



CELKROG
Zavrnjeni potencial biomase

Program Izkoriščanje potenciala biomase za razvoj naprednih materialov in bio-osnovanih produktov

IZDELAVA MIKROKAPSUL ZA PROTIMIKROBNE PREMAZE NA PAPIRJU

PRODUCTION OF MICROCAPSULES FOR ANTIMICROBIAL PAPER COATINGS

Bojana Boh Podgornik¹, Barbara Golja¹, Silvo Hribenik², Blaž Likozar³, Aleš Palatinus⁴,
David Ravnjak⁴, Barbara Šumiga⁵, Boštjan Šumiga¹, Matej Šuštaršič⁵

¹ Univerza v Ljubljani, Naravoslovnotehniška fakulteta, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo, Maribor, Slovenija

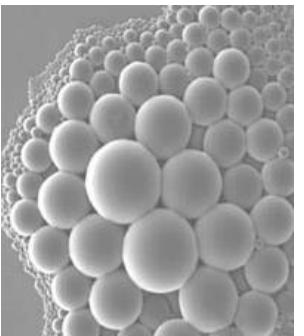
³ Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija

⁴ Papirnica Vevče d.o.o., Ljubljana – Dobrunje, Slovenija

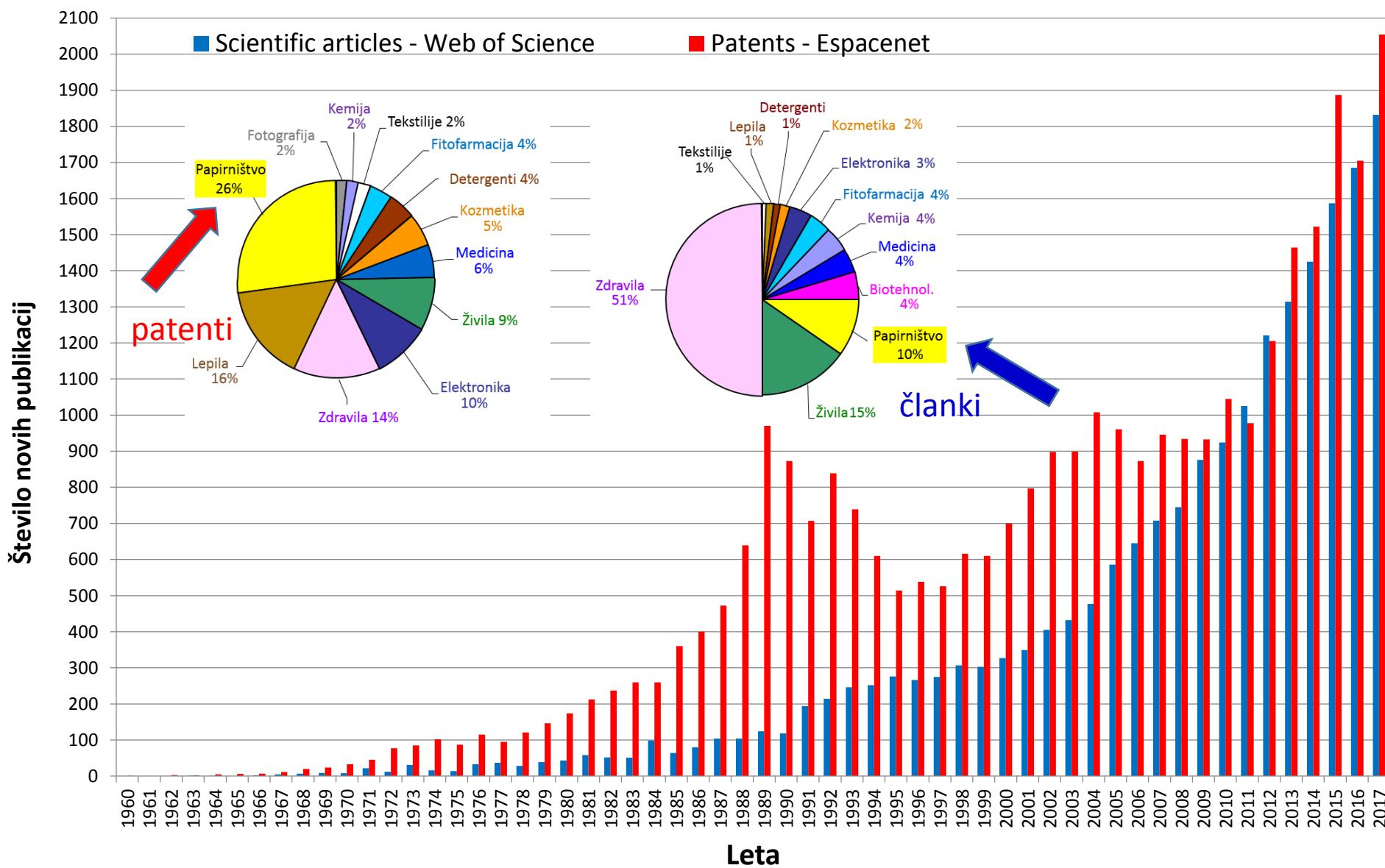
⁵ Inštitut za celulozo in papir, Ljubljana, Slovenija

Izhodišča

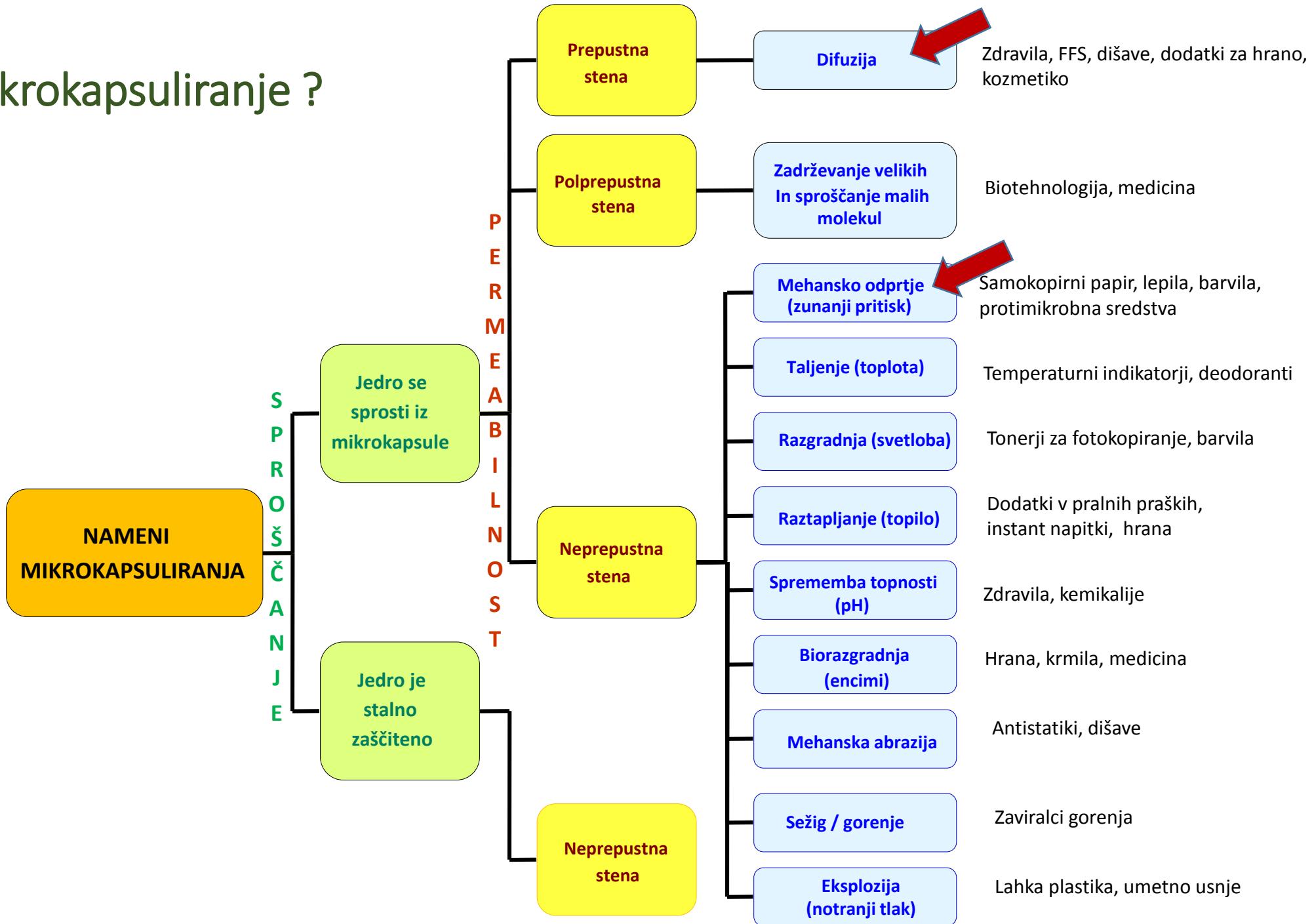
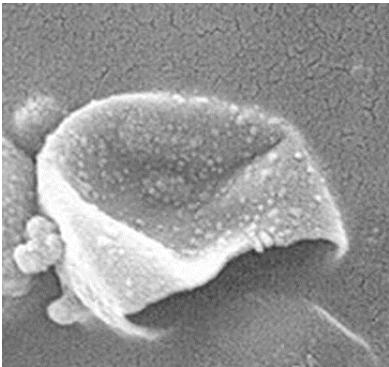
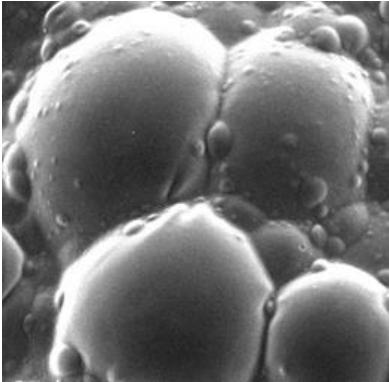
- **Cel.Krog:** »Izkoriščanje potenciala biomase za razvoj naprednih materialov in bio-osnovanih produktov«
- **Skupina za mikrokapsuliranje:** mikrokapsuliranje protimikrobnih snovi za embalažo in / ali etiketne papirje
- **Namen raziskave:** razvoj mikrokapsulirane oblike naravne učinkovine (eteričnega olja) s protimikrobnim učinkovanjem - funkcionalni dodatek v papirni in kartonski embalaži



Mikrokapsuliranje - novi patenti in znanstveni članki

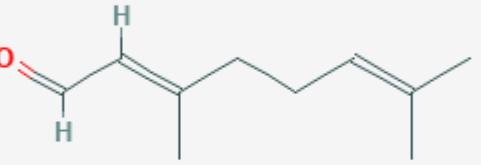


Zakaj mikrokapsuliranje ?

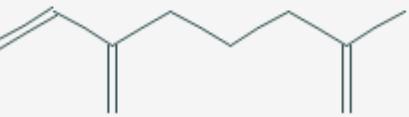




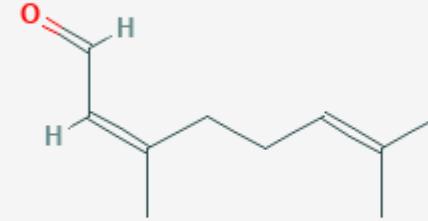
Eterično olje *Cymbopogon citratus* (EOC) (limonska trava, lemon grass, citronella)



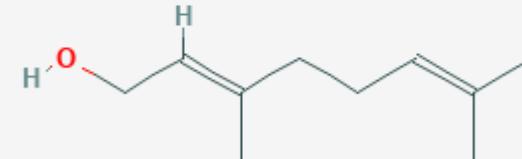
citral (geranal)
39 – 48 %



mircen
11 – 15 %



neral
32 – 35 %



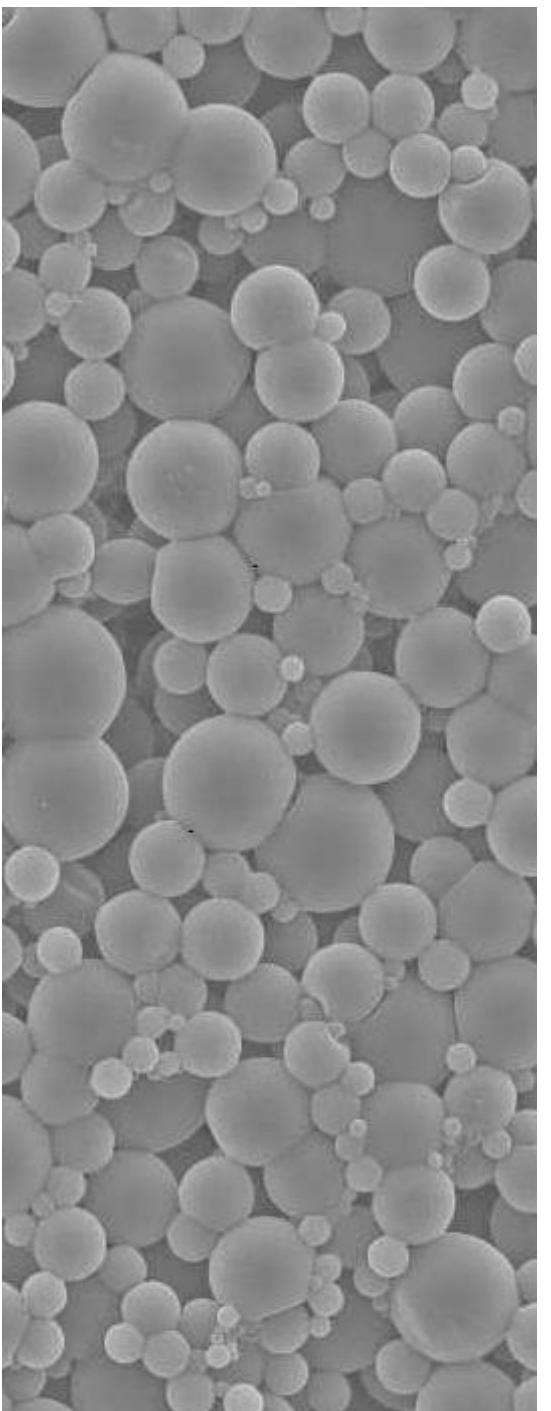
geraniol
3 – 5 %



Objavljene študije o EOC



- Uporaba v prehrani, farmaciji, kozmetiki; repellent, blago FFS (LD_{50} oralno za podgano 7200 mg/kg)
- Protimikrobnno učinkovanje na bakterije, kvasovke v hrani, plesni na žitih
- Sinergistično delovanje EOC v kombinaciji z antibiotiki (kloramfenikol, tetraciklin, eritromicin) na patogene gram-negativne bakterije
EOC izboljša ali obnovi bakterijsko občutljivost za antibiotike - blokira bakterijske izlivne črpalke, vpletene v odpornost na antibiotike
- Antioksidativno delovanje, odstranjevanje prostih radikalov, citoprotективни učinki



Zakaj mikrokapsuliranje EOC ?

