# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY


# STUDIUM SMĚSNÝCH PŘÍRODNÍCH ANTIMIKROBIÁLNÍCH PREPARÁTŮ A MOŽNOSTI JEJICH STABILIZACE
STUDY OF NATURAL ANTIMICROBIAL MIXTURES AND THEIR STABILIZATION

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**
MASTER'S THESIS


**AUTOR PRÁCE** Bc. Petra Vejrostová
AUTHOR

**VEDOUCÍ PRÁCE** prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
SUPERVISOR



**BRNO 2016**

Vysoké učení technické v Brně
**Fakulta chemická**
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

# Zadání diplomové práce

| | | | |
|---|---|---|---|
| Číslo diplomové práce: | **FCH-DIP0947/2015** | Akademický rok: | **2015/2016** |
| Ústav: | Ústav fyzikální a spotřební chemie | | |
| Student(ka): | **Bc. Petra Vejrostová** | | |
| Studijní program: | Chemie pro medicínské aplikace (N2846) | | |
| Studijní obor: | Chemie pro medicínské aplikace (2808T031) | | |
| Vedoucí práce | **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.** | | |
| Konzultanti: | Ing. Petra Matoušková, Ph.D. | | |

## Název diplomové práce:

Studium směsných přírodních antimikrobiálních preparátů a možnosti jejich stabilizace

## Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:
- přehledná rešerše zaměřená na přírodní antimikrobiální preparáty rostlinného a živočišného původu a jejich účinek
- optimalizace metod stanovení antimikrobiální aktivity a postupů enkapsulace
- testování antimikrobiální aktivity vybraných přírodních směsí ve volné a enkapsulované formě
- sledování dlouhodobé stability antimikrobiálních směsí

## Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

| | | |
|---|---|---|
| - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - |
| Bc. Petra Vejrostová<br>Student(ka) | prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.<br>Vedoucí práce | prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.<br>Ředitel ústavu |

V Brně, dne 31.1.2016

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

V rámci předložené diplomové práce byla zpracována rešerše zaměřená na přírodní antimikrobiální látky. V experimentální části práce bylo cílem testování antimikrobiální aktivity přírodních preparátů ve volné a enkapsulované formě, příprava částic a sledování jejich dlouhodobé stability.

Jako rostlinné antimikrobiální látky byly v práci používány různé extrakty čajů (vodné, etanolové a DMSO) a vodné extrakty bylin. S použitím vodných extraktů čajů byly za použití ultrazvuku připraveny lipozomy a chitosanové částice. Pro všechny částice byla stanovena enkapsulační účinnost, velikost, stabilita a antioxidační aktivita. Poté byla v rámci dvou měsíců u částic sledována dlouhodobá stabilita. Pro stanovení enkapsulační účinnosti i dlouhodobé stability bylo využito spektrofotometrické metody stanovení celkových polyfenolů. Po stanovení velikosti a stability částic byla využita metoda DLS. Antioxidační aktivita byla v celé práci sledována za použití spektrofotometrické metody využívající $ABTS^{\bullet+}$. Pro testování antimikrobiální aktivity různých typů extraktů čajů a bylin, jejich směsí a kombinací s lysozymem a antibiotiky byly využity bujónové diluční metody za použití grampozitivních i gramnegativních bakteriálních kmenů. U připravených částic byla sledována také jejich antimikrobiální aktivita, která byla značná především u chitosanových částic.

Vhodné kombinace přírodních látek ať už s antimikrobiálním či antioxidačním účinkem ve volné nebo enkapsulované formě mohou být s výhodou využity pro aplikace např. v kosmetickém průmyslu, potravinářství či v lékařství.

## KLÍČOVÁ SLOVA

přírodní antimikrobiální látky, polyfenoly, flavonoidy, kofein, antioxidační aktivita, enkapsulace, lipozomy, chitosanové částice, antimikrobiální aktivita

## ABSTRACT

Present diploma thesis is focused on natural antimicrobial substances. The aim of the experimental part of thesis was testing of antimicrobial activity of selected natural substances in free and encapsulated forms, preparation of particles and monitoring of their long-term stability.

Various teas extracts (aqueous, ethanoic and DMSO) and aqueous herbs extracts were used as plant antimicrobial substances. Liposomes and chitosan particles with encapsulated aqueous teas extracts were prepared by ultrasonication. Encapsulation efficiency, size, stability and antioxidant activity for all particles were specified. Consequently, within a two months period, long-term stability for these particles was monitored. Spectrophotometric method for determining total polyphenols was used for evaluating encapsulation efficiency as well as for monitoring of long-term stability. The DLS method was used for determination of size and stability of particles. Antioxidation activity was monitored by using spectrophotometric method using ABTS. For testing antimicrobial activity of various types of teas, herbs extracts and their mixtures and combianitons with lysozyme and antibiotics, broth dilution methods were used while using both Gram positive and Gram negative bacterial test strains. Antimicrobial activity of prepared particles was also monitored, the antimicrobial activity was especially significant with the chitosan particles.

Suitable combinations of natural substances whatever with antimicrobial or antioxidation effect either in free or encapsulated form could be used for applications for example in cosmetics industry, food processing or in medicine.

## KEY WORDS

natural antimicrobial substances, polyphenols, flavonoids, caffeine, antioxidant activity, encapsulation, liposomes, chitosan particles, antimicrobial activity

VEJROSTOVÁ, P. *Studium směsných přírodních antimikrobiálních preparátů a možnosti jejich stabilizace.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 71 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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 děkanem FCH VUT.

.....
podpis studenta


## PODĚKOVÁNÍ

*Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a ochotu při zpracování mé diplomové práce a v průběhu celého studia a za možnost být součástí okruhu skvělých lidí. Dále patří mé díky také Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za pomoc při vypracováním celé práce a zejména za pomoc s experimentální prací, trpělivost a motivaci. Velký dík patří mé rodině, za trpělivost, podporu, motivaci a všestrannou pomoc při zpracovávání mé diplomové práce i po celou dobu mého studia.*

## OBSAH


1. ÚVOD ..... 9
2. TEORETICKÁ ČÁST ..... 10
   2.1. Přírodní antimikrobiální látky ..... 10
   2.2. Antibiotika ..... 10
   2.3. Živočišné antimikrobiální látky ..... 13
      2.3.1. Peptidy ..... 13
      2.3.2. Lysozym ..... 13
   2.4. Rostlinné antimikrobiální látky ..... 16
      2.4.1. Kofein, theobromin, theofylin ..... 16
      2.4.2. Polyfenoly ..... 18
      2.4.3. Flavonoidy ..... 19
         2.4.3.1. Katechiny ..... 19
         2.4.3.2. Rutin ..... 20
         2.4.3.3. Morin ..... 21
   2.5. Čaje ..... 21
      2.5.1. Čaje „Gunpowder Formosa“ a „Gunpowder Black“ ..... 22
      2.5.2. Čaj „Pai Mu Tan“ - Bílá pivoňka ..... 22
      2.5.3. Rooibos červený, zelený ..... 23
      2.5.4. „Honeybush“ ..... 24
      2.5.5. „Lapacho“ ..... 24
   2.6. Guarana ..... 25
   2.7. Antioxidační účinek ..... 25
      2.7.1. Volné radikály ..... 25
      2.7.2. Antioxidanty ..... 25
   2.8. Možnosti zvýšení antimikrobiálního účinku ..... 26
      2.8.1. Kombinace látek ..... 26
      2.8.2. Enkapsulace ..... 26
   2.9. Možnosti aplikace vybraných antimikrobiálních látek ..... 26
      2.9.1. Kosmetika ..... 27
      2.9.2. Hojení ran ..... 27
      2.9.3. Potraviny ..... 27
3. CÍL PRÁCE ..... 28

