



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA ANTIMIKROBIÁLNÍCH GELŮ S OBSAHEM ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ A OLEJŮ

PREPARATION OF ANTIMICROBIAL GELS WITH PLANT EXTRACT AND OILS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Markéta Benešová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1501/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Markéta Benešová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
Akademický rok: 2019/20

Název bakalářské práce:

Příprava antimikrobiálních gelů s obsahem rostlinných extraktů a olejů

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úlohy:

- 1) Rešerše – přehled rostlin s potenciálním antimikrobiálním účinkem, aktivní látky
- 2) Příprava rostlinných extraktů a olejů
- 3) Analýza aktivních látek v extraktech a olejích z vybraných rostlin
- 4) Analýze antimikrobiálních a dalších účinků rostlinných extraktů
- 5) Příprava a testování antimikrobiálních gelů s obsahem rostlinných extraktů a olejů

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Markéta Benešová
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium antimikrobiálních vlastností přírodních extraktů a jejich následnou aplikací. Výzkum byl soustředěn na především na antioxidační a antimikrobiální aktivitu rostlinných extraktů a liposomových částic s jejich obsahem. Teoretická část práce byla zaměřena na tematiku přírodních antimikrobiálních a antioxidačních látek, problematika rezistence bakterií, a taktéž seznámení s použitými bylinami, charakteristika gelů a liposomů.

V experimentální části práce byly charakterizovány tři typy extraktů (vodné, ethanolové a olejové), které byly připraveny z 10 různých rostlin. Stanoven byl obsah fenolických látek, flavonoidů a antioxidační i antimikrobiální aktivity.

Následně byly ze všech extraktů připraveny liposomy, u nichž byla stanovena velikost, stabilita, enkapsulační účinnost, antioxidační a antimikrobiální aktivita. Distribuce velikostí byla široká, avšak z hlediska měřeného zeta potenciálu byla většina částic stabilních. Všechny připravené extrakty a liposomy s jejich obsahem byly testovány na jejich antimikrobiální aktivitu. Testy byly provedeny na grampozitivním kmeni *Micrococcus luteus* a gramnegativním kmeni bakterií *Serratia marcescens*. Proti oběma kmenům byly nejúčinnější olejové extrakty eukalyptu a jedle, také olejový extrakt hřebíčku, spolu s vodnými extrakty hořčičného semínka, hřebíčku a jalovce, nebo ethanolového extraktu anýzu vykazovaly vysokou antimikrobiální aktivitu. Na závěr byly extrakty a liposomové částice aplikovány do gelů, které mohou nalézt své využití ve farmaceutickém průmyslu, jako alternativa zevně využívaných antibiotik, nebo v průmyslu kosmetickém.

Klíčová slova

Antimikrobiální aktivita, enkapsulace, liposomy, gely, rostlinné extrakty

Abstract

This bachelor thesis was focused on studying antimicrobial effects of natural plant extracts and their subsequent application. The research was mainly focused on the antioxidant and antimicrobial activity of plant extracts and liposomal particles with their contents. Theoretical part of thesis was focused on the topic of natural antimicrobial and antioxidant substances, problems with bacterial resistance as well as describing features and attributes of used herbs, and characterization of gels and liposomes.

Within the experimental part of thesis, three types of extracts (aquatic, ethanol and oil), prepared from 10 different types of plants, were described. The content of phenolic, flavonoid substances, also antioxidant and antimicrobial activity were then determined.

After that, the contents of all extracts were encapsulated into liposomes, and size, stability, encapsulation activity, also antioxidant and antimicrobial activity of those liposomes were determined. The size distribution was wide, but in terms of the measured zeta potential, most of the particles were stable. All prepared extracts and liposomes containing them were tested for their antimicrobial activity. The tests were performed on a gram-positive genus of *Micrococcus luteus* and a gram-negative type of *Serratia marcescens*. The most effective oil extracts against both species were eucalyptus and fir, as well as oil extract of cloves, along with aqueous extracts of mustard seeds, cloves and juniper, or ethanol extract of anise which also has high antimicrobial effects. Finally, these extracts and liposomes were applied into the gels, which could be found useful in the pharmaceutical industry, as an alternative to externally used antibiotics, or in the cosmetic industry.

Key words

Antimicrobial activity, encapsulation, liposomes, gel, plant extracts

BENEŠOVÁ, Markéta. *Příprava antimikrobiálních gelů s obsahem rostlinných extraktů a olejů*. Brno, 2020. 66 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Petře Matouškové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnovala při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Marii Vysoké za možnost konzultace výsledků a odborné vedení v laboratoři. V neposlední řadě patří mé velké poděkování mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého mého studia.

OBSAH:

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Antimikrobiální látky	10
2.2	Přírodní antimikrobiální látky	10
2.3	Příklady přírodních antimikrobiálních látek	10
2.3.1	Fytoncidy	10
2.3.2	Fenoly, polyfenoly, fenolové kyseliny	11
2.3.3	Silice	12
2.3.4	Chinony	12
2.3.5	Terpeny, terpenoidy	13
2.3.6	Alkaloidy	13
2.4	Metody stanovení antimikrobiální aktivity	14
2.4.1	Diluční metody	14
2.4.2	Difúzní metody	14
2.4.3	Epsilon test	15
2.5	Faktory ovlivňující výsledky stanovení účinku antimikrobiálních látek	15
2.6	Antioxidanty	15
2.6.1	Stanovení antioxidační aktivity	16
2.7	Gely	16
2.7.1	Příprava gelů	17
2.7.2	Dělení gelů	17
2.7.3	Základní vlastnosti gelů	17
2.8	Enkapsulace	18
2.8.1	Liposomy	18
2.8.2	Vybrané metody přípravy liposomů	20
2.9	Metody charakterizace připravených částic	20
2.9.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	20
2.10	Kultivace mikroorganismů	22
2.11	Bakterie	22
2.11.1	Rezistence bakterií	24
2.11.2	Použité bakterie	24
2.12	Využití antimikrobiálních látek	26

2.13	Použité rostliny	26
2.13.1	Acai berry	26
2.13.2	Anýz vonný.....	27
2.13.3	Eukalyptus	27
2.13.4	Hořčičné semínko	28
2.13.5	Hřebíček.....	28
2.13.6	Jalovec obecný.....	29
2.13.7	Jedle	29
2.13.8	Senna	30
2.13.9	Zázvor.....	31
2.13.10	Žen-šen pravý.....	32
3	CÍL PRÁCE	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Použité mikroorganismy.....	34
4.2	Použité chemikálie	34
4.2.1	Přírodní složky do gelů na přípravu extraktů	34
4.2.2	Chemikálie na přípravu extraktů	34
4.2.3	Chemikálie na charakterizaci extraktů	34
4.2.4	Chemikálie na kultivaci mikroorganismů.....	34
4.2.5	Použité chemikálie jako standard	34
4.2.6	Chemikálie na přípravu částic	34
4.2.7	Chemikálie na přípravu gelu.....	34
4.3	Pomůcky a přístroje.....	34
4.4	Příprava extraktů	35
4.4.1	Vodné extrakty	35
4.4.2	Ethanolové extrakty	35
4.4.3	Lipidické extrakty.....	35
4.5	Charakterizace extraktů	36
4.5.1	Spektrofotometrické stanovení celkových fenolických látek.....	36
4.5.2	Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů	36
4.5.3	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS.....	36
4.6	Příprava liposomů.....	37
4.6.1	Příprava liposomů z vodných extraktů	37

4.6.2	Příprava liposomů z ethanolových extraktů	37
4.6.3	Příprava liposomů z lipidických extraktů	37
4.7	Charakterizace liposomů	37
4.7.1	Stanovení velikosti a stability připravených částic	37
4.7.2	Stanovení enkapsulační účinnosti	38
4.7.3	Stanovení antioxidační aktivity liposomů	38
4.7.4	Stanovení dlouhodobé stability	38
4.8	Příprava tekutého média	38
4.9	Kultivace mikroorganismů	38
4.9.1	Testování antimikrobiální aktivity diluční bujónovou metodou	38
4.10	Příprava gelu	39
4.10.1	Testování antimikrobiální aktivity	39
5	PŘEHLED VÝSLEDKŮ A DISKUZE	40
5.1	Charakteristika extraktů	40
5.1.1	Obsah celkových fenolů	40
5.1.2	Obsah celkových flavonoidů	42
5.1.3	Celková antioxidační aktivita	43
5.1.4	Antimikrobiální účinky	45
5.2	Charakteristika liposomů	46
5.2.1	Velikost liposomů	46
5.2.2	Stanovení stability částic	48
5.2.3	Enkapsulační účinnost	49
5.2.4	Antioxidační aktivita	51
5.2.5	Antimikrobiální aktivita	52
5.3	Charakterizace gelů	53
5.3.1	Antimikrobiální aktivita	54
5.4	Shrnutí antimikrobiálních testů	54
6	ZÁVĚR	57
7	ZDROJE	59
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66

1 ÚVOD

Během života se každý člověk setká s bakteriálními infekcemi, jak už u sebe samotného, tak i u člověka jemu blízkého. Bakteriální infekce patří k nejčastějším onemocněním.

Medicína se naučila proti bakteriálním, i jiným typům infekcí bránit, dokázala je zneškodnit pomocí antibiotik. Antibiotika jsou látky s protizánětlivým charakterem, které dokáží onemocnění potlačit, či úplně zničit. Avšak stejně jako moderní medicína, tak i bakterie se dokáží velmi rychle vyvíjet, proto dokáží mikroorganismy získat rychle rezistenci vůči synteticky připraveným antibiotikům. Z tohoto důvodu výzkum k výrobě antibiotik musí také pokročit dále.

Rostlinné organismy se už odpradáva dokázaly bránit proti mikroorganismům i proti UV záření. Proto se vědci při návratu k přírodě, rozhodli využít tyto látky a následně je aplikovat do každodenních životů v podobě kosmetiky, obohacení potravin nebo přírodních antibiotik.

Přírodní extrakty přináší široké spektrum výhod. Na rozdíl od synteticky připravených antibiotik nemají tolik vedlejších účinků, jako jsou bolest hlavy, nevolnost, střevní potíže, nerovnováha střevní mikroflóry, postižení jater nebo ledvin. Sice mohou alergizovat, ale tím, že lidé jsou schopni zjistit na jaké typy látek, ať už přírodní či syntetické, jsou alergičtí, budeme schopni tuto složku nahradit jinou přírodní alternativou. Jako další důležitý aspekt můžeme vyzdvihnout snadné odbourávání přírodních látek oproti syntetickým. Když přírodní složka není dostatečně silná, je možné ji zkombinovat se syntetickým antibiotikem, které může buď účinek znásobit, popřípadě rostlina dokáže zredukovat negativní vliv na naše tělo.

Díky moderní vědě jsme schopni izolovat jednotlivé účinné složky z rostlinných extraktů, následně je analyzovat, případně aplikovat.

Bakalářská práce se zaměřuje na práci s nejběžnějšími rostlinnými účinnými složkami, tudíž s polyfenoly a flavonoidy. Jedná se o nejčastější antioxidanty s antimikrobiálním účinkem. Tyto látky byly izolovány v podobě extraktů, jež byly následně zpracovány a testovány. Tyto extrakty mohou být s největší pravděpodobností aplikovány do farmaceutického a kosmetického průmyslu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Antimikrobiální látky

Antimikrobiální látky jsou látky účinkující proti mikroorganismům, jako jsou bakterie, houby, viry, parazitů. Tyto látky zahrnují např. antibiotika, chemoterapeutika, virostatika, antivirotika, antiseptika aj. [1]. Tyto látky se vyznačují schopností inhibovat růst těchto mikroorganismů. Dělí se podle své aktivity na antibakteriální, antiparazitické a antivirové [2,3].

2.2 Přírodní antimikrobiální látky

Většina rostlin má schopnost si vyrábět různé chemické látky, které určitým způsobem ovlivňují živé organismy, využívají se např. k obraně proti mikroorganismům, hmyzím škůdcům, býložravcům. Do této skupiny látek patří například fenolické látky a polyfenolické sloučeniny, také flavonoidy, silice nebo třísloviny, které mohou mít vliv i na rostlinnou vůni, popřípadě zbarvení [3].

Tyto účinné složky rostlin se mohou vyskytovat v celé její struktuře, nebo jen v specifických částech, nadzemních (květy, listy apod.) i podzemních (kořen, hlíza apod.). Funkce sloučenin je ovlivněna strukturou, funkčními skupinami, taktéž synergickými a antagonistickými interakcemi těchto komponent [3].

Podle účinku na bakterie můžeme antimikrobiální látky dělit na baktericidní, kam se zařazují např. β -laktamy, glykopeptidy nebo chinony, a bakteriostatické, mezi něž patří kupříkladu makrolipidy, sulfonamidy či tetracykly. Baktericidní látky bakterie usmrcují, zatímco bakteriostatické pouze inhibují jejich růst. Dále tyto látky dělíme podle účinku na mikroorganismus, podle místa primárního zásahu, kdy může být narušena buněčné stěny, funkce cytoplazmatické membrány, syntéza nukleových kyselin, proteosyntéza nebo syntéza kyseliny listové [4].

2.3 Příklady přírodních antimikrobiálních látek

Jakým způsobem účinkují tyto antimikrobiální látky není zcela známo. Mechanismy jsou velmi složité [2].

2.3.1 Fytoncidy

Látky jako fytoncidy rostlinného původu mající léčivé účinky, bývají označovány také jako rostlinná antibiotika. Mají antimikrobiální schopnosti, brání růstu mikroorganismů. Jedná se o látky, které jsou toxické pro plísňe, bakterie a prvoky. Jsou to velmi účinné látky, které se nachází v rostlinných pletivech vybraných druhů vyšších rostlin, kde plní obrannou funkci [5].

Sušením se fytoncidy rozkládají. Příklady mohou být alicin, různé silice, tomatin, lupulin, azulen, akylisothiokyanáty [5,6].

Fytoncidy jsou zařazeny do skupin biocidů. Biocidní přípravky jsou látky nebo směsi, které obsahují jednu nebo více účinných látek. Jsou určeny k hubení, odpuzování

a zneškodňování škodlivých organismů, zabránění a regulaci jejich působení jiným způsobem než fyzickým nebo mechanickým působením [5,6].

Mezi léčiva, která obsahují fytoncidy se řadí některá antidiabetika (mají podpůrný účinek při léčbě cukrovky; účinná látka se vyskytuje např. v listu borůvky černé, listu vachaty trojlisté, nati jeřabiny lékařské, aj.), antiflogistika (protizánětlivá léčiva pro zevní použití; účinné látky se vyskytují například v květu heřmánku pravého, měsíčku lékařského, nati třezalky tečkované...), antihidrotika (látky snižující pocení; účinná látka např. v listu šalvěje lékařské, nati yzopu lékařského, v kůře dubu), antireumatika, antisklerotika, diaforetika a mnoho dalších [6].

2.3.2 Fenoly, polyfenoly, fenolové kyseliny

Fenoly se v organické chemii označují jako sloučeniny obsahující hydroxylovou skupinu přímo navázanou na aromatické jádro. Označují se jako analogy alkoholů se specifickými vlastnostmi. V přírodě se hojně vyskytují v rostlinné říši, například v listech některých zástupců jako ochrana proti býložravcům, dále v plodech borůvek, ostružin, angreštu, rybízu, rozinek a dalších (bohaté na flavonoidy). Do skupin rostlinných fenolů patří např. třísloviny, deriváty kurminu, prenylované flavonoidy, deriváty stilbenu. Tyto látky využíváme jako vonné látky, chuťové látky (způsobují trpkou chuť) a přírodní barviva (chinony, flavonoidy apod.), jako analgetika (kyselina salicylová), fenolová barviva mají barevnost od červené k tmavě purpurové (zbarvení různých plodů jako jsou jablka, borůvky, brusinky apod.) [2,7].

Polyfenoly jsou fenoly, které obsahují více než jednu fenolovou jednotku v molekule. Do této skupiny řadíme estery kyseliny gallové, glukózy i jiných cukrů, lignany, flavonoidy, třísloviny a mnoho dalších. Obecně se dělí na hydrolyzovatelné taniny a fenylpropanoidy [2,7].

Je dokázáno, že počet hydroxylových skupin ve struktuře fenolových molekul velmi úzce souvisí s jejich antioxidační a antimikrobiální aktivitou, také zvýšená hydroxylace je přímo úměrná jejich toxicitě [2].

2.3.2.1 Flavonoidy

Jedná se o hydroxylované, aromatické, fenolické sloučeniny, jejichž základ je heterocyklická sloučenina flavan. Flavan je tvořen dvěma benzenovými kruhy, které jsou propojeny heterocyklickým pyranem. Řadíme je mezi polyfenoly s velkou antioxidační a antimikrobiální aktivitou. Pravdou je, že se svými vlastnostmi velmi liší od většiny polyfenolických látek, proto se místy zapisují jako samostatná skupina. Na antioxidační aktivitu má největší vliv počet a umístění hydroxylových skupin v molekule [2,8].

Jejich antimikrobiální aktivit se odvíjí od degradace buněčné stěny mikroorganismů nebo její rozrušování. Tento děj způsobuje interakce flavonoidů s extracelulárními proteiny právě v buněčné stěně mikroorganismů [2,8].

Mezi významné zástupce patří například netoxický rutin, různé katechiny (z čajových listků). Hojně se vyskytují také ve víně, v čokoládě (kakao), v borůvkách (rutin), citrusových plodech (citrín), v plodech ostropestřce mariánského, černého jeřábu. Flavonoidy v ostružinách mají silné antioxidační účinky, stejně jako v malinách, lékořici, černém rybízu, granátovém jablku, olivách, rajčatech a mnoha dalších [8,9,10].

2.3.2.2 *Třísloviny*

Třísloviny (taniny) patří do skupiny polymerních fenolových sloučenin. Třísloviny se vyskytují v potravinách rostlinného původu. Reagují s bílkovinami v ústní dutině za vzniku sraženin, které způsobují typickou trpkou chuť [11,12].

Chemicky jsou děleny na hydrolyzované (estery kyseliny galové, nazývány polygalloylestery), které se dále dělí na gallotaniny (hydrolyzou vzniká jen kyselina galová) a ellagotaniny (vzniká kyselina ellagová a případně i kyselina galová), a kondenzované (polymery některých flavonoidních látek). Kondenzované vznikají kondenzací monomerních flavonoidů [11,12,13].

Třísloviny se vyskytují např. v bobulovinách (i jiných druzích ovoce, jako granátové jablko), ve vlašských ořeších, kávových a kakaových bobech, v listech yzopu, tymiánu, šalvěji lékařské, vavřínu, v luštěninách, hlavně v zeleném čaji (čaj obsahuje i jiné látky, které způsobují trpkou chuť, jako jsou například katechiny). Také se vyskytují v listech rostlin, v nezralých plodech, kde složí jako zdroj energie. Třísloviny chrání svoje nositele před hmyzem, houbami a plísněmi [13,14].

Tyto látky jsou velmi chemicky různorodé, což zapříčiňuje různorodost i ve fyziologických účincích. Většina z nich funguje jako antioxidanty. Některé mají protizánětlivé a protialergické účinky. Některé mají v trávicím ústrojí detoxikační účinky, působí proti bakteriím, virům i střevním parazitům, podporují velmi pozitivně trávicí procesy, taktéž působí pozitivně na krevní oběh, také působí antisepticky. Řadí se mezi přírodní antibiotika, která se často využívají při onemocnění trávicího traktu, i při léčbě kožních poranění. Údajně je přímá úměra mezi trpkostí a léčivými účinky, čím je rostlina trpká, tím má silnější léčivé účinky [14].

Také ale patří do antinutričních látek, při nadměrné konzumaci způsobují nižší využitelnost bílkovin a minerálních látek [11,12].

2.3.3 *Silice*

Mezi silice se řadí přírodní těkavé organické lipofilní směsi látek, které mají intenzivní vůni, tuto vlastnost umocňují terpenické složky, palčivé chuti. Značně rozpustné v organických rozpouštědlech (benzen, chloroform, alkoholy, benzín) a nerozpustné ve vodě. Patří k léčivům rostlinného původu. Silice mohou prostupovat celou rostlinou, také se mohou koncentrovat jen v některých částech rostlin (jako v plodech, listech apod.). Většina je bezbarvá, někteří zástupci jsou ale zbarveny přirozeně (silice z hřebíčku je žlutě zbarvená, heřmánkové silice jsou zelené až modré), vyskytují se převážně v kapalném skupenství olejové struktury, některé částečně tuhnou [15,16].

Mohou být tvořeny terpeny, aldehydy, ketony, estery nebo sekviterpeny, fnylpropanoidy. Nejvíce je studována antimikrobiální aktivita silic z kořenových částí rostlin, hlavně inhibiční účinky růstu mikroorganismů, hlavně s obsahem carvarcolu, cineolu, eugenolu a thymolu. Mají široké využití v léčbě infekcí, jako alternativa antibiotik, také desinfekční účinky a antiseptické [15,16].

Získáváme je obvykle destilací s vodní parou, kondenzací a oddělení fází [16].

2.3.4 *Chinony*

Řadí se mezi přírodní barviva, která se vyskytují jako deriváty benzochinonů, naftochinonů, antrachinonů a jiných [17].

Jedná se o reaktivní sloučeniny s aromatickou strukturou, která je substituovaná karboxylovými kyselinami. Jejich antimikrobiální aktivita spočívá v tom, že se vážou na nukleofilní aminokyseliny v mikrobiální buňce a tvoří s nimi komplexy, to zapříčiní jejich inaktivaci a ztrátu funkce. Dále pravděpodobně reagují s povrchovými adheziny, polypeptidy buněčné stěny a enzymy na membránových obalech [2]

2.3.5 Terpeny, terpenoidy

Terpeny tvoří vonnou složku rostlinných pryskyřic a silic, jejichž základ tvoří isopren, který je pak lineárně spojován do struktury terpenů, kam patří i karotenoidy (tetratereny). Slouží převážně k odpuzování býložravců. Mají nízkou teplotu varu, jsou a prchavé. Do terpenoidů patří terpeny, které obsahují heterogenní kyslík. K nim se řadí např. kafr, menthol, farnesol, artemisin apod. Cyklizací terpenů vznikají steroidy [2,18].

Terpeny jsou značně lipofilní látky, mohou se vázat na cytoplazmatickou membránu mikroorganismů (jako jsou bakterie, sinice, popřípadě viry) a narušují jejich iontovou rovnováhu, tím zabrání přirozené funkci membránových lipidů, což může vést až k buněčné smrti. Toto tvrzení je stále testováno, ale studie dokazují, že znemožňují růst mikroorganismů [18,19].

Z přírodních zdrojů je získáváme extrakcí s nepolárním rozpouštědlem (př. ether) a následnou destilací s vodní parou [20].

2.3.6 Alkaloidy

Alkaloidy patří do skupiny heterocyklických dusíkatých sloučenin, které mají značné farmakologické účinky využívané v medicíně. Vyznačují se značně alkalickým charakterem, který způsobuje volný elektronový pár na dusíku. Vyskytují se v rostlinách jako soli organických kyselin jako jsou soli kyseliny vinné, jablečné šťavelové, octové, mléčné, jantarové a mnoha dalších, ze kterých se uvolňují působením silnější báze. Mají podobu převážně jako bezbarvé krystalické látky bez chuti a zápachu, které jsou špatně rozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v organických rozpouštědlech (v alkoholech, chloroformu, éteru ve směsích organických rozpouštědel). Strukturně se podobají biogenním aminům, což jsou převážně neurotransmitery. Ovlivňují metabolismus (urychlují, popřípadě tlumí nervový přenos), při vyšších dávkách jsou toxické. Při dlouhodobé expozici do organismu vzniká tolerance, musí se neustále zvyšovat dávky [2,16,21].

