

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Laboratorní ověření účinnosti tradičně využívaných
léčivých rostlin Ekvádoru**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Klepáčková

Vedoucí práce: Doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Laboratorní ověření účinnosti tradičně využívaných léčivých rostlin Ekvádoru" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D. a Ing. Janu Tauchenovi za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování diplomové práce.

Laboratorní ověření účinnosti tradičně využívaných léčivých rostlin Ekvádoru

Souhrn

Poskytování služeb zdravotní péče v Ekvádoru se značně liší podle socioekonomického postavení, věku, pohlaví a místa bydliště. Až třetina obyvatelstva nemá pravidelný přístup ke zdravotnickým službám a více než dvě třetiny obyvatel nemají zdravotní pojištění. Bylinná medicína je syntézou terapeutických zkušeností domorodých lékařů vyvíjejících se po stovky let a její prostředky se používají k prevenci a léčbě různých typů onemocnění. Rostliny jsou oblíbeným přírodním lékem díky účinnosti, bezpečnosti a minimálním vedlejším účinkům. Avšak některé kombinace bylinné medicíny a léků mohou být nebezpečné. Vědy, které pomáhají zkoumat souvislosti tradičního využití rostlin v časovém horizontu a také přispívají k objevování bioaktivních látek, se nazývají etnobotanika a etnofarmakologie. Tato práce se zabývá deseti rostlinami, dovezených z Ekvádoru, které se tradičně využívají na různé typy nemocí, jako jsou střevní potíže, chřipka, nachlazení, zánět močového měchýře, kožní nemoci v pánevní dutině atp. Výzkum účinnosti bylinných léčiv má do budoucna velký význam i kvůli rozšiřující se antimikrobiální rezistenci, která se v současné době stává vážným rizikem pro zdraví lidí a zvířat. Antimikrobiální a antioxidační aktivita rostlin, které jsou v této práci měřeny bujónovou mikrodiluční metodou a ORAC metodou, jsou významným ukazatelem pro analýzu léčivých rostlin. Jediným prokazatelným pozitivním výsledkem při testování antimikrobiální aktivity bylo nalezení minimální inhibiční koncentrace *Espeletia schultzei* proti *Streptococcus pyogenes* (MIC = 0,256 mg/ml). Nejvyšší antioxidační aktivitu prokázala rostlina *Croton elegans* Kunth ($743,64 \pm 28,56 \mu\text{g TE/mg extraktu}$), u které nebyly nalezeny žádné záznamy související s antioxidační aktivitou.

Klíčová slova: Ekvádor, léčivé rostliny, antimikrobiální aktivita, antioxidační aktivita, patogenní mikroorganismy

Laboratory evaluation of activity of traditional Ecuadorian medicinal plants

Summary

Health care in Ecuador varies greatly depending on socioeconomic status, age, sex and place of residence. One third of the population has no regular access to health services and more than two-thirds of the population has no health insurance. Herbal medicine is the synthesis of therapeutic experience of indigenous physicians which has been evolving for hundreds of years and its resources are used to prevent and treat various types of diseases. Plants are popular natural remedy due to their efficacy, safety and minimal side effects. However, certain combinations of herbal medicine and drugs can be dangerous. Sciences, which help to examine the context of the traditional use of plants in the timeframe and also contribute to the discovery of their bioactive compounds, are called ethnobotany and ethnopharmacology. This paper investigates ten plants imported from Ecuador, which are traditionally used for healing various types of diseases such as gastrointestinal disorders, influenza, cold, urinary tract infection, skin diseases in the pelvic cavity etc. Efficiency research of herbal medicine has a great significance for future healthcare because of the expansion of antimicrobial resistance, which is currently becoming a serious health risk for both humans and animals. Antimicrobial and antioxidant activity of plants, which are in this thesis measured by the broth microdilution method and ORAC method, are important indicators for the analysis of medicinal plants. The only demonstrable positive result of testing the antimicrobial activity was the discovery of minimum inhibitory concentration of *Espeletia schultzei* against *Streptococcus pyogenes* (MIC=0.256 mg/mL). The highest antioxidant activity was discovered in the plant *Croton elegans* Kunth ($743,64 \pm 28,56 \mu\text{g TE/mg}$ of the extract), for which no records associated to antioxidant activity were found.

Keywords: Ecuador, medicinal plants, antimicrobial activity, antioxidant activity, pathogenic microorganism

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
2.1	Vědecké hypotézy	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Ekvádor	10
3.2	Infekční onemocnění v Ekvádoru	11
3.3	Zdravotní péče v Ekvádoru	12
3.4	Bylinná medicína	12
3.5	Etnobotanika, etnofarmakologie	13
3.6	Ekvádorské indiánské kmeny	14
3.7	Tradičně využívané léčivé rostliny v Ekvádoru	15
3.7.1	<i>Psidium guajava</i> L.	16
3.7.2	<i>Espeletia schultzei</i> Wedd. (Klejovka)	17
3.7.3	<i>Xanthium catharticum</i> Kunth	17
3.7.4	<i>Pothomorphe peltata</i> Miq.....	18
3.7.5	<i>Croton elegans</i> Kunth	18
3.7.6	<i>Clinopodium nubigenum</i> Kuntze	19
3.7.7	<i>Solanum nigrum</i> L. (Lilek černý)	20
3.7.8	<i>Kalanchoe pinnata</i> Pers.....	21
3.7.9	<i>Justicia secunda</i> Vahl.....	21
3.7.10	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Merlík vonný)	22
3.8	Patogenní mikroorganismy	23
3.8.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.8.2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	23
3.8.3	<i>Escherichia coli</i>	24
3.8.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	24
3.8.5	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	24
3.8.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3.8.7	<i>Candida albicans</i>	25
3.9	Antimikrobiální rezistence (AMR)	25
3.9.1	Beta-laktamová antibiotika	26
3.9.2	Tetracykliny	27
3.10	Antimikrobiální aktivita	28
3.10.1	Mikrodiluční metoda	28
3.10.2	Diskový difúzní test	29

3.11	Antioxidační aktivita	29
3.11.1	Antioxidační testování ORAC.....	30
3.11.2	Antioxidační testování DPPH.....	30
4	Materiál a metody	31
4.1	Rostlinný materiál.....	31
4.2	Příprava extraktů	34
4.2.1	Chemikálie.....	34
4.2.2	Extrakce.....	34
4.3	Stanovení MIC extraktů.....	35
4.3.1	Chemikálie.....	35
4.3.2	Testované mikroorganismy	35
4.3.3	Mikrodiluční bujónová metoda	36
4.4	Stanovení antioxidační aktivity	38
4.4.1	Chemikálie.....	38
4.4.2	ORAC metoda.....	38
5	Výsledky	40
5.1	Antimikrobiální aktivita.....	40
5.2	Antioxidační aktivita	42
6	Diskuze	44
6.1	Antimikrobiální aktivita.....	44
6.2	Antioxidační aktivita	46
7	Závěr	49
8	Seznam použité literatury	50

1 Úvod

Z historického hlediska hrají nemoci velmi důležitou roli. Velké epidemie způsobily masové úbytky obyvatelstva, ale co se týče vědy a výzkumu ve zdravotnictví, přinesly i inovativní příspěvky.

Když Alexandr Fleming v roce 1928 objevil první antibiotikum, byl to bezesporu jeden z nejdůležitějších mezníků v historii medicíny. V současné době se však antimikrobiální rezistence vůči antibiotikům stává rizikovým faktorem. Proto je nutné hledat řešení pro tuto problematiku. Přírodní látky by měly být chápány jako možné alternativy k dnes široce využívaným syntetickým látkám.

Účinné látky se zkoumají kvůli tomu, že mohou působit stejně jako antibiotikum při léčbě infekčních onemocnění způsobených patogenními mikroorganismy. Tradiční využití rostlin by mohlo být potvrzeno v in vitro a následně v in vivo testech. V případě, že by se zjistilo, jaké konkrétní antimikrobiální a antioxidační látky rostliny obsahují, mohly by se extrahovat či začít synteticky vyrábět. Do budoucna by tyto poznatky mohly být uvedeny v reálný život a tím pomoci ke zlepšení zdravotní péče po celém světě.

2 Cíl práce

Cílem práce je stanovení antimikrobiální a antioxidační účinnosti tradičně využívaných léčivých rostlin Ekvádoru. Dílčím úkolem je zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC) získaných extraktů a jejich porovnání s tradičním využitím, a dále zjištění antioxidační aktivity a porovnání s tradičním využitím těchto rostlin.

2.1 Vědecké hypotézy

- Pro tradičně využívané léčivé rostliny Ekvádoru bude potvrzena antimikrobiální aktivita.
- Pro tradičně využívané léčivé rostliny Ekvádoru bude potvrzena antioxidační aktivita.
- Tradičně využívané rostliny se používají v množství, které obsahuje dostatečné koncentrace účinných látek.

3 Literární rešerše

3.1 Ekvádor

Ekvádorská republika je jedna z nejmenších andských zemí Jižní Ameriky (Guzman a kol., 1995). Rozloha činí 283 561 km² (Abrahámová a kol., 1999). Ekvádor je rozdělen do 24 provincií, které se jmenují Esmeraldas (Esmeraldas), Manabí (Portoviejo), Guayas (Guayaquil), El Oro (Machala), Carchi (Tulcán), Imbabura (Ibarra), Pichincha (Quito), Cotopaxi (Latacunga), Los Ríos (Babahoyo), Bolívar (Guaranda), Tungurahua (Ambato), Chimborazo (Riobamba), Cañar (Azogues), Azuay (Cuenca), Galapágos (Puerto Baquerizo Moreno), Santa Elena (Santa Elena), Santo Domingo de los Tsáchilas (Santo Domingo de los Colorados), Orellana (Puerto Francisco de Orellana), Loja (Loja), Sucumbíos (Nueva Loja), Napo (Tena), Pastaza (Puyo), Morona Santiago (Macas) a Zamora Chinchipe (Zamora) (pozn.: v závorce je uvedeno hlavní město) (Nations Online, 2016), (Cavender a Albán, 2009). Ekvádorská geografie je pozoruhodně různorodá. Zahrnuje Amazonské deštné pralesy, Andské vrcholy, pobřežní nížiny a Galapágy (Becker, 2010). Mapa Ekvádoru je na Obrázku 1.



Obrázek 1 mapa Ekvádoru (Cavender a Albán, 2009)

Ekvádor se nachází v rovníkové Americe, a díky tomu je tato země hodnocena jako jedna s nejvyšší biologickou rozmanitostí na světě (Tene a kol., 2007). Avšak není příliš teplou zemí díky Humboldtovu mořskému proudu a táhnoucímu se pásu And po západním pobřeží. Klima je velmi variabilní. Na pobřeží a na východ od And je tropická vegetace a v letních měsících tu teplota dosahuje až 30 °C, oproti tomu v andských údolích teplota dosahuje pouze 10-12 °C. Tato skutečnost má za následek i rozdílnou patologii (Valenzuela, 1927).

3.2 Infekční onemocnění v Ekvádoru

Přestože Ekvádor patří mezi menší státy, vyznačuje se mimořádnou různorodostí infekčních nemocí. Zdravotní problémy reflektují socioekonomickou situaci. Velký vliv na zdravotní situaci má klima, kultura a geografie. Statistiky jsou velmi variabilní (Guzman a kol., 1995).

V minulosti se zde vyskytovala onemocnění jako viscerální leishmanióza, horečka Oroya, horečka z krysiho kousnutí, cholera, vlnící horečka, vzteklna, filarióza, bilharzióza a aktinomykóza. Malárie se objevovala na celém pobřeží a v některých nejhlubších údolích And. V zimních měsících se toto onemocnění stávalo epidemií. Americká trypanosomiáza se nacházela na některých místech pobřeží a na východě země, ale byla vzácná ve srovnání s její četností v dalších jihoamerických zemích. Dermální leishmanióza se vyskytovala v teplejších částech Ekvádoru. V Andách byl černý kašel uvedený v čele seznamu jako příčina dětské úmrtnosti. Tyfus a paratyfus byly prevalentní v celém Ekvádoru, tyfus se vyskytoval převážně v andské zóně. Záškrtcem bylo také možné onemocnět, avšak s menší pravděpodobností než v ostatních zemích. Antrax se vyskytoval v pobřežních provinciích u lidí i zvířat. Tuberkulóza se vyskytovala všude, zatímco tetanus byl rozšířen především ve městech. I úplavice byla všude, zejména na pobřeží, a to jak bacilární tak amébová. Jaterní absces byl nejčastější v horách. Převládající paraziti byli škrkavka, tenkohlavec, tasemnice dětská a tasemnice dlouhočlenná. Cysticerkóza se dostávala nejčastěji do mozku a do svalů. Motolice plicní se vyskytovala ve dvou pobřežních provinciích. Dermatomykózy byly časté, stejně jako dermatitidy (Valenzuela, 1927).

V současné době patří mezi nejčastější zdravotní obtíže akutní infekční onemocnění dýchacích cest a gastrointestinálního systému, střevní parazitární infekce, dermatofytóza, bakteriální infekce kůže, gastritida, malárie, leishmanióza, infekce močových cest, artritida, tuberkulóza, onemocnění zubů, uštknutí hadem a podvýživa (Giovannini, 2015).

3.3 Zdravotní péče v Ekvádoru

Poskytování služeb zdravotní péče v Ekvádoru se značně liší podle socioekonomického postavení, věku, pohlaví a místa bydliště (jiné podmínky mají lidé z měst a lidé žijící na vesnici) (López-Cevallos a Chi, 2010). Úroveň zdravotnických zařízení je různorodá i v jednotlivých provinciích (Guzman a kol., 1995). 25-30 % obyvatel Ekvádoru nemá pravidelný přístup ke zdravotnickým službám a více než dvě třetiny obyvatel nemá zdravotní pojištění. Zdravotní péči mají na starost Ministerstvo zdravotnictví (MPH = Ministry of Public Health) a Ekvádorský ústav sociálního zabezpečení (IESS = Ecuadorian Social Security Institute). Zdravotnický sektor je kombinací veřejných a soukromých institucí (López-Cevallos a Chi, 2010). Každá instituce má svoje vlastní organizační schéma, správu a financování (PAHO a WHO, 2008).

