



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE A CHARAKTERIZACE AKTIVNÍCH LÁTEK OPUNCIE A ALOE VERA A MOŽNOSTI JEJICH APLIKACE

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF ACTIVE COMPONENTS OF PRICKLY PEAR
AND ALOE VERA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petra Kocúrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1569/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Petra Kocúrová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Izolace a charakterizace aktivních látek opuncie a aloe vera a možnosti jejich aplikace

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Příprava a charakterizace vybraných extraktů z opuncie a aloe vera
- 2) Enkapsulace připravených extraktů
- 3) Návrh potravinářského a kosmetického výrobku s obsahem vybraných aktivních látek

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Petra Kocúrová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo štúdium antioxidačných a antibakteriálnych účinkov rastlinných extraktov, konkrétne z dužín a šupiek listov a tiež z plodov rastlín *Aloe vera* a *Opuntia ficus-indica*. Boli vytvorené lipozómy s obsahom aktívnych zlúčenín a bolo skúmané ich využitie v potravinárskom a kozmetickom priemysle. Teoretická časť sa zaoberá botanickým a fytochemickým popisom rastlín a využitím rastlín vo výžive a lekárskej praxi. Ďalej bola popísaná enkapsulácia a metódy využívané k analýze enkapsulovaných látok.

V experimentálnej časti boli charakterizované pripravené extrakty z rôznych rastlinných častí pomocou etanolu ako rozpúšťadla, a to v rôznych koncentráciách (0 %, 20 %, 40 %, 80 %). Boli testované z hľadiska obsahu celkových fenolických látok, flavonoidov a tiež ich antioxidačnej aktivity. Vybrané extrakty boli enkapsulované do lipozómov, u ktorých bola stanovená enkapsulačná účinnosť, veľkosť, stabilita a dlhodobá stabilita.

Antimikrobiálna aktivita bola testovaná proti grampozitívnym baktériám *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Propionibacterium acnes* a gramnegatívnym baktériám *Serratia marcescens* a *Escherichia coli*. Testy boli vykonané aj na kvasinke *Candida glabrata*.

Na záver boli vybrané 2 etanolové extrakty rastlinných vzoriek, ktoré boli testované z hľadiska ich cytotoxicity na bunkovej línii Caco-2, a tiež bol premeraný profil vybraných fenolických látok pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

Najúčinnejším extraovadlom bol zvolený 20% roztok etanolu, ktorý obsahoval navyššiu koncentráciu celkového obsahu fenolických látok. Zároveň všetky pripravené extrakty vykazovali značnú antioxidačnú aktivitu. Antibakteriálny účinok bol však minimálny alebo žiadny. Vytvorené lipozómy z extraktov vzoriek boli stabilné. Tiež boli navrhnuté prípravky pre kozmetický a potravinársky priemysel, a to konkrétne hojivý gél s hydratačnými účinkami a pasta vytvorená z lipozómov ako doplnok stravy pre športovcov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Aloe vera*, *Opuntia ficus-indica*, antibakteriálna aktivita, antioxidačná aktivita, enkapsulácia, lipozómy

ABSTRACT

The main goal of this bachelor thesis was the study of antioxidant and antibacterial effect of natural plant extracts, specifically from pulp and peel of leaf of *Aloe vera* and *Opuntia ficus-indica*. Liposomes with encapsulated active compounds were prepared and their use in food and cosmetics industry was analyzed. The theoretical part was focused on botanical with and phytochemical description of natural plant and their use in nutrition and medical practice. Also encapsulation and methods used to analyze encapsulated substances were described.

In the experimental part basic characteristics of extracts from two kinds of plant using ethanol as a solvent in its different concentration (0 %, 20 %, 40 %, 80 %) were analyzed. Mainly total content of phenolics, flavonoids and total antioxidant activity were determined. Selected extracts were also encapsulated into liposomes and the encapsulation efficiency, size, stability and long-term stability of liposomes were determined.

Antibacterial activity was tested against Gram-positive *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and Gram-negative *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*. Moreover, antibacterial activity against yeast *Candida glabrata* was tested.

Finally, 2 ethanol extracts of plant samples were tested in terms of cytotoxicity by using cell line Caco-2 and profile of selected phenolic compounds were determined in the selected extract samples by using high performance liquid chromatography.

20% ethanol solution was chosen as the most efficient extract solvent which contained the highest concentration of total phenolic content and concurrently all tested extracts showed antioxidant activity. However, there was minimal or none antibacterial effect. Prepared liposomes from extracts were stable. Also product for cosmetics and food industry was designed, specifically healing gel with moisturizing effect and paste made of liposomes as food supplement for athletes.

KEYWORDS: *Aloe vera*, *Opuntia ficus-indica*, antibacterial activity, antioxidant activity, encapsulation, liposomes

KOCÚROVÁ, Petra. *Izolace a charakterizace aktivních látek opuncie a aloe vera a možnosti jejich aplikace*. Brno, 2020. 54 s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE:

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Petře Matouškovéj Ph.D. za odborné vedenie pri práci, za ochotu, trpezlivosť a čas ktorý mi venovala. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Julii Hoovej za veľkú pomoc s experimentálnou časťou a cenné rady, ktoré mi dala.

OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	TEORETICKÁ ČASŤ	12
2.1	Aloe vera	12
2.1.1	História	12
2.1.2	Botanický popis	12
2.1.3	Fytochémia <i>Aloe vera</i>	13
2.1.4	Dôležité chemické zlúčeniny v <i>Aloe Vera</i>	14
2.1.4.1	Polysacharidy	14
2.1.4.2	Bielkoviny	14
2.1.4.3	Glykoproteíny.....	14
2.1.4.4	Lektíny	15
2.1.4.5	Antrachinóny	15
2.1.4.6	Fenolické látky	15
2.1.4.7	Vitamíny a minerálne látky	15
2.1.5	<i>Aloe vera</i> vo výžive a lekárskej praxi.....	16
2.1.5.1	Účinky na hojenie rán.....	16
2.1.5.2	Účinky na pokožku.....	16
2.1.5.3	Protizápalové účinky	16
2.1.5.4	Antibakteriálne vlastnosti.....	16
2.1.5.5	Antimykotické vlastnosti.....	16
2.1.5.6	Antivírusové vlastnosti.....	17
2.1.5.7	Imunomodulačné účinky	17
2.1.5.8	Antioxidačné vlastnosti	17
2.1.5.9	Laxatívne účinky	17
2.2	<i>Opuntia ficus-indica</i>	18
2.2.1	Botanický popis	18
2.2.2	Fytochémia <i>Opuntia ficus-indica</i>	19
2.2.3	Dôležité chemické látky v <i>Opuntia ficus-indica</i>	20
2.2.3.1	Fenolické látky	20
2.2.3.2	Mastné kyseliny.....	20
2.2.3.3	Vitamíny.....	20
2.2.3.4	Steroly	20
2.2.3.5	Minerálne látky	20
2.2.3.6	Aminokyseliny	20
2.2.4	<i>Opuntia ficus-indica</i> vo výžive a lekárskej praxi	21
2.2.4.1	Antioxidačná aktivita	21
2.2.4.2	Antimikrobiálna aktivita.....	21
2.2.4.3	Ostatné zdravotné účinky	21
2.3	Enkapsulácia.....	21
2.3.1	Princíp	22
2.3.2	Enkapsulačné techniky	22

2.4	Metódy využívané k analýze častíc a enkapsulovaných látok.....	22
2.4.1	UV-VIS spektrofotometria	22
2.4.2	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia HPLC	22
2.4.3	Zeta potenciál	23
2.4.4	Dynamický rozptyl svetla.....	23
3	CIEĽ PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	25
4.1	Použité chemikálie	25
4.2	Použité prístroje a pomôcky	25
4.3	Použité rastliny	26
4.4	Použité mikroorganizmy	26
4.5	Príprava extraktov	26
4.6	Charakterizácia extraktov.....	26
4.6.1	Vážkové stanovenie sušiny.....	26
4.6.2	Stanovenie celkovej koncentrácie fenolických látok.....	26
4.6.3	Stanovenie celkovej koncentrácie flavonoidov	26
4.6.4	Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou ABTS.....	27
4.7	Identifikácia fenolických látok pomocou HPLC/UV-VIS	27
4.8	Príprava lipozómov	28
4.8.1	Príprava lipozómov z vodných extraktov	28
4.9	Charakterizácia pripravených lipozómov.....	28
4.9.1	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti a dlhodobej stability lipozómov	28
4.9.2	Stanovenie veľkosti a stability častíc	28
4.10	Kultivácia mikroorganizmov.....	29
4.10.1	Príprava kultivačných médií.....	29
4.11	Antimikrobiálne testy	29
4.11.1	Agarová difúzna metóda.....	29
4.11.2	Bujónová dilučná metóda	29
4.12	MTT test cytotoxicity.....	29
5	VÝSLEDKY A DISKUSIE.....	31
5.1	Charakterizácia extraktov.....	31
5.1.1	Vážkové stanovenie sušiny.....	31
5.1.2	Stanovenie celkovej koncentrácie fenolických látok.....	31
5.1.3	Stanovenie celkovej koncentrácie flavonoidov	34
5.1.4	Stanovenie antioxidačnej aktivity.....	35
5.2	Identifikácia fenolických látok pomocou HPLC/UV	38
5.3	Príprava častíc	38
5.3.1	Stanovenie veľkosti pripravených častíc	38
5.3.2	Stanovenie stability pripravených častíc	39
5.3.3	Stanovenie enkapsulačnej účinnosti lipozómov	41
5.3.4	Stanovenie dlhodobej stability lipozómov	42
5.4	Antimikrobiálne testy	42

5.4.1	Difúzna metóda	43
5.4.2	Dilučná metóda.....	44
5.5	MTT test cytotoxicity	45
5.6	Návrh aplikácie pripravených lipozómov v kozmetických a potravinárskych prípravkoch .	45
6	ZÁVER.....	48
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	50
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	54

1 ÚVOD

Ľudia odjakživa chceli byť vždy krásni a večne mladí. Pre omladenie a hydratáciu pleti či rast a hustotu vlasov alebo pre dlhý a zdravý život zbierali liečivé rastliny a vyrábali rôzne elixíry.

V poslednej dobe sa ľudia začínajú naspäť vracieť k využitiu prírodných látok v rôznych odvetviach ľudského života. Ich uplatnenie je širokospektrálne a najčastejšie sa uplatňuje v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle. Mnohé prírodné látky majú značné antioxidačné, protizápalové a antimikrobiálne účinky.

V komerčných produktoch, či už v kozmetickom alebo potravinárskom priemysle sa často stretávame s popismi, ktoré poukazujú na to, že produkty sú založené na prírodnej báze. Záujem o prírodné produkty sa v posledných rokoch zvýšil hlavne kvôli minimálnym vedľajším účinkom, nízkej toxicite a ľahšom odbúravaní. Využívané sú extrakty z celých rastlín, ale aj jednotlivé časti z rastlín. Účinné látky sa dajú získať rôznymi analytickými metódami.

Táto práca je zameraná na charakterizáciu extraktov v rôznych alkoholových koncentráciách z rastlín *Opuntia ficus-indica* a *Aloe vera*, následnú enkapsuláciu vybraných extraktov a možnosti ich aplikácie v potravinárskom a kozmetickom priemysle. V extraktoch bol sledovaný hlavne obsah fenolických látok, flavonoidov a celková antioxidačná aktivita. V experimentálnej časti boli pripravené lipozómy zo sójového lecitínu a cholesterolu. Bola skúmaná ich enkapsulačná účinnosť, veľkosť, stabilita a dlhodobá stabilita. Bol skúmaný ich antimikrobiálny účinok voči vybraným grampozitívnym a gramnegatívnym baktériám a tiež aj voči kvasinkám. Ďalej bol vykonaný MTT test cytotoxicity na ľudských bunkách Caco-2, konkrétne na bunkách adenokarcinomu hrubého čreva. Tiež bola vykonaná vysokoúčinná kvapalinová chromatografia HPLC s detekciou UV-VIS.

Fenolické zlúčeniny a flavonoidy sú látky, ktoré môžu mať inhibičný efekt proti baktériám. Vzhľadom na antioxidačné účinky pomáhajú ochrániť bunky ľudského tela proti oxidačnému stresu. V kozmetickom priemysle sa dajú aplikovať ako rôzne hojivé krémy či hydratačné masky na pleť alebo krémy proti starnutiu. Nezastupiteľnú úlohu však majú aj v potravinárskom priemysle.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 *Aloe vera*

Aloe vera (lat. *Aloe barbadensis* Miller/*vera*), nazývaná tiež ako Aloe pravá je sukulentná rastlina, ktorá patrí do čeľade laliovitá. Pôvod rastliny nie je úplne známy, pretože v kultúrach sa nachádza po niekoľko tisícročí. Pravdepodobne pochádza z oblasti povodia Nílu v Sudáne. Možný pôvod je aj v Arábii, Kanárskych ostrovoch alebo v Somálsku. V dnešnej dobe je *Aloe vera* pestovaná po celom svete hlavne za komerčným účelom. Používa sa hlavne v oblasti zdravotníctva a kozmetiky. V súčasnosti je známych vyše 400 druhov Aloe, no pre liečivé účely je používaných iba pár z nich.

Aloe vera je najstaršou a najpoužívanejšou liečivou rastlinou aká bola kedy známa. Používa sa terapeuticky už od doby rímskych čias. Najviac aktívnych látok sa pripisuje vnútorným bezfarebným listovým gélom a vonkajším vrstvám listu. Obsahuje 75 výživných látok a 200 účinných látok vrátane vitamínov, enzýmov, minerálov, cukrov, lignínu, antrachinónov, saponínov, kyseliny salicylovej, sterolov a aminokyselín. Účinky *Aloe vera* sú protizápalové, majú priaznivý vplyv na imunitný systém, antibakteriálne vlastnosti, protiplesňové vlastnosti a antivírusové vlastnosti. Zdravotné prínosy zahŕňujú jeho aplikáciu pri hojení rán, liečbe popálenín, poškodenie mrazom a tiež chráni pri poškodení kože röntgenovým žiarením. Taktiež napomáha pri črevných problémoch, rakovine pľúc a pri znížení hladiny cukru v krvi u diabetikov^{[1][2]}.

Existujú však aj varovné vyšetrenia, ktoré upozorňujú na možné alergické účinky u niektorých pacientov. Škodlivé reakcie na ošetrenie gélom z *Aloe vera* sa zaznamenávajú zriedka, ale je potrebné ich brať vážne^[1].

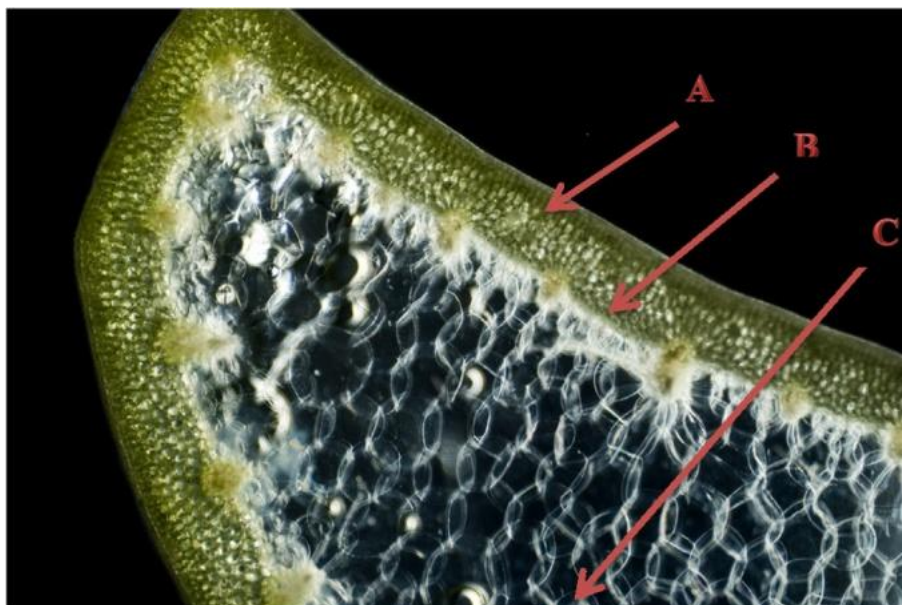
2.1.1 História

Liečebné vlastnosti *Aloe vera* boli známe už v staroveku. Jeho históriu popisujú fakty a legendárne rozprávania medzi Sumérmí, v časoch kráľov Akkadu, kde na hlinených tabľách nachádzame prvé poznatky o použití *Aloe vera*. Starí Egypťania používali túto rastlinu ako kozmetický produkt pre ženy. Faraóni ho považovali za elixír dlhého života. Olej z *Aloe vera* má pre mnohé orientálne krajiny veľký význam pre získanie múdrosti a nesmrteľnosti. Počas vojny Rimania objavili liečivé vlastnosti *Aloe vera* po tom, ako videli liečiť obrovské množstvo rán zranených karpatských väzňov^[3].

2.1.2 Botanický popis

Rastlina je bez stoniek alebo ich má len veľmi krátke. Má približne 20 listov v rovnej a hustej ružici. Listy dorastajú do výšky 40–50 cm a šírky 6–7 cm. Listy sú silné, mäsité a dobre zadržiavajú vodu. Vrchná strana listu má konkávny tvar a sivo–zelenú farbu. Mladé rastliny sú často škvrité. Spodná strana listu má konvexný tvar s bledo ružovým okrajom (viď obrázok 1). Na okrajoch sa nachádzajú 2 mm trnité zuby každých 10–20 mm. Hmotnosť listu môže dosahovať až 1,5–2 kg^{[2][4]}.

Kvety *Aloe vera* vyrastajú v hroznovitom kvetenstve, ktoré dosahujú dĺžky 30–40 cm. Kvetenstvo je husté a valcovité, smerom k vrcholu sa zužuje. Farba kvetov je bledo žltá až červená. Majú dĺžku približne 2,5 cm a pri rozkvitnutí sa otáčajú smerom dole. Na kvetnej trúbke je 6 tyčínok, ktoré vyčnievajú z kvetu. Semenník je zrastený z troch plodolistov. Na vrchole kvetu vyčnieva čnelka a má malú bliznu. Plodom je tobolka, ktorú rastlina využíva na rozmnožovanie vegetatívnym spôsobom^[4].



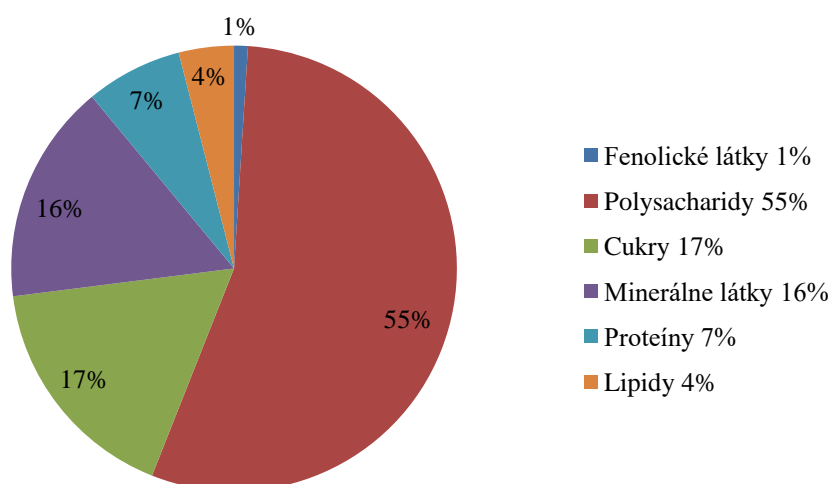
Obrázok 1 Rez listu *Aloe vera*; A: epiderma pozostávajúca z viacerých vrstiev rozptýlených chloroplastov; B: vonkajšia listová vlákna pozostávajúca z cievnych zväzkov; C: mezofyl pozostávajúci z parenchýmových buniek (obsahujú antrachinóny, alkaloidy, pyróny a iné)^[4]

2.1.3 Fytochémia *Aloe vera*

Z rôznych druhov *Aloe vera* bolo izolovaných niekoľko zložiek z rôznych fytochemických tried, ako sú alkaloidy, antróny, chromóny, avonoidy, glykoproteíny, naftalény a pyróny. Aloín, aloecín, aloeresín, aloe-emoín sú príklady niektorých bioaktívnych látok^[9]. Polysacharidové a glykoproteínové frakcie majú značnú biologickú aktivitu. V súčasnosti sa používajú a vyrábajú dva produkty z *Aloe vera*. Prvý je aloe géľ, ktorý sa získava zo sukulentných listov rastliny. Druhý produkt je horký žltý latex nazývaný aj aloe šťava, ktorý sa získava z plášte'a periférnych zväzkov buniek.

V *Aloe vera* je približne 200 rôznych typov molekúl. Géľ z listu obsahuje asi 98 % vody. Celkový obsah pevných látok v aloe vera géle je 0,66 % a rozpustné pevné látky predstavujú 0,56 %. Sušená forma gélovej *Aloe vera* pozostáva z polysacharidov (55 %), cukrov (17 %), minerálov (16 %), proteínov (7 %), lipidov (4 %), a fenolových zlúčenín (1 %) (viď Obrázok 2). Géľ obsahuje veľa vitamínov, vrátane dôležitých antioxidantných vitamínov A, C a E. Vitamín B1 (tiamín), niacín, vitamín B2 (riboflavín), cholín a kyselina listová. V niektorých literatúrach sa v stopových množstvách uvádza aj prítomnosť vitamínu B12 (kyanokobalamín)^[3].

