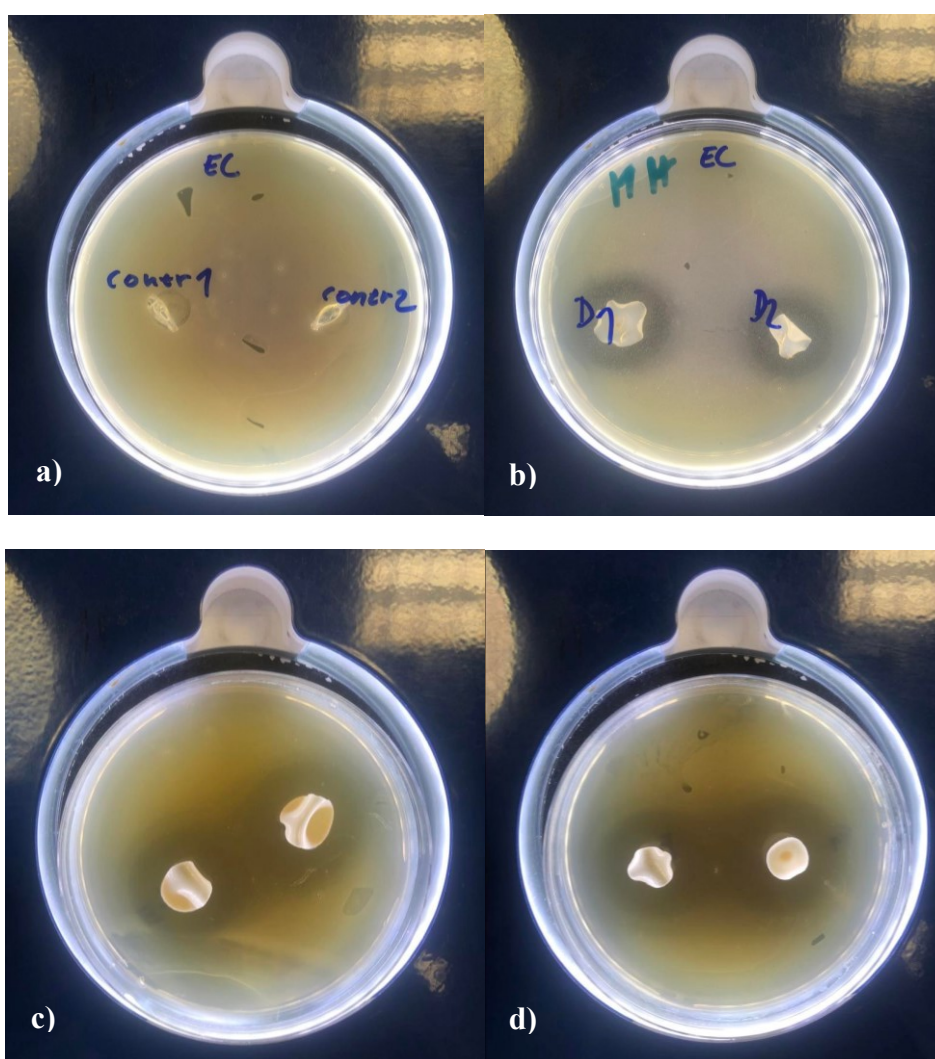
Pomocí agar difúzní metody byla prokázána antibakteriální aktivita na vzorcích chitosanových filmů s obsahem thymolu. Na základě naměřených inhibičních zón (Tabulka 7) lze konstatovat, že thymol prokázal vyšší účinnost vůči Gram pozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* oproti Gram negativní *Escherichia coli*. V případě kurkuminu antimikrobiální aktivita nebyla prokázána pro žádný z testovaných mikroorganismů.

Vyšší inhibice vůči Gram pozitivním mikroorganismům byla pozorována i ve studii [71], kde autoři testovali film na bázi poly(butylensukcinát)u s obsahem thymolu vůči potravinovým patogenům, konkrétně stejným typům, jako v naší práci, a to *S. aureus* a *E. coli*. Tento výsledek lze vysvětlit prostřednictvím rozdílného charakteru Gram negativních a Gram pozitivních bakterií. Je známo, že vnější membrána Gram negativních bakterií je silnější a k jejímu rozrušení je zapotřebí vyšší koncentrace antimikrobiálního činidla.