Neheterocyklické alkaloidy se strukturně i vlastnostmi podobají na adrenalin a noradrenalin, značně působí na centrální nervovou soustavu. Nazýváme je amfetaminy, prezentuje je například mezkalin (euforikum a analeptikum), methylamfetamin (droga pervitin, analeptikum), 3,4-methylendioxyamfetamin (extáze, euforikum), efedin (využívá se k léčbě astmatu [16,21].

K heterocyklickým se řadí tropanové alkaloidy, konkrétně antipin (způsobuje rozšíření zornic při aplikaci do očí, tlumení křečí hladkého svalstva) a kokain, pyridinové alkaloidy jako je nikotin a ricinin, piperidinové alkaloid, cholinové alkaloidy (např. chinin) a mnoho dalších [21].

K dalším významným zástupcům patří morfin (indolové alkaloidy), který byl izolován z máku, diterpenoidní alkaloidy, extrahovatelné z pryskyřníku s hojnou antimikrobiální

aktivitou, nebo také kofein izolovaný z kávových zrn. Také glykoalkaloid solamargin, využívan při léčbě HIV infekce, beberin s antimikrobiální aktivitou [2,16].

2.4 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Při testování používáme mikroorganismy ve vhodně zvolených kultivačních médiích. Metody na stanovení antimikrobiální aktivity dělíme na difúzní (kvalitativní metody) a diluční (kvantitativní metody) [22,23].

2.4.1 Diluční metody

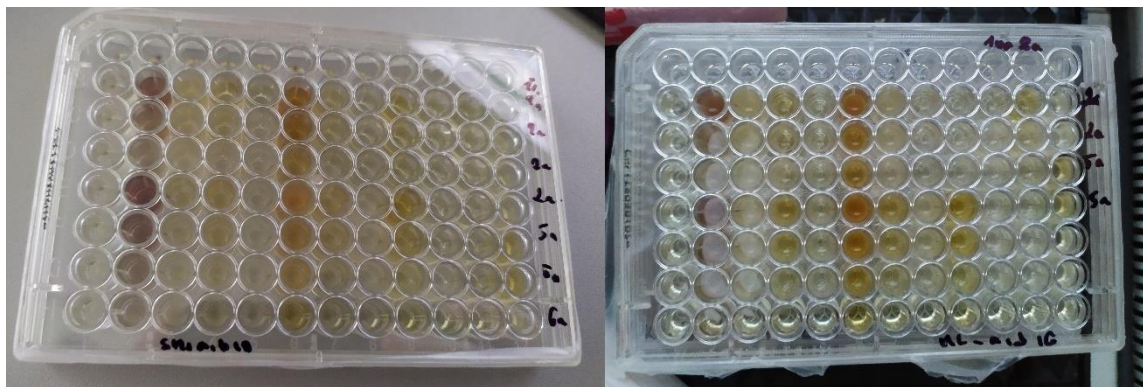
Tyto metody jsou převážně využívány na kvalifikace a určení tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC), která určuje nejnižší koncentraci látky, která inhibuje růst testovaného mikroorganismu. Pozoruje se růst, nebo pozastavení růstu, mikroorganismů. K přesnému stanovení je potřeba znát přesné množství přidané testované látky [22,23].

2.4.1.1 Agarová diluční metoda

Tato srovnávací metoda se snaží najít MIC tak, že je použita antimikrobiální látka o různé koncentraci. Tato látka je pak postupně přidávána do pevného média, kde jsou zaočkovány zkoumané kmeny bakterií. Po inkubaci je hledána nejnižší koncentrace testované látky, která způsobuje zatavení růstu mikroorganismů na mediu [22,23,24].

2.4.1.2 Bujónová diluční metoda

K této metodě se využívá buď řada zkumavek, nebo mikrotitrační destičky, do nichž je napipetováno médium spolu s klesající koncentrací antimikrobiální testované látky. Testování probíhá v daném testovacím časovém úseku (např. 24 hodin) a následně se hledá nejnižší koncentrace, která prokázala inhibici růstu mikroorganismů. Výsledek můžeme získat tak, že nevznikne zákal nebo sediment, který poukazuje na růst mikroorganismů. Pozorování inhibice růstu provádíme pomocí měření absorbance, turbidimetricky, pomocí průtokové cytometrie nebo vizuálně [22,23,24].



Obrázek 1: Připravené mikrotitrační destičky

2.4.2 Difúzní metody

Tyto metody patří mezi kvalitativní metody určení antimikrobiální aktivity. Provádí se převážně na pevném agaru, na který je aplikována antimikrobiální látka, která difunduje do okolí s klesajícím koncentračním gradientem. Vznikají tzv. inhibiční zóny, to jsou místa, kde dochází k pozastavení růstu mikroorganismů. Tyto metody jsou oblíbené pro svoji jednoduchost, také se dají provést poměrně rychle [22,23].

2.4.2.1 Difúzní disková metoda

Princip této metody spočívá v tom, že do agarového média jsou nejdříve naočkována testovaným druhem bakterií, o známé koncentraci. Na kultivovaném médiu je aplikován papírový disk, který byl napuštěn testovanou antimikrobiální látkou. Když médium začne uvolňovat vodu, látka bude z disku difundovat do okolí a bude vytvářet tzv. zónu inhibice, jak už bylo zmíněno výše. Látka se bude difundovat do okolí s klesajícím koncentračním gradientem [22,23].

Papírový disk můžeme napustit touto látkou o různé koncentraci, tím můžeme získat i účinné koncentrace [22,23].

2.4.2.2 Agarová difúzní metoda

Princip této metody je na téměř stejné bázi jako u předchozí metody, jediný rozdíl spočívá v tom, jak se aplikuje antimikrobiální látka. V agaru jsou předem vytvořené jamky, do kterých je následně aplikována tato látka. Opět vznikají oblasti, kde můžeme pozorovat zastavení růstu mikroorganismů. Antimikrobiální testovaná látka se může aplikovat v různých koncentracích, za účelem poznatku MIC [22,23,24].

2.4.3 Epsilon test

Epsilon test, jinak řečeno E-test, kombinuje jako diluční, tak i difúzní metodu stanovení antimikrobiální aktivity. Značně se podobá difúzní diskové metodě, až na to, že jsme tady schopni určit MIC. Stejně jako u difúzní metody, je agar kultivován konkrétním druhem bakterií o známé koncentraci. Na agar je aplikován E-testový proužek, který na svých okrajích vytváří koncentrační gradient zkoumané účinné látky. Testování provádíme po určitou inkubační dobu, po kterou se účinná látka uvolňuje do agaru a dojde k inhibici růstu bakterií. Výsledná inhibiční zóna má tvar elipsy. MIC se zjišťuje v místě, kde se protíná okraj testovacího proužku s okrajem vytvořené zóny pozastaveného růstu [25].

2.5 Faktory ovlivňující výsledky stanovení účinku antimikrobiálních látek

Na výstup jednotlivých metod má vliv mnoho faktorů, ke kterým patří např. pH, teplota (vliv na kultivaci bakterií), obecně podmínky kultivace bakterií, kvalita živého média, obsah minerálů a různých solí, rychlost difúze účinné látky, záleží i na její fyzikální a chemické povaze, její koncentrace i koncentrace bakteriálních buněk. Velký vliv má i rozpustnost látek, většina je hydrofobních, proto bývají rozpouštěny v etanolu [26].

2.6 Antioxidanty

Tyto látky jsou v organismech přítomné, aby zabránily negativnímu působení volných radikálů na buňky, tím zabraňují působení oxidačního stresu. Radikály nazýváme velmi reaktivní molekuly s jedním či více nepárovými elektrony. Chemický radikál označuje látku, která zvyšuje oxidativní charakter jiných molekul, a tím i posiluje redoxní reakce v organismu. Proces funguje tak, že na místo nepárového elektronu se váže molekula kyslíku, z níž následně vzniká peroxylový radikál snažící se z jiné molekuly získat chybějící elektron, tím vznikají radikály nové. Oxidační stres je stav, kdy v těle převažují volné radikály nad antioxidanty [27].

Přes všechny výhody, i přemíra antioxidantů může škodit, neboť mohou zabraňovat přirozeným oxidačním procesům v těle [27].

Antioxidanty jsou buď v organismu syntetizovány (enzymy, neurohormony), nebo jsou přijímány spolu s potravou. Přijímané oxidanty mohou být přirozené, vyskytující se v přírodě o nižších koncentracích, nebo syntetické, které mohou být syntetizovány uměle [27,28].

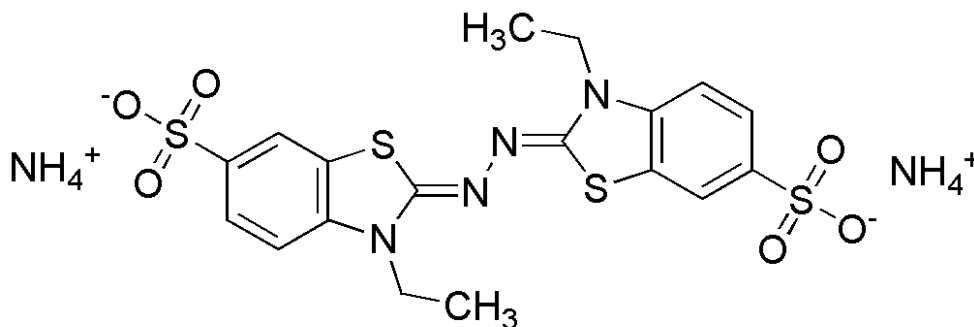
Antioxidanty v potravinách shledáváme spíše pozitivně, prodlužují trvanlivost potravin a snižují pravděpodobnost onemocnění kardiovaskulárního systému [27].

Mezi nejčastější antioxidanty jsou řazeny vitamíny, mezi nejznámější patří vitamíny A, E, C a B3, také karotenoidy, flavonoidy, třísloviny, fenolické antioxidanty, antioxidanty podobné aminokyselinám, jako jsou glutation a taurin, a mnoho jiných [27,28].

2.6.1 Stanovení antioxidační aktivity

Při stanovení celkové antioxidační aktivity byla použita metoda TEAC, kde si pomáháme peroxidázovým substrátem (ABTS). ABTS reaguje s peroxidem H_2O_2 za tvorby radikál kationtu $ABTS^{\cdot+}$. Tento radikál kation nabývá zelenomodrého velmi intenzivního zbarvení, které můžeme stanovit spektrofotometricky. Zbarvení pozorujeme při vlnové délce 734 nm, kde se nachází jeho maximum absorpance [29].

Trolox patří k syntetickým derivátům, který se využívá jako standard v TEAC ke stanovení celkové antioxidační aktivity. Jedná se o analog vitamínu E rozpustný ve vodě. Proto antioxidační aktivitu vzorku vyhodnocujeme jako ekvivalent Troloxu. Velice výhodné je, že můžeme zhodnotit jak hydrofilní, tak i lipofilní antioxidanty, neboť $ABTS^{\cdot+}$ není ovlivněno iontovými silami a může být rozpuštěno jak ve vodě, tak i organickém rozpouštědle [29].



Obrázek 2: Molekula ABTS [30]

2.7 Gely

Gely jsou koloidní systémy, které vytváří trojrozměrnou souvislou síť, která prostupuje disperzním prostředím. Jedná se tedy o koloidní disperze. Velikost částic v systému se pohybují od 1 do 500 nm, ale některé zdroje uvádějí až 1000 nm. Disperzní prostředí může tvořit až 99,9 % celého gelu, zbytek je sušina. Celý systém je spojitý, jak disperzní prostředí, tak i dispergovaná fáze. Pohyb sítě je velmi limitován a závislý právě na disperzním prostředí. Celá pohyb sítě je omezen na vibrační pohyb, částice se nemohou pohybovat volně celou sítí [31,32].

Disperzní prostředí se také označuje jako lyogel, vysušením (odstraněním disperzního prostředí) lyogelu vzniká xerogel (sušina). Sušina, nebo také pevný podíl gelu, tvoří většinou asi kolem 0,1 % celého koloidního systému [31,32].

2.7.1 Příprava gelů

Gely vznikají tzv. gelací. Tento proces spočívá v tom, že se jednotlivé koloidní částice, které vytváří disperzní podíl, spojují v trojrozměrnou souvislou síť a postupně se zpevňují v gel [31,32].

Gely můžeme připravit změnou fyzikálních podmínek v soustavě, chemickou reakcí nebo bobtnáním. Změna fyzikálních podmínek pod sebou zahrnuje změnu teploty, pH, nebo velký vliv má i rozpustnost určitých látek v různých rozpouštědlech. Změnou fyzikálních podmínek připravujeme tzv. fyzikálně síťované gely [31,32].

Chemickou reakcí tvoříme tzv. kovalentně síťované gely, které jsou mnohem pevnější a rigidnější než fyzikálně síťované gely, což je způsobeno mnohem silnějšími vazbami mezi částicemi v gelu. Zatímco ve fyzikálně síťovaných gelech se převážně uplatňují pouze ne vazebné interakce, v chemicky vázaných gelech vzniká pevná vazba [31,32].

Bobtnáním vznikají tzv. hydrogely. Hydrogely jsou gely, jejichž disperzní prostředí je tvořeno vodou. Když je hydrogel ve vysušeném stavu a tvoří xerogel, je schopen pojmout velké množství tekutiny. Tento proces je ale podmíněn tím, že se musí jednat o tzv. reverzibilní hydrogely [31,32].

2.7.2 Dělení gelů

Gely nejčastěji dělí podle jejich chování ve vysušeném stavu. Tedy, když odstraníme jejich disperzní prostředí (lyogel) za vzniku sušiny (xerogel). Podle tohoto kritéria se dělí na reverzibilní a ireverzibilní gely [31,32].

Reverzibilní gely po vysušení značně změní svůj objem, vzniknou z nich kompaktní xerogely. Při styku s původním disperzním prostředím opět zvětší svůj objem a vrátí se do původního stavu. Vzniká gel bobtnáním. Tyto gely vznikají gelací roztoků lineárních polymerů, nebo právě bobtnáním xerogelu [31,32].

Ireverzibilní gely po vysušení disperzního prostředí příliš svůj objem nemění, jsou porézní. Při opětovném styku s disperzním prostředím jsou sice schopny část kapaliny absorbovat, ale nevrátí se do původního stavu. Přeměna tohoto typu gelu na sušinu je nevratná. Tento typ vzniká gelací lyofobních solů [31,32].

Gely se dají dělit i podle jiných kritérií. Mohou se dělit podle chemického složení disperzního podílu na anorganické a organické. Podobně tak můžeme dělit podle chemického složení disperzního prostředí, na tzv. hydrogely, u kterých je disperzním prostředím voda, jak už bylo zmíněno výše, a na tzv. organogely, kde disperzní prostředí je tvořeno organickou kapalinou. Dále jsou tu také izogely, což jsou makromolekulární gely, v nichž je disperzní prostředí monomerním disperzním podílu (např. polystyren ve styrenu) [31,32].

2.7.3 Základní vlastnosti gelů

Gely se chovají jako elastická tuhá tělesa, přestože jejich disperzní prostředí má kapalně skupenství. Díky svému charakteristickému uspořádání mají podobný charakter jako tuhá tělesa. Tuhý stav si uchovávají d určité hodnoty tečného napětí (tzv. kritického napětí). Na pevnost celé sítě má velký vliv pevnost a počet vazeb v systému. Čím je více vazeb ve struktuře polymeru, tím méně je možné, aby se měnil tvar soustavy. Čím méně má v sobě vazeb, tím je elastičtější [31,32].

Další vlastnost je jejich elektrická vodivost a jejich difuzivita. V trojrozměrné struktuře gelu se mohou ionty pohybovat stejně rychle jako v odpovídajícím solu. Difuzivita nízkomolekulárních látek je o něco menší než v původním solu, z něhož vznikl gelací příslušný gel za zvětšení viskozity. Nižší difuzivitu způsobuje právě tato prostorová síť [31,32].

Gely podléhají stárnutí, nastává u nich synerze. Synerze označuje děj, při němž dochází k smršťování struktury gelu a následnému vytékání kapaliny, odmísí se od gelu. Celá struktura se smršťuje v důsledku s růstem počtu spojů ve struktuře, a pro kapalinu již není dostatek místa. Synerze je podporována zvyšováním teploty a přidavkem elektrolytů [31,32].

2.8 Enkapsulace

Enkapsulace, neboli zapouzdření, je děj, při němž dojde k obalení aktivní látky do nosného materiálu, vytvoří se malá kapsule. Kapsule vytváří hranici mezi svým vnitřním obsahem a okolním prostředím. Tento děj velmi usnadňuje transport aktivních látek na místo určení. K uvolňování dochází pozvolna za určitých podmínek, jako je např. koncentrační gradient [33,34].

Enkapsulace aktivních látek se využívá v mnoha odvětvích průmyslu, jako je farmaceutický, potravinářský i kosmetický. Enkapsulace účinných látek je z hlediska manipulace s nimi mnohem výhodnější. Jelikož se vytvoří obal, tak jsou látky chráněny proti vlivům vnějšího prostředí a následné degradaci, pokud jsou méně stabilní, jejich dávkování je kontrolované a přesnější, enkapsulované látky jsou stabilnější, můžeme je stabilizovat již během procesu výroby, a tím jsou i lépe skladované [33,34].

2.8.1 Liposomy

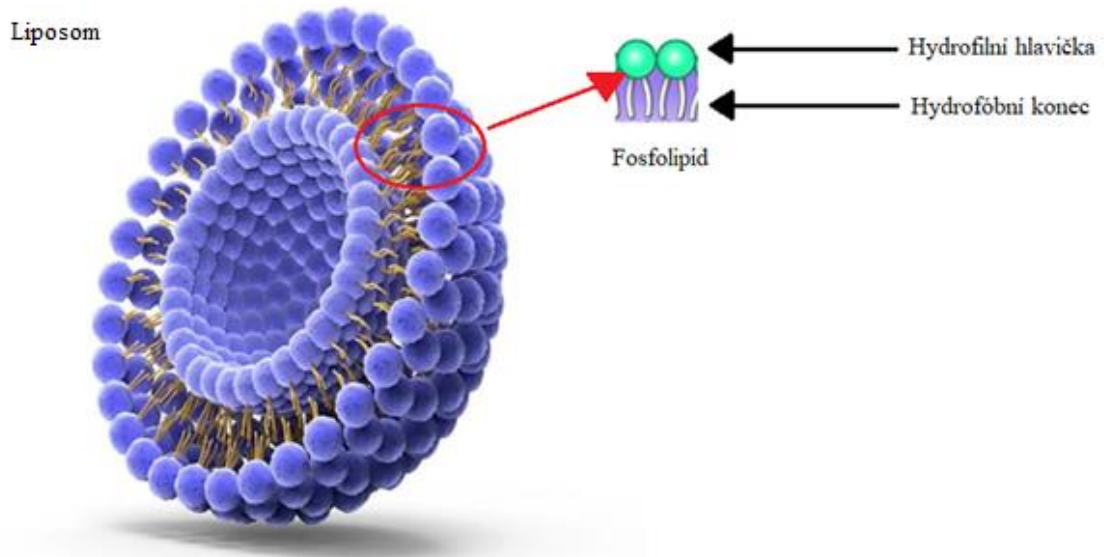
Liposomy definujeme jako uměle vytvořené útvary, které se strukturou velmi podobají na buněčnou membránu. Je to dutina, která je obklopena dvojitou vrstvou fosfolipidů, v jejíž struktuře se vyskytují i molekuly cholesterolu, které mají vliv na fluiditu celého systému. Liposomy se tvoří díky hydrfilně-hydrofobním interakcím v rámci molekuly fosfolipidu, a také díky tvaru samotného fosfolipidu. Fosfolipid se skládá z hydrofilní hlavy a dvou mastných hydrofobních nohou. Tyto dva faktory umožňují vytvoření různě velkých liposomálních struktur o velikosti 30 nm až několik milimetrů [34,33].

Tyto částice vyrábíme pomocí ultrazvuku, odpařováním na tenké vrstvě, táním nebo metodou střídavého zmrazování a rozmrazování, hydratací lipidového filmu, injekčním vstříkáním nebo přidáním nějakého detergentu [33,34].

Liposomy dělíme podle několika základních kritérií, a to podle lamelarity, velikosti, náboje a dalších charakteristik. Příklady mohou být vícevrstevné liposomy, jednovrstevné liposomy, dále je například konvenční typ liposomu, stealth liposomy (skryté, jsou obaleny vrstvou nějakého polymeru nebo nějakým proteinem), liposomy, které nesou kladný náboj, a mnoho dalších. Existuje široká škála možných druhů [34].

Využití je široké, díky jejich schopnosti uchovávat ve svém objemu aktivní látky, čehož využíváme v medicíně, kosmetice. Právě proto jsme schopni obohatit produkty o antimikrobiální, či antioxidační látky, lépe je zacílit na konkrétní buňky a také ovlivnit délku uvolňování účinných látek, nebo také prodloužit jejich životnost, neboť se jedná o látky velmi nestabilní. Velkou výhodou je jejich schopnost hydratace pokožky, která se využívá v krémech proti stárnutí, nebo na spáleniny [33,39].

Enkapsulovat je možné jak látky hydrofilní, tak i hydrofobní, což je možné díky tzv. amfifilnímu charakteru fosfolipidových částic. Amfifilní charakter vyjadřuje hydrofilní a zároveň hydrofobní schopnosti, které v sobě kombinuje právě jedna molekula. Látky, které chceme enkapsulovat a jsou hydrofilní, tak se umístí do vnitřního prostoru liposomu, zatímco hydrofobní látky jsou umístěny do fosfolipidové dvojvrstvy, mezi hydrofobní konce molekul [34].

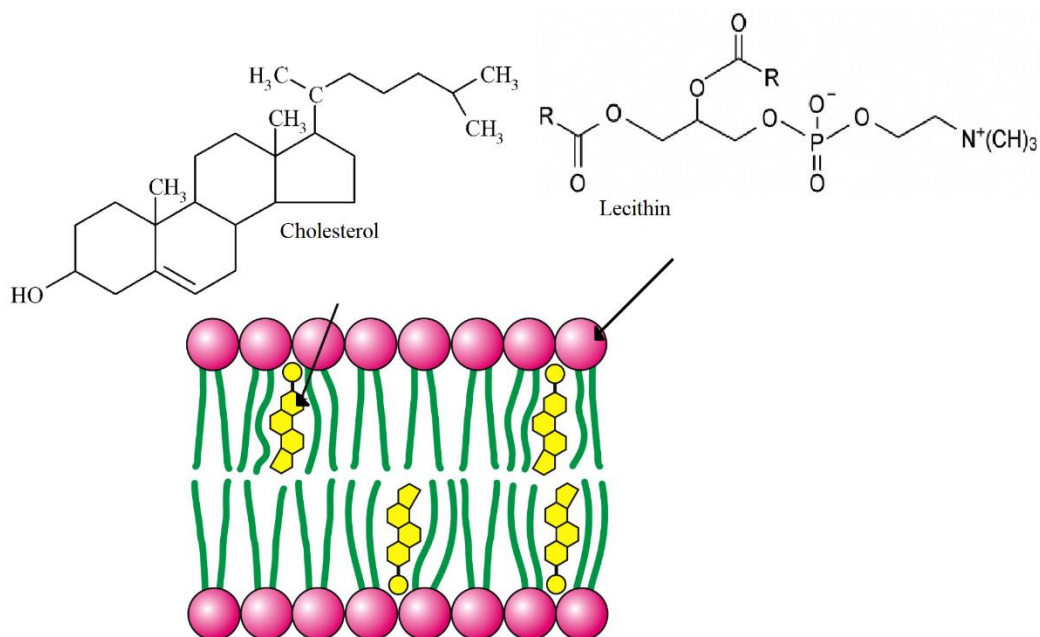


Obrázek 3: Schematický obrázek liposomu a fosfolipidu (inspirováno: [35,36])

2.8.1.1 Lecithin (1,2-diacyl-glycero-3-fosfocholin) a cholesterol

Lecithin získáváme alkoholovou extrakcí, především z vaječných žloutků, popřípadě jako náhrada se využívají sójové boby, slunečnice nebo řepka. Jedná se o jednu z hlavních složek biologických membrán, kterou využíváme na výrobu liposomů. Řadíme ho mezi přírodní povrchově aktivní látky s širokým využitím [40].