Sacharidy sa získavajú zo slizovej vrstvy pod kožou. Parenchymálne tkanivo tvorí vnútornú časť listov *Aloe vera*, čo predstavuje géľ (sliz). Géľ je číry, tenký, bez chuti a má konzistenciu želé. Toto tkanivo sa získa z listu oddelením gélu od vnútorného bunkového odpadu. Slizová vrstva obsahuje monosacharidy aj polysacharidy. Najdôležitejšie sú polysacharidy s dlhým reťazcom, ktoré obsahujú glukózu a manózu (známe ako glukomannany [$\beta(1,4)$ -viazaný acetylový manánom]). Vzhľadom na prevahu manózy ku glukóze sa tieto polysacharidy označujú ako polymannány^[9]. V stopových množstvách sa vyskytuje aj xylóza, ramnóza, galaktóza, arabinóza. Bolo dokázané, že géľ z *Aloe vera* sa skladá najmenej zo štyroch rôznych čiastočne acetylovaných glukomanánov, ktoré sú lineárnymi polymérmi bez vetvenia a majú 1,4-glykozidickú väzbu s glukózou a manózou v pomere 1:2:8. Inou časťou rastliny je skupina špecializovaných buniek známych ako pericyklické kanáliky. Vyskytujú sa tesne pod vonkajšou zelenou vrstvou listu. Tieto bunky produkujú exsudát, ktorý pozostáva z horkého žltého latexu so silnými laxatívnymi účinkami. Tento exsudát sa nemôže zamieňať s gélom z tkaniva parenchýmového listu^{[3][8]}.



Obrázok 2 Fytochemické zloženie *Aloe vera*^[4]

2.1.4 Dôležité chemické zlúčeniny v *Aloe Vera*

Tesne pod listom sa nachádza latex (živica alebo miazga), obsahuje antrachinónové glykozidy (aloín, aloe-emodín), ktoré sú silnými stimulačnými prehľadlami. Tieto vo vode rozpustné glykozidy sa črevnými baktériami delia na glykóny, ktoré spôsobujú laxatívny účinok. Laxatívny účinok z *Aloe vera* je silnejší ako z iných bylín, vrátane koreňa senny alebo rebarbory, ktoré majú tiež závažnejšie vedľajšie účinky, ako sú kŕče, hnačka a nevoľnosť^[8]. Pre lekárske účely sa latex vysuší a používa ako bylinné prehľadlo. *Aloe vera* sa zriedka odporúča ako prvá voľba z prehľadacích prípravkov kvôli ťažkým kŕčom a nevoľnosti spojenej s jeho používaním. Všetky dôležité chemické zlúčeniny sú znázornené na obrázku 3 a v tabuľke 1.

2.1.4.1 Polysacharidy

Polysacharidy tvoria približne 20 % obsahu pevnej zložky a väčšinou pozostávajú zo zmesi polysacharidov lineárneho, vysoko acetylovaného β -1,4-mannanu, rozvetvených dextransov a iných polysacharidov s negatívnym nábojom. Gél alebo sliz získaný z listovej dužiny obsahuje celkom odlišné zlúčeniny od horkého latexu extrahovaného z obloženia listov. Gél obsahuje zmäkčujúci polysacharid glukomannán. Je to dobrý zvlhčovač, ktorý zodpovedá za jeho použitie v mnohých kozmetických výrobkoch. Acemannán je hlavný uhl'ohydrát v géli, vo vode je rozpustný manózový polymér s dlhým reťazcom, ktorý urýchľuje hojenie rán, moduluje imunitné funkcie a vykazuje antineoplastické a antivírusové účinky^[8].

Patrí tu tiež čistý mannán, acemannán, acetylovaný glukomannán, galaktán, arabinogalaktán, pektínová látka, xylán, celulóza, fruktóza, L-ramnóza a aldopentóza, kyselina salicylová, lignín a saponíny^[10].

2.1.4.2 Bielkoviny

Bielkoviny v géli tvoria približne 1% obsahu pevnej zložky. Prevládajúcimi bielkovinami v gélových extraktach sú nízkomolekulové hmotnosti (11 000 až 14 000 kDa, v prípade dvoch peptidových reťazcov). Pravdepodobne sú spojené s lektínom a môžu zodpovedať za mitogénnu aktivitu^[8].

2.1.4.3 Glykoproteíny

Homogénny glykoproteín s 34% uhl'ohydrátov s molekulovou hmotnosťou 40 kDa stimuluje syntézu DNA v obličkových bunkách a vykazuje lektínové vlastnosti. Glykoproteínová frakcia z gélu *Aloe vera* vykazuje proliferačnú aktivitu v bunkách človeka a zvyšuje hojenie rán s významnou

profileráciou a migráciou buniek. Ďalšia frakcia glykoproteínu (82 % proteínu a 11% uhľohydrátu) s molekulovou hmotnosťou od 29 kDa z gélu *Aloe vera* má proliferáciu aktivitu na človeka in vitro^[8].

2.1.4.4 Lektíny

Aloe vera obsahuje lektíny s rôznymi hemagulačnými aktivitami. Aloktín I a aloktín II sa nachádza v listovej buničine. Obsahujú vysoký podiel kyslých aminokyselín (kyselina asparagová, kyselina glutamová) a nízky podiel metionínu a histidínu. Lektín s molekulovou hmotnosťou 35 kDa sa nachádza v koži listov a vykazuje hemaglutinujúcu a mitogénnu aktivitu^[8].

2.1.4.5 Antrachinóny

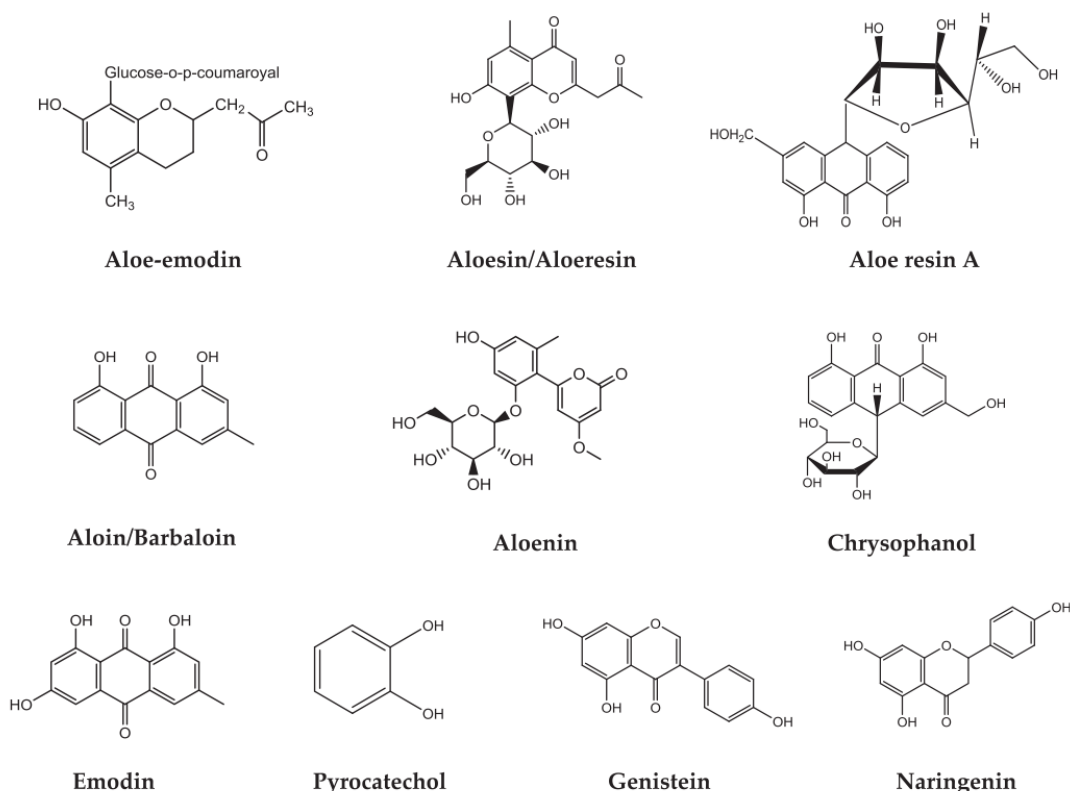
Niektoré deriváty antrachinónu zahŕňajú aloe-emodín a jeho o-glykozidy, 7-hydroxyaloe-emodín, nataloe-emodín a jeho estery, aloechryson, chryzopanol, aloesaponol, aloe saponarín, metylantrachinón, biantracén, aspedelín^[10].

2.1.4.6 Fenolické látky

Mnoho flavonoidov prítomných v *Aloe vera* je naringenín, api-gein, dihydroizorhamnetín, izovitexín, daidzenín a genistín^[10].

2.1.4.7 Vitamíny a minerálne látky

Aloe vera obsahuje množstvo dôležitých vitamínov a minerálov. Patria tu vitamíny A (β -karotén), C, E, B1, B2, B6, B12, kyselina listová, cholín, sodík, draslík, vápnik, chróm, meď, železo, selén, horčík, mangán, fosfor a zinok^[10].



Obrázok 3 Významné fytochemické látky v *Aloe Vera*^[10]

2.1.5 *Aloe vera* vo výžive a lekárskej praxi

2.1.5.1 Účinky na hojenie rán

Boli navrhnuté rôzne mechanizmy hojenia rán pomocou gélu z *Aloe vera*, ktoré zahŕňajú udržiavanie vlhkosti rany, zvýšenie migrácie epitelových buniek, rýchlejšiu maturáciu kolagénu a zníženie zápalu. Štúdie dokázali, že zložka polypeptidu s vysokou molekulovou hmotnosťou z gélu preukázala liečivý účinok na excízne rany. Glukomannán, polysacharid bohatý na manózu a gibberelín (rastový hormón), interagujú s receptorom rastového faktoru na fibrioblaste, čím stimulujú jeho aktivitu a proliferáciu. To zvyšuje syntézu kolagénu po lokálnej a orálnej aplikácii^[3].

2.1.5.2 Účinky na pokožku

Gélové extrakty s vyššími hmotnostnými koncentráciami (0,25 % a 0,50 %) zlepšujú hydratáciu pokožky pomocou zvlhčovacieho mechanizmu. Mechanizmus zvlhčovania znamená, že gél *Aloe vera* funguje tak, že priťahuje vodu z pod pokožky a pomáha udržiavať túto vodu viazanú v stratum corneum^[3].

Prípravky z *Aloe vera* sa používajú na široké spektrum kožných ochorení, od infekčných problémov po alergické reakcie. Často sa používa na liečbu rôznych typov rán a zranení, korózných vredov, modrín a parazitné kožné poruchy^[9].

Aloe vera má veľmi dobrý účinok proti starnutiu tým, že produkuje kolagénové a elastínové vlákna. Vďaka tomu je pokožka pružnejšia a menej vráskavá. Jedným z hlavných dôvodov je jedinečná schopnosť rastliny zvýšiť produkciu ľudských fibrioblastových buniek šesť až osemkrát rýchlejšie ako normálna produkcia buniek. Fibrioblastové bunky sa nachádzajú v pokožke a sú zodpovedné za výrobu kolagénu, podporného proteínu pokožky, ktorý udržiava pokožku pevnú, pružnú a mladistvú. Zistilo sa, že *Aloe vera* nielen zlepšuje štruktúru fibrioblastových buniek, ale tiež urýchľuje proces syntézy kolagénu^[3].

2.1.5.3 Protizápalové účinky

Zápal je reakcia tela v dôsledku zranenia a je charakterizovaná opuchom, bolesťou, začervenaním, teplom a stratou funkcie. Aloe gél zníži zápal prostredníctvom podpory syntézy prostaglandínov, ako aj zvýšením infiltrácie leukocytov^[10]. Používa sa aj na liečenie problémov s kĺbmi, ako je artralgia. Okrem toho sa používa na liečbu dislokácie kĺbov, dny a zlomenín^[9].

Aloe vera inhibuje cyklooxygenázovú dráhu a redukuje prostaglandín E2. Protizápalová zlúčenina C-glukozylchromón sa izoluje z gélových extraktov. Okrem toho sa z *Aloe vera* izoluje peptidázová bradykináza a ukázalo sa, že štiepi bradykinín, zápalovú látku, ktorá vyvoláva bolesť^[3].

2.1.5.4 Antibakteriálne vlastnosti

Infekčné choroby sú stále veľkou hrozbou pre verejné zdravie, a to aj napriek veľkému pokroku farmaceutického priemyslu. Ich vplyv je vysoký v dôsledku výskytu rezistencie na lieky. Na rozdiel od syntetických liekov majú antimikrobiálne látky pochádzajúce z rastlín obrovský terapeutický potenciál spojený s menším počtom vedľajších účinkov^[10].

Aktivita vnútorného gélu bola dokázaná proti grampozitívnym a gramnegatívnym baktériám. *Streptococcus pyogenes* a *Streptococcus faecalis* sú mikroorganizmy, ktoré boli inhibované pomocou gélu *Aloe vera*^[3]. Antibakteriálne vlastnosti zahŕňajú in vitro inhibíciu. Extrakt z gélu v koncentrácii 60 % má antibakteriálne účinky voči *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*. Extrakt so 70% koncentráciou inhibuje *Staphylococcus aureus*^{[7][8]}.

2.1.5.5 Antimykotické vlastnosti

Spracovaný gél z *Aloe vera* s 90% koncentráciou^[7] inhibuje rast mikroorganizmu *Candida albicans*^[3].

2.1.5.6 Antivírusové vlastnosti

Antivírusová aktivita *Aloe vera* je sprostredkovaná pomocou acemannánu^[10]. Antivírusový účinok môže byť priamy alebo nepriamy. Nepriamy v dôsledku imunitného systému a priamy v dôsledku aloe-emoдинu. Aloe-emoдин spôsobuje, že určité vírusy nie sú schopné fungovať. *Aloe vera* je vírusová proti vírusu *Herpes simplex* typu 1 a typu 2, vírusu *Varicella zoster*, vírusu *Pseudorabides* a vírusu chrípky. Virucidná aktivita bola spôsobená antrachinónmi extrahovanými z vnútorného listu aloe a koreňmi, kôrou alebo listami mnohých ďalších rastlín obsahujúcich antrachinón. Aloe-emoдин priamo ovplyvňuje obalené vírusy obsahujúce DNA aj RNA, ale nemal žiadny vplyv na nahé vírusy^[3]. *Aloe vera* tiež vykazuje antivírusové účinky proti viacerým vírusom, ktoré sa podieľajú na infekciách horných dýchacích ciest. Prínos rastliny bol aj dokázaný pri liečbe respiračných ochorení, najmä astmy či pľúcneho krvácania a na vyčistenie pľúc a hrdla od škodlivín^[9].

2.1.5.7 Imunomodulačné účinky

Aloe vera je dobrý stimulátor imunity, obsahuje 90 % ródia a irídia (stopových minerálnych látok) v acemannáne, ktorý je jeden z polysacharidov čo zvyšuje počet bielych krviniek alebo makrofágov a T buniek^[3]. Extrakty tiež blokujú produkciu prostglandínu a tromboxánu z kyseliny arachidónovej, čím sa znižuje zápal^[8].

2.1.5.8 Antioxidačné vlastnosti

Aeróbnym metabolizmus v bunkách je zodpovedný za tvorbu voľných radikálov v dôsledku homolytického štiepenia kovalentnej väzby prítomnej v biomolekulách. Nadmerná tvorba voľných radikálov spôsobuje oxidačný stres v dôsledku nerovnováhy medzi úrovňou reaktívnych druhov kyslíka a antioxidačného stavu, čo vedie k rôznym degeneratívnym ochoreniam. Oxidačné zhoršenie polynenasýtených mastných kyselín spôsobuje reťazové reakcie tvorby lipidových peroxidov, čo vedie k patofyziologickým zmenám, ktoré sú zodpovedné za mnohé choroby. Antioxidanty zmiernujú oxidačný stres darovaním elektrónu voľným radikálom a počas tohto procesu sa oxidujú samy a chránia biomolekuly pred oxidačným poškodením^[10].

Gél z *Aloe vera* obsahuje peroxid glutatión, enzýmy superoxidodismutázy a fenolické antioxidanty, ktoré sú zodpovedné za antioxidačné účinky. Okrem toho obsahuje aj vitamíny A, C a E. Voľné radikály zbavujú toxíny a karcinogénne vlastnosti, ktoré v našom tele máme, od znečistenia a nekvalitnej stravy^[3].

2.1.5.9 Laxatívne účinky

Jedným z dôležitých a najcitovanejších aplikácií *Aloe vera* je jeho použitie pri gastrointestinálnych problémoch. Koloniálna flóra hrubého čreva metabolizuje gélovú zložku aloínu za vzniku aktívneho metabolitu aloe-emoдин-9-antrónu, ktorý je zodpovedný za očistnú aktivitu^[10]. Antrachinóny zvyšujú obsah vody v črevách, stimulujú sekréciu vody a zvyšujú peristaltiku čreva. Skupina špeciálnych buniek známych ako pericyklické kanáliky, ktoré pozostávajú z horkého žltého latexu spôsobujú silné laxatívne účinky^[3]. Barbaloin pochádza z buniek pokožky listov. Ovplyvňuje sodíkovú/draselnú pumpu a chloridové kanály na membráne hrubého čreva^[8]. Okrem laxatívnych vlastností sa tradične aloe používala ako prostriedok proti hnilobe a na zmiernenie bolesti žalúdka^[9].

Tabuľka 1 Klasifikácia najdôležitejších zložiek *Aloe vera*^[4]

Trieda	Zlúčeniny
Anthrachinóny	Aloe–emodín, Aloe kyselina, aloín A a B, hydroxyaloín, chrysofánová kyselina, ester kyseliny škoricovej, emodín, resistannol
Enzýmy	Amyláza, kataláza, cyklooxygenáza, lipáza, fosfatáza, oxidáza, karboxypeptidáza
Esenciálne aminokyseliny	Izoleucín, leucín, lyzín, metionín, fenylalanín, treonín, valín
Minerálne látky	Vápnik, chlór, chróm, meď, železo, horčík, mangán, sorbát draselný, sodík, zinok
Neesenciálne zlúčeniny	Alanín, arginín, kyselina asparágová, kyselina glutámová, glycín, histidín, hydroxyprolín, prolín, tyrozín
Sacharidy	Aldopentóza, celulóza, glukóza, manóza, L–ramnóza
Vitamíny	B1, B2, B6, C, cholín, kyselina folinová, β –karotén, α –tokoferol
Ostatné	Cholesterol, lecitín, lignín, kyselina salicylová, kyselina arachidonová, giberlín, β –sitosterol, steroidy, kyselina močová, triglyceridy

2.2 *Opuntia ficus–indica*

Opuntia ficus–indica (nopál smokvovec alebo opuncia smokvoňovitá), bežne nazývaná aj hruškovitý kaktus alebo nopálny kaktus, patrí do čeľade dvojkličnolistných angiospermovcov *Cactaceae* rodiny, ktorá obsahuje asi 1 500 druhov kaktusov. Nopálny kaktus je subtropická a tropická rastlina. Môže rásť vo vyprahnutých a polosuchých podnebiach so zemepisným rozdelením, ktoré zahŕňa krajiny Mexika, Latinskej Ameriky, Južnej Afriky a Stredozemného mora.

Nopálny kaktus sa používa v oblasti zdravia, výživy vo forme čaju, džemu, džúsu a oleja extrahovaného z pichľavých semien hrušiek. Používa sa ako bylinný prostriedok pri rôznych zdravotných problémoch. *Opuntia ficus–indica* je známy svojím vysokým obsahom fenolických látok, ktoré vykazujú značné antioxidačné a protizápalové vlastnosti.

2.2.1 Botanický popis

Opuntia ficus–indica je sukulentná rastlina, ktorá môže dosahovať 3 až 6 metrov. Kaktusy rastú s plochými kruhovými listami, ktoré sa nazývajú aj kladódy a majú dva typy rôznych ostňov. Staršie časti listov sú drevnaté, môžu dosahovať dĺžky až 50 cm. Kvety sú jednotlivé, majú 8 až 10 cm v priemere, okvetné lístky sú žlté a kvitnú iba v noci. Plodom je guľovitá bobuľa so šŕavnatou dužinou.