4. EXPERIMETNÁLNÍ ČÁST ..... 29
4.1. Použité mikroorganismy ..... 29
4.2. Použité chemikálie ..... 29
4.2.1. Standardní a speciální chemikálie ..... 29
4.3. Přístroje a pomůcky ..... 29
4.4. Čaje a byliny ..... 30
4.5. Příprava bylinných a čajových extraktů ..... 30
4.5.1. Vodné extrakty ..... 30
4.5.2. Ethanolové extrakty ..... 30
4.5.3. DMSO extrakty ..... 31
4.5.4. Extrakty pro měření katechinu ..... 31
4.6. Metody pro stanovení základních charakteristik ..... 31
4.6.1. Stanovení celkových polyfenolů ..... 31
4.6.2. Stanovení celkových flavonoidů ..... 31
4.6.3. Stanovení kofeinu pomocí HPLC ..... 32
4.6.4. Stanovení katechinů pomocí HPLC ..... 32
4.6.5. Sanovení theofylinu a theobrominu pomocí HPLC ..... 32
4.6.6. Stanovení individuálních flavonoidů pomocí HPLC ..... 32
4.6.7. Stanovení antioxidační aktivity ..... 33
4.7. Příprava a charakterizace částic ..... 33
4.7.1. Příprava lipozomů ..... 33
4.7.2. Příprava chitosanových částic ..... 33
4.7.3. Stanovení enkapsulační účinnosti ..... 33
4.7.4. Stanovení velikosti a stability částic ..... 33
4.8. Stanovení dlouhodobé stability částic ..... 34
4.9. Testování antimikrobiální aktivity ..... 34
4.9.1. Kultivace mikroorganismů ..... 34
4.9.2. Bujónová diluční metoda ..... 34
4.9.3. Zkumavkový test ..... 34
4.10. Průtoková cytometrie ..... 35
5. VÝSLEDKY A DISKUSE ..... 36
5.1. Charakterizace čajů a bylin ..... 36
5.1.1. Stanovení celkových polyfenolů ..... 36
5.1.2. Stanovení celkových flavonoidů ..... 38
5.1.3. HPLC stanovení kofeinu, theobrominu a theofylinu ..... 39
5.1.4. HPLC stanovení katechinu ..... 41
5.1.5. HPLC stanovení individuálních flavonoidů ..... 41

5.1.6. Stanovení antioxidační aktivity ..... 43
5.2. Charakterizace částic ..... 45
5.2.1. Enkapsulační účinnost částic ..... 45
5.2.2. Velikost a stabilita částic ..... 46
5.2.3. Antioxidační aktivita částic ..... 48
5.3. Dlouhodobá stabilita částic ..... 49
5.3.1. Lipozomy ..... 49
5.3.2. Chitosanové částice ..... 50
5.4. Testy antimikrobiální aktivity ..... 51
5.4.1. Bujónová diluční metoda ..... 51
5.4.2. Zkumavkový test ..... 57
6. ZÁVĚR ..... 61
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ ..... 63
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ ..... 71

# 1. ÚVOD

Rostliny produkují téměř neomezeně velké množství sekundárních metabolitů, které jim slouží jako obrana proti mikroorganismům, hmyzu nebo býložravcům. Již v dávné minulosti lidé využívali léčivých schopností rostlin, které aplikovaly ve formě obkladů, nebo pili jejich výluhy. S nástupem antibiotik v roce 1950 ale použití rostlinných derivátů jako antimikrobiálních látek prakticky vymizelo. V posledních desetiletích ale opět roste zájem o hledání a využití antimikrobiálních látek produkovaných právě rostlinami. Nová antimikrobiální činidla je důležité hledat i z důvodu rostoucí rezistence k antibiotikům.
Antimikrobiálními látkami rozumíme látky takové, které jsou schopny inhibovat růst mikroorganismů.
Existuje také mnoho antimikrobiálních systémů živočišného původu, které se často vyvinuly jako obranné mechanismy hostitele. Mnoho antimikrobiálních látek, které jsou vlastní živočichům, se vyskytují především ve formě různých antimikrobiálních peptidů. Do skupiny antimikrobiálních peptidů řadíme i známý hydrolytický enzym lysozym. Tento 14,4 kDa velký peptid je obsažen v tělesných sekretech a vaječném bílku, z kterého se mimo jiné získává.
Ať už z důvodu rezistence k antibiotikům, tak i z jiných důvodů je důležité zvyšovat antimikrobiální potenciál účinných látek. Zvýšení antimikrobiálního účinku je výhodné jak pro farmaceutický, potravinářský i kosmetický průmysl. Jednou z možností, jak zvýšit či rozšířit antimikrobiální efekt je kombinace jednotlivých antimikrobiálních látek. Další možností, jak zlepšit antimikrobiální efekt látek je jejich enkapsulace.
Tato práce je zaměřená především na sledování antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů z vybraných čajů a bylin. Dále se zaměřuje na možnosti zvýšení antimikrobiálního účinku vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům. K tomu bylo v předložené práci využíváno především kombinací rostlinných a živočišných antimikrobiálních složek a následně sledování možného zvýšení antimikrobiální aktivity jejich enkapsulací do lipozomů a chitosanových částicích.

# 2. TEORETICKÁ ČÁST

## 2.1. Přírodní antimikrobiální látky

Antimikrobiálními látkami rozumíme látky takové, které jsou schopny inhibovat růst mikroorganismů. V poslední době dochází k rostoucímu zájmu o využívání přírodních antimikrobiálních látek. Mezi ně patří látky antibakteriální, antimykotické, antiparazitické, antiseptické nebo antivirové. Tyto přírodní látky mohou působit na mikroorganismy různými účinky. Mohou být využity např. v potravinářství, farmakologii nebo kosmetice [1].

Mechanismus účinku antimikrobiálních látek je velmi složitý a nebyl dosud zcela objasněn. Některé látky mohou působit současně i několika mechanismy. Mechanismy působení mohou korelovat se složením buněčné stěny a cytoplasmatické membrány mikroorganismů, dále mohou záviset např. na typu mikroorganismu [1], [2].

## 2.2. Antibiotika

Jako antibiotika jsou označovány látky získané původně jako přírodní produkty mikroorganismů. Jejich účinek je založen na zastavení růstu a rozmnožování nebo na usmrcování mikrobiálních buněk. Antibiotika lze dělit na skupiny dle různých kritérií: podle spektra účinku, typu účinku a mechanismu účinku [3], [2].

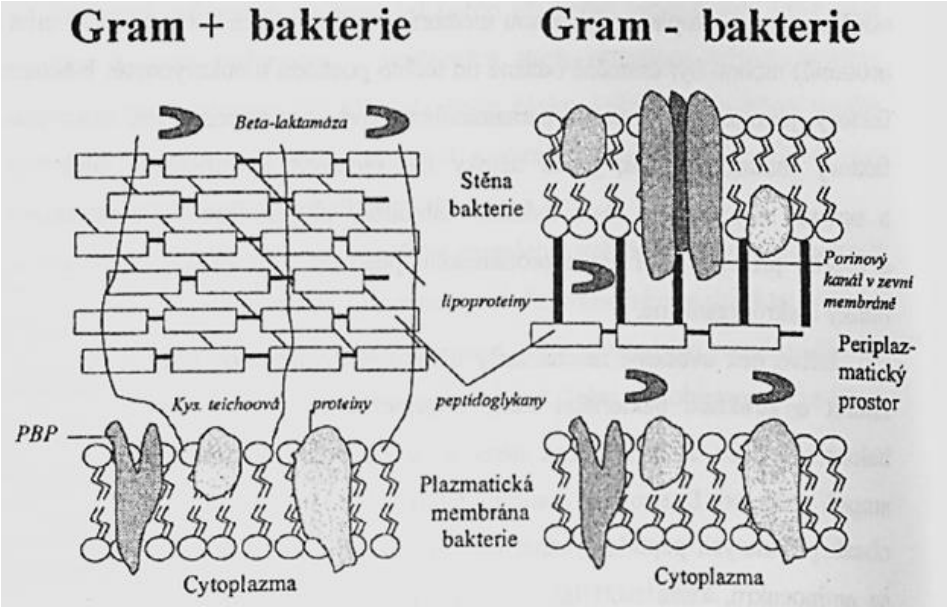
Spektrem účinku antibiotika rozumíme výčet kmenů citlivých k určitému antibiotiku. Rozlišujeme látky s úzkým spektrem účinku, tzv. antibiotika s cíleným účinkem, a rozšířeným nebo širokým spektrem účinku, což jsou antibiotika účinná proti celé řadě různých patogenů, ať už se jedná o G+ nebo G- mikroorganismy. Mezi antibiotika s cíleným účinkem patří např. Penicilin G a Penicilin V. Mezi širokospektrá antibiotika se řadí např. tetracykliny [2], [3], [4], [5].