Cholesterol je zástupcem steroidů, jež je velmi důležitou složkou živočišných membrán. Největší vliv má na jejich fluiditu (tekutost), přičemž se v membráně nachází vedle molekul fosfolipidů. Také je prekurzorem steroidních hormonů, například ve vaječném žloutku, mozku, mléku, také ve svalovině [34,40].



Obrázek 4: Cholesterol a lecithin ve fosfolipidové membráně - schéma [37,38]

2.8.2 Vybrané metody přípravy liposomů

Liposomy můžeme připravit mnoha způsoby, přičemž principi přípravy je velmi podobný. Společný rysem je, že se vytvoří kapička dané aktivní látky, která je následně obalena (je enkapsulována) do nosiče. Technikou přípravy ovlivňujeme druh a celkové vlastnosti vytvořeného liposomu [39].

2.8.2.1 Ultrazvuková metoda

Pomocí této metody připravujeme unilamelární liposomy, které můžeme připravit dvěma způsoby. Je možné použít sonifikační sondu, která je výhodnější pro menší objemy, nebo sonifikaci liposomů v sonifikační vodní lázni [41,42].

2.8.2.2 Odpařování na tenké vrstvě

Princip této metody spočívá ve vakuovém odpařování organického rozpouštědla z varné baňky. Pro lepší výsledky se rozpouštědlo v přítomnosti enkapsulované látky, což je výhodné hlavně u hydrofobních látek. Při odpaření rozpouštědla vznikne tenký fosfolipidový film na stěnách varné baňky. Tento film se následně opět hydratuje, ale tentokrát ve vodném prostředí. Pomocí následného třepání se tenký film promění na multilamelární částice [42].

2.9 Metody charakterizace připravených částic

Je velmi důležité znát charakteristiky připravených liposomů, hlavními informacemi jsou např. enkapsulační účinnost, stabilita, popřípadě velikost částic [43].

2.9.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Účinné látky mohou být enkapsulovány buď do vnitřního prostoru liposomu, nebo do jeho obalu, jeho fosfolipidové dvojvrstvy, podle hydrofilního nebo hydrofobního charakteru enkapsulované látky. Tzv. enkapsulační účinnost označuje množství enkapsulované látky do struktury vezikulu oproti předchozímu množství aktivní látky. Tato účinnost se většinou

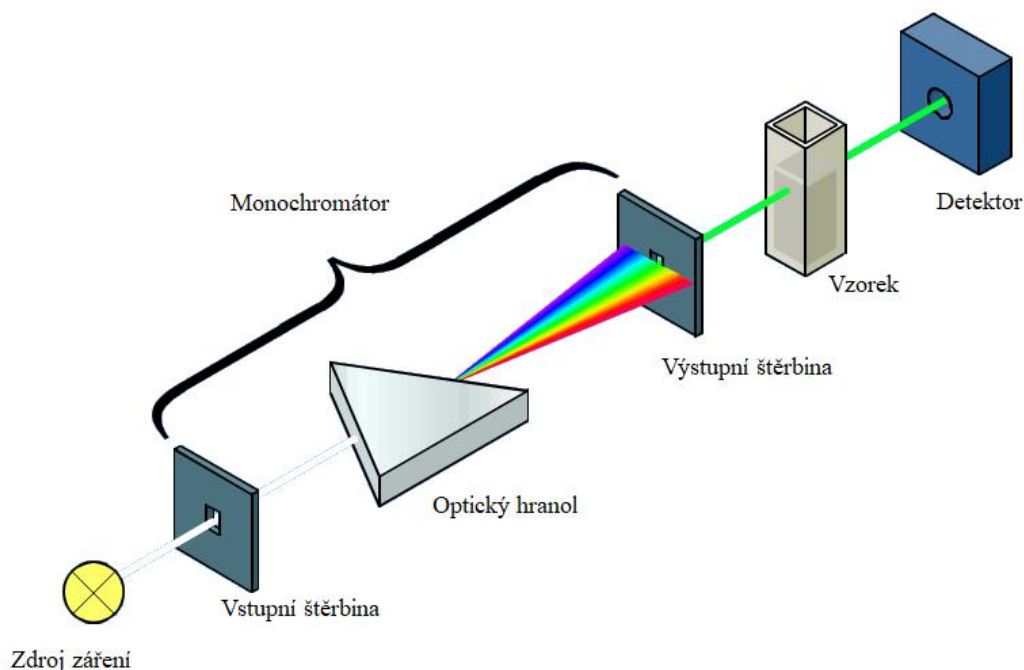
udává v procentech. Pro stanovení těchto procent je velmi důležité znát množství látky, která zůstala v okolním roztoku [43].

Ke stanovení enkapsulační účinnosti využíváme široké spektrum analytických metod jako jsou například UV-VIS spektrofotometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, popřípadě i titrační stanovení [43].

2.9.1.1 UV-VIS spektrofotometrie

Principiálně tato metoda spočívá v interakci elektromagnetického záření s analytem. Absorpční spektrofotometrie se řadí mezi optické metody, v jehož rozmezí použitého záření jsou zařazeny vlnové délky od UV oblasti (200-400 nm) až do oblasti viditelného záření (400-800 nm). Tato metoda se používá ke kvantitativnímu stanovení složky na základě Bouguer-Lambert-Beerovy zákony, kde je absorbance závislá na koncentraci látky [43].

Absorpční spektrofotometrii můžeme použít jako samostatnou analytickou metodu, kterou ale často využíváme jako detektor po separaci pomocí kapalinové chromatografie [43].



Obrázek 5: Zjednodušené schéma optického spektrofotometru [44]

2.9.1.2 Stanovení stability částic

K charakterizování stability připravených částic využíváme jejich zeta potenciálu. Zeta potenciál měříme pomocí laserové Dopplerovy elektroforézy, která kombinuje Dopplerovu velocimetrii a elektroforézu. Hlavní zjišťovaný faktor je rychlost pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Když je známa velikost použitého elektrického pole a poté, co je určena velikost rychlosti částic systému, tak je možné vypočítat zeta potenciál (za předpokladu, že známe i konstanty vzorku-dielektrickou konstantu a viskozitu). Zeta potenciál je značně závislý na pH roztoku, protože systém je nejméně stálý v tzv. izoelektrickém bodě. Isoelektrický bod je hodnota pH, kdy je náboj částice neutrální, nebo jinak řečeno, se její počet záporných a kladných nábojů rovná [45].

Zeta potenciál nám dává informaci o potenciálové stabilitě daného koloidního systému. Při vysoké hodnotě zeta potenciálu mají částice systému, ať už je pozitivní nebo negativní,

dochází ke vzájemnému odpuzování částic, tudíž nedochází k jejich shlukování. Zatímco při příliš nízkých hodnotách zeta potenciálu se částice dostatečně neodpuzují a dochází k jejich flokulaci [45].

Obecně jsou jako hranice stability zeta potenciálu brány hodnoty 30 mV a -30 mV. V intervalu (30; -30) mV hodnot zeta potenciálu se nacházejí látky nestabilní, přičemž dochází k agregaci jednotlivých částic za tvorby většího komplexu [45].

2.9.1.3 Stanovení velikosti připravených částic

Velikost částic je nejčastěji stanovována pomocí dynamického rozptylu světla (DLS), která se jinak označuje jako PCS (fotonová kolerační spektroskopie). Touto metodou se měří tzv. Brownův pohyb. Brownovým pohybem rozumíme neuspořádaný pohyb částic v roztoku, který je způsoben vzájemnými stálými srážkami částic v roztoku. Výsledek měření je rychlost právě Brownov pohybu, díky kterému můžeme vypočítat velikost částic. Rychlost pohybu je závislá na velikosti částic, velké částice se pohybují pomaleji a uspořádaněji, zatímco malé jsou naopak rychlejší a neuspořádanější [45].

Částice se pohybují neustále, proto jsou využity dva po sobě jdoucí snímky, pořízené ve velmi krátkém časovém úseku, k určení vzdálenosti, o kterou se částice posunula za tuto krátkou dobu. Při měření jsou částice v roztoku osvětleny laserem, odchylky intenzity rozptylu světla jsou následně analyzovány a je stanovena velikost částic. Velmi důležitým faktorem je i zvolit správnou teplotu, která také ovlivňuje Brownův pohyb částic, při vyšších teplotách se rychlost částic zvyšuje [45].

2.10 Kultivace mikroorganismů

Základem každé práce s mikroorganismy je právě jejich kultivace, jinak také pěstování. Při kultivaci je velmi důležité zvolit správné kultivační (živné) médium. Dalším faktorem k pěstování mikroorganismů je zvolit správnou teplotu a přístup vzduchu. Tyto faktory si volíme podle druhu zvolených mikroorganismů [46].

Živná média dělíme podle následujících kritérií: podle původu (přírodní, syntetická), skupenství (pevná polotuhá, tekutá), obsahu živin (základní, obohacená, limitovaná) a účelu použití (selektivní, univerzální, diagnostická, výběrová-diagnostická) [46].

Všechna média podléhají obecnému složení, do kterého patří zdroj uhlíku, dusíku a minerálních látek, voda, selektivní činidla, látky, které slouží k úpravě pH, a ztužovadlo. Ztužovadel je celá řada, ale nejčastěji se využívá agar, popřípadě želatina. Agar je polysacharid, který je získáván z mořských řas, při 40 °C tuhne a při 96 °C se vyskytuje tekutý, čehož využíváme při sterilizaci [46].

Tuhá media kultivujeme v termostatu, kde musí docházet k výměně vzduchu. Misky se musí uchovávat dnem vzhůru, dochází ke kondenzaci vody. Když jsou média kapalná, tak se uchovávají v termostatové třepačce, pomocí třepání dochází k dostatečnému provzdušňování a tím i dostatečnému přístupu kyslíku ke kultivovanému kmeni. Mikroorganismy většinou kultivujeme až několik dní [46].

2.11 Bakterie

Tyto prokaryotické jednobuněčné organismy jsou druhově a morfoloicky velmi rozmanité. Velikosti dosahují několika mikrometrů. Mohou se vyskytovat v mnoha tvarech, přičemž nejčastější jsou bakterie tyčinkovitého tvaru, velmi časté jsou koky, které odlišujeme pomocí

roviny dělení, když máme jen jednu rovinu, tak do této skupiny řadíme např. diplokoky a streptokoky, případně více rovin (dvě mohou vytvářet tetrády, tři roviny tvoří sarcina, stafylokoky). Dále tu jsou zakřivené tyčinky bakterie (vibria), také mohou vytvářet jeden i více závitů v jedné rovině (spirilla, spirocheta). Jednotlivé druhy odlišujeme také pomocí okrajů a profilů. Okraje nabývají tvarů okrouhlých, vroubkovaných, zubatých, zvlněných a mnoha dalších. I profily jsou rozmanité, ploché, zvýšené, vypouklé pupkovité, apod [47].

Chemickým složením se od ostatních typů buněk neliší, dá se říci, že je uniformní. Na stavbě se podílí 27 prvků, které se z 90 % vyskytují na zemské kůře, z toho 97 % sušiny tvoří biogenní, hlavně uhlík, vodík, dusík, kyslík, fosfor a síra. Může se odlišovat procentem obsahu vody (rozsahem 65-85 % celkové hmotnosti) [47].

Bakterie se odlišují i svým způsobem výživy a získáváním energie, také specifickým způsobem metabolismu a rozmnožování. Podle zdroje uhlíku a energie je dělíme na chemoheterotrofní, chemoautotrofní, fotoheterotrofní, případně na fotoautotrofní [47].

Esenciální strukturou se neliší. Pro nás má ale velký význam buněčná stěna, jeden ze způsobů rozpoznávání bakteriálních struktur. Hlavní funkcí je ale ohraničení, ochrana před chemickým a mechanickým poškozením, vysycháním. Také drží tvar. Ale u různých typů bakterií můžeme najít rozdílná chemická složení buněčné stěny. Základní stavební strukturou je peptidoglykan (murein), mezi jehož řetězce jsou vloženy lipidy, bílkoviny, polysacharidy a mnoho dalších molekul. Složení tohoto mukopeptidu se příliš neliší, skládá se z pravidelně se opakujících molekul N-acetylglukozaminu a N-acetylmuranové kyseliny [47].

Jedno z nejzákladnějších dělení je dle Grama, kde odlišujeme bakterie podle struktury buněčné stěny na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Díky rozdílným složením buněčné stěny jsou určité druhy schopny v sobě fixovat barvení, či nikoliv. Během barvení se využívá krystalová violet' a roztok jódu, kdy jsou následně opláchnuty organickým jaozpoštědlem jako je ethanol nebo aceton. Výstup můžou být purpurově zbarvené grampozitivní bakterie, nebo neobarvené gram negativní bakterie [47].

Buněčná stěna grampozitivních zástupců tvoří struktura peptidoglykanu a teikotoové kyseliny, která dokáže fixovat právě Gramovo barvení. Stěna má poměrně silnou (15-20 nm). Kyselina teikoová je ve vodě rozpustný lineární polymer složený z glycerfosfátu nebo ribitolfosfátu s glykosidicky navázanými sacharidy. Její funkce je dosud neobjasněna, ale předpokladem je, že se jedná o povrchový antigen podílející se na vazbě kationtů, zejména ze strany cytoplazmatické membrány. Dále neobsahuje lipidy, narozdíl od buněčné stěny gramnegativních bakterií [47].

Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu strukturně tenčí (cca 10 nm), ale podstatně složitější. Základem je opět tenká vrstva peptidoglykanů, na níž přiléhá tenká vrstva podobající se biologické membráně označující se jako vnější membrána, která stěnu chrání před fixací barviv. Vnější membrána je složená z fosfolipidů, která má na sobě z obou stran vázány bílkoviny, která je propojena s peptidoglykany pomocí lipoproternů. Antigenní vlastnosti udávají liposacharidy na vnější membráně. Bílkoviny jednotlivých vrstev jsou strukturně odlišné, ty, které prostupují všemi vrstvami vytváří hydrofilní pór (tunel), důležitý pro komunikaci buňky s okolím [47].

2.11.1 Rezistence bakterií

Jedním z největších problémů moderní doby je stále zvyšující se rezistence mikroorganismů proto antibiotikům. Bakterie můžeme nazvat jako velmi přizpůsobivé organismy, nalezneme je takřka všude, charakteristickým znakem pro ně je značně plastický genom. Díky čemuž získali schopnost se rychle přizpůsobit působení antibiotikům, a tím i přežít jejich účinek [48].

Hlavním důvodem zvyšující se rezistence můžeme přisuzovat neopatrným užíváním antibiotik ve velké nadmíře a nesprávně, stejně tak i zpomalení vývoje antibiotik nových [48].

Existuje mnoho mechanismů, jimiž se bakterie naučily vůči účinným látkám bránit. Jedním z nich je snížení propustnosti vnější membrány, to můžeme vidět např. u gramnegativních bakterií, kdy jejich vnější bariéru tvoří liposacharidy a fosfolipidy. Struktura vnější membrány častokrát snižuje propustnost látek do protoplastu buňky. Taktéž i změna genetické informace může poupravit selektivní propustnost vnější bariéry [49,50,51,52].

Další možností je zvýšený eflux, což znamená, že mikroorganismus zrychlí export antibiotik ven z buňky, tudíž se v buňce látka nemůže zakoncentrovat a zničit ji [52].

Vazba antibiotik na cílovou molekulu je velmi specifická. V rámci cílové struktury může dojít k mutaci, z tohoto důvodu nemůže dojít k interakci mezi antibiotikem a bakteriální buňkou [53].

Mezi dalšími důvody najdeme schopnost bakterií produkovat enzymy, které dokážou antibiotikum inaktivovat. Většina účinných, či antimikrobiálních látek, jsou strukturně velmi labilní, proto není těžké způsobit hydrolýzu vazeb ve struktuře pomocných látek, a tím zbavit látku účinku [54].

Rezistenci dělíme na přirozenou, která je dána fyziologickými vlastnostmi mikroorganismu, často se váže na konkrétní druh, a získanou, která vzniká mutací regulačních a strukturních genů na chromozomech, případně získáním genu od jiné rezistentní bakterie, např. konjugací, transdukcí nebo transformací. Předání informace o rezistenci je předávána pomocí tzv. mobilních genetických elementů, kam řadíme plazmidy, inzerční sekvence, transpozony a integrony [55].

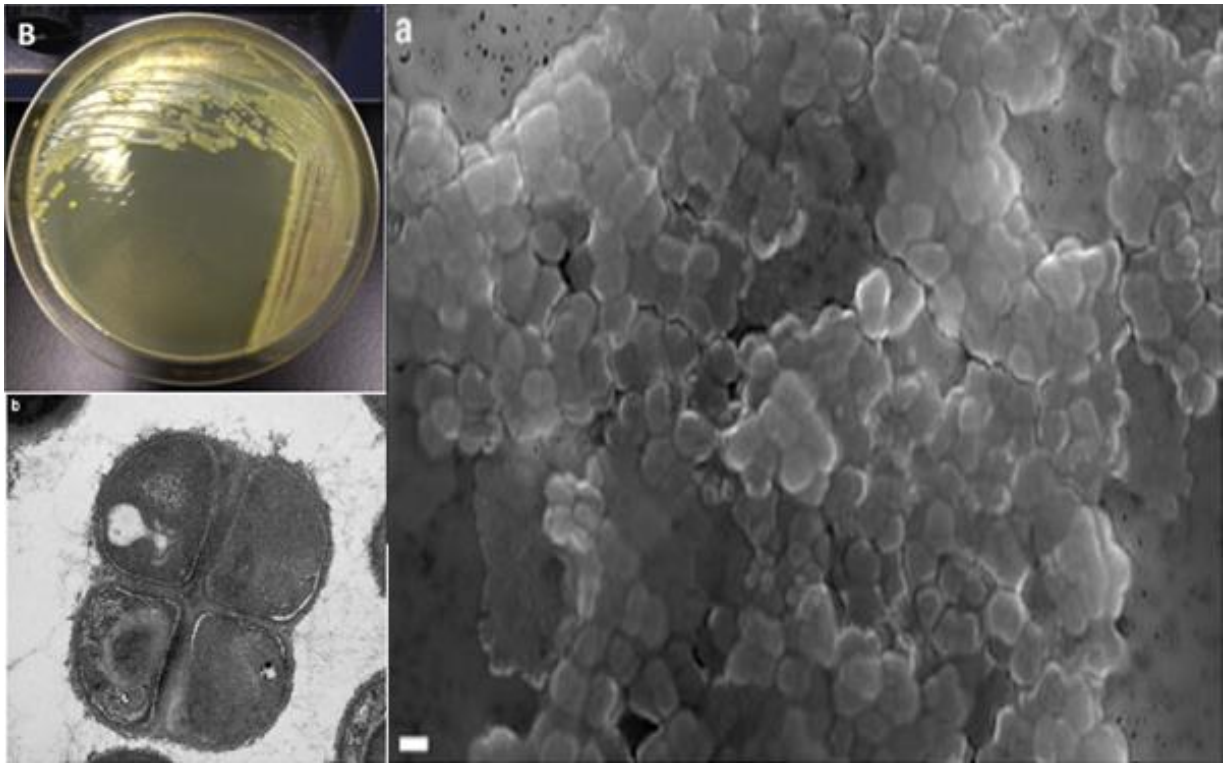
2.11.2 Použité bakterie

Byli vybráni zástupci grampozitivních a gramnegativních bakterií, na nichž byla testována možná antimikrobiální aktivita vybraných rostlin (viz 2.13).

2.11.2.1 *Micrococcus luteus*

Zástupce čeledi *Micrococcaceae* je právě *Micrococcus luteus*. Jedná se o grampozitivní aerobní bakterie kulovitěho tvaru. Vyskytuje se ve shlucích, tetradách či párech, nenese žádné bičíky, nevytváří spory. Charakteristické žluté zbarvení je způsobeno barvivem nazývaného lutein, řazené do skupiny karotenoidních barviv [56].

Přirozeně se vyskytuje jako součást mikroflóry saveců, např. okolí lidských potních žláz, sliznici ústní dutiny nebo dýchacích cest. Obecně ho nepovažujeme za nebezpečný druh, ale existují situace, kdy se může stát patogenní (oslabená imunita) [56].

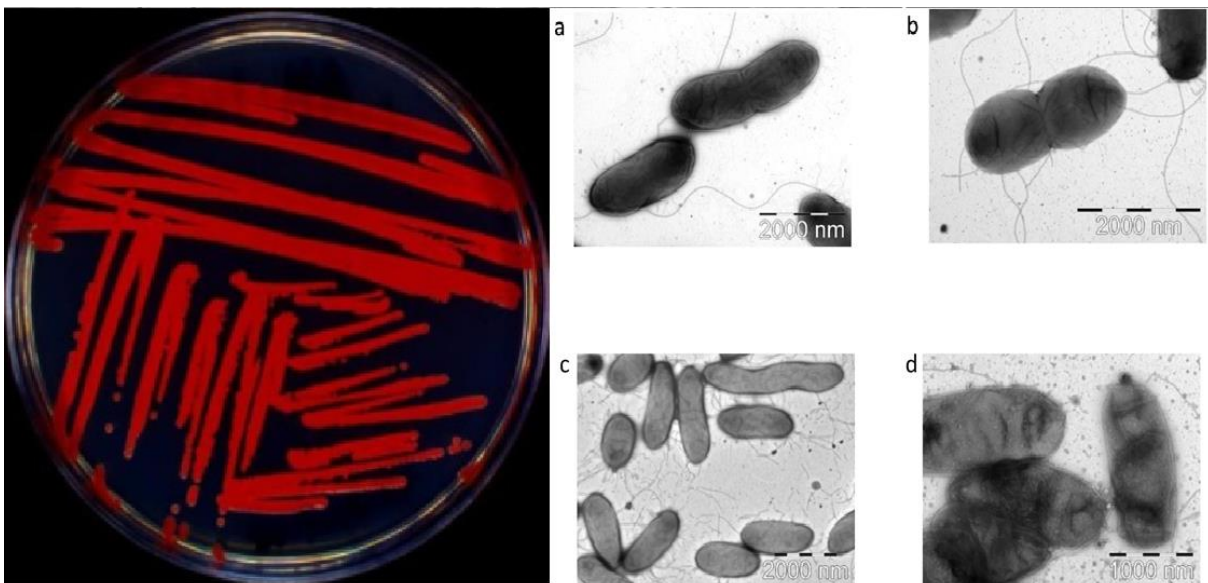


Obrázek 6: *Micrococcus luteus* [57,58]

2.11.2.2 *Serratia marcescens*

Tato fakultativně anaerobní bakterie zastupuje rod Enterobakterie, tyčinkovitého tvaru, chemotrofní, bohatého pohybu, netvořící spory. Patří ke gramnegativním bakteriím, které produkují při určité teplotě pigment prodigiozin červené barvy [59].

Opět je patogenní jen u pacientů s oslabenou imunitou, kdy může způsobit onemocnění dýchacích cest, infekci ran (proleženiny), také urogenitálního traktu, sepsi, meningitidu a endokarditidu [59].



Obrázek 7: *Serratia marcescens* [60,61]

2.12 Využití antimikrobiálních látek

Kosmetický i lékařský průmysl se v posledních letech snaží vyhovět požadavkům spotřebitelů nahrazovat různé chemikálie přírodními výtažky v produktech. Různé chemické složky jsou i různě kombinovány s antimikrobiálními látkami, které mají podobné vlastnosti a stejnými účinky. V potravinářském průmyslu nahrazují různé konzervanty, protože přirozeně inhibují růst a rozmnožování mikroorganismů [3,9,62].