Obrázok 4 *Opuntia ficus–indica*^[11]

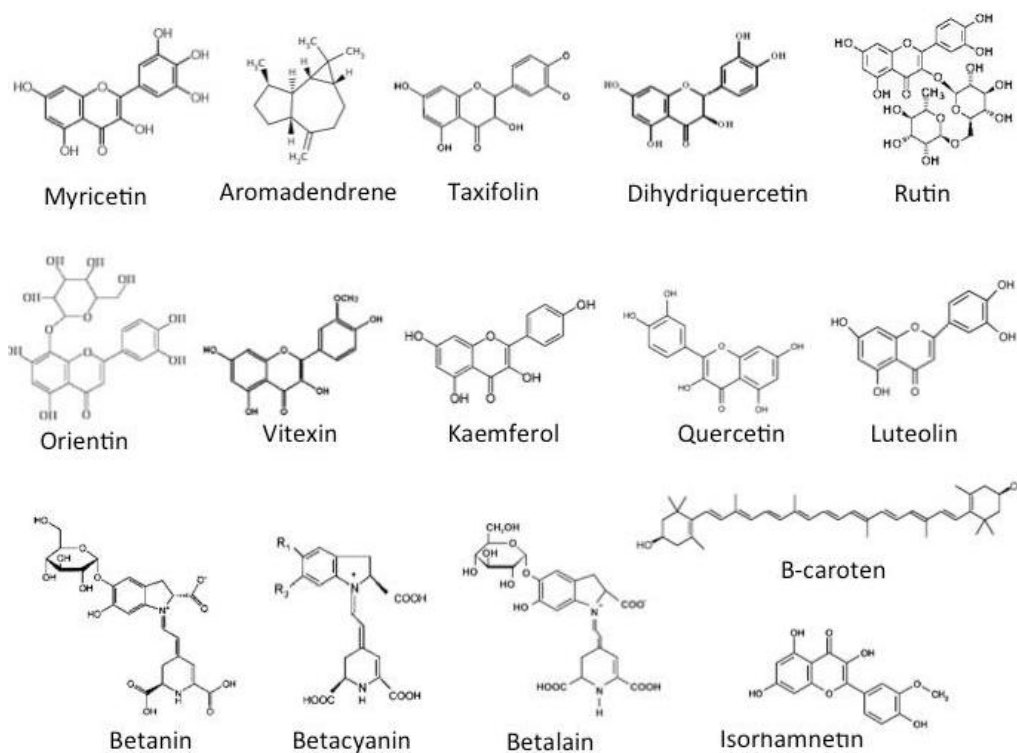
2.2.2 Fytochémia *Opuntia ficus-indica*

Kaktus obsahuje značné množstvo kyseliny askorbovej, vitamínu E, karotenoidov, aminokyselín a antioxidantných zlúčenín (fenoly, flavonoidy, betaxantín a betacyanín). Ovocie z nopálu je cenným zdrojom výživných látok. Medzi tieto výživné látky patria antiulcerogénne, antioxidantné, protirakovinové, neuroprotektívne, hepatoprotektívne a antiproliferatívne zlúčeniny. Kvety obsahujú rôzne flavonoidy, najmä kaempferol a kvercetín. Kaktusová kôra a semená sa môžu použiť na prípravu kaktusového oleja, pričom lipidy z kôry sú obohatené o esenciálne mastné kyseliny a antioxidanty rozpustné v tukoch. List z kaktusu obsahuje vitamíny, antioxidanty a rôzne flavonoidy, najmä quercetín a 3-metyléter, vysokoúčinný zachytávač radikálov. Extrakty z listov môžu znižovať hladinu cholesterolu a sprostredkovať protivredové a protizápalové mechanizmy. Vodný extrakt výrazne zlepšuje hojenie rán^[6]. Semená z rastlín *Opuntia ficus-indica* tiež obsahujú značné množstvo oleja s vysokou hladinou nenasýtených mastných kyselín, ktoré sú prospešné pre zdravie^[11].

Hlavná zložka listov je voda (80–95%), po nej nasledujú uhľohydráty (3–7 %) a vláknina (1–2 %). Cukrová časť zahŕňa slizové zložky obsahujúce polyméry. Fyziologická úloha rastlinného slizu je regulovať obsah bunkovej vody počas dlhodobého sucha a regulovať tok vápnika v rastline. Listy predstavujú zdroj fytochemikálií, ako sú fenolické kyseliny a flavonoidy (viď obrázok 5)^[11].

Vláknina z kaktusu pozostáva z niekoľkých chemických zložiek odolných voči tráviacim enzýmom, ako je celulóza, hemicelulóza, pektín, lignín, guma a podobne. Výhody spojené s obsahom vlákniny sú dobre známe, najmä pri prevencii chorôb, ako je cukrovka, liečba gastrointestinálnych porúch, chorôb spojených s nízkym príjmom vlákniny v strave, zníženie hladiny glukózy v krvi. Rozpustené vlákna, vrátane pektínov, živíc a slizov zvyšujú viskozitu potravy v čreve, spomaľujú alebo znižujú absorpciu cukru^[6].

Opuntia ficus-indica svojimi chemickými zložkami vykazuje antioxidantnú a antivoľno radikálovú aktivitu, ktorá má potenciál ako protirakovinová, protizápalová, hypoglykemická, hypolipidemická a hypocholesterolemická aktivita.



Obrázok 5 Dôležité fytochemické látky v *Opuntia ficus-indica*^[11]

2.2.3 Dôležité chemické látky v *Opuntia ficus-indica*

Pokiaľ ide o zloženie fenolických zlúčenín, vitamínov a iných špecifických zlúčenín, hruška kaktusu je dobrý kandidát pre výživové odporúčania a terapeutické využitie (viď tabuľka 2).

2.2.3.1 Fenolické látky

Fenolické látky predstavujú skupinu organických molekúl široko distribuovaných v rastlinnej ríši. Ako naznačuje ich názov, ich chemické štruktúry sa vyznačujú prítomnosťou niekoľkých fenolových skupín, ktoré môžu byť spojené s viac alebo menej komplexnými skupinami chemických zlúčenín, zvyčajne s vysokou molekulovou hmotnosťou. Všetky časti kaktusovej rastliny sú bohaté na členov polyfenolovej rodiny, ako sú rôzne flavonoidy a fenolické kyseliny^[13].

Kyselina gallová sa najčastejšie vyskytuje v kvetoch kaktusov a vykazuje vysokú antioxidačnú aktivitu, ktorá má schopnosť znižovať poškodenie DNA a tlmiť voľné radikály. Tiež má cytotoxickú aktivitu proti nádorovým bunkám z leukémie, rakoviny pľúc a prostaty. Listy sú bohaté na nikotiflorín, ktorý je neuroprotektívny proti hypoxii, glutamátom alebo oxidačným stresom. Okrem ochranného účinku na poruchu pamäti chráni nikotiflorín aj pred zlyhaním energetického metabolizmu. Ovocná šupka obsahuje veľké množstvo izorhamnetínu. Ten vykazuje protirakovinový účinok inhibíciou neoplastickej bunkovej transformácie indukovanej epidermálnym rastovým faktorom^[12].

2.2.3.2 Mastné kyseliny

V kaktusových listoch sa nachádza hlavne kyselina palmitová, kyselina olejová, kyselina linolová, kyselina linolénová. Tieto štyri kyseliny predstavujú viac ako 90 % celkových mastných kyselín. Ovocie, dužina, semeno a šťava v hrušiek sú bohaté na kyselinu linolénovú, kyselinu olejovú a kyselinu palmitovú. Vysoká hladina kyseliny omega-6-linolovej sa nachádza v kaktusovom oleji, a táto hladina je vyššia ako v slnečnicovom oleji alebo sezamovom oleji. Ako prekursor kyseliny arachidónovej je kyselina linolová už dlho akceptovaná ako látka, ktorá má hypocholesterolemický účinok a inhibičné vlastnosti proti metastatickým bunkám rakoviny hrubého čreva^[12].

2.2.3.3 Vitamíny

Opuntia ficus-indica má ovocie, ktoré obsahuje mäsitú dužinu so semenami a je obalená pichľavou šupkou. Ovocie, najmä pokožka je obohatená vitamínom E. Naopak, olej extrahovaný zo semien ovocia má nízky obsah vitamínu E. Hruška kaktusu obsahuje aj vitamín C^[14]. Tento obsah je vyšší ako v iných bežných druhoch ovocia, ako sú napríklad jablká, banány alebo hrozno. Vitamín K1 je prítomný vo všetkých častiach ovocia. Vitamín B je prítomný iba v listoch, v ktorom sa nachádza iba v stopových množstvách^[12].

2.2.3.4 Steroly

Ako hlavný sterol je β -sitosterol, ktorý sa dá izolovať z rôznych častí ovocných olejov. Ďalšie steroly sa nachádzajú v nižších množstvách ako kampesterol, lanosterol, avenasterol A5, ergosterol^[12].

2.2.3.5 Minerálne látky

Semená kaktusu sú bohaté na minerálne látky, s prevahou draslíka a fosforu. Pozoruhodná je prítomnosť veľkého množstva horčíka, sodíka a vápnika^[12].

2.2.3.6 Aminokyseliny

U kaktusových listov je hlavnou detekovanou aminokyselinou glutamín, po ktorom nasleduje leucín, lyzín, valín, arginín, fenylalanín a izoleucín. Naproti tomu v kaktusovom semene je hlavnou aminokyselinou kyselina glutámová a arginín. V kaktusovom ovocí sú dve prevládajúce aminokyseliny prolín a taurín. Ovocné semená a dužina sú považované za veľmi dobrý zdroj aminokyselín a proteínov^[12].

2.2.4 *Opuntia ficus-indica* vo výžive a lekárskej praxi

Nutričná hodnota hrušiek z kaktusu spočíva hlavne v obsahu kyseliny askorbovej, vitamínu E, karotenoidov, aminokyselín a veľkého množstva glukózy a fruktózy. Hrušky sú tiež bohaté na fenoly, flavonoidy, betaxantíny a betacyaníny^[12]. Kaktusové prípravky majú aj preventívne a terapeutické účinky proti alkoholizmu. V tradičnej medicíne sa *Opuntia ficus-indica* používa na liečbu popálenín, rán, hyperlipidémie, obezity a katarálnej gastritídy. Alkoholové extrakty sú určené na protizápalové, hypoglykemické a antivírusové účely.

2.2.4.1 Antioxidačná aktivita

Je všeobecne známe, že priaznivé účinky liečivých rastlín možno získať z aktívnych zložiek prítomných v celej rastline, jej častiach alebo z rastlinných materiálov či už v surovom alebo spracovanom stave. V súčasnosti je značný záujem o prírodné produkty s antioxidačnými vlastnosťami. *Opuntia ficus-indica* je liečivou rastlinou, ktorá má zaujímavú antioxidačnú aktivitu a ochrannú schopnosť vďaka prítomnosti zložiek, ako sú vitamíny C a E, fenolické látky a iné výživné látky.

Ovocná šťava obsahuje bohatú škálu prírodných antioxidantov, veľa fenolových zlúčenín, kyselinu askorbovú, betaína, betacyaníny a flavonoidovú frakciu, ktorá pozostáva hlavne z rutínu a derivátov izorhamnetínu^[11]. Flavonoglykozidy v extrakte kvetov z kaktusu sa používa ako prísada do potravín, kozmetických a farmaceutických výrobkov^[13].

2.2.4.2 Antimikrobiálna aktivita

Campylobacter je jedným z najbežnejších pôvodcov potravinovej bakteriálnej gastroenteritídy u ľudí. Extrakty z *Opuntia ficus-indica* majú výrazné baktericídne účinky na rast *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*^[13]. Metanolový a etanolový extrakt spôsobuje narušenie membrány, čo vedie k zvýšeniu priepustnosti membrány a následnému zníženiu pH a ATP. Tieto extrakty sa používajú na liečenie porúch črevného traktu spojených s týmito mikroorganizmami a na zabránenie kontaminácie potravín^[12].

2.2.4.3 Ostatné zdravotné účinky

Typické ochorenia pre človeka sú hyperglykémia, cukrovka, obezita, hypercholesterolémia. Tieto choroby sú spôsobené zlým zdravotným štýlom. Výťažky z kvetov a listov majú hypoglykemické účinky, v skutočnosti majú schopnosť spomaliť rýchlosť absorpcie glukózy v čreve, pravdepodobne kvôli ich viskozite. Olej zo semien *Opuntia ficus-indica* obsahuje veľa antioxidantov. Patologický stav, ako je obezita a cukrovka sa môže zlepšiť stravou, v ktorej je dostatok polyfenolov^[13].

Tabuľka 2 Klasifikácia najdôležitejších zložiek *Opuntia ficus-indica*

Trieda	Zlúčeniny
Mastné kyseliny	Kyselina palmitová, kyselina olejová, kyselina linolová, kyselina linolénová
Vitamíny	K1, C, B1, B2, B3, E, α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol
Steroly	Kampesterol, stigmasterol, lanosterol, β -sitosterol, ergosterol
Minerálne látky	Vápnik, sodík, horčík, draslík, železo, zinok, meď
Aminokyseliny	Alanín, arginín, asparagín, kyselina asparágová, glutamín, histidín, izoleucín, leucín, lyzín, metionín, serín

2.3 Enkapsulácia

Spotrebitelia aj výrobcovia v potravinárskom priemysle majú stále väčší záujem o prírodné zložky potravín. Tieto potravinové bioaktívne zložky sa formulujú takým spôsobom, ktorý ich chráni pred nepriaznivými procesmi a okolitými podmienkami. Musia sa bezpečne dodávať do cieľových orgánov

a buniek^[15]. Uplatnenie bioaktívnych zložiek v potravinárskom priemysle je však obmedzené, pretože sa ľahko deaktivujú, keď sú vystavené kyslíku, svetlu, teplu alebo iným extrémnym podmienkam^[14].

Enkapsulácia je proces zachytenia aktívnych látok v nosnom materiáli a je užitočný na zlepšenie dodávania bioaktívnych molekúl a živých do potravín. Materiály, ktoré sa najčastejšie využívajú na enkapsuláciu v potravinách sú polysacharidy, ale tiež sú vhodné aj proteíny a lipidy.

Cieľom zapuzdrenia je zachovať stabilitu bioaktívnych zlúčenín počas spracovania a skladovania a zabrániť nežiadúcim interakciám s kapsulou^[16].

2.3.1 Princíp

Ide o proces zachytenia jednej účinnej látky do inej látky, ktorá ju ochraňuje a ochraňuje, môže mať rôznu veľkosť a funkčné vlastnosti^[17]. Enkapsulovaná látka sa môže tiež nazývať ako jadro či vnútorná fáza. Látka, ktorá enkapsuluje sa nazýva membrána, obal, kapsula, vonkajšia fáza alebo nosný materiál. Výber materiálu kapsuly závisí od vlastností jadra ako aj na niektorých vlastnostiach membrány (napríklad elektrický náboj, molekulová hmotnosť, konformácia a iné).

Enkapsulácia je tiež definovaná ako technológia balenia pevných látok, tekutín alebo plyných materiálov do malých kapsúl, ktoré uvoľňujú svoj obsah kontrolovanou rýchlosťou za špecifických podmienok^[17].

2.3.2 Enkapsulačné techniky

Pre zapuzdrenie aktívnych látok je k dispozícii mnoho techník. Pretože enkapsulačné látky sú často v tekutej forme, mnohé technológie sú založené na sušení. Medzi metódy založené na sušení tu patrí napríklad sprejové sušenie, sprejové chladenie, sprejové mrazenie, fluidná vrstva a iné^[16].

2.4 Metódy využívané k analýze častíc a enkapsulovaných látok

2.4.1 UV-VIS spektrofotometria

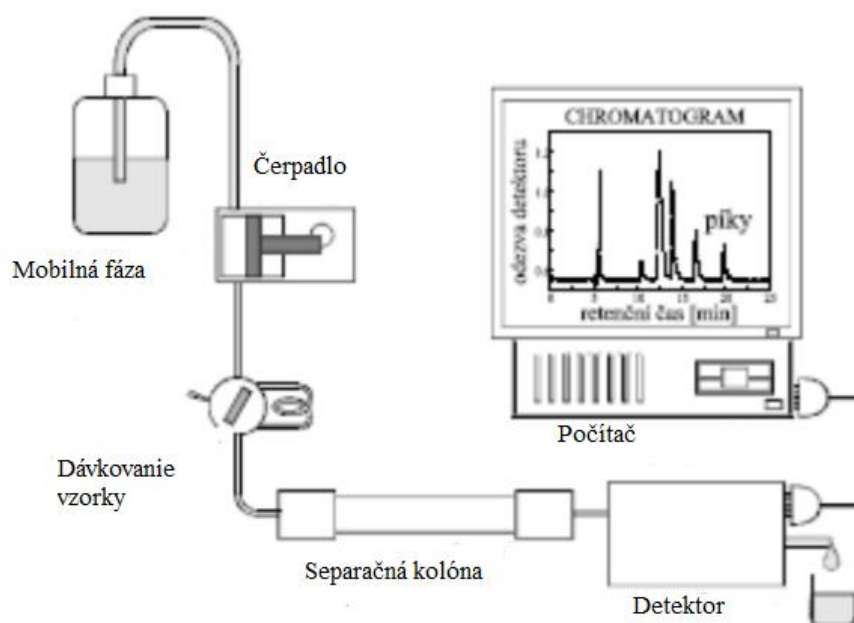
UV-VIS spektrofotometria patrí medzi optické analytické metódy, ktorá sa používa aj pri stanovení aktívnych látok pri enkapsulácii. Ide o metódu pri ktorej sa molekuly analyzovaných látok pri laboratórnych podmienkach nachádzajú vždy v základnej elektrónovej hladine a prevažne vo vibračnej hladine. Pri pohltení fotónu molekula prejde do excitovaného stavu, pričom molekula je schopná pohltiť iba taký fotón, ktorého energiu je schopná uchovať buď v elektrónovom obale alebo vo väzbách. V elektrónovom obale je energia uchovaná pomocou excitácie a vo väzbách pomocou vibračnej excitácie^[46].

Molekula sa v excitovanom stave nachádza pomerne krátku dobu a potom prechádza naspäť do základného stavu. Návrat zo základného stavu môže prebiehať buď nežiarivými prechodmi, kedy molekula predáva tepelnú energiu okoliu. Druhý spôsob je pomocou žiarivého prechodu, kedy je excitovaný fotón. V tejto metóde sa uplatňuje Lambert-Beerov zákon, ktorý je dôležitou charakteristikou UV-VIS spektrofotometrie a udáva, že absorbanca je priamo úmerná koncentrácii absorbujúcej látky.

2.4.2 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia HPLC

High performance liquid chromatography je v podstate nástupca klasickej stĺpcovej chromatografie, čiže ide o inštrumentovanú techniku. HPLC patrí medzi deliace metódy, ktorá je založená na fázovom rozhraní dvoch fáz, z ktorých je jedna stacionárna a druhá mobilná. Stacionárna fáza je nepohyblivá a obteká ju mobilná fáza, ktorá je pohyblivá a unáša vzorku.

Na začiatku chromatografu sa nachádza časť na prípravu mobilnej fáze, ide o zásobník mobilnej fáze a odplyňovač mobilnej fáze. Dopravenie mobilnej fáze na kolónu je zabezpečené pomocou čerpadla, ktoré môže dodávať rovnaké množstvo mobilnej fáze alebo môže postupne zvyšovať elučnú silu mobilnej fáze v priebehu analýzy. Na dávkovanie vzorky na kolónu slúži dávkovací ventil a za ním už nasleduje kolóna. Kolóna obsahuje predkolónu, ktorá chráni kolónu pred poškodením. Z kolóny vystupuje eluát na detektor, prípadne frakcie môžu byť odoberané^[47].



Obrázok 6 Schéma zariadenia HPLC^[47]

2.4.3 Zeta potenciál

Zeta potenciál je mierou elektrostatičného alebo nábojovej odpudivosti či príťažlivosti medzi časticami^[28]. Je to jeden zo základných parametrov, o ktorých je známe, že ovplyvňujú stabilitu častíc. Vplyvom elektrického pola dochádza k naviazaniu voľných iónov opačnej polarite z disperzie k povrchu častice. Okolo definovanej častice vzniká tenká vrstva, ktorá sa nazýva elektrická dvojvrstva, alebo aj Debyeho vrstva, a je viazaná silnými elektrostatičnými a adsorbčnými silami^[31]. Jeho meranie prináša podrobný pohľad na príčiny disperzie, agregácie a môže sa použiť na zlepšenie zloženia disperzií, emulzií a suspenzií^[29].

2.4.4 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla je technika, ktorá sa používa pri meraní veľkosti častíc a distribúcie veľkosti častíc. Je to najjednoduchšia a najrýchlejšia technika pre zistenie veľkosti častíc v koloidnej suspenzii alebo emulzii.

Častice sa v roztoku podrobujú Brownovmu pohybu, ak sú osvetlené laserovým lúčom, tak intenzita rozptýleného svetla odpovedá rýchlosťou, ktorá je závislá na veľkosti častíc. Malé častice sa pohybujú rýchlejšie ako veľké. Čím sú častice väčšie, tým je Brownov pohyb pomalší. Táto metóda analyzuje kolísanie intenzity svetla rozptýleného v mernom systéme^[30].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce je izolácia a charakterizácia aktívnych látok rastliny *Opuntia ficus-indica* a *Aloe Vera* a testovanie možností ich aplikácie v potravinárskych a kozmetických prípravkoch.

1. Príprava a charakterizácia vybraných extraktov z *Opuntia ficus-indica* a *Aloe Vera*.
2. Enkapsulácia pripravených extraktov.
3. Návrh potravinárskeho a kozmetického výrobku s obsahom vybraných aktívnych látok.

4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

ABTS – (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), Sigma-Aldrich (DE)
Brain Heart Infusion Agar, Himedia (India)
Diethylether, Penta (ČR)
Dusičnan sodný, Lach-Ner (ČR)
Ethanol, Penta (ČR)
Ethylacetát, Penta (ČR)
Folin-Cicolteau činidlo, Penta (ČR)
Glukosa, Lach-Ner (ČR)
Glycerol, Penta (ČR)
Heptahydrát hydrogenarseničnanu sodného, Lach-Ner (ČR)
Hexan, Penta (ČR)
Hydrogenuhlíčan sodný, Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný, Lach-Ner (ČR)
Chlorid hlinitý, Lach-Ner (ČR)
Chloroform, Penta (ČR)
Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu, Sigma-Aldrich (DE)
Katechin, Sigma-Aldrich (DE)
Kyselina sírová, Lach-Ner (ČR)
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DE)
L- α -Phosphatidylcholine – lecithin ze sóje, Sigma-Aldrich (DE)
Nisin z *Lactococcus lactis*, Sigma-Aldrich (DE)
Nutrient Broth, Himedia (India)
Pentahydrát síranu měďnatého, Lach-Ner (ČR)
Síran sodný, Lach-Ner (ČR)
Trolox, Sigma-Aldrich (DE)
Uhlíčan sodný, Lach-Ner (ČR)
Vínan sodno-draselný, Lach-Ner (ČR)
Acetonitril pro HPLC, Sigma-Aldrich (DE)
Hexan pro HPLC, Sigma-Aldrich (DE)
Metanol pro HPLC, P-Lab (ČR)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (DE)
Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (DE)
Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
Centrifuga, Sartorius, Biotech (ČR)
Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)
Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS - Malvern (UK)
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)
Ultrazvukový homogenizátor - Bandelin Sonoplus HS3200 - Sonorex Technik (DE)
Ultrazvuková lázeň PS02000 (ČR)
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (UK)
Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)
Biohazard box, model Airstream, třída II -ESCO, Biotech (ČR)
Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (DE) a Biohit (DE)
HPLC/UV-VIS sestava – Thermo Fisher Scientific (USA)

- Dionex UltiMate 3 000 series

- UV-VIS detector UlltiMate
- Pump UlltiMate
- Column Oven LCO 101, ECOM
- ERC RefractoMax 520

4.3 Použité rastliny

Aloe Vera (šupka, dužina), *Opuntia ficus-indica* (šupka a dužina z listu, šupka a dužina z plodu). Žltý plod z rastliny *Opuntia ficus-indica* bol zakúpený v obchode. Inak sa jednalo o čerstvé rastliny, ktoré boli dopestované doma v kvetináči.