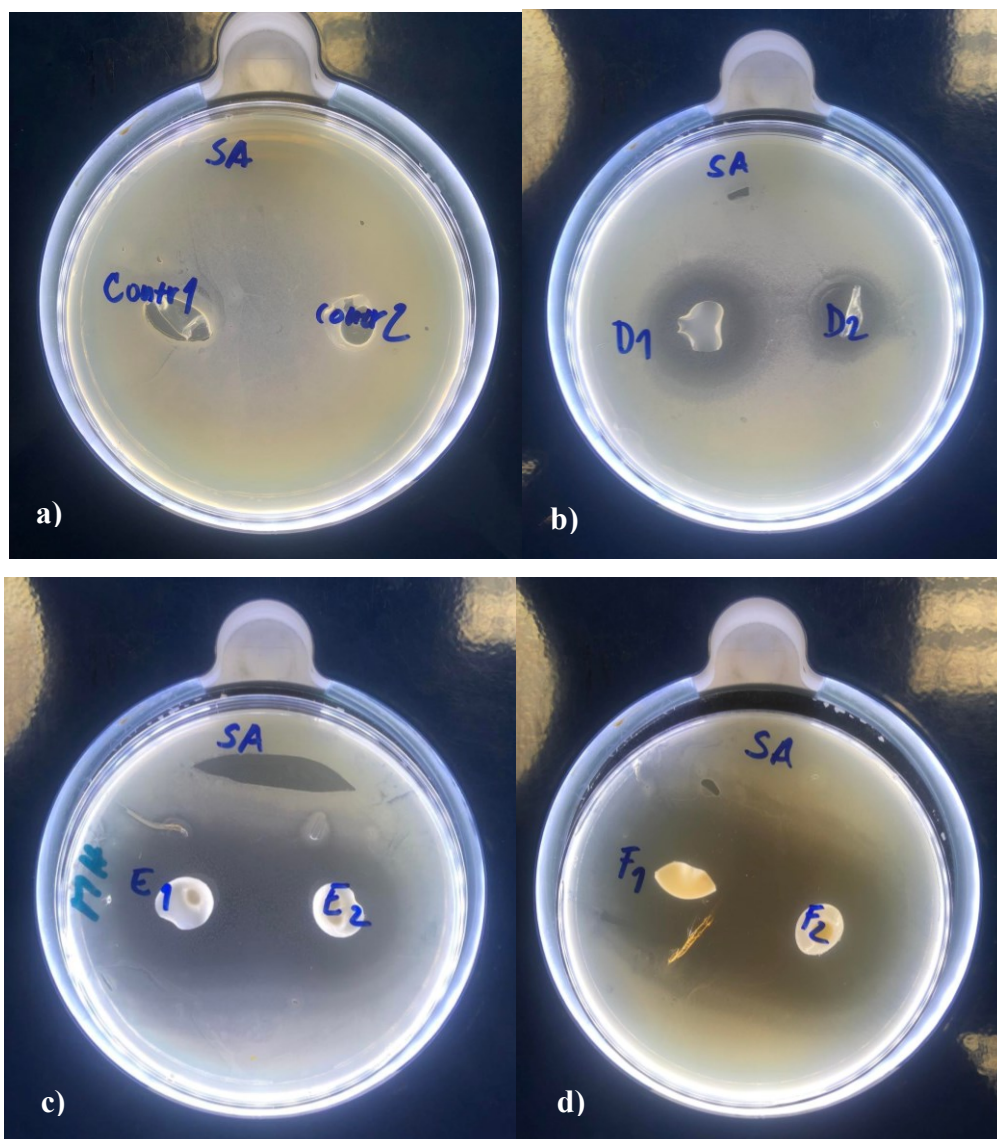
Antimikrobiální účinky thymolu byly potvrzeny v řadě studií [72], [73], [74]. Autoři Guarda a kol. [72] sledovali antimikrobiální vlastnosti polymerních filmů modifikovaných prostřednictvím mikrokapslí s obsahem karvakrolu a thymolu a bylo zjištěno, že thymol silně inhiboval růst mikroorganismů, jako je právě *E. Coli* a *S. aureus*. Výsledné inhibiční zóny lze vidět na Obr. 41 a 42.

Tabulka 7 Inhibiční zóny chitosanových filmů s obsahem thymolu

Koncentrace Thymolu [%]	Průměr inhibiční zóny [mm] <i>Staphylococcus aureus</i>	Průměr inhibiční zóny [mm] <i>Escherichia coli</i>
1	$5 \pm 0,01$	$10 \pm 0,01$
2	$20 \pm 0,01$	$18 \pm 0,01$
3	$38 \pm 0,01$	$20 \pm 0,01$

Obrázek 41 Inhibiční zóny – *E. coli* - a) kontrolní vzorek, b) 1 hm.% thymolu, c) 2 hm.% thymolu, d) 3 hm.% thymolu





Obrázek 42 Inhibiční zóny – *S. aureus* - a) kontrolní vzorek, b) 1 hm.% thymolu, c) 2 hm.% thymolu, d) 3 hm.% thymolu

## ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo zhodnotit vlastnosti biopolymerního nosiče na bázi chitosanu, který byl připraven ve formě filmu metodou odlévání z roztoku. Mimo mechanické charakteristiky tohoto polysacharidového filmu, jako jsou pevnost, elasticita a odolnost proti vpichu, byly sledovány i změny vlastností po zabudování aktivních látek, kurkuminu a thymolu, do filmu. V závěru byla sledována i antibakteriální účinnost chitosanových filmů pomocí agar difúzní metody. Stěžejní část práce se věnovala studiu faktorů ovlivňujících podmínky uvolňování zmíněných aktivních látek z matrice chitosanu.

Bylo zjištěno, že odléváním z roztoku chitosanu lze připravit homogenní a kompaktní filmy. Co se týká povrchových vlastností, samotný chitosanový film vykazoval hydrofobní povrch s kontaktním úhlem přes 100°. Zabudování námi testovaných aktivních látek, kurkuminu a thymolu, vedlo ke snížení kontaktního úhlu pro vodu a tím zvýšení smáčivosti. Tento fakt může mít zásadní význam zejména ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu.