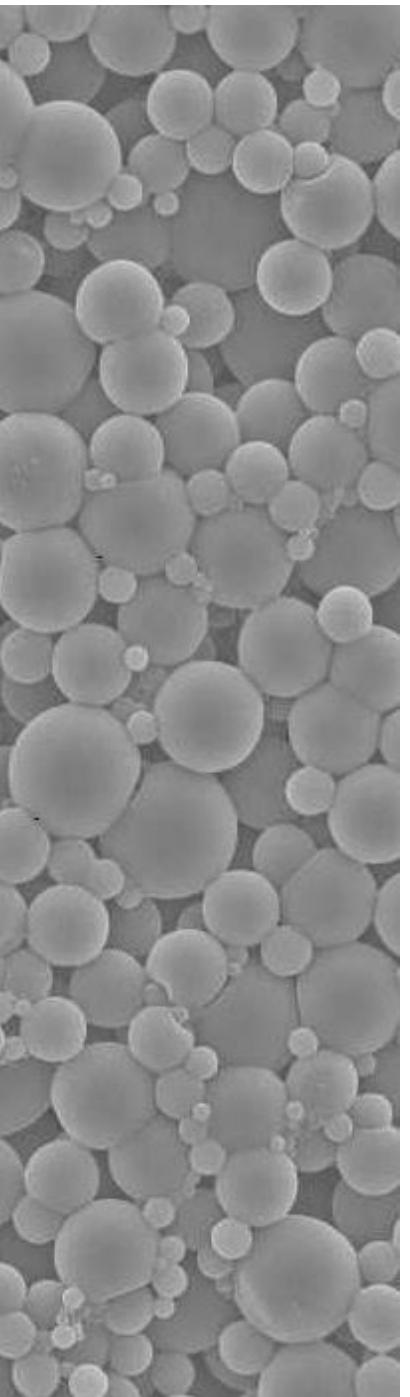


- eterična olja so hlapna (kratkotrajno učinkovanje)
- tekoča, hidrofobna (manj primerna za vključevanje v izdelke iz papirja in kartona)
- oblike za zaščito in podaljšano/kontrolirano sproščanje: mikrokapsule in mikrosfere, nanokapsule in nanosfere, liposomi, emulzije, geli ali molekulsко vključevanje

EKSPERIMENTALNI DEL

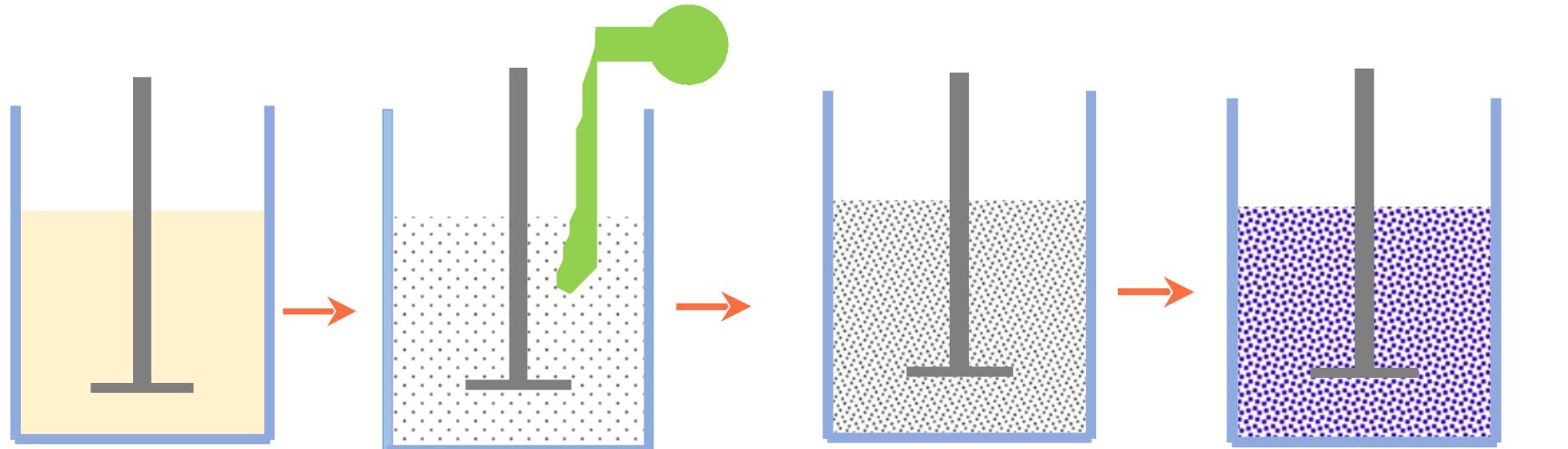
Postopki izdelave mikrokapsul

1. *in situ* polimerizacija melamin-formaldehidnih predkondenzatov, modifikator poliakrilna kislina
2. emulzijska polimerizacija aminoaldehydnih smol
3. emulzifikacija in izparevanje topila, etilcelulozna ovojnica
4. kompleksna koacervacija, ovojnica želatina-karboksimetilceluloza ter želatina -gumi arabika
5. preprosta koacervacija, ovojnica hitozan



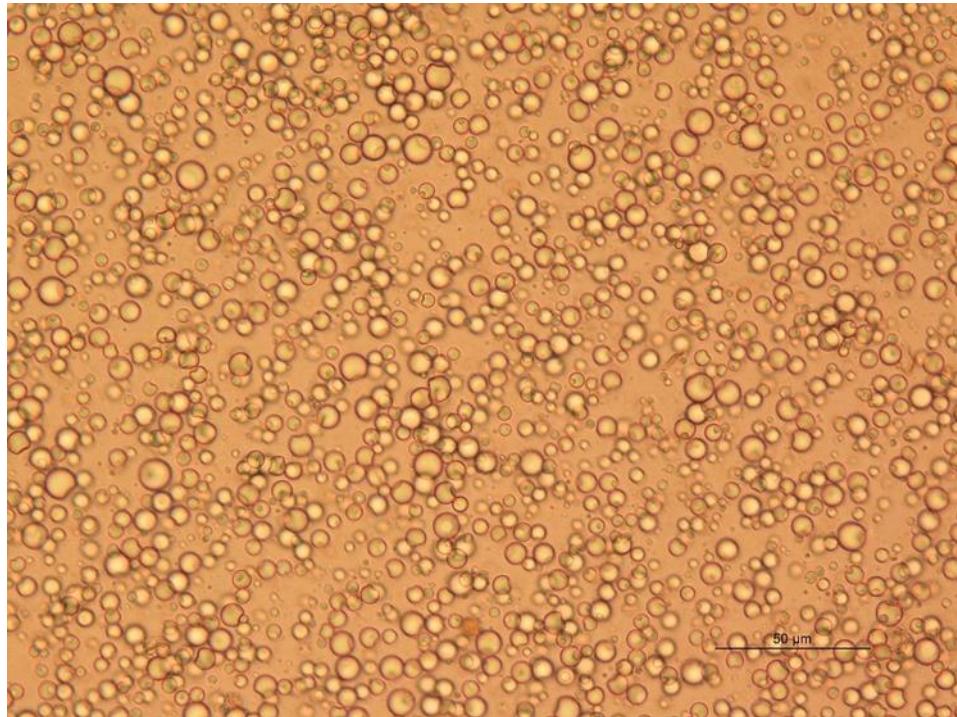
Mikrokapsuliranje po postopku *in situ* polimerizacije

- polikondenzacija monomerov ali predkondenzatov na površini emulgiranih joder v emulziji O/V
- modifikator emulgira in usmerja reakcijo polimerizacije, da poteka le na površini kapljic

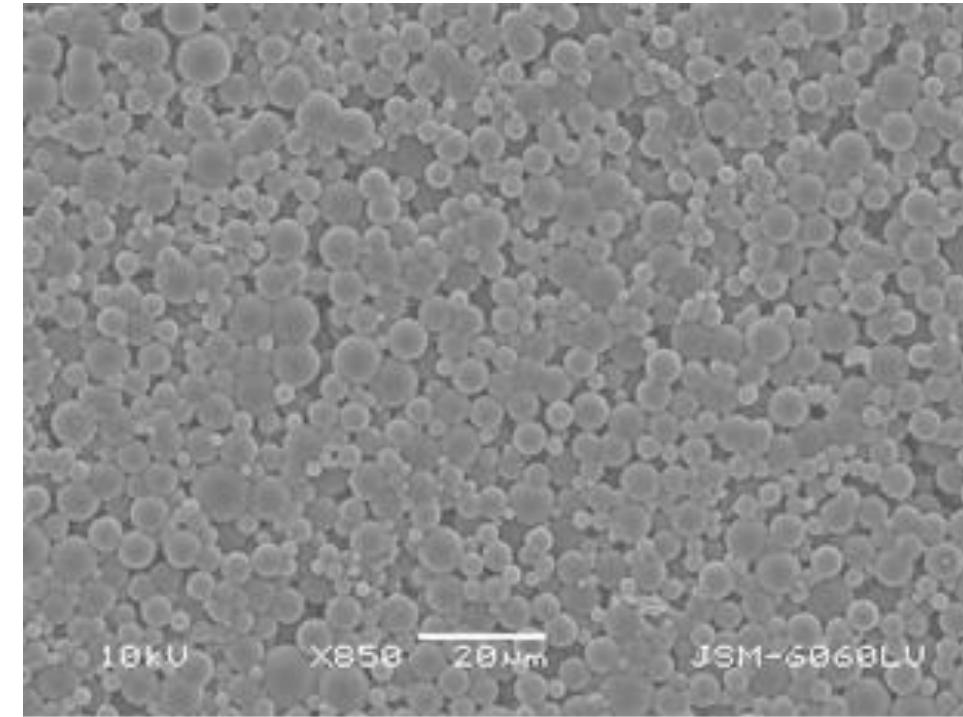


Mikrokapsule EOC po postopku *in situ* polimerizacije z aminoalheididno ovojnico

- pravilne kroglaste oblike, majhne (1 do 9 μm)
- ovojnice trdne in neelastične, v kontaktu ohranjajo obliko



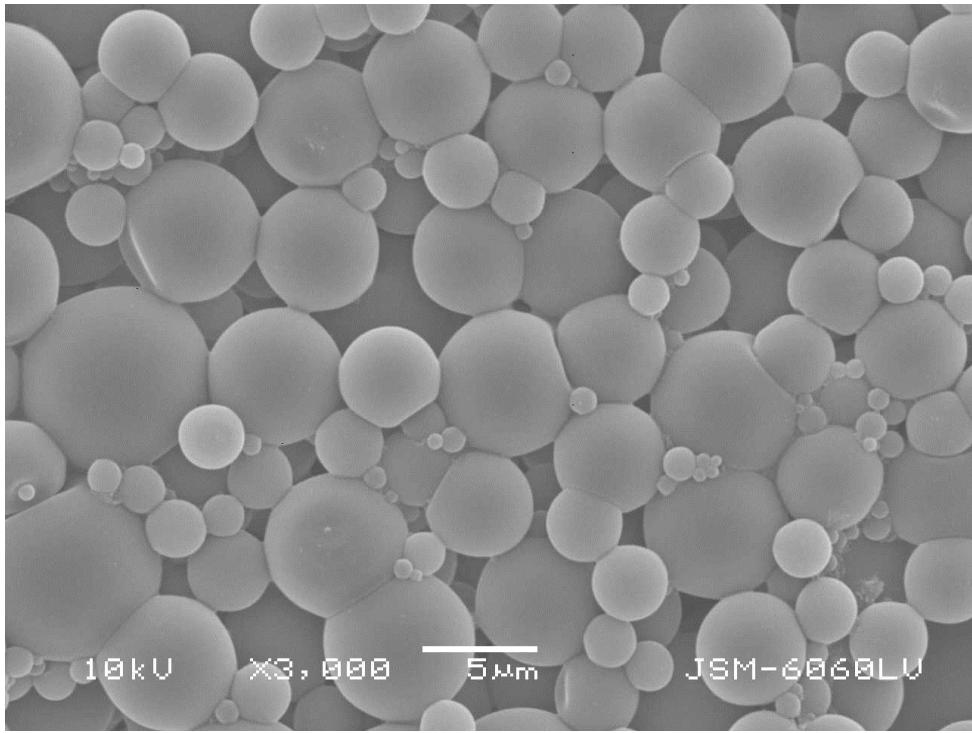
vodna suspenzija *in situ* mikrokapsul, 400x



