

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



Chemické složení a antimikrobiální aktivita silic z *Euodia hortensis* a *Polyscias fruticosa*

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Jakub Šimandl

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph. D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Chemické složení a antimikrobiální aktivita silic z *Euodia hortensis* a *Polyscias fruticosa*" jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 07. 2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval panu Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, za věnovaný čas, ochotu a cenné rady poskytované v průběhu zpracování práce. Dále děkuji Katedře kvality a bezpečnosti potravin za možnost provedení měření v laboratořích.

Chemické složení a antimikrobiální aktivita silic z *Euodia hortensis* a *Polyscias fruticosa*

Souhrn

Euodia hortensis J.R.Forst & G.Forst. a *Polyscias fruticosa* (L.) Harms jsou aromatické rostliny běžně rozšířené na ostrovech jižního Pacifiku. Oba tyto druhy jsou využívány v tradičním léčitelství k léčbě zánětů, onemocnění močových cest, poporodních problémů, bolestí hlavy a kožních afekcí. Zároveň se používají i k odhánění zlých duchů, kteří tyto nemoci mají způsobit.

Cílem této práce bylo vytěžit silice z listů *E. hortensis* a *P. fruticosa*, rostoucích na ostrovech Západní Samoy, zjistit jejich chemické složení a ověřit antimikrobiální aktivitu.

Silice byly získány ze sušených listů pomocí vodní destilace. Antimikrobiální aktivita byla testována bujónovou mikrodiluční metodou *in vitro* proti grampozitivním bakteriím *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, gramnegativním bakteriím *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*. Pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií bylo zanalyzováno jejich chemické složení.

Antimikrobiální aktivitu se v rozsahu testovaných koncentrací (2–1024 $\mu\text{l/ml}$) nepodařilo prokázat ani u jedné z testovaných silic. Hlavními složkami silice *E. hortensis* byly α -curcumene (40,52 %), α -copaene (18,50 %) a Caryophylene oxid (11,70 %). U *P. fruticosa* byly hlavními složkami silice β -farnesene (11,73 %), Ethanone, 1-(4-cyclohexylphenyl) (5,88 %), β -chamigrene (4,30 %) a Cadalene (4,29 %).

Poprvé byla provedena analýza chemického složení silic *E. hortensis* a *P. fruticosa* ze Samoy. Podle dostupných informací byla poprvé otestována jejich antimikrobiální aktivita.

Klíčová slova: *Euodia hortensis*, *Polyscias fruticosa*, silice, antimikrobiální, Samoa

Composition and antimicrobial activity of essential oils derived from *Euodia hortensis* and *Polyscias fruticosa*

Summary

Euodia hortensis J.R.Forst & G.Forst. a *Polyscias fruticosa* (L.) Harms are aromatic plants commonly found in the South Pacific Isles. Both of these species are used in the traditional herbal medicine as treatment for inflammation, urinary tract diseases, postpartum complications, headaches and skin lesions. They are also used to banish evil spirits, which are thought to be the cause of these illnesses.

The aim of this thesis was to extract essential oils from the leaves of *E. hortensis* and *P. fruticosa*, growing in the Isles of West Samoa, detect their chemical composition and confirm antimicrobial activity.

The oils were obtained by water-distilling dried leaves. Antimicrobial activity was tested using broth micro dilution *in vitro* method against gram-positive bacteria *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and yeast *Candida albicans*. The oils were analyzed using gas chromatography with mass spectrometry.

We were unable to prove antimicrobial activity in the range of concentrations (2–1024 $\mu\text{l/ml}$) of either oil tested. Main compounds of the *E. hortensis* essential oil were α -curcumene (40,52 %), α -copaene (18,50 %) and Caryophyllene oxide (11,70 %). *P. fruticosa* essential oils were made up of β -farnesene (11,73 %), Ethanone, 1-(4-cyclohexylphenyl) (5,88 %), β -chamigrene (4,30 %) and Cadalene (4,29 %).

This was the first time any of the Samoan specimens of *E. hortensis* a *P. fruticosa* were analyzed. According to data available, this was the first time their antimicrobial properties were tested.

Keywords: *Euodia hortensis*, *Polyscias fruticosa*, essential oil, antimicrobial, Samoa

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Silice.....	10
3.2	Historický pohled	10
3.3	<i>Euodia hortensis</i> J.R.Forst & G.Forst.	11
3.4	<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms.....	13
3.5	Chemické složení silic	16
3.5.1	Terpeny	16
3.5.1.1	Monoterpeny (C ₁₀ H ₁₆)	16
3.5.1.2	Seskviterpeny (C ₁₅ H ₂₄)	17
3.5.1.3	Diterpeny (C ₂₀ H ₃₂).....	17
3.5.1.4	Triterpeny (C ₃₀ H ₄₈).....	18
3.5.2	Kyslíkaté sloučeniny	19
3.5.2.1	Alkoholy.....	19
3.5.2.2	Fenoly.....	19
3.5.3	Etery	20
3.5.4	Aldehydy	20
3.5.5	Ketony	21
3.5.6	Organické kyseliny a estery	22
3.5.7	Cyklické ethery	22
3.6	Získávání silic	23
3.6.1	Destilace.....	23
3.6.1.1	Destilace parou.....	23
3.6.1.2	Vodní destilace / Hydrodestilace.....	24
3.6.1.3	Hydrodifuze.....	24
3.6.2	Extrakce rozpouštědlem.....	25
3.6.3	Enfleuráž	25
3.6.4	Lisování za studena.....	25
3.6.5	Plynová chromatografie	26
3.7	Využití silic.....	27
3.7.1	Kosmetika	27
3.7.2	Potravinářství	27
3.7.3	Léky a léčiva	28
3.8	Antimikrobiální aktivita – přehled metod	29
3.8.1	Difuzní metody	29

3.8.2	Diluční metody.....	30
3.9	Testované mikroorganismy	31
3.9.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.9.2	<i>Bacillus cereus</i>	31
3.9.3	<i>Escherichia coli</i>	32
3.9.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
3.9.5	<i>Candida albicans</i>	33
4	Metodika	34
4.1	Použité chemikálie.....	34
4.2	Použité pomůcky a přístroje	34
4.3	Rostlinný materiál.....	36
4.4	Mikroorganismy	36
4.5	Extrakce silic.....	37
4.6	Kultivační média	37
4.6.1	Müller-Hinton Broth (MHB) bujón	37
4.6.2	Müller-Hinton Broth (MHB) bujón pufrovaný	37
4.6.3	RPMI médium.....	38
4.7	Příprava zásobních vzorků silic.....	38
4.8	Příprava zásobního inokula	38
4.9	Příprava kontrolních antibiotik.....	39
4.10	Příprava inokula pro testování.....	39
4.11	Příprava mikrotitrační destičky a její zaočkování.....	39
4.12	Chemické složení	41
5	Výsledky.....	42
5.1	Extrakce silic.....	42
5.2	Antimikrobiální aktivita.....	42
5.3	Chemické složení silic	43
6	Diskuze	46
7	Závěr	49
8	Literatura.....	50
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	56
10	Seznam obrázků	57
11	Seznam tabulek.....	57

1 Úvod

Pro své léčivé účinky bylo a stále je používáno mnoho druhů rostlin po celém světě, zejména ve venkovských komunitách rozvojových zemí. Znalosti o léčivých vlastnostech rostlin se dědily z generace na generaci. Světová zdravotnická organizace (WHO) uznává roli tradiční medicíny, včetně použití léčivých bylin, při udržování veřejného zdraví, prevenci a léčbě nemocí, zejména u degenerativních chronických chorob a rakoviny. Ochrana a udržení znalostí tradičního léčitelství patří mezi její cíle (Malini et al. 2017). Znalosti tradičního léčitelství jsou však dokumentovány pouze v omezené míře a hrozí nebezpečí jejich ztráty, to je do značné míry způsobeno sociálními změnami společnosti (Giday et al. 2009).

Esenciální oleje jsou jednou z nejstarších člověku známých forem medikamentů, byly užívány již ve starověkých civilizacích, např. Řecko, Čína, Indie a Egypt. Jejich užití k léčbě nemocných je zaznamenáno ve staroegyptských hieroglyfech. Esenciální olej je definován jako produkt získaný hydrodestilací, destilací parou, suchou destilací nebo vhodným mechanickým procesem bez zahřívání (pro citrusové plody) rostliny nebo jejích částí (Bakkali et al. 2008).

Euodia hortensis a *Polyscias fruticosa* jsou rostliny rozšířené na ostrovech jižního Pacifiku a mají dlouholeté léčebné využití v tradiční medicíně, která je v tak odlehlých oblastech v první linii péče o nemocné. Využívají se různé části těchto rostlin (listy, květy, plody, kůra, kořeny) k léčbě zánětů, vředů, kůže, onemocnění močových cest, proti bolesti atd. (WHO 1998).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo z vybraných druhů samojských rostlin získat pomocí destilace silice a otestovat jejich antimikrobiální aktivitu a chemické složení.

Hypotéza: Silice často působí antimikrobiálně. Lze tedy předpokládat, že silice vybraných rostlin budou vykazovat antimikrobiální aktivitu.

3 Literární rešerše

3.1 Silice

Silice, také známé jako esenciální oleje nebo éterické oleje, jsou většinou tekuté při pokojové teplotě a jejich barva je od světle žluté po smaragdově zelenou a od modré po tmavě hnědou červenou (Bassolé & Juliani 2012; Dorman & Deans 2000). Mají olejovitou konzistenci a mohou je tvořit různé tkáně jedné rostliny, jako jsou stonky, listy, květy, pupeny, semena, plody a kořeny (Bakkali et al. 2008). Měly by se uchovávat v tmavých a vzduchotěsných nádobách, aby se zabránilo změnám složek esenciálních olejů a odpařování (Burt 2004).

Vzhledem k jejich složení a koncentraci každé jejich složky jsou vlastnosti a činnosti silic odlišné. Mají antibakteriální vlastnosti, jako jsou antimikrobiální, antimykotické a insekticidní (Bassolé & Juliani 2012). Tyto vlastnosti jsou pro silice nezbytné, neboť jsou připraveny bránit se predátorům a býložravcům.

Je známo přes 3000 esenciálních olejů a 300 z nich se komerčně používá v parfumerii, lékařství, zemědělství a potravinářských výrobcích. Mají silné aroma a používají se i v kosmetickém průmyslu (Bakkali et al. 2008).

3.2 Historický pohled

Silice jsou aromatické a těkavé kapaliny získané z rostlinného materiálu, včetně květů, kořenů, kůry, listů, semen, slupek, plodů, dřeva a celých rostlin (Hyldgaard et al. 2012). Po celou historii byly tyto oleje považovány za velmi zajímavé, ačkoli mnoho jejich použití bylo ztraceno s časem, všeobecně se uznává, že je lidé od úsvitu lidstva těží z aromatických rostlin. Aplikace esenciálních olejů pro různé účely jsou pestré a zahrnují nejen jejich použití při vaření pro zvýšení chuťových a zdravotních výhod potravin, při výrobě parfémů a kosmetiky.

Starí Egypťané používali esenciální oleje v medicíně, parfumerii a v umění balzamování a přípravy těl na pohřeb prostřednictvím mumifikace. Ve starověké Asii kodifikoval Vedas použití parfémů a aromatických látek pro liturgické i léčebné účely. Četné civilizace totiž v průběhu dějin používaly pro různé účely základní oleje a vůně, a to i pro náboženské obřady, při výrobě parfémů nebo jako léčebné prostředky proti infekčním onemocněním. Féniciáné, Židé, Řekové, Římané a další kultury ležící v okolí Středozemního moře, stejně jako Mayové a Aztékové v Americe, dosáhli v kultuře vůně velkého zdokonalení (Sonwa 2000).

Po pádu římské říše a s příchodem křesťanské a muslimské civilizace se umění a věda vůně dostaly do arabského světa, kde dosáhly vysoké úrovně sofistikovanosti. Ve středověku tyto znalosti přinesli zpět do Evropy křižáci vracující se ze Svaté země a dále ji rozvíjeli alchymisté i v kláštorech. Alchymisté se snažili vytvořit „elixír života“, aby mohli žít neomezeně dlouho, zatímco kláštery používaly esenciální oleje pro získání různých léčivých přípravků k léčení různých nemocí nebo pro výrobu aromatických derivátů, jako je mýdlo a parfém. Během renesance se rozšířilo používání esenciálních olejů v parfumerii a kosmetice po celém světě (Sonwa 2000).

3.3 *Euodia hortensis* J.R.Forst & G.Forst.

Taxonomická klasifikace:

Říše: Rostliny (Plantae)

Kmen: Cévnaté rostliny (Tracheophyta)

Třída: Nižší dvouděložné (Magnoliopsida)

Řád: Mýdelníkotvaré (Sapindales)

Čeleď: Routovité (Rutaceae)

Rod: *Euodia* Forst. (GBIF 2019)

Lidové pojmenování:

- mata ni raiqi, uci ni veikau, uci, rauvula (Fidži);
- uhi (Niue a Tonga);
- usi (Samoa a Futuna);
- fo'oka, aba'i ri'i (Šalamounovy ostrovy).

Popis: Keř nebo malý strom dorůstající do výšky 6 metrů. Listy protilehlé, aromatické, trojčetné (složené) nebo jednoduché. Jsou-li složené, každý list je vejčitý, 8–10 mm x 15–30 mm velký, a pokud se jedná o listy jednoduché, čepel je kopinatá a až 30 cm dlouhá.