Od roku 2012 je v Ekvádoru jedno hlavní stanoviště a dalších pět menších pro kmen „Achuar“ (viz 3.6 Ekvádorské indiánské kmeny), které zajišťují zdravotní péči. Léky jsou v těchto centrech vydávány bez poplatků. Tato zdravotní péče je poskytována ekvádorským Ministerstvem zdravotnictví. V několika obcích jsou zdravotničtí pracovníci, většinou muži, zvoleni komunitou a vycvičeni externími subjekty na základní zdravotní péči. Ti organizují místo zásobené léky pro pacienty (Giovannini, 2015).

3.4 Bylinná medicína

Bylinná medicína je syntézou terapeutických zkušeností domorodých lékařů vyvíjejících se po stovky let (Kamboj, 2000) a je vyhledávána stále větším počtem pacientů (Miller, 1998). Bylinné přípravky jsou definovány jako polotovary získané z rostlin a hub, například extrakcí alkoholem nebo odvarem, které se používají k prevenci a léčbě různých typů onemocnění. Jsou součástí tradiční medicíny téměř v každé kultuře (Linde a kol., 2001).

Bylinné léky jsou ve velké poptávce ve vyspělejších zemích pro primární zdravotní péči, protože jsou účinné, bezpečné a mají minimální vedlejší účinky (Kamboj, 2000). V zemích třetího světa jsou léčivé rostliny používány především tradičními léčiteli (Linde a kol., 2001). Léky bylinného původu mimo jiné nabízejí terapeutika pro onemocnění související se starším věkem, jako je ztráta paměti, osteoporóza, porucha imunity, atd. Světová zdravotnická organizace vypracovala v roce 1991 pokyny pro posouzení bylinné medicíny (Kamboj, 2000).

Současná nařízení nechrání spotřebitele před případným nebezpečím bylinných přípravků. Existují zvyšující se obavy týkající se vzájemného působení léků a bylinných přípravků. Ve většině případů je veřejnost nedostatečně informována o tom, že pacienti by měli svému lékaři sdělit, co všechno užívají za léky, a to i včetně těch bylinných (Vickers a kol., 2006). Uvádí se, že 70 % pacientů neřekne svému lékaři o užívání bylinné medicíny. Tato skutečnost je velmi nebezpečná (Miller, 1998).

Je prokázána interakce mezi bylinnými přípravky a léčivy. Například třapatka může působit hepatotoxicky, a proto by neměla být užívána s jinými známými hepatotoxickými léky, jako jsou anabolické steroidy, amiodaron, methotrexát či ketokonazol. Česnek, jinan, zázvor či ženšen mohou ovlivnit srážlivost krve, proto by neměly být tyto látky užívány společně s warfarinem. Ženšen by také neměl být užíván s estrogeny a kortikoidy. Kozlík by neměl být užíván spolu s barbituráty. Lékořice, jitrocel a ženšen mohou interagovat s digoxinem. Pupalkový olej a brutnák lékařský by neměly být užívány s antikonvulzivy, protože mohou snížit práh epileptického záchvatu. Kava užívána společně s alprazolamem může mít za následek kóma. Obecně imunostimulanty (např. třapatka a zinek) by neměly být podávány s imunosupresivy (např. kortikosteroidy a cyklosporin). Lékořice může kompenzovat farmakologický účinek spironolaktonu. Mnoho rostlin má vliv na hladinu glukózy v krvi a neměly by být užívány při onemocnění diabetes mellitus (Miller, 1998).

3.5 Etnobotanika, etnofarmakologie

Etnobotanika je věda, která se zabývá vztahem člověka a rostlin v rámci prehistorického a historického období až po současnost. Rostliny tvoří základ téměř veškerého života na Zemi. Kromě obsahu základních živin (sacharidy, tuky, bílkoviny) jsou rostliny zdrojem i dalších užitečných materiálů jako je dřevo, celulóza, guma a mnoho

dalších. Jedním z nejdůležitějších aspektů rostlinné říše je jejich léčivá schopnost (Diksha a Amla, 2011). Již od pradávna lidé používají různé přírodní materiály k léčbě onemocnění či ke zlepšení zdraví. Tradiční medicína se stala významnou součástí analýzy léčiv. Mnoho důležitých moderních léků, jako je digitoxin, reserpin, tubokurarin, efedrin, ergometrin, atropin, vinblastin a aspirin, bylo objeveno pomocí lidového využití (Ghorbani a kol., 2006). Účinné látky se získávají z různých částí rostlin (plody, květy, listy, stonky, kořeny, semena, kůra) (Diksha a Amla, 2011).

Etnobotanika studuje vztah mezi lidmi a rostlinami v nejširších souvislostech, včetně kulturních zvyklostí spojených s užíváním rostlin. Nezaměřuje se pouze na léčivé rostliny, ale i na jiné přírodní zdroje jako jsou potraviny, rostliny používané při rituálech, barviva, přadné rostliny, jedy, hnojiva atd. Vzhledem k tomu, že rostliny hrají důležitou roli v lidském životě, promítá se etnobotanika do oblastí botaniky, biochemie, farmakognosie, toxikologie, lékařství, výživy, zemědělství, ekologie, evoluce, sociologie, antropologie, lingvistiky, historie a archeologie (Ghorbani a kol., 2006).

Etnofarmakologie má také interdisciplinární charakter. Zabývá se pozorováním, popisem a experimentálním výzkumem domorodých léků a jejich biologických aktivit. Zahrnuje použití rostlin, hub, živočichů, mikroorganismů a minerálních látek (Soejarto, 2005). Pojem „etnofarmakologie“ má v oblasti výzkumu poměrně krátkou historii. Termín byl poprvé použit v roce 1967 v titulu knihy o halucinogenech (Diksha a Amla, 2011).

3.6 Ekvádorské indiánské kmeny

V dnešní době využívá rostlin 80 % světové populace pro primární lékařskou pomoc. Jedná se především o rozvojové země, mezi které patří také Ekvádor. Přibližně 30 % z celkového počtu obyvatel patří do různých domorodých skupin s etnobotanickými znalostmi a zkušenostmi, které se stále přenáší z generace na generaci ústní tradicí (Tene a kol., 2007).

Skupina „Achuar“ jsou domorodí lidé obývající severovýchodní Peru a jižní Ekvádor v povodí řek Pastaza, Corriente a Morona. Patří do jazykové rodiny „Jivaroan“ společně s „Shuar“, „Aguaruna“ a „Humabisa“. Na rozdíl od jiných domorodých kmenů skupina „Achuar“ obývá odlehlou oblast amazonského pralesa, a tím si byla schopna bránit její území a do jisté míry i životní styl. V sedmdesátých letech dvacátého století vpadly na její území ropné společnosti, které těžbou ropy znečistily přírodní zdroje a vážně poškodily ekosystém a

zdraví lidí. Ekonomika je především založena na zahradnictví a lovu, dále na chovu dobytka a na několika místech i na pěstování tržních plodin nebo sběru planě rostoucích rostlin. Plodiny a rostliny jsou prodávány externím subjektům, které je používají jako rostlinné produkty nebo na výrobu kosmetiky. V Ekvádoru žije přibližně 6000 obyvatel z kmene „Achuar“ shromážděných do 75 komunit. Na jejich území se lze dostat jedině na kánoi nebo v malých letadlech. Jednotlivé komunity jsou pak spojeny sítí lesních cest (Giovannini, 2015).

Nejběžnějším způsobem přípravy bylinného léku „Achuary“ je příprava odvaru dané části rostliny ve velkém množství vody. Do některých odvarů se přidává cukrová třtina, která slouží k výrobě léčivých sirupů. Tyto přípravky se užívají orálně a v mnoha případech pacient očekává, že bude po užití léku zvracet. Děti, „které se ještě nenaučily zvracet“, nemají dovoleno užívat tento typ medicíny. „Achuarové“ jsou si také vědomi možných nežádoucích účinků v případě kombinování jednotlivých druhů rostlin. Některé léky jsou připraveny bez vaření – například drcením a rmutováním rostlin ve vodě a následnou filtrací pomocí síta. Například kořen *Cyperus spp.* je žvýkán, poté mixován s vodou a před podáním filtrován. Orální bylinné léky jsou často podávány třikrát denně v dávce, která souvisí s věkem léčeného jedince (Giovannini, 2015).

Loja a Zamora-Chinchipe jsou dvě provincie na jihu Ekvádoru s bohatou biologickou rozmanitostí a bohatou etnobotanickou tradicí. Tato příznivá kombinace pomohla lidové medicíně popsat více než 200 místních rostlin, identifikovaných botanicky. Nemoci ledvin, žaludeční infekce, bolesti hlavy a chřipka jsou nejčastější onemocnění léčena přírodními prostředky. Avšak i méně rozšířené nemoci, jako je rakovina či cukrovka, jsou léčeny rostlinnými extrakty. (Tene a kol., 2007)

3.7 Tradičně využívané léčivé rostliny v Ekvádoru

Nejvíce referovanou léčivou rostlinou v Ekvádoru je zázvor lékařský (*Zingiber officinale*), který je původně z Asie. Například „Shuarové“, ale i další domorodí lidé, používají zázvor k léčbě průjmu a dalších gastrointestinálních problémů (Giovannini, 2015).

K léčbě různých typů onemocnění se v Ekvádoru používá široká škála rostlin. Tato práce se zabývá deseti z nich, jejichž extrakty byly testovány proti několika druhům mikroorganismů. Při získávání informací byly z velké části použity internetové zdroje, které jsou však relevantní. Server „tropic.org“ je pod záštitou „Missouri Botanical Garden“ a

server „theplantlist.org“ spolupracuje s „Royal Botanic Gardens“, „Kew“ a „Missouri Botanical Garden“.

3.7.1 *Psidium guajava* L.

Čeleď: *Myrtaceae* (myrtovité) – stálezelené rostliny; listy jsou většinou vstřícné, kožovité a celistvé; v pletivech mají aromatické silice; květy jsou jednotlivé nebo v hroznovitých květenstvích; rostliny tropů a subtropů; bobule, peckovice, nažka, tobolka (Novák a Skalický, 2009)

Rod: stálezelené keře nebo nízké stromy

Botanický popis druhu: keř nebo nízký strom 6-10 m vysoký; listy vstřícné, podlouhle eliptické, cca 15 cm dlouhé, celokrajné, kožovité; květy bílé, vonné, jednotlivě nebo po 2-3 v úžlabí listů; plod bobule kulovitěho až hruškovitěho tvaru, 8-12 cm dlouhá, světle žlutě zbarvená; požívají se čerstvé/džemy, želé, pasty, sirupy; vysoký obsah vitamínu C (100-300 mg/100 g) – plně nahradí pomeranče (Valíček, 2002)

Nadmořská výška: 0-3000 m n. m.

Oblast: Galapágy, pobřeží, Andy, Amazonie

Provincie: Bolívar, Carchi, Esmeraldas, Galapágos, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Morona-Santiago, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua (Tropicos, 2016a)

Nebezpečí: při kombinaci s listy rostliny *Ilex guayusa* ve stejném odvaru vzniká jedovatý nápoj (Giovannini, 2015)

Antimikrobiální aktivita: benzofenonový glykosid, izolovaný z listů *Psidium guajava*, byl testován proti standardním kmenům grampozitivních a gramnegativních bakterií a byly zjištěny antibakteriální účinky proti *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*, v porovnání s testovaným antibiotikem (cetriaxon) byl tento účinek slabší (Ukwueze a kol., 2015); hydroalkoholický extrakt působí antimikrobiálně na *Streptococcus mutans* (Vieira a kol., 2014)

Antioxidační aktivita: extrakty či frakce *Psidium guajava* fungují jako antioxidanty v biologických systémech (Park, 2008)

3.7.2 *Espeletia schultzii* Wedd. (Klejovka)

Čeleď: *Asteraceae* (hvězdicovité) – byliny, v tropech i dřeviny a sukulenty; listy jsou střídavé, bezpalistnaté, jednoduché i dělené; květy jsou nejčastěji trubkovité a oboupohlavné v jednom terči (žluté) a na obvodu jsou květy souměrné (různé barvy, často bílé); čeleď má kosmopolitické rozšíření (Novák a Skalický, 2009)

Rod: asi 45 druhů tohoto rodu (od severozápadní Venezuely po Ekvádor), nápadný symbol zdejší flóry (Hoskovec-Gaston, 2015)

Botanický popis druhu: vytrvalý, hustě bíle plstnatý polokeř; mohutné růžice, dorůstají výšky až 2 m; listy jsou střídavé, přisedlé, kopinaté, 40-60 cm dlouhé a 3-6 cm široké, oboustranně plstnaté, téměř celokrajné, špičaté; květenství (lata) vyrůstá v paždí listů; listeny jsou vstřícné, kopinaté, na bázi prorostlé; úbory vyrůstají na stopkách 3-15 cm dlouhých; jazykovité květy jsou samičí, liguly jsou zlatožluté, trubkovité květy jsou oboupohlavné, funkčně samčí, také žluté; plody jsou trojhranné lysé černé nažky

Nadmořská výška: 2900-4200 m n. m. (Hoskovec-Gaston, 2015)

Výskyt: endemický druh v Ekvádoru, Kolumbii a Venezuele

Oblast: Andy (The Plant List, 2013)

Antimikrobiální aktivita: *Espeletia schultzii* prokázala antibakteriální účinnost proti bakteriím *Bacillus cereus* a *S. aureus* v in vitro testech (Ríos a kol., 1999)

Antioxidační aktivita: na základě osobních schopností a dostupných zdrojů nebyla nalezena žádná informace k výzkumu antioxidační aktivity

3.7.3 *Xanthium catharticum* Kunth

Čeleď: *Asteraceae* (viz 3.7.2 *Espeletia schultzii*)

Rod: reprezentován relativně malým počtem druhů, rozšířen po celém světě (Duke a kol., 2009)

Synonymum: *Xanthium spinosum* L. (The Plant List, 2010a)

Botanický popis druhu: listy se třemi trny na bázi listů (Duke a kol., 2009), bylina

Nadmořská výška: 2000-3500 m n. m.