4.4 Použité mikroorganizmy

V experimentálnej časti boli používané na testovanie antimikrobiálnej aktivity kultúry *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Serratia marcescens* CCM 8587, *Propionibacterium acnes* CCM 3437, *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418, *Candida glabrata* CCM 8270 a *Escherichia coli* CCM 7395. Všetky použité bakteriálne kultúry boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

4.5 Príprava extraktov

Boli pripravené 4 druhy extraktov, z toho jeden bol vodný a 3 etanolové v koncentráciách 20 %, 40 % a 80 %. K príprave extraktov bolo použitých 0,5 g vzorky. Navážka bola extrahovaná v 5 ml vody alebo v etanolovom koncentráte 24 hodín na trepačke pri 37 °C.

Čerstvé vzorky boli oddelené na šupku a dužinu a boli nakrájané na menšie kúsky. Následne prebiehala extrakcia a filtrácia cez dvojité gázu.

4.6 Charakterizácia extraktov

4.6.1 Vážkové stanovenie sušiny

Množstvo sušiny v jednotlivých častiach rastlín bolo stanovené vážkovo. Do plastovej skúmavky bol na analytických váhach odvážený 1 gram vzorky. Navážené vzorky sa sušili 3 dni pri teplote 55 °C do ustálenia na konštantnú hmotnosť. Po usušení boli vzorky vložené do exikátoru a následne boli opäť zvažované na analytických váhach. Na záver bol vypočítaný obsah sušiny vo vzorkách.

4.6.2 Stanovenie celkovej koncentrácie fenolických látok

Celková koncentrácia polyfenolov bola stanovená spektrofotometricky, kedy bola sledovaná intenzita sfarbenia vzorky, ktorá reagovala s Follin–Ciocaltauovým činidlom. Ako štandard bola používaná kyselina gallová^[35].

Do skúmavky bolo vždy napipetovaný 1 ml zriedeného Follin–Ciocaltauového činidla, ktorý bol zriedený v pomere 1:9. Ďalej bolo napipetovaný 1 ml destilovanej vody a 100 µl extraktu vzorky. Každá vzorka bola stanovovaná v troch paralelných stanoveniach. Roztok v skúmavkách bol premiešaný a ponechaný stáť. Po 5 minútach bolo do každej skúmavky pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného a znova bolo všetko premiešané. Po 15 minútach bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 750 nm oproti blanku, kde bolo miesto vzorky pridaná destilovaná voda. Pre vytvorenie kalibračnej krivky bol použitý rovnaký postup. Ako štandard bola pripravená kalibračná rada kyseliny gallovej s koncentráciou v rozmedzí od 0,1 do 0,7 mg/ml. Zo získaných absorbancií bol zostrojený graf kalibračnej závislosti.

4.6.3 Stanovenie celkovej koncentrácie flavonoidov

Celková koncentrácia flavonoidov bola stanovená spektrofotometricky, kedy bola sledovaná zmena farby roztoku a intenzita absorbancie, kde dochádzalo k reakcii hlinitej soli a dusitanom. Ako štandard bol použitý 1M roztok katechínu v etanole^[35].

Do skúmavky bolo vždy napipetované 0,5 ml extraktu vzorky, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok v skúmavkách bol premiešaný a ponechaný stáť 5 minút. Potom bol pridaný do skúmaviek 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Znova boli skúmavky premiešané a ponechané stáť 5 minút. Nakoniec bolo pridaných 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilovanej vody. Po 15 minútach bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 510 nm oproti blanku, kde bolo miesto vzorky pridaná destilovaná voda.

Pre vytvorenia kalibračnej krivky bol použitý rovnaký postup. Ako štandard bola pripravená kalibračná rada roztoku katechínu s koncentráciou v rozmedzí od 0,1 do 0,4 mg/ml. Zo získaných dát bol zostrojený graf kalibračnej závislosti.

4.6.4 Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou ABTS

Metóda je založená na schopnosti vzorky zhasť kation-radikál ABTS^{•+}. Táto metóda je tiež označovaná ako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), čiže výsledná antiradikálová aktivita vzorky je porovnávaná s antiradikálovou aktivitou syntetickej štandardnej látky, derivátu vitamínu E s názvom Trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová). Zhasťovanie radikálu ABTS^{•+} pomocou antioxidantov, ktoré sa správajú ako donory vodíku sa sleduje spektrofotometricky na základe zmien absorpčného spektra ABTS^{•+}[35].

ABTS bolo rozpustené v destilovanej vode tak, aby mal pripravený roztok koncentráciu 7mM. Pre vytvorenie radikálového kationu bol roztok zmiešaný s peroxodisíranom draselným a bol ponechaný stáť 12 hodín v tme pri laboratórnej teplote. Pred použitím ABTS^{•+} bol roztok nariadený s etanolom na absorbanciu 0,700±0,02 pri vlnovej dĺžke 734 nm oproti etanolu.

Meranie bolo realizované v zúženej kvete, do ktorej bol napipetovaný 1 ml ABTS^{•+} a bolo pridaných 10 µl vzorky. Pokles absorbancie bol zmeraný v desiatej minúte po pridaní vzorky (A_{10}). Ako blank (východzia absorbanca) bol použitý 1 ml ABTS^{•+} a 10 µl destilovanej vody (A_0). Pomocou tejto hodnoty bol určený pokles absorbancie.

Pre stanovenie kalibračnej krivky bol ako štandard použitý roztok Troloxu s koncentráciou v rozmedzí od 50 do 400 µg/ml. Pre výpočet z rovnice bola dosadzovaná hodnota $\Delta A = (A_0 - A_{10})$ a výsledná hodnota antioxidačnej aktivity bola vyjadrená ako ekvivalent Troloxu.

4.7 Identifikácia fenolických látok pomocou HPLC/UV-VIS

Pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s UV-VIS detekciou boli u vybraných etanolových vzoriek extraktov premerané fenolické látky. Pre zostavenie boli použité nasledujúce štandardy: aloenin A, apigenin, daidzein, epikatechin, floridzin, hesperidin, katechin, kvercetín-3-glukozid, kyselina gallová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina kumarová a pelargonidin-3-glukozid chlorid.

Vzorky pre samotnú analýzu boli pripravené pridaním 1 ml hexánu k 1 ml etanolového (20%) extraktu pripraveného podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5. Po premiešaní boli pridané 2 ml 70% metanolu (pripraveného nariadením pomocou Mili-Qvody). Polárna časť bola po vhodnom nariadení prefiltrovaná cez nylonový filter s priemerom 0,45 µm do sklenených vialiek a tie boli následne podrobené analýze.

Tabuľka 3 Parametre analýzy prístroja RP-HPLC/UV-VIS

HPLC zostava	Dionex Ultimate 3 000, Thermo Fisher Scientific
Kolóna	Kinetex 2,6 µm F5 (150 x 4,6 mm)
Predkolóna	C18
Teplota kolóny/autosampleru [°C]	35
Objem nástriku [µl]	20
Doba analýzy [min]	30
Prietok mobilnej fáze (MF) [ml/min]	0,4
Eluce	Gradientová (MF B 10 % → 70 %)
MF A	Mili-Q voda, 0,1 % TFA (trifluorooctová kyselina)
MF B	Acetonitril
Software	Chromeleon

4.8 Príprava lipozómov

K príprave lipozómov boli pripravené extrakty z časti rastlín, ktoré obsahovali najviac polyfenolov a vykazovali dobrú antioxidačnú aktivitu, konkrétne dužina z listov *Aloe vera* a *Opuntia ficus-indica*, ďalej bola použitá šupka z červeného a žltého plodu *Opuntia ficus-indica*. Lipozómy boli pripravené pomocou tyčového ultrazvukového homogenizátoru.

4.8.1 Príprava lipozómov z vodných extraktov

Do kadičky bolo pridaných 10 ml vodného extraktu vzorky, bolo pridaných 90 mg sójového lecitínu a 10 mg cholesterolu. Zmes bola pripravovaná pomocou tyčového ultrazvuku pri účinnosti 50 % v prerušovaných intervaloch 1 minútu za súčasného chladenia kadičky vo vodnom kúpeli.

4.9 Charakterizácia pripravených lipozómov

Po príprave lipozómov bola stanovená ich enkapsulačná účinnosť, bola skúmaná ich veľkosť a stabilita. Ďalej bola testovaná dlhodobá stabilita pri skladovaní pri 8 °C po dobu 3 mesiacov.

4.9.1 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti a dlhodobej stability lipozómov

Po príprave lipozómov boli vzorky zcentrifugované 5 minút pri 6 000 ot/min, následne bol oddelený supernatant, ktorý bol centrifugovaný 1 hodinu pri 14 500 ot/min. Po skončení centrifugácie bol v supernatante stanovený celkový obsah fenolických látok podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.2. Rovnakým spôsobom bola stanovená koncentrácia celkových fenolických látok v roztoku pred enkapsuláciou. Z rozdielov koncentrácie celkových fenolických látok v roztoku pred a po enkapsulácii bola stanovená enkapsulačná účinnosť. Sediment bol rozsuspendovaný v 1 ml destilovanej vody a bola stanovená antioxidačná aktivita podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.4.

Dlhodobá stabilita bola stanovená po 3 mesiacoch s opätovným stanovením obsahu fenolických látok a antioxidačnej aktivity.

4.9.2 Stanovenie veľkosti a stability častíc

DLS metóda (dynamický rozptyl svetla) je jedna z najpoužívanejších techník pre meranie veľkosti častíc. Používa sa hlavne k určeniu distribúcie veľkosti nanočastíc v kvapalnom médiu. Lipozómy boli analyzované v koloidnom analyzátore Malvern Zetasizer Nano ZS.

Roztoky obsahujúce lipozómy boli centrifugované 5 minút pri 6 000 ot/min, následne bol oddelený supernatant, ktorý bol centrifugovaný 1 hodinu pri 14 500 ot/min. Po centrifugácii bol supernatant oddelený a usadené lipozómy boli rozsuspendované v 1 ml destilovanej vody. Rozsuspendované roztoky boli 100krát zriedené, následne bol ich obsah prevedený do kyvety a bola zistená distribúcia veľkosti, priemerná veľkosť a polydisperzita častíc. Stabilita bola zistená pomocou zeta potenciálu.

Do kvety bol napipetovaný 1 ml zriedeného roztoku a bol vložený elektródový nástavec a roztok bol zmeraný. Z hodnôt zeta potenciálu bola stanovená stabilita častíc.

4.10 Kultivácia mikroorganizmov

Ku kultivácii zo skupiny grampozitívnych baktérií boli použité bakteriálne kmene *Micrococcus luteus*, *Propionibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermidis*. Skupina bakteriálnych kmeňov *Serratia marcescens* a *Escherichia coli* patria do skupiny gramnegatívnych baktérií. Tiež bola použitá kvasinka *Candida Glabrata*.

Práca s týmito mikroorganizmami bola realizovaná v sterilnom boxe a kultúry boli očkované na tuhé aj kvapalné médiá. Ich inkubácia trvala 24 hodín a podľa nárokov na kyslík prebiehala ich inkubácia pri 37 °C v termostate s alebo bez trepania.

Pred kultiváciou baktérií boli vždy médiá vysterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom pri 100 °C po dobu 60 minút.

4.10.1 Príprava kultivačných médií

Pre prípravu kultivačných médií pre baktérie kmeňu *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Escherichia coli* bolo používané kultivačné médium NB (Nutrient Broth), kedy bola príprava realizovaná podľa pokynov výrobcu. Na prípravu 50 ml kvapalného média bolo navážených 1,25 g NB média.

Pre prípravu kultivačného média pre baktériu *Propionibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermidis* bolo používané kultivačné médium BHI (Brain Heart Infusion), kedy bola príprava realizovaná podľa pokynov výrobcu. Na prípravu 50 ml kvapalného média bolo navážených 1,85 g BHI média.

Pre prípravu kultivačného média pre kvasinku *Candida Glabrata* bolo použité kultivačné médium YPD (Yeast Extract Powder), kedy bola príprava realizovaná podľa pokynov výrobcu. Na výrobu 50 ml kvapalného média bolo navážených 0,5 g zložky Y a 1 g zložky P (pepton) a D (D–glukóza).

4.11 Antimikrobiálne testy

Pripravené extrakty boli vždy testované na všetkých mikroorganizmoch. V tejto práci boli uskutočňované dva typy antimikrobiálnych testov, a to dilučná metóda a difúzna metóda. Práca s mikroorganizmami bola vždy uskutočňovaná v sterilnom boxe.

4.11.1 Agarová difúzna metóda

Bolo pripravené sterilné médium s agarom, ktoré bolo vyliate na Petriho misky. Po stuhnutí bolo na agarovú platňu napipetovaných 100 µl zriedenej kultúry, ktorá bola rozotrená sterilnou hokejkou. Misky boli ponechané stáť 20 minút. Následne u anaeróbných kultúr bola nanosená ďalšia vrstva sterilného média s agarom. Na záver boli vytvorené do tuhého média diery pomocou špičky a do dier bolo nanosených 10 µl extraktu alebo koncentrovanej vzorky.

Vyhodnotenie bolo prevedené po 24 hodinách kultivácie, pričom boli pozorované inhibičné zóny okolo extraktov a koncentrovaných vzoriek.

4.11.2 Bujónová dilučná metóda

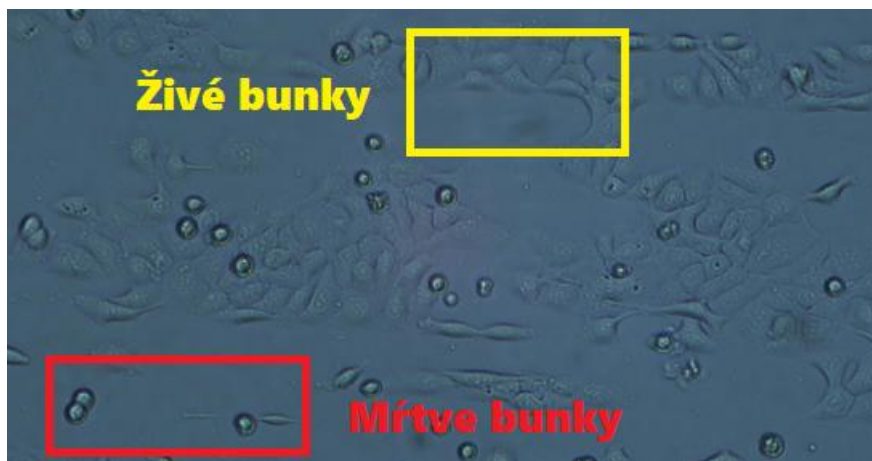
Bujónová dilučná metóda je založená na sledovaní rastu mikroorganizmov na 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke. K pozorovaniu boli použité všetky mikroorganizmy z 24 hodinovej kultivácie. Médium s bunkami bolo napipetované po 150 µl do každej jamky, následne bolo pridaných 50 µl antimikrobiálnej látky (vodné a alkoholové extrakty). Ako blank bolo použité 150 µl zriedenej kultúry a 50 µl rozpúšťadla. Vzrastajúca absorbancia, ktorá vyjadruje rast mikroorganizmov, bola meraná pri 630 nm v čase 0 a po 24 hodinách kultivácie.

4.12 MTT test cytotoxicity

Princíp testu cytotoxicity MTT je založený na tom, že žltý MTT (3–[4,5–dimetyltiazol–2–yl]–2,5–difenyltetrazolium bromid) je zredukovaný mitochondriálnymi enzýmami dýchacieho reťazca buniek

na fialový formazanový derivát. Derivát zostáva vo vnútri buniek vo forme nerozpustných granúl. Po pridaní detergentu SDS (dodecylsírán sodný) sa farbivo uvoľní a rozpustí, čím vznikne fialový roztok, ktorý sa spektrofotometricky meria pri 562 nm^[44].

Pre tento test boli používané bunky adenokarcinomu hrubého čreva Caco-2 po dostatočnom náraste (viď obrázok 7). Bunky boli vhodne zriedené médiom tak, aby ich výsledná koncentrácia bola $1,5 \cdot 10^4$ buniek/100 μ l. Pripravená suspenzia bola pipetovaná po 100 μ l na 96 jamkovú doštičku. Následne bola doštička skontrolovaná pod mikroskopom, či sa nachádzajú bunky s podobnou koncentráciou v každej jamke, po kontrole bola doštička vložená do inkubátoru na 24 hodín (5 % CO₂, vlhkosť, teplota 37 °C). Po inkubácii bolo z jamiek odpipetované médium a bolo pridaných 100 μ l sterilnej vzorky v médiu do každej jamky v rôznych koncentráciách. Potom bola doštička opäť vložená do inkubátoru. Po uplynutí 24 hodín bola vzorka odpipetovaná a do každej jamky bolo napipetovaných 20 μ l MTT s koncentráciou 2,5 mg/ml. Bunky boli znova vložené do inkubátoru a boli kultivované 3 hodiny. Na záver bolo do každej jamky pridaných 100 μ l 10% SDS v PBS. Doštička bola ponechaná v tme pri laboratórnej teplote na 24 hodín. Po 24 hodinách bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 562 nm. Valiabilita buniek bola vypočítaná ako pomer absorbancie vzorky voči kontrole, ktorá obsahovala po celú dobu čisté médium (CC–cell control). Výsledky boli tiež porovnané so vzorkami obsahujúcimi nariedené médium sterilné destilovanou vodou (VC–vehicle control) alebo nariedené médium 70% roztokom etanolu (NC–negative control).



Obrázok 7 Ukážka adhézných Caco-2 buniek v kultivačnej nádobke

5 VÝSLEDKY A DISKUSIE

Táto práca bola zameraná na štúdium antioxidantných, antimikrobiálnych vlastností vybraných rastlinných materiálov. Tiež bol sledovaný obsah aktívnych látok a z pripravených extraktov boli pripravené lipozómy, u ktorých bola stanovená stabilita, veľkosť, enkapsulačná účinnosť a dlhodobá stabilita. V práci boli identifikované fenolické látky pomocou HPLC/UV a bol vykonaný test MTT cytotoxicity na ľudských bunkách adenokarcinomu hrubého čreva.

K analýze boli vybrané časti rastlín z *Aloe vera* a *Opuntia ficus-indica*. Na záver bol na základe výsledkov zostavený potenciálny kozmetický a potravinársky výrobok obsahujúci aktívne zlúčeniny z týchto rastlín.

5.1 Charakterizácia extraktov

Boli pripravované vodné a alkoholové extrakty z rôznych častí rastlín *Aloe vera* a *Opuntia ficus-indica*. Bolo navážených 0,5 g vzorky, ktoré boli následne 24 hodín extrahované na trepačke pri 37 °C. U testovaných extraktov bola pozorovaná a stanovená celková koncentrácia fenolických látok a u niektorých celková koncentrácia flavonoidov. Tiež bola stanovená antioxidantná aktivita extraktov.

5.1.1 Vážkové stanovenie sušiny

Pri stanovení sušiny vážkovou metódou bolo postupované podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.1. V tabuľke 3 sú uvedené vypočítané hodnoty sušiny v 1 grame rastliny.

Tabuľka 3 Obsah sušiny v jednotlivých častiach rastlín

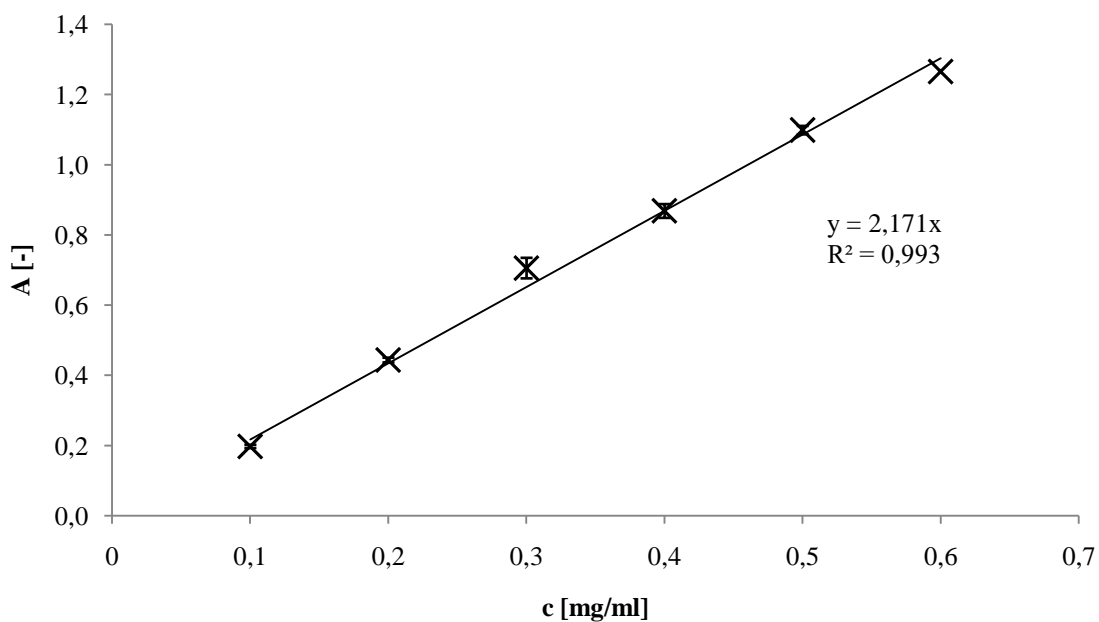
ČASŤ RASTLINY	W _{sušina} [%]
<i>Aloe vera</i> (dužina)	0,36
<i>Aloe vera</i> (šupka)	4,90
<i>Op. ficus-indica</i> list (dužina)	3,22
<i>Op. ficus-indica</i> list (šupka)	6,75
<i>Op. ficus-indica</i> plod červený (dužina)	24,05
<i>Op. ficus-indica</i> plod červený (šupka)	5,59
<i>Op. ficus-indica</i> plod žltý (dužina)	18,21
<i>Op. ficus-indica</i> plod žltý (šupka)	21,78

Obsah sušiny v jednotlivých častiach rastlín výrazne kolíše. Najväčší obsah vody, a to 99,64 % obsahovala dužina z *Aloe vera*^[9], kedy sa jednalo o gélovitú časť rastliny. Naproti tomu najnižší obsah vody vykazovala dužina z červeného plodu *Opuntia ficus-indica*, a to 75,95 %. Mohlo to byť spôsobené najmä z dôvodu, že tento plod obsahoval vo svojej dužine veľké množstvo semien.