Měření mechanických vlastností byl prokázán vliv koncentrace inkorporovaných aktivních látek na celkovou pevnost při vpichu a v tahu. Oba tyto parametry se s přibývajícím koncentrací aktivních látek snižovaly. Z toho vyplývá, že daná modifikace a s tím související distribuce kurkuminu a thymolu v matrici chitosanu způsobila porušení polymerní struktury vedoucí k poklesu mechanické pevnosti. Naopak prodloužení při přetržení indikující elasticitu materiálů bylo u formulací s obsahem aktivních látek vyšší. Lze tedy konstatovat, chitosanové filmy obohacené o aktivní látky jsou sice méně pevné, ale zato pružnější.

Pomocí FTIR-ATR spektroskopie byly hodnoceny případné strukturní změny připravených bioaktivních systémů. U filmu modifikovaného thymolem byl jednoznačně prokázán vznik nových píků, indikujících interakce mezi polymerem a aktivní látkou. V případě směsi s kurkuminem nebyly prokázány významné změny ve spektrech oproti referenčnímu vzorku. Důvodem mohou být nižší koncentrace aktivní látky, nebo ukotvení kurkuminu ve vnitřní struktuře polymerní matrice.

Jak již bylo zmíněno, stěžejní část této práce byla věnována studiu kinetiky uvolňování aktivních látek z polymerního chitosanového filmu. Důraz byl kladen na faktory, jako je teplota, pH a koncentrace aktivní látky. Z naměřených dat je zjevné, že všechny tři parametry významně ovlivnily chování směsi během testu uvolňování. V případě obou aktivních sloučenin lze obecně říci, že s jejich rostoucí koncentrací roste i maximální koncentrace uvolněné látky a rychlost procesu uvolňování. Se změnou teploty docházelo při obou

testovaných hodnotách pH ke zvýšení maximální koncentrace uvolněné látky. Vliv zvýšení pH se u filmů s kurkuminem projevil při obou teplotách nárůstem jak maximální uvolněné koncentrace, tak i rychlostní konstanty. Stejný trend byl monitorován u formulací s thymolem, ovšem pouze při teplotě 25 °C. Při vyšší teplotě 37 °C byl naopak pozorován pokles těchto hodnot. Mikrobiologické testy potvrdily u vzorků chitosanu s obsahem thymolu antibakteriální vlastnosti, přičemž vyšší účinnost byla prokázána vůči Gram pozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*.

Závěrem lze konstatovat, že připravené nosiče na bázi chitosanu s thymolem, resp. kurkuminem, splňují požadavky, které jsou v současné době kladené na environmentálně příznivé aktivní systémy. Díky změně složení nosiče, vlastností média a okolních podmínek lze ovlivnit kinetiku uvolňování, což lze s výhodou aplikovat při vývoji responzivních nosných systémů pro řízené uvolňování bioaktivních látek.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] COSTA, Raquel a Lúcia SANTOS. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. Powder Technology [online]. 2017, 322, 402-416 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00325910. Dostupné z: doi:10.1016/j.powtec.2017.07.086
- [2] LAOUINI, A., JAAFAR-MALLEJ, C., LIMAYEM-BLOUZA, I. et al. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. Colloid Science and Biotechnology. 2012, 1(2), pp. 147-168
- [3] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters [online]. 2013, 8(1) [cit. 2022-05-01]. ISSN 1556-276X. Dostupné z: doi:10.1186/1556-276X-8-102
- [4] BOB AVEYARD. Surfactants: In Solution, at Interfaces and in Colloidal Dispersions. 2019. ISBN 9780198828600. Dostupné také z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&an=2258473&scope=site>
- [5] NARANG, A, D DELMARRE a D GAO. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. International Journal of Pharmaceutics [online]. 2007, 345(1-2), 9-25 [cit. 2022-05-01]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2007.08.057
- [6] MYERS, Drew. Surfactant Science and Technology [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2005 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9780471746072. Dostupné z: doi:10.1002/047174607X
- [7] BHATIA, Surita R. Surfactants and Polymers in Drug Delivery. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Volume 122 By Martin Malmsten (Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden). Marcel Dekker, Inc: New York, Basel. 2002. x + 348 pp. \$165.00. ISBN 0-8247-0804-0. Journal of the American Chemical Society [online]. 2003, 125(11), 3400-3400 [cit. 2022-05-01]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja025301i