Jak již bylo zmíněno, antibiotika mohou působit dvěma typy účinků. Prvním z nich je bakteriostatický účinek. Pokud antibiotikum působí bakteriostaticky, dojde k zastavení růstu a rozmnožování bakterií. V případě baktericidního účinku antibiotikum způsobí usmrcení bakterií [2], [3].

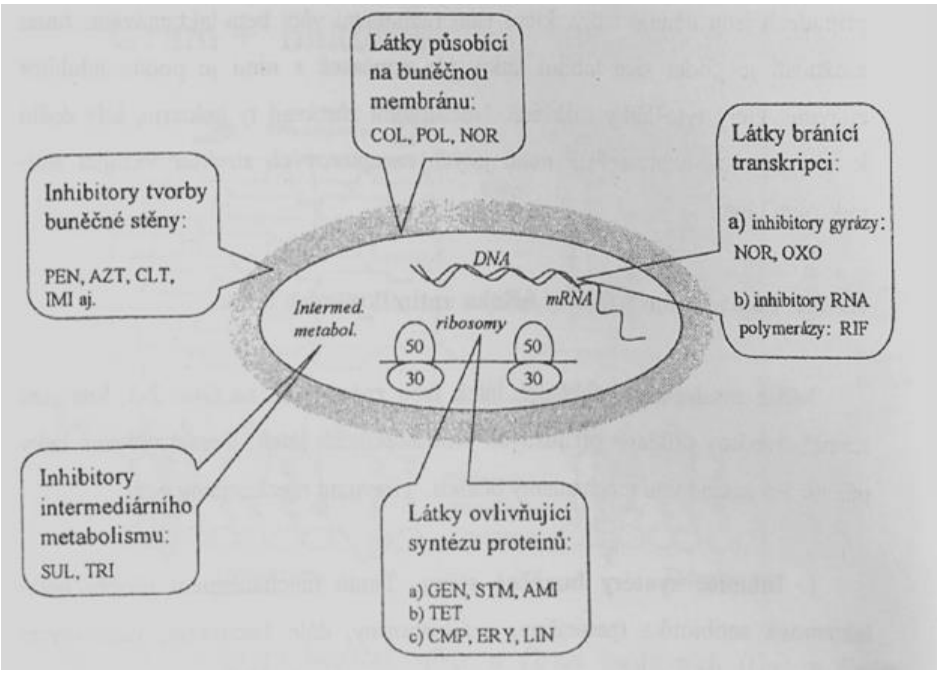
Tabulka 1: Rozdělení antibiotik dle typu účinku [4], [6]

| Bakteriostatiská ATB | Baktericidní ATB |
|---|---|
| Peniciliny | Tetracykliny |
| Cefalosporiny | Amfenikoly |
| Aminoglykosidy | Makrolidy |
| Sulfonamidy | Linkosamidy |
| Nitrofurany | Spektinomycin |
| Glykopeptidy | Sulfonamidy |
| Chinolony | Pirimidiny |
| Monobaktamy | Nitrofurany |
| Karbapenemy | |
| Ansamyciny | |
| Polypeptidy | |
| Nitroimidazoly | |

Dalším možným dělením antibiotik je dělení dle mechanismu jejich účinku. Zde je třeba zmínit, že bakterie patří do skupiny prokaryotických organismů, obsahují buněčnou stěnu a jejich nukleové kyseliny nalezneme v jádře. Existují dva typy bakteriální buněčné stěny, buněčná stěna G+ bakterií a G- bakterií. V případě G+ bakterií obsahuje buněčná stěna velké množství peptidoglykanů, jejichž tvorbu je možno zastavit právě některými antibiotiky, tím pak dojde k likvidaci buňky. G- bakterie mají pouze tenkou vrstvu peptidoglykanů, ale obsahují povrchovou fosfolipidovou dvouvrstvu a v periplazmatickém prostoru mají nahromaděné beta-laktamázy, které rozkládají řadu antimikrobiálních látek a jsou tak odolnější. Tyto odlišnosti znamenají zásadní rozdíl v odolnosti vůči různým typům antimikrobiálních látek [2], [3].




*Obrázek 1: Stavba buněčné stěny bakterií [2]*




*Obrázek 2: Možnosti působení antibiotik [2]*

Tabulka 2: Rozdělení antibiotik dle mechanismu účinku [2], [5].

| Mechanismus účinku | Antibiotikum | |
|---|---|---|
| Inhibice syntézy buněčné stěny | Beta-laktamová ATB | Peniciliny |
| | | Cefalosporiny |
| | | Atypické beta-laktamy |
| | Vankomycin, Bacitracin | |
| Poškození funkce cytoplazmatické membrány | Polymyxiny | |
| | Amfotericin B | |
| | Nystatin | |
| Inhibice syntézy kyseliny tetrahydrolistové | Sulfonamidy | |
| | Trimetoprim | |
| | Kotrimazol | |
| | Sulfasalazin | |
| Inhibice funkce DNA | Deriváty nitroimiazolu | |
| | Rifampicin | |
| → Inhibice DNA gyrázy | Ofloxacin | |
| | Ciprofloxacin | |
| | Enofloxacin | |
| → Inhibice RNA polymerázy | Rifampicin | |
| Inhibice proteosyntézy → Inhibice zahájení proteosyntézy | Oxazolidinony | |
| → Vazba na 30S podjednotku ribozomu | Aminoglykosidy | |
| | Tetracykliny | |
| → Vazba na 50S podjednotku ribozomu | Makrolidy | |
| Inhibice intermediárního metabolismu | Sulfonamid | |
| | Trimethoprim | |

## 2.3. Živočišné antimikrobiální látky

Existuje mnoho antimikrobiálních systémů živočišného původu, které se často vyvinuly jako obranné mechanismy hostitele. Mnohé antimikrobiální látky, které jsou vlastní živočichům, se vyskytují ve formě antimikrobiálních peptidů.

### 2.3.1. Peptidy

Mezi živočišné antimikrobiální látky patří velká skupina antimikrobiálních peptidů. Jedná se o klíčovou složku vrozené imunity většiny mnohobuněčných organismů. Doposud bylo objeveno již více než 2000 přírodních antimikrobiálních peptidů [10]. Existuje jich několik druhů – kationické, anionické, aromatické dipeptidy a deriváty proteinů vážící kyslík, přičemž nejvíce zastoupeny jsou peptidy kationické [7].

Antimikrobiální peptidy jsou relativně krátké řetězce obsahující 12-100 aminokyselin. Mohou mít mnoho různých struktur, např. alfa-helixy, beta-listy, smyčky a natažené struktury [8]. Většina těchto látek působí stejným mechanismem, a to permeabilizací membrány patogenu [9].

Nejlépe prostudované jsou kationické antimikrobiální peptidy s antibakteriální aktivitou. Jak bylo zmíněno výše, většina AMP způsobuje permeabilizaci membrán. Objevuje se však stále více důkazů o tom, že některé mohou působit na více cílů v bakteriální buňce. Přesto je účinek všech AMP závislý na interakci s bakteriální buněčnou membránou. Působí jak na G+ tak i na G- bakterie. Při působení AMP nejdříve proběhne elektrostatická interakce mezi kationickým peptidem a záporně nabitými složkami (fosfátové skupiny, lipoteichoová kyselina) v membráně bakterií. U G- bakterií se pak peptid vloží do struktury vnější membrány, což vede k jejímu narušení a permeabilizaci. Tím je membrána propustná pro další peptidy, které se tak dostanou k cytoplazmatické membráně. Některé studie však dokazují, že existují AMP, které membránovou permeabilizaci nezpůsobují a zapříčiní smrt buňky působením na základní intracelulární procesy [8].