5.1.2 Stanovenie celkovej koncentrácie fenolických látok

Stanovenie fenolických látok bolo prevedené pomocou reakcie s Follin-Ciocalteovým činidlom, kde ako štandard bola použitá kyselina gallová^[35]. Pri určovaní celkovej koncentrácie fenolických látok všetkých extraktov bola zostrojená kalibračná závislosť (viď obrázok 8).

Celková koncentrácia fenolických látok vo vodných a alkoholových extraktoch pripravených podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.2 bola stanovená spektrofotometricky a bola vypočítaná z lineárnej regresie kalibračnej závislosti. Všetky merania boli prevedené trikrát, z ktorých bol následne vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Výsledná koncentrácia bola prepočítaná na miligram celkového obsahu fenolických látok na gram sušiny v rastline.

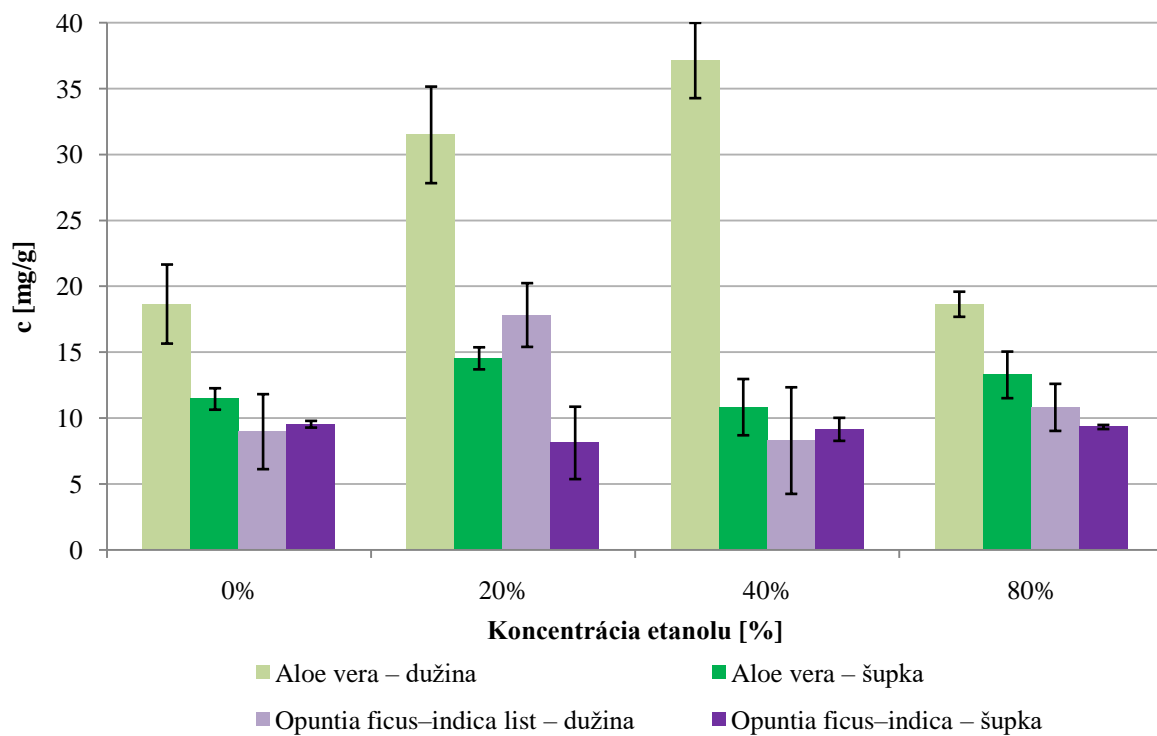


Obrázok 8 Kalibračná závislosť pre stanovenie celkových fenolických látok

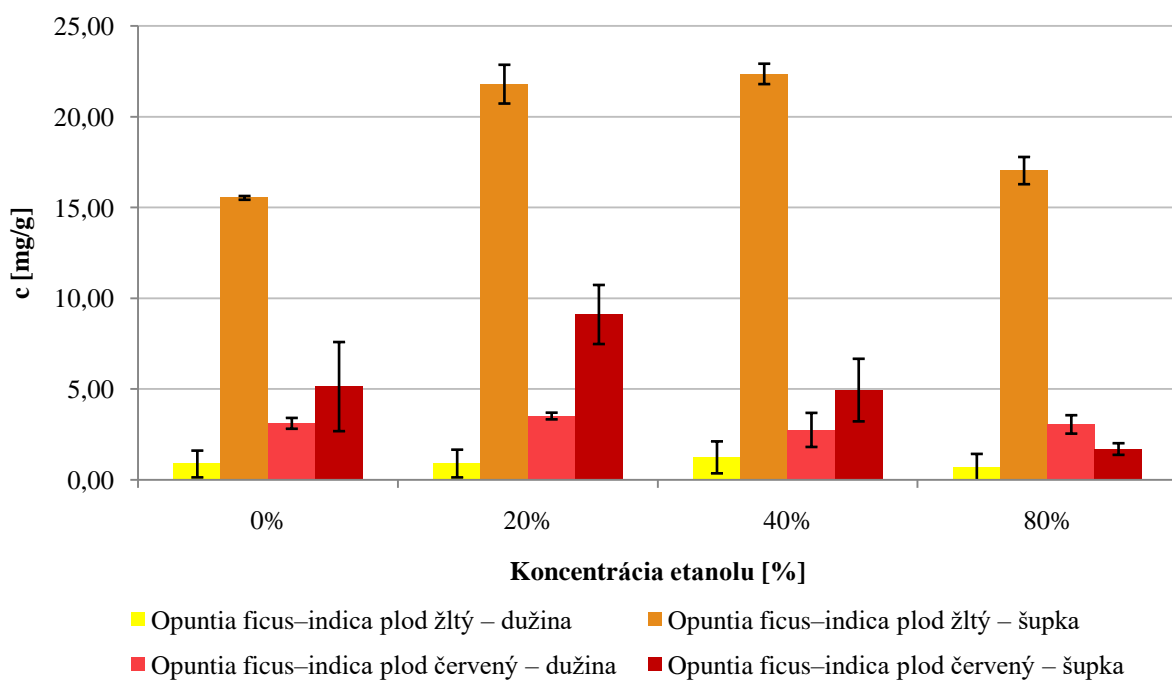
Tabuľka 4 Výsledné celkové koncentrácie fenolických látok v extraktoch

	Etanolový extrakt	<i>Aloe vera</i> (list)	<i>Opuntia ficus indica</i> (list)	<i>Opuntia ficus indica</i> (plod žltý)	<i>Opuntia ficus indica</i> (plod červený)
dužina	0%	18,66±3,00	8,98±2,84	0,87±0,74	3,11±0,30
	20%	31,49±3,66	17,83±2,42	0,90±0,76	3,52±0,18
	40%	37,13±2,86	8,31±4,04	1,24±0,88	2,75±0,94
	80%	18,65±0,95	10,83±1,78	0,68±0,75	3,05±0,51
šupka	0%	11,46±0,81	9,55±0,26	15,53±0,10	5,14±2,45
	20%	14,55±0,84	8,13±2,75	21,79±1,07	9,11±1,63
	40%	10,84±2,13	9,16±0,87	22,35±0,56	4,95±1,72
	80%	13,29±1,77	9,34±0,16	17,03±0,75	1,70±0,32

V tabuľke 4 a v obrázku 9 a 10 sú uvedené výsledky merania obsahu fenolických látok po dosadení nameraných hodnôt absorbcie do rovnice kalibračnej krivky $y = 2,171x$ uvedenej v obrázku 8.



Obrázok 9 Obsah fenolických látok v extraktoch listov rastlín



Obrázok 10 Obsah fenolických látok v extraktoch plodov rastliny *Opuntia ficus-indica*

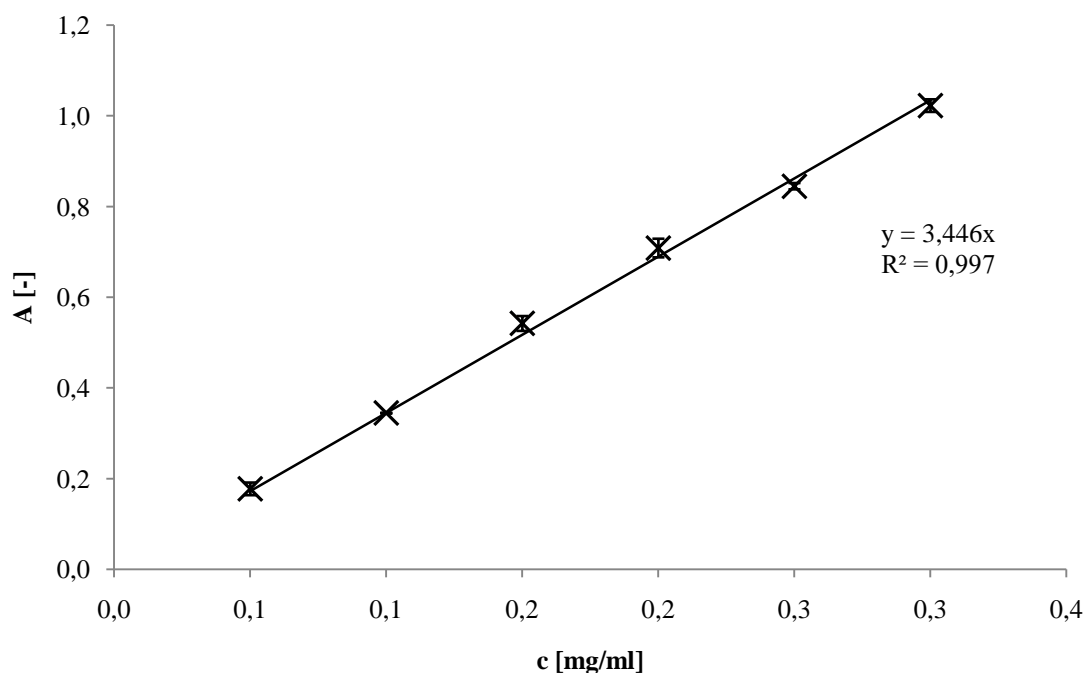
Obsah celkového obsahu fenolických látok v *Aloe vera* sa pohyboval v rozmedzí od 10,84–37,13 mg/g sušiny rastliny. V liste *Opuntia ficus-indica* bol obsah fenolických látok stanovený v rozmedzí od 8,13–17,83 mg/g sušiny rastliny. U žltého plodu to bolo od 0,68–22,35 mg/g sušiny rastliny a u červeného plodu sa obsah polyfenolov pohyboval od 1,70–9,11 mg/g sušiny rastliny.

Z uvedených výsledkov je vidieť, že najvyšší obsah polyfenolov v *Aloe vera* sa nachádza v dužine listu, pričom medzi alkoholovými extraktmi nie je príliš veľký rozdiel. Je zaujímavé, že šupka zo žltého plodu rastliny dosahovala niekoľkonásobne vyšší obsah celkových polyfenolov ako jej dužina. Z grafov je vidieť, že rozdiel uvoľnených polyfenolov v rôznych alkoholových extraktoch bol minimálny. Avšak k najúčinnejšej extrakcii dochádzalo pri použití 40% etanolu, najmä u dužiny z *Aloe vera*, a to 27,04 mg/g sušiny v rastline. Najnižšia koncentrácia celkových polyfenolov bola stanovená v dužine žltého plodu *Opuntia ficus-indica*, a to konkrétne v 80% etanole bol stanovený obsah na 0,68 mg/g sušiny v rastline.

5.1.3 Stanovenie celkovej koncentrácie flavonoidov

Stanovenie flavonoidov bolo prevedené pomocou reakcie hlinitej soli s dusitanom, kde ako štandard bol použitý katechín^[35]. Pri určovaní celkovej koncentrácie flavonoidov vo vybraných extraktoch bola zostrojená kalibračná závislosť (viď obrázok 11), podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.3.

Boli vybrané vzorky z červeného a žltého plodu *Opuntia ficus-indica*, ktoré obsahovali väčšie množstvo celkových fenolických látok a tiež obsahovali farebné pigmenty žltej a červenej farby. U ostaných vzorkách bola koncentrácia flavonoidov veľmi nízka alebo nebola detekovaná. U vybraných vzoriek bola teda stanovená ich celková koncentrácia flavonoidov vo vodných a alkoholových extraktoch pripravených podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.3. Obsah flavonoidov bol stanovený spektrofotometricky a bol vypočítaný z lineárnej regresie kalibračnej závislosti. Všetky merania boli prevedené trikrát, z ktorých bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Výsledná koncentrácia bola prepočítaná na miligramy flavonoidov na gram sušiny v rastline. V tabuľke 5 sú uvedené hodnoty koncentrácie flavonoidov v extraktoch vo vybraných častiach rastlín.

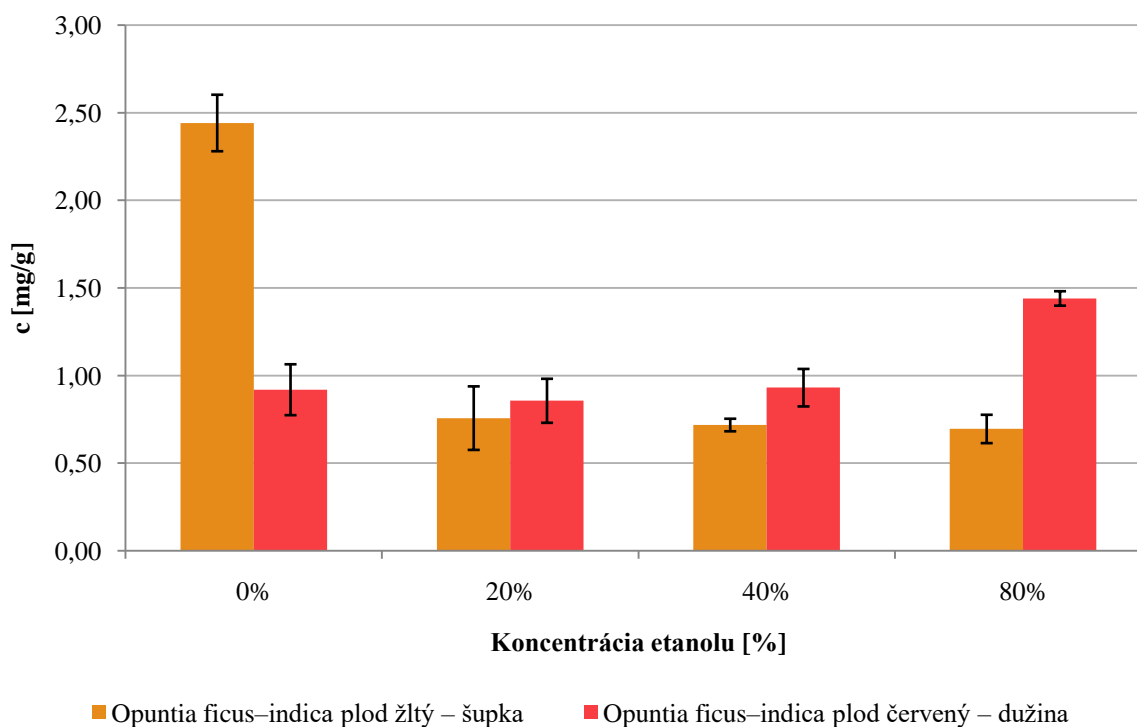


Obrázok 11 Kalibračná závislosť pre stanovenie celkových flavonoidov

Tabuľka 5 Výsledné celkové koncentrácie flavonoidov v extraktoch

Časť rastliny	Etanolový extrakt	c [mg/g]
<i>Opuntia ficus-indica</i> (plod červený-dužina)	0%	0,92±0,15
	20%	0,86±0,13
	40%	0,93±0,11
	80%	1,44±0,04
<i>Opuntia ficus-indica</i> (plod žltý-šupka)	0%	2,44±0,16
	20%	0,76±0,18
	40%	0,72±0,04
	80%	0,70±0,08

V tabuľke 5 a v obrázku 12 sú uvedené výsledky merania po dosadení nameraných hodnôt absorbancie do rovnice kalibračnej krivky $y = 3,446x$ uvedenej v obrázku 11.

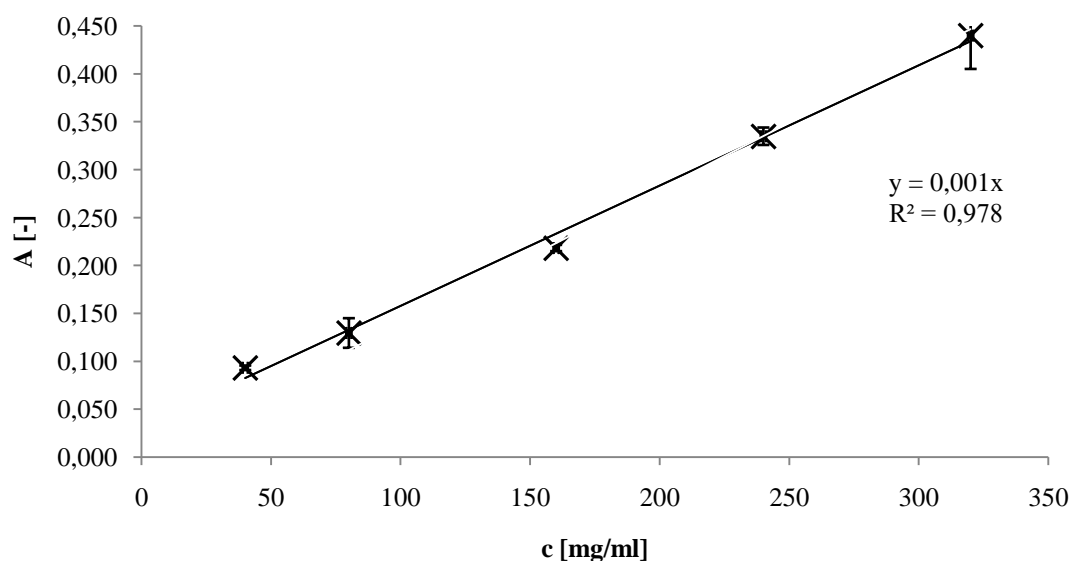


Obrázok 12 Obsah flavonoidov v extraktoch vybraných častí rastlín

Z grafu (viď obrázok 12) je vidieť, že obsah flavonoidov v plodoch *Opuntia ficus-indica* bol porovnateľný a rozdiely v alkoholových extraktoch boli opäť minimálne. Obsah flavonoidov v šupke žltého plodu sa pohybuje v rozmedzí od 0,70–2,44 mg/g sušiny v rastline a v červenom plode to bolo v rozmedzí od 0,86–1,44 mg/g sušiny v rastline. Najviac účinné bolo extrahovanie pomocou vodného rozpúšťadla, kedy bol stanovený celkový obsah flavonoidov v šupke žltého plodu *Opuntia ficus-indica* na 2,44 mg/g sušiny v rastline, najmenej flavonoidov bolo stanovených v 80% etanole tej istej časti rastliny na 0,70 mg/g sušiny v rastline.

5.1.4 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Stanovenie antioxidačnej aktivity u všetkých pripravených extraktoch podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5 bolo prevedené pomocou ABTS podľa postupu uvedeného v kapitole 4.6.4.