Květy malé, bílé, voňavé, čtyřčetné, tvořící latu vyrůstající z úžlabí listů. Plodem je souplodí 4 pukavých měchýřků s jedním semenem v každém segmentu. Květenství a plody se vytvářejí po celý rok (WHO 1998).



Obr. 1: *Euodia hortensis* J.R.Forst & G.Forst.
(Zdroj: [www. https://toptropicals.com/catalog/uid/Euodia hortensis](https://toptropicals.com/catalog/uid/Euodia%20hortensis))

Místo výskytu: Pěstované a zdomácnělé v sekundárním lese, lesní okraje a houštiny od hladiny moře do 500 m. n. m. (WHO 1998).

Rozšíření: Pravděpodobně domácí v Nové Guineji a nyní široce rozšířený v jižní části Pacifiku (WHO 1998).

Obsahové látky: Silice (karyofylen, α -copaen, arcucumen), menthofuran, evodon, hortensol, berberin, furochinolin a akridonové alkaloidy (WHO 1998).

Tradiční použití: Na Fidži se tekutina z kůry používá k léčbě nemocí, jejichž příznaky jsou žluté bělmo u očí a nepřírozně žlutá moč. Tekutina ze stonku se využívá k léčbě křečí u dětí. Tekutina z listů se využívá při léčbě oteklých varlat. Na Fidži se používá k podpoře krevního oběhu a proudění krve zejména v oblasti podbřišku a dělohy, používá se k vyvolání menstruace, která se nedostaví z hormonálních důvodů. Na Niue, se listy používají k léčbě bolesti zubů a žaludku. Na Tonze používají výluh z listů jako projímadlo, k snížení horečky, pro léčbu otoků a jako léčbu na bolesti hlavy. Listy jsou rozdrceny, smíchány s olejem a nanášeny na bolavé části těla. Listy se také používají k léčbě bolesti hlavy a při bolestech uší. Věří se, že vůně z listů odežene zlé duchy, a proto se rostlina využívá k léčbě nemocí, kterou měli zlí duchové způsobit, a to na Tonze, Samoi, Niue. Na Šalamounových ostrovech jsou listy zahřívány a pokládají se na modřiny. Kůra se žvýká s betelovými ořechy a natírá se na bolavé části těla (WHO 1998).

3.4 *Polyscias fruticosa* (L.) Harms

Taxonomická klasifikace:

Říše: Rostliny (Plantae)

Kmen: Cévnaté rostliny (Tracheophyta)

Třída: Nižší dvouděložné (Magnoliopsida)

Řád: Miříkotvaré (Apiales)

Čeleď: Aralkovité (Araliaceae)

Rod: *Polyscias* (*Stínovka*) (GBIF 2019)

Lidové pojmenování: danidani (Fidži a Samoa).

Popis: Keř nebo malý strom dorůstající do výšky 4 metrů. Listy střídavé, řapíkaté, nepravidelně složené, listy s nápadným ozubením okraje, čepel často nažloutlé barvy a při drcení voňavá. Květy relativně malé, nažloutlé zelené, tvoří okolík. Plodem je malá peckovice s jedním semenem. Kořeny voní a chutnají jako petržel (WHO 1998).



Obr. 2: *Polyscias fruticosa* (L.) Harms (Koffuor et al. 2014).

Místo výskytu: Běžně se pěstuje v zahradách a případně zdomácňuje v některých oblastech do 500 m nadmořské výšky (WHO 1998).

Rozšíření: Pravděpodobně domácí v Malajsii, ale nyní široce kultivovaná v tropické oblasti a pěstovaná ve sklenících (Malini et al. 2017).

Obsahové látky: α -bergamoten, γ -trans-bisabolen, betaelemen, falcarinol, germakren D, polyacetyleny a kyselina oleanolová (WHO 1998).

Tradiční použití: Na Fidži se kořen používá jako diuretikum. Šťáva z kůry se používá na kvasinkovou infekci a vředy na jazyku nebo v krku. Obklad vyrobený z kůry se používá na syfilitické vředy. Šťáva z kmenové kůry je podávána pro lepší vyloučení (vyčistění) po porodu. Odvar listů se používá k léčbě zánětu vedlejších dutin nosních, bolesti hlavy a hemoroidů. Odvar z listů *P. fruticosa*, spolu s odvarem listů některých jiných druhů, se používá při léčbě angíny a migrény. Tato rostlina také pomáhá upravit vysoký krevní tlak (WHO 1998; Malini et al. 2017).

Biologická aktivita: Mnoho léčivých rostlin vykázalo zajímavé výsledky v různých cílových specifických biologických aktivitách a jako takové byly navrženy jako potenciál při léčbě astmatu. Jednou takovou rostlinou je *P. fruticosa*. Ačkoli v poslední době došlo ke zvýšení povědomí a zájmu o léčivé rostliny, předpokládá se, že řada bylin by mohla mít nepříznivé účinky. Aby se zabránilo nebezpečným situacím, musí být účinnost a bezpečnost těchto rostlin zjišťována před jejich doporučením pro lékařské použití. Studie prokázaly, že ethanolový extrakt z listů *P. fruticosa* snižuje počet bílých krvinek a její diferenciály v krvi, a tedy její protizánětlivý účinek; užitečná vlastnost při léčbě astmatu (Koffuor et al. 2014; Koffuor et al. 2016).

Tabulka 1: Souhrnná tabulka - využití rostlin *E. hortensis* a *P. fruticosa*

Rostlinný druh	Lokalita	Lokální název	Použitá část	využití	aplikace	Citace
<i>Polyscias fruticosa</i>	Batan Island, Filipíny	papuida	list	Bolest hlavy	Nanesením oleje na hlavu	Abe & Ohtani 2013
	Karangwangi Villagers, Filipíny	gordah	list	Močové problémy	Odvar	Malini et al. 2017
	Fidži	danidani	kořen	Bolest v krku	Aplikace do šťávy z <i>Cocos nucifera</i> a <i>Carica papaya</i>	Walker 2017
			list	Péče o kůži / ošetření svědivé a suché kůže	Obklady z vody a sušených listů	
			List, kůra	Ošetření vředů	odvar	Malini et al. 2017
<i>Euodia hortensis</i>	Fidži	uci	listy	Léčba horečky	Mísení s listy <i>Phaleria disperma</i>	Croft & Tu'ipulotu 1980
	Tonga	uhi	listy	Kožní náplasti	Nanesení na pokožku	Croft & Tu'ipulotu 1980
	Niue	uhi	listy	Bolavé dásně, zuby	Drcené a smíchané s olejem	WHO 1998
	Samoa	usi	stonek	Křeče u dětí	Odvar	Croft & Tu'ipulotu 1980
	Fidži	uci	kůra	Menstruace a bolesti při porodu	Součást léčiva	WHO 1998

3.5 Chemické složení silic

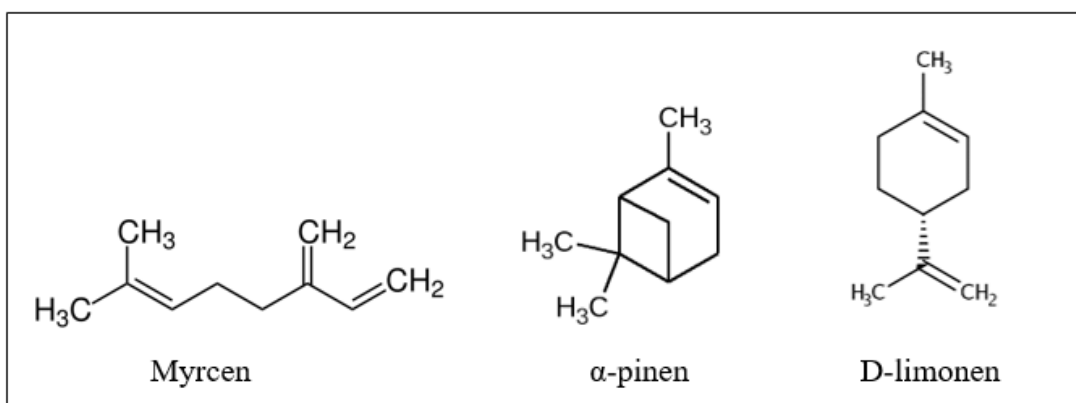
Silice obsahující mezi 20-60 složkami v různých koncentracích se považují za velmi komplexní přírodní směsi (Pandey et al. 2014). Silice jsou charakterizovány dvěma nebo více hlavními sloučeninami s několika dalšími stopovými sloučeninami. Procentuální složení silic se může lišit v závislosti na rostlinách, podmínkách prostředí, typech půdy a živinách. Esenciální složky silic sestávají hlavně z terpenů a jejich derivátů (Hrckova & Velebny 2012; Tongnuanchan & Benjakul 2014).

3.5.1 Terpeny

Terpeny jsou nejobvyklejšími složkami esenciálních olejů, které jsou produkovány širokou řadou rostlin, a sestávají z kombinace isoprenových jednotek (jednotky s pěti atomy uhlíku). Dva hlavní typy terpenů převládající v esenciálních olejích jsou monoterpeny a seskviterpeny, které spojují dvě a tři isoprenové jednotky (Bakkali et al. 2008).

3.5.1.1 Monoterpeny ($C_{10}H_{16}$)

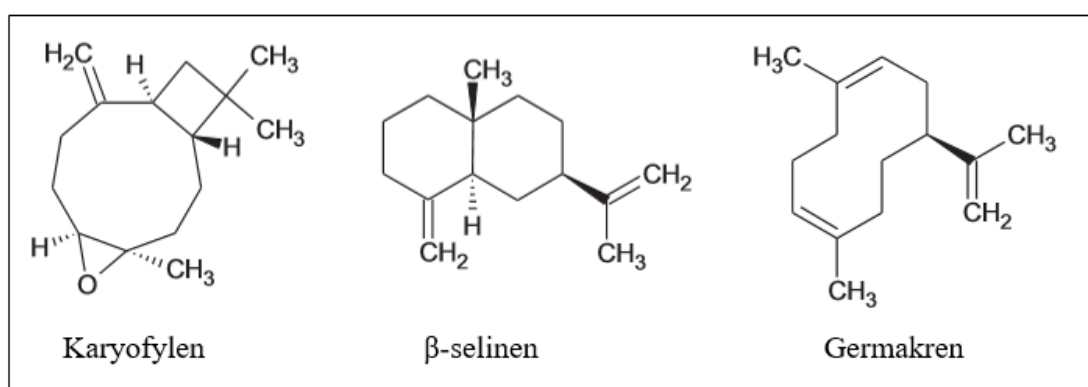
Monoterpeny přispívají k asi 90 % esenciálních olejů (Bakkali et al. 2008). Monoterpeny jsou považovány za sekundární metabolity se dvěma isoprenovými jednotkami (Holopainen 2004). Tyto molekuly mají nižší teploty varu a jsou nerozpustné ve vodě, zatímco některé monoterpeny, jako je thymol a terpinen-4-ol, jsou také toxické pro hmyz (Choi et al. 2006). Udává se, že tyto přírodní produkty hrají roli v chemické ekologii tím, že vytvářejí obranu proti patogenům, pomáhají při opylování, rozptylu semen a alelochemických funkcí mezi rostlinami a býložravci (Ibanez et al. 2012). Běžnými příklady monoterpenů jsou myrcen, α -pinen a D-limonen (viz Obrázek 3), které mají insekticidní vlastnosti. Literatura ukázala, že myrcen (5,9 %) a α -pinen (27,4 %) byly hlavními složkami identifikovanými v silicích *Eleoselinum asclepium*, které měly rozsáhlé insekticidní vlastnosti proti západonilské horečce (Evergetis et al., 2009).



Obr. 3: Vybrané struktury monoterpenů

3.5.1.2 Seskviterpeny (C₁₅H₂₄)

Seskviterpeny se skládají ze tří isoprenových jednotek, tedy mají patnáct atomů uhlíku (Ghantous et al. 2010). Mezi běžné příklady patří: karyofylen, β-selinen a germakren (viz. Obrázek 4). Sloučeniny seskviterpenů mají na hmyz dráždivé účinky. Například mnoho druhů čeledi *Celastraceae*, jako jsou čínské hořké listy (*Celastrus angulatus*), se v Číně tradičně používají jako insekticidy (Gonzalez-Coloma et al. 2013). Seskviterpenové sloučeniny se také používají jako analgetika, spasmolytika, uklidňující, mírné hypotenzory a protizánětlivé látky. Příklady rostlin, které tyto sloučeniny obsahují, jsou citronová tráva, borovice, máta peprná, mandarinka, šalvěj a tymián (Bakkali et al. 2008).

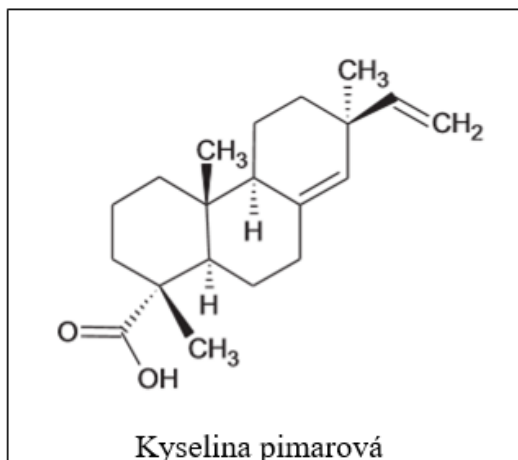


Obr. 4: Vybrané struktury seskviterpenů

3.5.1.3 Diterpeny (C₂₀H₃₂)

Jedná se o organické sloučeniny, které se většinou skládají ze čtyř isoprenových jednotek. Diterpeny jsou ve srovnání s monoterpeny a seskviterpeny nejtěžšími molekulami

v éterických olejích (Stewart 2013). Příkladem je běžná kyselina pimarová (viz Obrázek 5). Diterpeny vykazují také insekticidní aktivitu (de Oliveira et al. 2008).