### 2.3.2. Lysozym

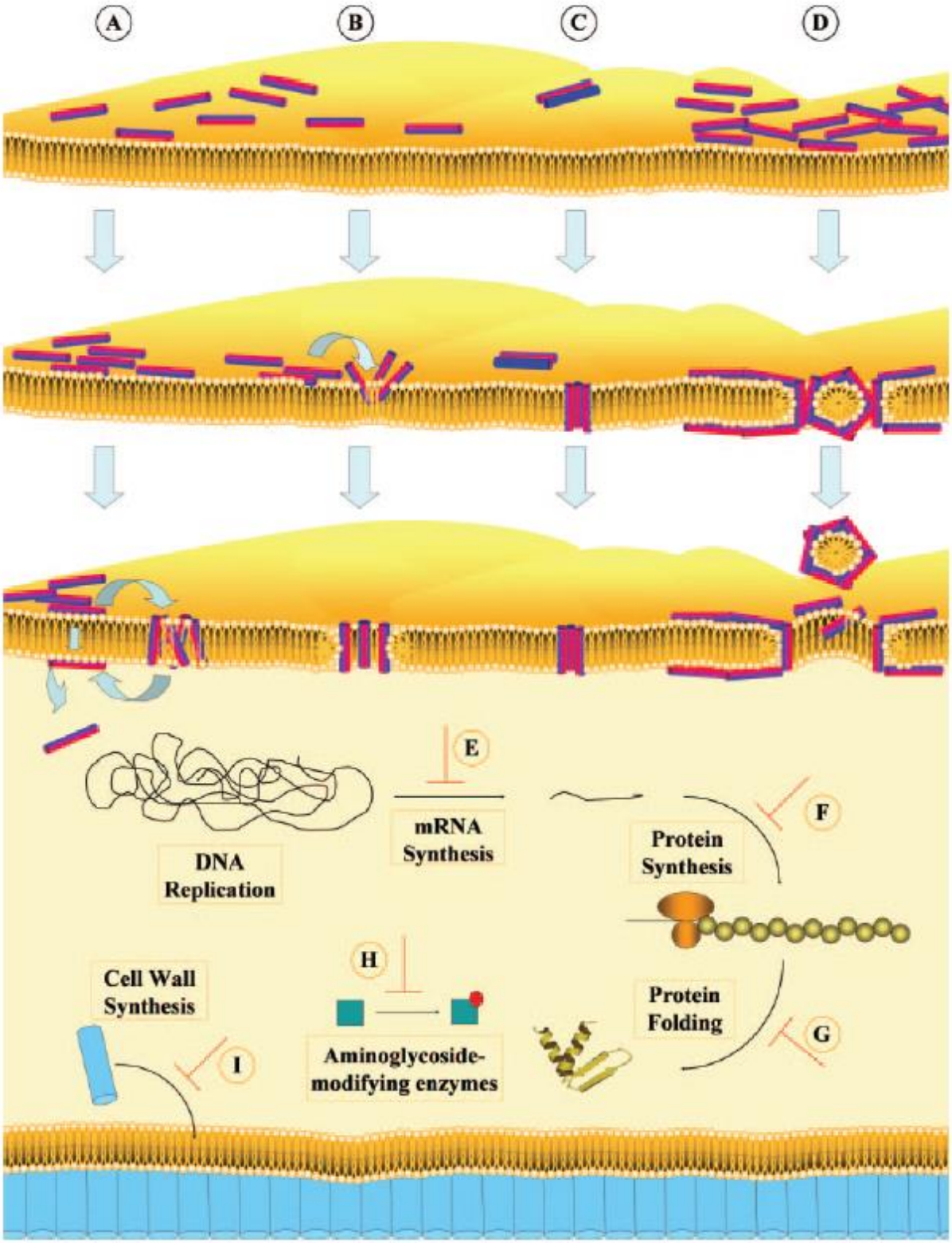
Do skupiny antimikrobiálních peptidů řadíme i známý hydrolytický enzym lysozym. Tento 14,4 kDa velký peptid je obsažen v tělesných sekretech a vaječném bílku, z kterého se mimo jiné získává. Existují čtyři třídy lysozymu dle jeho aktivity a struktury. Lysozym právě ze slepičího bílku, lysozym z husího bílku, z bakteriofága T4 a Ch-lysozym.

Lysozym ze slepičího bílku je jednořetězcová molekula složená ze 129 zbytků aminokyselin. Její kulovitý tvar je udržován čtyřmi disulfidickými můstky. Molekula lysozymu obsahuje pět $\alpha$-helikálních úseků a jeden úsek s uspořádáním $\beta$-skládaného listu [11], [12], [13], [14], [15].

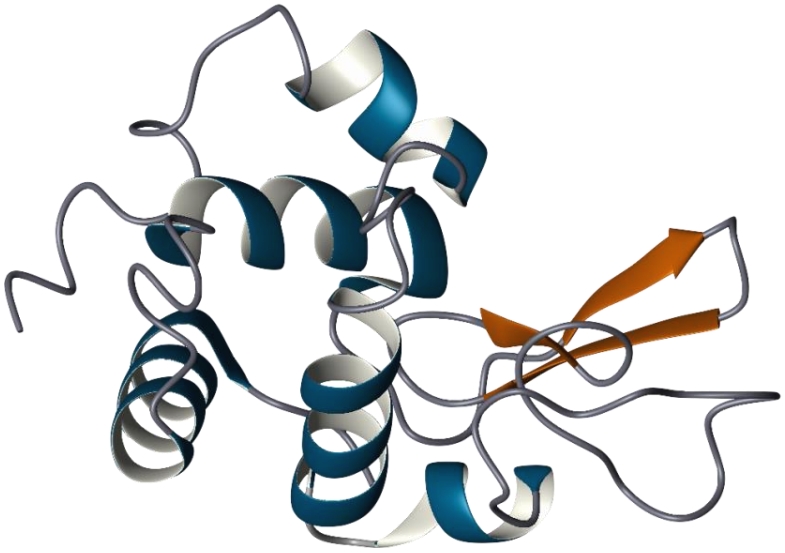
Buněčné stěny především G+ bakterií obsahují *N*-acetylmuramovou kyselinu a *N*-acetylglukosamin, které jsou spojeny $\beta$ - 1, 4 – glykosidickou vazbou. Právě toto spojení je cílem působení lysozymu z vaječného bílku. Mechanismus účinku různých typů lysozymu se může lišit dle toho, v jakém organismu je lysozym obsažen [14], [16].