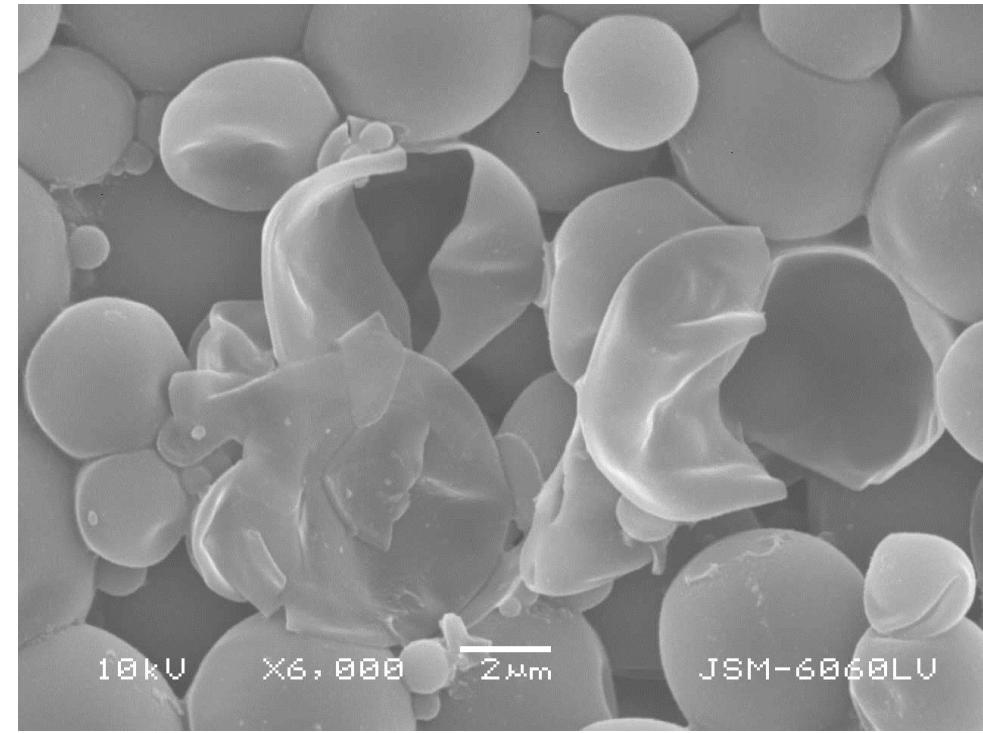
in situ mikrokapsule, SEM 850x

Mikrokapsule EOC po postopku *in situ* polimerizacije z aminoalheidno ovojnico

- sproščanje vsebine: aktivacija z mehanskim pritiskom

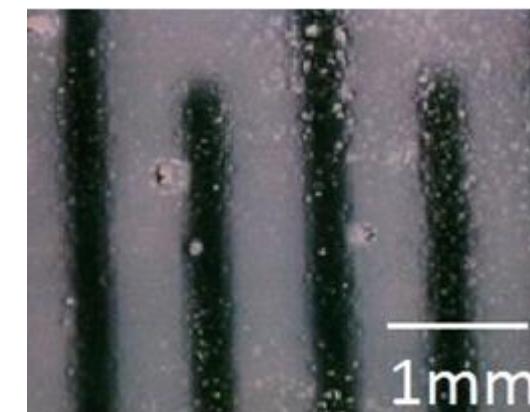
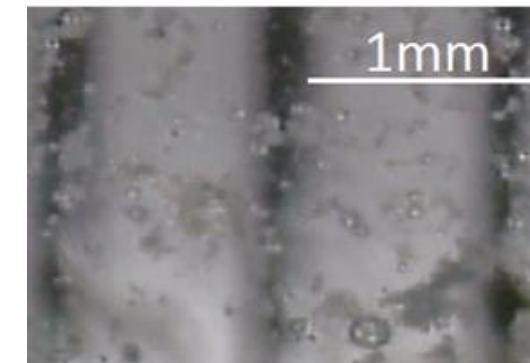


neaktivirane *in situ* mikrokapsule, 3000x



in situ mikrokapsule z odprto ovojnicico, SEM 6000x

Mikrokapsuliranje z emulzijsko polimerizacijo aminoaldehydnih smol (Melapret PTS 70)

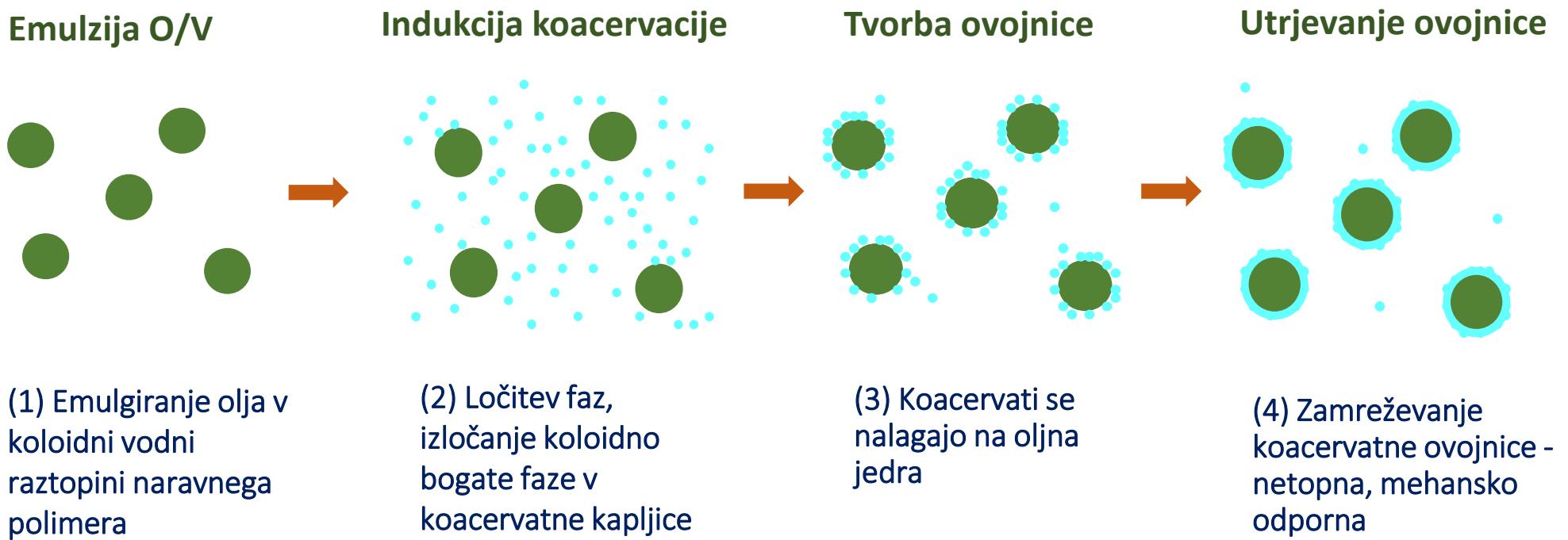


EOC

tanin

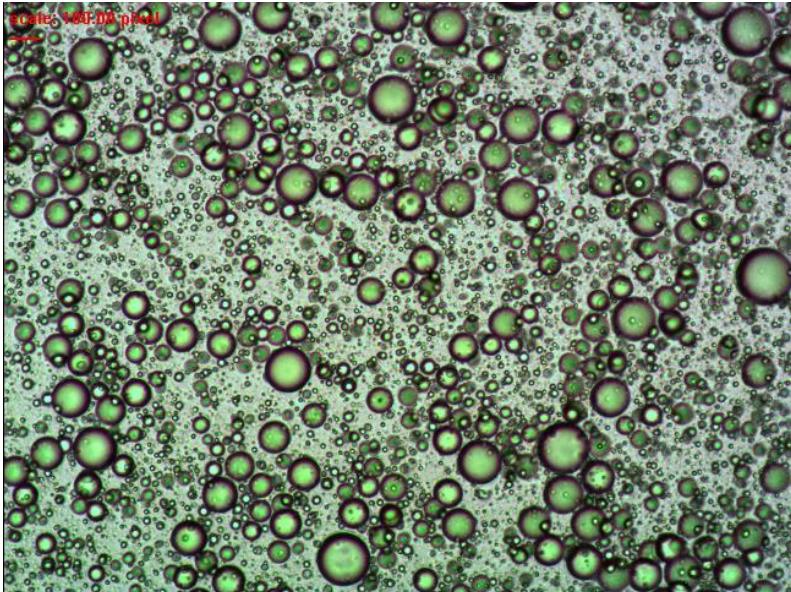
Mikrokapsuliranje po postopku koacervacije

delna desolvacija makromolekularnega koloida v emulziji O/V - izloči se koloidno bogata faza – ovojnica

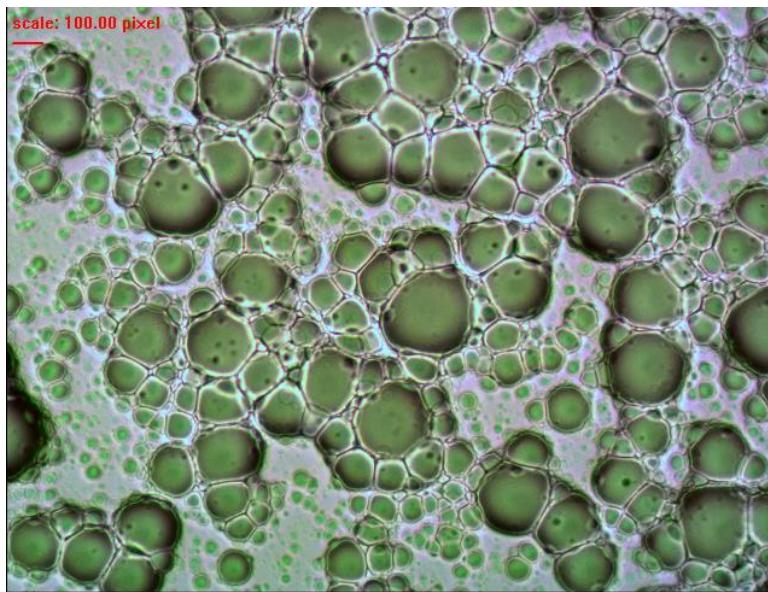


Mikrokapsule po postopku kompleksne koacervacije, ovojnica želatina-karboksimetilceluloza

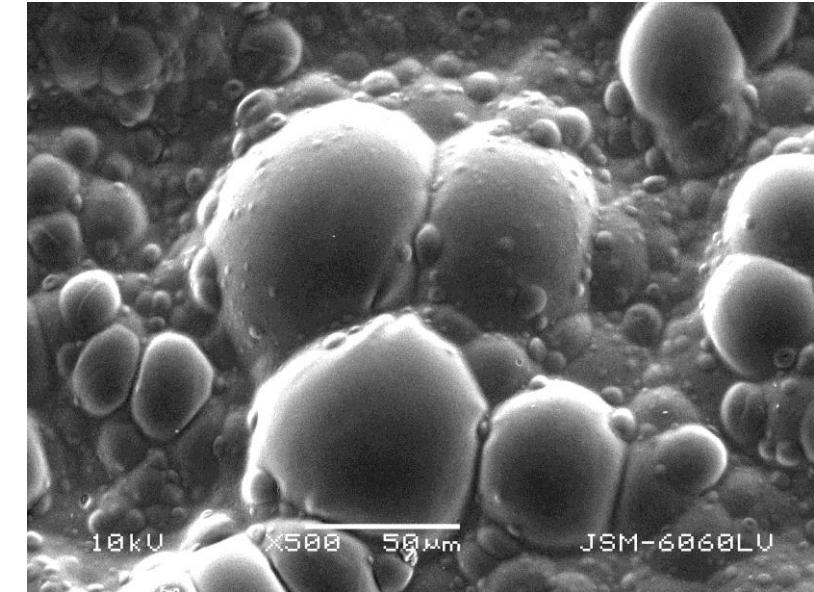
- velikost 10 do 90 µm
- ovojnice iz naravnega materiala, prozorne in elastične; ob stiku in sušenju se kroglaste oblike prilagodijo



Vodna suspenzija mikrokapsul
(svetlobni mikroskop, 100 x)



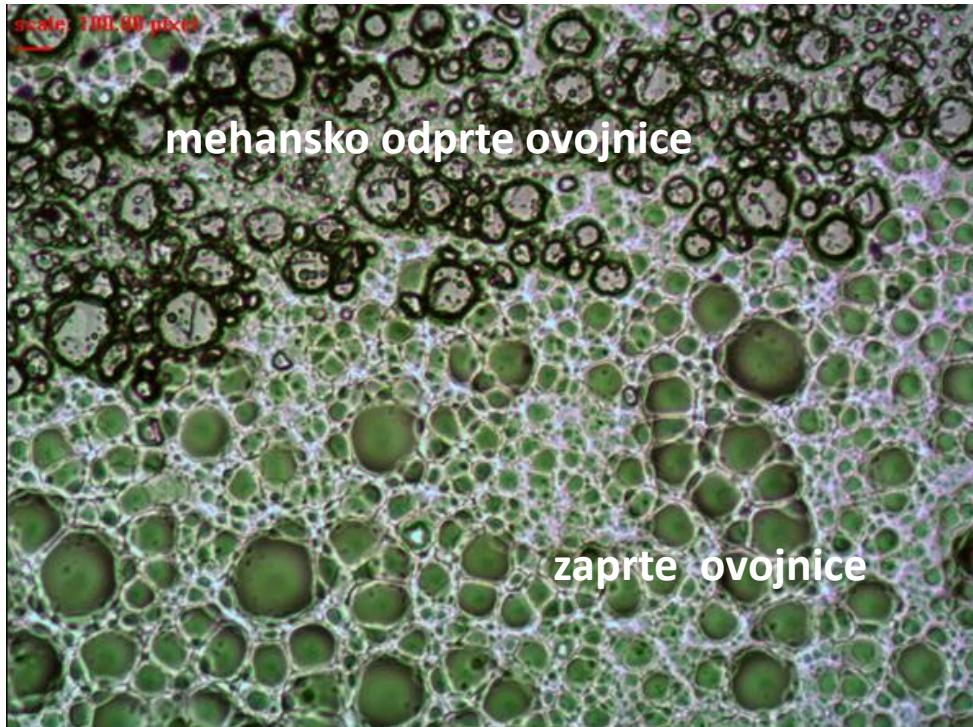
Osušene mikrokapsule na steklu
(svetlobni mikroskop, 100 x)