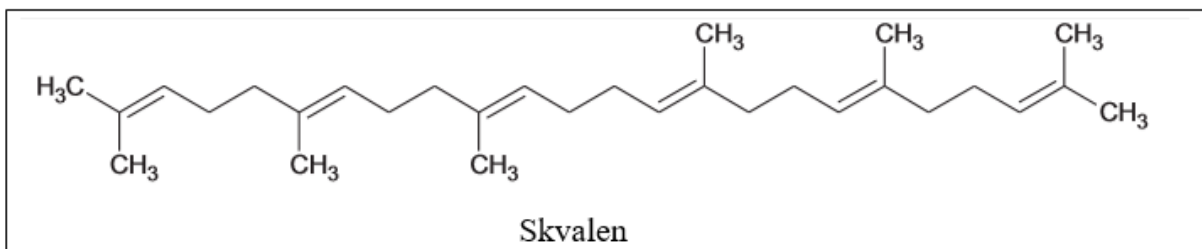


Obr. 5: Vybraná struktura diterpenů

3.5.1.4 Triterpeny ($C_{30}H_{48}$)

Triterpeny jsou nejrozmanitější skupinou rostlinných přírodních produktů. Tyto sloučeniny nejsou považovány za důležitou složku v rostlinách pro růst a vývoj (Kemen et al. 2014). Existují v rostlinách v nemodifikované formě, častěji jako konjugát s jinými makromolekulami (Thimmappa et al. 2014). Obvyklý příklad této sloučeniny je skvalen (viz Obrázek 6). Skvalenové sloučeniny byly také identifikovány jako hlavní složka lidského mazu (vylučují mastnou látku na kůži), která se spolupodílí při podpoře oxidačního poškození kůže (Mudiyanselage et al. 2003).

Triterpeny jsou také komponenty povrchových vosků, které se hromadí ve vrstvách stonků a povrchu listů uvnitř kutikuly pro ochranu před dehydratací a býložravci. Široká škála použití těchto sloučenin je v potravinářském, zdravotnickém a průmyslovém biotechnologickém sektoru (Thimmappa et al. 2014).



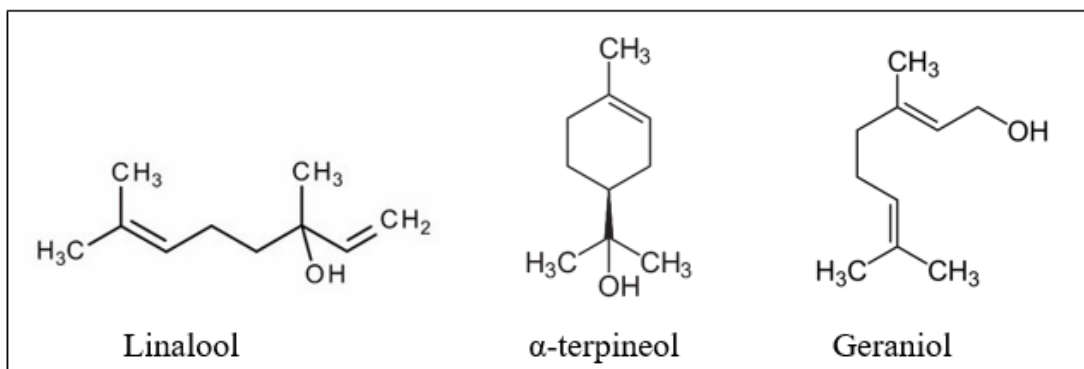
Obr. 6: Struktura triterpenů

3.5.2 Kyslíkaté sloučeniny

Jedná se o sloučeniny, které se vyskytují méně často než terpeny. Hlavní zdroje těchto sloučenin jsou z rodin: *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae* a *Rutaceae* (Janardhanan & Thoppil 2004).

3.5.2.1 Alkoholy

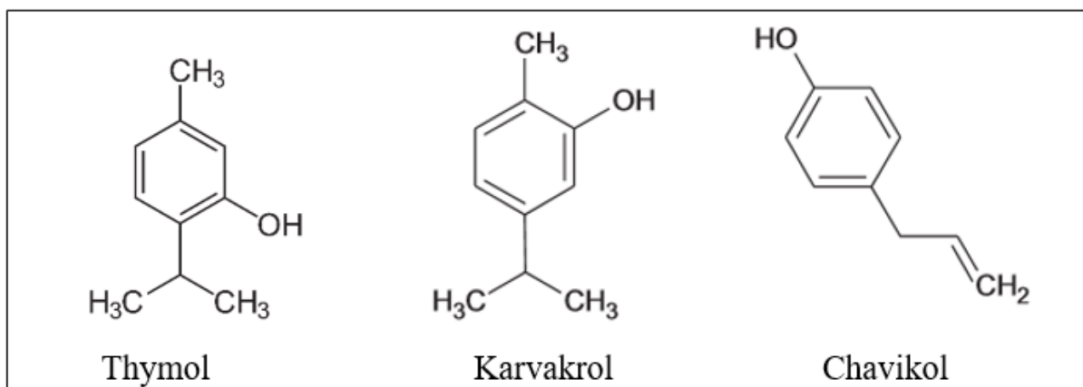
Alkoholové sloučeniny mají na uhlíku vázanou hydroxylovou skupinu (-OH). Mezi běžné příklady těchto sloučenin patří: linalool, α -terpineol a geraniol (viz Obrázek 7). Alkoholy jsou přítomny buď jako volná sloučenina nebo v kombinaci s terpenem nebo esterem. Jsou velmi užitečné díky svým antivirovým, antibakteriálním a antiseptickým vlastnostem. Například linalool vykazuje dobrou repelentní aktivitu proti *Tribolium castaneum* (Ukeh & Umoetok 2011).



Obr. 7: Vybrané skupiny alkoholů

3.5.2.2 Fenoly

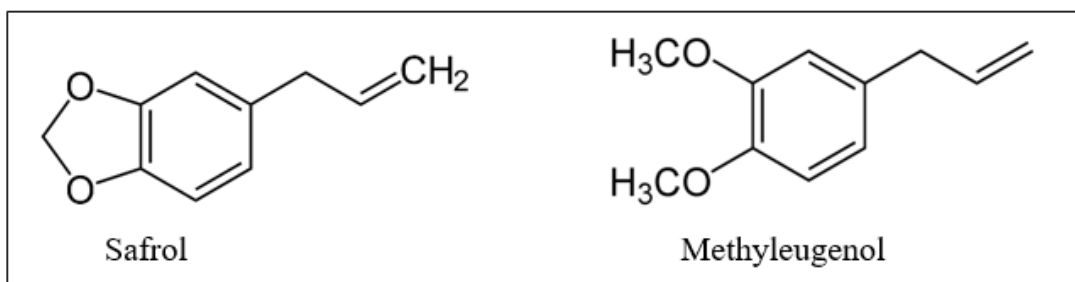
Fenolové sloučeniny mají skupinu -OH připojenou k aromatickému kruhu. Jedná se o alkoholy, které mají silné toxické účinky, například thymol, karvakrol a chavikol (viz Obrázek 8). Sloučeniny mají antiseptické, baktericidní a insekticidní vlastnosti. Například bylo zjištěno, že sloučeniny thymolu a karvakrolu inhibují růst mycelia a klíčení konidia u *Corynespora cassiicola* (Romero et al. 2013).



Obr. 8: Vybrané skupiny fenolů

3.5.3 Ethers

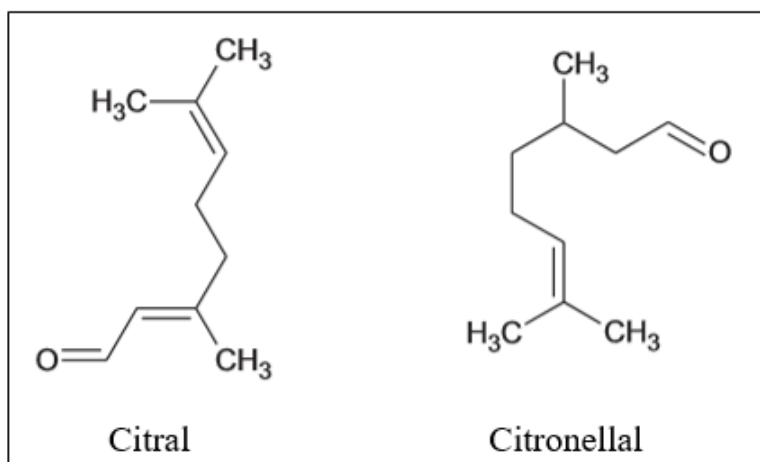
Sloučeniny, jež mají atom kyslíku mezi dvěma uhlíkovými řetězci. Často je jeden řetězec aromatický a druhý ne. Mezi běžné příklady patří: safrol a methyl eugenol (viz Obrázek 9). Podle He et al. (2009), cineol a citronellol (cyklické a acyklické ethery) významně ovlivnily rychlost klíčení, růst sazenic, obsah chlorofylu a respirační aktivity plevelů *Ageratum conyzoides*. Je také známo, že tyto sloučeniny mají antifungální vlastnosti.



Obr. 9: Vybrané skupiny etherů

3.5.4 Aldehydy

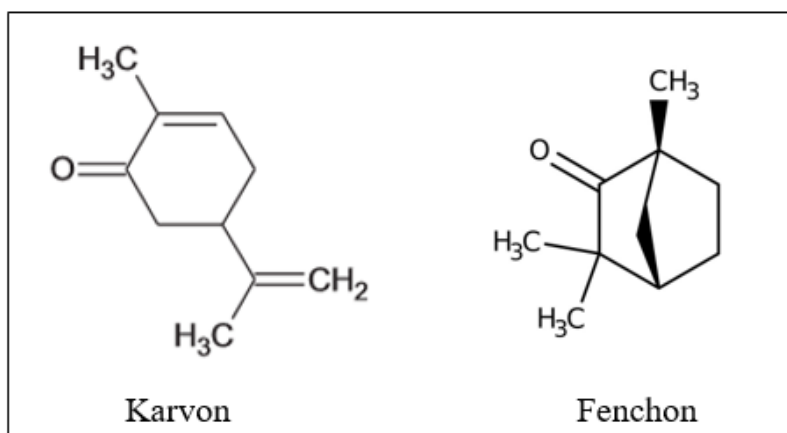
Aldehydové sloučeniny mají silné aroma, většinou se používají při výrobě parfémů. Mezi běžné příklady patří: citral, citronellal (viz Obrázek 10). Tyto sloučeniny se také používají pro antivirové, protizánětlivé, hypotenzní, vazodilatační a antipyretické aktivity (Djilani & Dicko 2012). Například citral spolu s linaloolem měl nejsilnější inhibiční aktivitu proti houbovým druhům *Candida albicans* (Zore et al. 2011).



Obr. 10: Vybrané skupiny aldehydů

3.5.5 Ketony

Aromatické ketony se zřídka vyskytují v silicích. Některé ketony se dělí na monoterpenové ketony (jako je karvon (viz Obrázek 11), pulegone, isopulegone, menthon) a seskviterpen keton (jako je germakren). Tyto sloučeniny vykazovaly toxické účinky na řadu škůdců. Například fenchon (viz Obrázek 11) měl nejsilnější toxický účinek na larvy mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) (Kordali et al. 2007). Podobně sloučeniny karvonu vykazovaly silné toxické účinky proti oběma druhům škůdcům obilnin: *Sitophilus zeamais* a *Troboium castaneum*. Chemotyp karvonu má potenciál ve vývoji přírodních insekticidů, protože byl toxičtější než citral. Některá další použití těchto sloučenin zahrnují antikoagulační, protizánětlivé a trávicí činidlo (Peixoto et al. 2015).

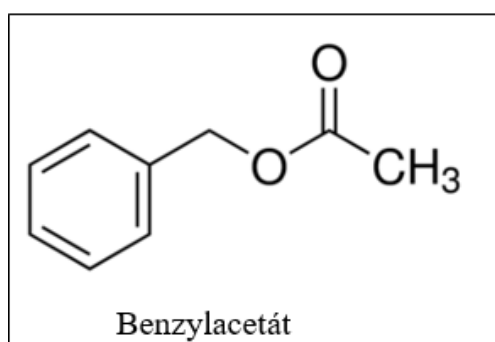


Obr. 11: Vybrané skupiny ketonů

3.5.6 Organické kyseliny a estery

Organické kyseliny mají charakteristickou skupinu –COOH. Velmi dobrým příkladem esteru je benzylacetát (viz Obrázek 12), který je důležitou složkou jasmínových a gardéniových olejů.

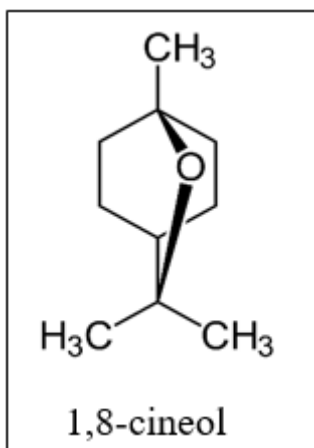
Mají zvláštní vlastnosti, jako jsou antifungální, protizánětlivé a antispasmodické účinky. Tyto sloučeniny mají také potenciální antimikrobiální vlastnosti, pokud se používají v kyselých potravinách pro prevenci růstu kvasinek, plísní a bakterií v potravinách (Stratford & Eklund 2003).