Molekula lysozymu obsahuje za fyziologických podmínek na svém povrchu štěrbinu, která je aktivním místem enzymu. Tato štěrbina má 6 vazných míst (ABCDEF), v nichž jsou vázány sacharidy k molekule vodíkovými vazbami. Štěpné vazby jsou mezi vaznými místy D a E. Ve vazném místě D se po zformování molekuly do položidličkové konformace váže substrát. Při působení lysozymu na bakteriální buněčnou stěnu působí jako katalyzátor ionty $H^+$. Lysozym se nejdříve svým aktivním místem připojí na buněčnou stěnu. Díky karboxylové skupině Glu-35, která poskytuje proton, dojde k protonaci atomu kyslíku. Dále dochází ke štěpení vazby C-O za vzniku alkoholu a karbokationtu stabilizovaného skupinou Asp-52. Poslední fází působení lysozymu je adice vody na vzniklý karbokation a vznik poloacetalu. Tento mechanismus způsobuje rozklad peptidoglykanu v buněčných stěnách

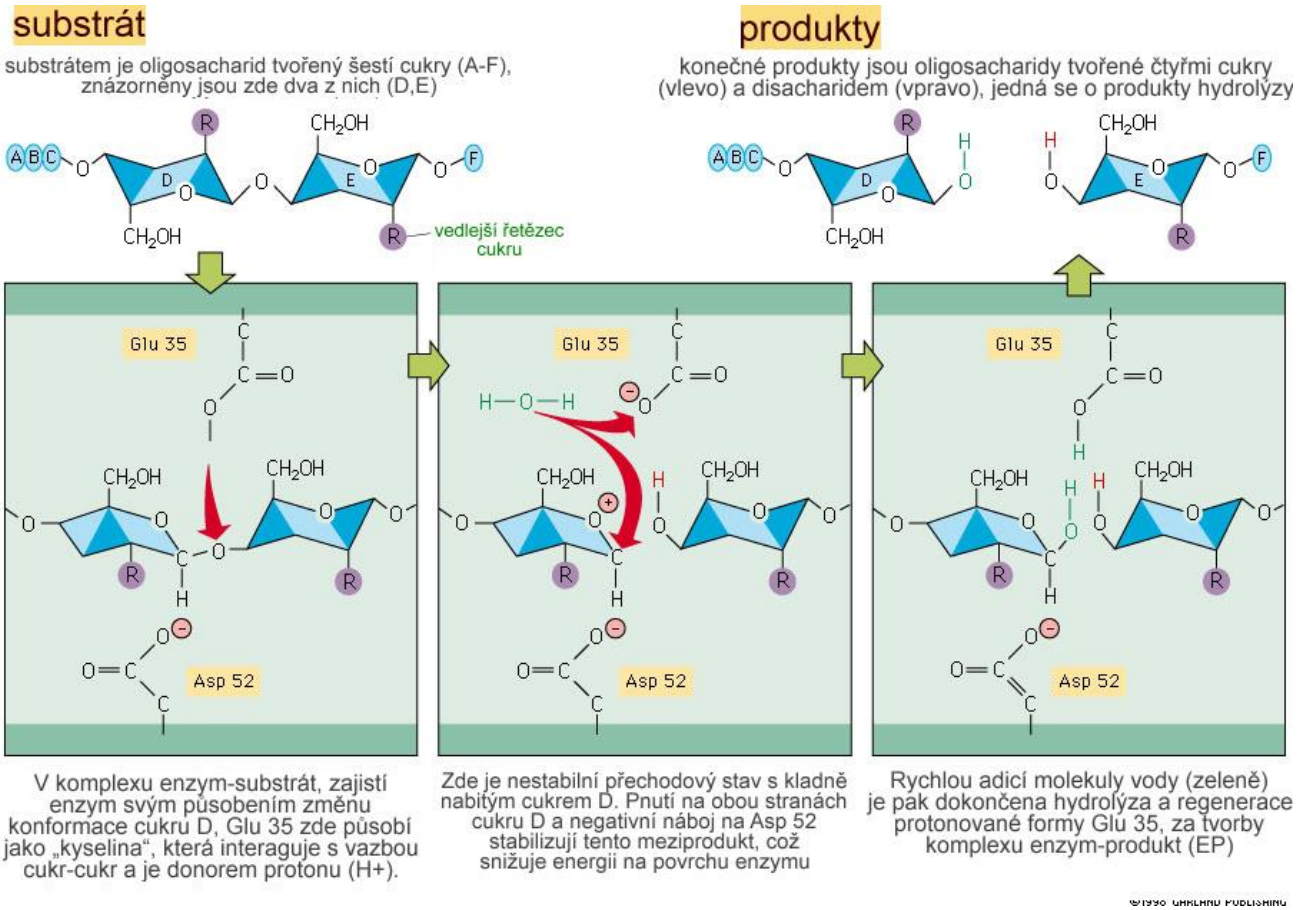
na disacharidové jednotky, čímž jsou bakteriální buňky zahubeny [11], [12], [14], [16], [17], [18].




*Obrázek 3: Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů*
*A-D: Mechanismy vedoucí k membránové permeabilizaci*
*E-I: Mechanismy peptidů, které nezpůsobují membránovou permeabilizaci [8]*



*Obrázek 4: Struktura lysozymu [11]*



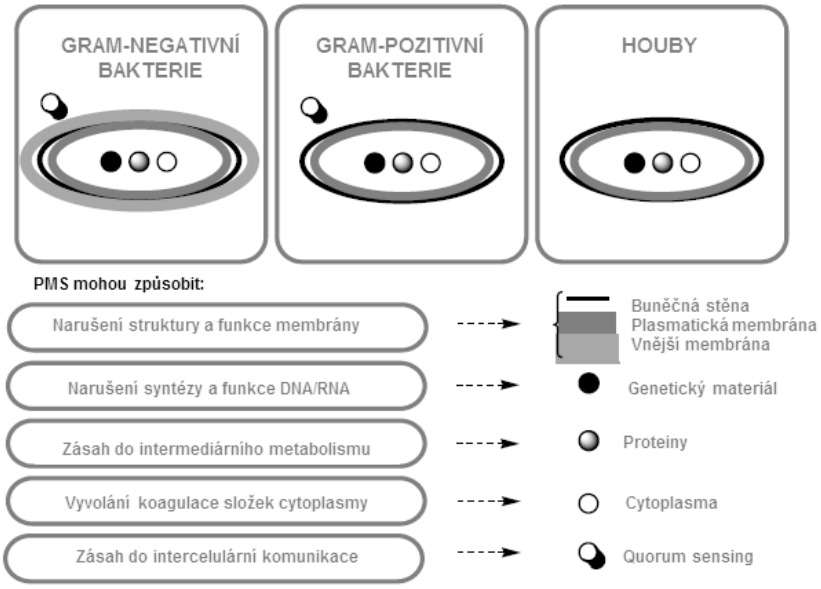

*Obrázek 5: Mechanismus působení lysozymu[19]*

## 2.4. Rostlinné antimikrobiální látky

Rostliny produkují téměř neomezeně velké množství sekundárních metabolitů, které jim slouží jako obrana proti mikroorganismům, hmyzu nebo býložravcům. Poskytují rostlinám jejich specifická aromata, chutě a pigmenty. Již v dávné minulosti lidé využívali léčivých schopností rostlin, které aplikovaly ve formě obkladů, nebo pili jejich výluhy. Léčebné účinky však byly často rozporuplné, docházelo jak k léčbě symptomů, tak i k častým otravám. S nástupem antibiotik v roce 1950 ale použití rostlinných derivátů jako antimikrobiálních látek prakticky vymizelo. V posledních desetiletích ale opět roste zájem o hledání a využití antimikrobiálních látek produkovaných právě rostlinami. Mezi důvody tohoto hledání patří např. nepříznivý vliv antibiotik na lidský organismus nebo jejich nadužívání. Smysl využití přírodních antimikrobiálních látek je v jejich značné antimikrobiální aktivitě. Mezi tyto sekundární metabolity s antimikrobiálním účinkem patří např. fenolické sloučeniny, terpenoidy, chinony, taniny a další [20], [21].

Jak je zobrazeno na obrázku 6, sekundární metabolity rostlin mohou působit několika mechanismy antimikrobiálního účinku. Jedná se o narušení membránové funkce a struktury, narušení syntézy DNA a RNA, zásah do metabolismu buňky, indukce koagulace složek cytoplazmy a porušení normální buněčné komunikace. Mechanismus probíhá obvykle v následujícím sledu: interakce s buněčnou membránou a difuze přes ni; interakce s intracelulárními složkami/procesy. Antimikrobiální potenciál a mechanismus působení jednotlivých látek může být ovlivněn a závisí na mnoha faktorech (vlastnosti cílových buněk, prostředí atd.) [22].

V dalších kapitolách jsou popsány vybrané skupiny rostlinných antimikrobiálních látek.