Na trhu vzrůstá poptávka po přírodní kosmetice, proto se vědci snaží získat rostlinné extrakty s podobnými vlastnostmi, jako používané chemikálie. Velmi důležité faktory jsou tolerance organismu vůči dané látce, jejich stálost. Hodně používané jsou extrakty, které obsahují flavonoidy, polyfenoly, popřípadě silice, právě pro jejich antimikrobiální aktivitu, které se využívá i v lékařství. Dobré využití se skýtá v krémech, v nichž mají protizánětlivé a hojivé účinky, které zároveň i zklidňují pokožku. V lékařství je značný problém, že postupně vzrůstá odolnost bakterií vůči běžně používaným antibiotikům, která se využívají. Proto se vědci snaží nahradit běžná léčiva novými dosud nepoužívanými alternativami, které mají stejný účinek. Nebo se používají i v kombinaci s antibiotiky. Mají i velký potenciál v oblasti farmakologie [2,10,63].

2.13 Použité rostliny

Bylo vybráno deset zástupců z rostlinné říše, které byly zkoumány na obsah antimikrobiálních látek, také antioxidantů. Bylo prozkoumáno, do jaké míry jsou vyrobené extrakty antimikrobiální. Obsah látek byl kvantifikován zapsán v kapitole 5.1.

2.13.1 Acai berry

Acai berry je sytě fialové bobulovité ovoce rostoucí v trsech na palmě (Euterpe oleracea, česky Euterpe brazilská nebo Kapustoš brazilská), která dorůstá do výšky 15 až 25 m. Původ se nachází v Amazonském pralese, kde je také nejhojnější výskyt těchto palm [64].

Plody dosahují velikosti 1-2 cm v průměru, řadíme je do tzv. superpotravin, což znamená, že dosahuje výjimečných nutričních a výživových hodnot. V dnešní době je moderní tyto superpotraviny je zahrnovat do běžného stravování. Acai se konkrétně konzumuje ve formě ovoce, džusu, ale i jako příchuť do zmrzliny [64].

Udává se, že Acai má pozitivní vliv na metabolismus, kvalitu pleti, podporuje zdraví srdce tím, že redukuje hladinu cholesterolu v krvi, obsahuje antioxidanty (např. vitamín C), zlepšuje kvalitu spánku, podporuje funkci nervového systému [64].

V práci byl použit lyofilizovaný prášek z bobulí.



Obrázek 8: Bobule acaie [65]

2.13.2 Anýz vonný

Patří k miříkovitým rostlinám, jejichž lodyha je přímá, neboře větvená, s řapíkatými listy a bílými květy. Květenství je obojate, paprscité. Vyskytuje se v Česku zřídka, převážně Jihomoravský kraj, největší výskyt je v oblasti Středomoří, oblast bývalého SSSR, Bulharska, Rumunska, Maďarska a Polska, mimo Evropu také v Japonsku a Číně [66].

Využívanou částí jsou plody, které využíváme jako koření i léčivo. Vyznačuje se pronikavou vůní a sladkou kořeněnou chutí. Účinkuje baktericidně, což přisuzujeme silici obsahující až 90 % anetolu, methylchavikol a různé oleje. Dále také uklidňuje, je protikřečová a pozitivně působí na trávicí ústrojí, redukuje zápach z úst, čehož využíváme v kosmetice v ústních vodách a pastách. Díky aromatu se s ní můžeme setkat i v likérnictví, a jako kořením v potravinářském průmyslu [66].



Obrázek 9: Anýz [67]

2.13.3 Eukalyptus

Blahovičník neboli eukalyptus patří do čeledi myrtovitých. Jedná se o aromatické stromy a keře s jednoduchými listy. Nejvyšší druhy mohou dosahovat výšky až 100 m. Nesou oboupohlavné květy, květenstvím je okolík, plodem tobolka [68].

Obsahuje široké spektrum účinných látek, převážně silice, také terpeny, triketony a jednoduché acylfloroglucinoly, různé flavonoidy, třísloviny. Silice se vyznačují antimikrobiálními a protizánětlivými účinky, čehož využíváme v medicíně. Patří pro své účinky k tradičním léčivům v kultuře Aboridžinců. Mají antimikrobiální účinek proti řadě patogenních mikroorganismů, nejčastěji se uvádí eukalyptol (1,8-cineol) a limonen, p-cymen, piperiton a mnoho dalších [68].

Některé druhy obsahují i kyanogenní glykosidy, ze kterých se po poškození tkání uvolňuje kyanovodík [68].

Největší výskyt je v Austrálii, několik druhů je i v oblasti nové Guineji [68].



Obrázek 10: *Eukalyptus* [69]

2.13.4 Hořčičné semínko

Pochází z hořčice seté. Patří k velmi známým druhům koření, které se využívají k výrobě hořčice. Hlavní úlohu pro nás hraje semeno štiplavé chuti a žlutavé barvy kulatého tvaru [70].

Využití máme například v konzervaci zeleniny (zejm. okurky) a ryb, také k dochucení. Látky obsažené v semeni způsobují prokrvení zažívacího traktu, tím urychluje trávení a látkovou výměnu, proto se doporučuje při špatném trávení. Údajně i tiší revmatické bolesti. Samotná semena nemají do rozdrcení žádnou vůni, po rozdrcení mají štiplavou vůni i chuť. Obsahují glykosid sinalbin a různé fermenty. Štěpením sinalbinu vzniká silice, které přisuzujeme její antimikrobiální vlastnosti [70].

Samotná rostlina se pěstuje i v Česku, jinak v jižní Evropě, Středomoří a západní Asii [70].



Obrázek 11: *Hořčice setá* [71]

2.13.5 Hřebíček

Hřebíček je koření, které pochází ze sušeného kalichu hřebíčkovce kořenného, jehož původ je mapován na Moluckých ostrovech [66].

Má velmi specifické aroma využívané v aromatických směsích, kořenění potravin, rýže a masa. Charakteristická nasládlá chuť přechází až v hořkou, barva nabývá hnědé až lehce černé [66].

Nejvýznamnější sloučeninou pro nás je eugenol, což je silice, která má antiseptické a lokálně anestetické účinky, často využívané v zubním lékařství. Tlumí citlivost dásní, proto se používá jako příměs v kloktadlech, je také účinný proti zánětům v ústní dutině. Můžeme ho najít i v protirevmatických mastech [66].



Obrázek 12: Hřebíček [72]

2.13.6 Jalovec obecný

Jedná se o dvoudomý jehličnan řazený mezi cypřišovité. Může dorůst velikosti až 12 m, charakteristický svými trhlinami, které tvoří v pruzích odlupující se šedá borka. Samčí zástupci jsou kuželovitého tvaru, zatímco samičí nízce rozložené. Listy má jehlicovité, ve střídavých trojčetných přeslech. Květy rostou ve formě šištic. Samičí šupiny se po oplození mění v bobule (dužnatější). Plody (jalovčiny) voní po pryskyřici s kořeněnou chutí a lehce palčivě až hořce. Je bohatá na silici a terpenoidy, z nichž terpineol-4 působí diureticky, dále obsahují flavonoidy, pryskyřičné kyseliny a až 30 % inertního cukru [66].

V minulosti se ve formě čaje používal odvar na nemoci močového ústrojí, při zánětech ledvin. Další využití bylo v mazání při revmatických potížích. Dnes se používá běžně jako koření při přípravě zvěřiny, ryb i zeleniny, nebo i při výrobě alkoholických destilátů [66].

Výskyt je nejhojnější v oblasti Himalájí, Atlasu, Kavkazu [66].



Obrázek 13: Jalovec obecný [73]

2.13.7 Jedle

Jedle (latinsky *Abies*) je zástupce jednodomých stálezelených jehličnatých stromů čeledi borovicovitých. Jedle jako taková se vyskytuje přibližně v 50 modifikacích nacházející se v Severní Americe, oblasti střední a jihovýchodní Evropě, ve Středomoří a ve východní Asii [68].

Mohou dorůst do výšky 30-60 m, výjimečně 80, mohou se dožít až několika stovek let. Charakteristickým znakem jsou pro ně šišky, které vzrůstají směrem vzhůru, ve stáří se rozpadají [68].

Strom má široké využití, jak už jeho dřevo, ale i aromatické esenciální oleje a pryskyřice. Pryskyřice je bohatá na terpeny (získáváme z ní tzv. Kanadský balzám, využívaný jako fixační látka do mikroskopických preparátů a čoček), taktéž se používá jako přísada do mastí proti revmatu a artróze, nebo také při kožních potížích i pohmožděninách, což poukazuje na léčivé schopnosti jedle [68].

Jehličí, jakožto zdroj esenciálních aromatických olejů, je bohaté na silice a mnoho druhů terpenů, jako pineny, limonen, kamfen aj. V aromaterapii je olej využíván právě pro charakteristické aroma oleje, pro jeho antiseptické i desinfekční účinky. Můžeme zde nalézt i mnoho vitamínů jako jsou vitamín A, B a C [68].



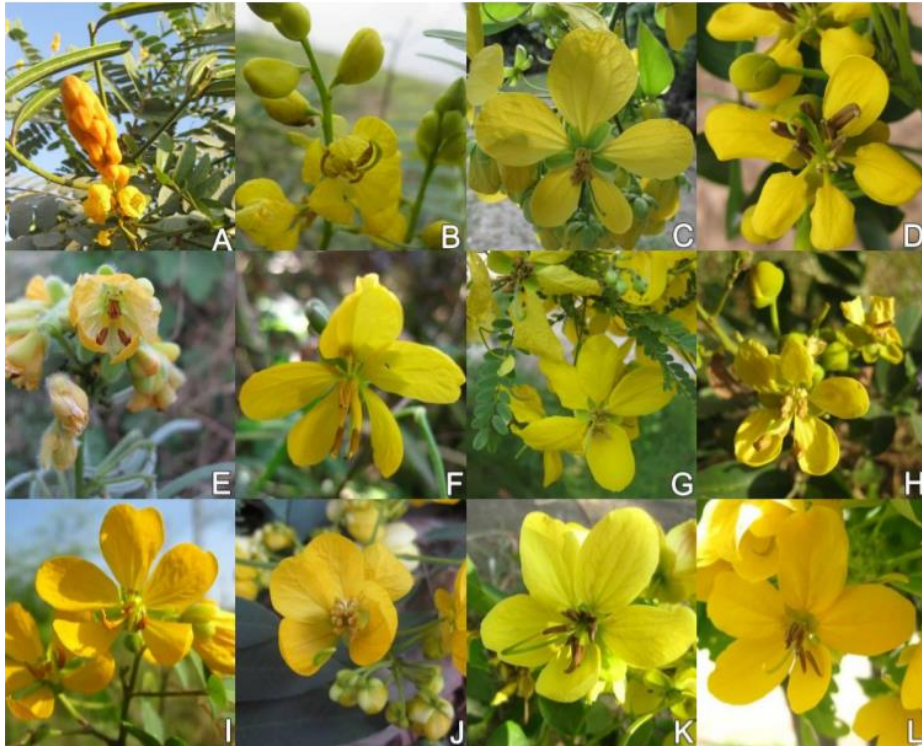
Obrázek 14: Jedle [74]

2.13.8 Senna

Žluté květy jsou typickým znakem rodu tropických rostlin *Senna* patřící k čeledi bobovitých. Tyto keře, stromy i byliny jsou rozšířeny zejména v tropech. Slouží jako okrasné rostliny, ale mají své místo i v medicíně. U nás se nejvíce jako odvar využívá při zácpě, jinak je využíván v tradiční čínské, indické i latinsko americké medicíně [75,76].

Žluté květy na větvích doprovázejí sudozpeřené listy, ale některé druhy mohou být lysé. Stromy, keře i byliny nemají trny. Mezi důležité látky, které jsou obsaženy v listech a plodech, patří hlavně deriváty antrachinonu, jako jsou rheim, sennidin, sennosidy [75,76].

Rod obsahuje více než 250 zástupců, jež se nachází převážně v tropech, ale výskyt zasahuje místy i na mírné pásmo [75].



Obrázek 15: Vybrání zástupci rodu senna [77]

2.13.9 Zázvor

Nepostradatelnou součástí domácí tradiční medicíny je zázvor lékařský (jinak zázvorník lékařský), jež má své místo v každé domácnosti. Jedná se o koření získávané z oddenků této byliny. Historicky pochází z Asie (Indie, Čína), jak už jako součást domácí kuchyně, ať už ve formě koření, limonád, piva či součást pekařských výrobků, nebo tradiční medicíny [68].

Nejnámější část této vytrvalé byliny je její dužnatý oddenek, z něhož vyrůstá několik stonků nesoucích žluto-fialové květy, jež jsou uspořádány do klasu [68].

Na trhu se vyskytuje mnoho druhů zázvoru, avšak všechny obsahují 2-3 % silice, kde největší podíl má zingiberen, následně pryskyřice aj. [68].



Obrázek 16: Oddenek zázvoru lékařského [78]

2.13.10 Žen-šen pravý

Též všehož ženšenový patří k tradičním léčivým bylinám, jež jsou řazeny do čeledi aralkovitých. Přirozeně se vyskytuje na území Číny, Rusku, místy na území Koreji a střední či východní Ameriky (americký ženšen) [79,80].

Pro nás zajímavá podzemní část je tvořena kořenovou hlavou, z níž vyrůstají mrkvovité kořeny. Nadzemní část, tvořena lodyhou, nese složené listy a drobné zelenobílé květy. Plody jsou červené peckovice [79,80].

Jako účinné látky je možno uvést saponiny (asi 70 druhů, jako ginsenosidy, pamaxosidy), antioxidanty (maltol, kyselina salicylová a vanilová), různé polysacharidy (ginsan) a peptidy [79,80].



Obrázek 17: Žen-šen pravý [81]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je připravit antimikrobiální gely s rostlinnou složkou ve formě extraktu a oleje. V rámci práce byly řešeny následující dílčí úlohy:

1. Rešerše – přehled rostlin s potenciálním antimikrobiálním účinkem, aktivní látky
2. Příprava rostlinných extraktů a olejů
3. Analýza aktivních látek v extraktech a olejích z vybraných rostlin
4. Analýze antimikrobiálních a dalších účinků rostlinných extraktů
5. Příprava a testování antimikrobiálních gelů s obsahem rostlinných extraktů a olejů

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité mikroorganismy

Na testování antimikrobiální aktivity v rámci této bakalářské práce byly použity kultury *Micrococcus luteus* CCM 1569 a *Serratia marcescens* CCM 8587. Tyto bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy university v Brně.

4.2 Použité chemikálie

4.2.1 Přírodní složky do gelů na přípravu extraktů

Anýz bio (SONNENTOR), lyofilizovaný acai prášek (Iswari), eukalyptus (Léčivé rostliny), hořčičné semínko bio (SONNENTOR), hřebíček (Vitana), jalovec bio (SONNENTOR), jedle kavkazská, senna (Léčivé rostliny), zázvor čerstvý, ženšen kořen (Léčivé rostliny)

4.2.2 Chemikálie na přípravu extraktů

Ethanol pro UV-VIS 99 % - Lach-Ner (ČR)

Hexan - Lach-Ner (ČR)

4.2.3 Chemikálie na charakterizaci extraktů

Folin-Ciocalteuovo činidlo – Lach-Ner (ČR)

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)-(ABTS) – Sigma-Aldrich (DE)

Uhlíčan sodný – Lach-Ner (ČR)

Hydroxid sodný – Lach-Ner (ČR)

Chlorid hlinitý – Lach-Ner (ČR)

Dusitan sodný – Lach-Ner (ČR)

4.2.4 Chemikálie na kultivaci mikroorganismů

Nutrient Broth (NB), Himedia (India)

4.2.5 Použité chemikálie jako standard

Kyselina gallová – Sigma-Aldrich (DE)

Katechin – Sigma-Aldrich (DE)

Trolox – Sigma-Aldrich (DE)

4.2.6 Chemikálie na přípravu částic

Chloroform – Lach-Ner (ČR)

Lecithin – Serva (DE)

Cholesterol – hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu – Serva (DE)

4.2.7 Chemikálie na přípravu gelu

Carbomer, Polygel CA

4.3 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy, Boeco (DE)

Předvážky, Boeco (DE)

Vortex, TK3S, KArtell spa (USA)
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (DE)
Magnetická míchačka s ohřevem, Lavat – Verkon (ČR)
Koloidní DLS analyzátor TetaSizer Nano ZS – Malvern (UK)
ELISA ReaderBioTec ELx808, Biotec (DE)
Biohazard box, model Airstream, ESCO, Biotech (DE)
Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HS 3200, Bandelin (DE)
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (UK)
Vakuová rotační odparka Werke RV06-ML: IKA (DE)
Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (ČR)
Optický mikroskop asoftware Dino Capture (ČR)
Automatické pipety v různém rozsahu objemu
Elektrický mlýnek na kávu SILVERCREST SKMS 150 A1
SOX THERM, C. Gerhardt GmbH & Co. KG (DE)

4.4 Příprava extraktů

Byly připraveny celkem tři typy extraktů a to vodné, ethanolové a olejové. Všechny byly připraveny z bylin zmíněných výše viz 4.2.1. Vodné a ethanolové byly extrahovány v koncentraci 0,1 g/ml.

4.4.1 Vodné extrakty

Ve vodném prostředí, jehož objem činil 50 ml, bylo extrahováno 5 g bylin. Extrakce probíhala na temperované magnetické míchačce při 80 °C po dobu 24 hodin. Poté byly extrakty přefiltrovány buď přes gázu, nebo filtrační papír. Dále zcentrifugovány, aby byly zbaveny většího množství sedimentu.

4.4.2 Ethanolové extrakty

Rostlinná složka byla extrahována v 20% ethanolu při laboratorní teplotě na třepačkách po dobu 24 hodin. Objem činil 50 ml a bylo použito 5 g bylin. Vzniklé extrakty byly zfiltrány buď pomocí gázy, nebo filtračního papíru, následně zcentrifugovány.

4.4.3 Lipidické extrakty

Byliny byly předem odváženy (5 g) do extrakční patry, které následně byly ucpány vatou, poté byly zality 120 ml hexanu, a po dobu 3 hodin a 4 minut extrahovány na SOX THERMu (podmínky extrakce viz *tabulka 1*), vzniklé oleje byly převedeny do baněk. Oleje byly zbaveny zbytků rozpouštědla na vakuové odparce.

Tabulka 1: Podmínky extrakce olejů, program SOXTHERM Manager

Teplotní klasifikace:	300 °C
Extrakční teplota:	170 °C
Redukční interval:	3 minuty 30 sekund
Redukční puls:	3 sekundy
Horká extrakce:	1 hodina 30 minut
Vypařování A:	5x interval
Extrakční čas:	1 hodina 0 minut
Vypařování B:	2x interval
Vypařování C:	10 minut
Čas trvání:	3 hodiny 4 minuty

4.5 Charakterizace extraktů

4.5.1 Spektrofotometrické stanovení celkových fenolických látek

Na spektrofotometru pomocí této metody měříme absorbanci modrého komplexu, které vzniká reakcí fenolických látek a Follin-Ciocaltauva činidla. Jako standard používáme kyselinu gallovou, pomocí různých koncentrací kyseliny gallové byla sestavena kalibrační křivka.

Do malé zkumavky bylo napipetováno 1 ml zředěného Follin-Ciocaltauva činidla v poměru 1:9, posléze přidáno 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Po 5 minutách byl přidán roztok nasyceného uhličitanu sodného. Po 15 minutách byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm proti vodě.

Na sestrojení kalibrační křivky byl použit stejný postup, pouze místo vzorku bylo přidáno 50 μ l kyseliny gallové v rozmezí koncentrací 0,1 až 0,7 mg/l. Na základě získaných dat byl sestrojen graf závislosti absorbance na koncentraci.

4.5.2 Spektrofotometrické stanovení celkových flavonoidů

Flavonoidy tvoří při této metodě barevný komplex, přičemž absorbance je závislá na míře zbarvení zkoumaného roztoku. Jako standard byl použit roztok katechinu v ethanolu.

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku spolu s 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% dusitanu sodného. Obsah promíchán a ponechán 5 minut stát. Následně bylo přidáno 1M 1,5 ml hydroxidu sodného 1 ml vody. Obsah zkumavek byl opět promíchán a ponechán 15 minut stát. Vzniklé barevné komplexy byly měřeny při vlnové délce 510 nm proti destilované vodě.

Na kalibrační křivku byly připraveny roztoky katechinu o koncentraci 0,05 až 0,3 mg/ml. Poté byl vytvořen graf závislosti absorbance na koncentraci katechinu.

4.5.3 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Bylo použito výše zmíněné činidlo ABTS \cdot + viz 2.6.1, kdy je ABTS rozpuštěno v destilované vodě, tak aby byl roztok 7nM. Následně musí být roztok smíchán s peroxodisíranem draselným, o koncentraci 2,45 mM, na vytvoření radikálového kationtu. Směs musí stát 12 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

Před samotným měřením musí být radikál naředěn UV-VIS ethanolom na absorbanci 0,70 \pm 0,02 při vlnové délce 734 nm. Měření na spektrofotometru probíhá proti ethanolu.

Jako blank byl použit 1 ml ABTS^{•+} radikálů spolu s 10 μ l vody v čase 0 (A_0), díky této počáteční hodnotě jsme byli schopni zjistit pokles absorbance u vzorků. Při měření vzorků pouze místo vody pipetujeme 10 μ l vzorku, roztok poté změříme po desáté minutě po smíchání.

Ke kalibraci byl použit roztok Troloxu rozpuštěný v 60% ethanolu v rozmezí koncentrací 50 až 400 ng/ml. Do výpočtu z rovnice byla dosazována hodnota ΔA ($A_0 - A_{10}$), výsledná hodnota musí být vyjádřena jako ekvivalent Troloxu.

4.6 Příprava liposomů

Pomocí tyčového ultrazvukového homogenizátoku byly připraveny liposomy z vodných, ethanolových i olejových extraktů.

4.6.1 Příprava liposomů z vodných extraktů

Na liposomy z vodných extraktů bylo použito 90 mg sójového lecithinu a 10 mg cholesterolu, smíchány s 10 ml extraktu. Vzniklá směs byla homogenizována pomocí tyčového ultrazvuku po dobu 1 minuty do vzniku liposomů.

Byly vyrobeny liposomy z různých koncentrací extraktů, kdy byl použit buď čistý extrakt, nebo desetkrát zředěný.

Vzniklé liposomy byly nejprve centrifugovány na 6 000 ot/min po dobu 5 minut, posléze byl supernatant odebrán do eppendorf zkumavek, které byly centrifugovány na 11 000 ot/min po dobu 60 minut. Supernatant byl odebrán a usazenina liposomů byla rozsuspendována v 1 ml sterilní vody. Vzniklý vzorek byl použit k další analýze.

4.6.2 Příprava liposomů z ethanolových extraktů

Postup byl podobný jako v předchozím případě, kdy bylo použito 90 mg lecithinu a 10 mg cholesterolu, které byly homogenizovány s 10 ml extraktu po dobu jedné minuty do vzniku liposomů. Roztoky byly před požitím desetkrát zředěny.

Zbytek postupu je shodný s přípravou vodných liposomů, viz 4.6.1.

4.6.3 Příprava liposomů z lipidických extraktů

100 μ l oleje bylo rozpuštěno v 1 ml chloroformu ve zkumavce, celý obsah byl smíchán s 90 mg lecithinu, 10 mg cholesterolu a 10 ml vody. Vše bylo promícháno a v 50 ml kádince pomocí ultrazvuku mícháno do vzniku liposomů po dobu 1 minuty. Použitý chloroform byl odpařen na magnetické míchačce s ohřevem při 40 °C.

Další body zpracování liposomů byl shodný s úpravou liposomů z vodných i ethanolových extraktů, viz 4.6.1.

4.7 Charakterizace liposomů

Záhy po přípravě liposomů byla stanovena enkapsulační účinnost, taktéž velikost a stabilita připravených částic, jejich antimikrobiální a antioxidační účinky. Na závěr byla testována jejich dlouhodobá stabilita.