Obr. 12: Vybraná skupina esterů

3.5.7 Cyklické ethery

Tyto sloučeniny se nejčastěji používají pro aromaterapii, léčiva a zemědělství. Jedním z užitečných cyklických etherů vyskytujících se v silicích je 1,8–cineol (viz Obrázek 13) (eukalyptol). 1,8–cineol výrazně ovlivnil růst kořenů a výhonků dvou druhů plevelů (*Echinochloa crus-galli* a *Cerberiopsis obtusifolia*), což později vedlo k morfologickému zkreslení ve tvaru vývrtky (Romagni et al. 2000).



Obr. 13: Vybraná skupina cyklických etherů

3.6 Získávání silic

Metodami používanými pro extrakci silic jsou destilace párou, hydrodestilace, hydrodifuze, extrakce rozpouštědly a enfleurage (Janardhanan & Thoppil, 2004).

3.6.1 Destilace

Destilace je metoda využívaná k získávání silic. Tři běžné formy destilace jsou: destilace párou, vodní destilace a hydrodifuze.

Nejčastěji používanou metodou je metoda vodní destilace. Tento extrakční proces může trvat od 1 do 10 hodin. Množství vyprodukované silice závisí na délce doby destilace, teplotě, tlaku a druhu rostlinného materiálu. Během destilace se rostlinné materiály vystavují vroucí vodě nebo páře, aby se v nich odpařováním uvolňoval esenciální olej (Boutekedjiret et al. 2003).

3.6.1.1 Destilace parou

Parní destilace je běžná metoda. Tato metoda však vyžaduje vysokou teplotu, která může vést k rozkladu a nízkému výtěžku silic. Během procesu destilace páry je čerstvý nebo sušený botanický materiál vložen do komory destilačního zařízení a pára umožňuje průchod materiálem pod tlakem, který změkčuje buňky a umožňuje esenciálním olejům uniknout ve formě páry. Teplota páry musí být dostatečně vysoká, aby odpařila přítomný olej, ale ne tak vysoká, aby zničila rostlinný materiál nebo esenciální olej. Pára poté prochází chladicím systémem, kde kondenzuje. Silice tvoří film na povrchu vody (Boutekedjiret et al. 2003).

3.6.1.2 Vodní destilace / Hydrodestilace

Vodní destilace je využívána jako standardní destilační metoda pro extrakci silic, většinou pomocí zařízení typu Clevenger (viz Obrázek 14). Destilační aparatura se skládá ze spodní baňky, kde je umístěna směs rostlinného materiálu a vody. Kondenzátoru, kde je silice zachytávána. Součástí aparatury je i třísměrný ventil, který umožňuje vodě kolovat, nebo oddělení silice od vodní fáze (Başer & Buchbauer 2010). Rostlinný materiál je při destilaci ponořen přímo ve vodě uvnitř baňky a celý obsah je přiveden k varu. Pomocí zahřívání, zvýšeného tlaku, dochází k porušení buněčných stěn a uvolňování esenciálních olejů, které se odpařují a proudí směrem ke kondenzátoru (Başer & Buchbauer 2010). V kondenzátoru se pára ochlazuje, a to vede ke vzniku destilátu ve sběrné trubici (Boutekedjiret et al. 2003).



Obr. 14.: Clevengerova aparatura (Šimandl 2020)

3.6.1.3 Hydrodifuze

Hydrodifuze je metoda získávání silic, při níž pára při atmosférickém tlaku prochází rostlinnými materiály z horní části extrakční komory. Tento proces je upřednostňován před destilací parou, protože vyžaduje méně času na destilaci, nízkou spotřebu páry a absenci vysoké teploty. Společná extrakce dalších netěkavých a polárních složek však komplikuje celý proces

hydrodifuze. Nemusí tedy být dobrou technikou, jak získat vysoký výnos sloučeniny (Lucchesi et al. 2007).

3.6.2 Extrakce rozpouštědlem

Jedná se o extrakční metodu, která se nejčastěji používá v průmyslovém procesu k získání velmi čistých silic. Tato technika používá organická nepolární rozpouštědla (např. petrolether) za účelem oddělení těkavých sloučenin od rostlinných materiálů. Organické sloučeniny se rozpouštějí při průniku do rostlinných materiálů. Shromážděné organické rozpouštědlo se poté převede do odpařovače, kde se rozpouštědlo při nízké teplotě odstraní. Výtěžkem (výnosem) je pevná substance (zbytek po odstranění rozpouštědla), která je pak velmi rychle promyta alkoholem, aby se odstranil vosk, a nakonec se získá čistá látka (koncentrovaná forma vůně). Nicméně, tato metoda není moc preferována, protože je velmi nákladná, vysoce hořlavá a má škodlivý vliv na životní prostředí (Hashemi et al. 2018).

3.6.3 Enfleuráž

Enfleuráž (z francouzského slova „enfleurage“) je extrakční metoda, která se datuje až do antiky. Během této metody se na rostlinný materiál (např. květiny) nanáší vyčištěný studený tuk bez zápachu. Látky uvolněné květinami se následně rozpouštějí v tuku. Nové květy nahrazují ty staré a proces se opakuje tak dlouho, dokud není dosaženo nasycení tuku. Poté se tuk sbírá a extrahuje alkoholem. Podle dnešních standardů je to časově náročná, pracná a nákladná metoda (Eltz et al. 2007).

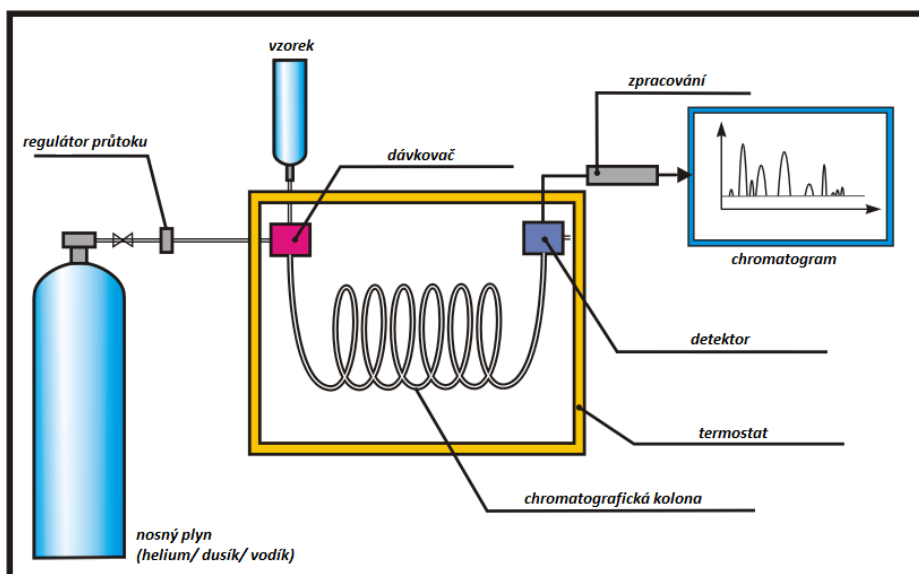
3.6.4 Lisování za studena

Expres nebo lisování za studena je nejstarší metodou extrakce a používá se téměř výhradně pro výrobu citrusových éterických olejů. Tato metoda se vztahuje na jakýkoli fyzický proces, během kterého jsou esenciální oleje ve slupce a kutikule porušeny, aby se olej uvolnil. Výsledkem tohoto procesu je tvorba vodné emulze, která je následně odstředěná k oddělení éterického oleje (Bousbia et al. 2009).

3.6.5 Plynová chromatografie

Základem plynové chromatografické separace je rozdělení analytu mezi dvě fáze. Jedna z těchto fází je stacionární fáze a druhá je mobilní plynná fáze, která je v podstatě inertní, pohybuje se přes kolonu GC a prochází stacionární fází. Pokud je stacionární fáze pevná látka, nazývá se plynová chromatografie (GSC); jestliže stacionární fáze je kapalina (obecně netěkavá kapalina nesená na inertní pevné látce), mluvíme o plynové kapalinové chromatografii (GLC). K dispozici je široká škála kapalných fází s použitelnou teplotou až 400 °C, což činí GLC nejvšestrannější a nejefektivnější formou plynové chromatografie (Paré & Bélanger 1997).

V GC je vzorek (obvykle směs analytů) zaveden do mobilní fáze injekčním systémem. Protože analyty musí být zaváděny do plynné fáze, může být teplota vstupního systému GC řízena od nižší než 0 °C, aby se zabránilo ztrátě velmi těkavých složek vzorků na více než 300 °C, aby vytékaly složky, které mají velmi nízkou volatilitu. Jakmile vzorek vstoupí do kontaktu s mobilní fází ve sloupci, složky vzorku interagují v různé míře se stacionární fází a rozdělením mezi stacionární a mobilní fází, což má za následek rozdílné míry migrace ve sloupci. V kteroukoli danou dobu konkrétní analyt je buď v mobilní fázi, pohybující se spolu s pohybujícím se plynem, nebo ve stacionární fázi a rozptylující se v něm. Takový proces sorpce-desorpce probíhá opakovaně, dokud každý analyt nevytvoří samostatný pás a neopustí kolonu. Jak analyt vychází z konce kolony GC, vstupuje do detektoru a produkuje určitou formu signálu, jehož síla a trvání jsou v nejlepším případě spojeny s množstvím nebo povahou analytu. Obecně je signál zesílen a předáván elektronickému integrátoru, počítači, záznamníku pásového grafu nebo jiným způsobem, pomocí kterých je získán chromatogram a poté je provedena kvantifikace analytu (Paré & Bélanger 1997). Schéma plynového chromatografu je znázorněno na Obrázku 15.



Obr. 15: Schéma plynového chromatografu (Opletal 1994)

3.7 Využití silic

Použití silic je různorodé v závislosti na zdroji, kvalitě, extrakčním postupu apod. Silice mají osvědčené průmyslové využití při výrobě parfémů, kosmetiky, mýdla, šamponů či čisticích prostředků. Dalším zajímavým aspektem těchto olejů je jejich potenciál jako terapeutických prostředků při aromaterapii nebo jako aktivních či pomocných látek léků. Další významné uplatnění silic je v zemědělsko-potravinářském průmyslu, a to jak pro výrobu nápojů, tak pro dochucovací potraviny (Ríos 2016).

3.7.1 Kosmetika

Využití silic v kosmetice, parfumerii, při výrobě čisticích prostředků je z ekonomického hlediska velmi zajímavé. Světová produkce silic pro přípravu parfémů se jednoznačně zvýšila, na trhu se velmi hledají specifické skupiny aromatických rostlin. Konkrétní chemotypy šalvěje, levandule a tymiánu jsou ceněny zejména pro získání jemných a nových parfémů. Za tímto účelem jsou technologie výroby a dostatečný výběr surovin základními prvky pro zlepšení jakosti konečného výrobku (Başer & Buchbauer 2010).

3.7.2 Potravinářství

Silice se používají v široké škále spotřebního zboží, jako jsou cukrovinky, nealkoholické nápoje a destilované alkoholické nápoje. Kromě rozsáhlého použití jako

aromatický materiál se používají ve výživových a zemědělských oblastech pro své hlášené antimikrobiální, antimykotické, antivirové, insekticidní a antioxidační vlastnosti (Turek & Stinzing 2013). Proto bylo navrženo jejich použití jako antioxidantů a konzervantů v potravinách, buď začleněných do obalového materiálu potravin, nebo jako rostlinných protektorů (Adorjan & Buchbauer 2010). Mnoho silic má antioxidační a antimikrobiální vlastnosti, ale jejich aplikace jako konzervační látky na potraviny vyžaduje dobrou znalost jejich vlastností, včetně citlivosti cílových mikroorganismů, specifického způsobu účinku, jejich antimikrobiální účinnosti a vlivu složek potravinové matrice na jejich antimikrobiální vlastnosti (Hyldgaard et al. 2012).

3.7.3 Léky a léčiva

Silice se používají ve farmaceutických výrobcích jako léčiva (Harris 2010). To je zejména případ silic z eukalyptu (*Eucalyptus globulus*), máty peprné (*Mentha piperita*), anýzu (*Pimpinella anisum*), šalvěže (*Salvia officinalis*), hřebíčku (*Syzygium aromaticum*) a čajovníkového stromu (*Melaleuca alternifolia*). Tyto oleje se používají pro léčbu kašle a bronchitidy (eukalyptus), jako antimikrobiální látky (šalvěj, čaj a hřebíček), jako lék na zmenšení zduření dýchacích cest (máta peprná) a jako lék proti nadýmání (anýz), mimo jiné použití. Hřebíčkový olej se tedy v zubním lékařství používá pro své antiseptické a analgetické vlastnosti, zatímco čajový olej se používá pro léčbu akné kvůli jeho antimikrobiální aktivitě proti grampozitivním bakteriím (Buchbauer 2010).

Některé silice se navíc používají v lécích na aromatizaci farmaceutických přípravků a zlepšení jejich chuti. Aromaterapie může být hlavním použitím silic jako léčivých přípravků. Podávání silic získaných z různých zdrojů se provádí pomocí různých aplikačních metod. Termín „aromaterapie“ založil Gattefossé ve dvacátých letech minulého století a v šedesátých letech ho oživila Maury. Od osmdesátých let se jeho popularita neustále zvyšovala. V současné době je poměrně dobře zavedená v Austrálii, Kanadě, Francii, Německu, Novém Zélandu, Švýcarsku, Spojeném království a Spojených státech (Lis-Balchin 2010). Nejčastější aplikační metoda silic je ve zředěných formách, často spolu s nosným olejem v rámci masážní terapie. Lze je aplikovat i jako masti a krémy (Boehm et al. 2012).