- [8] LU, Wei, Alan L. KELLY a Song MIAO. Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols. *Trends in Food Science* [online]. 2016, 47, 1-9 [cit. 2022-02-20]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2015.10.015
- [9] FANUN, M. *Microemulsions: properties and applications*. Boca Raton: CRC Press©2009. In: *Surfactant science series*, v. 144. ISBN 1420089595
- [10] CHELLAPA, P., ARIFIN, F. D., EID, A. M. et al. Nanoemulsion for cosmetic application. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2016, 3(7), pp. 8-11.
- [11] TAMPAU, Alina, Chelo GONZÁLEZ-MARTÍNEZ a Amparo CHIRALT. Polyvinyl alcohol-based materials encapsulating carvacrol obtained by solvent casting and electrospinning. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2020, str. 153 [cit. 2022-04-06]. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104603
- [12] MAITZ, M.F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* [online]. 2015, 1(3), str. 161-176 [cit. 2022-04-06]. ISSN 24054518. Dostupné z: doi:10.1016/j.bsbt.2015.08.002
- [13] HUBER, Kerry C. a Milda E. EMBUSCADO, ed. *Edible Films and Coatings for Food Applications* [online]. New York, NY: Springer New York, 2009 [cit. 2021-01-06]. ISBN 978-0-387-92823-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-92824-1
- [14] THOMAS, Merin Sara, Rekha Rose KOSHY, Siji K. MARY, Sabu THOMAS a Laly A. POTHAN. *Starch, Chitin and Chitosan Based Composites and Nanocomposites* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019 [cit. 2022-05-01]. SpringerBriefs in Molecular Science. ISBN 978-3-030-03157-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-03158-9
- [15] SUHAG, Rajat, Nishant KUMAR, Anka Trajkovska PETKOSKA a Ashutosh UPADHYAY. Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Research International* [online]. 2020, 136 [cit. 2021-02-20]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2020.109582
- [16] SACCO, Pasquale, Seidy PEDROSO-SANTANA, Yogesh KUMAR, Nicolas JOLY, Patrick MARTIN a Patrizia BOCCHETTA. Iontropic Gelation of

- Chitosan Flat Structures and Potential Applications: Review. *Molecules* [online]. 2021 [cit. 2022-01-11]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26030660>
- [17] Extruze: Základní princip procesu extruze. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b6/Extrusion\\_process\\_1.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b6/Extrusion_process_1.png)
- [18] STARBIRD-PEREZ, Ricardo, Pasquale DEL GAUDIO a Carlos A. GARCÍA-GONZÁLEZ. Special Issue: Biopolymers in Drug Delivery and Regenerative Medicine. *Molecules* [online]. 2021, 26(3) [cit. 2022-04-29]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:[10.3390/molecules26030568](https://doi.org/10.3390/molecules26030568)
- [19] BHANU MALHOTRA, Bhanu Malhotra, Harsha Kharkwal HARSHA KHARKWAL a Anuradha Srivastava ANURADHA SRIVASTAVA. Water-soluble biodegradable polymers for drug delivery. HARSHA KHARKWAL, Harsha Kharkwal a Srinivas Janaswamy SRINIVAS JANASWAMY, ed. *Natural polymers for drug delivery* [online]. Wallingford: CABI, 2017, 2017, s. 37-44 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9781780644479. Dostupné z: doi:[10.1079/9781780644479.0037](https://doi.org/10.1079/9781780644479.0037)
- [20] BHANU MALHOTRA, Bhanu Malhotra, Harsha Kharkwal HARSHA KHARKWAL a M. P. YADAV. Cellulose-based polymeric systems in drug delivery. HARSHA KHARKWAL, Harsha Kharkwal a Srinivas Janaswamy SRINIVAS JANASWAMY, ed. *Natural polymers for drug delivery* [online]. Wallingford: CABI, 2017, 2017, s. 10-21 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9781780644479. Dostupné z: doi:[10.1079/9781780644479.0010](https://doi.org/10.1079/9781780644479.0010)
- [21] Celulosa. In: *Leporelo.info: Encyklopedie* [online]. [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: [https://leporelo.info/pics/pic/celulosa-\\_vzorec.jpg](https://leporelo.info/pics/pic/celulosa-_vzorec.jpg)
- [22] The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use. SELYANIN, Mikhail A., Petr Ya. BOYKOV, Vladimir N. KHABAROV a Felix POLYAK. *Hyaluronic Acid* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015, 2015-01-09, s. 1-8 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9781118695920. Dostupné z: doi:[10.1002/9781118695920.ch1](https://doi.org/10.1002/9781118695920.ch1)
- [23] CARVALHO, L. S., A. M. GOMES, L. R. QUEIROZ, B. S. MAGALHÃES a N. S. PARACHIN. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural