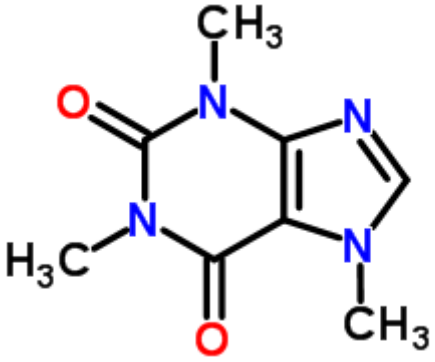

*Obrázek 6: Možnosti působení rostlinných antimikrobiálních látek [22]*

### 2.4.1. Kofein, theobromin, theofylin

Kofein neboli 1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion je alkaloid a jeden z purinových derivátů xanthinu. Jedná se o bílou, krystalickou, hořlavou látku. Je bez zápachu a má silnou hořkou chuť. Jeho molekulová hmotnost je 194,191 Da [23], [24].

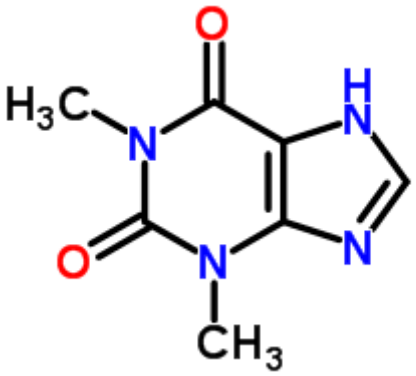
Kofein je přítomen ve velkém množství rostlin vyskytujících se všude na světě. Jedná se pravděpodobně o celosvětově nejvíce užívanou drogu. Je obsažen např. v čaji, guaraně, kávě nebo kakau. Obsah kofeinu v čaji se pohybuje od 24 do 50 mg/150 ml, pro kávu

je to od 40 do 180 mg/150 ml a od 2 do 7 mg/150 ml v kakau [25]. Většinou je užíván ve formě extraktů a v různých potravinách a nápojích.
Kofein má povzbudivé účinky, zvyšuje fyzický výkon, schopnost soustředit se, zmírňuje úzkosti a celkově podporuje centrální nervový systém člověka. Mimo jiné má kofein i silné antioxidační a antimikrobiální účinky. Antioxidační aktivitu má kofein díky přítomnosti karbonylových skupin a díky dvojným vazbám. Bylo zaznamenáno, že kofein inhibuje růst plísní a bakterií. Také byl prokázán antibakteriální účinek kofeinu z kávovníku arabského a listů zeleného čaje *Camellia sinensis* proti G+ i G- bakteriím [26], [27], [28], [29].



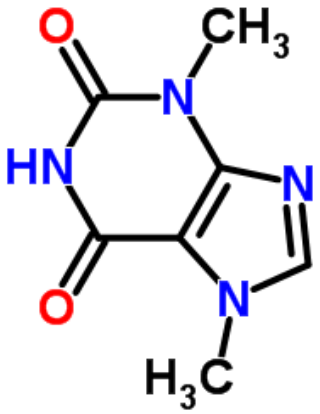

*Obrázek 7: Struktura kofeinu [23]*

Díky své biologické aktivitě a schopnosti proniknout přes kůži je kofein hojně využíván v kosmetickém průmyslu. Syntetický kofein se využívá ve farmaceutickém průmyslu jako přísada do analgetik a antipyretik a v potravinářství jako přísada do nealkoholických nápojů. Vyrábí se methylací xanthanu, který je získáván synteticky z kyseliny močové [30],[31].
Katabolismus kofeinu v bakteriálních systémech a vyšších rostlinách vytváří další purinové alkaloidy, jako je např. theobromin a theofylin. Dle některých studií probíhá rozklad kofeinu na theobromin a theofylin také u člověka [32].
Theobromin, systematickým názvem 3,7-dimethylpurin-2,6-dion je hlavním alkaloidem kakaovníku pravého a vyskytuje se v řadě dalších rostlin. Jedná se také o xanthinový alkaloid a jeho molekula má hmotnost 180,164 Da. V krystalické podobě se jedná o bílý prášek hořké chuti. Dříve byl využíván v lékařství jako diuretikum a při léčbě anginy pectoris a hypertenze [33].
Tak jako kofein má i theobromin zhášecí efekt na produkci hydroxylových radikálů a také na oxidativní poškození DNA těmito radikály. Theobromin má také značné antioxidační vlastnosti [34].




*Obrázek 8: Struktura theobrominu [35]*

Dalším katabolickým produktem kofeinu, jak již bylo zmíněno výše, je theofylin. Theofylin má systematický název 3,7-dihydro-1,3-dimethyl-1 H-purin-2,6-dion. Jeho molekulová hmotnost je 180,164 Da a jedná se také o bílý krystalický prášek. Tak jako kofein a theobromin patří theofylin do skupiny alkaloidů [36], [37].
Theofylin se přirozeně vyskytuje v kakaových bobech a stopově také v čaji. Společně s ostatními xantinovými sloučeninami chrání mladé čajové lístky před mikroby a hmyzem [37]. Jako silný antioxidant zabraňuje theofylin poškození DNA, má také protinádorovou a antivirovou aktivitu [28].




*Obrázek 9: Struktura theofylinu [36]*

Molekulární mechanismy působení těchto látek nejsou dosud zcela známy [28]. Existují však modely mechanismů účinku. Např. pro kofein bylo zjištěno, že může snadno procházet bakteriální buněčnou stěnou. Po průniku do buňky začne kofein inhibovat syntézu DNA, což způsobí, že se nesyntetizují enzymy a proteiny. Tento mechanismus ovšem nemusí nastat, pokud je kofein ještě před oxidací převeden pomocí enzymů na theobromin a paraxanthin [29].

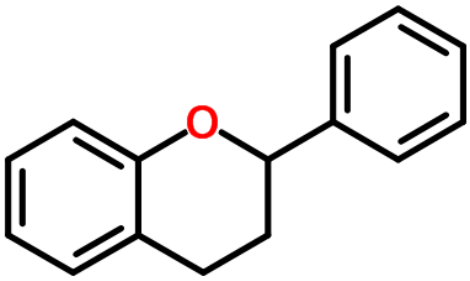
### 2.4.2. Polyfenoly

Polyfenolické látky jsou přítomné ve většině vyšších rostlin, kde jsou produkovány jako sekundární metabolity. Jsou obsaženy např. v ovoci, zelenině, obilovinách, luštěninách a v rostlinných nápojích jako je víno, pivo, čaj a káva. Podílí se na různých biologických procesech, např. růst rostlinného pletiva, pigmentace, ochrana proti škůdcům a chorobám [38]. Dosud bylo objeveno několik tisíc polyfenolických molekul, z toho pak několik stovek v jedlých rostlinách [39]. Díky svému širokému rozsahu biologické aktivity jsou polyfenoly jedny z nejintenzivněji studovaných molekul v různých odvětvích chemie, zejména v chemii potravinářské a kosmetické. Strukturu polyfenolů tvoří jedno nebo více aromatických jader, na které jsou navázány dvě a více hydroxylových skupin [40], [41], [42].
K nejdůležitějším vlastnostem polyfenolů patří jednak jejich schopnost reagovat s proteiny a poté tvořit vysokomolekulární komplexy a dále jejich antioxidační aktivita [43]. Jakožto antioxidanty chrání buňky před oxidačním stresem. Mechanismus antimikrobiálního účinku fenolických látek spočívá zřejmě v jejich reakci s thiolovými skupinami a v nespecifických reakcích s terciální strukturou enzymů [19], [21].
Dle chemické struktury lze polyfenoly dělit na tři základní skupiny – polyfenoly neflavonoidní, flavonoidní a ostatní. Další možností dělení je dělení na základě primárních vlastností. V rámci tohoto dělení rozlišujeme chuťové látky, barviva (flavonoidy), přírodní antioxidanty (flavonoidy) a vonné látky [44].
Nejjednoduššími zástupci neflavonoidních fenolů jsou jednoduché fenoly a benzochinony. Mezi jednoduché fenoly řadíme fenolické kyseliny jako např. kyselina gentisová, kávová,

gallová a ellagová nebo kyselina benzoová a skořicová. Ty se v rostlinách nacházejí nejčastěji vázané na proteiny nebo polymery buněčných stěn. Dalšími neflavonoidními fenoly jsou saponiny (např. ginsenosid), stilbeny (např. resveratrol), hydrolyzované taniny, lignany a další např. kurkumin [39], [44], [45], [46].