4.7.1 Stanovení velikosti a stability připravených částic

Metoda DLS (dynamický rozptyl světla) je jednou z nejpoužívanějších metod pro zjištění distribuce velikostí částic, a zároveň i jejich stabilitu na základě jejich zeta potenciálu. Při měření musí být vzorek v kapalném skupenství, přičemž pracujeme na koloidním

analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS, který umožňuje získat informace o velikosti, průměrné velikosti a indexu polydisperzivity vzorku.

Taktéž můžeme změřit již zmíněný zeta potenciál, za pomoci speciálního nástavce opatřený elektrodou. Díky zeta potenciálu můžeme zjistit stabilitu analyzovaných částic. Obecně můžeme říci, že v případě zeta potenciálu, jež nabývá vyšších hodnot než 60 mV (v případě záporného náboje částic -60 mV), tak se jedná o částice s vynikající stabilitou, zatímco v případě 30 mV (také -30 mV) mluvíme o dobré stabilitě. Je-li ale hodnota nižší než 5 mV (nebo -5 mV), tak můžeme dedukovat velmi rychlou agregaci námi vytvořených částic.

4.7.2 Stanovení enkapsulační účinnosti

Po centrifugování liposomů při 11 000 ot/min po dobu 60 minut byl odebrán supernatant, zbytek postupu viz 4.6. V odebraném supernatantu byl určen obsah volných polyfenolů podle návodu v 4.5.1., stejně tak i v extraktu před enkapsulací byla stanovena celková koncentrace fenolických látek. Z rozdílu koncentrací fenolických látek před a po enkapsulaci byla zjištěna enkapsulační účinnost.

4.7.3 Stanovení antioxidační aktivity liposomů

Celková antioxidační aktivita liposomů byla zjištěna pomocí stejného postupu jako u extraktů v kapitole 4.5.3, kdy pouze místo extraktu bylo použito 10 μ l rozsuspendovaných liposomů.

4.7.4 Stanovení dlouhodobé stability

Liposomy byly po přípravě skladovány při teplotě 5 °C po dobu jednoho měsíce, poté byly zcentrifugovány při 11 000 ot/min, supernatant odlit, částice byly usušeny a rozpuštěny v chloroformu o objemu 1 ml. Z takto připraveného vzorku je možné zjistit množství enkapsulovaných fenolických látek. Do zkumavky bylo napipetováno 50 μ l vzorku, z něhož byl odpařen chloroform, dále je postup shodný s kapitolou 4.5.1.

Dlouhodobá stabilita byla vypočítána na základě množství uvolněných fenolických látek z jednotlivých částic.

4.8 Příprava tekutého média

Tekutá média byla připravena z media Nutrient Broth (NB). Jeho příprava byla přesně podle pokynů výrobce na zakoupeném obalu, kdy je na přípravu 100 ml použito 2,5 g pudrového prášku, který byl rozpuštěn ve vodě a ponechán v Erlenmeyerově bance ponechán sterilovat.

4.9 Kultivace mikroorganismů

Jak už bylo výše zmíněno, tak ke kultivaci byly použity dva kmeny bakterií, a to *Micrococcus luteus* 2.11.2.1 zastupující grampozitivní bakterie a *Serratia marcescens* 2.11.2.2 zastupující gramnegativní bakterie. S bakteriemi bylo pracováno zásadně ve sterilním boxu, kde byly očkované do kapalných médií. Následná inkubace byla provedena na temperovaných třepáčkách při 37 °C.

4.9.1 Testování antimikrobiální aktivity diluční bujónovou metodou

Všechny extrakty i liposomy byly testovány na obou bakteriálních kmenech, které byly prováděny ve sterilním boxu. Bylo testováno, zda extrakty a liposomy mohou obsahovat nějaké typy antimikrobiálních látek.

Základem metody je 96 jamková mikrotitrační destička, kde byl sledován růst, případně inhibice růstu, mikroorganismů. Sledování bylo prováděno na základě změny absorbance při 630 nm. Čím vyšší absorbance, tím větší nárůst kultury.

Na testování byla použita 24hodinová kultura, kdy buňky byly před měřením zředěny sterilním médiem na absorbanci 0,1 při 630 nm. Do jamek byl napipetován vzorek, který byl podle potřeby naředěn, aby byla sledovány minimální inhibiční koncentrace. Vždy bylo použito 50 μ l vzorku (extrakt, liposomy), k níž byla přidána kultura o objemu 150 μ l. Objem každé jamky činil 200 μ l. Na blank bylo použito 50 μ l čistého rozpouštědla a stejné množství kultury. Po připravení destičky byla na ELIZA Readru změřena absorbance v čase 0. Změna absorbance (nárůst nebo inhibice) byla sledována po 24 hodinách.

4.10 Příprava gelu

Gely byly připraveny z destilované vody a carbomeru, použitá koncentrace carbomeru byla 2 %. Carbomer byl míchán s destilovanou vodou v kádince do vzniku gelu. Následně byly přidávány antimikrobiální složky ve formě extraktů, případně liposomů. Byly připraveny gely o různých koncentracích. Dále byly zkoumány vlastnosti jednotlivých gelů.

4.10.1 Testování antimikrobiální aktivity

U připravených gelů byla testována jejich antimikrobiální aktivita podle postupu z kapitoly 4.9.1.

5 PŘEHLED VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit gely s přírodní antimikrobiální složkou. K tomuto účelu bylo vybráno 10 typů bylin a koření, z nichž byly připraveny 3 typy extraktů, a to vodné, ethanolové a olejové. Každý extrakt byl otestován s ohledem na množství fenolických látek a antioxidačních látek, také byla testována jejich antimikrobiální aktivita.

Z jednotlivých extraktů byly připraveny liposomy, u nichž byla stanovena velikost, stabilita, antioxidační aktivita, enkapsulační účinnost, dlouhodobá stabilita a jejich antimikrobiální účinky.

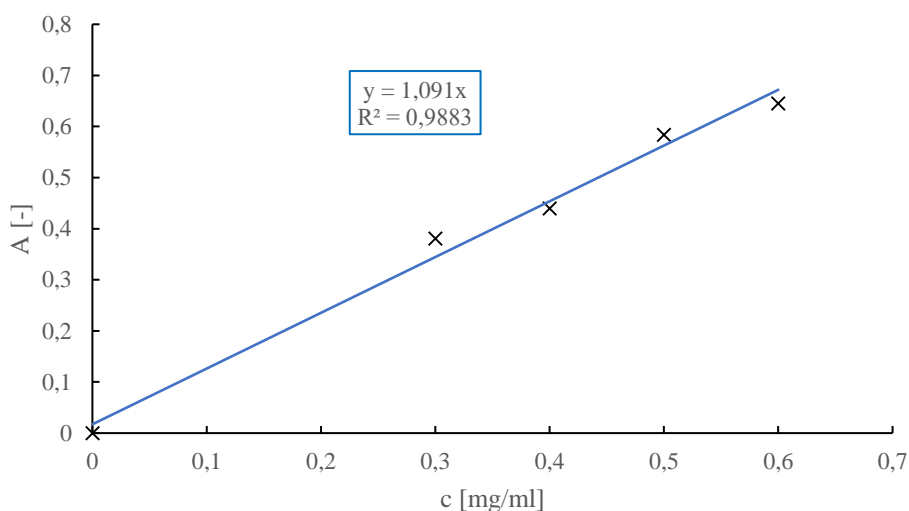
Všechny antimikrobiální testy byly provedeny jak na grampozitivním kmeni bakterií, tak i gramnegativním kmeni.

5.1 Charakteristika extraktů

U všech extraktů, jež byly připraveny podle návodu popsáném v kapitole 4.4, bylo stanoveno množství fenolických, flavonoidních látek a jejich antioxidační či antimikrobiální aktivita.

5.1.1 Obsah celkových fenolů

Byla sestavena kalibrační závislost podle postupu v kapitole 4.5.1, z níž byla získána rovnice závislosti absorbance na koncentraci fenolických látek.

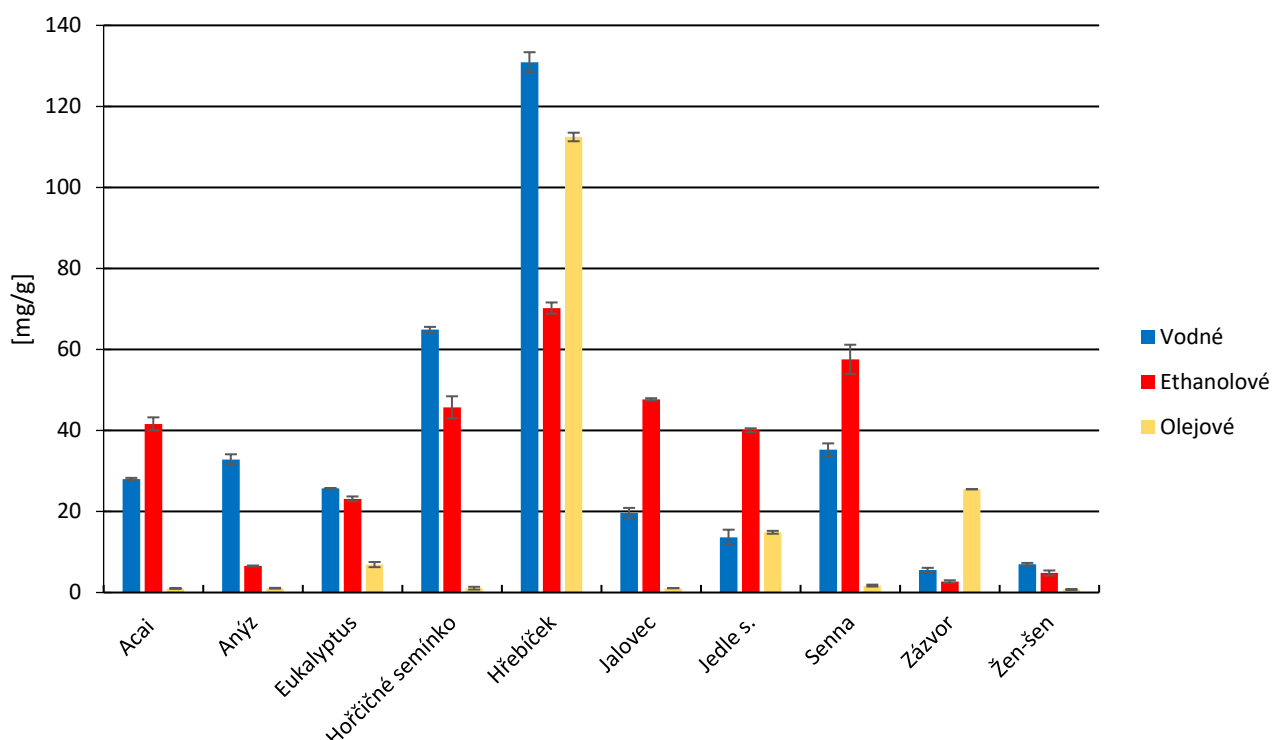


Obrázek 18: Kalibrační závislost pro stanovení celkových polyfenolů

Nejdříve byla změřena absorbance extraktů. Podle míry absorbance byla z regresní závislosti vypočítána koncentrace fenolických látek ve vzorku. Každý extrakt byl měřen třikrát, hodnoty byly způměrovány a výsledná hodnota byla přepočítána na mg fenolických látek na gram rostliny. Vypočítané koncentrace jsou zapsány v *tabulce 2*.

Tabulka 2: Výsledné koncentrace celkových fenolických látek

Rostlina	Vodné extrakty c [mg/g]	Ethanolové extrakty c [mg/g]	Olejoyé extrakty c [mg/g]
Acai berry	28,0 ± 0,3	41,6 ± 1,6	1,01 ± 0,07
Anýz vonný	32,8 ± 1,3	6,56 ± 0,11	1,06 ± 0,09
Eukalyptus	25,70 ± 0,08	23,1 ± 0,6	6,9 ± 0,6
Hořčičné semínko	64,9 ± 0,6	45,7 ± 2,7	1,1 ± 0,3
Hřebíček	130,9 ± 2,4	70,2 ± 1,4	112,5 ± 1,1
Jalovec obecný	19,7 ± 1,2	47,7 ± 0,3	1,08 ± 0,02
Jedle	13,6 ± 1,9	40,1 ± 0,5	14,9 ± 0,4
Senna	35,2 ± 1,6	57,6 ± 3,6	1,7 ± 0,2
Zázvor	5,5 ± 0,6	2,7 ± 0,3	25,52 ± 0,02
Žen-šen	7,0 ± 0,3	4,8 ± 0,6	0,75 ± 0,08



Obrázek 19: Koncentrace polyfenolů v jednotlivých extraktech

Ze získaných výsledků, které lze vidět v tabulce 2 a na obrázku 19, můžeme vyvodit, že fenolických látek je v nejmenší míře obsaženo v olejových extraktech, výjimka byl zázvor, kde naopak bylo dosaženo nejlepšího výsledku, ačkoliv stále nízkého, a hřebíčku, kdy nejnižší hodnota byla změřena u extraktu ethanolového.

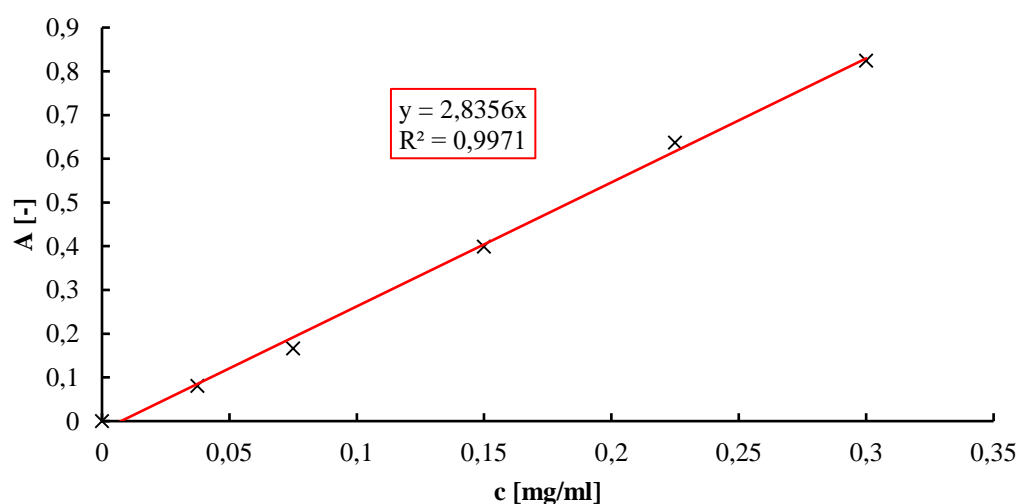
Nejlepšího výsledku dosáhl hřebíček, konkrétně jeho vodný extrakt s 130,9 mg fenolických látek na 1 g čisté hmoty, dále jeho olejový extrakt, který obsahoval 112,5 mg fenolických látek na 1 g suchého podílu testovaného vzorku. Nejvyšší výsledky byly obecně získány u vodných extraktů, konkrétně z anýzu, eukalyptu, hořčičného semínka, hřebíčku a žen-šenu. Zatímco u acai, jalovce, jedle a senny byly účinné látky vyextrahovány nejlépe pomocí 20% ethanolu. Zároveň je nutné podotknout, že u acai (hlavně v případě olejového extraktu), anýzu (stejně

jako u acai), aukalyptu, jedle, zázvoru a žen-šenu byly hodnoty koncentrací velmi nízké. Nejmenší obsah fenolických látek byl detekován u žen-šenu.

Množství extrahovaných látek je viditelně individuální, každá rostlina reaguje na dané rozpouštědlo jinak, tudíž není pozorovaný výrazný pravidelný trend či nějaké závislosti extrahovaných látek na rozpouštědle nebo typu extrakce.

5.1.2 Obsah celkových flavonoidů

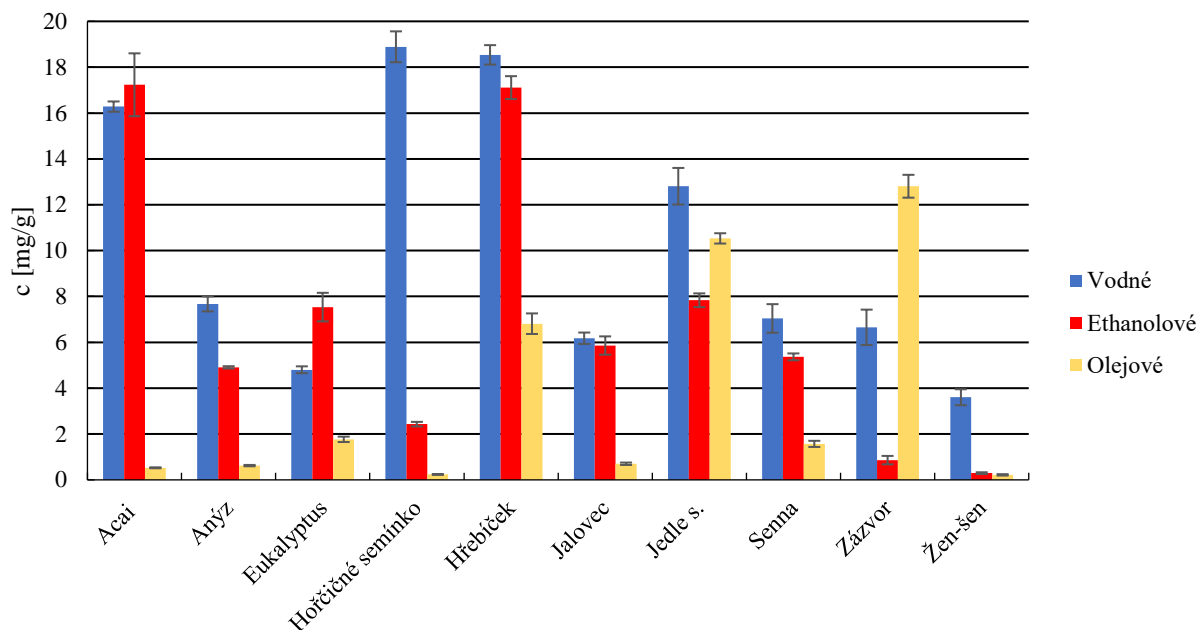
K výpočtu koncentrací flavonoidních látek v testovaných vzorcích byla použita kalibrační křivka viz *obrázek 20*, jenž byla připravena podle postupu v kapitole 4.5.2, podle něhož byly měřeny i flavonoidy v testovaných extraktech. Vše bylo měřeno spektrofotometricky, koncentrace extrahovaných látek byla vypočítána z regresní rovnice kalibrační přímky a následně přepočítána na miligramy účinných látek na gram rostliny (mg/g). Hodnoty koncentrací byly zapsány do *tabulky 3*.



Obrázek 20: Kalibrační závislost k stanovení celkových flavonoidů

Tabulka 3: Vypočítané koncentrace flavonoidů v testovaných extraktech

Rostlina	Vodné extrakty c [mg/g]	Ethanolové extrakty c [mg/g]	Olejoyé extrakty c [mg/g]
Acai berry	16,3 ± 0,2	17,2 ± 1,4	0,53 ± 0,02
Anýz vonný	7,6 ± 0,3	4,91 ± 0,05	0,62 ± 0,03
Eukalyptus	4,8 ± 0,2	7,5 ± 0,6	1,77 ± 0,12
Hořčičné semínko	18,9 ± 0,6	2,43 ± 0,10	0,237 ± 0,009
Hřebíček	18,5 ± 0,4	17,1 ± 0,5	6,8 ± 0,5
Jalovec obecný	6,2 ± 0,3	5,9 ± 0,4	0,70 ± 0,05
Jedle	12,8 ± 0,8	7,8 ± 0,3	10,5 ± 0,2
Senna	7,0 ± 0,6	5,4 ± 0,2	1,57 ± 0,13
Zázvor	6,7 ± 0,8	0,9 ± 0,2	12,8 ± 0,5
Žen-šen	3,6 ± 0,4	0,29 ± 0,04	0,22 ± 0,03



Obrázek 21: Obsah flavonoidů v testovaných extraktech

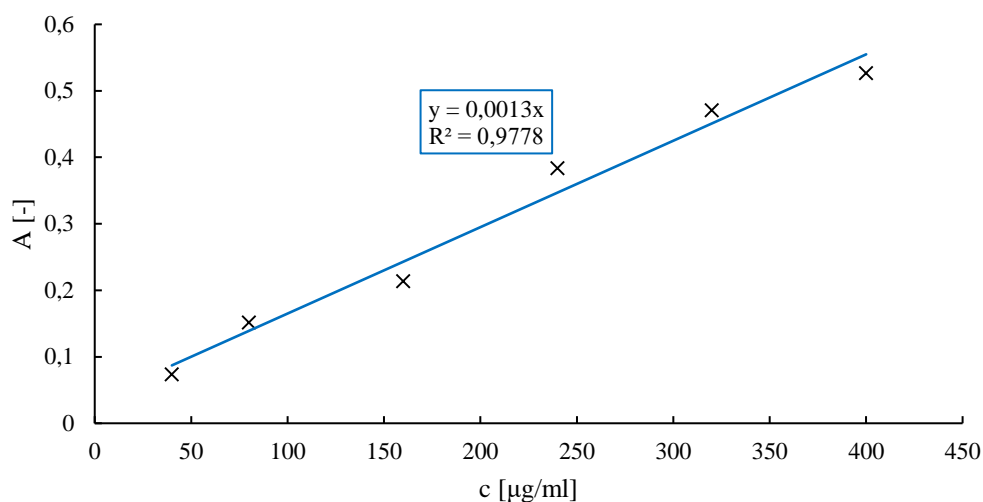
Z grafů na obrázku 21 je patrné, že nejlépe probíhala extrakce flavonoidních látek ve vodě, konkrétně u sedmi z deseti extraktů, mimo acaie a eukalyptu, u kterých nejlépe probíhala extrakce do ethanolu, nebo u zázvoru, kde stejně jako u polyfenolů byla extrakce nejúčinnější v případě izolace oleje.

Největší koncentrace flavonoidů byla detekována u hořčičného semínka (18,9 mg/g rostliny), následně u hřebíčku a acaie. Nejméně efektivní extrakce může být považována extrakce na SOXThermu (viz kapitola 4.4.3), kde byly koncentrace v 8 případech z 10 nejnižší, mimo zázvoru a jedle, téměř nulová.

Opět může být řečeno, že z grafu není možné vyčíst žádný výrazný trend, mimo lepší extrakce pomocí vody, ale to může být způsobeno volbou bylin. Reakce na typy extrakce je nahodilá.

5.1.3 Celková antioxidační aktivita

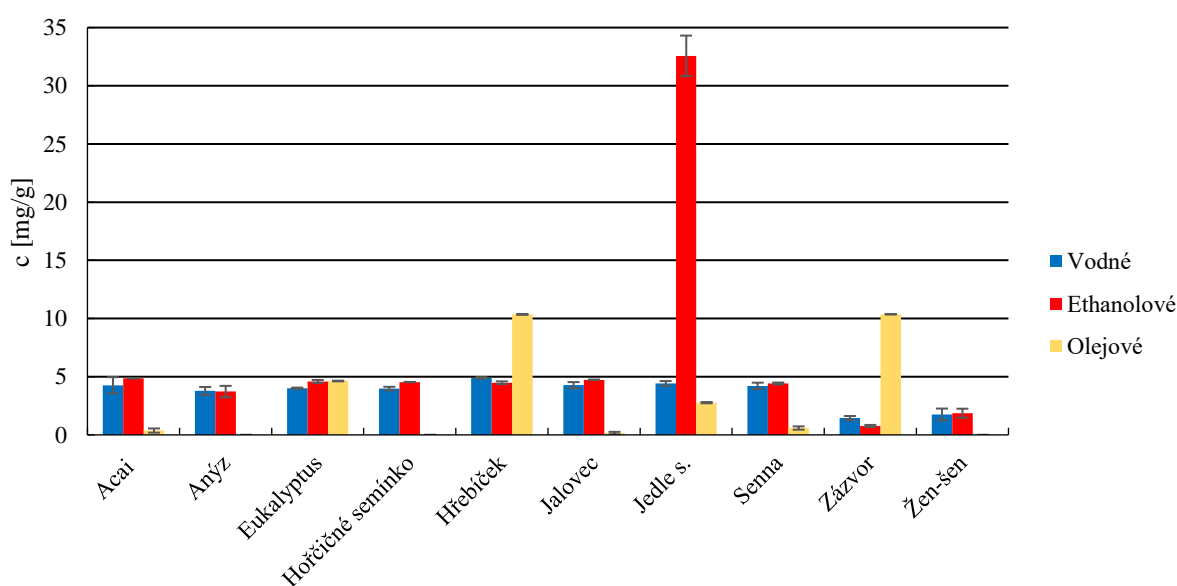
Pomocí postupu v kapitole 5.1.3 byla vytvořena kalibrační křivka, z níž byly následně vypočítány koncentrace antioxidačních látek jako ekvivalent Troloxu a následně přepočítáno na počet miligramů na gram rostliny. Měření probíhalo spektrofotometricky podle stejného návodu, jako probíhalo sestavení kalibrační závislosti. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát. Získané hodnoty byly zaprány do tabulky 4.