Oblast: Andy

Provincie: Azuay, Cañar, Chimborazo, Pichincha, Tungurahua (Tropicos, 2016b)

Antimikrobiální aktivita: rostlina prokázala slabou antibakteriální aktivitu (disková difúzní metoda) proti *Bacillus subtilis* a *S. aureus*, a dále antimykotickou aktivitu proti *Candida*

albicans (Culanda a Marinoni, 1991); dále byla zjištěna aktivita proti bakteriím *S. aureus*, *S. epidermis*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella typhi*, ale ne proti *E. coli* (Duke a kol., 2009)

Antioxidační aktivita: na základě osobních schopností a dostupných zdrojů nebyla nalezena žádná informace k výzkumu antioxidační aktivity

3.7.4 *Pothomorphe peltata* Miq.

Čeľad: *Piperaceae* (pepřovníkovité) – často liány, byliny a dřeviny; jednoduché střídavé listy; květy malé, oboupohlavné nebo jednopohlavné, v hroznovitých květenstvích; většinou tropický pás (Novák a Skalický, 2009)

Rod: do tohoto rodu patří dva nejznámější zástupci – *P. peltata* a *P. umbellata*

Synonymum: *Piper peltatum* L.

Botanický popis druhu: bylina, polokeř nebo keř

Nadmořská výška: 0-1000 m n. m.

Oblast: Galapágy, Amazonie, pobřeží

Provincie: Bolívar, Carchi, El Oro, Esmeraldas, Galapágos, Guayas, Loja, Los Ríos, Manabí, Morona-Santiago, Napo, Pastaza, Pichincha, Zamora-Chinchi (Tropicos, 2016c)

Antimikrobiální aktivita: byla zjištěna protizánětlivá aktivita u *Pothomorphe umbellata* (Perazzo a kol., 2005), která je společně s *P. peltata* hojně využívána jako léčivá bylina v Brazílii (Noriega a kol., 2008)

Antioxidační aktivita: hlavním sekundárním metabolitem *Pothomorphe peltata* je 4-nerolidylkatechol β -glykosid, který prokázal pozoruhodnou antioxidační aktivitu (Lopes a kol., 2013); dále prokázal protizánětlivé a antimalarické působení (Cordeiro a kol., 2013)

3.7.5 *Croton elegans* Kunth

Čeľad: *Euphorbiaceae* (pryšcovité) – jednoleté a vytrvalé byliny, polokeře, keře a stromy, často sukulenty; nejčastěji se střídavými listy (u sukulentů redukovaných v šupiny); podobnost s kaktusy; květy tvoří vrcholičnatá květenství; plod je tobolka nebo bobule; mléčnice obsahující latex, u některých druhů alkaloidy, toxalbuminy, pryskyřice a kyanogenní glykosidy; největší zastoupení v tropech a subtropích, méně v mírném pásu (Novák a Skalický, 2009)

Rod: vyskytuje se na obou zemských polokoulích v tropických a subtropických oblastech; tento rod zastupuje kolem 750-ti druhů stromů a keřů; několik z nich je velmi dobře známých pro své léčivé využití; některé druhy produkují hodnotné pryskyřice, které se používají jako nátěry (Schultes a Raffauf, 1990)

Synonymum: *Croton ferrugineus* Kunth (The Plant List, 2010b)

Botanický popis druhu: keř, endemický druh

Nadmořská výška: 1500-3500 m n. m.

Oblast: Andy

Provincie: Imbabura, Pichincha, Tungurahua (Tropicos, 2016d)

Antimikrobiální aktivita: na základě osobních schopností a dostupných zdrojů nebyla nalezena žádná informace k výzkumu antimikrobiální aktivity

Antioxidační aktivita: na základě osobních schopností a dostupných zdrojů nebyla nalezena žádná informace k výzkumu antioxidační aktivity

3.7.6 *Clinopodium nubigenum* Kuntze

Čeleď: *Lamiaceae* (hluchavkovité) – byliny (v tropech i dřeviny); čtyřhranná lodyha se vstřícnými křížmostojnými listy, které jsou zpravidla jednoduché, často chlupaté a žláznaté; květy vyrůstají v lichopřeslenech, dvoudomé tyčinky; mnohé obsahují cenné silice; druhy medonosné, okrasné, plevelné i rumištní; výskyt na všech kontinentech (Novák a Skalický, 2009)

Synonyma: *Thymus nubigenus* Kunth, *Micromeria nubigena* Kunth Benth, *Satureja nubigena* Kunth (Gilardoni a kol., 2011a)

Botanický popis druhu: listy velké 2-4 mm, čepel vejčité kosočtverečná a tupá a na bázi zaoblená, řapíkaté, celokrajné, chlupaté, přeslenité; květy přisedlé, chlupatý kalich, špičaté laloky (Slabý, 2016)

Nadmořská výška: 3000-4500 m n. m.

Oblast: Andy

Provincie: Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Tungurahua (Tropicos, 2016e)

Antimikrobiální aktivita: byla testována antimikrobiální aktivita silic pocházející z *Clinopodium nubigenum* a byla prokázána účinnost proti *C. albicans* (Gilardoni a kol., 2011b)

Antioxidační aktivita: na základě osobních schopností a dostupných zdrojů nebyla nalezena žádná informace k výzkumu antioxidační aktivity

3.7.7 *Solanum nigrum* L. (Lilek černý)

Čeled: *Solanaceae* (lilkovité) – byliny, v tropech i dřeviny; střídavé listy, bezpalistnaté; květy vyrůstají jednotlivě nebo ve vrcholičnatých květenstvích; plody obsahující alkaloidy (především atropin) jsou prudce jedovaté; tropické a subtropické pásmo ve střední a Jižní Americe, zasahují i do mírného pásu (Novák a Skalický, 2009)

Rod: tento rod má kolem 2000 druhů a tím je jedním z největších rodů rostlinné říše; vyskytuje se v mírném až tropickém pásmu po celém světě; zahrnuje byliny, keře a někdy i menší stromy; některé druhy jsou popínavé nebo trnité; rod je zdrojem několika toxických ale i léčivých druhů (Schultes a Raffauf, 1990)

Botanický popis druhu: jedná se o běžný zahradní, polní a rumištní plevel (Novák a Skalický, 2009), vytrvalá bylina 1 m vysoká; vejčité listy, jednoduché, tupě ozubené, klínovitá báze; zvonkovitý kalich, hvězdovitá koruna velká v průměru 8-10 mm, květy bílé nebo vzácně s nachovou příměsí, podlouhlé prašníky 2-3,5 mm dlouhé; plody kulovité až elipsoidní 6-10 mm v průměru, matné nebo lesklé černé nebo purpurově – černé (Padua a Lemmens, 1999)

Nadmořská výška: 0-4000 m n. m.

Oblast: Galapágy, Andy, Amazonie, pobřeží

Provincie: Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Esmeraldas, Galapágos, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Manabí, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua, Zamora-Chinchipe (Tropicos, 2016f)

Antimikrobiální aktivita: byla zjištěna antimikrobiální aktivita methanolového extraktu listů a semen *Solanum nigrum* proti bakteriím *E. coli*, *Citrobacter spp.*, *Shigella flexenari*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *Yersinia aldovae* a také antimykotická aktivita proti houbám *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus parasiticus*, *Trichophyton rubrum*, *Fusarium* a *C. albicans* (Mehjabeen a kol., 2011)

Antioxidační aktivita: na základě osobních schopností a dostupných zdrojů nebyla nalezena žádná informace k výzkumu antioxidační aktivity

3.7.8 *Kalanchoe pinnata* Pers.

Čeled': *Crassulaceae* (tlusticovité) – 1500 druhů zařazených do 35 rodů; primárně se jedná o sukulentní vytrvalé rostliny s masitými listy; většinou jsou to byliny či polokeře; vyskytují se v suchých, kamenitých oblastech

Rod: výskyt na 200 druhů v jižní Africe, Madagaskaru, Číně a na Jávě, některé druhy jsou typické pro Jižní Ameriku; jsou to rozvětvené sukulenty; někdy pěstované pro okrasu (Schultes a Raffauf, 1990)

Synonymum: *Bryophyllum pinnatum* (Tropicos, 2016g)

Botanický popis druhu: vytrvalá sukulentní rostlina (Tatsimo a kol., 2012), bylina nebo polokeř (Tropicos, 2016g); vysoké duté stonky; masité, výrazně tvarované, tmavě zelené listy; květy jsou červené, zvonkovité a svěšené (Taylor a County, 2012)

Nadmořská výška: 0-3000 m n. m.

Oblast: Galapágy, Andy, Amazonie, pobřeží

Provincie: Azuay, Cotopaxi, Galapágos, Guayas, Imbabura, Loja, Los Ríos, Manabí, Napo, Pichincha (Tropicos, 2016g)

Antimikrobiální aktivita: methanolový extrakt prokázal antimikrobiální aktivitu s minimální inhibiční koncentrací od 32 do 512 µg/ml proti *S. aureus*, *C. albicans* a *S. typhi*

Antioxidační aktivita: methanolový extrakt prokázal antioxidační aktivitu s inhibiční koncentrací 50 (IC₅₀ = koncentrace látky, která redukuje volný radikál z 50 %) rovnající se 52,48 µg/ml; kaempferol rhamnosid, izolovaný z *Kalanchoe pinnata*, je jednou z látek, které prokázaly tyto antioxidační účinky, ale také antimikrobiální účinky (Tatsimo a kol., 2012)

3.7.9 *Justicia secunda* Vahl

Čeled': *Acanthaceae* (paznehtníkovité) – byliny nebo dřeviny, zřídka liány; vstřícné listy; květy vyrůstají v paždí střechovitě se kryjících listenů; hlavně tropy a subtropy a teplé oblasti mírného pásu (Novák a Skalický, 2009)

Rod: existuje kolem 300 druhů v tropických a subtropických oblastech na obou zemských hemisférách; jsou to byliny či malé keře; některé aromatické oleje izolované z některých druhů se používají jako složky repelentů či insekticidů a rovněž jako fixační složky v parfémeh a mýdlech (Schultes a Raffauf, 1990)

Botanický popis druhu: bylina nebo keř

Nadmořská výška: 0-500 m n. m.

Oblast: Amazonie

Provincie: Napo (Tropicos, 2016h)

Antimikrobiální aktivita: extrakty z *Justicia secunda* nevykazují antimikrobiální aktivitu proti třem testovaným bakteriím *S. aureus* – ATCC 25923, *P. aeruginosa* – ATCC 27853 a *Enterococcus faecalis* (Carrington a kol., 2012)

Antioxidační aktivita: v *Justicia secunda* byly analyzovány flavonoidy, které jsou známy svojí vysokou antioxidační aktivitou (Koffi a kol., 2013)

3.7.10 *Chenopodium ambrosioides* L. (Merlík vonný)

Čeleď: *Chenopodiaceae* (merlíkovité) – byliny, zřídka dřeviny; jednoduché vstřícné nebo střídavé listy, bezpalistnaté; oboupohlavné nebo jednopohlavné květy, někdy složené do laty; výskyt po celém světě (Novák a Skalický, 2009)

Rod: přibližně 185 druhů trvalých bylin nebo zřídka keřů; vyskytuje se v mírném pásmu na obou polokoulích; semena některých druhů jsou bohatá na škrob (např. *Chenopodium quinoa*); tento rod byl celkem úspěšně zkoumán – izolace flavonoidů, triterpenů, betacyaninů a éterických olejů (Schultes a Raffauf, 1990)

Botanický popis druhu: bylina

Nadmořská výška: 0-4000 m n. m.

Oblast: Galapágy, Andy, Amazonie

Provincie: Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Esmeraldas, Galapagos, Guayas, Imbabura, Manabí, Napo, Pichincha, Tungurahua (Tropicos, 2016ch)

Antimikrobiální aktivita: olejovitý extrakt z *Chenopodium ambrosioides*, bohatý na monoterpeny (Harraz a kol., 2015), prokázal antimikrobiální aktivitu proti vybraným druhům gram-pozitivních i gram-negativních bakterií a některých druhů hub (Nisar a kol., 2013); v testovaných koncentracích (5-100 mg/ml) hydroalkoholického extraktu *Chenopodium ambrosioides* nevykázal antimikrobiální aktivitu proti *S. mutans* (Vieira a kol., 2014)

Antioxidační aktivita: bylo izolováno pět bioaktivních látek z *Chenopodium ambrosioides*, které vykazují antioxidační a protizánětlivou aktivitu (Song a kol., 2015)

3.8 Patogenní mikroorganismy

Mikroorganismy byly prvními živými obyvateli Země a za dobu jejich existence se musely přizpůsobovat podmínkám prostředí, které měnily jejich vlastnosti. Tato skutečnost vedla i ke vzniku velkého počtu druhů. Většina druhů mikroorganismů je neškodná, nebo dokonce pro člověka prospěšná. Avšak druhy patogenní mohou u člověka vyvolat infekční onemocnění (Ferenčík a kol., 2011). Mezi běžně se vyskytující druhy patogenních mikroorganismů patří:

3.8.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus je gramnegativní kok, buňky tvoří nepravidelné shluky připomínající hrozny. *S. aureus* je fakultativně anaerobní bakterie. Její schopnost fermentovat glukózu ji odlišuje od rodu *Micrococcus*.