### 2.4.3. Flavonoidy

Mezi polyfenolické sloučeniny patří rozsáhlá skupina látek, tvořených flavanovým cyklickým skeletem – flavonoidy. Flavanový skelet, zobrazený na obrázku č. 10, tvoří dva substituované benzenové kruhy a pyranový kruh. Díky kyslíkovému atomu pyranového kruhu můžeme pozorovat typické reakce flavonoidů [47], [48].




*Obrázek 10: Struktura flavanového skeletu[49]*

Klasifikace flavonoidů je možná dvojím způsobem; jedním je způsob napojení fenylového kruhu na pyranový. Tato klasifikace je shrnuta v tabulce 3. Běžně bývají na kruzích připojeny hydroxy- nebo methoxyskupiny a jednotlivé deriváty se od sebe liší stupněm substituce a oxidace. Druhé dělení je tedy podle stupně oxidace C3 řetězce. Takto rozlišujeme flavanoly, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, falvonoly a anthokyanidiny, chalkony atd.[47], [48].

Tabulka 3: Klasifikace flavonoidů dle napojení fenylového kruhu na pyranový[47]

| Pozice napojení | Skupina flavonoidů | Příklad |
|---|---|---|
| C2 | normální flavonoidy | většina flavonoidních barviv |
| C3 | isoflavonoidy | roteniny |
| C4 | neoflavonoidy | |

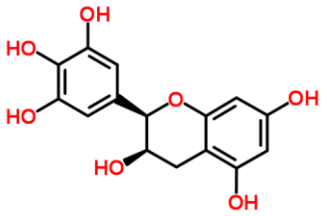
Dosud bylo nalezeno více než 4000 flavonoidů, a to především v listech, semenech, kořenech a květech rostlin [50]. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů. Ty obsahují ve své molekule aglykon - necukernou část a cukernou část [51], [52]. Flavonoidy plní v rostlinách různé funkce, jako je např. pigmentace, obranné funkce, interakce s mikroorganismy, ochrana před UV zářením [53], [54].

Flavonoidy jsou vysoce reaktivní a jsou velmi dobrými antioxidanty. Jejich antioxidační aktivita závisí na prostorovém uspořádání funkčních skupin [50]. Díky tomu, že flavonoidy interagují s extracelulárními proteiny buněčné stěny, způsobují tímto degradaci buněčné stěny, a jsou tak antimikrobiálními činidly. U lipofilních flavonoidů bylo zjištěno, že mohou také narušovat cytoplazmatickou membránu mikroorganismů [21].

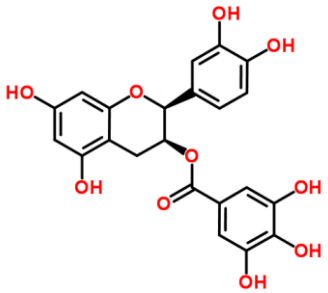
#### *2.4.3.1. Katechiny*

Polyfenoly jsou nejdůležitějšími složkami v čajových lístcích. Čerstvé listy zeleného čaje jsou bohaté především na 3-flavanoly, známé jako katechiny. Katechiny jsou zde přítomné v množství 30-40% sušiny [55]. V čaji způsobují jeho trpkost a hořkost.

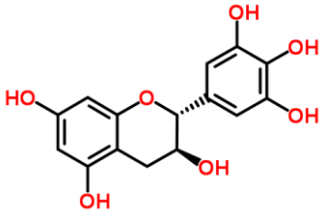
Katechiny mají v molekule dva chirální uhlíky a mohou se vyskytovat ve čtyřech izomerech — (+,-)-katechiny a (+,-)-gallokatechiny. V přírodě se však vyskytují pouze (+)-katechiny a (+)-gallokatechiny a (-)-epikatechiny a (-)-epigallokatechiny [45].
V čaji jsou obsaženy následující katechiny, které jsou zobrazeny i na obrázku č. 11: gallokatechin, epikatechin (EC), epigallokatechin (EGC), epikatechin-3-gallát (ECG) a epigallokatechin-3-gallát (EGCG) který je zde zastoupen nejvíce. Čím více je čaj oxidovaný, tím méně katechinů je v něm obsaženo. Přeměnou katechinů vznikají thearubigeny a theaflaviny, které jsou obsaženy v černém čaji [56].



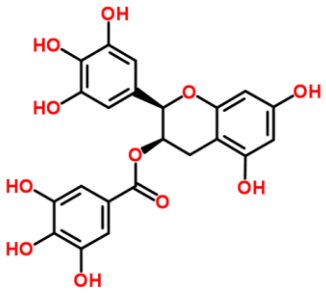
(-)-Epigallokatechin



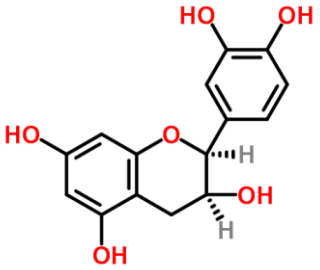
(+)-Epikatechin-3-gallát



(+)-Gallokatechin



(-)-Epigallokatechin gallát



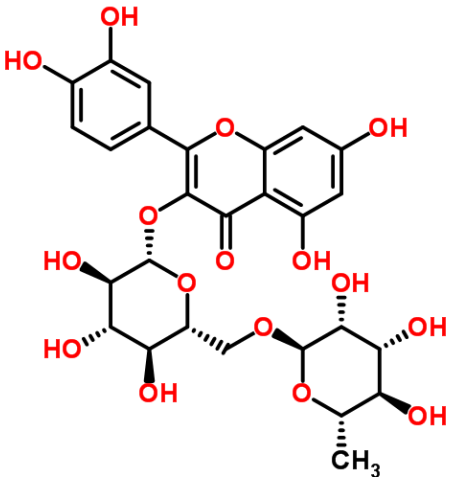
(+)-Epikatechin

*Obrázek 11: Katechiny obsažené v čaji [57], [58], [59], [60], [61]*

Katechiny působí inhibičně na růst mikroorganismů a jsou účinné i při prevenci některých generačních chorob [21].

#### *2.4.3.2. Rutin*

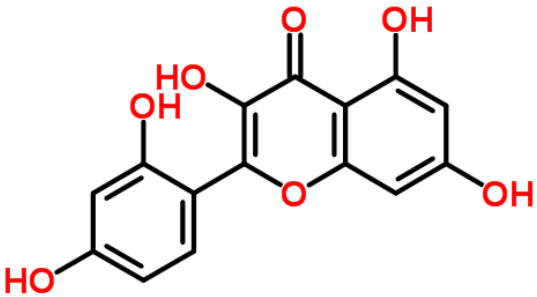
Nejznámějším flavonoidem je rutin, jehož struktura je zobrazena na obrázku č. 12. Jedná se o netoxickou, poměrně rozšířenou rostlinnou látku obsaženou nejméně v 85 rostlinných druzích [62]. Jedná se o zelenožlutou krystalickou látku, které je špatně rozpustná ve vodě.
Rutin je významný svými účinky na lidský organismus. Má značnou antioxidační aktivitu, protizánětlivé, antimutagenní a antikarcinogenní účinky [63], [64]. Má také určitý antimikrobiální efekt v zažívacím traktu [65].
Rutin je díky svým příznivým vlastnostem hojně využíván ve farmacii, kosmetice a potravinářství [66].