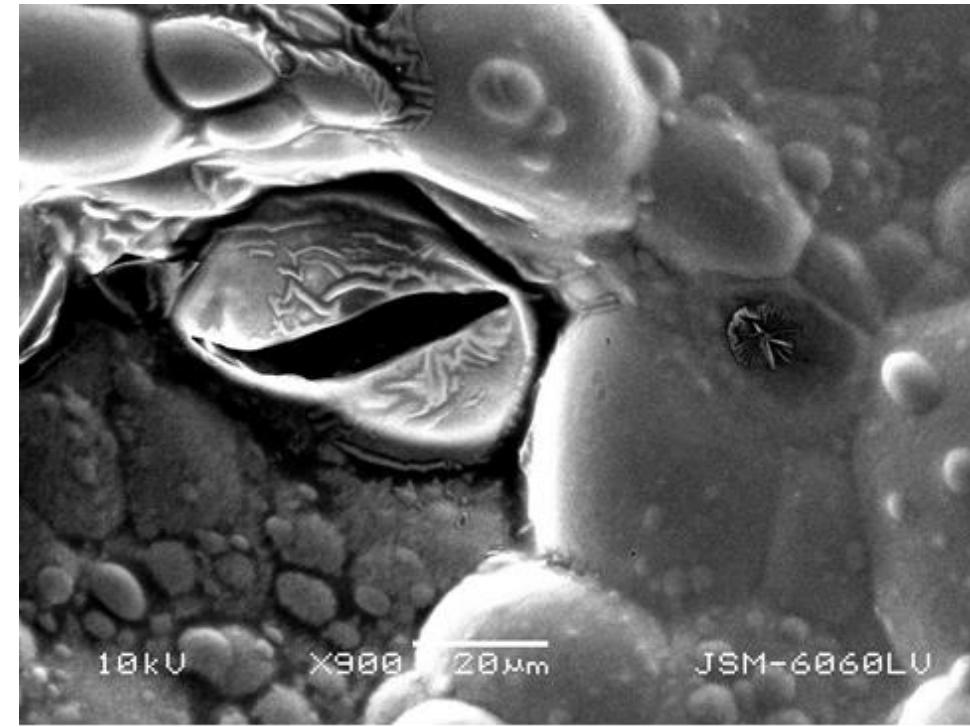
Elektronski vrstični mikroskop -
SEM, 500x

Mikrokapsule po postopku kompleksne koacervacije, ovojnica želatina-karboksimetilceluloza

- sproščanje vsebine z mehanskim pritiskom



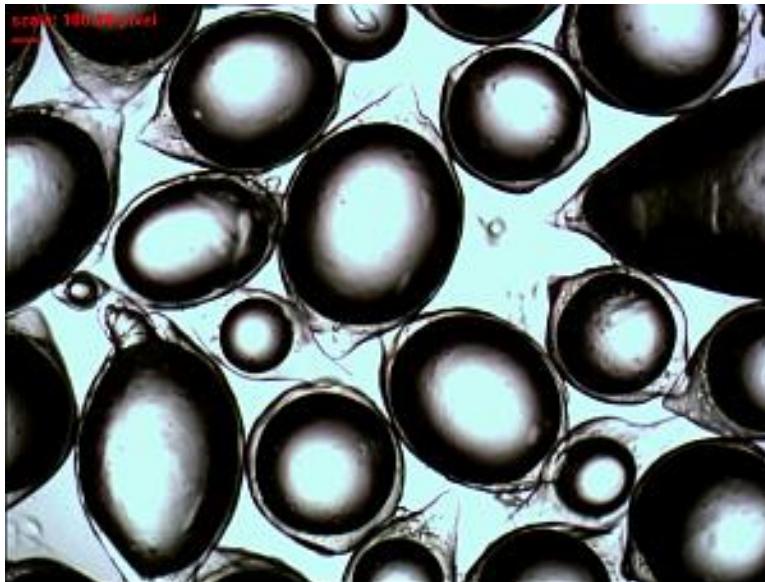
premaz mikrokapsul
brez aktivacije / po mehanski aktivaciji
(svetlobni mikroskop, 100x)



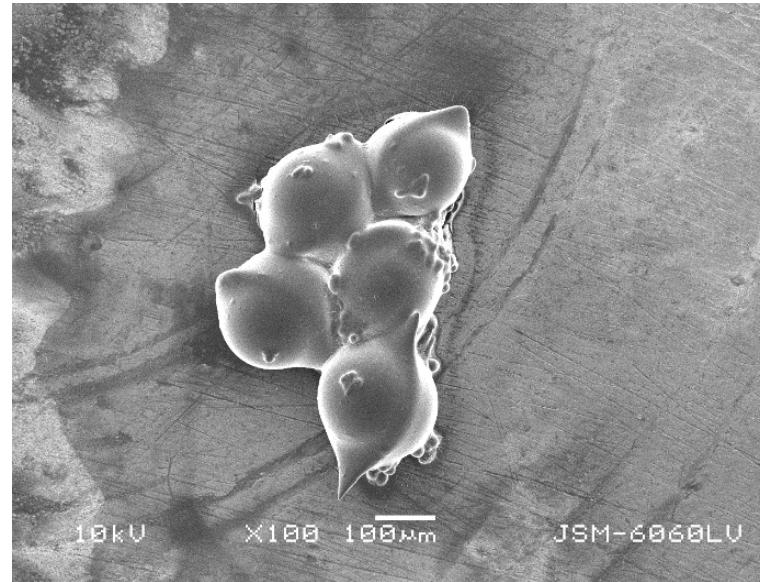
mikrokapsula z odprto ovojnico
(SEM, 900x)

Mikrokapsule po postopku kompleksne koacervacije (brez emulgatorja), ovojnica želatina-gumi arabika

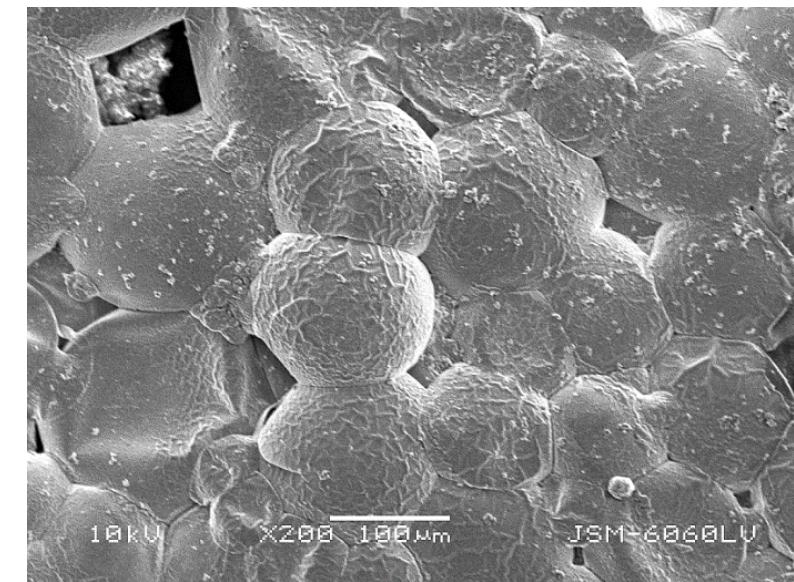
- velikost 50 do 150 µm
- ovojnice iz naravnega materiala, prozorne in elastične; ob stiku in sušenju se kroglaste oblike prilagodijo
- nižja viskoznost suspenzije



V vodni suspenziji
(svetlobni mikroskop 100x)



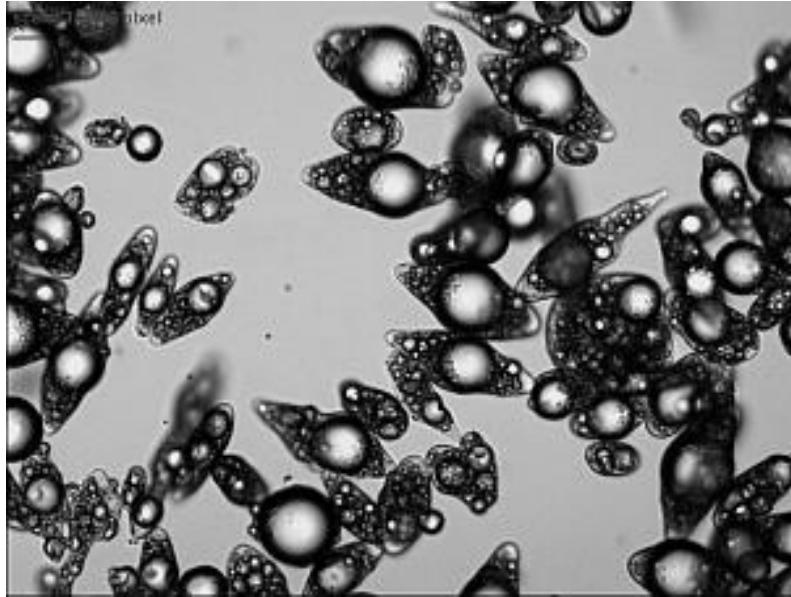
utrjene z glutaraldehidom
SEM, 100x



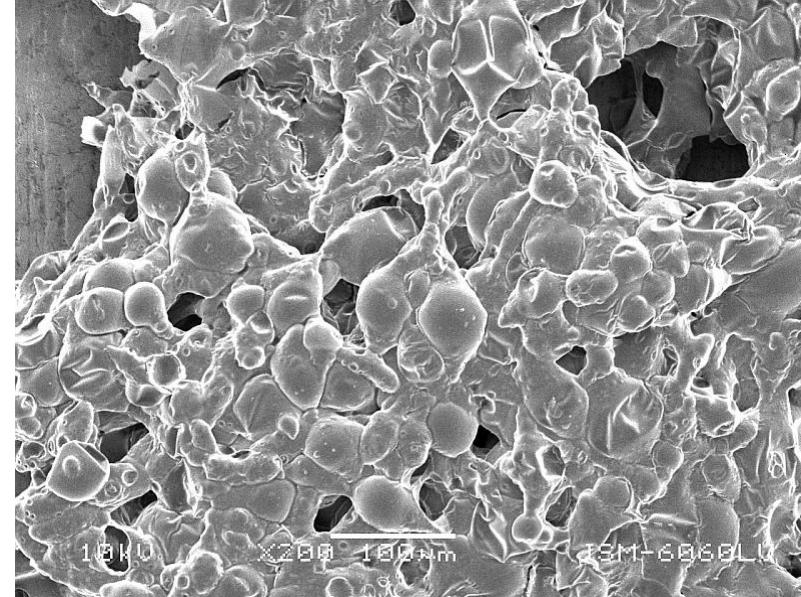
utrjene s taninom,
SEM 200x

Mikrokapsule po postopku kompleksne koacervacije (emulgator SDS), ovojnica želatina-gumi arabika