Hlavním místem výskytu stafylokoků je kůže, kožní žlázy a sliznice teplokrevných živočichů. U lidí se vyskytuje především v nosní dutině. Může být izolován z výkalů, sladké i slané vody, z rostlin, prachu a vzduchu. Ačkoliv se vyskytuje na kůži přirozeně, může způsobovat kožní abscesy. Otrava z jídla je doprovázena nevolností, zvracením, žaludečními křečemi, dávením, vysílením a průjmem (Adams a Moss, 2008).

3.8.2 *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes je fakultativně anaerobní, grampozitivní bakterie, jejíž buňky tvoří diplokoky nebo řetízky. Jedná se o významný kožní patogen, který interaguje s keratinocyty v kožní tkáni (Regnier a kol., 2016).

Infekce způsobené touto bakterií jsou nejčastěji pyogenní (hnisavé) a dělí se do tří skupin. První skupinou jsou pyogenní lokální infekce, kam patří akutní zánět mandlí a hrtanu, angína a kožní vezikuly. Druhou skupinou jsou pyogenní invazivní infekce, což jsou celulitida, nekrotizující fasciitida (zánět a rozpad podkožní tkáně), sepse, atp. Třetí skupinou jsou pozdní následky a komplikace streptokokových infekcí, kam se řadí revmatická horečka a akutní glomerulonefritida (Melter a Malmgren, 2014).

3.8.3 *Escherichia coli*

E. coli patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, kam se řadí gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky. *E. coli* je nesporulující, fermentativní bakterie. Geneticky je velmi podobná rodu *Shigella*, se kterou může být obtížně odlišitelná.

E. coli se v těle vyskytuje buďto jako komenzál ve střevech, kde je neškodná a živí se zbytky potravy hostitele, nebo jako patogen, způsobující řadu infekčních onemocnění jako je sepse, zánět močového měchýře, pneumonie u pacientů se sníženou imunitou a meningitida u novorozenců. *E. coli* je také častou příčinou průjemových onemocnění (Adams a Moss, 2008).

3.8.4 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes patří mezi významné lidské patogeny. Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterii. K identifikaci této bakterie se používá test na krevním agaru, kde synergickým působením hemolyzinu *L. monocytogenes* a *S. aureus* dochází ke zvýšené hemolýze.

L. monocytogenes je všudypřítomná v životním prostředí. Byla izolována ze sladké i slané vody, půdy, čistírenských kalů, hnilých vegetací, výkalů a siláží. Výskyt infekce je nízký, protože náchylný jedinec musí být vystaven dostatečně vysoké dávce virulentního kmene.

Příznaky listeriózy mohou být od těch mírnějších podobné chřipce (bolest hlavy, horečka, občasné gastrointestinální symptomy) až po ty závažné podobající se meningitidě a meningoencefalitidě. Zvýšené riziko je u těhotných žen, protože následkem onemocnění může dojít k předčasnému porodu, potratu či narození mrtvého plodu (Adams a Moss, 2008).

3.8.5 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*

Rod *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou to gramnegativní, nesporulující, fakultativně anaerobní bakterie.

Hlavními příznaky salmonelózy jsou horečka, nevolnost, zvracení, bolest břicha a průjem trvající několik dní. Nemoc obvykle odezní sama, závažnější průběh může být

u slabších skupin jako jsou malé děti, staří lidé a nemocní (Adams a Moss, 2008).

3.8.6 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je nejčastější pseudomonádou u člověka. Patří mezi gramnegativní, aerobní, pohyblivé, nefermentující bakterie. Bývá v tlustém střevě jako součást přirozené mikroflóry. V prostředí se vyskytuje hlavně v tenké vrstvě mikrobů na povrchu různých předmětů, v planktonu, v přírodních i odpadových vodách, v půdě, na kulturních i planě rostoucích rostlinách, u domácích i volně žijících zvířat a v potravinách (zejména v mase).

Je původcem infekcí, které jsou většinou závažné. Způsobuje kožní infekce, snadno infikuje popálenou kůži a bércové vředy. Je původcem zánětu dolních cest dýchacích urogenitálního traktu.

Tato bakterie je relativně rezistentní k antibiotikům. Rezistenci získávají poměrně snadno a proto je potřeba vyšetřovat jejich citlivost. Používají se na ně specifická antipseudomonádová antibiotika jako je karbencilin, tikarcilin, ceftriazim a imipenem (Schindler, 2014).

3.8.7 *Candida albicans*

C. albicans je kvasinkový mikroorganismus patřící do říše hub. U zdravého člověka se kandidy vyskytují v ústní dutině a ve stolici.

C. albicans způsobuje onemocnění kůže, které nemusí být závažné, ale na druhou stranu bývá přetrvávající, bez tendence ke zlepšení či zhoršení. Závažnější infekce vznikají při antibakteriálních léčbách, kdy kvasinky nahrazují potlačenou bakteriální mikroflóru. Často způsobují infekce urogynekologických cest. Při průniku kandid do krevního oběhu mohou být postiženy ledviny, játra, slezina a mozek (Schindler, 2014).

3.9 Antimikrobiální rezistence (AMR)

V poslední době se objevuje závažný fakt, že bakterie u lidí, potravin a zvířat vykazují odolnost vůči nejpoužívanějším antimikrobiálním látkám.

Nejnovější výzkumy ukazují, že rezistence na ciprofloxacín, který je kriticky důležitý pro léčbu infekcí u lidí, je velmi vysoká u bakterie rodu *Campylobacter*, což snižuje možnosti pro efektivní léčbu závažných infekcí přenášených potravinami. Vědci upozorňují, že napříč Evropou se dále šíří bakterie rodu *Salmonella*, která je odolná vůči širokospektrým léčivům (EFSA a ECDC, 2016).

Poslední výroční celoevropská zpráva Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) a Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) zdůrazňuje, že antimikrobiální rezistence představuje vážné riziko pro zdraví lidí a zvířat. Toto riziko je v současné době hlavní prioritou politické agendy v oblasti bezpečnosti potravin. Dále se sleduje souvislost mezi mírou AMR a používáním antimikrobiálních látek u zvířat. Například v zemích severní Evropy, kde se používají antimikrobiální látky u zvířat méně, je zjištěna nižší AMR, než ve východní a jižní Evropě, kde je nejvyšší úroveň AMR v Evropě (EFSA a ECDC, 2016).

Výroční zpráva EFSA a ECDC (2016) také předkládá důkaz rezistence rodu *Salmonella* a *E. coli* k antibiotiku colistin u drůbeže v Evropské unii. Mike Catchpole, vedoucí výzkumu ECDC, v této souvislosti upozornil na fakt, že i léky „poslední záchrany“ nebudou mít brzy požadovaný efekt při léčbě vážných infekcí u lidí způsobených bakteriemi rodu *Salmonella*.

Vytenis Andriukaitis, Evropský komisař pro zdraví a bezpečnost potravin, říká, že hrozba se neomezuje pouze na Evropu, ale jedná se o globální problém, který vyžaduje globální řešení (EFSA a ECDC, 2016).

Dle druhu antibiotika existují rozdílné mechanismy účinku rozkladu buněčné stěny bakterie. Tato práce se zabývá dvěma z nich (beta-laktamová a tetracyklinová antibiotika). Tetracyklin byl použit jako porovnávací antibiotikum při testování.

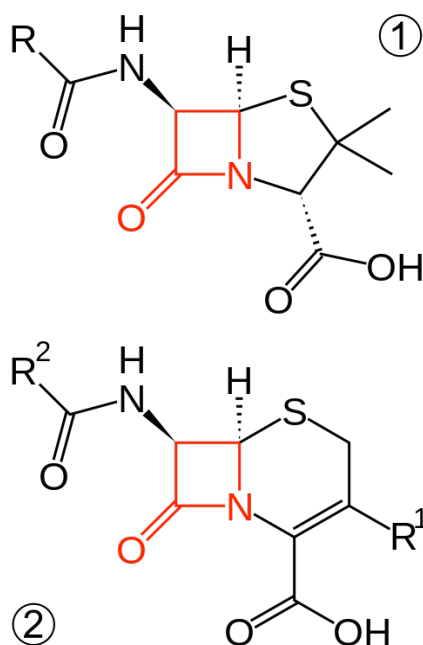
3.9.1 Beta-laktamová antibiotika

Všechna beta-laktamová antibiotika, zahrnující peniciliny a cefalosporiny, jsou inhibitory syntézy buněčné stěny bakterií. Antibiotikum musí nejdříve obklíčit buněčnou stěnu bakterie, navázat se na tzv. „penicillin-binding protein“ (zkr. PBP) a následně může způsobit různé procesy, které vedou k buněčné smrti. Hlavní úlohou antibiotika je inhibice

vzniku peptidoglukanové struktury. Všechna penicilinová i cefalosporinová antibiotika jsou baktericidní. Chemická struktura penicilinu a cefalosporinu je na Obrázku 2.

Doposud bylo vynalezeno 56 beta-laktamových antibiotik a všechny obsahují čtyřčlenný beta-laktamový kruh. Antibakteriální účinnost těchto molekul je umístěna v samotném kruhu (na Obrázku 2 je zvýrazněn červeně).

Bakterie mají proti beta-laktamovým antibiotikům tři typy obranných mechanismů. Mohou zničit antibiotikum beta-laktamázi, druhou možností je snížení penetrace antibiotika do buněčné stěny získáním PBP a třetí variantou je snížení afinity PBP na antibiotikum.



Obrázek 2 Chemická struktura penicilinu (1) a cefalosporinu (2) (Fvasconcellos, 2007)

3.9.2 Tetracykliny

Tetracykliny reversibilně váží 30S ribozomální podjednotky a tím inhibují syntézu bílkovin, která způsobí bakteriostatický účinek.

Jakmile si mikroorganismus vyvine rezistenci k jednomu druhu tetracyklinu, automaticky si zajistí rezistenci vůči celé třídě tohoto léčiva. Dojde k chromozomální mutaci ve vnější membráně bakterie a to vede ke snížení penetrace tetracyklinu do buňky. Bakterie také mohou produkovat proteiny, které interagují s ribozomy a syntéza proteinů může pokračovat bez ohledu na přítomnost tetracyklinu v buňce (Schwalbe a kol., 2007).

3.10 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivitu vykazují sloučeniny, které v nízkých koncentracích působí staticky či cidně proti mikroorganismům (bakteriím, plísním, protozoím a virům) a vykazují vůči nim selektivní toxicitu. Jedná se o látky přírodní i syntetické a patří sem antibiotika, dezinfekční prostředky, konzervační prostředky a jiné látky (Bezpečnost potravin A-Z, 2012a).

Antimikrobiální aktivita přírodních extraktů může být detekována sledováním reakce různých mikroorganismů se vzorky (Cos a kol., 2006). V této práci jsou uvedeny dvě laboratorní metody pro stanovení antimikrobiální aktivity (mikrodiluční a disková difúzní).

3.10.1 Mikrodiluční metoda

Diluční test se může provádět buď jako makrodiluční nebo mikrodiluční bujónová, nebo agarová metoda. Jedná se o běžné kvantitativní metody testování antimikrobiální citlivosti, při kterých se stanovuje minimální inhibiční koncentrace. Pro stanovení antimikrobiální aktivity účinných látek testovaných rostlin dovezených z Ekvádoru byla v této práci použita mikrodiluční bujónová metoda.

V mikrodiluční metodě se používají mikrotitrační destičky, které mají 96 jamek, tudíž je možné na jedné destičce otestovat až 12 vzorků v 8 koncentracích. Po inokulaci bakteriemi a inkubaci po dobu 24 hod při 37 °C se provádí odečet výsledků. Minimální inhibiční koncentrace, která udává množství antimikrobiální látky, při kterém není schopen mikroorganismus růst, se rovná první jamce, ve které není viditelný nárůst bakterie (Jílek a Buchta, 2002).

3.10.2 Diskový difúzní test

Diskovým difúzním testem se zjišťuje kvalitativní citlivost mikroorganismu k antibiotiku či rostlinnému extraktu. V tomto testování se určí buď citlivost, nebo rezistence bakterie k testované látce.

Principem je difúze testované látky do agaru s naočkovaným bakteriálním testovaným kmenem. V případě potlačení růstu bakterie, dojde k vytvoření tzv. inhibiční zóny, která se pak měří v milimetrech a následně se porovnává s tabulkovými hodnotami, aby se určilo, zda se jedná o citlivost či rezistenci bakterie. Odečet vzorků se provádí po době inkubace (24 hod) při 37 °C. Lze testovat až 6 vzorků proti jednomu mikroorganismu na jednom disku (Schindler, 2014).

3.11 Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky, které zabraňují oxidačnímu stresu v těle. Snižují aktivitu volných radikálů, které jsou přirozenými vedlejšími produkty metabolismu. Oxidační působení na buňky způsobují stárnutí a různé zdravotní problémy (kardiovaskulární onemocnění, některé typy rakoviny). V potravinách oxidace způsobuje žluknutí tuků, poškozování biologicky aktivních látek a barevné změny.

Z chemického hlediska jsou antioxidanty velmi různorodou skupinou. Patří sem přirozeně se vyskytující antioxidanty jako jsou rostlinná barviva (flavonoidy, isoflavony), fenolické látky, tokoferoly, fosfolipidy, lignany, diterpeny, kurkuminoidy, taniny atd. Některé antioxidanty se vyrábějí synteticky jako například vitamin A, C, E či selen, které se často přidávají do doplňků stravy.