- and engineered microorganisms. *Microbial cell factories* [online]. 2016, 15(1), 119 [cit. 2021-10-26]. ISSN 14752859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-016-0517-4
- [24] ANIRBANDEEP BOSE, Anirbandeep Bose a Wong TinWui WONG TINWUI. Chitosan in drug delivery and targeting for cancer treatment. HARSHA KHARKWAL, Harsha Kharkwal a Srinivas Janaswamy SRINIVAS JANASWAMY, ed. *Natural polymers for drug delivery* [online]. Wallingford: CABI, 2017, 2017, s. 117-144 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9781780644479. Dostupné z: doi:10.1079/9781780644479.0117
- [25] MUJTABA, Muhammad, Rania E. MORSI, Garry KERCH, Maher Z. ELSABEE, Murat KAYA, Jalel LABIDI a Khalid Mahmood KHAWAR. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, 121, 889-904 [cit. 2022-05-01]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109
- [26] Vavříková, E. a Vinšová, J. 2009. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. *Chemické listy*. 103, 1 (úno. 2009)
- [27] ULLAH, H., Ali, S. Classification of anti-bacterial agents and their functions. In: KUMAVATH, R. ed. *Antibacterial Agents.. BoD-Books on Demand*, 2017. ISBN 9535131990
- [28] MAHIRA, Shaheen, Anjali JAIN, Wahid KHAN a Abraham J. DOMB. Chapter 1. Antimicrobial Materials—An Overview. DOMB, Abraham J, Konda Reddy KUNDURU a Shady FARAH, ed. *Antimicrobial Materials for Biomedical Applications* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2019, 2019, s. 1-37 [cit. 2022-05-01]. Biomaterials Science Series. ISBN 978-1-78801-188-4. Dostupné z: doi:10.1039/9781788012638-00001
- [29] HASSANE HAMADOU, Alkassoumi, Wen-Can HUANG, Changhu XUE a Xiangzhao MAO. Formulation of vitamin C encapsulation in marine phospholipids nanoliposomes: Characterization and stability evaluation during long term storage. *LWT* [online]. 2020, 127 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2020.109439
- [30] FRANK, J. a H. K. BIESALSKI. *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology*. 2004, 973-977. ISBN 9783540428435. Dostupné také z:

<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&an=22803445&scope=site>

- [31] KHANNIRI, E., N. BAGHERIPOOR-FALLAH, S. SOHRABVANDI, A. M. MORTAZAVIAN, K. KHOSRAVI-DARANI a R. MOHAMMAD. Application of Liposomes in Some Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2015, 56(3), 484-493 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2013.779571
- [32] BASTOS, F., SANTOS, L. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*. 2015, 33(1), pp. 1-17. doi: 10.3109/02652048.2015.1115900
- [33] GALOTTO, M.J., C. López DE DICASTILLO, A. TORRES a A. GUARDA. Thymol. *Antimicrobial Food Packaging* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 553-562 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9780128007235. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800723-5.00045-0
- [34] ANWAR, Sirajudheen, Nafees AHMED, Sofiane HABIBATNI a Yousef ABUSAMRA. Ajwain (*Trachyspermum ammi* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 181-192 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9780124166417. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416641-7.00019-5
- [35] JAVERI, Indu a Naresh CHAND. Curcumin. *Nutraceuticals* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 435-445 [cit. 2022-05-01]. ISBN 9780128021477. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802147-7.00031-0
- [36] RAI, Mahendra a Carolina ALVES DOS SANTOS, ed. *Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [cit. 2022-05-01]. ISBN 978-3-319-70298-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-70299-5
- [37] HERDIANA, Yedi, Nasrul WATHONI, Shaharum SHAMSUDDIN a Muchtaridi MUCHTARIDI. Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Heliyon* [online]. 2022, 8(1) [cit. 2022-04-25]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08674



- [38] VARMA, Manthena V S, Aditya M KAUSHAL, Alka GARG a Sanjay GARG. Factors Affecting Mechanism and Kinetics of Drug Release from Matrix-Based Oral Controlled Drug Delivery Systems. *American Journal of Drug Delivery* [online]. 2004, 2(1), 43-57 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1175-9038. Dostupné z: doi:10.2165/00137696-200402010-00003
- [39] DASH, Suvakanta, et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 2010, 67.3: 217-223
- [40] COLOMBO, Paolo, Ruggero BETTINI, Pier Luigi CATELLANI, Patrizia SANTI a Nikolaos A. PEPPAS. Drug volume fraction profile in the gel phase and drug release kinetics in hydroxypropylmethyl cellulose matrices containing a soluble drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1999, 9(1), 33-40 [cit. 2022-04-19]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/S0928-0987(99)00039-1
- [41] KOU, Shijie (Gabriel), Linda M. PETERS a Michael R. MUCALO. Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 169, 85-94 [cit. 2022-05-01]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005
- [42] SEIDI, Farzad, Mohsen KHODADADI YAZDI, Maryam JOUYANDEH, et al. Chitosan-based blends for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 183, 1818-1850 [cit. 2022-04-19]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.003
- [43] SHOUEIR, Kamel R., Nagwa EL-DESOUKY, Moataz M. RASHAD, M.K. AHMED, Izabela JANOWSKA a Maged EL-KEMARY. Chitosan based-nanoparticles and nanocapsules: Overview, physicochemical features, applications of a nanofibrous scaffold, and bioprinting. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, 167, 1176-1197 [cit. 2022-04-19]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.072
- [44] SAFDAR, Rizwan, Abdul Aziz OMAR, Appusami ARUNAGIRI, Iyyasami REGUPATHI a Murugesan THANABALAN. Potential of Chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2019, 49, 642-659 [cit. 2022-04-20]. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2018.10.020 (str. 648)