- manjša velikost 20 do 80 μm

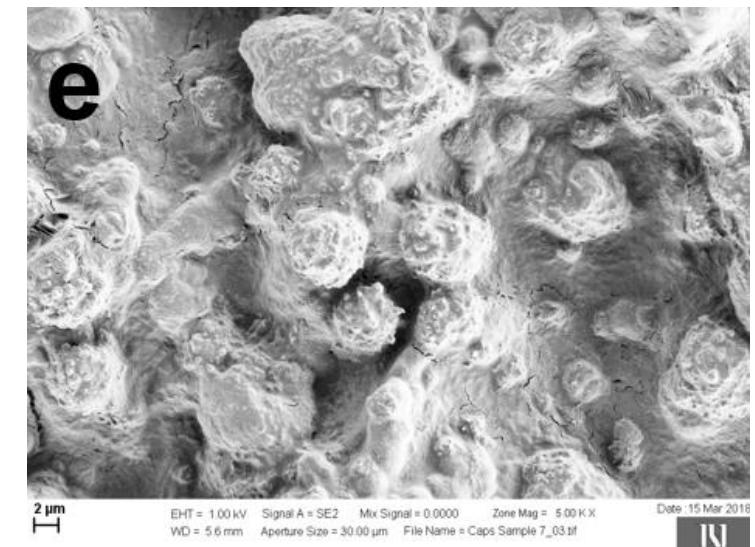
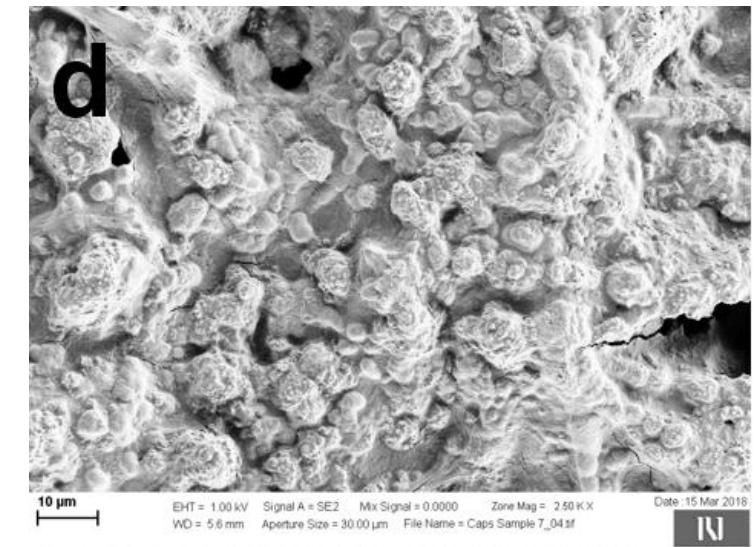
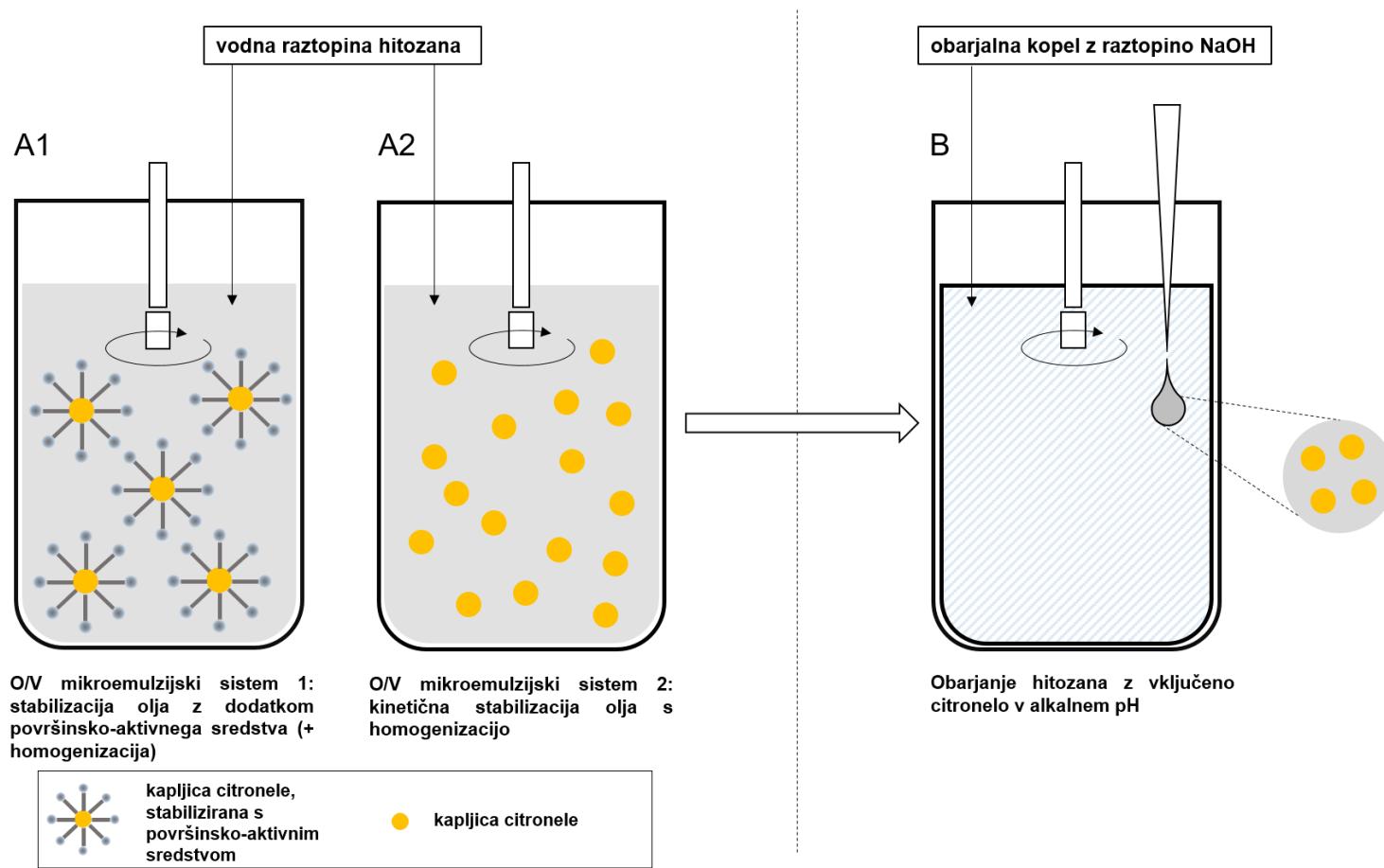


V vodni suspenziji
(svetlobni mikroskop 100x)



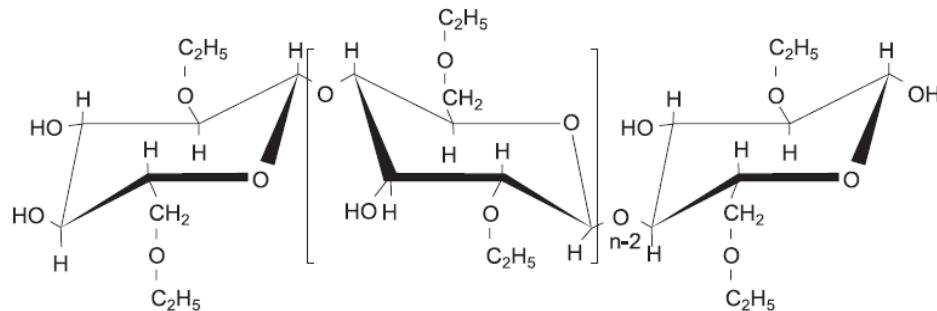
Suhe
(SEM 200x)

Mikrokapsule po postopku preproste koacervacije, ovojnica hitozan (emulgator SDS)

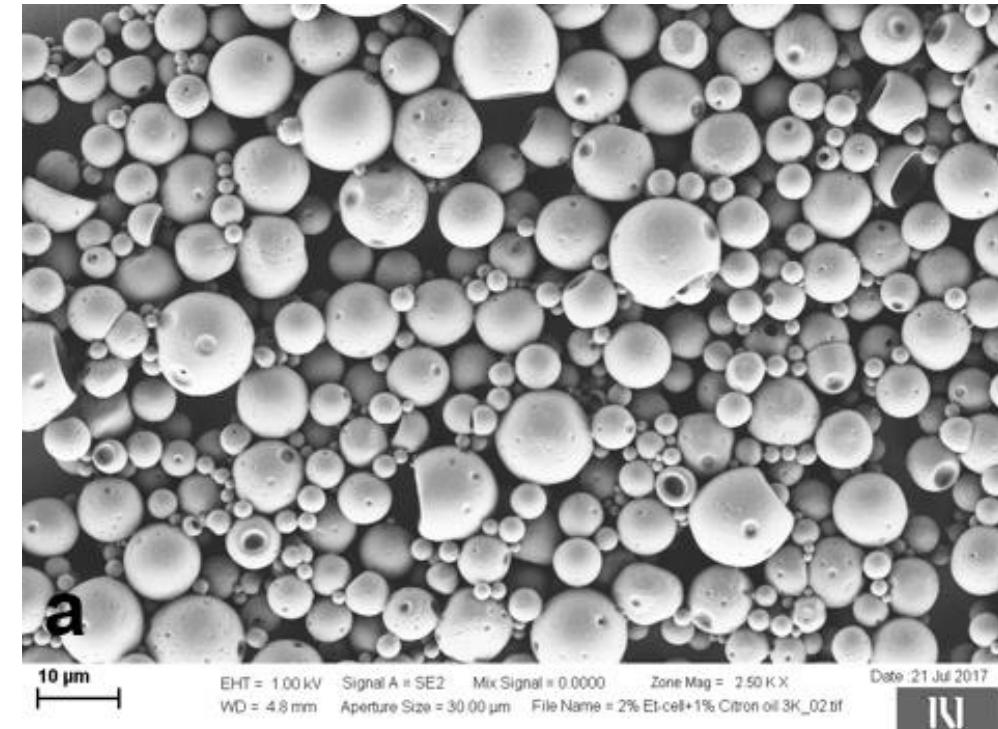


Mikrokapsuliranje po postopku emulzifikacije in odparevanja topila, ovojnica etilceluloza

- etilacetat - hlapno topilo, ki se ne meša z vodo
- emulzija raztopine etilceluloze v vodi - O/W, ($c = 2 \text{ ut.\%}$ in 4 ut.\%)
- površinsko aktivna sredstva: natrijev dodecil sulfat in Pluronic F-127 + dodajanje etanola
- različni pogoji emulgiranja (3.000 – 10.000 obr/min)



Etilceluloza: netopna v vodi, stabilna na svetlobi in vročini, netoksična, biokompatibilna, mehansko primerna

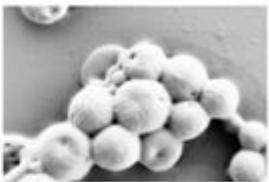
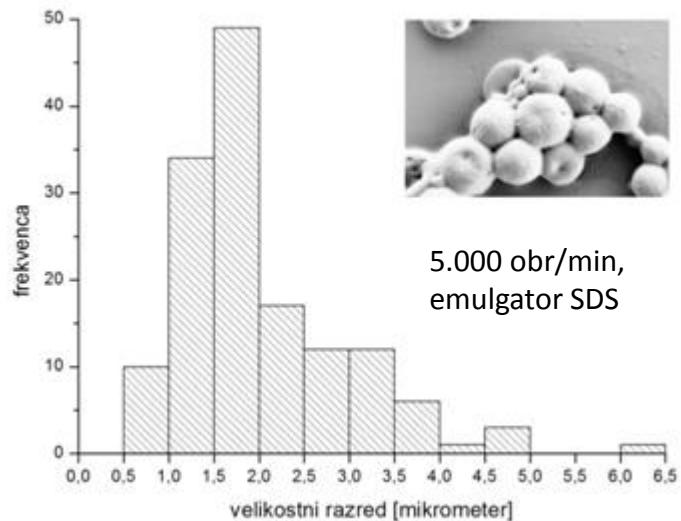


etilcelulozne mikrokapsule (SEM)

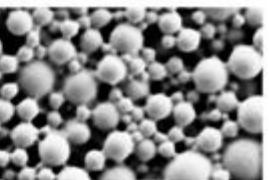
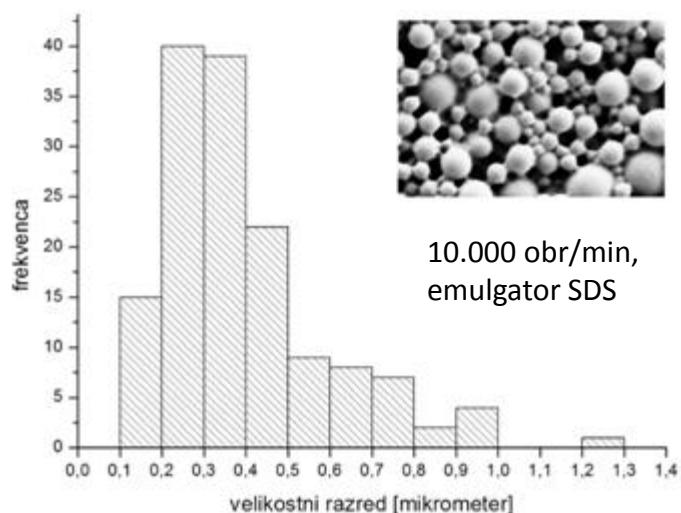
Vpliv pogojev emulgiranja na velikost etilceluloznih mikrokapsul

Velikost:

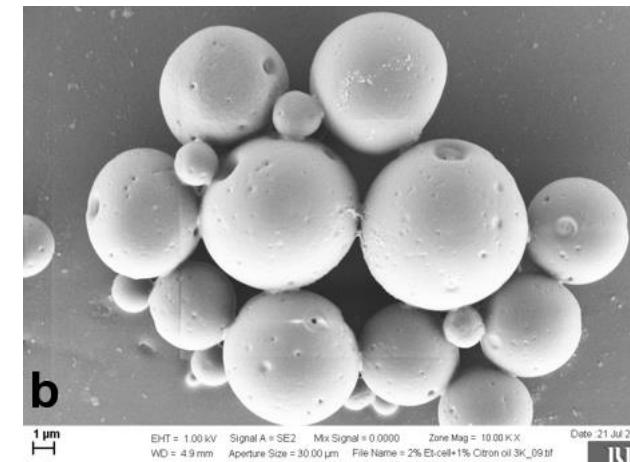
- 5 µm do 0,2 µm



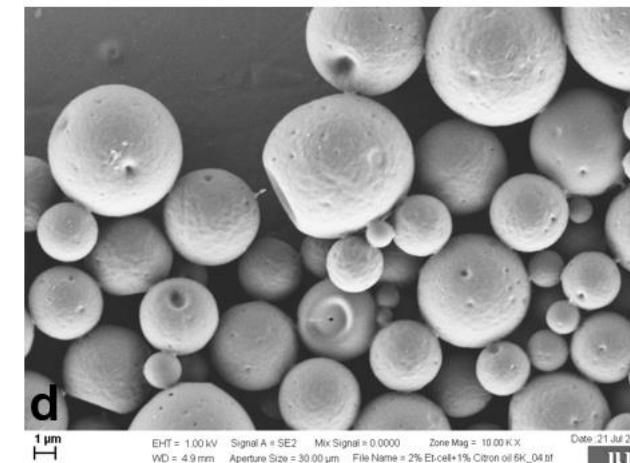
5.000 obr/min,
emulgator SDS



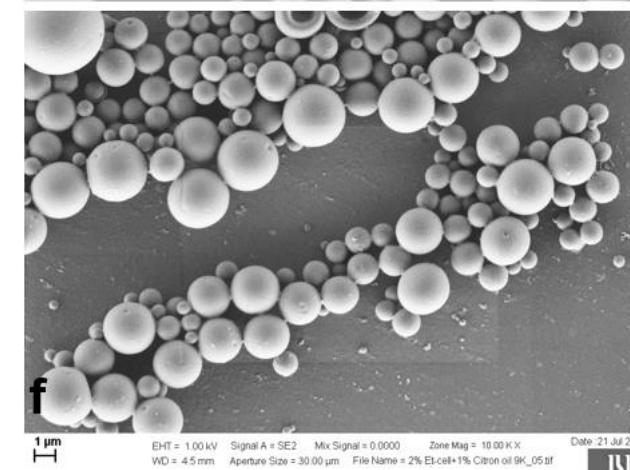
10.000 obr/min,
emulgator SDS



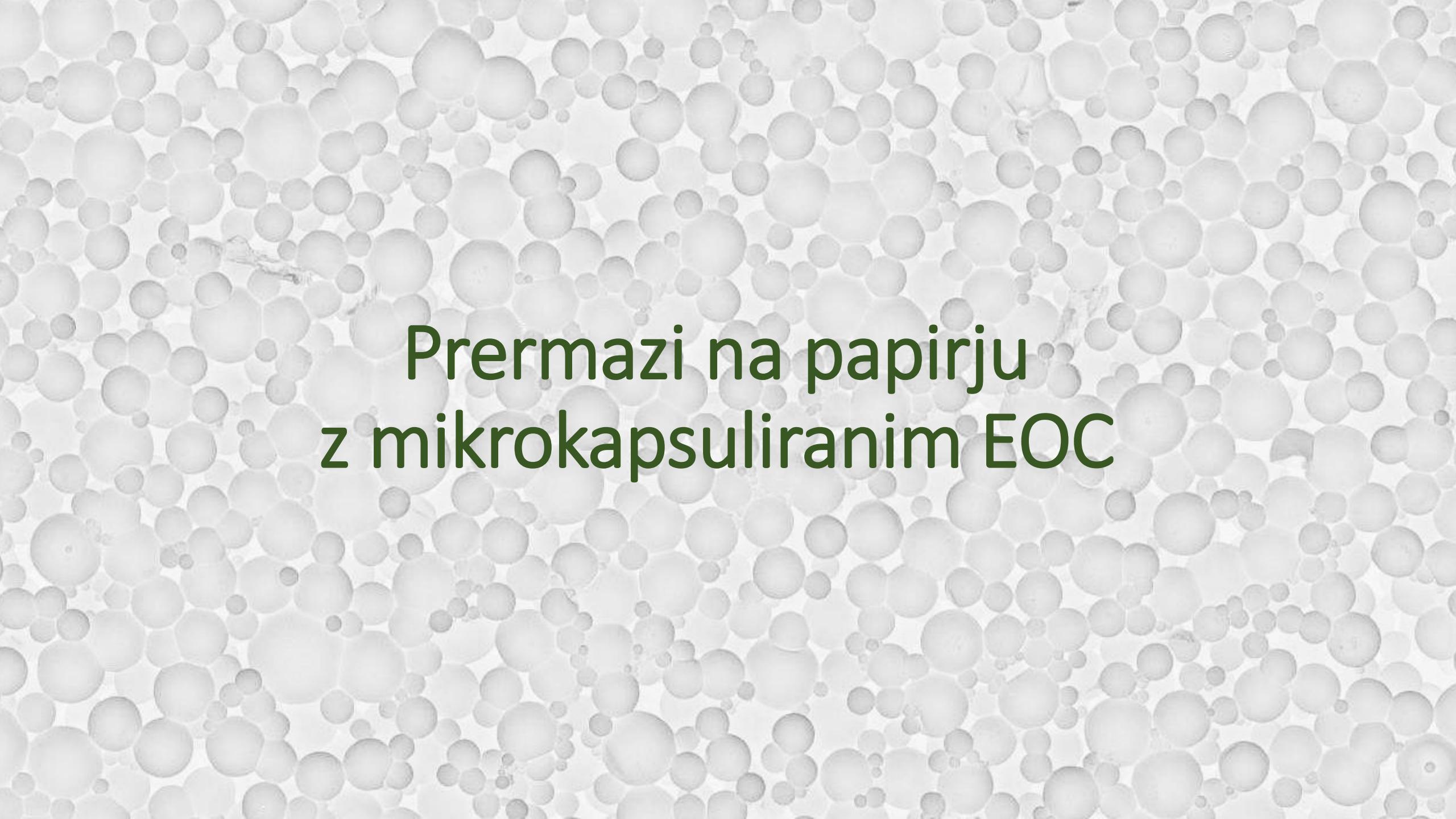
3.000 obr/min,
emulgator SDS



6.000 obr/min,
emulgator SDS



9.000 obr/min,
emulgator SDS

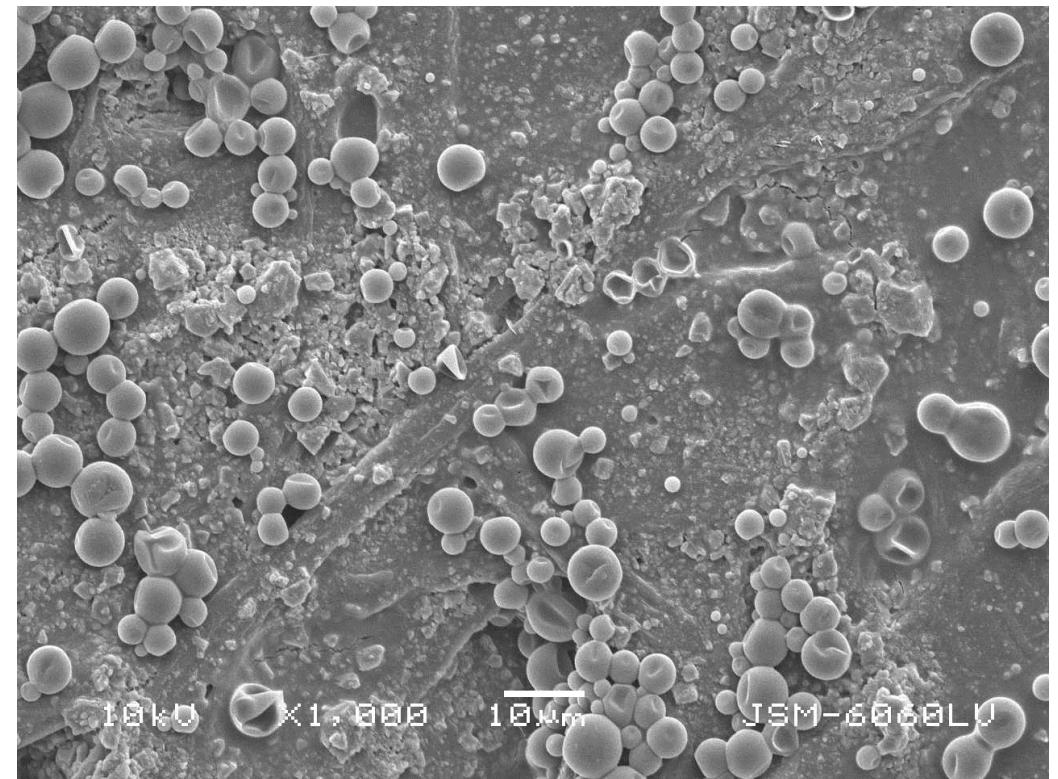


Prermazi na papirju
z mikrokapsuliranim EOC

Premazi na papirju

Primer 1: nanos 2 g (suhe formulacije) /m²

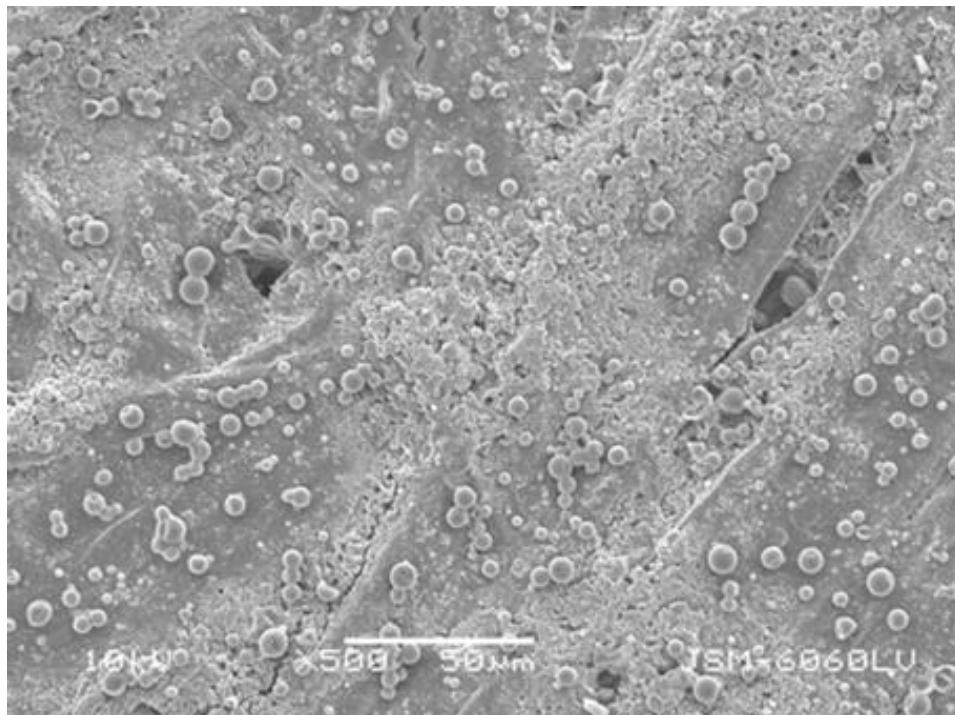
- mikrokapsule EOC po postopku *in situ* polimerizacije
- etiketni papir (70 g/m²) in papir za gibko embalažo (50 g/m²)
- premazovanje na laboratorijskem premazovalniku s palico (raklom)
- formulacije mikrokapsul in škroba ali mikrokapsul in CMC v razmerju 1 : 1 in 1 : 2 (suho na suho)
- koncentracija formulacije za nanos 2 g (suhe formulacije) /m²



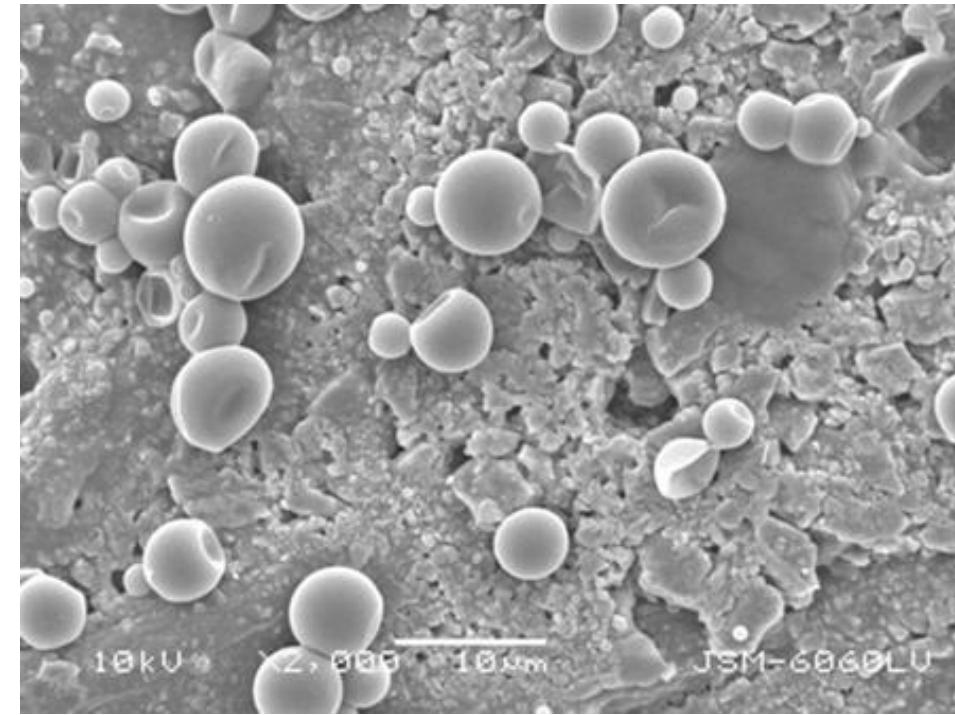
Mikrokapsule EOC na papirju,
SEM 1000x

Premazi na papirju

Premaz papirju: *in situ* mikrokapsule EOC, vezivo vodotopni škrob, 2g/m²



SEM, 500 x

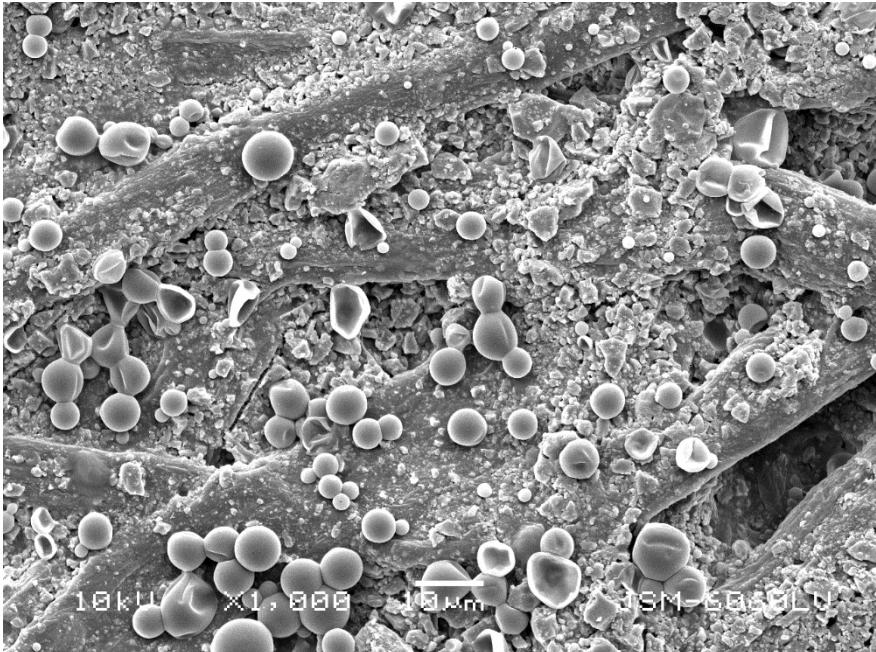


SEM, 2000 x

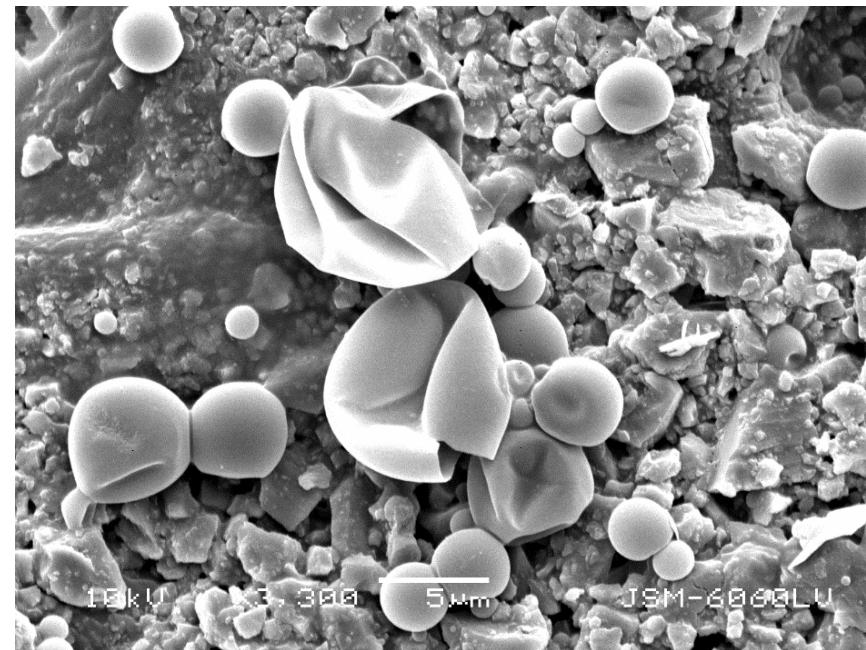
Premazi na papirju

Mehanska aktivacija mikrokapsul

Aktivacija *in situ* mikrokapsul EOC, postopek s 5 kg utežjo (2 potega)