Některé antioxidanty se přidávají přímo do potravin za účelem prodloužení trvanlivosti a konzervace (tokoferoly, galáty, siřičitany a další). Tento přírůstek musí být však regulován, neboť ani tyto látky není dobré přijímat v nadměrném množství. Jejich účinek se může změnit v silně prooxidační (Bezpečnost potravin A-Z, 2012b).

„Trolox equivalent antioxidant capacity“ (TEAC) měří antioxidační kapacitu dané látky ve srovnání se standardem (trolox). TEAC se často používá k měření antioxidační kapacity potravin, nápojů a doplňků stravy. Využívají ho např. metody ORAC a DPPH (Huang a kol., 2005).

3.11.1 Antioxidační testování ORAC

Jednou z metod testování antioxidační aktivity, která byla použita v této práci, je „oxygen radical absorbance capacity“ (ORAC). Tato metoda se používá pro měření antioxidační aktivity různých vitamínů, fytochemikálií a dalších organických a anorganických sloučenin.

ORAC měří oxidační degradaci fluorescenční molekuly (v našem případě fluoresceinu) po smíchání s kyslíkovým radikálovým iniciátorem. Intenzita fluorescence se snižuje se zvyšující se oxidační degradací. Pokud je přítomen antioxidant, chrání fluorescenční molekulu před degradací a intenzita fluorescence klesá pomaleji. To znamená, že pokud fluorescein udržuje svojí intenzitu, tak je přítomno málo kyslíkových radikálů, nebo je přítomen antioxidant (Garrett a kol., 2010).

3.11.2 Antioxidační testování DPPH

DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) je tmavě zbarvený krystalický prášek složený ze stabilních radikálových molekul. DPPH je v metanolu intenzivně fialově zbarven, toto zbarvení se v případě přítomnosti antioxidantu odbarvuje do žluta. Principem reakce je redukce radikálu DPPH• za vzniku DPPH-H (Sharma a Bhat, 2009). K práci se používají mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Destička se udržuje v temnu po dobu 30 min při pokojové teplotě a následně je změřena absorbance. Výsledky se udávají jako 50% inhibiční koncentrace (IC₅₀) (Tauchen a kol., 2015).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Rostliny byly vybrány na základě tradičního využití na onemocnění, která jsou nejčastěji způsobena bakteriemi (viz Tabulka 1). Paní Lic. Viviana Margarita Espinel Jara, která působí na univerzitě „Universidad Técnica del Norte“ ve městě Ibarra v Ekvádoru, rostliny sbírala v různých oblastech Ekvádoru. Poskytla také informace o místě sběru a o tradičním využití těchto rostlin. Rostliny byly po sběru sušeny ve stínu po dobu 3-5 dnů dle rostlinného druhu. Rostlinný materiál převzal pan Doc. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani, který ho poskytl České zemědělské univerzitě pro testování. Místo sběru, botanické zařazení, latinský a místní název je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 1 Tradiční využití rostlinného materiálu (Jara, 2016, osobní sdělení)

vzorek č.	latinský název	využívaná část rostliny	způsob využití	tradiční využití
1	<i>Psidium guajava</i>	listy kůra plody	nálev nálev nálev, džus, jídlo (plod)	diabetes mellitus, střevní potíže střevní potíže (průjem) kurděje, střevní potíže (průjem)
2	<i>Espeletia schultzii</i>	listy	nálev	chřipka, nachlazení (rýma), dýchací problémy
3	<i>Xanthium catharticum</i>	celá rostlina	nálev	zánět močového měchýře a prostaty
4	<i>Pothomorphe peltata</i>	listy	obklad	křečové žíly, hematomy
5	<i>Croton elegans</i>	listy	nálev, koupel	kožní nemoci v pánevní dutině
6	<i>Clinopodium nubigenum</i>	listy	nálev	výšková nemoc, chřipka, nachlazení, dýchací problémy
7	<i>Solanum nigrum</i>	listy	nálev, koupel	kožní nemoci v pánevní dutině
8	<i>Kalanchoe pinnata</i>	listy	nálev, obklad, šťáva	kožní nemoci v pánevní dutině, angína
9	<i>Justicia secunda</i>	listy	nálev	diabetes mellitus, cholesterol
10	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	listy	jídlo	chudokrevnost, ztráta paměti

Tabulka 2 Přehled testovaných rostlin a místo jejich sběru (Jara, 2016, osobní sdělení)

vzorek č.	latinský název	místní název	čeleď	místo sběru
1	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba	<i>Myrtaceae</i>	Imbabura, Ibarra, Lita Rocafuerte
2	<i>Espeletia schultzii</i>	Frailejones	<i>Asteraceae</i>	Carchi, Espejo, Reserva ecológica El Ángel
3	<i>Xanthium catharticum</i>	Casha-marucha	<i>Asteraceae</i>	Imbabura, Ibarra, Sagrario
4	<i>Pothomorphe peltata</i>	Maria Panka, Anís María Panga	<i>Piperaceae</i>	Napo, Archidona, Sábata, Amupakin
5	<i>Croton elegans</i>	Chala, Cucharilla, Mosqueo, Purga	<i>Euphorbiaceae</i>	Imbabura, Ibarra, Sagrario, Yahuarcocha
6	<i>Clinopodium nubigenum</i>	Zunfo	<i>Lamiaceae</i>	Imbabura, Ibarra, Agochagua, Zuleta
7	<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora	<i>Solanaceae</i>	Imbabura, Ibarra, Sagrario, Yahuarcocha
8	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Chukri yuyo, Chukri yuyi, Hoja del Viento, Espíritu Santo	<i>Crassulaceae</i>	Napo, Tena, Tena, Barrio Bellavista Baja
9	<i>Justicia secunda</i>	Insulina panga, Hoja de insulina, Sigamochila, Cascajera, Cascajero	<i>Acanthaceae</i>	Imbabura, Ibarra, Sagrario, Barrio La Victoria
10	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Paico, apazote	<i>Chenopodiaceae</i>	Imbabura, Ibarra, Sagrario, Yahuarcocha

4.2 Příprava extraktů

4.2.1 Chemikálie

- denaturovaný líh (96%, Penta, CZ); destilovaná voda

4.2.2 Extrakce

Bylo naváženo cca 5 g sušené rostliny, která byla homogenizována v kávovém mlýnku (Valentino, KM 5001). Mlýnek byl mezi jednotlivým mixováním očištěn destilovanou vodou a lihem. Vzorky byly umístěny do prachových nádob se zábrusem. Prachovnice byly zality 80% denaturovaným lihem, každá objemem 100 ml. Hrdlo prachovky s víčkem bylo zajištěno parafínem (Bemis, Neenah – WI 54956), aby obsah nevytěkal. Směs byla důkladně zamíchána. Vzorky byly macerovány po dobu deseti dní za občasného zamíchání.

Vzorky byly po uplynulé době macerace nejdříve zfiltrány na podtlakovém filtru. Byl použit filtrační papír s průměrem 12,5 cm. Všechny vzorky byly následně odpařeny na rotační vakuové odparce (Laborata 4000 – efficient, Heidolph) při 40 °C a maximální rychlosti 280 otáček za minutu, až na poslední (desátý) vzorek, který byl odpařen na centrifugační odparce (ScanLaf, Scanvac), protože měl tendenci k explozivnímu varu. Hmotnost kvantitativního zisku byla zjištěna rozdílem hmotností baňky se vzorkem a prázdné baňky. Přesná navážka vzorků a následná výtěžnost po odparu je uvedena v Tabulce 3.

Odpařené vzorky byly před dalším použitím skladovány v chladničce (4 °C).

Tabulka 3 Navážky vzorků určených k maceraci a kvantitativní zisk vzorků po odparu

vzorek	navážka macerace (g)	výtěžek (g)	výtěžnost (%)
<i>P. guajava</i>	5,64	1,38	24,46
<i>E. schultzei</i>	5,5	1,77	32,18
<i>X. catharticum</i>	5,31	1,12	21,09
<i>P. peltata</i>	5,53	0,94	16,99
<i>C. elegans</i>	5,61	2,18	38,86
<i>C. nubigenum</i>	6,38	0,66	10,34
<i>S. nigrum</i>	6,41	2,28	35,56
<i>K. pinnata</i>	5,41	1,31	24,21
<i>J. secunda</i>	5,23	0,92	17,59
<i>Ch. ambrosioides</i>	5,32	1,02	19,17

4.3 Stanovení MIC extraktů

4.3.1 Chemikálie

- Mueller-Hintonův bujón (MHB) (Oxoid, CZ); tween (Roth, GE); DMSO (dimethylsulfoxid) (Penta, CZ); Tetracyklin T3258-5G (Sigma – Aldrich chemie, CZ); denaturovaný líh (70%, Penta, CZ); destilovaná voda

4.3.2 Testované mikroorganismy

Bylo testováno 8 sbírkových kmenů a jeden klinický izolát:

- *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278534, *Candida albicans* ATCC 10231, *Streptococcus pyogenes* CCM 4425, *Staphylococcus aureus* klinický izolát, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591

4.3.3 Mikrodiluční bujónová metoda

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byla zvolena mikrodiluční bujónová metoda. Úkolem bylo určit minimální inhibiční koncentrace jednotlivých vzorků i antibiotika, které byly testované na vybrané druhy mikroorganismů. Všechny pomůcky byly před použitím sterilovány v autoklávu (Tuttnauer, 3140 E), (15 min, 121 °C). K práci se používal MHB.

Bylo naváženo přibližně 3 mg vzorku do 1,5 ml zkumavky (eppendorf). Byl přidán tween jakožto rozpouštědlo, a to 0,5 % konečného objemu. Vzorky se daly na pět minut na centrifugu (Minispin plus, eppendorf), aby se celý objem přesunul na dno zkumavky a byl lépe rozpustitelný. Vzorky byly následně umístěny do ultrazvukové lázně (Bandelin, Sonorex digitec), dokud se nerozpustily. Po několika neúspěšných pokusech rozpustit vzorek číslo 8 (tween/DMSO/kombinace) byl tento vzorek vyřazen z dalšího testování. Do vzorku číslo 6 bylo přidáno stejné množství DMSO jako tweenu, aby bylo možné vzorek rozpustit. Následným přidáním MHB byl vzorek naředěn na výchozí koncentraci (viz Tabulka 4). Konečná koncentrace závisela na schopnosti rozpustnosti vzorku. Nejvyšší testovaná koncentrace byla určena na začátku a během testování se již neměnila.

Tabulka 4 Typ rozpouštědla a hodnoty nejvyšších testovaných koncentrací

vzorek	rozpouštědlo	nejvyšší testovaná koncentrace (mg/ml)
<i>P. guajava</i>	tween	0,512
<i>E. schultzei</i>	tween	1,024
<i>X. catharticum</i>	tween	1,024
<i>P. peltata</i>	tween	1,024
<i>C. elegans</i>	tween	1,024
<i>C. nubigenum</i>	tween + DMSO	2,048
<i>S. nigrum</i>	tween	1,024
<i>J. secunda</i>	tween	1,024
<i>Ch. ambrosioides</i>	tween	1,024

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno (schéma viz Tabulka 5):

- 100 μ l média do všech jamek kromě řady A (žlutá barva)
- 200 μ l média do dvou jamek – pozitivní a negativní kontrola (oranžová barva)
- 200 μ l vzorku (červená barva)
- 200 μ l antibiotika (zelená barva)

Pomocí multikanálové pipety byla vytvořena ředící řada.

Tabulka 5 Znárodnění rozmístění jednotlivých látek v mikrotitrační destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Oranžová	Červená	Červená	Červená	Červená	Červená	Červená	Červená	Červená	Červená	Zelená	Oranžová
B	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá
C	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá
D	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá
E	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá
F	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá
G	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá
H	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá	Žlutá

žlutá: médium, oranžová: pozitivní a negativní kontrola, červená: vzorek, zelená: antibiotikum

Jeden den před samotným očkováním bylo vytvořeno inokulum bakterií. Bakterie se dále připravovaly za pomoci denzilometru. Primární koncentrace inokula byla 10^8 kolonií tvořících jednotku (KTJ) na ml. Bakteriální suspenze byla dále naředěna na 10^6 KTJ/ml, tento roztok byl přidáván injekční stříkačkou po kapce (10 μ l) do každé jamky mikrotitrační destičky. Konečný počet mikroorganismů byl tedy 10^5 KTJ/ml.

Vzorky byly umístěny do termostatu (37°C) a druhý den bylo provedeno vyhodnocení výsledků. Každé testování se vzorky připravovaly znovu, mezi jednotlivým testováním byly extrakty uloženy v chladničce (4 °C).

4.4 Stanovení antioxidantní aktivity

4.4.1 Chemikálie

- fosfátový pufr: vyroben z K_2HPO_4 a KH_2PO_4 (Lachema – Lach – Ner, s.r.o., CZ), upraven na pH=7; fluorescein (Sigma – Aldrich chemie, CZ); trolox (vitamin E; 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (Sigma – Aldrich chemie, CZ); AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid) (Sigma – Aldrich chemie, CZ); DMSO (dimethylsulfoxid) (Penta, CZ); denaturovaný líh (70%, Penta, CZ); destilovaná voda

4.4.2 ORAC metoda

Bylo naváženo cca 10 mg vzorku do 1,5 ml zkumavky (eppendorf), který byl rozpuštěn v DMSO na konečnou koncentraci 10 mg/ml. Vzorky č. 3, 4, 5, 7, 9, 10 byly dále naředěny na koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ (konečná koncentrace v mikrotitrační destičce byla 5 $\mu\text{g/ml}$) a vzorky č. 1, 2, 6, 8 byly naředěny na koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ (konečná koncentrace v mikrotitrační destičce byla 2,5 $\mu\text{g/ml}$) ve fosfátovém pufru, který má simulovat prostředí krve v lidském těle.