Obrázek 22: Kalibrační závislost antioxidační aktivity Troloxu

Tabulka 4: Získané koncentrace antioxidantů na gram rostliny

Rostlina	Vodné extrakty c [mg/g]	Ethanolové extrakty c [mg/g]	Olejové extrakty c [mg/g]
Acai berry	4,3 ± 0,7	4,86 ± 0,02	0,37 ± 0,18
Anýz vonný	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,5	0 ± 0
Eukalyptus	4,01 ± 0,05	4,59 ± 0,13	4,06 ± 0,03
Hořčičné semínko	3,98 ± 0,15	4,539 ± 0,013	0 ± 0
Hřebíček	4,90 ± 0,07	4,48 ± 0,12	10,351 ± 0,009
Jalovec obecný	4,3 ± 0,3	4,737 ± 0,004	0,15 ± 0,11
Jedle	4,4 ± 0,2	32,6 ± 1,7	2,77 ± 0,05
Senna	4,2 ± 0,3	4,42 ± 0,08	0,59 ± 0,14
Zázvor	1,5 ± 0,2	0,76 ± 0,09	10,366 ± 0,009
Žen-šen	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,4	0 ± 0



Obrázek 23: Množství antioxidantů v rostlinných extraktech

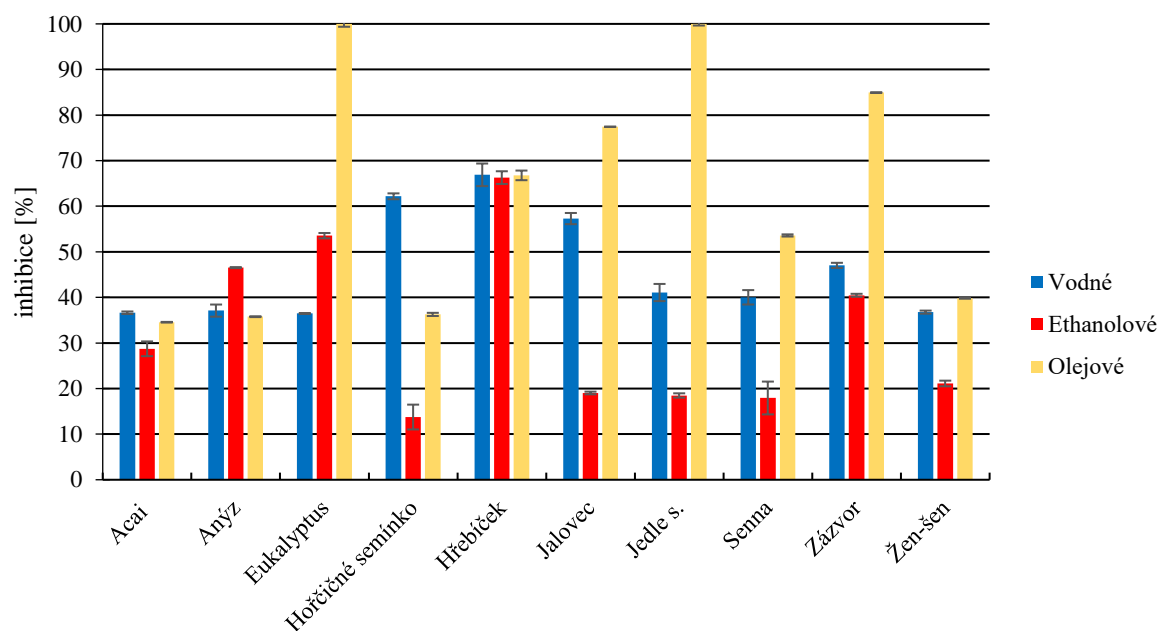
Z obrázku 23 je možné vyčíst, že připravené extrakty nemají příliš velkou antioxidační aktivitu, když nezahrneme ethanolový extrakt jedle, jež dosáhl poměrně vysoké antioxidační aktivity, taktéž olejové extrakty hřebíčku a zázvoru vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu. Mimo již zmíněných dvou olejových extraktů, měly nejnižší antioxidační aktivitu právě olejové extrakty, u nichž v některých případech nebyla detekována žádná antioxidační aktivita.

U většiny extraktů je poměr mezi extrahovanými antioxidanty ve vodných a ethanolových extraktech téměř vyrovnán, tudíž se dá usuzovat, že na tento faktor opět nemá markantní vliv druh extrakce. Obsah antioxidantů je opět individuální.

5.1.4 Antimikrobiální účinky

Byl proveden antimikrobiální test na dvou typech vybraných bakterií. Jako zástupce grampozitivních bakterií byl vybrán kmen *Micrococcus luteus*, a jako zástupce gramnegativních *Serratia marcescens*. Testy byly provedeny diluční jamkovou metodou popsanou v kapitole 4.9.1. Na obou kmenech byly testovány jak vodné, ethanolové i olejové extrakty. Měření bylo několikrát opakováno, získané hodnoty byly způměrovány a zakresleny do níže vyobrazených grafů. Do grafů byly zakresleny koncentrace extraktů s nejvyšší antimikrobiální aktivitou.

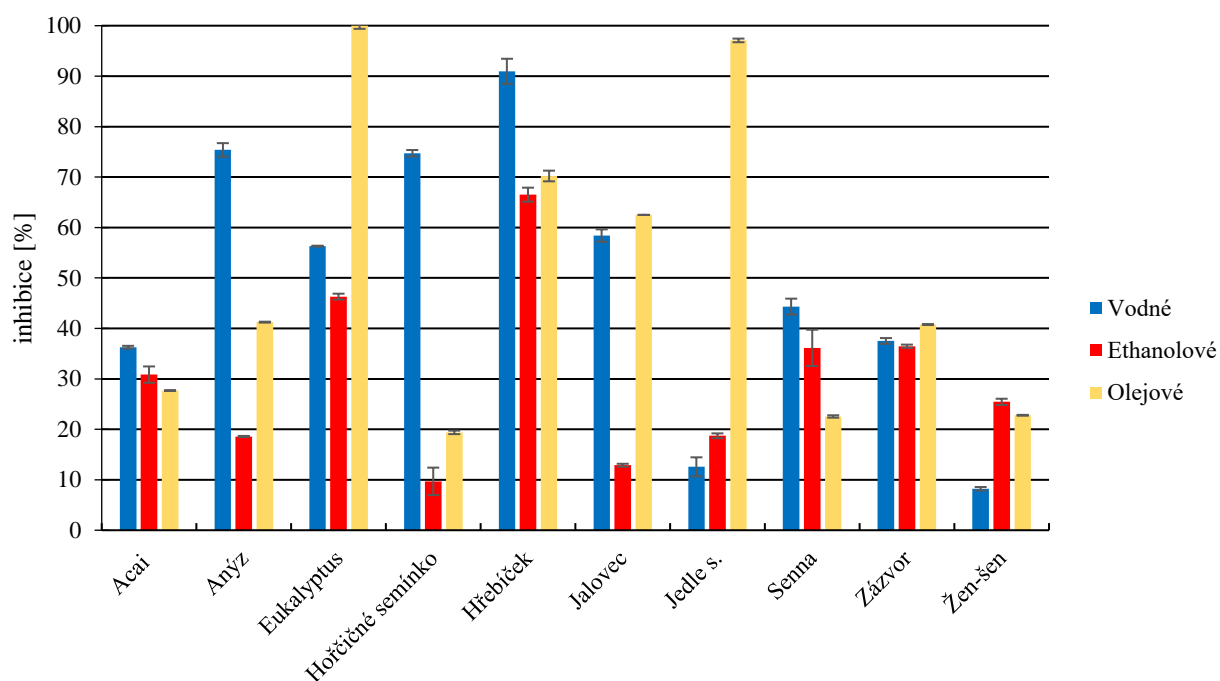
5.1.4.1 Kmen *Micrococcus luteus*



Obrázek 24: Přehled nejlepších výsledků inhibice

Jak už bylo řečeno, testy byly provedeny diluční bujónovou metodou. Ze získaných hodnot je patrné, že největší antimikrobiální aktivity dosahují olejové extrakty, kde bylo dosaženo ve dvou případech k inhibici 100 %, eukalyptový a olej z jedle. U zázvoru si můžeme výrazných zlepšení vlastností při extrakci do oleje, stejně jakou antimikrobiálních vlastností v případě oleje z eukalyptu a jedle. Co se týče hřebíčku, jeho antimikrobiální vlastnosti nejsou závislé na typu extrakce. Eukalyptový olej a olej z jedle taktéž vykazovaly i baktericidní aktivitu, u eukalyptu dosahovala až 5,8 %, v případě jedle 15,8 % oproti původní koncentraci buněk.

5.1.4.2 Kmen *Serratia marcescens*



Obrázek 25: Přehled nejlepších výsledků inhibice

Stejně jako v případě grampozitivní bakterie si můžeme povšimnout 100% inhibice eukalyptového oleje, ale obecně můžeme tvrdit, že procento inhibice je nejlepší v případě vodných extraktů. Nejhorších výsledků bylo dosaženo u ethanolových extraktů, ačkoli v některých případech byla procenta vyrovnána. Výrazné zlepšení inhibičních vlastností bylo získáno v případě jedlového oleje a oleje eukalyptu, taktéž jalovce, kde ale je výsledek vyrovnán s vodným extraktem. U eukalyptového oleje bylo taktéž dosaženo i baktericidního účinku, jež dosahoval 2,6 %.

5.2 Charakteristika liposomů

Postupem uvedeném v kapitole 4.6 byly připraveny liposomy z vodných, ethanolových i olejových extraktů, popřípadě jejich směsi. Následně byly liposomy zcharakterizovány.

5.2.1 Velikost liposomů

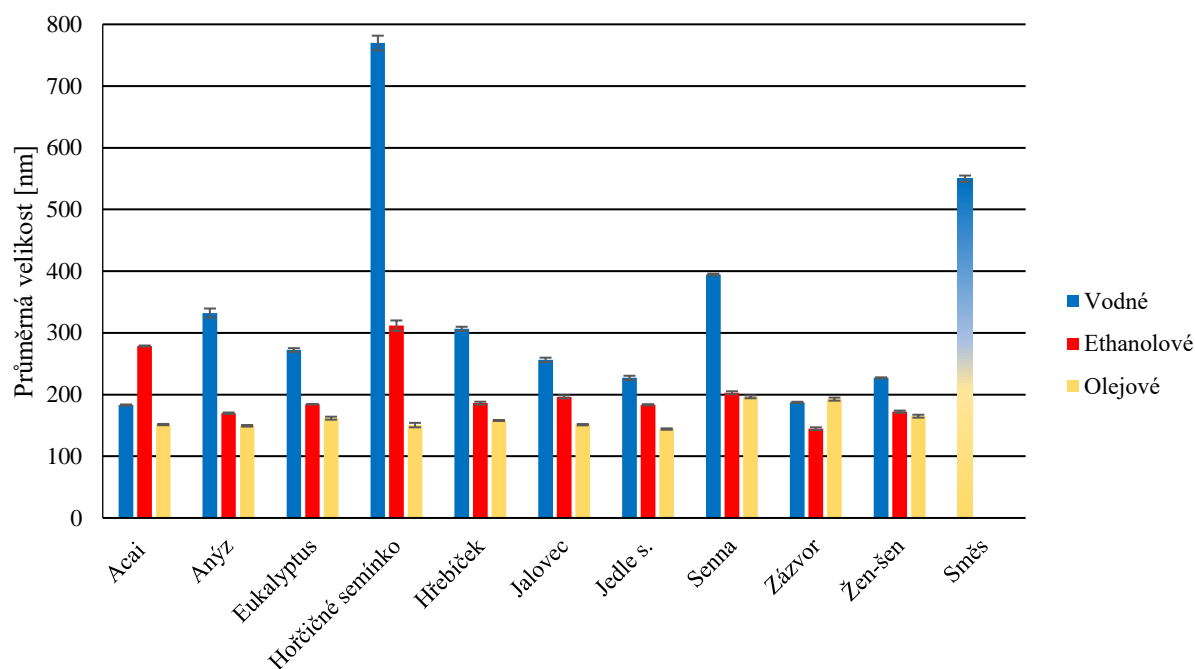
Stanovení velikosti liposomů bylo řízeno postupem z kapitoly 4.7.1. Každé měření bylo provedeno třikrát, výsledné hodnoty byly způměrovány a zapsány do *tabulky 5* a *tabulky 6*. V tabulkách můžete vidět jak průměrné velikosti, tak i hodnoty polydisperzivity systémů. Byl sestrojen graf, který můžete vidět na *obrázku 26*, pro celkovou přehlednost.

Tabulka 5: Průměrná hodnota distribuce velikostí a průměrné velikosti liposomů vodných a ethanolových

Rostlina	Vodné extrakty		Ethanolové extrakty	
	PdI	Ø velikost [nm]	PdI	Ø velikost [nm]
Acai berry	0,201 ±0,019	182,9±0,9	0,43±0,04	278,6±0,9
Anýz vonný	0,489 ±0,014	332,1±7,3	0,237±0,013	169,73±1,19
Eukalyptus	0,438 ±0,004	272±3	0,245±0,024	184,3±0,2
Hořčičné semínko	0,504 ±0,012	769,8±11,9	0,53±0,03	311,7±8,4
Hřebíček	0,454 ±0,007	306,6±3,3	0,249±0,005	186,1±2,3
Jalovec obecný	0,298 ±0,014	256,3±3,4	0,249±0,003	196,2±2,4
Jedle	0,3100 ±0,0012	227,2±3,3	0,261±0,012	183,5±0,9
Senna	0,47 ±0,03	187,3±1,4	0,371±0,005	202,9±2,5
Zázvor	0,227 ±0,014	187±1	0,202±0,008	144,7±2,2
Žen-šen	0,241 ±0,0012	227,0±0,9	0,231±0,005	172,3±1,8

Tabulka 6: Průměrná hodnota distribuce velikostí a průměrné velikosti liposomů olejových a vybrané směsi

Rostlina	Olejové extrakty		Směs olej z acaie a vodného jalovce	
	PdI	Ø velikost [nm]	PdI	Ø velikost [nm]
Acai berry	0,131±0,010	151,37±1,07	0,62 ±0,08	549,83 ±5,09
Anýz vonný	0,115±0,019	149,4±1,3		
Eukalyptus	0,175±0,013	161,7±2,4		
Hořčičné semínko	0,167±0,014	150,5±3,6		
Hřebíček	0,184±0,006	158,0±0,6		
Jalovec obecný	0,116±0,023	151,2±1,05		
Jedle	0,154±0,020	144,20±1,15		
Senna	0,218±0,011	196,23±2,2		
Zázvor	0,205±0,009	192,6±2,5		
Žen-šen	0,146±0,017	164,56±2,3		



Obrázek 26: Průměrné velikosti připravených liposomů

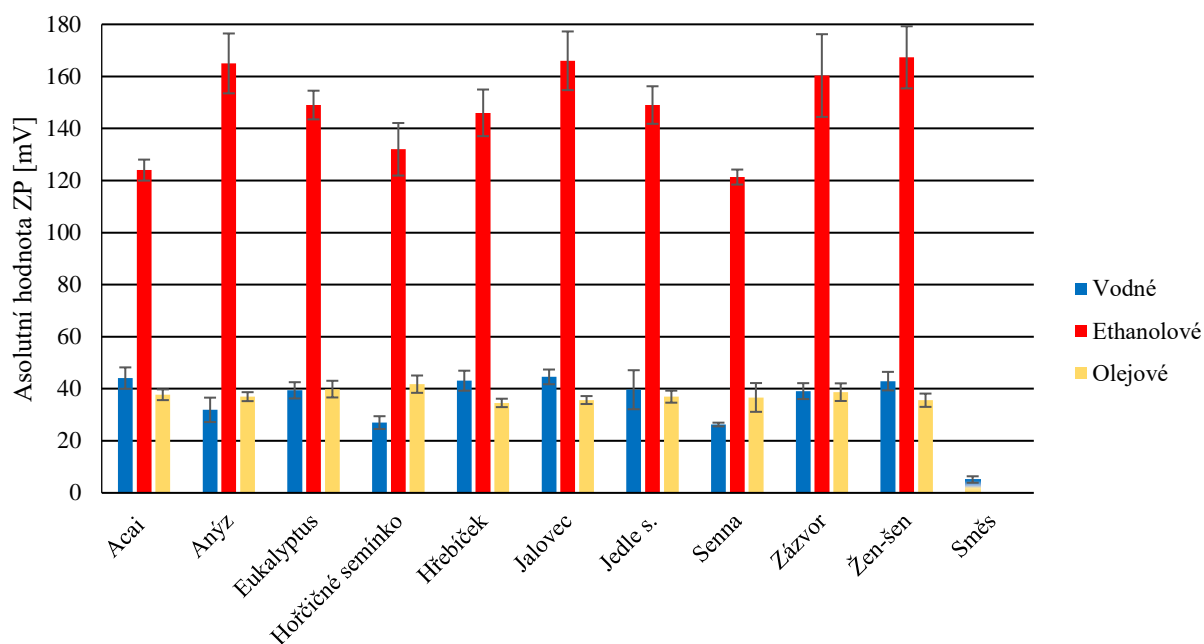
Z výsledků je patrné, že největších liposomů dosahujeme u vodných extraktů, což může zapříčinit velké množství antimikrobiálních látek. Již v předchozích stanoveních jsme mohli postřehnout velké množství fenolických a flavonoidních látek ve vodných extraktech. Nejvíce je tento fakt viditelný u hořčičného semínka s velikostí $769,8 \pm 11,9$ nm, následně u liposomu, kde byl zkombinován vodný extrakt jalovce a olejový acaie. Acai jako jediná má největší liposomy ethanolové, u níž nejlepšími výsledky dosahoval právě ethanolový extrakt.

5.2.2 Stanovení stability částic

Stanovení stability liposomů bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.7.1, přičemž každé měření bylo provedeno třikrát. Měření byla zprůměrována a jejich hodnoty byly zapsány do přehledné tabulky 7 a vyobrazeny v grafu na obrázku 27.

Tabulka 7: Stabilita liposomů

Rostlina	Vodné extrakty	Ethanolové extrakty	Olejové extrakty	Směs
	ZP [mV]	ZP [mV]	ZP [mV]	ZP [mV]
Acai berry	-44 ± 4	-124 ± 4	$-37,7 \pm 2,1$	$-5,14 \pm 1,24$
Anýz vonný	-32 ± 5	-165 ± 12	$-37,0 \pm 1,7$	
Eukalyptus	-39 ± 3	-149 ± 6	-40 ± 3	
Hořčičné semínko	-27 ± 2	-132 ± 10	-42 ± 3	
Hřebíček	-43 ± 4	-146 ± 9	$-34,6 \pm 1,6$	
Jalovec obecný	-45 ± 3	-166 ± 11	$-35,7 \pm 1,5$	
Jedle	-40 ± 7	-149 ± 7	$-37,0 \pm 2,3$	
Senna	$-26,3 \pm 0,7$	-121 ± 3	-37 ± 6	
Zázvor	-39 ± 3	-160 ± 16	-39 ± 3	
Žen-šen	-43 ± 4	-167 ± 12	$-35,6 \pm 2,6$	



Obrázek 27: Distribuce hodnot ZP

Většina literatury udává hodnoty zeta potenciálu menší než -30 mV a zároveň vyšší 30 mV přisuzujeme stabilním částicím, jež netvoří agregáty. Z tabulky 7 a grafu na obrázku 27 můžeme vyčíst, zda vytvořené částice jsou stabilní, či nikoliv. V grafu byly hodnoty pro přehlednost udány v absolutní hodnotě. Nejvyšší stability dosahují liposomy připravené z ethanolových extraktů, jejichž hodnoty jsou poměrně vysoké. Oproti tomu liposomy z vodných extraktů ani zdaleka takové stability nedosahují, což opět můžeme přisuzovat velkému množství aktivních látek, jež mohou tvořit agregáty. Zeta potenciály liposomů z vodných a olejových extraktů jsou poměrně vyrovnané. Nejnižší hodnoty dosahují liposomy z vodného extraktu jalovce

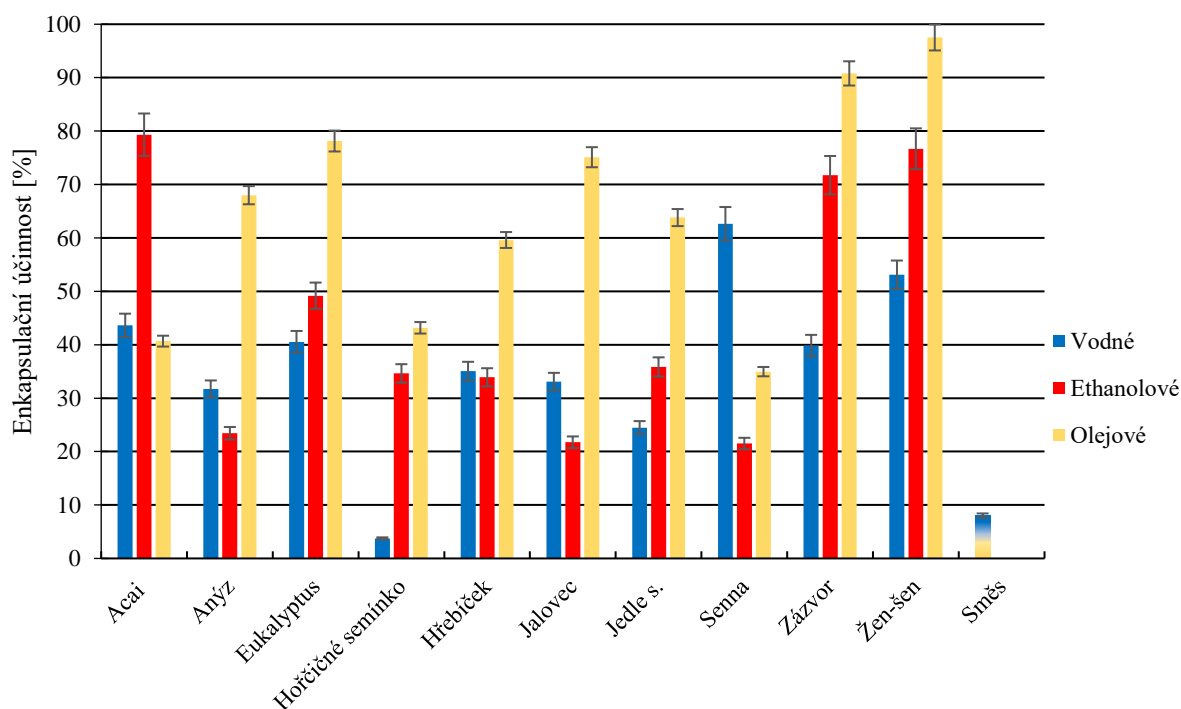
a olejového extraktu acaie, která dosahuje pouze hodnoty $-5,14 \pm 1,24$ mV. U ethanolových extraktů bylo dosaženo stabilních vyrovnaných hodnoty ZP, přičemž nejvyšší stability dosahuje žen-šen s hodnotou -167 ± 12 mV.