Jako účinná metoda pro získávání příznivých účinků těchto látek bylo zavedeno ústní použití esenciálních olejů prostřednictvím zapouzdření nebo jiných metod plánovaného uvolnění. Mohou se pít ve formě čaje s cukrem nebo v měkkých kapslích, což umožňuje přesnější dávkování a zároveň se vyhýbá několika nežádoucím účinkům (Karlsen 2010).

3.8 Antimikrobiální aktivita – přehled metod

K hodnocení antimikrobiální aktivity lze použít širokou škálu testů in vitro. Takové metody jsou obvykle klasifikovány jako difúzní, diluční nebo bioautografické metody a nejpoužívanější jsou první dvě (Lang & Buchbauer 2012). Metoda difúze na agarovém disku se používá jako screeningový test před dalšími studii. Jeho použití je užitečné pro výběr antimikrobiálních látek, které mají být použity. Srovnání různých údajů týkajících se této metody je však obtížné kvůli rozdílům v provozních podmínkách uplatňovaných různými autory. Na druhé straně jsou tradičně stanoveny antimikrobiální aktivity a standardizovány pro použití antibiotik jako účinných látek. Silice a jejich složky jsou těkavé a komplexní viskózní látky. Dále jsou tyto látky hydrofobní v protikladu k antibiotikům, která jsou obecně hydrofilní. Výše uvedené metody byly proto upraveny tak, aby byly přizpůsobeny využití silic jako účinných látek (Burt 2004; Horváth et al. 2010). Při studiu antimikrobiální aktivity silic mohou být výsledky ovlivněny různými faktory. Jedním z hlavních problémů je jejich těkavost, protože látky s vyšší těkavostí se odpařují rychleji a aktivita silic by nebyla řádně vyhodnocena. Aby se tomuto problému zabránilo, jsou někdy preferovány ředící testy. Nicméně hydrofobnost, která vyžaduje použití povrchově aktivních látek nebo rozpouštědel, může výsledek zkreslit. Každé rozpouštědlo má odlišné vlastnosti, které mohou následně ovlivnit aktivitu silic jiným způsobem (Lang & Buchbauer 2012). Proměnlivé mohou být také metody extrakce silic, protože rozdíl v organoleptickém profilu naznačuje rozdíly ve složení silic získané různými způsoby extrakce, které by mohly ovlivnit antimikrobiální vlastnosti silic (Burt 2004).

3.8.1 Difuzní metody

Difuzní metody jsou diskový diluční test, metoda rozptylu válce a difuze par. V prvním případě se malé otvory děrují na inokulované agarové desce pomocí jednoduchých zařízení, jako jsou sterilní Pasteurovy pipety. Rozptyl disku vyžaduje umístění malých papírových disků napuštěných silicemi na naočkovaný povrch agaru. Disk může být po impregnaci přímo umístěn na agar nebo může být silice před vložením usazena na disk (Lang & Buchbauer 2012).

Metoda rozptylu válcem je technika, která se tak často nepoužívá. Při této metodě jsou umístěny válce z nerezové oceli nebo porcelánu na předchozí naočkované Petriho misce. Válce jsou naplněny antimikrobiálními látkami a Petriho misky jsou inkubovány. Po uplynutí této doby jsou válce vyjmuty a výsledky vyhodnoceny (Choma & Grzelak 2011). Všechny tyto techniky vedou k inhibiční zóně obklopující oblast, kde byla umístěna silice (Lang & Buchbauer 2012). V literatuře bylo navrženo (Fu et al. 2007), že inhibiční průměry menší než

10 mm by měly být považovány za slabou antimikrobiální aktivitu a vyšší než 10 mm by měly být považovány za uspokojivé. Jak je uvedeno výše, hlavním problémem tohoto typu testu je nízká rozpustnost silic ve vodě, což někdy může vést k falešně nízké antimikrobiální aktivitě. Například některé silice vykazují nízkou aktivitu v diskovém dilučním testu, ale vyšší antimikrobiální aktivitu v ředících testech. Pokud jde o difuzní testy, používají se také metody v plynné fázi, i když méně často (Lang & Buchbauer 2012).

Existují dvě varianty této techniky: pomalé a rychlé odpařování. Nejobvyklejší je rychlé odpařování (nebo invertovaná Petriho miska), při kterém se naočkovaná agarová deska umístí vzhůru nohama na rezervoár. Pod očkovanou desku se umístí sterilní filtrační papír impregnovaný těkavým olejem, aby se umožnila difuze par. Pomalé odpařování spočívá v naočkování agarové destičky a filtračního papíru nebo skleněné misky obsahující silici umístěné uvnitř utěsněné nádoby, což by umožnilo simulaci uzavřeného systému, kde se silice pomalu vypařuje a uplatňuje antibakteriální účinek. V obou případech se měří inhibiční zóna a je možné stanovit minimální inhibiční dávky (MID) (Inouye 2003).

3.8.2 Diluční metody

Diluční metody lze použít jako podpůrné pevné médium (agar) nebo kapalně médium (vývar). Oba případy zvažují koncentrační gradient látky, a proto se připravuje řada ředění. Vytvoření nasycené zvlhčené atmosféry je významně užitečné pro úpravu volatility (Lang & Buchbauer 2012). Pokud se použije agar, po zředění se nechá ztuhnout na Petriho miskách. U typu ředění bujónu se často používá mikrodiluce bujónu. Tato varianta může zahrnovat růst mikroorganismů v mikrotitračních destičkách a používá menší objemy (Choma & Grzelak 2011).

Jak je uvedeno výše, hlavní výhodou zředěvacích metod je možnost aplikovat je na studium ve vodě rozpustných nebo nerozpustných sloučenin, což je zvláště užitečné pro silice. Přesto to vyžaduje namáhavou manipulaci a vyšší náklady (Lang & Buchbauer 2012). Zředěvací metody umožňují stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) a následně stanovení účinnosti silic proti určitým mikroorganismům (Lang & Buchbauer 2012; Burt 2004).

3.9 Testované mikroorganismy

3.9.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus je fakultativně anaerobní, nesporující, grampozitivní bakterie, všudypřítomná v životním prostředí. Tvar je kulovitý o velikosti asi 1 μm . Byl objeven v roce 1880 skotským lékařem Alexanderem Ogstonem. *S. aureus* je přítomen na lidské kůži a v horních cestách dýchacích. *S. aureus* je široce rozšířen v životním prostředí, potravě vodě a půdě. Je schopen přežít v suchých podmínkách i slaném prostředí (Rubab et al. 2018).

Jako potencionální patogen způsobuje *S. aureus* potravinové infekce, od mírných infekcí kůže až po pooperační infekce rány. Je spojován s několika typy dermatitid a infekcí gastrointestinálního traktu a je hlavní příčinou bakteriémie a infekční endokarditidy. Symptomy infekcí *S. aureus* se mohou objevit během 1–6 hodin po konzumaci kontaminované potravy, zatímco trvání symptomů se objeví během 24–48 hodin. *S. aureus* má schopnost produkovat řadu toxinů uvnitř i vně buňky a způsobuje poškození biologických membrán přímou interakcí s hostitelem, což vede k buněčné smrti. Tyto toxiny zahrnují stafylokokové enterotoxiny, toxin-1 syndromu toxického šoku a leukocidin. Vzhledem k vlastnostem toxinů je *S. aureus* považován za významnou hrozbu v potravinářském průmyslu (Rubab et al. 2018).

3.9.2 *Bacillus cereus*

B. cereus je aerobní spórotvorná grampozitivní bakterie normálně rozšířená v životním prostředí. Obvykle se izoluje z půdy, rostlinných materiálů, syrového masa a zpracovaných masných výrobků. Plánová identifikace *B. cereus* obvykle zahrnuje izolaci na selektivním médiu, odhalení pohyblivosti, prototyp hemolýzy na krevním agaru a okyselení glukózy. Vegetativní forma *B. cereus* roste v rozmezí 10 až 50 °C, s optimální teplotou mezi 30 až 40 °C. Jednotlivé kmeny tolerantní vůči chladu se však mohou množit i při teplotách 4 až 6 °C, i když s výrazně delšími časy generování. V suchých nebo kyselých potravinách *B. cereus* není schopen růst. Tepelná odolnost spór se liší mezi kmeny a je silně závislá na potravinové matrici. Běžné tepelné ošetření, jako je vaření nebo pasterizace, inaktivuje vegetativní buňky, ale nestačí k úplnému inaktivaci spór. Snížení konkurenční mikrobioty tepelným zpracováním podporuje jak klíčení spór, tak růst vegetativních buněk. Proto je po tepelném zpracování potravin nezbytné rychlé ochlazení (≤ 7 °C) nebo horké skladování (≥ 65 °C), aby se zabránilo vyklíčení spór. *B. cereus* se podílí na mnoha ohniskách nemocí způsobených potravinami

v mnoha zemích na celém světě. Byl inkriminován jako příčina dvou typů otravy jídlem, emetických a průjemových syndromů (Shawish & Tarabees 2017).

3.9.3 *Escherichia coli*

E. coli je fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinka, která žije ve střevním traktu člověka a zvířat. *E. coli* byla poprvé popsána německo-rakouským pediatrem Theodorem Escherichem v roce 1885 jako *Bacterium coli*, kterou izoloval z výkalů novorozence. *E. coli* obvykle kolonizuje gastrointestinální trakt lidských kojenců během několika hodin po narození. Bakterie se požívá jídlem, vodou nebo se získává přímo od jiných jedinců, kteří s kojencem manipulují, a může ulpívat na hlenu tlustého střeva (Hooper & Gordon 2001; Kaper et al. 2004).

Vztah mezi *E. coli* a hostitelem lze definovat jako komensalismus, protože normální mikrobiota *E. coli* poskytuje hostiteli určité výhody tím, že brání kolonizaci dalších patogenů produkcí bakteriocinu a několika dalších mechanismů (Tenaillon et al. 2010). Avšak ve specifických situacích, například, když *E. coli* kolonizuje jiné orgány a tkáně nebo když byl imunitní systém hostitele potlačen léčbou léčivem nebo jinými nemocemi, může se *E. coli* stát oportunním patogenem a způsobit infekci. Vysoce adaptované kmeny *E. coli* jsou schopné způsobovat řadu různých střevních a extraintestinálních, někdy život ohrožujících onemocnění, přičemž nejčastějšími jsou průjem a infekce močových cest (Kaper et al. 2004).

3.9.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je gramnegativní, pohyblivá, aerobní, nefermentující bakterie. Pozitivní kataláza a oxidáza. *P. aeruginosa* byl tradičně považován za přísný aerob, neschopný růst v anaerobních podmínkách kvůli jeho požadavku na kyslík jako terminální elektronový akceptor v biochemických drahách. Ukázalo se však, že anaerobní růst *P. aeruginosa* je možný v přítomnosti dusičnanů nebo argininu, které organismus může také využít jako terminální elektronové akceptory. Má široký rozsah růstových teplot, roste dobře při teplotách 30–37 °C, ale i při pokojové teplotě. *P. aeruginosa* je odlišitelná od ostatních klinicky významných *Pseudomonas* spp. svou schopností růstu při teplotě 42 °C (Kiska & Gilligan 2003).

Tato všestranná bakterie se vyskytuje v půdě, vodě a může infikovat rostliny, zvířata a lidi. *P. aeruginosa* je oportunní patogen a málokdy postihuje zdravé jedince. Jeho všudypřítomná růstová kapacita kombinovaná s vysokou vnitřní rezistencí vůči antibiotikům a dezinfekčním prostředkům a schopností snadno získat mechanismy rezistence činí

z *P. aeruginosa* důležitý patogen pro člověka. Zdraví lidé jsou infikováni zřídka, ale tento patogen je neslavný tím, že způsobuje nozokomiální infekce u imunokompromitovaných pacientů, ventilovaných pacientů na jednotce intenzivní péče a pacientů s popáleninami. V nemocnicích může organismus kontaminovat zařízení, která zůstávají uvnitř těla, například dýchací zařízení a katétrů (Stover et al. 2000).

3.9.5 *Candida albicans*

C. albicans je diploidní, aerobní a polymorfní (schopnost růst v několika morfologiích) houba. V Gramově barvení se barví pozitivně (Nobile & Johnson 2015). Historicky je *C. albicans* znám od roku 400 př. n. l., kdy známý řecký lékař Hippocrates identifikoval mikrobiální infekci a nazval ji „drozd“, což je způsobeno tímto patogenem. *C. albicans* je oportunní fungální patogen, který existuje jako neškodný komensál v gastrointestinálním a genitourinárním traktu přibližně u 70 % lidí, a přibližně 75 % žen trpí infekcí *Candida* alespoň jednou za život. Stává se však oportunistickým patogenem pro imunokompromitované pacienty, pro některé imunologicky slabé jedince nebo dokonce pro zdravé jedince. Infekce způsobená *C. albicans* je běžně známá jako kandidóza. Kandidózu lze klasifikovat do dvou kategorií v závislosti na závažnosti onemocnění. V první kategorii jsou mukózní infekce a nejznámější z těchto mukózních infekcí je tzv. drozd, který se vyznačuje bílými skvrnami v infikovaných membránách. Tyto infekce obecně ovlivňují gastrointestinální epiteliální buňky, vaginální nebo orofaryngeální sliznici. Dále je u žen docela běžná vaginální kandidóza (VVC) a některé z nich zažívají opakovaný výskyt této infekce, která je známá jako recidivující vulvovaginální kandidóza (RVVC). Způsobuje však život ohrožující systémové infekce těžce nemocným pacientům, u nichž je úmrtnost přibližně 30 %. Systémové *Candida* infekce jsou běžné u imunokompromitovaných jedinců, včetně pacientů infikovaných HIV, příjemců transplantací, pacientů s chemoterapií a kojenců s nízkou porodní hmotností (Kabir et al. 2012).