Byly připraveny standardy troloxu a to v koncentracích 64, 32, 16, 8 a 4 $\mu\text{g/ml}$. Posledním ze standardů byl blank ($c_{\text{trolox}} = 0 \mu\text{g/ml}$). Dále byl připraven zásobní roztok fluoresceinu ($c = 0,00008 \text{ mg/ml}$).

Vše bylo napipetováno do černé mikrotitrační destičky, která byla po dobu 10-ti minut inkubována při 37 °C (simulace tělní teploty).

Mezitím byl připraven roztok AAPH („volné radikály“) v konečné koncentraci 0,0414 g/ml, který byl přidán po deseti minutách inkubace do destičky všude, kromě jamek s vodou. Ve všech jamkách musí být stejný konečný objem.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno (schéma viz Tabulka 6):

- 200 μ l vody – do krajních jamek – aby nedocházelo ke zkreslování výsledků – neměří se (modrá barva)
- 150 μ l fluoresceinu – do všech jamek, kde není voda
- 25 μ l standardu trolox (žlutá barva)
- 25 μ l vzorku (červená barva)
- 25 μ l AAPH – do všech jamek, kde není voda

Tabulka 6 Znázornění rozmístění jednotlivých látek v mikrotitrační destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		64	8	1	4	7	10				16	
C		64	8	1	4	7	10				16	
D		32	4	2	5	8				64	8	
E		32	4	2	5	8				64	8	
F		16	blank	3	6	9				32	4	
G		16	blank	3	6	9				32	4	
H												

modrá: voda, žlutá: standard, červená: vzorky, zelená: cizí vzorky

Destička se vložila do readeru (Tecan microplate reader, Infinite M200) a proběhlo měření, trvající dvě hodiny, při teplotě 37 °C. Výsledky z readeru byly zpracovány v programu Excel.

Byly provedeny tři nezávislé testy vždy ve dvou opakováních. Vzorky byly mezi jednotlivými testy skladovány v mrazničce (-20 °C).

5 Výsledky

5.1 Antimikrobiální aktivita

Vzorky byly vyhodnocovány na základě viditelně narostlých či nenarostlých bakterií. Výsledky testování jsou znázorněny v Tabulce 7 a 8.

Tabulka 7 Minimální inhibiční koncentrace (mg/ml) vzorků a antibiotika – 1. část

vzorek/ATB	EC	LI	SAL	P
<i>P. guajava</i>	> 0,512	> 0,512	> 0,512	> 0,512
<i>E. schultzei</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>X. catharticum</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>P. peltata</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>C. elegans</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>C. nubigenum</i>	> 2,048	> 2,048	> 2,048	> 2,048
<i>S. nigrum</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>J. secunda</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>Ch. ambrosioides</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
Tetracyklin	< 0,00390625	< 0,00390625	< 0,00390625	< 0,00390625

EC = *E. coli*, LI = *L. monocytogenes*, SAL = *S. Enteritidis*, P = *P. aeruginosa*

Bakterie *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. Enteritidis* ATCC 13076 a *P. aeruginosa* ATCC 278534 byly testovány ve dvou opakováních. V těchto testech bylo zřejmé, že se MIC neblíží ani počáteční testované koncentraci vzorků.

Tabulka 8 Minimální inhibiční koncentrace (mg/ml) vzorků a antibiotika – 2. část

vzorek/ATB	SP	SA - 25923	SA - KI	SA - 33591	CA
<i>P. guajava</i>	> 0,512	> 0,512	> 0,512	> 0,512	> 0,512
<i>E. schultzii</i>	0,256	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>X. catharticum</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>P. peltata</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>C. elegans</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>C. nubigenum</i>	> 2,048	> 2,048	> 2,048	> 2,048	> 2,048
<i>S. nigrum</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>J. secunda</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
<i>Ch. ambrosioides</i>	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024	> 1,024
Tetracyklin	0,000164	0,000328	0,0625	0,25	> 0,5

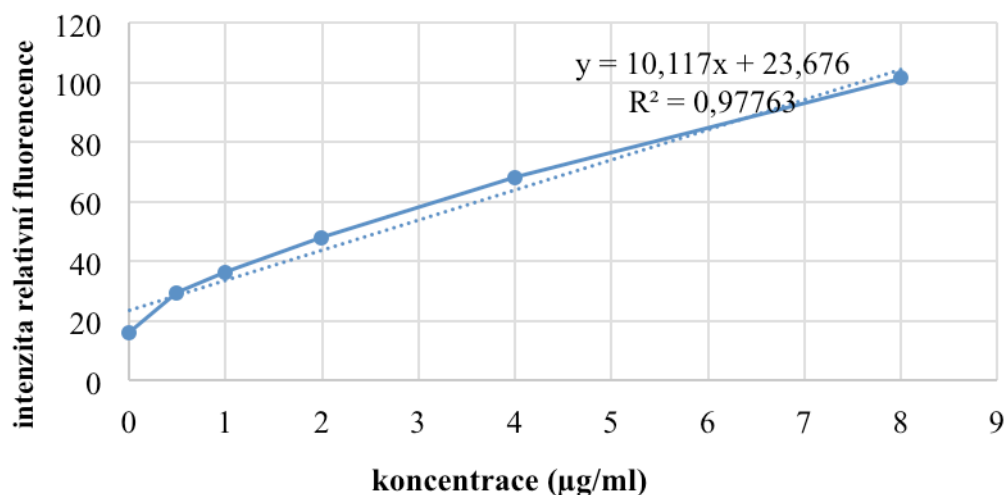
SP = *S. pyogenes*, SA = *S. aureus*, KI = klinický izolát, CA = *C. albicans*

Mikroorganismy *S. aureus* ATCC 33591, *S. aureus* klinický izolát, *S. pyogenes* CCM 4425 a *C. albicans* ATCC 10231 byly testovány dvakrát ve dvou opakováních. *S. aureus* ATCC 25923 byl testován pětkrát ve dvou opakováních.

U *C. albicans* nebyla zjištěna minimální inhibiční koncentrace u žádného vzorku ani u antibiotika, u kterého byla MIC vyšší než testovaná (0,5 mg/ml). U *S. aureus* ATCC 33591 a *S. aureus* klinického izolátu nebyla zjištěna MIC u žádného ze vzorků, ale byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace antibiotika. Proti *S. aureus* ATCC 25923 prokázaly aktivitu rostliny *E. schultzii*, *X. catharticum*, *P. peltata*, *J. sekunda* a *Ch. ambrosioides* v počáteční koncentraci, ale pouze ve výrazné menšině z deseti opakování (2-3 pozitivní výsledky). Tato koncentrace (u všech vzorků rovna 1,024 mg/ml) by mohla být hraniční minimální inhibiční koncentrací. Pro *S. aureus* ATCC 25923 byla zjištěna MIC antibiotika, která je rovna 0,000328 mg/ml. Pro porovnání bylo na inhibici *S. aureus* klinického izolátu a *S. aureus* ATCC 33591 potřeba o dva až tři řády silnější antibiotikum než na inhibici *S. aureus* ATCC 25923. Rostlina *Espeletia schultzii* prokázala inhibici proti *S. pyogenes* v koncentraci 0,256 mg/ml, MIC antibiotika je rovna 0,000164 mg/ml.

5.2 Antioxidační aktivita

Standardy vytvoří kalibrační křivku, která je znázorněna na Obrázku 3. Hodnoty relativní fluorescence standardů se směrodatnou odchylkou jsou zapsány v Tabulce 9.



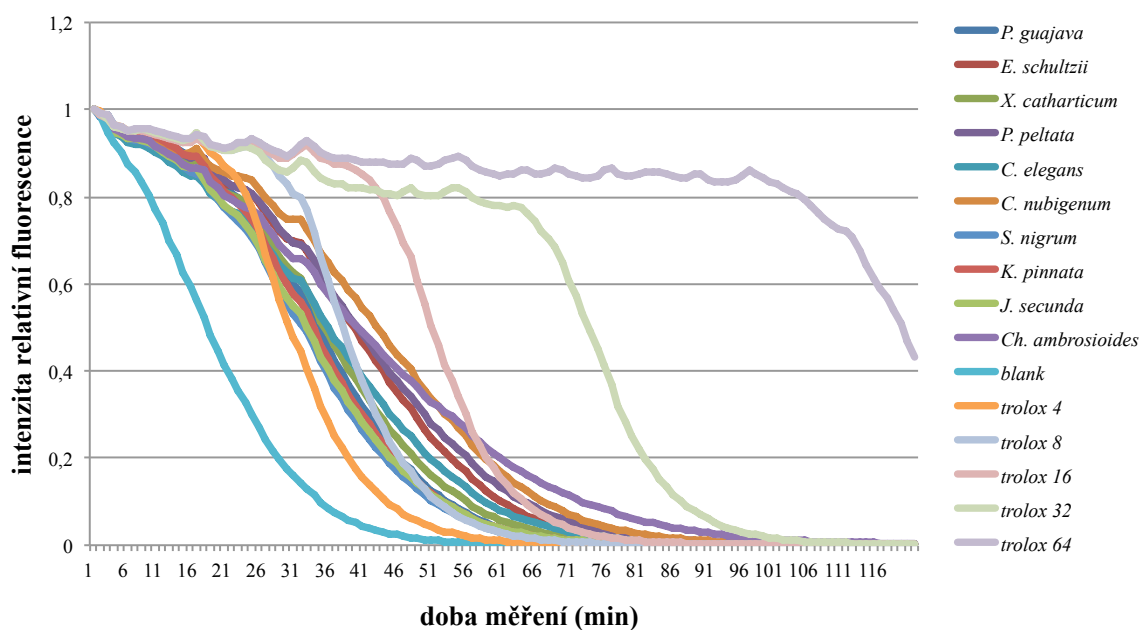
Obrázek 3 Kalibrační křivka

Tabulka 9 Hodnoty relativní fluorescence standardu

trolox	koncentrace (ug/ml)	relativní fluorescence ± SD
trolox 64	8	102,041 ± 1,77
trolox 32	4	65,014 ± 7,44
trolox 16	2	47,783 ± 3,05
trolox 8	1	36,569 ± 2,93
trolox 4	0,5	29,665 ± 2,75
blank	0	18,553 ± 2,47

SD=směrodatná odchylka

Průběh měření antioxidační aktivity je znázorněn na Obrázku 4. Každou minutu bylo provedeno měření vzorků i standardů, které vytvoří spojnicový graf. Vzorky se následně přepočítají na ekvivalent k vitamínu E (viz Tabulka 10).



Obrázek 4 Průběh měření antioxidační aktivity vzorků

Tabulka 10 Ekvivalent troloxu ku vzorkům

vzorek	$\mu\text{g TE/mg extraktu} \pm \text{SD}$
<i>P. guajava</i>	$360,73 \pm 23,88$
<i>E. schultzii</i>	$540,61 \pm 4,87$
<i>X. catharticum</i>	$198,49 \pm 7,70$
<i>P. peltata</i>	$298,27 \pm 8,56$
<i>C. elegans</i>	$743,64 \pm 28,56$
<i>C. nubigenum</i>	$692,66 \pm 3,73$
<i>S. nigrum</i>	$134,05 \pm 9,04$
<i>K. pinnata</i>	$334,81 \pm 2,64$
<i>J. secunda</i>	$146,58 \pm 8,93$
<i>Ch. ambrosioides</i>	$334,02 \pm 30,11$

TE=ekvivalent troloxu, SD=směrodatná odchylka

Z testovaných vzorků vykazuje nejvyšší antioxidační aktivitu *Croton elegans* a *Clinopodium nubigenum*. Naopak nejnižší antioxidační aktivitu má *Solanum nigrum*.

6 Diskuze

6.1 Antimikrobiální aktivita

Jediný pozitivní výsledek antimikrobiální aktivity v této práci prokázala *Espeletia schultzi* (vzorek č. 2) proti *S. pyogenes* v koncentraci 0,256 mg/ml. Extrakt z této rostliny byl v minulosti testován i proti *B. cereus* a *S. aureus*, proti kterým taktéž prokázal antibakteriální účinnost (Ríos a kol., 1999). V této práci byla nejvyšší testovaná koncentrace vzorku *E. schultzi* (1,024 mg/ml) nejspíše hraniční proti *S. aureus* ATCC 25923, protože účinnost byla prokázána ve třech z deseti opakování. Tradičně se tato rostlina využívá na chřipku, nachlazení a dýchací problémy jako nálev připravený z listů (Jara, 2016, osobní sdělení). Při těchto nemocech se *S. pyogenes* a *S. aureus* můžou vyskytovat v dýchacích cestách (Melter a Malmgren, 2014), (Adams a Moss, 2008). Pokud by se in vitro testy daly aplikovat na in vivo podmínky bez ohledu na přítomnost synergických a antagonistických mechanismů v lidském těle, bylo by potřeba 55,7 g rostliny na alkoholový extrakt pro 70 kg jedince (počítá se s výtěžností rostliny 32,18 %; Tabulka 3). Výtěžnost tohoto extraktu by byla 17,9 g, což je poměrně vysoká dávka a reálné konzumní hodnoty by se měly pohybovat níže.