5.2.3 Enkapsulační účinnost

Stanovení enkapsulační účinnosti probíhalo podle postupu v kapitole 4.7.2, jež byla stanovena u liposomů z vodných, ethanolových i olejových extraktů, případně jejich směsí. Účinnost byla stanovena v %, jako rozdíl fenolických látek v supernatantu a výchozím extraktu. Každé měření bylo opakováno, ze získaných hodnot byl vypočítán průměr, který byl použit pro následné výpočty. Pro přehlednost byl sestrojen graf, jenž je vyobrazen na obrázku 28.

Tabulka 8: *Enkapsulační účinnost liposomů v procentech a koncentrace enkapsulovaných fenolických látek*

Rostlina	Vodné extrakty		Ethanolové extrakty		Olejové extrakty	
	c [mg/ml]	EU [%]	c [mg/ml]	EU [%]	c [mg/ml]	EU [%]
Acai berry	0,8	43,6	4,04	79,3	0,17	40,7
Anýz vonný	1,24	31,7	0,4	24,43	0,3	68
Eukalyptus	0,98	40,6	2,9	49,18	2,7	78,14
Hořčičné semínko	0,06	3,8	0,98	34,6	0,14	43,17
Hřebíček	6,3	35,06	6,6	33,9	10,23	59,6
Jalovec obecný	0,7	33,09	0,4	21,8	0,4	75,11
Jedle	0,4	24,5	1,4	35,9	4,5	63,8
Senna	3,7	62,7	0,6	21,5	0,07	35
Zázvor	0,6	39,9	1,16	71,8	6,6	90,8
Žen-šen	0,4	53,11	2,04	76,7	0,9	97,5
Směs	1,21	8,02				



Obrázek 28: *Enkapsulační účinnost připravených částic*

Z výsledků můžeme vyčíst, že nejvyšší enkapsulační účinnost můžeme vidět u olejových liposomů, kde se účinek blíží téměř 100 %. Jedinou výjimkou je acai, kde opět nejlepších výsledků dosáhly liposomy ethanolové. Nejvyšší procento je přisuzováno žen-šenu, kde bylo dosaženo 97,5 % enkapsulace účinné látky. Oproti tomu nejnižšího procenta bylo dosaženo u hořčičného semínka, kde bylo dosaženou enkapsulační účinnosti pouze 3,8 %. Obecně můžeme říci, že nejnižšího procenta enkapsulace bylo dosaženo u vodných extraktů, mimo

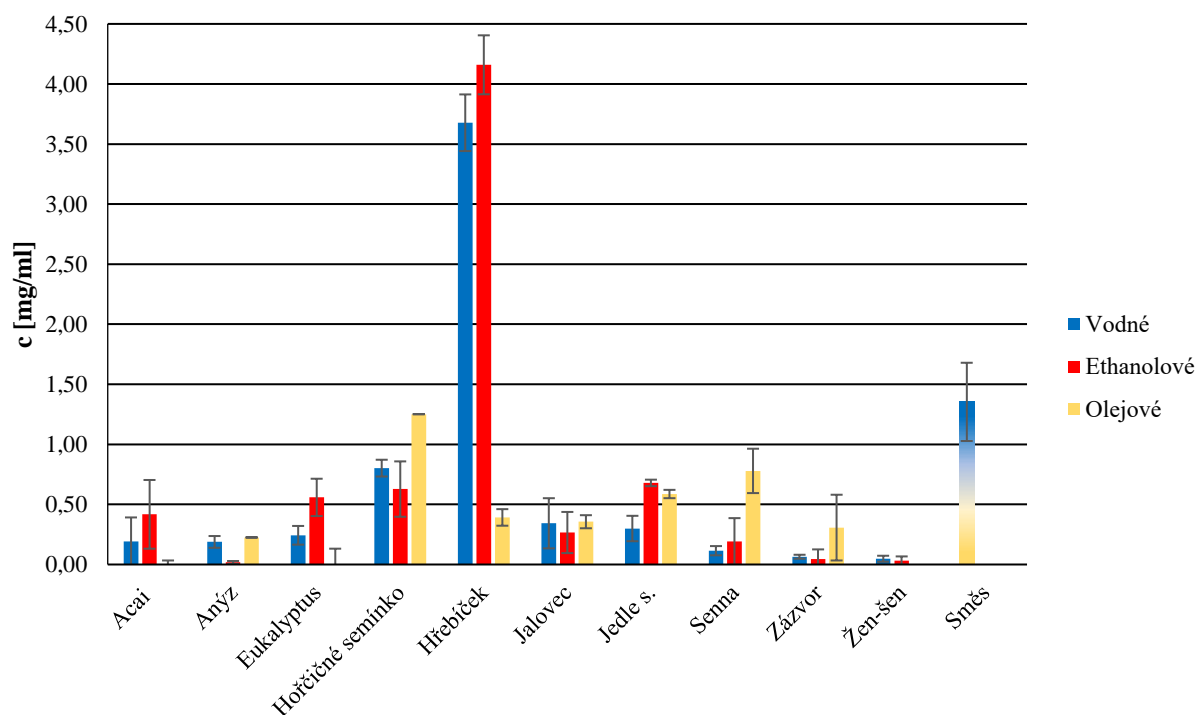
senny a anýzu, kde pro změnu bylo nízké procento enkapsulace u liposomů z ethanolových extraktů.

5.2.4 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita liposomů byla stanovena stejně jako v předchozím případě, pomocí návodu v kapitole 5.1.3. Získané hodnoty absorbance byly přepočítány jako ekvivalent Troloxu a zapsána do *tabulky 9*. Stejně jako v předchozích vyhodnoceních byl vykreslen graf, který můžete nalézt na *obrázku 29*. Každé měření bylo opakováno, výsledné hodnoty způměrovány, z průměrných hodnot vypočítána koncentrace.

Tabulka 9: Množství antioxidantní aktivity liposomů přepočítané na ekvivalent Troloxu

Rostlina	Vodné extrakty c [mg/ml]	Ethanolové extrakty c [mg/ml]	Olejové extrakty c [mg/ml]
Acai berry	0,19±0,02	0,4±0,3	0,03±0,03
Anýz vonný	0,115±0,05	0,017±0,012	0±0
Eukalyptus	0,24±0,08	0,56±0,16	0,23±0,13
Hořčičné semínko	0,80±0,07	0,63±0,23	0±0
Hřebíček	3,68±0,24	4,2±0,25	1,25±0,13
Jalovec obecný	0,34±0,21	0,27±0,18	0,39±0,07
Jedle	0,30±0,11	0,768±0,03	0,36±0,05
Senna	0,115±0,039	0,19±0,19	0,58±0,05
Zázvor	0,06±0,02	0,05±0,03	0,8±0,3
Žen-šen	0,05±0,02	0,03±0,03	0,3±0,2
Směs:	1,4 ± 0,3		



Obrázek 29: Antioxidanty –liposomy

Obecně ze získaných hodnot je patrné, že antioxidační aktivita liposomů je nízká. Důvodem může být stabilita vyrobených liposomů, čehož jsme chtěli docílit. Důvodem přípravy liposomů je uchovat a zvýšit stabilitu aktivních komplexů. Nízká antioxidační aktivita se může s postupem času měnit, neboť po čase dochází k rozpadu fosfolipidového obalu a uvolnění aktivních látek do prostředí.

5.2.5 Antimikrobiální aktivita

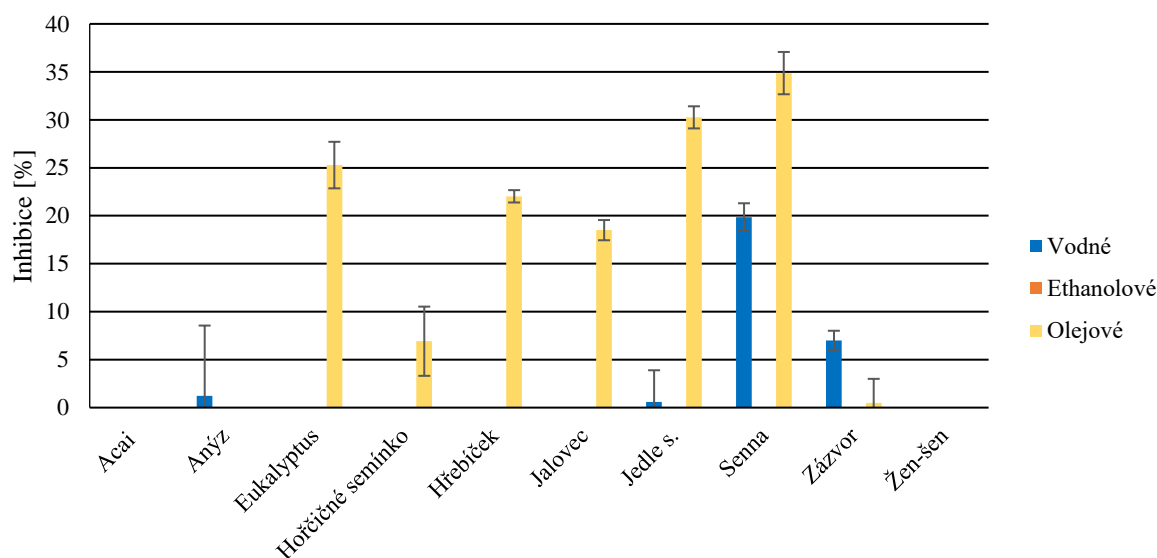
Stejně jako u připravených extraktů byly provedeny antimikrobiální testy na dvou typech vybraných bakterií. Jako zástupce grampozitivních bakterií byl vybrán kmen *Micrococcus luteus*, a jako zástupce gramnegativních *Serratia marcescens*. Testy byly provedeny diluční jamkovou metodou popsanou v kapitole 4.9.1. Souběžně byly prováděny testy na obou kmenech. Na obou kmenech byly testovány jak vodné, ethanolové či olejové liposomy.

5.2.5.1 Kmen *Micrococcus luteus*

V případě testování na kmeni *Micrococcus luteus* nebylo dosaženo viditelných výsledků antimikrobiální činnosti. Ale z předchozích výsledků můžeme vyvodit, že tento výsledek je způsoben stabilitou fosfolipidového obalu a pomalého uvolňování účinných látek do okolí. Jelikož testy byly provedeny pouze v časovém úseku jednoho dne, tak při postupném uvolňování účinných látek můžeme dosáhnout viditelných výsledků při delší inkubaci s mikroorganismy.

5.2.5.2 Kmen *Serratia marcescens*

Stejně jako předchozím případem byly testy provedeny diluční bujónovou metodou uvedenou v kapitole 4.9.1. Výsledky byly pro přehlednost zakresleny do grafu na obrázku 30.



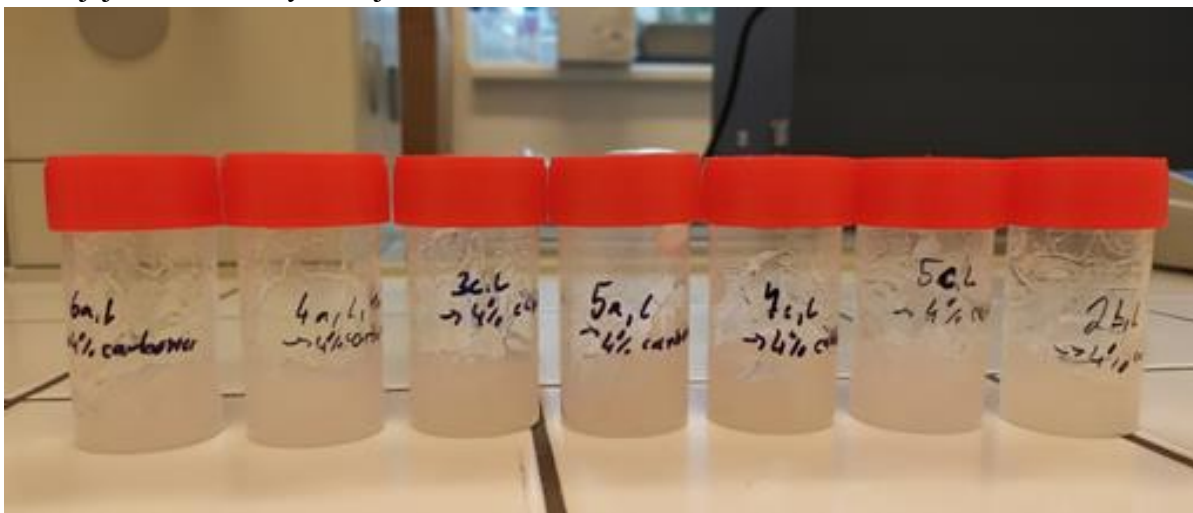
Obrázek 30: Inhibice liposomů u kmene *Serratiamarcescens*

V případě gramnegativního kmene *Serratia marcescens* bylo již dosaženo viditelných výsledků inhibiční účinnosti, které můžete pozorovat v grafu na obrázku 30, kde nejlépe dopadly liposomy s obsahem olejů. A pouze v případě zázvoru, jedle, anýzu a senny bylo dosaženo viditelných výsledků i u vodných extraktů. Procenta inhibice liposomů z extraktů ethanolových byla nulové. Ale z předchozího měření víme, že tyto liposomy se těšily vysoké

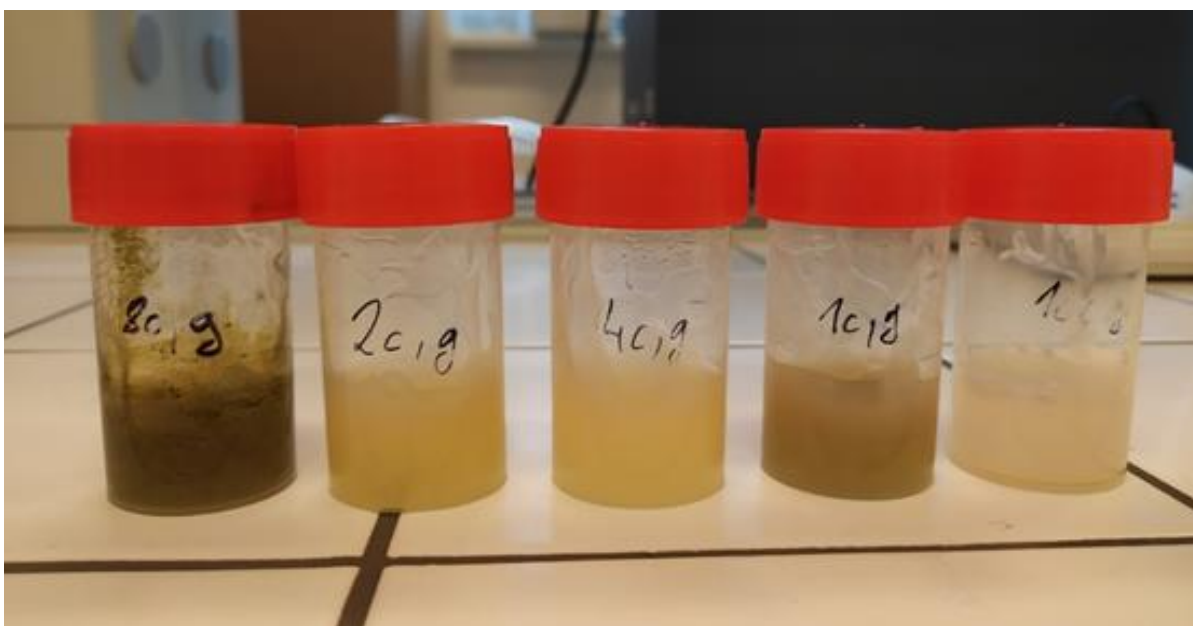
stabilitě. Nejlépe dopaly liposomy z olejového extraktu senny, kde byla inhibice přes 35 %. U acaie, žen-šenu i směsi nebylo dosaženo žádných výsledků inhibice.

5.3 Charakterizace gelů

Gely byly připraveny pomocí postupu v kapitole 4.10. z vybraných typů extraktů a jejich liposomů. Následně byly zkoumány jejich vlastnosti, jako jsou barva vůně, jež by mohly ovlivnit jejich budoucí využití, jak ve farmacii, tak i kosmetice.



Obrázek 31: Připravené gely z vybraných druhů liposomů



Obrázek 32: Připravené druhy gelů s vybranými olejovými extrakty

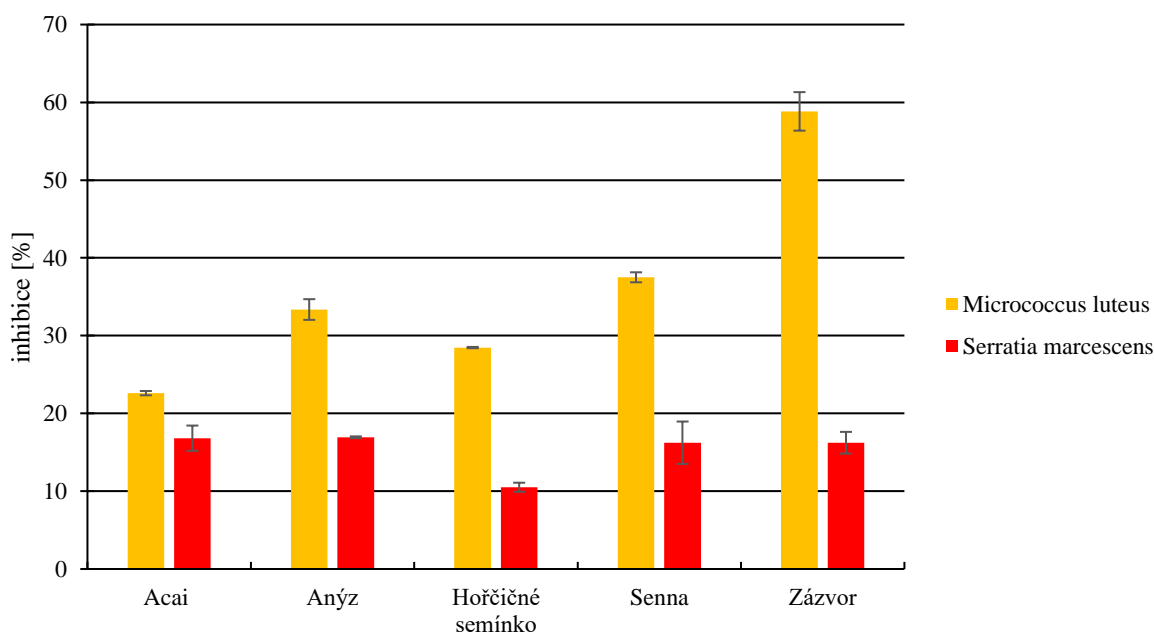
Na obrázku 31 a obrázku 32 můžeme vidět připravené gely z vybraných druhů liposomů a olejových extraktů. Olejové extrakty byly vybrány pro jejich jedinečné antimikrobiální vlastnosti, zatímco liposomové gely byly připraveny z důvodu dlouhodobější stability komplexů účinných látek. Konkrétně byly použity liposomy z vodného extraktu hořčičného semínka, hřebíčku a jalovce, z ethanolových liposomů byl vybrán anýz, a z olejových liposomů eukalyptus, hřebíček a jedle. Gely z liposomů neoplývaly výraznou barvou a ani vůní, pouze gely z liposomů vyrobených z olejových extraktů, které měly jemnou vůni původní byliny.

Gely z olejových extraktů z acaie, anýzu, hořčičného semínka, senny a zázvoru byly vytvořeny pro jejich antimikrobiální vlastnosti, jemnou vůni a schopnosti hydratace.

Celkem bylo vyrobeno 12 různých gelů.

5.3.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita byla opět testována diluční bujónovou metodou popsanou v kapitole 4.9.1. Kdy u gelů z liposomů bylo dosaženo minimální inhibice v růstu mikroorganismů. Gely s oleji měly ekvivalentní výsledky jako při testování samotných olejů, viz 5.1.4, výsledná inhibice byla nižší z důvodu zředění olejů gelovou složkou, *obrázek 33*. Tudíž jejich antimikrobiální účinky mohou být odvozeny od jejich přírodní složky.



Obrázek 33: Antimikrobiální aktivita gelů s olejovou složkou

5.4 Shrnutí antimikrobiálních testů

Pro přehlednost byly vytvořeny níže uvedené tabulky, které shrnují účinnost připravených extraktů, liposomů a gelů proti růstu mikroorganismů. Značení bylo použito dle *tabulky 10*. Značením „-“ byly označeny látky neúčinné, „+“ málo účinné, „++“ středně účinné, „+++“ velmi účinné a „++++“ maximálně účinné.

Tabulka 10: Značení procenta inhibice růstu mikroorganismů

Inhibice	Značení
0-5 %	-
5-25 %	+
26-50 %	++
51-75 %	+++
76-100 %	++++

Tabulka 11: Inhibice růstu *micrococca lutea* vlivem připravených extraktů a liposomů

Rostlina	Extrakty			Liposomy		
	Vodné	Ethanolové	Olejové	Vodné	Ethanolové	Olejové
Acai	++	++	++	-	-	-
Anýz	++	++	++	-	-	-
Eukalyptus	++	+++	++++	-	-	-
Hořčičné semínko	+++	+	+++	-	-	-
Hřebíček	+++	+++	+++	-	-	-
Jalovec	+++	+	++++	-	-	-
Jedle	++	+	++++	-	-	-
Senna	++	+	+++	-	-	-
Zázvor	++	++	++++	-	-	-
Žen-šen	++	+	++	-	-	-

Tabulka 12: Inhibice růstu *micrococca lutea* vlivem připravených gelů

Rostlina	Gely s liposomy			Gely
	Vodné	Ethanolové	Olejové	Oleje
Acai				+
Anýz		-		++
Eukalyptus			-	
Hořčičné semínko	-			++
Hřebíček	-		-	
Jalovec	-			
Jedle			-	
Senna				+++
Zázvor				++
Žen-šen				

Tabulka 13: Inhibice růstu *serratie marcescens* vlivem připravených extraktů a liposomů

Rostlina	Extrakty			Liposomy		
	Vodné	Ethanolové	Olejové	Vodné	Ethanolové	Olejové
Acai	++	++	++	-	-	-
Anýz	+++	+	++	-	-	-
Eukalyptus	+++	++	++++	-	-	++
Hořčičné semínko	+++	+	+	-	-	+
Hřebíček	++++	+++	+++	-	-	+
Jalovec	+++	+	+++	-	-	+
Jedle	+	+	++++	-	-	++
Senna	++	++	+	+	-	++
Zázvor	++	++	++	+	-	-
Žen-šen	+	++	+	-	-	-

Tabulka 14: Inhibice růstu *Serratia marcescens* vlivem připravených gelů

Rostlina	Gely s liposomy			Gely
	Vodné	Ethanolové	Olejové	Oleje
Acai				+
Anýz		-		+
Eukalyptus			+	
Hořčičné semínko	-		-	+
Hřebíček	-			
Jalovec	-			
Jedle			+	
Senna				+
Zázvor				+
Žen-šen				

Můžeme říci, že nejlepšími výsledky dosáhly olejové extrakty z eukalyptu a jedle, jež dosáhly maximální účinnosti proti růstu obou typů mikroorganismů. Velmi dobrých výsledků, které byly konstantní pro jakýkoliv typ extrakce, bylo docíleno u hřebíčku. Také vodný a olejový extrakt jalovce, vodný extrakt hořčičného semínka s podobnou účinností u obou typů bakterií. U ostatních typů extraktů bylo docíleno různých inhibic růstu u rozdílných skupin bakterií, jak už jsme dříve zjistili v předchozích kapitolách, tak druh extrakce má vliv na množství vyextrahovaných látek, jež způsobují antimikrobiální i antioxidační aktivitu daných rostlin.