- [45] THAKUR, Vijay Kumar a Manju Kumari THAKUR, ed. Functional Biopolymers [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018 [cit. 2022-05-01]. Springer Series on Polymer and Composite Materials. ISBN 978-3-319-66416-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-66417-0
- [46] SIMON, Anna Paulla, Carlise Hannel FERREIRA, Andressa RODRIGUES, Janaina Soares SANTOS, Francisco Trivinho STRIXINO, Patrícia Teixeira MARQUES, Henrique Emilio ZOREL JUNIOR a Mariana De Souza SIKORA. TiO<sub>2</sub>NT as Platform for Drug Release: The Effect of Film Wettability. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry* [online]. 2019, 11(6), 361-366 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1984-6428. Dostupné z: doi:10.17807/orbital.v11i6.1251
- [47] FERREIRA, J.A., P. DE OLIVEIRA a E. SILVEIRA. Drug release enhanced by temperature: An accurate discrete model for solutions in H<sub>3</sub>. *Computers & Mathematics with Applications* [online]. 2020, 79(3), 852-875 [cit. 2022-04-25]. ISSN 08981221. Dostupné z: doi:10.1016/j.camwa.2019.08.002 873-874
- [48] AYDIN, Nalan Erdöl. Effect of Temperature on Drug Release: Production of 5-FU-Encapsulated Hydroxyapatite-Gelatin Polymer Composites via Spray Drying and Analysis of In Vitro Kinetics. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2020, 2020, 1-13 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8017035
- [49] LIU, Yujia, Yanxue CAI, Xueying JIANG, Jinping WU a Xueyi LE. Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids* [online]. 2016, 52, 564-572 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2015.08.005
- [50] ZIVANOVIC, Svetlana, Jiajie LI, P. Michael DAVIDSON a Kevin KIT. Physical, Mechanical, and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films. *Biomacromolecules* [online]. 2007, 8(5), 1505-1510 [cit. 2022-05-04]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm061140p
- [51] OTHMAN, Siti Hajar, Nur Fitrah Liyana OTHMAN, Ruzanna Ahmad SHAPI'I, Siti Hajar ARIFFIN a Khairul Faezah Md. YUNOS. Corn Starch/Chitosan Nanoparticles/Thymol Bio-Nanocomposite Films for Potential Food Packaging Applications. *Polymers* [online]. 2021, 13(3) [cit. 2022-04-29]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13030390

- [52] RACHTANAPUN, Pornchai, Warinporn KLUNKLIN, Pensak JANTRAWUT, et al. Characterization of Chitosan Film Incorporated with Curcumin Extract. *Polymers* [online]. 2021, 13(6) [cit. 2022-05-04]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13060963
- [53] NORDIN, Norhazirah, Siti Hajar OTHMAN, Suraya Abdul RASHID a Roseliza Kadir BASHA. Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, 106 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105884
- [54] MELO-SILVEIRA, Raniere Fagundes, Gabriel Pereira FIDELIS, Mariana Santana Santos Pereira COSTA, et al. In Vitro Antioxidant, Anticoagulant and Antimicrobial Activity and in Inhibition of Cancer Cell Proliferation by Xylan Extracted from Corn Cobs. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, 13(1), 409-426 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms13010409
- [55] WOLKERS, Willem F., Ann E. OLIVER, Fern TABLIN a John H. CROWE. A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carbohydrate Research* [online]. 2004, 339(6), 1077-1085 [cit. 2022-05-01]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2004.01.016
- [56] SILVA, F.R.F., C.M.P.G. DORE, C.T. MARQUES, M.S. NASCIMENTO, N.M.B. BENEVIDES, H.A.O. ROCHA, S.F. CHAVANTE a E.L. LEITE. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, 79(1), 26-33 [cit. 2022-05-01]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.010
- [57] VINO, Aruldhason Barwin, Pasiyappazham RAMASAMY, Vairamani SHANMUGAM a Annaian SHANMUGAM. Extraction, characterization and in vitro antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeata* Orbigny, 1848. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 2012, 2(1), S334-S341 [cit. 2022-05-01]. ISSN 22211691. Dostupné z: doi:10.1016/S2221-1691(12)60184-1
- [58] SONG, Chao, Hao YU, Min ZHANG, Yanyan YANG a Guren ZHANG. Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly

- Chrysomya megacephala larvae. International Journal of Biological Macromolecules [online]. 2013, 60, 347-354 [cit. 2022-05-01]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.05.039
- [59] FERNANDES QUEIROZ, Moacir, Karoline MELO, Diego SABRY, Guilherme SASSAKI a Hugo ROCHA. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?. Marine Drugs [online]. 2015, 13(1), 141-158 [cit. 2022-05-01]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/md13010141
- [60] KUMARI, Sarita, R. V. KUMARASWAMY, Ram Chandra CHOUDHARY, S. S. SHARMA, Ajay PAL, Ramesh RALIYA, Pratim BISWAS a Vinod SAHARAN. Thymol nanoemulsion exhibits potential antibacterial activity against bacterial pustule disease and growth promotory effect on soybean. Scientific Reports [online]. 2018, 8(1) [cit. 2022-05-04]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-24871-5
- [61] Thymol: IR Spectrum. National Institute of Standards and Technology: WebBook [online]. [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C89838&Mask=80#IR-Spec>
- [62] RAJKUMAR, P., S. SELVARAJ, R. SUGANYA, D. VELMURUGAN, S. GUNASEKARAN a S. KUMARESAN. Vibrational and electronic spectral analysis of thymol an isomer of carvacrol isolated from Trachyspermum ammi seed: A combined experimental and theoretical study. Chemical Data Collections [online]. 2018, 15-16, 10-31 [cit. 2022-05-04]. ISSN 24058300. Dostupné z: doi:10.1016/j.cdc.2018.03.003
- [63] CHEN, Xing, Li-Qiang ZOU, Jing NIU, Wei LIU, Sheng-Feng PENG a Cheng-Mei LIU. The Stability, Sustained Release and Cellular Antioxidant Activity of Curcumin Nanoliposomes. Molecules [online]. 2015, 20(8), 14293-14311 [cit. 2022-05-04]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules200814293
- [64] ISMAIL, E. H., D. Y. SABRY, H. MAHDY a M. M. H. KHALIL. Synthesis and Characterization of some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1,10-phenanthroline and their Anticancer Applications. Journal of Scientific Research [online]. 2014, 6(3), 509-519 [cit. 2022-05-04]. ISSN 2070-0245. Dostupné z: doi:10.3329/jsr.v6i3.18750