4 Metodika

Úkolem bylo z vybraných druhů samojských rostlin získat silice a otestovat jejich antimikrobiální aktivitu a chemické složení.

4.1 Použité chemikálie

- Tween 80 (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika)
- hexan (Penta; Praha, Česká republika)
- etanol 96%, 70% (Penta; Praha, Česká republika)
- DMSO (dimethyl sulfoxid) (VWR; Francie)
- RPMI 1640 médium (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika)
- Mops (VWR; Taiwan)
- 35% chlorovodíková kyselina (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Chlorid sodný (Dorapis; Praha, Česká republika)
- Chlorid draselný (Penta; Praha, Česká republika)
- Tris Base (tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Roth; Karlsruhe, Německo)
- Mueller – Hinton Broth (Oxoid; Basingstoke, Velká Británie)

4.2 Použité pomůcky a přístroje

Pomůcky:

- laboratorní sklo
- automatické pipety Eppendorf
- Petriho misky
- mikrotitrační destičky (Gama Group, ČR)
- filtrační papír
- vialka šroubovací 2 ml
- injekční stříkačky na 5ml
- injekční stříkačka Hamiltonka na 1 μ l, 50 μ l
- sterilní vaničky na multikanálové pipety, Costar
- Clevengerova aparatura

Přístroje:

- magnetické míchadlo (Variomag)
- předvážky Kern EMB 600-2 (VERKON)
- analytické váhy (FR-200 MK II, AND)
- autokláv (Tuttnauer 3850EL)
- vortex (Chromservis)
- termostat BT 120
- inkubátor KBC G-100/250
- Laminární box (Teistar 16152)
- sonikátor (Logic ultrasonic PE cleaner)
- Multiscant Ascent Microplate Microplate (ThermoFisherScientific)
- hořák Fuego – basic (WLD-TEC)
- mrazák (BOSCH)
- denzimetr (Merci)
- topné hnízdo (LTHS)
- pH metr (XS)
- plynový chromatograf Agilent 7890A GC (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
- hmotnostní spektrometr Agilent 5975C MSD (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
- kolona HP-5MS (30m x 0,250mm x 0,25 μ m) (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

4.3 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál pro výzkum byl dodán vedoucím práce Ing. Pavlem Novým, PhD., který ho získal při své výzkumné cestě po ostrovech Samoa. Datum a lokalita sběru je uvedena v Tabulce 2 a znázorněna na Obrázku 16.

Tabulka 2: Druh, datum a lokalita sběru rostlinného materiálu

<i>E. hortensis</i>	
Datum sběru	14. 09. 2015
lokalita sběru	Apia – Vailima, Upolu, Samoa
<i>P. fruticosa</i>	
datum sběru	21. 09. 2015
lokalita sběru	Salelologa (Tafua), Savai'i, Samoa



Obr. 16: Mapa vyznačených míst sběru rostlin

4.4 Mikroorganismy

Na testování antimikrobiální aktivity byly použity standardní sbírkové kmeny z American type culture collection (ATCC).

Grampozitivní bakterie: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
Bacillus cereus ATCC 11778

Gramnegativní bakterie: *Escherichia coli* ATCC 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Kvasinka: *Candida albicans* ATCC 10231

4.5 Extrakce silic

Vysušený rostlinný materiál byl najemno rozdrcen a nasypán do varné baňky o objemu 2 litrů, přidán 1 litr vody a varné kamínky. Následně byla provedena destilace vodní parou pomocí Clevengerova aparátu po dobu 3 hodin. Jako sběrné rozpouštědlo byl použit n-Hexan. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Získaná silice byla uložena ve skleněné vialce při 4 °C.

4.6 Kultivační média

4.6.1 Müller-Hinton Broth (MHB) bujón

Bujón byl připraven dle návodu. Na předvážkách bylo naváženo 21 g MHB, který byl rozpuštěn v 1 litru destilované vody. Obsah byl důkladně promíchán na magnetickém míchadle. Poté byl sterilován při 121 °C po dobu 20 minut a následně uložen při 4 °C.

4.6.2 Müller-Hinton Broth (MHB) bujón pufrovaný

Pro přípravu Müller-Hinton média byl nejprve připraven pufr. Na přípravu pufru bylo na předvážkách naváženo 8 g NaCl, 0,2 g KCl a 6,1 g TrisBase na 1 litr destilované vody. Následně bylo pomocí HCl upraveno pH na 7,6 na pH metru. Do této připravené směsi bylo přidáno 21 g MHB a celý obsah byl důkladně promíchán na magnetickém míchadle. Vše bylo následně autoklárováno při 121 °C po dobu 20 minut a následně uloženo při 4 °C.

4.6.3 RPMI médium

K testování kvasinek bylo podle doporučení NCCLS naváženo 10,4 g RPMI a 34,53 g MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) a vše bylo důkladně rozpuštěno v 1 litru destilované vody. Poté bylo pomocí 1M roztoku NaOH upraveno pH na hodnotu 7. Takto připravené médium bylo zfiltrováno přes membránový filtr (0,45 μm) pomocí předem sterilovaného vakuového filtračního zařízení a skladováno při 4 °C.

4.7 Příprava zásobních vzorků silic

Ze silic získaných extrakcí byly připraveny zásobní roztoky, které se poté využívaly k testování. Při vypouštění silic z aparatury bylo použito jako sběrné rozpouštědlo hexan, který se musel nechat nejdříve odpařit. Vážením byl sledován váhový úbytek. Po odpaření hexanu byly výpočtem připravené zásobní roztoky, aby počáteční koncentrace v první jamce destičky odpovídala 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Příslušné množství silic bylo rozpuštěno ve směsi ethanolu + Tween smíchaného v poměru 2:1. Takto připravený roztok byl zvortexován a sonifikován.

Z připravených zásobních roztoků bylo poté do eppendorfek odpipetováno 12,5 μl roztoku a takto připravené vzorky byly následně zamrazeny.

Před každým pokusem bylo vyndáno příslušné množství vzorků. Vzorky pro bakterie byly rozpuštěny v Müller-Hintonově médiu a vzorky pro kvasinku v RPMI médiu. K objemu 12,5 μl silice bylo odpipetováno 1237,5 μl Müller-Hintona média pro bakterie a 1237,5 μl RPMI média pro kvasinku.

4.8 Příprava zásobního inokula

Před samotným započítím pokusu byla založena zásobní inokula testovaných mikroorganismů a uchována pro následující testování. Zásobní inokula byla z příslušného média a organismu a inkubována při 37 \pm 0,2 °C 24 hodin pro bakterie, a přes noc při 25 \pm 0,2 °C pro *C. albicans*. Zásobní inokula byla uchována v lednici při 4 °C.

4.9 Příprava kontrolních antibiotik

Pro každé testování bylo připraveno vždy nové kontrolní antibiotikum. Pro testování bakterií byl jako kontrolní antibiotikum použit tetracyklin o čistotě 88 %, který byl rozpuštěn v 96,5% ethanolu. Pro kvasinku *C. albicans* bylo vybráno antibiotikum tioconazol o čistotě 97 % a rozpuštěn v roztoku DMSO. Navážky antibiotik byly upraveny dle čistoty daného antibiotika, udané od výrobce. Z důvodu přesnosti vah bylo vždy naváženo 100x vyšší množství antibiotika, rozpuštěno v příslušném rozpouštědle a zvortexováno. Poté bylo odpipetováno 10 µl antibiotika a přidáno 990 µl příslušného média, u bakterií MHB bez pufru a pro kvasinku RPMI médiu. Počáteční koncentrace antibiotika tioconazolu pro kvasinku byla 16 µl/ml. Počáteční koncentrace tetracyklinu pro *S. aureus*, *E. coli* a *P. aeruginosa* byla 16 µl/ml a pro bakterii *B. cereus* 4 µl/ml.

4.10 Příprava inokula pro testování

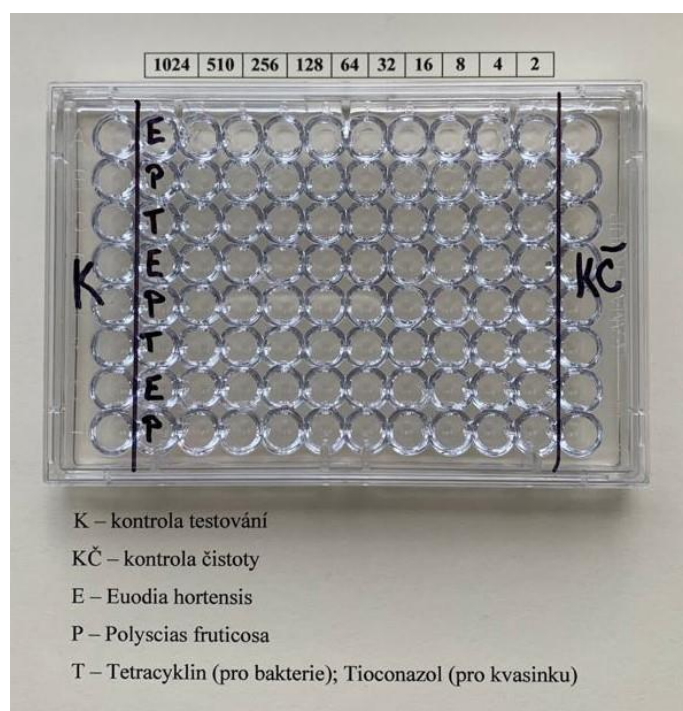
Pro testování bylo 12 hodin předem připraveno inokulum. Ve Flow-boxu bylo do 15 ml zkumavky sterilně injekční stříkačkou odebráno 10 ml Müller-Hintonova média a bylo zaočkováno příslušným mikroorganismem, aby se denzita zvýšila o 0,5 McFarland zákalového standardu, která byla měřena pomocí denzimetru. Připravená inokula byla uchována při teplotě 37 °C v termostatu.

4.11 Příprava mikrotitrační destičky a její zaočkování

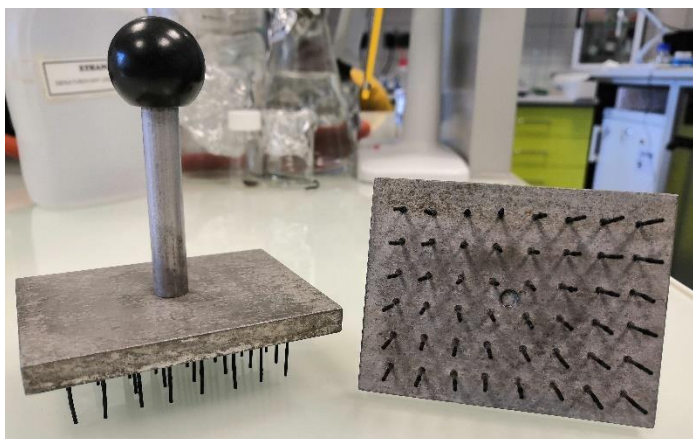
Pro stanovení antimikrobiální aktivity byla použita *in vitro* mikrodiluční metoda. Do sloupců 1., 3. - 12. mikrotitrační destičky bylo odpipetováno 100 µl bujónu. U bakterií byl použit pufrovaný MHB, u *C. albicans* RPMI médium. První sloupec na destičce sloužil jako kontrola růstu mikroorganismů a poslední dvanáctý sloupec jako kontrola čistoty. Do jamky 2. sloupce v 1., 4. a 7. řádku bylo pipetováno 200 µl roztoku silice *Euodia hortensis*, do jamky v 2., 5. a 8. řádku druhého sloupce bylo pipetováno 200 µl roztoku silice *Polyscias fruticosa*. Do jamky 3. a 6. řádku 2. sloupce bylo napipetováno 200 µl kontrolního antibiotika, tetracyklin pro bakterie a tioconazol pro *C. albicans*. Pomocí multikanálové pipety bylo z druhého sloupce odpipetováno 100 µl a přeneseno do jamek 3. sloupce, promícháno a znova odpipetováno 100 µl a přeneseno do dalšího sloupce. Takto bylo postupováno až do 11. sloupce, kde bylo

odpipetováno 100 μ l roztoku pryč. Ve všech jamkách mikrotitrační destičky bylo tedy 100 μ l roztoku. Mikrotitrační destička pro pokus znázorněna na Obrázku 17.

K zaočkování destičky byl použit inokulátor (viz Obrázek 18). Připravená inokula byla přelita do Petriho misek. Do Petriho misek s inokulem byl namočen inokulátor, poté byla pomocí inokulátoru zaočkována destička v jamkách 1. až 11. sloupce, 12. sloupec, kde byla kontrola čistoty, se nezaočkoval. Zaočkování bylo provedeno dvakrát, tím se dosáhlo přibližně 4×10^5 KTJ/ml v každé jamce destičky při objemu 100 μ l. Inokulátor byl mezi očkovanými vždy namočen do ethanolu a nad kahanem ožihán. Takto zaočkované destičky byly zakryty popsánými víčky a byly inkubovány v termostatu při 37 °C 24 hodin. *C. albicans* byla inkubována 48 hodin. Po inkubaci bylo provedeno vyhodnocení antimikrobiální aktivity vizuálně a pomocí přístroje Multiscan Ascent Microplate Photometer. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla vyzjištěna jako modus/medián ze 3 opakování ve 4 nezávislých testech.