Po aktivaciji, SEM 1000x

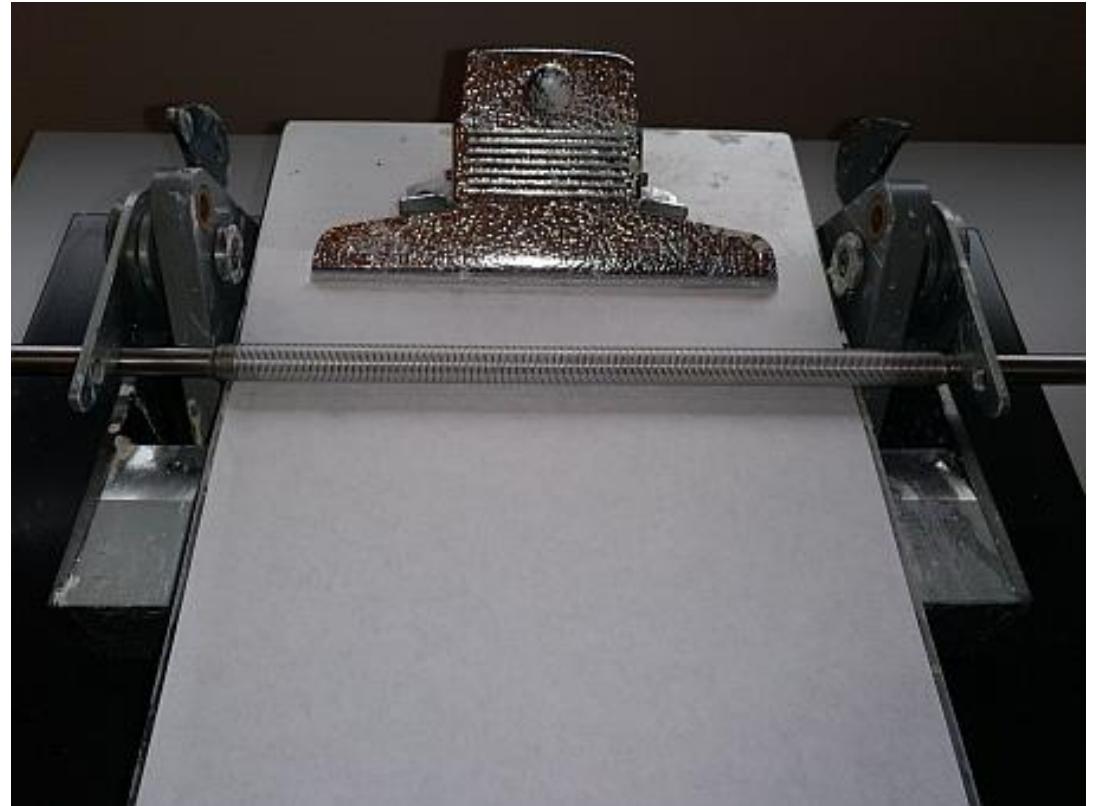


Po aktivaciji, SEM 3300 x

Premazi na papirju

Poskus 2: nanos 30 g (suhe formulacije) /m²

- mikrokapsule EOC po postopku *in situ* polimerizacije
- papir 52 g/m²
- premazovanje na laboratorijskem premazovalniku s palico št. 8, hitrost 4
- suspenzija *in situ* mikrokapsul brez dodatkov
- sušenje v sušilniku na 110°C, 2 minuti
- dosegli nanos 30,20 g (suhe formulacije) /m²



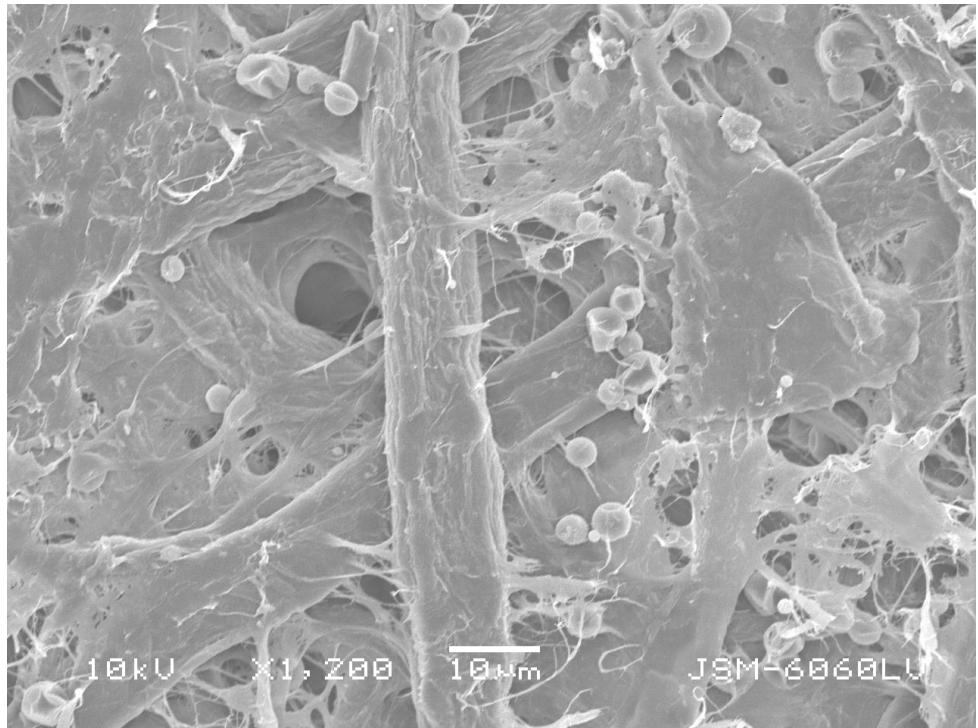
Vgrajevanje mikrokapsul v papirno maso

Vgrajevanje mikrokapsul v papirno maso

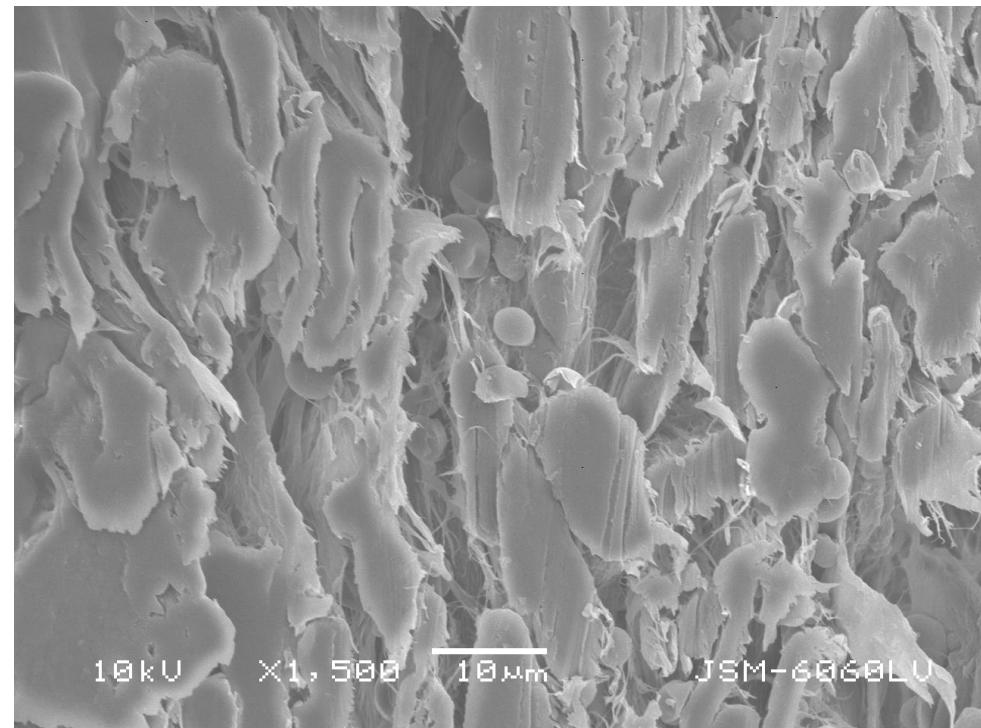
- laboratorijski oblikovalnik listov
- dodatek 5% in 10% *in situ* mikrokapsul EOC glede na papirno maso (suho)
- dodatek 0,3% kationskega retencijskega sredstva (zeta potencial *in situ* mikrokapsul -54,1mV)
- vmešano v vlakninsko suspenzijo
- sušenje in kondicioniranje 24h pri standardnih pogojih
- zadrževanje mikrokapsul EOC v papirni masi 39% do 50% (5% in 10% dodatek)



Vgrajevanje mikrokapsul v papirno maso



Mikrokapsule EOC v papirni masi – površina
papirja (SEM 1200x)



Mikrokapsule EOC v papirni masi – prerez
papirja (SEM 1500x)

Vrednotenje protimikrobne učinkovitosti

Določanje učinka nekapsuliranega EOC na mikroorganizme



Escherichia coli



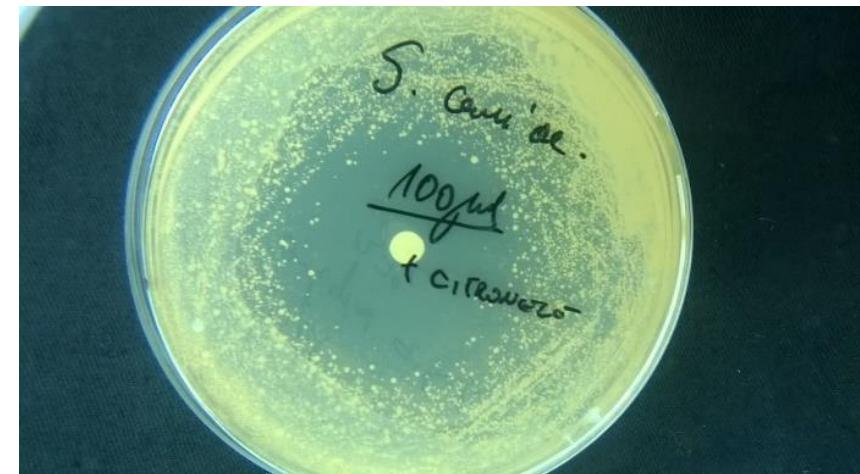
Pseudomonas aeruginosa



Bacillus subtilis

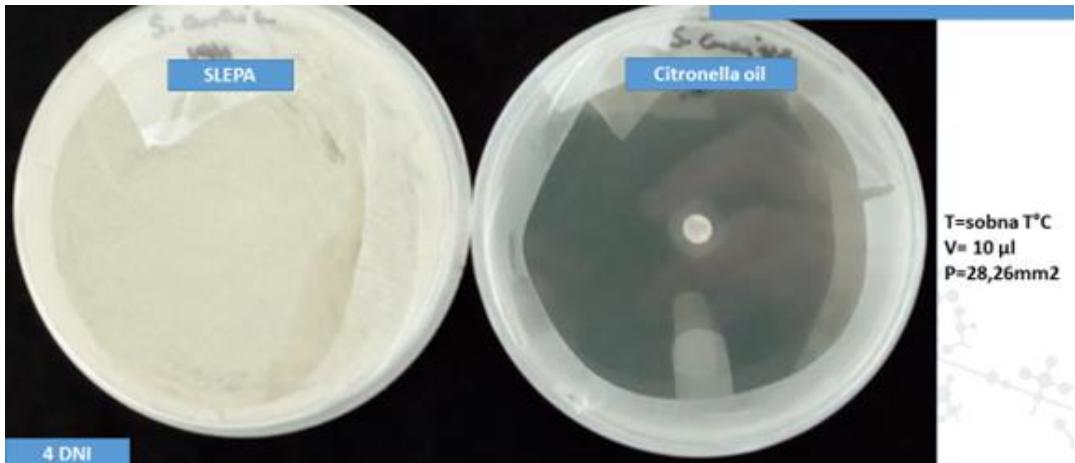


Saccharomyces cerevisiae

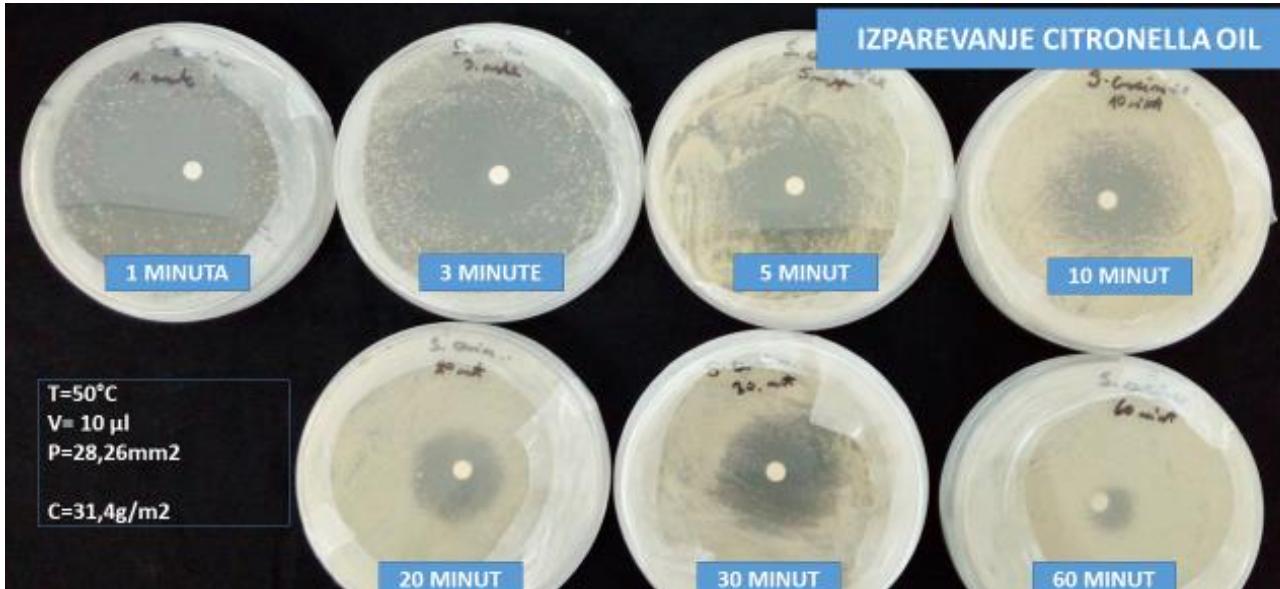


Primer določitve učinka EOC za *S. cerevisiae* na
papirju v petrijevkah z agarjem