- [65] MERCHAN, Martha, Jana SEDLARIKOVA, Vladimir SEDLARIK, Michal MACHOVSKY, Jitka SVOBODOVA a Petr SAHA. Antibacterial polyvinyl chloride/antibiotic films: The effect of solvent on morphology, antibacterial activity, and release kinetics. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2010, , n/a-n/a [cit. 2022-5-02]. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.32185
- [66] LI, Riwan, Li DENG, Zhengwei CAI, Shuyun ZHANG, Kun WANG, Lihua LI, Shan DING a Changren ZHOU. Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, 80, 156-164 [cit. 2022-05-05]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.05.136
- [67] LIU, Yujia, Dandan LIU, Li ZHU, Qian GAN a Xueyi LE. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food Research International* [online]. 2015, 74, 97-105 [cit. 2022-05-05]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2015.04.024
- [68] PIRI-GHARAGHIE, Tohid, Sheida BEIRANVAND, Anali RIAHI, et al. Fabrication and Characterization of Thymol-Loaded Chitosan Nanogels: Improved Antibacterial and Anti-Biofilm Activities with Negligible Cytotoxicity. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2022, 19(3) [cit. 2022-05-05]. ISSN 1612-1872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.202100426
- [69] MILOVANOVIC, Stoja, Darka MARKOVIC, Ksenija AKSENTIJEVIC, Dusica B. STOJANOVIC, Jasna IVANOVIC a Irena ZIZOVIC. Application of cellulose acetate for controlled release of thymol. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, 147, 344-353 [cit. 2022-05-08]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.03.093
- [70] TIĞLI AYDIN, R. Seda a Mehlika PULAT. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2012, 2012, 1-10 [cit. 2022-05-08]. ISSN 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2012/313961
- [71] PETCHWATTANA, Nawadon a Phisut NAKNAEN. Utilization of thymol as an antimicrobial agent for biodegradable poly(butylene succinate). *Materials Chemistry and Physics* [online]. 2015, 163, 369-375 [cit. 2022-05-04]. ISSN 02540584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2015.07.052

- [72] GUARDA, Abel, Javiera F. RUBILAR, Joseph MILTZ a Maria Jose GALOTTO. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, 146(2), 144-150 [cit. 2022-05-02]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011
- [73] PEI, Rui-song, Feng ZHOU, Bao-ping JI a Jing XU. Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method. *Journal of Food Science* [online]. 2009, 74(7), M379-M383 [cit. 2022-05-02]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x
- [74] SHAH, BHAVINI, P. MICHAEL DAVIDSON a QIXIN ZHONG. Antimicrobial Activity of Nanodispersed Thymol in Tryptic Soy Broth. *Journal of Food Protection* [online]. 2013, 76(3), 440-447 [cit. 2022-05-02]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-354

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

O/V	emulze typu olej ve vodě
cmc	kritická micelární koncentrace
V/O	emulze typu voda v oleji
O/V/O	emulze typu olej ve vodě v oleji
V/O/V	emulze typu voda v oleji ve vodě
EIP	inverzní bod emulze
PIT	teplota inverze fází
HA	kyselina hyaluronová
DNA	deoxyribonukleová kyselina
pKa	disociační konstanta
BMC	bisdemethoxykurkumin
DMSO	dimethylsulfoxid
DD	stupeň deacetylace
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
NMR	nukleární magnetická resonance
®	registrovaná ochranná známka
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná
UV	ultrafialový
Rpm	počet otáček za minutu
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
PEO	polyethylenoxid
PBS	fosfátem pufrovaný fyziologický roztok