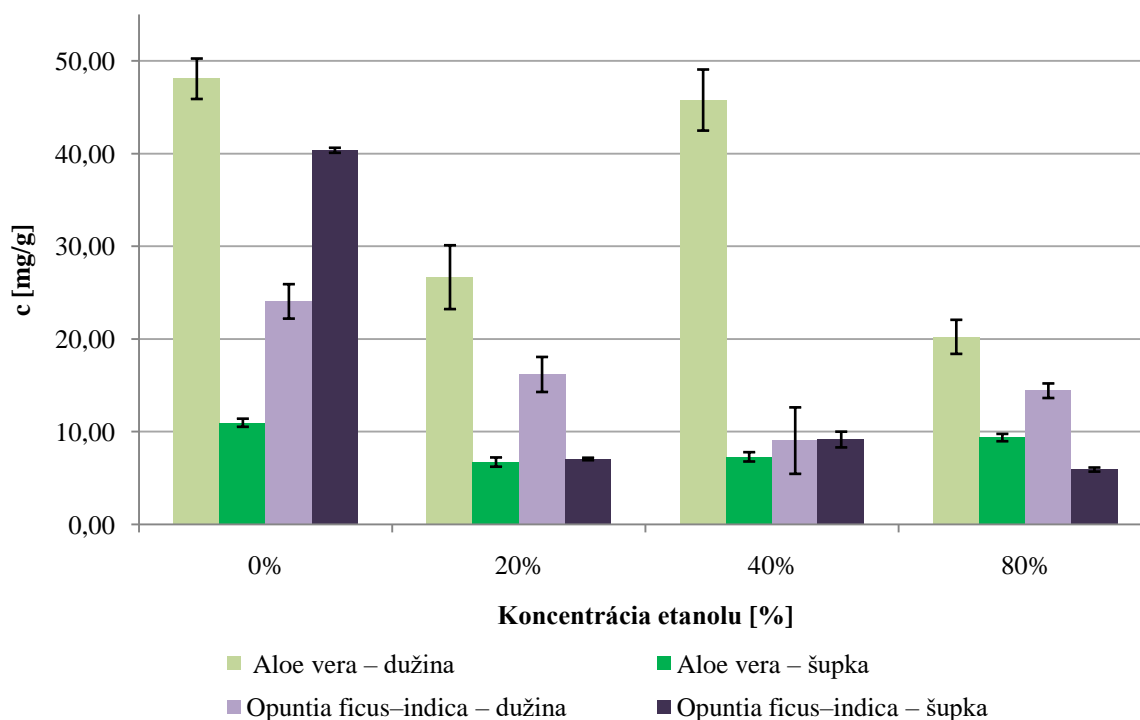
Obrázok 13 Kalibračná závislosť pre stanovenie antioxidantnej aktivity

Celková antioxidantná aktivita vzoriek bola stanovená spektrofotometricky a bola vypočítaná z lineárnej regresie kalibračnej závislosti (viď obrázok 13). Každá vzorka bola meraná 3krát a hodnoty boli spriemerované a tiež bola vypočítaná smerodajná odchýlka. Výsledný obsah antioxidantov bol prepočítaný na miligramy antioxidantov na gram sušiny v rastline.

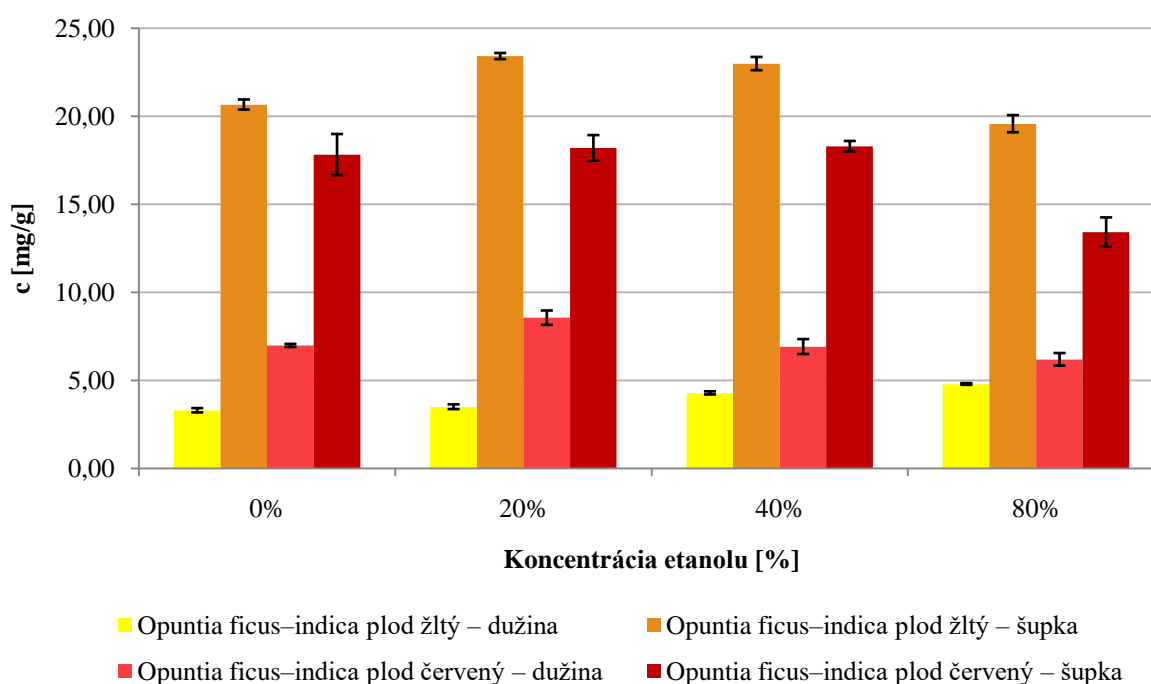
Tabuľka 6 Obsah antioxidantov v extraktoch

	Etanolový extrakt	<i>Aloe vera</i> (list)	<i>Opuntia ficus indica</i> (list)	<i>Opuntia ficus indica</i> (plod žltý)	<i>Opuntia ficus indica</i> (plod červený)
		c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]	c [mg/g]
dužina	0%	48,09±8,26	24,07±1,86	3,30±0,12	6,98±0,09
	20%	26,68±3,44	16,19±1,89	3,50±0,13	8,55±0,41
	40%	45,79±3,29	9,06±3,59	4,28±0,09	6,91±0,43
	80%	20,25±1,84	14,44±0,79	4,79±0,05	6,19±0,36
šupka	0%	10,98±0,44	40,37±0,27	20,66±0,29	17,82±1,17
	20%	6,74±0,50	7,07±0,13	23,41±0,17	18,20±0,73
	40%	7,31±0,50	9,17±0,85	22,99±0,38	18,30±0,29
	80%	9,39±0,40	5,93±0,22	19,57±0,49	13,42±0,83

V tabuľke 6 a v obrázku 14 a 15 sú uvedené výsledky merania obsahu antioxidantov po dosadení nameraných hodnôt absorpcie do rovnice kalibračnej krivky $y = 0,001x$ uvedenej v obrázku 13.



Obrázok 14 Obsah antioxidantov v extraktoch listov rastlín



Obrázok 15 Obsah antioxidantov v extraktoch plodov rastliny *Opuntia ficus-indica*

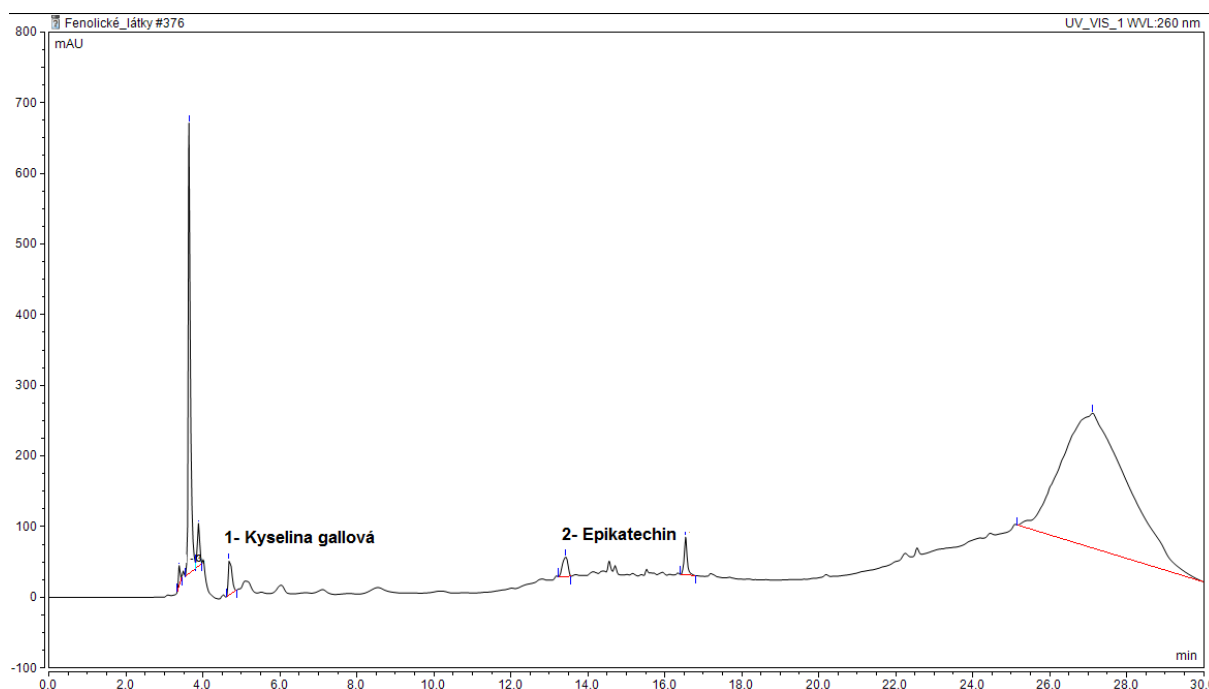
Z nameraných a vypočítaných hodnôt je vidieť, že najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovala dužina z *Aloe vera*, a to vo vodnom rozpúšťadle, kde obsah antioxidantov dosahoval 48,09 mg/g sušiny v rastline, pričom v tejto časti rastliny bol zaznamenaný aj navyšší obsah celkových fenolických látok. Vysokú antioxidačnú aktivitu vykazovala aj dužina listu a taktiež šupka z plodov rastliny *Opuntia ficus-indica*. Nižšiu antioxidačnú aktivitu vykazovala šupka z *Aloe vera*

a *Opuntia ficus-indica*. Najnižší obsah antioxidantov bol zaznamenaný v dužine plodov, konkrétne v dužine žltého plodu *Opuntia ficus-indica*, kde bolo stanovenie určené na 3,30 mg/g sušiny v rastline. Celkovo obsah antioxidantov bol zaznamenaný v rozmedzí od 3,30–43,64 mg/g. V dužinách listov a šupkách plodov bol zároveň zaznamenaný vysoký obsah celkových polyfenolov.

5.2 Identifikácia fenolických látok pomocou HPLC/UV

Pre stanovenie vybraných individuálnych fenolických látok bola použitá metóda RP–HPLC s UV–VIS detekciou. Vzorky boli pripravené podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5 a analýza prebiehala podľa parametrov uvedených v kapitole 4.7. Výsledné koncentrácie jednotlivých fenolických látok sú vypočítané z externých kalibračných závislostí vybraných štandardov. Vzorky boli premerané 2krát a výsledné koncentrácie sú uvedené ako priemer z oboch meraní a sú vzťahované na gram sušiny materiálu.

U vzoriek etanolového extraktu dužiny červeného plodu *Opuntia ficus-indica* boli identifikované iba dve fenolické látky z rady vybraných štandardov. Konkrétne sa jednalo o kyselinu gallovú (0,110 µg/g) a epikatechin (28,194 µg/g). Z chromatogramu (viď obrázok 16) je zrejmé, že došlo k elúcii aj iných látok, ktoré neboli identifikované. U vzoriek dužiny listu *Aloe vera* neboli bohužiaľ detekované žiadne nami vybrané fenolické látky, aj keď sa očakávalo zastúpenie špecifického aloeninu A. Je preto nutné zvážiť prípadné zakoncentrovanie vzorky, napríklad pomocou lyofilizátora.



Obrázok 16 Chromatogram vzorky dužiny červeného plodu *Opuntia ficus-indica*

5.3 Príprava častíc

Na základe charakterizácie extraktov boli vybrané 4 vzorky (dužina z listov, šupka z plodov) s vysokým obsahom celkových polyfenolov a vysokou antioxidačnou aktivitou, z ktorých boli pripravené lipozómy. Príprava bola realizovaná podľa postupu uvedeného v kapitole 4.7.1. Boli pripravené iba vodné extrakty vzoriek s koncentráciou 0,1 g/ml. Celkom boli pripravené 4 rôzne druhy lipozómov.

5.3.1 Stanovenie veľkosti pripravených častíc

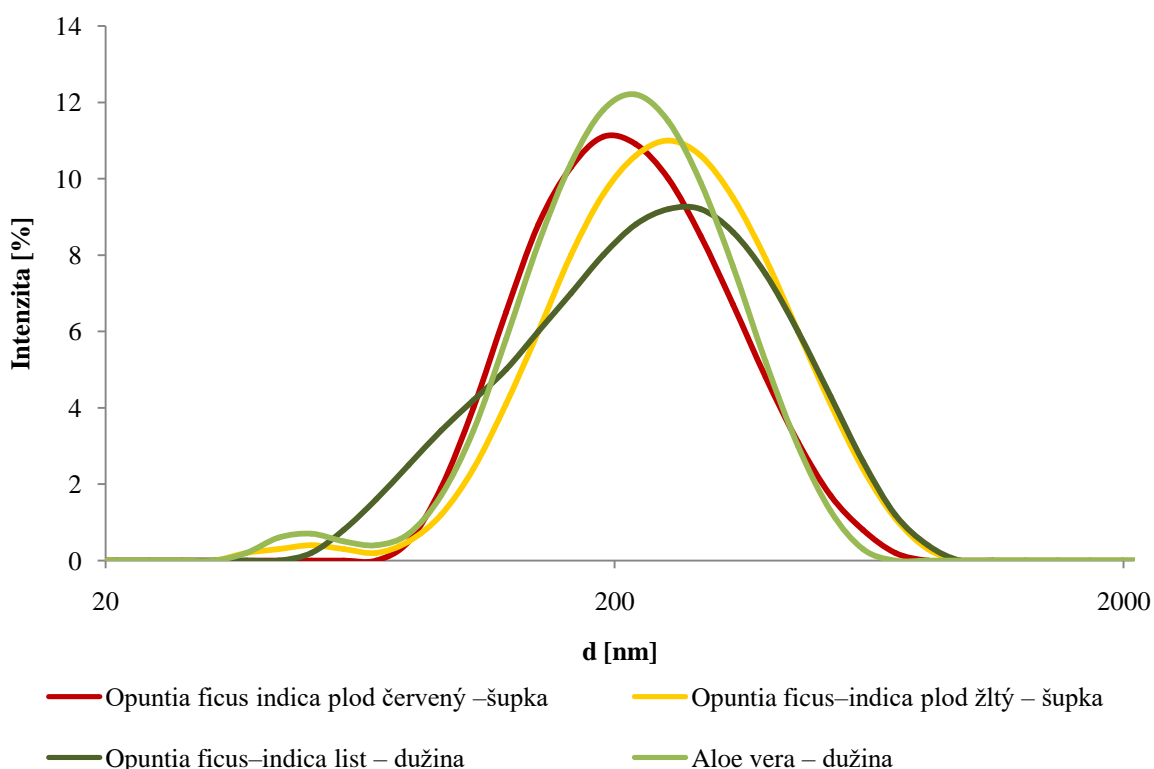
Pre stanovenie veľkosti a distribúcie veľkosti bolo postupované podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.2. Všetky merania boli prevedené 3krát a získané hodnoty boli spriemerované a tiež bola

vypočítaná smerodajná odchýlka. V tabuľke 7 sú uvedené hodnoty polydisperzity a priemerná veľkosť častíc. Na obrázku 17 je vidieť grafické znázornenie distribúcie veľkostí častíc.

Tabuľka 7 Priemerná veľkosť a intenzita distribúcie vodných lipozómov

Časť rastliny	Vodné lipozómy	
	PDI	θ veľkosť [nm]
<i>Aloe vera</i> (dužina)	0,284±0,024	212,5±4,9
<i>Opuntia ficus-indica</i> list (dužina)	0,332±0,020	218,1±1,3
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod žltý (šupka)	0,337±0,029	267,5±5,8
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod červený (šupka)	0,296±0,005	219,4±1,2

Najmenšia priemerná veľkosť častíc pripravených pomocou ultrazvukovej metódy sa v prípade *Aloe vera* pohybovala v rozmedzí od 37,84–712,4 nm. Veľkosť častíc pripravených z listu *Opuntia ficus-indica* bol zaznamenaný v rozmedzí od 50,75–825,0 nm, u žltého plodu to bolo od 37,84–825,0 nm a v prípade červeného plodu sa veľkosť častíc pohybovala v rozmedzí od 78,82–712,4 nm. Na základe polydisperzity môžu byť považované všetky pripravené častice za uniformné. Lipozómy s enkapsulovaným vodným extraktom *Aloe vera* mali najmenšiu priemernú veľkosť, a to 212,5±4,9 nm. Tieto lipozómy najviac vykazovali najnižšiu polydisperzitu, a to 0,284±0,024.



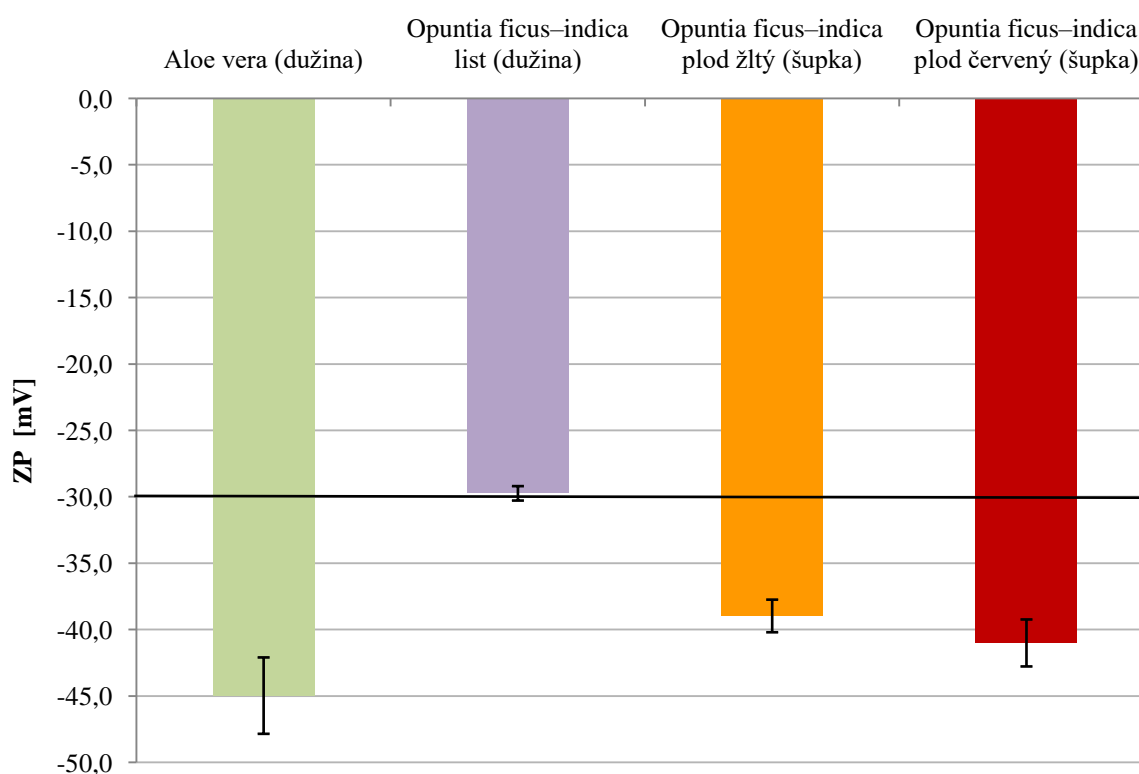
Obrázok 17 Závislosť intenzity rozptylu svetla na veľkosti a distribúcii častíc jednotlivých vzoriek

5.3.2 Stanovenie stability pripravených častíc

Stabilita lipozómov bola stanovená v čase prípravy častíc a po 3 mesiacoch podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.2. Všetky merania boli prevedené 3krát a získané hodnoty boli spriemerované a tiež bola vypočítaná smerodajná odchýlka. V tabuľke 8 a obrázku 18 a 19 sú uvedené priemerné hodnoty zeta potenciálu lipozómov.