Protimikrobní učinek nekapsuliranega EOC v odvisnosti od časa izhlapevanja ($T=50^{\circ}\text{C}$) – test na agarju v petrijevkah



- EOC je protimikrobní učinkovito

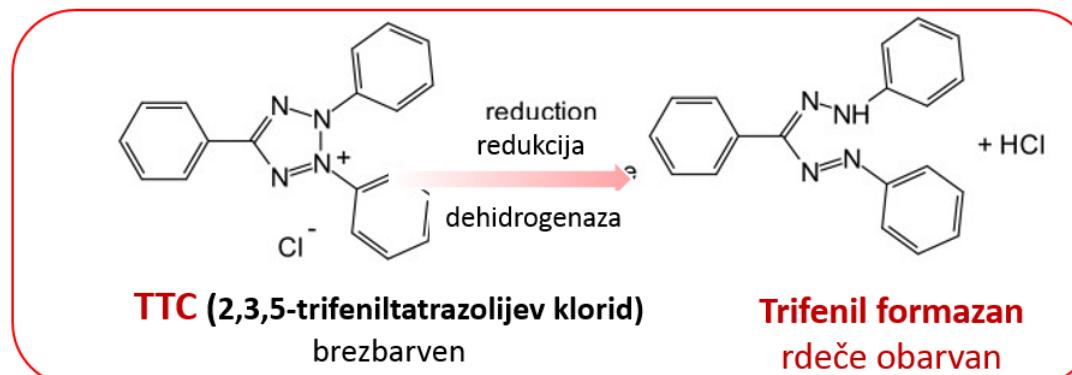


- Nekapsulirano EOC izgubi učinkovitost zaradi izhlapevanja
- EOC je potrebno mikrokapsulirati v neprepustne ovojnice
- Med postopkom mikrokapsuliranja EOC zaščititi pred izhlapevanjem (kratko emulgiranje, hitra tvorba ovojnice)

Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) v tekočem gojišču



- **Testni mikroorganizmi:** *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* in *S. cerevisiae*
- **Vzorci:** suspenzije mikrokapsul EOC (neaktivirane)
- **Metoda:** razredčevanje 6 epruvet (1:5, 5 konc. + kotrola), inkubacija pri 37°C v temi, rezultat odčitan po 24h
- **Indikator** respiracije celic TTC



Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC): interval med najnižjo koncentracijo brez obarvanja in prvo koncentracijo z obarvanjem

MIC suspenzij neaktiviranih mikrokapsul z EOC

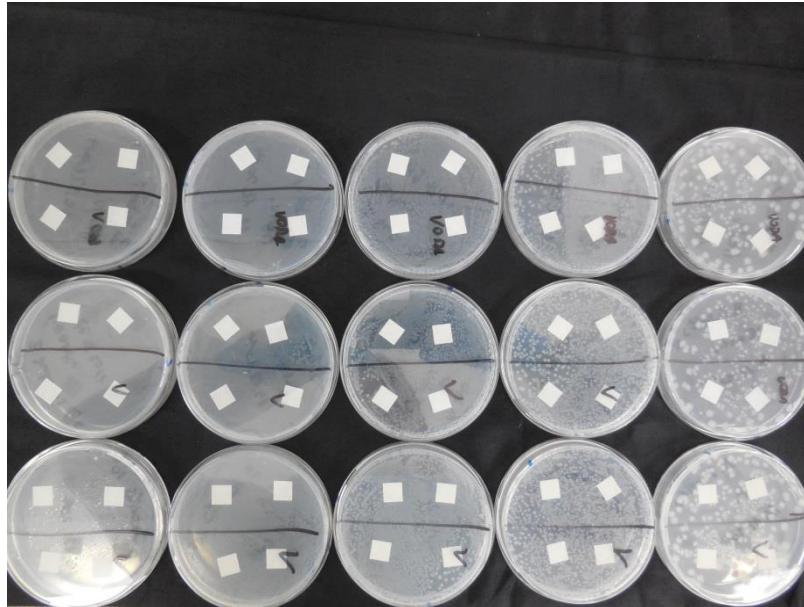


| Mikroorganizem | KK mikrokapsule z EOC (kompleksna koacervacija) | ISP mikrokapsule z EOC (<i>in situ</i> polimerizacija) |
|----------------------|--|--|
| <i>B. subtilis</i> | 0,07%< MIC >0,014% | 1,72 %< MIC >0,34% |
| <i>E. coli</i> | 0,07 %< MIC >0,014% | MIC >1,72% |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0,07%< MIC >0,014% | MIC >1,72% |
| <i>S. cerevisiae</i> | 1,72%< MIC >0,34% | MIC >1,72% |

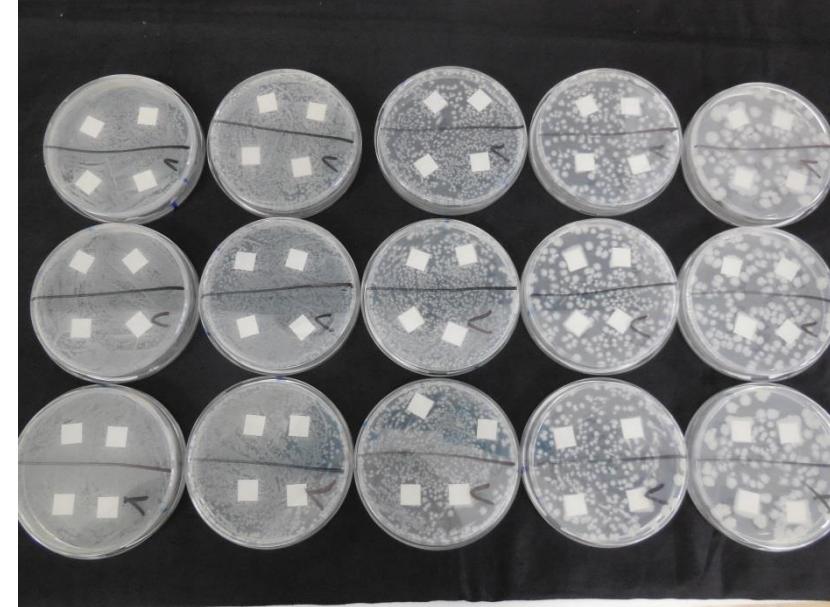
- Suspenzija neaktiviranih G-CMC koacervacijskih mikrokapsul EOC znatno višji učinek protimikrobnosti – delno permeabilne ovojnice
- *In situ* mikrokapsule EOC - ovojnica neprepustne, ni preostankov prostega EOC v suspenziji

Vrednotenje učinkovitosti premazov na papirju - nanos 2 g/m²

- določanje aerobnih mezofilnih bakterij
- nepremazane papirne matrice in papirji premazani s formulacijami *in situ* mikrokapsul EOC, 2 g/m²
- pred in po aktivaciji, lističi 1 x 1 cm na agarju



B. subtilis

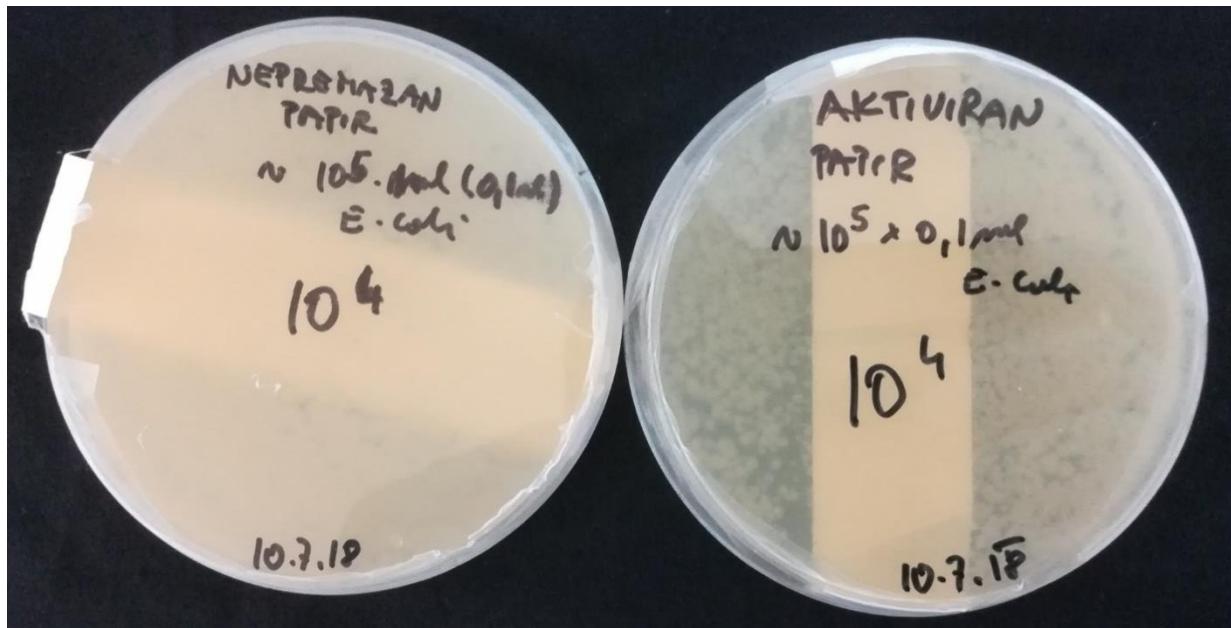


E. coli

- rezultat podan kot število mikroorganizmov, ki so sposobni tvoriti kolonije CFU / g
- **ni bilo signifikantnih razlik: 2 g/m² je premajhen nanos aktivne učinkovine**

Vrednotenje učinkovitosti premazov na papirju - nanos 30 g/m^2

- vzorci premazanega papirja (nanos 30 g/m^2) na pokrovčku zaprte petrijevke
- *E. coli* in *S. cerevisiae*
- aktivacija papirja – poteg s sterilno palčko, petrijevka takoj zaprta



Nepremazan (levo) in premazan aktiviran papir (desno)
E. coli, $c = 10^4 \text{ CFU}$ (24h inkubacija)

Pri **nanosu 30 g/m^2** je opazna razlika med nepremazanim papirjem (levo) in z mikrokapsuliranim EOC premazanim aktiviranim vzorcem papirja (desno).

V nadaljevanju:

- Izpopolnitev metode testiranja
- Kombinacija EOC z drugimi učinkovinami

Testiranje protimikrobne učinkovitosti dodatnih učinkovin – določanje MIC

Minimalna inhibitorna koncentracija - ppm

| | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Taninska kislina | 500< C >250 | 500< C >250 | 250< C >125 | 500< C >250 |
| Kostanjev tanin | 500< C >250 | 500< C >250 | 500< C >250 | 125< C >62,5 |
| Srebrova raztopina | C > 500 | 250< C >125 | 500< C >250 | C > 500 |
| Borov ekstrakt | C > 500 | C > 500 | C > 500 | C > 500 |

Zaključki

Zaključki

1. Izdelali mikrokapsule EOC po petih različnih postopkih
2. Razlikujejo se glede na velikost, zgradbo in lastnosti ovojnice – primerne za različne aplikacije
3. Za premazovanje na papir izbrane *in situ* mikrokapsule
4. Protimikrobna učinkovitost premaza mikrokapsul EOC na papirju 30g/m^2
5. Nadaljevanje raziskav:
 - dodajanje drugih protimikrobnih snovi za višjo (sinergistično) protimikrobno učinkovitost
 - vključevanje mikrokapsul v barierne premaze za doseganje večfunkcionalnih lastnosti.

Zahvala

Raziskava je bila izvedena v okviru razvojno-raziskovalnega programa CEL.KROG: »Izkoriščanje potenciala biomase za razvoj naprednih materialov in bio-osnovanih produktov«, sofinanciranega s strani Ministrstva za izobraževanje, znanost in šport TS in Evropskega sklada za regionalni razvoj, 2016–2020.



REPUBLIKA SLOVENIJA
**MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,
ZNANOST IN ŠPORT**



EVROPSKA UNIJA
EVROPSKI SKLAD ZA
REGIONALNI RAZVOJ
NALOŽBA V VAŠO PRIHODNOST