Naopak liposomy vykazují minimální antimikrobiální aktivitu proti inkubovaným bakteriím, ačkoliv nejvyšší inhibice bylo docíleno v případě olejových liposomů testovaných na *Serratia marcescens*, u nichž byla nalezena i střední účinek. Ale tento fakt může poukazovat na stabilitu připravených částic.

Připravené gely nevyhazovaly příliš velkou antimikrobiální aktivitu, ale to může být způsobeno naředěním ve struktuře gelu a také stabilitou přidaných liposomálních částic.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na zkoumání antimikrobiálních vlastností vybraných rostlin, jakožto alternativy k antibiotikům. Zároveň bylo cílem předložené práce využití vybraných rostlinných antimikrobiálních extraktů pro aplikace do gelů k zevnímu použití.

Celkem bylo vybráno 10 bylin, z nichž byly vyrobeny 3 druhy extraktů, a to vodný, ethanolový a olejový. Každý extrakt byl nejprve otestován na obsah fenolických látek a jejich antioxidační aktivitu. Z těchto extraktů byly nadále vyrobeny liposomy, především za účelem stabilizace antimikrobiálních látek, jež mohou být strukturně labilní a podléhají vlivem vnějších faktorů destrukci a následné nefunkčnosti.

Extrakty byly připraveny z acaie, anýzu, eukalyptu, hořčičného semínka, hřebíčku, jalovce, jedle, senny, zázvoru a žen-šenu. Obsahem fenolických látek vynikal hřebíček, jenž obsahoval $130,9 \pm 2,4$ mg/g fenolických látek za použití vodné extrakce, jeho olejový pak dosáhl koncentrace $112,5 \pm 1,1$ mg/g fenolických látek. V případě stanovení obsahu flavonoidů byla nejvyšší koncentrace dosažena u vodného extraktu hořčičného semínka ($18,9 \pm 0,6$ mg/g) a hřebíčku ($18,5 \pm 0,4$ g/mg). V případě antioxidační aktivity byla nejvyšší hodnota detekována u jedle v ethanolovém extraktu, zde byla stanovena koncentrace $32,6 \pm 1,7$ mg/g antioxidantů na gram rostliny.

Následně byly připraveny liposomové částice s obsahem testovaných extraktů. U částic byla změřena jejich velikost, stabilita, která byla charakterizována pomocí zeta potenciálu, enkapsulační účinnost a antioxidační aktivita. Distribuce velikostí připravených liposomových částic se pohybovaly v rozmezí od 100 až do 800 nm. A ve většině případů, byly připravené částice stabilní. Nejvyšší hodnota zeta potenciálu bylo dosaženo především u liposomů obsahujících ethanolové extrakty, kde byla naměřena zcela nejvyšší absolutní hodnota zeta potenciálu u žen-šenu (167 ± 12 mV). Dále byla u částic stanovena enkapsulační účinnost fenolických látek. Nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo obecně dosaženo u lipidických extraktů, kde liposomy dosahovaly v některých případech téměř 100 % enkapsulační úspěšnosti, žen-šen (97,5 %), zázvor (90,8 %). Testována byla i antioxidační aktivita připravených liposomů a nejvyšší hodnota byla zjištěna u liposomů s enkapsulovaným ethanolovým extraktem hřebíčku, $4,2 \pm 0,25$ mg/ml.

Všechny připravené extrakty i liposomy s obsahem těchto extraktů byly podrobeny také testům antimikrobiální aktivity. Antimikrobiální aktivita byla sledována vůči grampozitivnímu kmenu *Micrococcus luteus* a gramnegativnímu kmenu *Serratia marcescens*. Nejvyšší míry inhibice mikroorganismů bylo dosaženo v případě eukalyptového oleje, kdy byla u obou kmenů stanovena 100% inhibiční účinnost. V případě kmene *Micrococcus lutea* byla 100% antimikrobiální aktivita stanovena i u lipidického extraktu z jedle. Ve srovnání s neenkapsulovanými extrakty pak liposomy nevykazovaly téměř žádnou antimikrobiální aktivitu, což však může svědčit i o stabilitě připravených částic a pomalém uvolňování aktivních látek.

Na závěr práce byly vybrány nejúčinnější částice a oleje byly zakomponovány do struktury gelu. Konkrétně byly použity liposomy z vodného extraktu hořčičného semínka, hřebíčku a jalovce, ethanolového extraktu anýzu, a olejových extraktů eukalyptu, hřebíčku a jedle. Dále

byly použity oljeje z acaie, anýzu, hořčičného semínka, senny a zázvoru. Tímto byly vyrobeny gely s antimikrobiální složkou, jež by mohly nalézt uplatnění ve farmacii, jako alternativa k antibiotikům s vnějším aplikací, nebo kosmetice.

7 ZDROJE:

- [1] *ACS Synthetic Biology*. 2012, **2**(7). ISSN 2161-5063. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/sb300101g>
- [2] COWAN, M. M.: Plant products as microbial agents, *Clin. Microbiol. Reviews*, 1999, vol. 12, no. 4, s. 564 – 582
- [3] TIWARI, Brijesh K., Vasilis P. VALDRAMIDIS, Colm P. O' DONNELL, Kasiviswanathan MUTHUKUMARAPPAN, Paula BOURKE a P. J. CULLEN. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(14), 5987-6000. DOI: 10.1021/jf900668n. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf900668n>
- [4] CHANDER, Yogesh, Satish C GUPTA, Sagar M GOYAL a Kuldip KUMAR. Antibiotics: Has the magic gone? *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007, **87**(5), 739-742. DOI: 10.1002/jsfa.2764. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2764>
- [5] ŠUTA, Miroslav. Biocidy - revize politiky Evropské unie. *EKO - ekologie a společnost*. 2010, 21(2), 13-14.
- [6] RUBIN, B.A., Ye.V. ARTSIKHOVSKAYA, Sagar M GOYAL a Kuldip KUMAR. PLANT IMMUNITY: Has the magic gone? *Biochemistry and Physiology of Plant Immunity*. Elsevier, 1963, 1963, **87**(5), 140-279. DOI: 10.1016/B978-0-08-010190-3.50009-9. ISBN 9780080101903. ISSN 00225142. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080101903500099>
- [7] Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-33. Retrieved from <https://search-proquest-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/212310380?accountid=17115>
- [8] Grotewold, E. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. 274 p. ISBN-13: 978-0387-28821-5.
- [9] OLAGARAY, K.E. a B.J. BRADFORD. Plant flavonoids to improve productivity of ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 2019, 2019(251), 21-36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.02.004>. ISSN 0377-8401.
- [10] Velíšek, J., *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368 S. ISBN 80-86659-02-X.
- [11] Patel, Vaidehi & Patel, Rajesh. (2016). The active constituents of herbs and their plant chemistry, extraction and identification methods. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2016. 1423-1443.
- [12] Kumar Ashok, Praveen & Upadhyaya, Kumud. (2012). Tannins are astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1. 45-50.
- [13] 1946-, Velíšek, Jan., *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. vyd. Tábor: OSSIS 2 sv. s. Dostupné online. ISBN 9788086659176, ISBN 8086659178. OCLC 505915318
- [14] REE, Teunis van; KHANBABAEE, Karamali. Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*. 2001-12-11, roč. 18, čís. 6, s. 641–649. Dostupné online. ISSN 1460-4752. DOI: 10.1039/B101061L.

- [15] OPLETAL, L., ŠIMERDA, B.: Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv, Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat, 2005, s. 27 – 37.
- [16] JIRÁSEK, V., STARÝ, F. Atlas léčivých rostlin. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 504 s. ISBN 08-010-90
- [17] MORAVCOVA, J.: Biologicky aktivní přírodní látky, VŠCHT Praha 2003, s. 11-91.
- [18] TROMBETTA, D., CASTELLI F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTIANI M., DANIELE C., SAIJA, A., MAZZANTI G., BISIQNANO, G.: Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrob. Agents chemotherapy*, 2005, vol. 49, no. 6, s. 2474- 2478
- [19] BOURGAUD, F., A. GRAVOT, S. MILESI, E. GONTIER, Paula BOURKE a P. J. CULLEN. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 2001, **161**(5), 839-851. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00490-3. ISSN 01689452. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945201004903>
- [20] WIART, Christophe, Ye.V. ARTSIKHOVSKAYA, Sagar M GOYAL a Kuldip KUMAR. Terpenes: Has themagic gone? *Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Neurodegenerative Diseases*. Elsevier, 2014, 2014, **87**(5), 189-284. DOI: 10.1016/B978-0-12-398373-2.00002-9. ISBN 9780123983732. ISSN 00225142. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123983732000029>
- [21] HEIJDEN, Robert, Denise JACOBS, Wim SNOEIJER, Didier HALLARD a Robert VERPOORTE. The Catharanthus Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*. Elsevier, 2004, 2014, **11**(5), 607-628. DOI: 10.2174/0929867043455846. ISBN 9780123983732. ISSN 09298673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123983732000029>
- [22] TENOVER, F C, J M SWENSON, C M O'HARA a S A STOCKER. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *Journal of clinical microbiology* [online]. 9506, 33(6), 1524. ISSN 00951137. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228208/>
- [23] WIEGAND, Irith, Kai HILPERT, Robert E W HANCOCK, E. GONTIER, Paula BOURKE a P. J. CULLEN. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances: a historical perspective. *Nature Protocols*. 2008, 3(2), 163-175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521. ISSN 1754-2189. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2007.521>
- [24] Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-29. doi:<http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.2174/0929867033457719>
- [25] Antimicrobial susceptibility testing protocols. (2007, 09). *Scitech Book News*, 31 Retrieved from <https://search-proquest-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/200147135?accountid=17115>
- [26] URBÁŠKOVÁ, Pavla. Standardní metody pro stanovení minimálních inhibičních a baktericidních koncentrací antibakteriálních preparátů. Praha: Institut hygieny a epidemiologie, 1982. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*.

- [27] CHANDRA, Priyanka, RakeshKumar SHARMA, DaljitSingh ARORA, Didier HALLARD a Robert VERPOORTE. Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food Research International*. Elsevier, 2020, 2014, **129**(5), 607-628. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108849. ISBN 9780123983732. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919307355>
- [28] MAQSOU DLOU, Atefe, Elham ASSADPOUR, Hossein MOHEBODINI, SeidMahdi JAFARI a Robert VERPOORTE. Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier, 2020, 2014, 278(5), 607-628. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102122. ISBN 9780123983732. ISSN 00018686. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868619304464>
- [29] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179.
- [30] MILLER, Nicholas J. THE FERRYLMYOGLOBIN/ABTS • ASSAY FOR MEASURING TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY. *Natural Antioxidants and Food Quality in Atherosclerosis and Cancer Prevention*. Elsevier, 1996, 1996, , 69-72. DOI: 10.1533/9780857093059.69. ISBN 9781855737945. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781855737945500213>
- [31] Polymer gels and networks: 44th Microsymposium of P.M.M., Prague, 10-14 July 2005 : programme booklet : on the occasion of 75th birthday of professor Karel Dušek. Prague: Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 2005. ISBN 80-85009-50-1.
- [32] LAPČÍK, Lubomír. Gelová forma hmoty jako základ materiálově-inženýrských prvků: teze přednášky k profesorskému jmenovacímu řízení v oboru Materiálové vědy a inženýrství. Brno: VUTIUM, 2002. Vědecké spisy Vysokého učení technického v Brně. Habilitační a inaugurační spisy. ISBN 80-214-2176-2.
- [33] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. Elsevier, 2011, 1, 1806-1815 DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- [34] LASIC, D. D. a Demetrios PAPAHADJOPOULOS. *Medical applications of liposomes*. New York: Elsevier, 1998. ISBN 978-0-444-82917-7.
- [35] <https://fineartamerica.com/featured/drug-delivery-liposome-alfred-pasieka.html?product=canvas-print>
- [36] <http://spacanada.ca/liposomes-good-skin/>
- [37] RAUT, Sushil, Santosh Singh BHADORIYA, Vaibhav UPLANCHIWAR, Vijay MISHRA, Avinash GAHANE a Sunil Kumar JAIN. Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Elsevier, 2012, 1996, **2**(1), 8-15. DOI: 10.1016/j.apsb.2011.12.005. ISBN 9781855737945. ISSN 22113835. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383511001079>
- [38] RACZYŃSKI, P., A. DAWID, A. PIĘTEK, Z. GBURSKI, Avinash GAHANE a Sunil Kumar JAIN. Reorientational dynamics of cholesterol molecules in thin film surrounded carbon nanotube: Molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Structure*.

- Elsevier, 2006, 1996, **792-793**(1), 216-220. DOI: 10.1016/j.molstruc.2006.01.064. ISBN 9781855737945. ISSN 00222860. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286006002134>
- [39] FANG, Zhongxiang a Bhesh BHANDARI. Encapsulation of polyphenols – a review. Trends in food science & technology [online]. 2010, 21(10), 510-523. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- [40] SOMASUNDARAN, P. Encyclopedia of surface and colloid science. 2nd ed. New York, c2006. ISBN 08-493-9615-8.
- [41] RICKWOOD, D., HAMES, B. D. Liposomes a practical approach. IRL-Press Oxford, 1990. pp. 420. ISBN 978-0-19-963654-9.
- [42] LASIC, D. D. Liposomes in gene delivery. CRC-Press, 1997. 320 p. Boca Raton. New York. ISBN 978-0849331091.
- [43] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [44] GOHAIN, Neelakshi. (2009). Studies on the structure and function of phenazine modifying enzymes PhzM and PhzS involved in the biosynthesis of pyocyanin. 10.17877/DE290R-8364.
- [45] © MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2003, 2004. Zetasizer Nano Series User Manual. 1.1. Anglie, 2004. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [46] TROGL. NÁVODY PRO CVIČENÍ Z MIKROBIOLOGIE. 2008. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/NavodyMikrobiologie.pdf>. Skriptum. UJEP.
- [47] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. Základy obecné mikrobiologie. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [48] GILLINGS, Michael R., Satish C GUPTA, Sagar M GOYAL, Kuldip KUMAR a Robert VERPOORTE. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome: Has the magic gone? *Frontiers in Microbiology*. Elsevier, 2013, 2014, 4(5), 739-742. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00004. ISBN 9780123983732. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00004/abstract>
- [49] KOHANSKI, Michael A., Daniel J. DWYER, James J. COLLINS, Seid Mahdi JAFARI a Robert VERPOORTE. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*. Elsevier, 2010, 2014, 8(6), 423-435. DOI: 10.1038/nrmicro2333. ISBN 9780123983732. ISSN 1740-1526. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2333>
- [50] CHANDER, Yogesh, Satish C GUPTA, Sagar M GOYAL, Kuldip KUMAR a Robert VERPOORTE. Antibiotics: Has the magic gone? *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Elsevier, 2007, 2014, 87(5), 739-742. DOI: 10.1002/jsfa.2764. ISBN 9780123983732. ISSN 00225142. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2764>
- [51] DELCOUR, Anne H., Satish C GUPTA, Sagar M GOYAL, Kuldip KUMAR a Robert VERPOORTE. Outer membrane permeability and antibiotic resistance: Has the magic gone? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. Elsevier,

- 2009, 2014, **1794**(5), 808-816. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005. ISBN 9780123983732. ISSN 15709639. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963908003592>
- [52] Džidic S., Šuškovc J., Kos B. (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technol. Biotechnol.* 46: 11-21.
- [53] Poole, Toni & Sheffield, Cynthia. (2013). Use and Misuse of Antimicrobial Drugs in Poultry and Livestock: Mechanisms of Antimicrobial Resistance. *Pakistan Veterinary Journal.* 33. 266-271.
- [54] *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* Elsevier, 2014, **70**(5). ISBN 9780123983732. ISSN 0916-8451. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.70.1060>
- [55] SUMMERS, Anne O., Ryoichi KATSUMATA, Sagar M GOYAL, Kuldip KUMAR a Robert VERPOORTE. Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic Multi-Resistance Problem: Has the magic gone? *Animal Biotechnology.* Elsevier, 2006, 2014, **17**(2), 125-135. DOI: 10.1080/10495390600957217. ISBN 9780123983732. ISSN 1049-5398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10495390600957217>
- [56] NUÑEZ, M., Ryoichi KATSUMATA, Sagar M GOYAL, Kuldip KUMAR a Robert VERPOORTE. Micrococcus: Has the magic gone? *Encyclopedia of Food Microbiology.* Elsevier, 2014, 2014, **17**(2), 627-633. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00206-8. ISBN 9780123847331. ISSN 1049-5398. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300002068>
- [57] MALDONADO, Juan. (2020). Selection Of Phototrophic Microorganisms For Use As Bioindicators Of Heavy Metals In Natural Environments. Optimization Of High-Resolution Microscopy Techniques.
- [58] HANAFY, Radwa A., M.B. COUGER, Kristina BAKER, et al. Draft genome sequence of *Micrococcus luteus* strain O'Kane implicates metabolic versatility and the potential to degrade polyhydroxybutyrates: Molecular dynamics simulations. *Genomics Data.* Elsevier, 2016, 1996, **9**(1), 148-153. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.08.006. ISBN 9781855737945. ISSN 22135960. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213596016301027>
- [59] RAFII, F., Ryoichi KATSUMATA, Sagar M GOYAL, Kuldip KUMAR a Robert VERPOORTE. Serratia: Has the magic gone? *Encyclopedia of Food Microbiology.* Elsevier, 2014, 2014, **17**(2), 371-375. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00304-9. ISBN 9780123847331. ISSN 1049-5398. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300003049>
- [60] CHO, Gyu-Sung, Maria STEIN, Erik BRINKS, Jana RATHJE, Woojung LEE, Soo Hwan SUH a Charles M.A.P. FRANZ. *Serratia nevei* sp. nov. and *Serratia bockelmannii* sp. nov., isolated from fresh produce in Germany and reclassification of *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* Ajithkumar et al. 2003 as a later heterotypic synonym of *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*. *Systematic and Applied Microbiology.* 2020. DOI: 10.1016/j.syapm.2020.126055. ISSN 07232020. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202020300035>

- [61] GUO, Zhiqing, Xia ZHANG, Juxiang WU, et al. In vitro inhibitory effect of the bacterium *Serratia marcescens* on *Fusarium proliferatum* growth and fumonisins production: Molecular dynamics simulations. *Biological Control*. Elsevier, 2020, 1996, **143**(1), 148-153. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104188. ISBN 9781855737945. ISSN 10499644. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964419306206>
- [62] HERMAN, Anna, Andrzej HERMAN, Beata DOMAGALSKA a Andrzej MŁYNARCZYK. Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion. *Indian Journal of Microbiology* [online]. India: Springer-Verlag, 1306, 53(2), 232-237. DOI: 10.1007/s12088-012-0329-0. ISSN
- [63] BASU, Paramita a Camelia MAIER. In vitro antioxidant activities and polyphenol contents of seven commercially available fruits. *Pharmacognosy Research* [online]. Mumbai: Medknow Publications, 2016, 8(4), 258-264. DOI: 10.4103/0974-8490.188875. ISSN 09764836. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004516/>
- [64] *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2018, **17**(2). ISBN 9780081005965. ISSN 1049-5398. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965224979>
- [65] FIBIGR, Jakub, Dalibor ŠATÍNSKÝ a Petr SOLICH. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **143**, 204-213. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.045. ISSN 07317085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708517309421>
- [66] JIRÁSEK, Václav, František SEVERA a František STARÝ. *Kapesní atlas léčivých rostlin*. 2. vyd. Praha: SPN, 1989. Knižnice obrazových publikací.
- [67] BRANDT, Wilhelm, M. GÜRKE, F. E. KÖHLER, G. PABST, G. SCHELLENBERG a Max. VOGTHERR. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America /herausgegeben von G. Pabst. 1883. DOI: 10.5962/bhl.title.623.
- [68] MLADÁ, Jarmila, František SEVERA a František STARÝ. *Atlas cizokrajných rostlin*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1987. Knižnice obrazových publikací.
- [69] GIBBS, Jane E. M., Kazuhiro ITO a Barbara AMBROSE. Eucalyptus Pollen Allergy and Asthma in Children: A Cross-Sectional Study in South-East Queensland, Australia. *PLOS ONE*. 2015, **10**(5), 204-213. DOI: 10.1371/journal.pone.0126506. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0126506>
- [70] DIVAKARAN, M. a K.N. BABU. Mustard. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, 2016, , 9-19. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00475-X. ISBN 9780123849533. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012384947200475X>
- [71] BAHLAKEH, Ghasem, Ali DEGHANI, Bahram RAMEZANZADEH, Mohammad RAMEZANZADEH, G. SCHELLENBERG a Max. VOGTHERR. Highly effective mild steel corrosion inhibition in 1 M HCl solution by novel green aqueous Mustard seed extract: Experimental, electronic-scale DFT and atomic-scale MC/MD explorations. *Journal of Molecular Liquids*. 2019, 1883, **293**. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111559. ISSN

01677322. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732219318938>
- [72] MISAR, K.S., S.B. KULKARNI, W.B. GURNULE, Mohammad RAMEZANZADEH, G. SCHELLENBERG a Max. VOGTHERR. Formulation and evaluation of antiacne cream by using Clove oil: Experimental, electronic-scale DFT and atomic-scale MC/MD explorations. *Materials Today: Proceedings*. 2020, 1883, **293**. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.06.106. ISSN 22147853. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214785320345600>
- [73] BAIS, Souravh, Naresh Singh GILL, Nitan RANA, Shandeep SHANDIL, G. SCHELLENBERG a Max. VOGTHERR. A Phytopharmacological Review on a Medicinal Plant: Juniperus communis: Experimental, electronic-scale DFT and atomic-scale MC/MD explorations. *International Scholarly Research Notices*. 2014, 1883, **2014**, 1-6. DOI: 10.1155/2014/634723. ISSN 2356-7872. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/archive/2014/634723/>
- [74] SIMOVSKI, Bojan & Acevski, Jane. (2012). The Fir as a Destructor of the Forest Communities in the Republic of Macedonia. 10.13140/RG.2.1.3231.9126.
- [75] SKALICKÁ, Anna, Václav VĚTVIČKA a Václav ZELENÝ. *Botanický slovník rodových jmen cévnatých rostlin: [latinsko-český, česko-latinský]*. Praha: Aventinum, 2012. ISBN 978-80-7442-031-3.
- [76] VALÍČEK, Pavel, Václav VĚTVIČKA a Václav ZELENÝ. *Užitkové rostliny tropů a subtropů: [latinsko-český, česko-latinský]*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0939-6.
- [77] PANSA MONKHEANG, Jane E. M., Kazuhiro ITO a Barbara AMBROSE. Eucalyptus Pollen Allergy and Asthma in Children: A Cross-Sectional Study in South-East Queensland, Australia. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, **5**(26), 204-213. DOI: 10.5897/JMPR11.1075. ISSN 19960875. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0126506>
- [78] IMO, Chinedu & Za'aku, Jivini. (2019). Curr Trends Biomedical Eng & Biosci Medicinal Properties of Ginger and Garlic: A Review. 18. 10.19080/CTBEB.2019.18.555985.
- [79] HUANG, K. C., W. Michael WILLIAMS a Václav ZELENÝ. *The pharmacology of Chinese herbs: [latinsko-český, česko-latinský]*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c1999. ISBN 08-493-1665-0.
- [80] ZENG, Pengjiao, Juan LI, Yulong CHEN a Lijuan ZHANG. The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs. *Glycans and Glycosaminoglycans as Clinical Biomarkers and Therapeutics - Part B*. Elsevier, 2019, 2019, , 423-444. Progress in Molecular Biology and Translational Science. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2019.03.003. ISSN 9780128177402. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117319300377>
- [81] FOSTER, Steven. (2016). Toward and Understanding of Ginseng Adulteration: The Tangled Web of Names, History, Trade and Perception.. *HerbalGram*. 111. 36-57.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

PCS – fotonová korelační spektroskopie

UV oblast – ultra fialová oblast

MIC – minimální inhibiční koncentrace

DLS-dynamický rozptyl světla

ZP-zeta potenciál

NB-Nutrient Broth

ABTS-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)