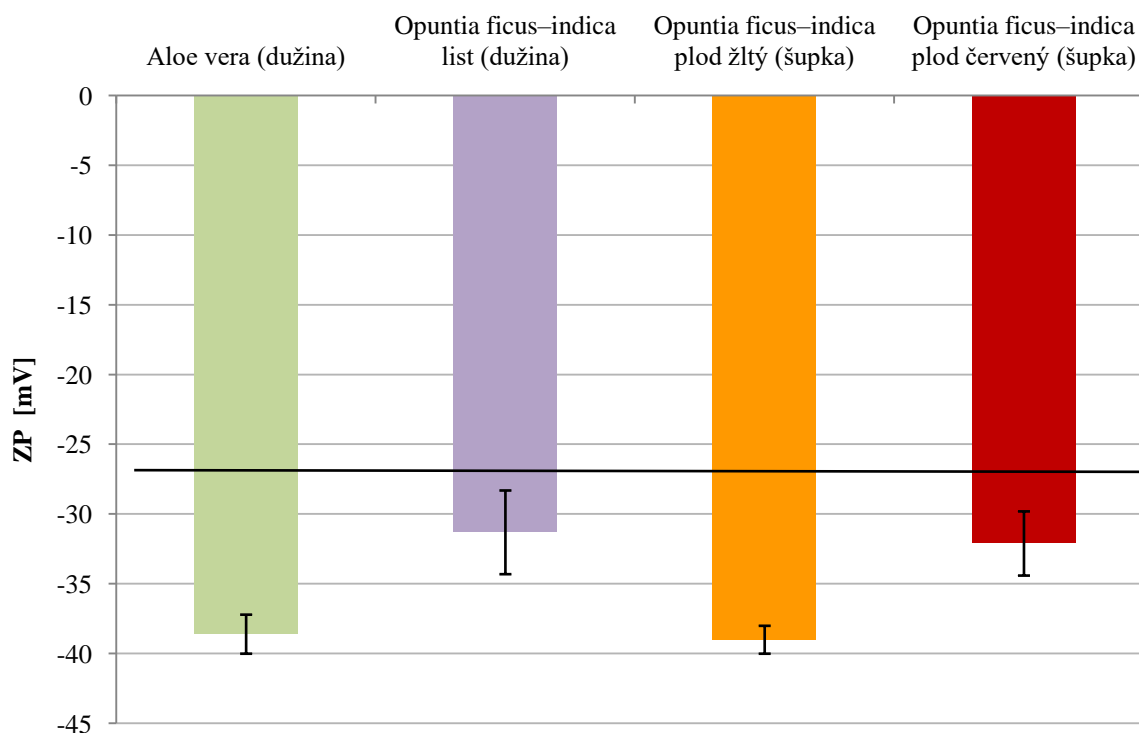
Tabuľka 8 Priemerná hodnota zeta potenciálu vodných lipozómov

Časť rastliny	ZP [mV] v čase prípravy	ZP [mV] po 3 mesiacoch
<i>Aloe vera</i> (dužina)	-45,0±2,9	-38,6±1,4
<i>Opuntia ficus-indica</i> list (dužina)	-29,7±0,5	-31,3±3,0
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod žltý (šupka)	-39,0±1,2	-39,0±1,0
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod červený (šupka)	-41,0±1,8	-32,1±2,3



Obrázok 18 Stabilita pripravených častíc – hodnota zeta potenciálu v čase prípravy

V rozmedzí -30 mV až 30 mV sú častice nestabilné. Všetky lipozomy vykazujú záporný náboj a nachádzajú sa skoro všetky pod hranicou -30 mV. Z nameraných hodnôt môžeme povedať, že okrem dužiny z listu *Opuntia ficus-indica*, ktorá bola najmenej stabilná -29,7±0,5 mV sú všetky pripravené lipozomy veľmi dobre stabilné. Najvyššia stabilita bola zistená u lipozómov vytvorených z dužiny *Aloe vera*, ktorá dosahovala hodnotu -45,0±2,9 mV. U červeného plodu bol zeta potenciál stanovený na -41,0±1,8 mV, v prípade žltého to bolo -39,0±1,2 mV.



Obrázok 19 Stabilita pripravených častíc – hodnota zeta potenciálu po 3 mesiacoch

Po dobu 3 mesiacoch bol opäť zmeraný zeta potenciál pripravených lipozómov, ktorý je zobrazený na obrázku 19. Vzorky boli uskladnené vo vodnom prostredí a pri teplote 8 °C. Dobrou správou je, že všetky pripravené lipozómy boli po 3 mesiacoch stabilné. U vzoriek z *Aloe vera* ($-38,6 \pm 1,4$ mV) a červeného plodu *Opuntia ficus-indica* ($-32,1 \pm 2,3$ mV) bol zaznamenaný pokles stability častíc. V prípade žltého plodu rastliny ($-39,0 \pm 1,0$ mV) a dužiny listu *Opuntia ficus-indica* ($-31,3 \pm 3,0$), bola hodnota stability rovnaká ako na počiatku merania. Celkovo môžeme tvrdiť, že stabilita častíc ostala zachovaná.

5.3.3 Stanovenie enkapsulačnej účinnosti lipozómov

Bola stanovená enkapsulačná účinnosť vodných lipozómov vybraných extraktov podľa postupu uvedeného v kapitole 4.8.1. Vzorky lipozómov boli pripravené podľa postupu z kapitoly 4.7.1. Enkapsulačná účinnosť bola stanovovaná z hľadiska celkového množstva fenolických látok a antioxidačnej aktivity. Z týchto hodnôt bola vypočítaná enkapsulačná účinnosť a bola vyjadrená v percentách. Pre každú vzorku bolo meranie opakované 3krát a zo získaných hodnôt bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka, získané výsledky sú uvedené v tabuľke 9.

Tabuľka 9 Enkapsulačná účinnosť lipozómov

Časť rastliny	EU [%] Obsah celkových polyfenolov	EU [%] Antioxidačná aktivita
<i>Aloe vera</i> (dužina)	6,17 ± 2,06	37,64 ± 2,71
<i>Opuntia ficus-indica</i> (dužina)	52,81 ± 0,92	83,01 ± 1,04
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod červený (šupka)	58,14 ± 0,41	89,64 ± 0,66
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod žltý (šupka)	69,03 ± 0,10	83,40 ± 0,31

Z výsledkov je vidieť, že najvyššia enkapsulačná účinnosť bola zaznamenaná u lipozómov vytvorených zo šupky žltého plodu *Opuntia ficus-indica*, a to $69,03 \pm 0,10$ %. Naopak najnižšiu enkapsulačnú účinnosť vykazovali lipozómy z dužiny listu *Aloe vera* a to $6,17 \pm 2,06$ %.

Z hľadiska antioxidačnej aktivity bola najvyššia enkapsulačná účinnosť nameraná u šupky z červeného plodu *Opuntia ficus-indica*, konkrétne $89,64 \pm 0,66$ %. Najnižšiu enkapsulačnú účinnosť opäť vykazovala dužina z listu *Aloe vera*, a to $37,64 \pm 2,71$ %.

5.3.4 Stanovenie dlhodobej stability lipozómov

Pre stanovenie dlhodobej stability bolo postupované podľa postupu v kapitole 4.8.1. Stabilita bola skúmaná po 3 mesiacoch od prípravy lipozómov uchovávaných vo vodnom prostredí pri 8°C . Stabilita bola analyzovaná z hľadiska obsahu celkových polyfenolov a antioxidačnej aktivity, ktoré zostali enkapsulované v lipozómoch. Všetky vzorky boli premerané 3krát, následne bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Výsledné množstvá sú uvedené v percentách v tabuľke 10.

Z tabuľky 10 je vidieť, že dlhodobá stabilita pripravených lipozómov z hľadiska fenolických látok je celkom vysoká. Lipozómy vytvorené zo šupky žltého plodu *Opuntia ficus-indica* vykazovali najlepšiu stabilitu, a to $86,03 \pm 0,21$ %. Najnižšia stabilita bola zaznamenaná u lipozómov vytvorených z dužiny listu *Opuntia ficus-indica*, konkrétne $54,89 \pm 0,92$ %.

Z hľadiska antioxidačnej aktivity bola najvyššia stabilita zaznamenaná v lipozómoch vytvorených z červenej šupky *Opuntia ficus-indica*, ktorá vykazovala dlhodobú stabilitu $75,39 \pm 0,25$ %. Naopak najnižšia dlhodobá stabilita bola nameraná v lipozómoch vytvorených z dužiny *Aloe vera*, ktorá bola stanovená na $39,22 \pm 6,12$ %.

Tabuľka 10 Dlhodobá stabilita lipozómov

Časť rastliny	EU [%] Obsah fenolických látok	EU [%] Antioxidačná aktivita
<i>Aloe vera</i> (dužina)	$67,97 \pm 29,11$	$39,22 \pm 6,12$
<i>Opuntia ficus-indica</i> (dužina)	$54,89 \pm 0,92$	$43,66 \pm 1,28$
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod červený (šupka)	$57,86 \pm 0,62$	$75,39 \pm 0,25$
<i>Opuntia ficus-indica</i> plod žltý (šupka)	$86,03 \pm 0,21$	$53,64 \pm 0,12$

Celkové výsledky dlhodobej stability môžeme považovať za dobré, pretože v lipozómoch sa stále nachádzalo množstvo aktívnych látok. Výsledky sú priaznivé aj vďaka dobrej stabilite častíc, čo bolo dokázané meraním zeta potenciálu po 3 mesiacoch. Vzorky boli uskladnené pri teplote 8°C po dobu 3 mesiace, pričom ich dlhodobá stabilita sa pohybovala v rozmedzí od $54,89 \pm 0,92\%$ do $86,03 \pm 0,21\%$ z hľadiska celkových polyfenolov. U antioxidačnej aktivity boli tieto hodnoty mierne nižšie, ale stále sa dajú považovať za dobré, pohybovali sa v rozmedzí od $39,22 \pm 6,12$ % do $75,39 \pm 0,25$ %.

Straty aktívnych častíc mohli byť spôsobené nedokonalou izoláciou z lipozómov, tiež mohlo dôjsť k čiastočnej degradácii enkapsulovaných zložiek. Ďalej nemuselo dôjsť k dokonalému uvoľneniu enkapsulovaných častíc pri stanovovaní celkových polyfenolov a antioxidačnej aktivity, kde vďaka stabilným časticiam nedochádzalo k ich degradácii.

5.4 Antimikrobiálne testy

V práci bola skúmaná aj antimikrobiálna aktivita rastlinných extraktov a koncentrovaných vzoriek. Testy boli vykonávané proti bakteriálnym kmeňom *Micrococcus luteus*, *Propionibacterium acnes*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* a kvasinke *Candida Glabrata*. Boli vykonané dva druhy testov, a to difúzna metóda podľa postupu v kapitole 4.10.1 a dilučná metóda podľa postupu v kapitole 4.10.2. U oboch metód boli použité extrakty skúmaných častíc rastlín pripravených podľa postupu uvedeného v kapitole 4.5.

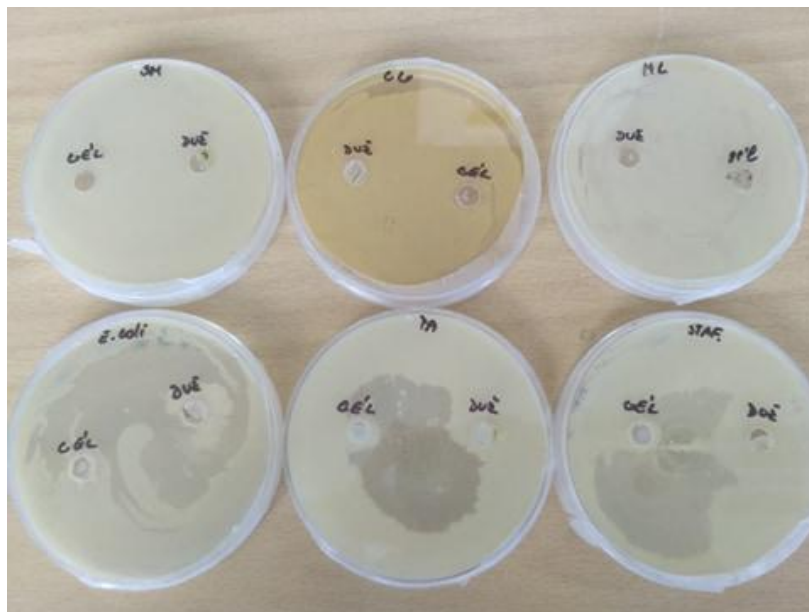
5.4.1 Difúzna metóda

Pri skúmaní antimikrobiálnej aktivity difúznou metódou boli použité extrakty vodné a s rastúcou koncentráciou etanolu, tiež boli použité koncentrované vzorky z dužiny *Aloe vera*.



Obrázok 20 Inhibičné zóny extraktov

U ani jedného extraktu nebola nameraná inhibičná zóna, v niektorých prípadoch bolo vidieť, že extrakty podporujú rast mikroorganizmov.



Obrázok 21 Inhibičné zóny koncentrovaných vzoriek dužiny *Aloe vera*

V prípade bakteriálnych kultúr *Escherichia Coli*, *Staphylococcus epidermidis* a *Propionibacterium acnes* bola zaznamenaná inhibičná zóna. Je zrejmé, že koncentrovaná vzorka

dužiny z *Aloe vera* má antimikrobiálne účinky. Z tohto dôvodu bola prevedená aj dilučná metóda k bližšiemu skúmaniu antimikrobiálnej aktivity.

5.4.2 Dilučná metóda

Pri skúmaní antimikrobiálnej aktivity boli použité extrakty vodné a s rastúcou koncentráciou etanolu. Extrakty mali koncentráciu 0,1 g/ml.

Tabuľka 11 Porovnanie antimikrobiálnej účinnosti proti *Propionibacterium acnes* a *Candida glabrata*

	<i>Propionibacterium acnes</i>				<i>Candida glabrata</i>			
	0%	20%	40%	80%	0%	20%	40%	80%
Aloe vera šupka	–	–	–	+	+	+	–	–
Aloe vera dužina	–	+	–	+	–	–	–	–
Opuntia list šupka	–	+	–	–	–	–	–	+
Opuntia list dužina	–	–	–	–	+	–	–	–
Op. žltá šupka	–	–	–	+	+	+	–	–
Op. žltá dužina	–	–	–	–	–	–	–	+
Op. červená šupka	–	–	–	+	+	–	–	+
Op. červená dužina	–	–	–	++	+	–	+	+

+++ (účinnosť nad 70%); ++ (účinnosť nad 50%); + (účinnosť pod 50%); – (neúčinné)

Tabuľka 12 Porovnanie antimikrobiálnej účinnosti proti *Escherichia Coli* a *Serratia marcescens*

	<i>Escherichia Coli</i>				<i>Serratia marcescens</i>			
	0%	20%	40%	80%	0%	20%	40%	80%
Aloe vera šupka	+	+	–	+	–	+	–	+++
Aloe vera dužina	+	–	–	+	–	+	+	++
Opuntia list šupka	+	–	–	+	–	–	–	+
Opuntia list dužina	+	–	+	–	–	–	–	+
Op. žltá šupka	–	–	–	–	–	–	+	++
Op. žltá dužina	–	–	+	–	–	–	–	+
Op. červená šupka	–	–	–	–	–	–	–	+
Op. červená dužina	–	–	–	–	–	–	–	+

+++ (účinnosť nad 70%); ++ (účinnosť nad 50%); + (účinnosť pod 50%); – (neúčinné)

Tabuľka 13 Porovnanie antimikrobiálnej účinnosti proti *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus epidermidis*

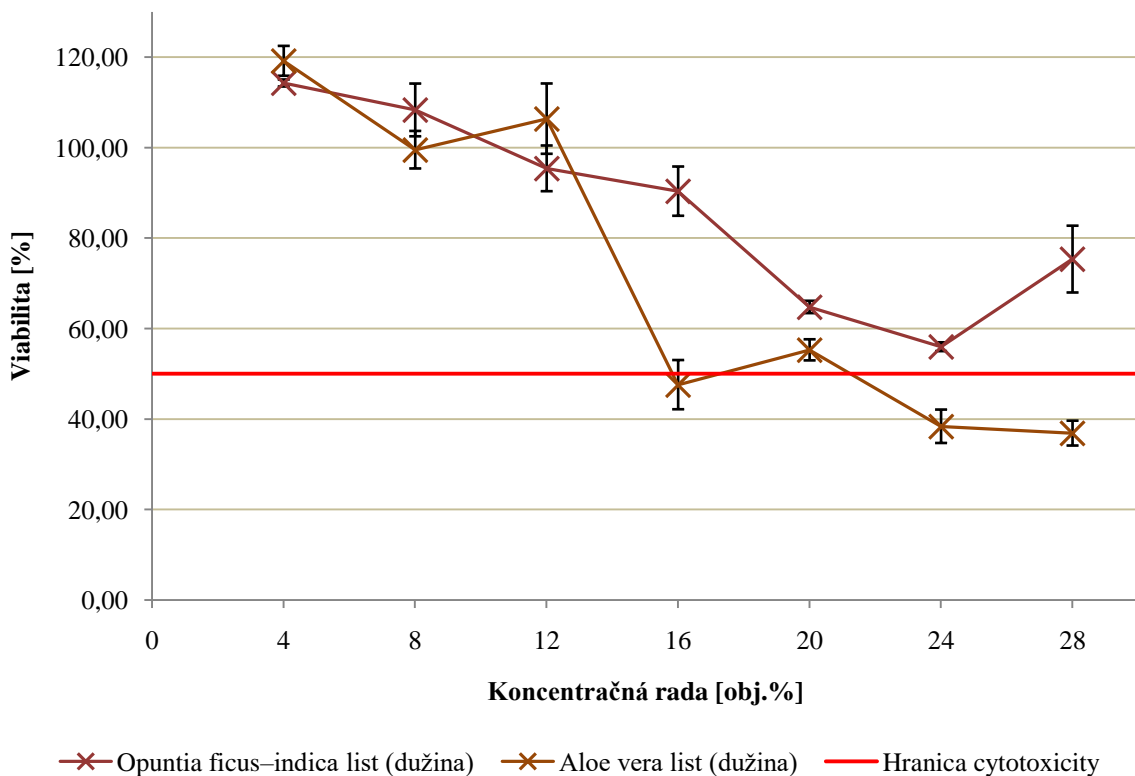
	<i>Micrococcus luteus</i>				<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
	0%	20%	40%	80%	0%	20%	40%	80%
Aloe vera šupka	–	+	–	–	–	–	–	+++
Aloe vera dužina	–	+	–	–	–	–	–	+++
Opuntia list šupka	–	–	–	–	–	+	–	+++
Opuntia list dužina	–	–	–	–	–	–	–	+++
Op. žltá šupka	–	–	–	–	–	–	–	+++
Op. žltá dužina	–	–	–	–	–	–	–	+++
Op. červená šupka	–	–	–	–	–	–	–	+++
Op. červená dužina	–	+	–	+	–	–	–	+++

+++ (účinnosť nad 70%); ++ (účinnosť nad 50%); + (účinnosť pod 50%); – (neúčinné)

Z dosiahnutých výsledkov je vidno, že väčšina extraktov nevykazovala žiadne antimikrobiálne účinky. Vyššia účinnosť bola zaznamenaná pri extraktoch v 80% etanole. V tomto prípade je pravdepodobné, že účinnosť bola spôsobená vysokou koncentráciou etanolu a nie účinkom extraktu. V niektorých prípadoch extrakty výrazne podporovali rast mikroorganizmov. Pravdepodobne to bolo spôsobené tým, že použité vzorky obsahovali množstvo sacharidov, ktoré slúžia ako výživa pre rast mikroorganizmov.

5.5 MTT test cytotoxicity

Test cytotoxicity MTT bol skúmaný na 20% etanolových extraktoch z dužín listov *Aloe vera* a *Opuntia ficus-indica*. Test bol vykonaný za pomoci ľudských buniek adenokarcinomu hrubého čreva. Ako najvhodnejšie rozpúšťadlo bol zvolený 20% etanol z dôvodu, že tieto extrakty obsahovali značný obsah aktívnych látok. Test bol spravený podľa postupu uvedeného v kapitole 4.11. Výsledky sú uvedené v nasledujúcom obrázku 22.



Obrázok 22 Výsledky MTT testu cytotoxicity

Ako hraničná hodnota viability buniek sa považuje hodnota LC50 – úhyn 50 % a viac buniek. Vzorka, ktorej hodnota sa nachádza nad touto hranicou sa nepovažuje za cytotoxickú. Z dosiahnutých výsledkov je vidieť, že v prípade etanolových extraktov z rastliny *Opuntia ficus-indica* boli všetky vzorky vhodné pre prípravu potravinárskych a kozmetických prípravkov. Extrakty s koncentráciou v rozmedzí 4–12 % viabilitu buniek dokonca mierne podporovali. U alkoholových extraktov pripravených z *Aloe vera* je možné využiť iba extrakty s nízkou koncentráciou, pretože u vyšších koncentráciách mali extrakty mierny cytotoxický účinok. Je možné, že tento cytotoxický účinok spôsoboval to, že extrakty boli extrahované v 20% etanole.

5.6 Návrh aplikácie pripravených lipozómov v kozmetických a potravinárskych prípravkoch

V tejto práci boli pre extrakciu vzoriek použité 4 druhy rozpúšťadiel. Bola použitá destilovaná voda a 3 etanolové rozpúšťadlá s rastúcou koncentráciou (20 %, 40 %, 80 %). Vzhľadom na skutočnosť, že výsledky jednotlivých testov boli porovnateľné, ako vhodné rozpúšťadlo pre lipozómy bola vybraná destilovaná voda. Toto rozpúšťadlo je vhodné pre kozmetické aj potravinárske prípravky, pretože nespôsobuje žiadne nepriaznivé účinky, či zmenu chuti, vône alebo farby.

Na základe testov by boli pripravené lipozómy vhodné ako hojivý gél s hydratačnými účinkami. Ako hlavná zložka hojivého gélu bola vybraná dužina z *Aloe vera*, ktorá vykazovala vysoký obsah celkových fenolických látok, vysokú antioxidačnú aktivitu a z hľadiska zeta potenciálu boli tieto lipozómy najstabilnejšie. Z MTT testov cytotoxicity bolo zistené, že extrakty s nízkou koncentráciou nemajú cytotoxické účinky, ale naopak môžu podporovať viabilitu buniek. *Aloe vera* obsahuje vysoký podiel vody, kde v nameraných výsledkoch dosahovalo množstvo vody až 99,64 % v 1 grame vzorky. Táto rastlina tiež obsahuje množstvo vitamínov a látok prospešných pre organizmus^[12]. Vďaka týmto vlastnostiam je *Aloe vera* vhodným kandidátom ako účinný gél pre drobné rany na pokožke a vďaka vysokému obsahu vody aj ako hydratačný gél^[13]. Antimikrobiálny účinok extraktu z dužiny *Aloe vera* bol minimálny, mohlo to byť spôsobené nízkou koncentráciou extraktu. Avšak pri vyššej koncentrácii extraktu môžeme predpokladať aj antimikrobiálne účinky. Pre zlepšenie vytvoreného gélu by druhou zložkou boli lipozómy vytvorené zo šupky žltého plodu *Opuntia ficus-indica* pre svoj vysoký obsah celkových fenolických látok a vysokú stabilitu, ktoré by zvýšili účinky gélu voči oxidačnému stresu. Vytvorený gél by bol založený na prírodnej báze a bol by unikátny svojím antioxidačným účinkom, regeneračnými účinkami a dobrým vstrebávaním živín. Gél by bol vhodný pre všetky typy pleti, no primárne by bol určený pre suchú a poškodenú pokožku.