Obr. 17: Mikrotitrační destička (Šimandl 2019)



Obr. 18: Inokulátor (Šimandl 2019)

4.12 Chemické složení

Kvantifikace: plynový chromatograf Agilent 7890A GC s plamenovým ionizačním detektorem. K analýze byl využit plynový chromatograf Agilent 7890A GC, spojený s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C MSD, který byl vybaven kolonou HP – 5MS (30m x 0,250mm x 0,25 μ m). Pro plynovou chromatografii byl připraven roztok silice a n–Hexanu v poměru 1:1000, z toho bylo pro analýzu použito 1 μ l. Do injektoru vyhřátého na 225 °C byl proveden nástřik o objemu 1 μ l ve splitovém poměru 12:1. Jako nosný plyn bylo použito helium a byl nastaven konstantní průtok 1 ml/min. Teplotní program byl nastaven na počáteční teplotu 60 °C po dobu 3 minut, poté došlo ke zvyšování teploty 3 °C/min až na 231 °C. Tato teplota byla udržována 10 minut. Celkový čas analýzy byl 70 minut. Ionizační energie byla nastavena na 70 eV a data byla získána v módu celkového skenování. Identifikace jednotlivých látek byla provedena porovnáním hmotnostních spekter a retenčních časů s National Institute of Standards and Technology Library (NIST, USA), literaturou a standardy. Kvantifikace provedena na základě relativního procentuálního zastoupení ploch píků.

5 Výsledky

Byly vydestilovány silice z obou rostlin, otestována jejich antimikrobiální aktivita a zanalyzováno jejich složení.

5.1 Extrakce silic

Vodní destilací pomocí Clevengerova aparátu sušeného materiálu rostliny *E. hortensis* o hmotnosti 16,27 g bylo získáno 70 μ l nažloutlé silice, což odpovídá výtěžnosti 0,43 %. Z rostliny *P. fruticosa* o hmotnosti 26,25 g bylo vydestilováno 40 μ l silice zelené barvy s výtěžností 0,152 %. Výtěžnosti shrnuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Výtěžnost silic.

	Navážka sušeného materiálu	Množství vydestilované silice	Výtěžnost	Barva silice
<i>E. hortensis</i>	16,27 g	70 μ l	0,43 %	nažloutlá,
<i>P. fruticosa</i>	26,25 g	40 μ l	0,152 %	zelená

5.2 Antimikrobiální aktivita

U rostlin *E. hortensis* a *P. fruticosa* nebyla prokázána antimikrobiální aktivita v rozmezí koncentrací 2–1024 μ l/ml.

Účinnost antibiotik tetracyklin a tioconazol vůči námi vybraným kmenům ATTC odpovídala koncentracím udávaných dle CLSI (2013). Výsledky testů jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Antimikrobiální aktivita *E. hortensis* a *P. fruticosa*

Mikroorganismus	<i>E. hortensis</i>		<i>P. fruticosa</i>		Tetracyklin	Tioconazol
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>B. cereus</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	0,03	n.t.
<i>S. aureus</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	0,5	n.t.
<i>E. coli</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	1	n.t.
<i>P. aeruginosa</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	16	n.t.
<i>C. albicans</i>	>1024	>1024	>1024	>1024	n.t.	1

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace (minimální fungicidní koncentrace v případě *C. albicans*); n.t. – nebylo testováno

5.3 Chemické složení silice

U silice *E. hortensis* bylo identifikováno 11 látek představujících 93,68 % celkového obsahu. Nejvíce byly zastoupeny látky α -copaene (18,50 %), α -curcumene (40,52 %) a Caryophyllene oxid (11,70 %). Celkové složení silice je shrnuto v Tabulce 5.

Tabulka 5: Chemické složení silice *E. hortensis*

RI	Identifikovaná látka	% zastoupení
1032	D-Limonene ^s	3,09
1346	α -cubebene	2,91
1374	α -copaene	18,50
1416	β -caryophyllene	3,35
1453	α -humulene ^s	1,95
1476	β -himachalene	1,78
1479	α -curcumene	40,52
1515	δ -cadinene	4,07
1572	Spathulenol	3,29
1577	Caryophyllene oxide	11,70
1841	Hexahydrofarnesyl acetone	2,52
Identifikováno celkem		93,68

RI – Kovatsův retenční index (HP – 5MS); s – identifikace potvrzena pomocí standardu

Mezi hlavními látkami silice *P. fruticosa* jsou β -farnesene (11,73 %), Ethanone, 1-(4-cyclohexylphenyl) (5,88 %), β -chamigrene (4,30 %) a Cadalene (4,29 %). Celkové složení je shrnuto v Tabulce 6.

Tabulka 6: Chemické složení silice *P. fruticosa*

RI	Identifikovaná látka	% zastoupení
1368	α -ylangene	0,53
1381	β -bourbonene	0,84
1387	β -elemene	2,04
1481	β -chamigrene	4,30
1485	β -selinene ^s	1,55
1492	β -cadinene	3,22
1500	Isoaromadendrene epoxide	0,51
1515	γ -cadinene	2,13
1518	α -calamenene	0,56
1538	Diepicedrene-1-oxide	1,50
1549	C ₁₄ H ₂₂	2,89
1577	Spathulenol ^s	3,62
1581	Cyryophylene oxide ^s	2,47
1587	Neidentifikovaná látka I	4,00
1593	Isoaromadendrene epoxide	1,10
1604	α -humulene	1,63
1611	Neidentifikovaná látka II	1,78
1617	Neidentifikovaná látka III	1,57
1625	β -farnesene	11,73
1643	Ethanone, 1-(4-cyclohexylphenyl)	5,88
1648	C ₁₅ H ₂₄	4,95
1653	γ -Elemene	3,07
1659	γ -Gurjunene	1,58
1664	β -Guaiene	0,97
1669	Cadalene ^s	4,29
1677	Neidentifikovaná látka IV	2,69
1685	Neidentifikovaná látka V	0,73
1687	Neidentifikovaná látka VI	0,60

Tabulka 6: Chemické složení silice *P. fruticosa* (pokračování)

RI	Identifikovaná látka	% zastoupení
1707	Neidentifikovaná látka VII	0,82
1719	Cedren-13-ol, 8-	0,73
1732	Longipinocarvone	0,36
1746	Germacrone	0,44
1759	Neidentifikovaná látka VIII	2,51
1764	Neidentifikovaná látka IX	0,90
1766	Neidentifikovaná látka X	0,80
1823	Neidentifikovaná látka XI	0,75
1841	Neidentifikovaná látka XII	0,49
Identifikováno celkem		80,02

RI – Kovatsův retenční index (HP – 5MS); s – identifikace potvrzena pomocí standardu

6 Diskuze

Mnoho druhů rostlin s léčivými účinky je používáno po celém světě, ale mnohdy tyto rostliny nejsou dostatečně prozkoumané. Tato práce směřovala k lepšímu poznání rostlin *E. hortensis* a *P. fruticosa*. Silice byly podrobeny testování antimikrobiální aktivity pomocí mikrodiluční metody. Zvoleny byly standardní kmeny mikroorganismů: *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *C. albicans*. Dále bylo stanoveno chemické složení obou silic.

U silic se dá obecně očekávat alespoň nějaká slabá antimikrobiální aktivita, v této práci se jí v rozmezí testovaných koncentrací nepodařilo potvrdit.

E. hortensis

Výtěžnost silice *E. hortensis* ze sušeného materiálu nadzemních částí pomocí vodní destilace v této práci byla 0,43 %. Barva silice měla nažloutlou barvu. Brophy et al. (1985) ve své práci využívali čerstvé listy *E. hortensis*. Destilací parou po dobu 5 hodin získali olej hnědé barvy s výtěžností 0,47 %, což zhruba odpovídá výtěžnosti v této práci. Sadibutar (2015) ve své práci získával silice pomocí hydrodestilace a výtěžnost z listů byla 0,60 %, což představovalo vyšší výtěžnost oproti mému pokusu. Odchytky ve výtěžnosti mohou být způsobené klimatickými a geografickými podmínkami, dobou sběru, chemotypem, podmínkami sušení, delší dobou destilace (4 – 5 hodin) (Morteza – Semnani et al. 2008). Další literatura udává výtěžnost 0,30 % silice světle žluté barvy získané z listů příbuzného druhu *E. meliaefolia*, (Trung et al. 2016).

O chemickém složení esenciálního oleje *E. hortensis* je jen velmi málo dostupných záznamů. První studie, která se chemickým složením esenciálního oleje *E. hortensis* zabývá je z roku 1985 od autorů Brophy et al. (1985). Další autoři, kteří se tímto stanovením zabývali, vycházejí jen z této studie. Hlavní složky silice *E. hortensis* v mé práci tvořily látky α -copaene (18,50 %), α -curcumene (40,52 %) a Caryophyllene oxid (11,70 %). Stejně látky udávají i autoři Brophy et al. (1985) α -copaene (8 %), α -curcumene (15 %), Caryophyllene oxid (5 %), tyto hodnoty jsou ale o polovinu nižší než hodnoty naměřené v mé práci. Jako hlavní naměřené složky uvádějí menthofuran (64 %) a evodone (27 %), tyto látky nebyly v mé práci vůbec detekovány.

Juliano et al. (2019) ve své studii udávají, že curcumene je bylinný terpen, který se nachází v rozmarýnu (*Rosmarinus*) a ve vysokých koncentracích v esenciálních olejích zázvoru (*Zingiber officinale*) a kurkumy (*Curcuma longa*). Curcumene patří do sesquiterpenů. Před příchodem moderní medicíny se curcumene převážně používal v tradiční medicíně na léčení gastrointestinálních problémů, nádorů a kardiovaskulárních poruch. Novější vědecké výzkumy prokázaly schopnost curcumene v léčbě revmatických stavů a zánětu zažívacího traktu.

α -copaene je tricyklický seskviterpen, je přítomen v několika esenciálních olejích léčivých a aromatických rostlin. Studie ukázaly, že α -copaene má antikarcinogenní, antioxidační, hepatoprotektivní a protizánětlivé účinky. Dále také důležité biologické aktivity, včetně antigenotoxické aktivity (Turkez et al. 2014).

Autoři Fidy et al. (2016) ve své studii uvádějí, že caryophyllene oxide je v posledních letech kvůli své vysoké biologické aktivitě rozsáhle studován. Jako hlavní přírodní zdroje caryophyllene oxidu označují bazalku (*Ocimum spp.*) a šalvěj (*Salvia glutinosa*). Studie udává, že čistá látka nebo jako součást rostlinných éterických olejů vykazuje caryophyllene oxide protizánětlivé, antioxidační, antivirové, antikarcinogenní a analgetické vlastnosti.

P. fruticosa

Výtěžnost silice *P. fruticosa* byla 0,152 % zelené barvy. Tato výtěžnost se shoduje s udávanou hodnotou 0,13 % a vzhledu světle zelené barvy (Brophy et al. 1990).

Hlavní složky silice *P. fruticosa* v této práci byly látky β -Farnesene (11,73 %), Ethanone, 1-(4-cyclohexylphenyl) (5,88 %), β -Chamigrene (4,30%) a Cadalene (4,29 %). Další naměřené látky jsou Spathulenol (3,62 %), β -cadinene (3,22 %) a další. První chemické složení *P. fruticosa* provedli autoři Brophy et al. (1990) v roce 1990. Dalších záznamů o chemickém složení této rostliny je velcí málo a když už nějaká je, tak většinou vychází z práce těchto autorů. Tito autoři ve své studii stanovovali vzorky tří druhů silic *P. fruticosa* z jiného místa výskytu. Jako hlavní látky autoři udávají Gemacrene (20,3 % a 27 %) a β -elemene (1,5 % a 16,7 %). S hlavními složkami v mé práci se autoři Brophy et al. (1990) shodují s látkou β -cadinene, u které udávají naměřenu hodnotu 2 %. Dalšími látkami, kterými se shodují jsou látky α -ylanglene v rozmezí (0,1 – 0,3 %) a γ -elemene, kterou udávají v rozmezí (1,5 – 16,7 %) podle různé odrůdy. Tyto látky v mé práci byly zastoupeny α -ylanglene (0,53 %) a γ -elemene (3,07 %). Ostatní látky jsou rozdílné.

Udávají, že *P. fruticosa* zahrnuje mnoho různých forem, proto je možné, že za kvantitativní i kvalitativní chemické rozdíly mohou být zodpovědné menší genetické rozdíly. Bylo často pozorováno, že některé aromatické druhy čeledi Araliaceae vykazují vůně připomínající různé byliny patřící do čeledi Apiaceae a zejména to, že vůně drcených listů *P. fruticosa* připomíná petržel (*Petroselinum crispum*). Hledání látek, jako je α -phellandrene, terpinolene, 6, p-dimethylstyrene, p-mentha-1,3,8-trien, myristicin a zejména apiole, které jsou odpovědné za vůni drcené petrželky se ukázalo jako negativní. To nemusí být nic překvapivého, jelikož srovnání zápachů je vysoce subjektivní a může vést k nesprávným závěrům, zejména v rukou (nebo vhodněji nosech) pracovníků nequalifikovaných v sensorické analýze. (Brophy et al. 1990).

Autoři Kirsten et al. (2016) udávají, že β -farnesene se přirozeně vyskytuje v mnoha rostlinách a bylinách. β -farnesene má protizánětlivé, antimykotické účinky. Dále se uvádí, že má uklidňující a sedativní vlastnosti, které mohou zmírnit úzkost a uvolnit svaly a snížit tak křeče.