Ostatní rostliny prokázaly částečnou aktivitu proti *S. aureus* ATCC 25923, či žádnou v testovaných koncentracích. Klouček a kol. (2004) testoval antimikrobiální aktivitu rostlin dovezených z Peru pomocí mikrodiluční bujónové metody v koncentracích od 0,25 mg/ml do 16 mg/ml. Bylo testováno devět rostlin proti devíti mikroorganismům. Tři rostliny měly MIC stejnou jako *Espeletia schultzi* v této práci (0,25 mg/ml), každá proti jedné bakterii. Přibližně v jedné třetině případů vyšla minimální inhibiční koncentrace 1 mg/ml, druhá třetina měla MIC v rozmezí od 2 mg/ml do 16 mg/ml a poslední třetina byly vzorky, které nevykazovaly žádnou aktivitu. V této práci byla nejvyšší testovaná koncentrace 2,048 mg/ml u jedné rostliny, 1,024 mg/ml u sedmi rostlin a 0,512 mg/ml u jedné rostliny. Je možné, že kdyby se zvýšily tyto koncentrace, bylo by nalezeno více pozitivních výsledků.

Pothomorphe peltata je léčivá bylina, jejíž listy se v Ekvádoru používají jako obklad na hematomy a křečové žíly (Jara, 2016, osobní sdělení). Ve třech z deseti případů byla nalezena MIC proti *S. aureus* ATCC 25923, která je rovna 1,024 mg/ml.

Rostlina *Xanthium catharticum* se tradičně používá na zánět močového měchýře a zánět prostaty (Jara, 2016, osobní sdělení). Zánět prostaty může mít mnoho příčin, mezi které patří také bakterie *E. coli* (Coker a Dierfeldt, 2016). Zánět močového měchýře je nejčastěji

způsoben bakterií *E. coli* (Ulett a kol., 2013). Proti *E. coli* však nebyla prokázána účinnost ani v této práci ani podle Duke a kol. (2009). Dle předchozího testování byla prokázána aktivita proti mikroorganismům, které byly testovány i v této práci (*S. aureus*, *C. albicans* a *P. aeruginosa*) a proti dalším bakteriím (*B. subtilis*, *B. cereus*, *S. epidermis*, *S. typhi* a *Klebsiella pneumoniae*) (Culanda a Marinoni, 1991), (Duke a kol., 2009). U dvou z deseti testování byla určena minimální inhibiční koncentrace proti *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 1,024 mg/ml).

Extrakt z *Justicia secunda* nevykazuje antimikrobiální aktivitu ani v této práci ani v dostupné literatuře, kde byla prokázána neaktivita proti *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* a *E. faecalis* (Carrington a kol., 2012). Avšak ve dvou z deseti opakování v této práci byla změřena MIC = 1,024 mg/ml proti *S. aureus* ATCC 25923. Tradičně se tato rostlina využívá na onemocnění diabetes mellitus a vysoký cholesterol ve formě nálevu vyrobeného z listů (Jara, 2016, osobní sdělení). Nebylo shledáno, že by tyto nemoci mohly být způsobeny patogenními mikroorganismy.

Listy *Chenopodium ambrosioides* slouží v Ekvádoru jako lék ve formě jídla na chudokrevnost a ztrátu paměti (Jara, 2016, osobní sdělení). Extrakt z této rostliny byl ve dvou z deseti opakování účinný proti *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 1,024 mg/ml). Je možné, že se jedná o hraniční minimální inhibiční koncentraci.

Dle odborné literatury *Psidium guajava* v minulosti prokázala antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* a *S. aureus*. Avšak testován byl benzofenonový glykosid, izolovaný z listů (Ukwueze a kol., 2015), který jakožto účinná látka má samozřejmě silnější působení oproti sumárnímu extraktu z homogenizovaného rostlinného materiálu, který byl použitý v této práci. Dále byla prokázána aktivita proti *S. mutans* (Vieira a kol., 2014), který však nebyl v této práci testován. Dle tradičního využití se používá na střevní potíže (většinou průjmy) (Jara, 2016, osobní sdělení), které může způsobovat právě *E. coli*. Dalšími testovanými bakteriemi způsobující infekční průjem jsou *S. Enteritidis* a *L. monocytogenes* (Adams a Moss, 2008), proti kterým extrakt v testovaných koncentracích neprokázal žádnou aktivitu, ani nebyla nalezena žádná informace o úspěšném či neúspěšném testování *Psidium guajava* proti těmto dvěma bakteriím.

U rostliny *Croton elegans* nebyla prokázána antimikrobiální aktivita proti žádnému z testovaných mikroorganismů, ani nebyly nalezeny žádné studie týkající se výzkumu antimikrobiální aktivity na základě osobních schopností a dostupných zdrojů. Tradičně se tato rostlina využívá na kožní nemoci v pánevní dutině (Jara, 2016, osobní sdělení), které můžou

být způsobeny např. *E. coli* (Adams a Moss, 2008), *C. albicans* a *P. aeruginosa* (Schindler, 2014).

Z dostupných zdrojů bylo zjištěno úspěšné testování silic získaných z *Clinopodium nubigenum* proti *C. albicans* (Gilardoni a kol., 2011b). Nálev z listů této rostliny se v Ekvádoru tradičně využívá na léčbu chřipky, nachlazení a dýchacích problémů co se mikrobiologických onemocnění týká. Dále se používá i na výškovou nemoc (Jara, 2016, osobní sdělení), kde nebyla shledána souvislost s antimikrobiálním využitím.

Nálev či koupel ze *Solanum nigrum* se tradičně využívá na kožní nemoci v pánevní dutině (Jara, 2016, osobní sdělení). Mehjabeen a kol. (2011) zjistili antimikrobiální aktivitu proti *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Citrobacter spp.*, *Shigella flexenari*, *Yersinia aldovae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus parasiticus*, *Trichophyton rubrum* a *Fusarium*. Patogeny *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, které byly zároveň testovány v této práci, mohou způsobit kožní záněty (Adams a Moss, 2008), (Schindler, 2014).

Kalanchoe pinnata byla vyřazena z antimikrobiálního testování z důvodu špatné rozpustnosti extraktu. Tradičně se využívá nálev, šťáva nebo obklad z listů na kožní nemoci v pánevní dutině a na angínu (Jara, 2016, osobní sdělení). V předešlých testech byla prokázána aktivita methanolového extraktu proti *S. aureus*, *C. albicans* a *S. typhi* s MIC od 0,032 do 0,512 mg/ml (Tatsimo a kol., 2012).

Jedním z důvodů, proč se neprokázala účinnost těchto rostlin, může být homogenizace rostlinného materiálu. Některé z nich totiž obsahovaly více rostlinných částí (kořeny, stonky, listy), ale ve skutečnosti je používána pouze některá část rostliny (viz Tabulka 1). Bližší informace o rostlinách byly k dispozici bohužel až po zpracování rostlinného materiálu. Další chyby mohly vzniknout neovlivnitelnými odchylkami přesnosti použitých přístrojů.

6.2 Antioxidační aktivita

Na základě osobních schopností a dostupných zdrojů nebyla nalezena žádná informace k výzkumu antioxidační aktivity *Croton elegans*, avšak 1 mg testovaného extraktu je ekvivalentem 743,64 µg troloxu a jedná se o nejsilnější antioxidační aktivitu v této práci. Tradičně se tato rostlina používá na kožní nemoci v pánevní dutině (Jara, 2016, osobní sdělení).

Rostlina *Clinopodium nubigenum* vykazovala druhou nejsilnější antioxidační aktivitu v této práci (1 mg extraktu je ekvivalentní ku 692,66 µg troloxu). K této rostlině a výzkumu antioxidační aktivity taktéž nebyly nalezeny žádné odborné články. Tradičně se rostlina využívá na výškovou nemoc, chřipku, nachlazení a dýchací problémy (Jara, 2016, osobní sdělení). Antioxidanty mohou zlepšovat různé funkce imunitního systému, který zajišťuje významnou ochranu při infekcích způsobených bakteriemi, viry nebo parazity (Puertollano a kol., 2011).

Vysokou antioxidační aktivitu v rámci této práce také prokázala *Espeletia schulzii*. Byla naměřena ekvivalentní hodnota 1 mg extraktu ku 540,61 µg troloxu. Rostlina se tradičně využívá na chřipku, nachlazení a dýchací problémy (Jara, 2016, osobní sdělení).

Listy *Psidium guajava* se tradičně používají jako nálev na zmírnění příznaků onemocnění diabetes mellitus (Jara, 2016, osobní sdělení), které může souviset se vznikem oxidačního stresu (Maxwell a kol., 1997), (Sachdev a kol., 1999). Avšak Ministerstvo zemědělství v Americe uvedlo, že prevence a léčba chronických onemocnění typu rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, Alzheimerovy choroby nebo diabetes mellitus by neměla být připisována antioxidačnímu působení, jelikož ještě nejsou zcela objasněné mechanismy účinku antioxidantů v živých organismech a antioxidační aktivita je často jen využívána výrobními společnostmi pro propagaci a podporu prodeje jejich produktů (USDA National Nutrient Database, 2016). Homogenizovaný extrakt směsi kořenů, stonků a listů vážící 1 mg měl antioxidační aktivitu ekvivalentní ku 360,74 µg troloxu. Plody této rostliny se v Ekvádoru tradičně využívají, nejspíše pro svůj vysoký obsah vitamínu C (100-300 mg/100g) (Valíček, 2002), na kurděje.

Kaempferol rhamnosid, izolovaný z *Kalanchoe pinnata*, je jednou z látek, které v minulosti prokázaly antioxidační účinky (Tatsimo a kol., 2012). V této práci má 1 mg rostlinného extraktu ekvivalent ku 334,81 µg troloxu. Rostlina se tradičně využívá při angíně či kožních nemocech v pánevní dutině (Jara, 2016, osobní sdělení).

U *Chenopodium ambrosioides* byla naměřena antioxidační aktivita, která se rovná ekvivalentu 1 mg extraktu ku 334,02 µg troloxu. V odborné literatuře bylo uvedeno, že tato rostlina obsahuje pět bioaktivních látek vykazujících antioxidační aktivitu. Mimo jiné také obsahuje flavonoidy (Song a kol., 2015). Rostlina se tradičně využívá na chudokrevnost a ztrátu paměti (Jara, 2016, osobní sdělení).

Hlavní sekundární metabolit (4-nerolidylkatechol β -glykosid) *Pothomorphe peltata* v minulosti prokázal silnou antioxidační aktivitu (Lopes a kol., 2013). V této práci je 1 mg extraktu ekvivalentní ku 298,27 μg troloxu. Tradičně se využívá obklad z listů na hematomy a křečové žíly (Jara, 2016, osobní sdělení). U několika rostlinných výtažků (*Aesculus hippocastanum*, *Ruscus aculeatus*, *Centella asiatica*, *Hamamelis virginiana*) bylo prokázáno zlepšení mikrocirkulace kapilárního toku a posílení pojivové tkáně, což přispívá k léčbě křečových žil a hemerodidů (MacKay, 2001).

Xanthium catharticum vykazuje poměrně slabou antioxidační aktivitu v porovnání s ostatními vzorky (1 mg extraktu je ekvivalentní s 168,49 μg troloxu). Tradičně využívá nálev z celé rostliny na zánět močového měchýře a prostaty (Jara, 2016, osobní sdělení).

Druhou nejnižší antioxidační aktivitu prokázala *Justicia secunda* (1 mg extraktu je ekvivalentní ku 146,58 μg troloxu). Dle předchozích záznamů tato rostlina obsahuje flavonoidy, které jsou známy svojí vysokou antioxidační aktivitou (Koffi a kol., 2013). Tradičně se využívá na diabetes mellitus a vysoký cholesterol (Jara, 2016, osobní sdělení).

Nejnižší antioxidační aktivitu v této práci prokázala rostlina *Solanum nigrum* (1 mg extraktu je ekvivalentní ku 134,05 μg troloxu). Nebyla nalezena žádná data k výzkumu antioxidační aktivity *Solanum nigrum*. Tradičně se využívají listy této rostliny jako nálev nebo koupel na kožní nemoci v pánevní dutině (Jara, 2016, osobní sdělení).

Tauchen a kol. (2015) měřili antioxidační aktivitu osmnácti Etiopských léčivých rostlin. Nejvyšší antioxidační aktivitu prokázala *Rubus steudneri* Schweinf. ($1206,5 \pm 72,8$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu). Naopak nejnižší antioxidační aktivita byla naměřena u rostliny *Cyathula cylindrica* Moq. ($37,8 \pm 1,9$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu).

Ministerstvo zemědělství v Americe upozorňuje, že informace o antioxidační aktivitě zjištěných in vitro nelze aplikovat na in vivo účinky v lidském organismu. Antioxidační molekuly mají širokou škálu funkcí, z nichž mnohé nesouvisí se schopností absorbovat volné radikály (USDA National Nutrient Database, 2016).

7 Závěr

- Jediným prokazatelným pozitivním výsledkem při testování antimikrobiální aktivity bylo nalezení minimální inhibiční koncentrace *Espeletia schultzi* Wedd. proti *Streptococcus pyogenes* (MIC = 0,256 mg/ml). Aby člověk, který váží 70 kg, zahnal infekci způsobenou touto bakterií, musel by pozřít 17,9 g extraktu. Pokud by se nepředpokládala synergický účinek v lidském organismu, který by snížil minimální inhibiční koncentraci, je tato dávka relativně vysoká.
- Do budoucna by se měla testovat antimikrobiální aktivita *Kalanchoe pinnata* Pers. V této práci se rostlina netestovala z důvodu špatné rozpustnosti extraktu.
- Další výzkumný postup by mohl směřovat k rozdělení extraktů na kapalinové chromatografii na frakce, jejich identifikace a testování frakcí na antimikrobiální aktivitu.
- Co se týče testování antioxidační aktivity, tak by mohly být pro srovnání provedeny další testy, například metodou používající DPPH. Nejvyšší antioxidační aktivitu prokázaly rostliny *Croton elegans* Kunth (743,64 ± 28,56 µg TE/mg extraktu) a *Clinopodium nubigenum* Kuntze (692,66 ± 3,73 µg TE/mg extraktu), u kterých nebyly nalezeny žádné záznamy související s antioxidační aktivitou.
- Závěrem lze říci, že z in vitro studií nelze přímo potvrdit antimikrobiální a antioxidační aktivitu, je třeba dalších výzkumů.