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Schéma techniky odlévání (upraveno dle [16, str. 4]).....	15
Obrázek 2 Schéma procesu extruze (upraveno dle [17]).....	16
Obrázek 3 Strukturní vzorec celulózy [21].....	18
Obrázek 4 Diagram přeměny celulózy (upraveno dle [20, str. 11]) .....	18
Obrázek 5 Struktura xantanové gumy [19, str. 38].....	20
Obrázek 6 Struktura kyseliny hyaluronové (upraveno dle [23]) .....	20
Obrázek 7 Aplikace kyseliny hyaluronové (upraveno dle [23, str. 3]).....	21
Obrázek 8 Deacetylace a chemická struktura chitosanu [26, str. 56].....	22
Obrázek 9 Chemická struktura thymolu [33, str. 556] .....	25
Obrázek 10 Chemická struktura kurkuminu a jeho derivátů [35, str. 436] .....	26
Obrázek 11 Faktory ovlivňující kinetiku a mechanismus uvolňování léčiva z polymerních systémů (upraveno dle [38]) .....	28
Obrázek 12 Kontaktní úhel [45, str. 133-134] .....	31
Obrázek 13 Texturometr při měření tahových zkoušek.....	39
Obrázek 14 Nástavec pro zkoušku vpichem.....	40
Obrázek 15 Kontrolní chitosanový film bez přídavku aktivní látky .....	42
Obrázek 16 Chitosanový film s a) 1 hm.%, b) 2 hm.% a c) 3 hm.% thymolu .....	42
Obrázek 17 Chitosanový film s a) 0,1 hm.%, b) 0,3 hm.% a c) 0,5 hm.% kurkuminu .....	43
Obrázek 18 Průměrné hodnoty kontaktního úhlu vody na povrchu filmu s obsahem thymolu .....	44
Obrázek 19 Přisedlá kapka vody na a) kontrolním vzorku, b) vzorku s obsahem 1 hm.% thymolu .....	44
Obrázek 20 Průměrné hodnoty kontaktního úhlu vody na povrchu filmu s obsahem kurkuminu.....	45
Obrázek 21 Přisedlá kapka vody na a) kontrolním vzorku, b) vzorku s obsahem 0,5 hm.% kurkuminu.....	45
Obrázek 22 Pevnost při vpichu chitosanových filmů s thymolem .....	46
Obrázek 23 Pevnost při vpichu chitosanových filmů s kurkuminem .....	47
Obrázek 24 Pevnost v tahu chitosanových filmů s thymolem.....	48
Obrázek 25 Pevnost v tahu chitosanových filmů s kurkuminem.....	48
Obrázek 26 Prodloužení při přetržení chitosanových filmů s thymolem .....	49
Obrázek 27 Prodloužení při přetržení chitosanových filmů s kurkuminem .....	50
Obrázek 28 FTIR-ATR spektra pro A kontrolní vzorek, B vzorek s obsahem thymolu (3 hm.%), C čistý thymolový prášek.....	51
Obrázek 29 FTIR-ATR spektra pro A kontrolní vzorek, B vzorek s obsahem kurkuminu (0,5 hm.%), C čistý kurkuminový prášek .....	52



Obrázek 30 Kalibrační přímka pro kurkumin (měřeno při 426 nm).....	53
Obrázek 31 Kalibrační přímka pro thymol (měřeno při 284 nm).....	53
Obrázek 32 Závislost kumulativní koncentrace na čase pro vzorek obsahující 0,1 hm.% kurkuminu proložená fitovaným modelem dle rovnice (3) .....	54
Obrázek 33 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (kurkumin) na čase při pH 6,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C .....	55
Obrázek 34 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (kurkuminu) na čase při pH 7,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C .....	56
Obrázek 35 Vliv změny teploty z 25 °C na 37 °C při a) pH 6,5, b) pH 7,5 na uvolňování kurkuminu.....	57
Obrázek 36 Vliv změny pH při teplotě a) 25 °C, b) 37 °C na uvolňování kurkuminu.....	59
Obrázek 37 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (thymolu) na čase při pH 6,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C.....	59
Obrázek 38 Závislost kumulativní koncentrace aktivní látky (thymolu) na čase při pH 7,5 a teplotě a) 25 °C, b) 37 °C.....	60
Obrázek 39 Vliv změny teploty při a) pH 6,5, b) pH 7,5 na uvolňování thymolu .....	61
Obrázek 40 Vliv změny pH při teplotě a) 25 °C, b) 37 °C na uvolňování kurkuminu.....	62
Obrázek 41 Inhibiční zóny – <i>E. coli</i> - a) kontrolní vzorek, b) 1 hm.% thymolu, c) 2 hm.% thymolu, d) 3 hm.% thymolu .....	64
Obrázek 42 Inhibiční zóny – <i>S. aureus</i> - a) kontrolní vzorek, b) 1 hm.% thymolu, c) 2 hm.% thymolu, d) 3 hm.% thymolu.....	65

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Navážky pro 1 litr pufru o hodnotě pH 7,5.....	37
Tabulka 2 Navážky pro 1 litr pufru o hodnotě pH 6,5.....	37
Tabulka 3 Konstanty Rovnice (3) získané pro test uvolňování kurkuminu při pH 6,5 a teplotě 25 a 37 °C .....	56
Tabulka 4 Konstanty Rovnice (3) získané pro test uvolňování kurkuminu při pH 7,5 a teplotě 25 a 37 °C .....	57
Tabulka 5 Konstanty rovnice (3) získané pro test uvolňování thymolu při pH 6,5 a teplotě 25 a 37 °C .....	60
Tabulka 6 Konstanty rovnice (3) získané pro test uvolňování thymolu při pH 7,5 a teplotě 25 a 37 °C .....	61
Tabulka 7 Inhibiční zóny chitosanových filmů s obsahem thymolu .....	64