7 Závěr

Ani u jedné z testovaných silic nebyla v rozmezí koncentrací (2–1024 $\mu\text{l/ml}$) antimikrobiální aktivita prokázána, nelze ale vyloučit, že testované silice mohou vykazovat alespoň nějaké mírné antimikrobiální účinky, jelikož v chemickém složení silic byly identifikovány látky s antimikrobiálními účinky, jako například látka β -farnesene obsažená v silici rostliny *P. fruticosa*.

Chemické složení těchto silic bylo velmi různorodé a lišilo se s předešlými studiemi. Je prokázáno dlouhodobějším zkoumáním, že složení silic jednoho druhu se může výrazně lišit v závislosti na kultivaru, klimatickými a geografickými podmínkami, dobou sběru, podmínkami uskladnění, správné zpracování, způsobu extrakce.

Poprvé byla provedena analýza chemického složení silic z daných rostlin *E. hortensis* a *P. fruticosa* ze Samoy. Z dostupných informací byla také poprvé otestována jejich antimikrobiální aktivita.

Naše hypotéza o antimikrobiálním působení se nepotvrdila, i když potenciál u rostlin by byl. Analýza chemického složení může přispět k poznání variability chemotypů druhů z různých lokalit výskytu.

8 Literatura

- Abe R, Ohtani K. 2013. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. *Journal of Ethnopharmacology* **145**:554-565.
- Adorjan B, Buchbauer G. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal* **25**:407–426.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**:446-475.
- Başer KHC, Buchbauer G. 2016. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Bassolé IH, Juliani HR. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* **17**:3989-4006.
- Benjamin KR, Silva IR, Cherubim JP, McPhee D, Paddon CJ. 2016. Developing commercial production of semi-synthetic artemisinin, and of β -Farnesene, an Isoprenoid Produced by Fermentation of Brazilian Sugar. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **27**:1339-1345.
- Boehm K, Büssing A, Ostermann T. 2012. Aromatherapy as an adjuvant treatment in cancer care - a descriptive systematic review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* **9**:503–518.
- Bousbia N, Abert Vian MA, Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. 2009. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering* **90**:409–413.
- Boutekdjiret C, Bentahar F, Belabbes R, Bessiere JM. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal* **18**:481-484.
- Brophy JJ, Rahmani M, Toia RF, Croft KD, Lassak EV. 1985. The volatile oils of *Euodia hortensis* forma *hortensis*. *Flavour and Fragrance Journal* **1**:17-20.
- Brophy JJ, Lassak EV, Suksamrarn A. 1990. Constituents of the volatile leaf oils of *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. *Flavour and fragrance journal* **5**:179-182.
- Buchbauer G. 2010. Biological activities of essential oils. Pages 235-280 in Baser KHC, Buchbauer G, editors. *Handbook of Essential Oils – Science, Technology and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**:223-253.

- Croft KD, Tu'ipulotu P. 1980. A survey of Tongan medicinal plants. *Journal of Natural Science* **1**:45-57
- de Oliveira AM, Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB. 2008. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* **3**:1-8.
- Djilani A, Dicko A. 2012. The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, Well-Being and Health*, France.
- Dorman HJ, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* **88**:308-316.
- Eltz T, Zimmermann Y, Haftmann J, Twele R, Francke W, Quezada-euan JJG, Klaus Lunau K. 2007. Enfleurage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**:2843-2848.
- Evergetis E, Michaelakis A, Kioulos E, Koliopoulos G, Haroutounian SA. 2009. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from six Apiaceae family taxa against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research* **105**:117-124.
- Fidyk K, Fiedorowicz A, Strzdała L, Szumny A. 2016. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer medicine* **5**:3007-3017.
- Fu Y, Zu YG, Chen LY, Shi XG, Wang Z, Sun S, Efferth T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research* **21**:989-994.
- GBIF. 2019. Free and open access to biodiversity data. Global Biodiversity Information Facility, Denmark. Available from: <https://www.gbif.org/> (accessed November 2019).
- Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. 2010. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today* **15**:668-678.
- Giday M, Asfaw Z, Woldu Z. 2009. Medicinal plants of the Meinit ethnic group of Ethiopia: an ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology* **124**:513-521.
- Gonzalez-Coloma A, Reina M, Diaz CE, Fraga BM, Santana-Meridas O. 2013. Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier **3**:237-268.
- Harris B. 2010. Phytotherapeutic uses of essential oils. Pages 315-352 in Baser KHC, Buchbauer G, editors. *Handbook of Essential Oils – Science, Technology and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

- Hashemi SMB, Khaneghah AM, Sant'ana AS. 2018. Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications. Hoboken, New Jersey.
- He HB, Wang HB, Fang CX, Lin YY, Zeng CM, Wu LZ, Guo WC, Lin WX. 2009. Herbicidal effect of a combination of oxygenic terpenoids on *Echinochloa crus-galli*. *Weed Research* **49**:183-192.
- Holopainen JK. 2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends In Plant Science* **9**:529-533.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. **292**:1115-1118.
- Horváth G, Jám bor N, Végh A, Böszörményi A, Lemberkovic s É, Héthelyi É, Kovács K, Kocsis B. 2010. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal* **25**:178-182.
- Hrc kova G, Velebny S. 2013. Pharmacological potential of selected natural compounds in the control of parasitic diseases. Springer Vienna, Vienna.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* **3**:12.
- Choi WS, Park BS, Lee YH, Jang DY, Yoon HY, Lee SE. 2006. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. *Crop Protection* **25**:398-401.
- Choma IM, Grzelak EM. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* **1218**:2684-2691.
- Ibanez S, Gallet C, Després L. 2012. Plant insecticidal toxins in ecological networks. *Toxins* **4**:228-243.
- Inouye S. 2003. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy* **13**:95-107.
- Janardhanan M, Thoppil JE. 2004. Herb and spice essential oils: therapeutic, flavor and aromatic chemicals of Apiaceae. Discovery Publishing House, New Delhi.
- Juliano C, Marchetti M, Campagna P, Usai M. 2019. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso collected in South-West Sardinia. *Saudi Journal of Biological Sciences* **26**:897-905
- Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. 2012. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiology* (e538694) DOI: 10.5402/2012/538694.

- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2**:123-140.
- Karlsen J. 2010. Encapsulation and other programmed release techniques for essential oils and volatile terpenes. Pages 855-862 in Baser KHC, Buchbauer G, editors. *Handbook of Essential Oils – Science, Technology and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Kemen AC, Honkanen S, Melton RE, Findlay KC, Mugford ST, Hayashi K, Haralampidis K, Rosser SJ, Osbourn A. 2014. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:8679-8684.
- Kiska DL, Gilligan PH. 2003. *Pseudomonas*. Pages: 719-728 in Murray PR et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC.
- Koffuor GA, Boye A, Ofori-Amoah J, Kyei S, Abokyi S, Nyarko RA, Banglu RN. 2014. Anti-inflammatory and safety assessment of *Polyscias fruticosa* (L.) Harms (Araliaceae) leaf extract in ovalbumin-induced asthma. *The Journal of Phytopharmacology* **3**:337-342.
- Koffuor GA, Boye A, Kyei S, Ofori-Amoah J., Akomanin AE, Barku A, Kumi Awuku A. 2016. Anti-asthmatic property and possible mode of activity of an ethanol leaf extract of *Polyscias fruticosa*. *Pharmaceutical biology* **54**:1354-1363.
- Kordali S, Kesdek M, Cakir A. 2007. Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Industrial Crops and Products* **26**:278-297.
- Lang G, Buchbauer G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrance Journal* **27**:13-39.
- Lis-Balchin M. 2010. Aromatherapy with essential oils. Pages 549-584 in Baser KHC, Buchbauer G, editors. *Handbook of Essential Oils – Science, Technology and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Lucchesi ME, Smadja J, Bradshaw S, Louw W, Chemat F. 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering* **79**:1079-1086.
- Malini DM, Madihah M, Kusmoro J, Kamilawati F, Iskandar J. 2017. Ethnobotanical Study of Medicinal Plants in Karangwangi, District of Cianjur, West Java. *Biosaintifika* **9**:345-356.

- Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbarzadeh M. 2008. The Essential Oil Composition of *Leonurus cardiaca* L. *Journal of Essential Oil Research* **20**:107-109.
- Mudiyansele SE, Elsner P, Thiele JJ, Hamburger M. 2003. Ultraviolet A Induces Generation of Squalene Monohydroperoxide Isomers in Human Sebum and Skin Surface Lipids In Vitro and In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* **120**:915-922.
- NCCLS. 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 NCCLS, Pennsylvania.
- Nobile CJ, Johnson AD. 2015. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology* **69**:71-92.
- Pandey AK, Singh P, Tripathi NN. 2014. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **4**:682-694.
- Paré JRJ, Bélanger JMR. 1997. *Instrumental methods in food analysis*. Elsevier, New York.
- Peixoto MG, Bacci L, Fitzgerald BA, Araújo APA, Alves PB, Silva JHS, Santos AA, Oliveira AP, da Costa AS, Arrigoni-Blank MF. 2015. Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. *Industrial Crops and Products* **71**:31-36.
- Ríos JL. 2016. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. Pages 3-10 in Preedy VR, editors. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, San Diego.
- Romagni J, Allen S, Dayan F. 2000. Allelopathic Effects of Volatile Cineoles on Two Weedy Plant Species. *Journal of Chemical Ecology* **26**:303-313.
- Romero AL, Oliveira RR, Romero RB, Almeida AL, Diniz SPSS, Vida JB. 2013. Efeito de monoterpenos naturais no crescimento micelial e germinação de conídios de *Corynespora cassiicola*. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana* **18**:3-7.
- Rubab M, Shahbaz HM, Olaimat AN, Oh DH. 2018. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosensors and Bioelectronics* **105**:49-57.
- Sidabutar DHM. 2015. Analisis Komponen Senyawa Kimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Zodia (*Euodia Hortensis* JR & G. Forst) [Skripsi]. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Shawish R, Tarabees R. 2017. Prevalence and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus*/i isolated from beef products in Egypt. *Open Veterinary Journal* **7**:337-341.

- Sonwa MM. 2000. Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus* [Ph.D. Thesis]. University of Hamburg, Hamburg.
- Stewart D. 2013. The Chemistry of Essential Oils Made Simple: God's Love Manifest in Molecules. Care Publications, New York.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL et al. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-964.
- Stratford M, Eklund T. 2003. Food Preservatives. MA: Springer US, Boston.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **8**:207-217.
- Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, O'Maille P, Osbourn A. 2014. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**:225-257.
- Tongnuanchan P, Benjakul S. 2014. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science* **79**:1231-1249.
- Trung HD, Ban PH, Thang TD, Hoi TM, Dai DN, Ogunwande IA. 2016. Chemical Constituents of Essential Oil from the Leaf of *Euodia meliaefolia* (Hance) Benth. Grown in Vietnam. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **19**:88-93.
- Turek C, Stintzing FC. 2013. Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**:40–53.
- Turkez H, Togar B, Tatar A, Geyikoglu F, Hacimuftuoglu A. 2014. Cytotoxic and cytogenetic effects of α -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia* **69**:936-942.
- Ukeh DA, Umoetok SBA. 2011. Repellent effects of five monoterpenoid odours against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in Calabar, Nigeria. *Crop Protection* **30**:1351-1355.
- WHO Regional Publications. 1998. Medicinal plants in the South Pacific. WHO Regional Office for the Western Pacific, Manila.
- Walker T. 2017. An examination of medicinal ethnobotany and biomedicine use in two villages on the Phnom Kulen plateau. Hollins University. United States.
- Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* **18**:1181-1190.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

WHO -Světová zdravotnická organizace

MID – minimální inhibiční dávka

VVC – vaginální kandidóza

RVVC – recidivující vulvovaginální kandidóza

ATB - antibiotika

DMSO - dimethylsulfoxid

MHB - Müller – Hinton bujón

ATCC - americké sbírkové kmeny (American Type Culture Collection)

GS-MS - plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MIC – minimální inhibiční koncentrace

10 Seznam obrázků

Obr 1: <i>Euodia hortensis</i> J.R.Forst & G.Forst.	12
Obr. 2: <i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms.....	13
Obr. 3: Vybrané struktury monoterpenů.....	17
Obr. 4: Vybrané struktury seskviterpenů.....	17
Obr. 5: Vybraná struktura diterpenů.....	18
Obr. 6: Struktura triterpenů.....	18
Obr. 7: Vybrané skupiny alkoholů.....	19
Obr. 8: Vybrané skupiny fenolů.....	20
Obr. 9: Vybrané skupiny etherů.....	20
Obr. 10: Vybrané skupiny aldehydů.....	21
Obr. 11: Vybrané skupiny ketonů.....	21
Obr. 12: Vybraná skupina esterů.....	22
Obr. 13: Vybraná skupina cyklických etherů.....	23
Obr. 14: Clevengerova aparatura.....	24
Obr. 15: Schéma plynového chromatografu.....	27
Obr. 16: Mapa vyznačených míst sběru rostlin.....	36
Obr. 17: Mikrotitrační destička.....	40
Obr. 18: Inokulátor.....	41

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Souhrnná tabulka – využití rostlin <i>E. hortensis</i> a <i>P. fruticosa</i>	15
Tabulka 2: Druh, datum a lokalita sběru rostlinného materiálu.....	36
Tabulka 3: Výtěžnost silic.....	42
Tabulka 4: Antimikrobiální aktivita <i>E. hortensis</i> a <i>P. fruticosa</i>	43
Tabulka 5: Chemické složení silice <i>E. hortensis</i>	43
Tabulka 6: Chemické složení silice <i>P. fruticosa</i>	44