8 Seznam použité literatury

- Abrahámová, J. (eds.). 1999. Všeobecná encyklopedie v osmi svazcích, 2. svazek. Diderot. Praha. 534 s. ISBN: 809025554X.
- Adams, M., Moss, M. 2008. Food Microbiology. 3. vydání. RSC Publishing. Guildford. ISBN: 9780854042845.
- Becker, M. 2010. The Ecuador Reader: History, Culture, Politics. Duke University Press. Durham a Londýn. ISBN: 0822390116.
- Bezpečnost potravin A-Z [online]. 2012a. [cit. 2016-03-08]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92388.aspx>>.
- Bezpečnost potravin A-Z [online]. 2012b. [cit. 2016-03-08]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76468.aspx>>.
- Carrington, S., Cohall, D. H., Gossell-Williams, M., Lindo, J. F. 2012. The Antimicrobial Screening of a Barbadian Medicinal Plant with Indications for Use in the Treatment of Diabetic Wound Infections. West Indian Medical Journal. 61 (9). 861–864.
- Cavender, A. P., Albán, M. 2009. The use of magical plants by curanderos in the Ecuador highlands. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.
- Coker, T. J., Dierfeldt, D. M. 2016. Acute Bacterial Prostatitis: Diagnosis and Management. American Family Physician. 93 (2). 114–120.
- Culanda, J., Marinoni, G. 1991. New Sesquiterpenes from *Xanthium catharticum*. Journal of Natural Products. 54 (2). 460–465.
- Cordeiro, K. C. F. A., Rezende, K. R., Vaz, B. G., Romão, W., Lião, L. M., de Souza Gil, E., de Oliveira, V. 2013. Biosynthesis and antioxidant activity of 4NRC β -glycoside. Tetrahedron Letters. 54 (48). 6656–6659.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden, Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. Journal of Ethnopharmacology. 106 (3). 290–302.
- Diksha, S., Amla, B. 2011. Ethnobotany and Ethnopharmacology - Past, Present and Future. International Journal of Pharmaceutical Innovations. 1 (3). 86–92.
- Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M. J., Ottesen, A. R. 2009. Duke’s Handbook of Medicinal Plants of Latin Amerika. CRC Press. Boca Raton. ISBN: 9781420043167.

- EFSA, ECDC. Antimicrobial resistance on the rise in the European Union [online]. 2016. [cit. 2016-02-24]. Dostupné z <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160211>>.
- Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., Mat'ha, V. 2011. Imunitní systém - informace pro každého. Grada. Praha. 236 s. ISBN: 8024711966.
- Fvasconcellos. Beta-lactam antibiotics [online]. 23. říjen 2007 [cit. 2016-03-22]. Dostupné z <https://cs.wikipedia.org/wiki/Beta-laktamov%C3%A1_antibiotika#/media/File:Beta-lactam_antibiotics_example_1.svg>.
- Garrett, A. R., Murray, B. K., Robison, R. A., O'Neill, K. L. 2010. Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. *Methods in Molecular Biology*. 594. 251–62.
- Ghorbani, A., Naghibi, F., Mosaddegh, M. 2006. Ethnobotany, Ethnopharmacology and Drug Discovery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2 (2). 109–118.
- Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., Guglielminetti, M., Finzi, P. V. 2011a. Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21 (5). 850–855.
- Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., Guglielminetti, M., Finzi, P. V. 2011b. Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21 (5). 850–855.
- Giovannini, P. 2015. Medicinal plants of the Achuar (Jivaro) of Amazonian Ecuador: Ethnobotanical survey and comparison with other Amazonian pharmacopoeias. *Journal of Ethnopharmacology*. 164. 78–88.
- Guzman, J., Jurado, H., Kron, M. 1995. Infectious Disease in Ecuador. *Journal of Travel Medicine*. 2 (2). 89–95.
- Harraz, F. M., Hammoda, H. M., El Ghazouly, M. G., Farag, M. A., El-Aswad, A. F., Bassam, S. M. 2015. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. *Natural Product Research*. 29 (9). 879–82.

- Hoskovec-Gaston, L. *Espeletia schultzii* Wedd. – klejovka [online]. 2015. [cit. 2016-02-21]. Dostupné z <<http://botany.cz/cs/espeletia-schultzii/>>.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (6). 1841–56.
- Jara, V. M. E. 29. ledna 2016. osobní sdělení.
- Jílek, P., Buchta, V. 2002. Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví. Karolinum. Praha. 104 s. ISBN: 8024604590.
- Kamboj, V. 2000. Herbal medicine. *Current Science*. 78 (1). 35–39.
- Klouček, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., Kokoska, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2), 309–312.
- Koffi, E. N., Le Guernevé, C., Lozano, P. R., Meudec, E., Adjé, F. A., Bekro, Y.-A., Lozano, Y. F. 2013. Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses. *Industrial Crops and Products*. 49. 682–689.
- Linde, K., ter Riet, G., Hondras, M., Vickers, A., Saller, R., Melchart, D. 2001. Systematic reviews of complementary therapies - an annotated bibliography. Part 2: herbal medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 1. 5.
- Lopes, A. P., Bagatela, B. S., Rosa, P. C. P., Nanayakkara, D. N. P., Tavares Carvalho, J. C., Maistro, E. L., Perazzo, F. F. 2013. Antioxidant and cytotoxic effects of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from aerial parts of *Pothomorphe umbellata* L. (*Piperaceae*). *BioMed Research International*.
- López-Cevallos, D. F., Chi, C. 2010. Health care utilization in Ecuador: A multilevel analysis of socio-economic determinants and inequality issues. *Health Policy and Planning*. 25 (3). 209–218.
- MacKay, D. 2001. Hemorrhoids and Varicose Veins: A Review of Treatment Options. *Alternative Medicine Review*. 6 (2). 126.
- Maxwell, S. R. J., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M. A., Thorpe, G. H. G., Barnett, A. H. 1997. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*. 27 (6). 484–490.

- Mehjabeen, Ahmad, M., Jahan, N., Zia-ul-Haq, M., Alam, S. M., Wazir, A., Saeedul-Hassan 2011. Antimicrobial screening of some plants of medicinal importance. *Pakistan Journal of Botany*. 43 (3). 1773–1775.
- Melter, O., Malmgren, A. 2014. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Karolinum. Praha. 139 s. ISBN: 9788024624143.
- Miller, L. 1998. Herbal Medicinals. *Archives of Internal Medicine*. 158 (9). 2200–2211.
- Nations Online. Administrative Map of Ecuador [online]. 2016. [cit. 2016-02-21]. Dostupné z <<http://www.nationsonline.org/oneworld/map/ecuador-administrative-map.htm>>.
- Nisar, M., Shah, H., Khan, I., Fazal-ur-Rehman, Khan, M. S., Marwat, S. K., Ullah, A. 2013. Antimicrobial Potential and Phytochemical Investigation of Fixed Oil of Plant *Chenopodium ambrosioides* Linn. *Asian Journal of Chemistry*. 25 (2). 1069–1072.
- Noriega, P., Ropke, C., Consiglieri, V., Taqueda, M., Tavares, L., Wasicky, A., Barros, S. 2008. Optimization of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel topical formulations using experimental design. *International Journal of Pharmaceutics*. 353 (1-2). 149–159.
- Novák, J., Skalický, M. 2009. *Botanika*. 2. vydání. Powerprint. Praha. 336 s. ISBN: 9788090401150.
- Padua, L. S., Lemmens, R. H. M. J. 1999. *Plant Resources of South-East Asia 12 - Medicinal and poisonous plants 1*. Prosea Foundation. Bogor. ISBN: 9057820420.
- PAHO, WHO. 2008. *Health systems profile Ecuador - monitoring and analysis health systems change and reform processes*. 3. vydání. OPS. Washington, D.C. ISBN: 9789275329443.
- Park, S. N. 2008. Antioxidative Activity and Component Analysis of *Psidium guajava* Leaf Extracts. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 34 (3). 233–244.
- Perazzo, F. F., Souza, G. H. B., Lopes, W., Cardoso, L. G. V., Carvalho, J. C. T., Nanayakkara, N. P. D., Bastos, J. K. 2005. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*) aerial parts. *Journal of Ethnopharmacology*. 99 (2). 215–220.
- Puertollano, M. A., Puertollano, E., de Cienfuegos, G. Á., de Pablo, M. A. 2011. Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 11 (14). 1752–66.

- Regnier, E., Grange, P. A., Ollagnier, G., Crickx, E., Elie, L., Chouzenoux, S., Dupin, N. 2016. Superoxide anions produced by *Streptococcus pyogenes* group A-stimulated keratinocytes are responsible for cellular necrosis and bacterial growth inhibition. *Innate Immunity*. 22 (2). 113–23.
- Ríos, C., Hidalgo Báez, D., Contreras, Q., Crescente, O., Caserta, A. 1999. Phytochemical evaluation and antibacterial activity of *Espeletia schultzii* (Asteraceae) inflorescences. *Ciencia*. 7 (1). 72–77.
- Sachdev, P., Saharov, T., Cathcart, S. 1999. The preventative role of antioxidants (selegiline and vitamin E) in a rat model of tardive dyskinesia. *Biological Psychiatry*. 46 (12). 1672–1681.
- Sharma, O. P., Bhat, T. K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113 (4). 1202–1205.
- Schindler, J. 2014. *Mikrobiologie - pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vydání. Grada. Praha. 224 s. ISBN: 9788024747712.
- Schultes, R. E., Raffauf, R. F. 1990. *The Healing Forest - Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*. 2 vydání. Dioscorides Press. Hong Kong. 500 s. ISBN: 0931146143.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. C. 2007. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press. Boca Raton. ISBN: 0824741005.
- Slabý, P. 2016. *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze [online]. 2016. [cit. 2016-03-04] Dostupné z <<http://flora.kadel.cz/g/kvCard.asp-Id=16639.htm>>.
- Soejarto, D. D. 2005. Ethnographic component and organism documentation in an ethnopharmacology paper: A “minimun” standard. *Journal of Ethnopharmacology*. 100 (1-2). 27–29.
- Song, K., Zhang, J., Zhang, P., Wang, H.-Q., Liu, C., Li, B.-M., Chen, R.-Y. 2015. Five new bioactive compounds from *Chenopodium ambrosioides*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 17 (5). 482–90.
- Tatsimo, S. J. N., Tamokou, J. de D., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Tane, P. 2012. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research Notes*. 5. 158.

- Tauchen, J., Duskocil, I., Caffi, C., Lulekal, E., Marsik, P., Havlik, J., Kokoska, L. 2015. In vitro antioxidant and anti-proliferative activity of Ethiopian medicinal plant extracts. *Industrial Crops and Products*. 74. 671–679.
- Taylor, L., County, M. 2012. Tropical Plant Database File [online]. 2012 [cit. 2016-03-06]. Dostupné z <<http://www.rain-tree.com/coirama.htm#VtvmyTaobq0>>.
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., Zaragoza, T. 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*. 111 (1). 63–81.
- The Plant List. *Croton elegans* Kunth [online]. 2010b. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-49842>>.
- The Plant List. *Espeletia schultzei* Wedd. 2013. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-25982>>.
- The Plant List. *Xanthium catharticum* Kunth [online]. 2010a. [cit. 2016-02-21]. Dostupné z <<http://www.theplantlist.org/tpl/record/gcc-43838>>.
- Tropicos. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken [online]. 2016g. [cit. 2016-03-06]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/8902864?projectid=2>>.
- Tropicos. *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze. [online]. 2016e. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/17605046?projectid=2>>.
- Tropicos. *Croton elegans* Kunth [online]. 2016d. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/12806668?projectid=2>>.
- Tropicos. *Chenopodium ambrosioides* L. [online]. 2016ch. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/7200092?projectid=2>>.
- Tropicos. *Justicia secunda* Vahl. [online]. 2016h. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/101550?projectid=2>>.
- Tropicos. *Piper peltatum* L. [online]. 2016c. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/25001500?projectid=2>>.
- Tropicos. *Psidium guajava* L. [online]. 2016a. [cit. 2016-03-04]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/22101794?projectid=2>>.
- Tropicos. *Solanum americanum* Mill. [online]. 2016f. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/29600095?projectid=2>>.

- Tropicos. *Xanthium spinosum* L. [online]. 2016b. [cit. 2016-02-21]. Dostupné z <<http://www.tropicos.org/Name/2703486?projectid=2>>.
- Ukwueze, S. E., Osadebe, P. O., Okoye, F. B. C. 2015. A new antibacterial benzophenone glycoside from *Psidium guajava* (Linn.) leaves. *Natural Product Research*. 29. 1728-1734.
- Ulett, G. C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A. J., Sweet, M. J., Schembri, M. A. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology*. 16 (1). 100–7.
- USDA National Nutrient Database. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods [online]. 2016. [cit. 2016-03-29]. Dostupné z <<http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=15866>>.
- Valenzuela, A. J. 1927. The Pathology of the Republic of Ecuador. *Arch. f. Schiffs-u. Tropen-Hyg.* 31 (1). 13-20.
- Valíček, P. 2002. Užitkové rostliny tropů a subtropů. 2. vydání. Academia. Praha. 486 s. ISBN: 8020009396.
- Vickers, K. A., Jolly, K. B., Greenfield, S. M. 2006. Herbal medicine: women's views, knowledge and interaction with doctors: a qualitative study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6. 40.
- Vieira, D. R. P., Amaral, F. M., Maciel, M. C. G., Nascimento, F. R. F., Libério, S. A., Rodrigues, V. P. 2014. Plant species used in dental diseases: ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*. 155 (3). 1441–1449.