Opuntia ficus-indica je známa hlavne kvôli svojim antioxidačným účinkom, ktoré boli preukázané aj v tejto práci. Na základe výsledkov by boli najvhodnejšie pre potravinárske účinky vytvorené lipozómy zo šupky z červeného a žltého plodu tejto rastliny. Ako produkt by bola pasta vytvorená zahustením lipozómov, ktorá by slúžila ako prídavok k proteínom pre športovcov. Vytvorené lipozómy zo šupiek plodov vykazovali vysoký obsah celkových fenolických látok a v šupke žltého plodu sa nachádzalo aj značné množstvo flavonoidov. Oba plody vykazovali aj vysokú antioxidačnú aktivitu. Vďaka týmto vlastnostiam by práve tieto dva druhy lipozómov boli vhodnými kandidátmi, napríklad ako pasta pre športovcov, ktorá by podporovala najmä antioxidačné účinky v organizme. V MTT testoch cytotoxicity bolo preukázané, že môžu byť použité rôzne koncentrované extrakty pre kozmetický a potravinársky priemysel, pretože nepreukazovali žiadny cytotoxický účinok.

Tabuľka 14 Vybrané látky pre kozmetický a potravinársky priemysel

Prípravok	Účinky		
	Obsah celkových polyfenolov [mg/g]	Antioxidačná aktivita [mg/g]	Zeta potenciál [mV]
HOJIVÝ GÉL			
Lipozómy z <i>Aloe vera</i>	18,66±3,00	43,64±8,26	-45,0±2,9
Lipozómy zo šupky žltého plodu <i>Op. ficus-indica</i>	8,98±2,84	24,07±1,86	-39,0±1,2
PASTA PRE ŠPORTOVCOV			
Lipozómy zo šupky žltého plodu <i>Op. ficus-indica</i>	15,53±0,10	20,66±0,29	-39,0±1,2
Lipozómy zo šupky červeného plodu <i>Op. ficus-indica</i>	5,14±2,45	17,82±1,17	-41,0±1,8

6 ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na prípravu a štúdium charakterizácie extraktov z rôznych častí rastlín *Aloe vera* a *Opuntia ficus-indica*. Ďalej boli študované antibakteriálne účinky, stabilita a veľkosť častíc pripravených lipozómov v čase prípravy a po 3 mesiacoch, a tiež bol vykonaný MTT testy cytotoxicity a identifikácia fenolických látok pomocou HPLC/UV. Cieľom práce bolo testovanie vybraných vzoriek a navrhnúť možnosť ich aplikácie v potravinárskom a kozmetickom priemysle.

V bakalárskej práci bolo vybraných 8 druhov vzoriek. Boli pripravované extrakty z listov rastlín (dužina a šupka) a z dvoch plodov rastlín (dužina a šupka). Z každej vzorky boli pripravené 4 druhy extraktov, a to vodné a s rastúcou koncentráciou etanolu (20 %, 40 %, 80 %).

Ako prvé bol u extraktov skúmaný obsah aktívnych látok. Stanovený bol celkový obsah fenolických látok, celková antioxidačná aktivita a u vybraných vzoriek aj celkový obsah flavonoidov.

Z testovaných vzoriek najviac fenolických látok obsahovala dužina z *Aloe vera* v 40% etanole ($37,13 \pm 2,86$ mg/g) a šupka zo žltého plodu *Opuntia-ficus indica* ($22,35 \pm 0,56$ mg/g) v 40% etanole. V prípade flavonoidov, boli vybrané iba dve vzorky na testovanie a to plody z *Opuntia-ficus indica*. Najväčší obsah flavonoidov obsahovala šupka zo žltého plodu, ktorá vykazovala hodnotu $2,44 \pm 0,16$ mg/g a dužina z červeného plodu obsahovala $1,44 \pm 0,04$ mg/g flavonoidov. Z pohľadu antioxidačnej aktivity boli testované všetky vzorky. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazoval vodný extrakt z dužiny *Aloe vera* ($48,09 \pm 8,26$ mg/g). U druhej rastliny to bol vodný extrakt zo šupky listu ($40,37 \pm 0,27$ mg/g).

Na základe antioxidačnej aktivity boli vybrané 4 vodné extrakty, konkrétne dužina z listov rastlín a šupka z červeného a žltého plodu *Opuntia ficus-indica*. Vybrané extrakty boli enkapsulované do lipozómov. U týchto častíc bola sledovaná veľkosť, stabilita, enkapsulačná účinnosť a dlhodobá stabilita. Priemerná veľkosť lipozómov sa pohybovala v rozmedzí od $212,5 \pm 4,9$ – $267,5 \pm 5,8$ nm. Stabilita lipozómov bola testovaná pomocou zeta potenciálu. Okrem pripravených lipozómov z dužiny listu *Opuntia-ficus indica* boli všetky lipozómy veľmi stabilné. U lipozómov pripravených z dužiny listu *Aloe vera* bola pozorovaná najmenšia priemerná veľkosť, a to $212,5 \pm 4,9$ nm. Tieto lipozómy s PDI $0,284 \pm 0,024$ vykazovali uniformnosť a tiež najvyššiu stabilitu ($-45,0 \pm 2,9$ mV).

Ďalej bola skúmaná enkapsulačná účinnosť pripravených lipozómov z hľadiska celkových fenolických látok a obsahu antioxidantov. Najvyššia účinnosť z hľadiska polyfenolov bola zaznamenaná u žltého plodu *Opuntia ficus-indica*, kde účinnosť dosahovala $69,03 \pm 0,10$ %, u antioxidačnej aktivity to bol červený plod, ktorý vykazoval účinnosť $89,64 \pm 0,66$ %. Naopak najnižšia enkapsulačná účinnosť vykazovala dužina z listu *Aloe vera*, kde účinnosť bola stanovená na $6,17 \pm 2,06$ %, v prípade antioxidačnej aktivity to bola opäť dužina z *Aloe vera*, ktorá bola stanovená na $37,64 \pm 2,71$ %.

Celkovo výsledky dlhodobej stability môžeme považovať za dobré, pretože v lipozómoch ostali aktívne látky aj po dobu 3 mesiacov uskladnených vo vodnom prostredí pri 8°C. Celkovo najlepšia dlhodobá stabilita bola stanovená u žltého plodu z *Opuntia ficus-indica*, ktorá dosahovala stabilitu $86,03 \pm 0,21$ %. Najnižšia stabilita bola zaznamenaná u *Aloe vera*, a to $39,22 \pm 6,12$ %.

Tiež bola skúmaná antimikrobiálna aktivita proti šiestim mikroorganizmom. Všeobecne sa dá povedať, že extrakty nemali veľký antimikrobiálny účinok. Najvyšší účinok mali extrakty v 80% etanole proti mikroorganizmu *Staphylococcus epidermidis*. V tomto prípade sa dá predpokladať, že inhibícia mikroorganizmov bola spôsobená vďaka vysokej koncentrácii alkoholu a nie kvôli antimikrobiálnym účinkom extraktu. Vo vodných extraktoch bol spozorovaný jav, kedy extrakty podporovali rast mikroorganizmov, pravdepodobne vďaka vysokému obsahu sacharidov v extraktoch. Pri vykonaní MTT testov cytotoxicity bolo zistené, že *Opuntia ficus-indica* je vhodná pre potravinársky a kozmetický priemysel, pretože nemá žiadne cytotoxické účinky. V prípade *Aloe vera* boli zaznamenané malé cytotoxické účinky pri niektorých vyšších koncentráciách. Mohlo to byť spôsobené aj tým, že ako rozpúšťadlo bol použitý 20% etanol.

V práci boli identifikované fenolické látky aj pomocou HPLC/UV-VIS metódy. U červeného plodu *Opuntia ficus-indica* boli identifikované dve fenolické látky, a to kyselina gallová $0,110$ µg/g

a epikatechin 28,194 $\mu\text{g/g}$. Výsledné koncentrácie sú vzťahnuté na gram sušiny materiálu v rastline. U rastliny *Aloe vera* neboli detekované žiadne nami vybrané fenolické látky.

Na záver boli navrhnuté prípravky pre kozmetický a potravinársky priemysel. Pre kozmetický priemysel bol navrhnutý gél, ktorý bol vytvorený kombináciou lipozómov z dužín listov *Aloe vera* a *Opuntia ficus-indica*. Vďaka vysokému obsahu celkových fenolických látok, značnej antioxidačnej aktivity a vysokému obsahu vody a vitamínov je gél vhodný pre poškodenú pokožku a má dobré hydratačné účinky. Pre potravinársky priemysel bola navrhnutá pasta, ktorá bola vytvorená zahustením lipozómov v kombinácii zo šupiek oboch plodov *Opuntia ficus-indica*. Obe tieto zložky obsahujú značné množstvo celkových polyfenolických látok a vykazujú antioxidačnú aktivitu. Prípravok je vhodný ako doplnok stravy pre športovcov voči oxidačnému stresu.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] REYNOLDS, T. DWECK, A.C. Aloe vera leaf gel: a review update. In *Journal of Ethno-Pharmacology*, 1999, vol.68, page 3-37
- [2] TARIQ, Huma, Muhammad ZIA, IHSAN-UL-HAQ, et al. Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, and Protein Kinase Inhibition Potential in Aloe vera L. *BioMed Research International* [online]. 2019, **2019**, 1-14 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.1155/2019/6478187. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/6478187/>
- [3] SAJJAD, Arbaz a Samia SUBHANI SAJJAD. Aloe vera: An Ancient Herb for Modern Dentistry—A Literature Review. *Journal of Dental Surgery* [online]. 2014, 2014, 1-6 [cit. 2019-11-23]. DOI: 10.1155/2014/210463. ISSN 2356-7325. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/archive/2014/210463/>
- [4] Aloe Vera: A Systematic Review of its Industrial and Ethno-Medicinal Efficacy. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. **2016**(5), 21-33.
- [5] UNLU, Ahmet. Aloe Vera and Cancer. *Turkish Journal of Oncology* [online]. 2016 [cit. 2019-11-23]. DOI: 10.5505/tjo.2016.1433. ISSN 13007467. Dostupné z: http://onkder.org/pdf/pdf_TOD_949.pdf
- [6] EL-MOSTAFA, Karym, Youssef EL KHARRASSI, Asmaa BADREDDINE, et al. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules* [online]. 2014, **19**(9), 14879-14901 [cit. 2019-12-01]. DOI: 10.3390/molecules190914879. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14879>
- [7] Ronald M. Shelton, MAJ, USAF,MC. Aloe Vera: Its Chemical and Therapeutic Properties. *International Journal of Dermatology*. **1991**(30), 679-683.
- [8] M.A. Saeed, Ishtiaq Ahmad, Uzma Yaqub, Shazia Akbar, Amran Waheed, M. Saleem, and Nasir-ud- Din. *ALOE VERA: A PLANT OF VITAL SIGNIFICANCE*. 2003, **2004**(9), 1-13.
- [9] AKABERI, Maryam, Zahra SOBHANI, Behjat JAVADI, Amirhossein SAHEBKAR a Seyed Ahmad EMAMI. Therapeutic effects of Aloe spp. in traditional and modern medicine: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2016, **84**, 759-772 [cit. 2020-01-15]. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.096. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332216309520>
- [10] KUMAR, Ramesh, Amit Kumar SINGH, Ashutosh GUPTA, Anupam BISHAYEE a Abhay K. PANDEY. Therapeutic potential of Aloe vera—A miracle gift of nature. *Phytomedicine* [online]. 2019, **60** [cit. 2020-01-15]. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152996. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711319301631>
- [11] Cactus (*Opuntia ficus-indica*): A Review on its Antioxidants Properties and Potential Pharmacological Use in Chronic Diseases. *Natural Products Chemistry & Research* [online]. 2014, **2**(6) [cit. 2020-01-16]. DOI: 10.4172/2329-6836.1000153. ISSN 23296836. Dostupné z: <http://www.esciencecentral.org/journals/cactus-opuntia-ficusindica-a-review-on-its-antioxidants-properties-2329-6836.1000153.php?aid=33317>
- [12] EL-MOSTAFA, Karym, Youssef EL KHARRASSI, Asmaa BADREDDINE, et al. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules* [online]. 2014, **19**(9), 14879-14901 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.3390/molecules190914879. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14879>
- [13] ARAGONA, M., E. R. LAURIANO, S. PERGOLIZZI a C. FAGGIO. *Opuntia ficus - indica* (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. *Natural Product Research* [online]. 2017, **32**(17), 2037-2049 [cit. 2020-01-19]. DOI:

- 10.1080/14786419.2017.1365073. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2017.1365073>
- [14] NIU, Ben, Ping SHAO, Yangchao LUO a Peilong SUN. Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **99** [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105376. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X19316443>
- [15] ASSADPOUR, Elham a Seid MAHDI JAFARI. A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2019, **59**(19), 3129-3151 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1080/10408398.2018.1484687. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2018.1484687>
- [16] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, **1**, 1806-1815 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [17] SPERANZA, Barbara, Leonardo PETRUZZI, Antonio BEVILACQUA, Mariangela GALLO, Daniela CAMPANIELLO, Milena SINIGAGLIA a Maria Rosaria CORBO. Encapsulation of Active Compounds in Fruit and Vegetable Juice Processing: Current State and Perspectives. *Journal of Food Science* [online]. 2017, **82**(6), 1291-1301 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1111/1750-3841.13727. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.13727>
- [18] ARAGONA, M., E. R. LAURIANO, S. PERGOLIZZI a C. FAGGIO. Opuntia ficus - indica (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. *Natural Product Research* [online]. 2017, **32**(17), 2037-2049 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1080/14786419.2017.1365073. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2017.1365073>
- [19] BERRABAH, Hicham, Khaled TAÏBI, Leila AIT ABDERRAHIM a Mohamed BOUSSAÏD. Phytochemical composition and antioxidant properties of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers from the Algerian germplasm. *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 2019, **13**(2), 1166-1174 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1007/s11694-019-00032-8. ISSN 2193-4126. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11694-019-00032-8>
- [20] ORSINI, Francesca, Irena VOVK, Vesna GLAVNIK, Urška JUG a Danilo CORRADINI. HPTLC, HPTLC-MS/MS and HPTLC-DPPH methods for analyses of flavonoids and their antioxidant activity in *Cyclanthera pedata* leaves, fruits and dietary supplement. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2019, **42**(9-10), 290-301 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1080/10826076.2019.1585630. ISSN 1082-6076. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826076.2019.1585630>
- [21] CHEMAT, Farid, Maryline ABERT-VIAN, Anne Sylvie FABIANO-TIXIER, Jochen STRUBE, Lukas UHLENBROCK, Veronika GUNJEVIC a Giancarlo CRAVOTTO. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **118**, 248-263 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.trac.2019.05.037. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993619300706>
- [22] YAHIA, E.M., J.DE.J. ORNELAS a A. ANAYA. EXTRACTION AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF MUCILAGE FROM MESQUITE, ALOE VERA, MAGUEY AND PRICKLY PEAR CACTUS CLADODES (NOPAL) AND EVALUATION OF ITS PREBIOTIC EFFECT ON THE GROWTH OF 2 PROBIOTIC BACTERIA. *Acta Horticulturae* [online]. 2009, (841), 625-628 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.841.98. ISSN 0567-7572. Dostupné z: https://www.actahort.org/books/841/841_98.htm
- [23] CHAOUCH, Mohamed Aymen, Jawhar HAFSA, Christophe RIHOUEY, Didier LE CERF a Hatem MAJDOUB. Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: Antioxidant

- and antiglycated activities. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **79**, 779-786 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.003. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813015004055>
- [24] DI LORENZO, Flaviana, Alba SILIPO, Antonio MOLINARO, et al. The polysaccharide and low molecular weight components of *Opuntia ficus indica* cladodes: Structure and skin repairing properties. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **157**, 128-136 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.09.073. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716311298>
- [25] LEFSIH, Khalef, Cédric DELATTRE, Guillaume PIERRE, Philippe MICHAUD, Tejraj M. AMINABHAVI, Farid DAHMOUNE a Khodir MADANI. Extraction, characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of *Opuntia ficus indica*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **82**, 645-652 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.046. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813015300507>
- [26] AMMAR, Imene, Monia ENNOURI a Hamadi ATTIA. Phenolic content and antioxidant activity of cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) flowers are modified according to the extraction method. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **64**, 97-104 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.11.030. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014007328>
- [27] Radka Kelichová. OPUNTIA FICUS-INDICA. *Botanic* [online]. [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://botanic.cz/herbar/opuntia-ficus-indica>
- [28] ENGWAYU, Jophat a Marek PAWLIK. Adsorption of anionic polymers on hematite – a study of zeta potential distributions. *Minerals Engineering* [online]. 2020, **148** [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/j.mineng.2020.106225. ISSN 08926875. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892687520300455>
- [29] Zeta potential. Malvern [online]. 2015 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/>
- [30] SCHEFFOLD, F., et al. New trends in optical microrheology of complex fluids and gels. *Progress in Colloid and Polymer Science*. [online]. 2004, Vol. 123, s. 141-146. DOI: 10.1007/978-3-540-36462-7_32
- [31] KIRBY, B. J.; HASSELBRINK, E- F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *ELECTROPHORESIS*. 2004, vol. 25, issue 2, 187-202
- [32] VÁZQUEZ-VUELVAS, Oscar F., Félix A. CHÁVEZ-CAMACHO, Jorge A. MEZA-VELÁZQUEZ, Emilio MENDEZ-MERINO, Merab M. RÍOS-LICEA a Juan Carlos CONTRERAS-ESQUIVEL. A comparative FTIR study for supplemented agavin as functional food. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **103** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105642. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X18317302>
- [33] WISE, Kimber, Harsharn GILL a Jamie SELBY-PHAM. Willow bark extract and the biostimulant complex Root Nectar® increase propagation efficiency in chrysanthemum and lavender cuttings. *Scientia Horticulturae* [online]. 2020, **263** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.109108. ISSN 03044238. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030442381930994X>
- [34] RASOULPOUR, Rasoul, Keramat IZADPANAH a Alireza AFSHARIFAR. Opuntin B, the antiviral protein isolated from prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) cladode exhibits ribonuclease activity. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2020, **140** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103929. ISSN 08824010. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401019316791>
- [35] Mikeš V.: Základní biochemické praktikum. Skriptum, MU Brno, 1997.

- [36] MENDEL, Zvi, Alexei PROTASOV, Juan M. VANEGAS-RICO, J. Refugio LOMELI-FLORES, Pompeo SUMA a Esteban RODRÍGUEZ-LEYVA. Classical and fortuitous biological control of the prickly pear cochineal, *Dactylopius opuntiae*, in Israel. *Biological Control* [online]. 2020, **142** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104157. ISSN 10499644. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964419304360>
- [37] GUO, Mingming, Mingfeng HE, Jianjun ZHONG, Qiao HE, Balarabe B. ISMAIL, Guoying CHEN a Donghong LIU. High-performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence method for determination of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in canned foods. *Science of The Total Environment* [online]. 2020, **710** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134975. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719349678>
- [38] ZHAO, Huanhuan, Xinyue ZHOU, Enbo XU, Mingming GUO a Donghong LIU. Extrinsic factors influencing nano-/micro-particle formation in pure soy glycinin solution via heating. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **103** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105649. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X19324828>
- [39] HAN, Guang, Shuming WEN, Han WANG a Qicheng FENG. Selective adsorption mechanism of salicylic acid on pyrite surfaces and its application in flotation separation of chalcopyrite from pyrite. *Separation and Purification Technology* [online]. 2020, **240** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.116650. ISSN 13835866. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586619352657>
- [40] TRAN, Vinh Van, Ju-Young MOON a Young-Chul LEE. Novel Magnesium Aminoclay-Vitamin C Hybrid for Enhanced Stability and Bioactivity in Cosmeceutical Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2020, **20**(7), 4257-4262 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1166/jnn.2020.17583. ISSN 1533-4880. Dostupné z: <https://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jnn.2020.17583>
- [41] NASCIMENTO, Luis Gustavo Lima, Federico CASANOVA, Naaman Francisco Nogueira SILVA, Alvaro Vianna Novaes de Carvalho TEIXEIRA a Antonio Fernandes de CARVALHO. Casein-based hydrogels: A mini-review. *Food Chemistry* [online]. 2020, **314** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.126063. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619322113>
- [42] PATIL, Jayesh, Rahul RAJPUT, Pritam PATIL, Arun MUJUMDAR a Jitendra NAIK. Generation of sustained release chitosan nanoparticles for delivery of ketorolac tromethamine: a tubular microreactor approach. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 2020, **69**(8), 516-524 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1080/00914037.2019.1581201. ISSN 0091-4037. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00914037.2019.1581201>
- [43] Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca. 4. vyd. Praha: Avicenum, 1987
- [44] [Základní techniky práce s tkáňovými kulturami. Ústav lékařské chemie a biochemie [online]. [cit. 2019-05-13]. Dostupné z: <http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>]
- [45] RAHMAN, Atta-ur-. 2017. *Studies in natural products chemistry*. New York: Elsevier.
- [46] WORKMAN, Jerry a Art W. SPRINGSTEEN. *Applied spectroscopy: a compact reference for practitioners*. San Diego: Academic Press, c1998. ISBN 9780127640709.
- [47] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, c2013. ISBN 9780123850133.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Použité jednotky

g - gram

mg - miligram

l - liter

ml - mililiter

μl -mikroliter

H - hodina

nm - nanometer

°C - stupne Celzia

D - Dalton

Ostatné

HPLC - High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

DLS - Dynamic Light Scattering, dynamický rozptyl svetla

UV - ultrafialová oblasť

VIS - viditeľná oblasť

NB - Nutrient Broth

YPD - Yeast Extract Powder

BHI - Brain Heart Infusion