*Obrázek 12: Struktura rutinu [67]*

#### *2.4.3.3. Morin*

Jedním z významných flavonoidů je i morin, neboli 2-(2,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-on. Tento flavonoid byl nalezen stejně jako rutin např. v ovoci, zelenině, čaji nebo víně. Jedná se o žlutý prášek, jehož struktura je znázorněna na obrázku 13. [68]
Morin má také řadu biologických a biochemických účinků, ať už protizánětlivé, protinádorové nebo kardioprotektivní. Taktéž se jedná o silný antioxidant, který může působit různými mechanismy [68].




Obrázek 13: Struktura morinu [69]

## 2.5. Čaje

Pravý čaj je takový produkt, který je vyroben z výhonků, listů, pupenů a zdřevnatělých stonků čajovníku *Camellia sinensis [70]*. Dle zpracování se pravý čaj rozděluje na černý, oolong a zelený. Při procesu zpracování čaje probíhá jeho oxidace. Neoxidovaný čaj je čaj zelený. Částečně oxidovaný je čaj polozelený, neboli oolong. Zcela oxidovaný je čaj černý [71].
Abychom získali čaj bílý, jsou jeho nerozvinuté pupeny a nedorostlé lístky po nasbírání ponechány zavadnout a přetřásáním na platech se mírně pomačkají. Pomačkání způsobí narušení buněčných membrán, díky čemuž dojde ke slabé oxidaci. Brzy poté se ale čaj propaří a suší, čímž je proces oxidace zastaven [72].
Čaj obsahuje v sušině dvakrát větší množství kofeinu než kávové boby. Ovšem po přípravě obsahuje šálek čaje o polovinu kofeinu méně než šálek kávy. Významnými složkami čaje jsou polyfenoly, kterých obsahují čajové lístky až 22 %, a které mají antioxidační účinky. Dále obsahuje čaj proteiny, vlákninu, vitamíny a minerály. V neposlední řadě čaj obsahuje také některé alkaloidy (theofylin, theobromin, kofein) a katechiny [72]. Bylo zjištěno, že aromatické složky zeleného čaje ničí bakterie, zodpovědné za vznik zubního kazu [73]. Extrahovaný čínský čaj pak podle výzkumů zpomaluje růst některých významných patogenních bakterií [72].

Mezi čaje se často zařazují i nápoje, které vlastně čaji nejsou. Takové nápoje se označují jako „nečaje“ a nejsou vyrobeny z lístků čajovníku. Mezi tyto nápoje se řadí např. rooibos, honeybush, lapacho nebo maté.

### 2.5.1. Čaje „Gunpowder Formosa“ a „Gunpowder Black“

Čaje „Gunpowder“ pocházejí původně z Číny, v současné době však může pocházet i z jiných zem,í např. Srí Lanky nebo Thaiwanu. Tento kvalitní čaj má lahodnou chuť a osvěžující účinky. Dělí se do několika tříd, které se od sebe mohou lišit různými vlastnostmi. Tyto čaje se zpracovávají charakteristickými postupy ručně nebo na speciálních strojích. Jejich konečnou podobou jsou lístky srolované do tvaru kuliček [74].

V této práci byly využity dva čaje druhu Gunpowder. Jedním z nich je Gunpowder Formosa, který pochází z Thaiwanu. Tento čaj má specifickou chuť, odlišnou od ostatních druhů čajů typu Gunpowder. Jedná se o zelený čaj, který má výrazně tmavou barvu a velmi pronikavou chuť i vůni [74].

Dalším čajem, který byl v práci využíván je Gunpowder Black. Lístky tohoto čaje pocházejí z čínské provincie Yunnan a mají také podobu srolovaných kuliček. Vyznačují se odstíny od tmavě zelené po černou. Tento čaj je ale na rozdíl od předchozího oxidovaný a jeho nálev má zlatohnědou barvu [75],[76].

*Obrázek 14: A – Gunpowder Black, B- Gunpowder Formosa*

### 2.5.2. Čaj „Pai Mu Tan“ - Bílá pivoňka

Čaj „Pai Mu Tan“, neboli bílá pivoňka pochází z Číny z hor v oblasti Fu-ťien. Tento čaj je vyráběn ze sušených stříbrných ochmýřených tipsů a nerozvitých pupenů s chloupky. Pai Mu Tan se sklízí vlastně ještě nedozrálý, jeho lístky se pak suší, ale nesvinují se. Způsob zpracování tohoto čaje přispívá k tomu, že voní a chutná téměř jako čerstvý čaj. Nálev tohoto čaje je oranžově žlutý a má jemné bylinkové až ořechové aroma.

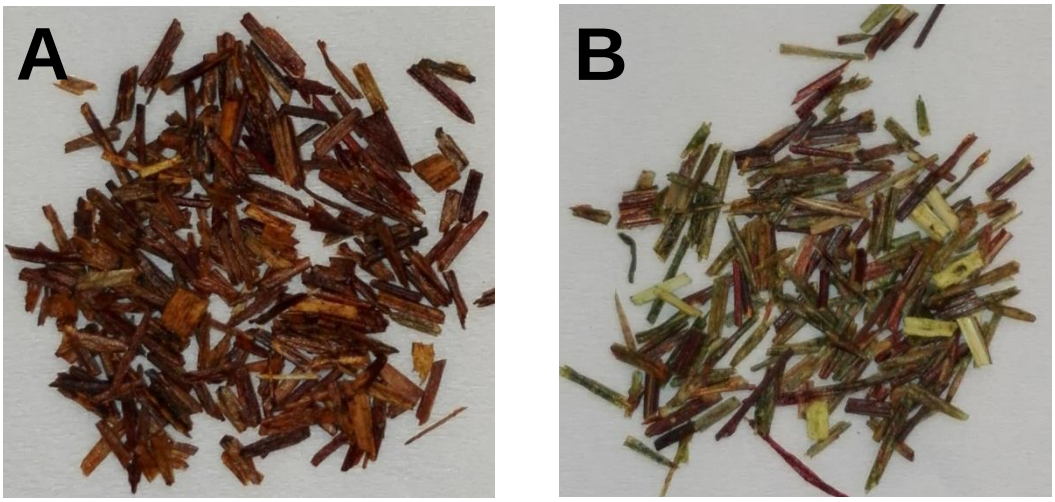
Pai Mu Tan má nízký obsah kofeinu, obsahuje mnoho antioxidantů, vitaminů a minerálních látek. Díky obsaženým látkám je tento čaj vhodný k prevenci civilizačních chorob, zlepšuje obranyschopnost, podporuje zdraví kůže, vlasů a nehtů [77], [78].

*Obrázek 15: Pai Mu Tan*

### 2.5.3. Rooibos červený, zelený

Dalším využitým čajem je „nečaj“, tedy Rooibos zelený a červený. Rooibos pochází z oblastí na severu od Kapského města. Jedná se o nápoj připravený z keře *Aspalathus linearit*, tento keř se po určité době od vysazení sbírá do vaků a drtí se. Rooibos chutná i vypadá téměř jako pravý čaj. Jeho výhodou pro každodenní popíjení je, že neobsahuje kofein. Naopak Rooibos obsahuje značné množství antioxidantů, vitamin C a minerální látky. Tak jako bílý čaj pomáhá i Rooibos v prevenci civilizačních chorob, zabraňuje hromadění škodlivých látek v organismu a posiluje imunitu.

Lístky červeného Rooibosu, jsou po sklizni oxidovány a tím získávají svou typickou červenou barvu. Naopak Rooibos zelený se oxidovat nenechává a obsahuje o něco více antioxidantů než červený [79], [80].




*Obrázek 16: A- Rooibos červený, B- Rooibos zelený*

### 2.5.4. „Honeybush“

Dalším „nečajem“ použitým v této práci je „honeybush“. Tento keř je příbuzným výše zmíněného Rooibos a taktéž pochází z Jižní Afriky. Zpracovává se také podobně jako rooibos. Sklizeň probíhá v období květu z divoce rostoucích Medových keřů. Tyto keře jsou sekány těsně nad zemí, poté se nařežou na malé kousky, které jsou namáčeny, a poté probíhá jejich oxidace. Po procesu oxidace je barva honeybush čaje tmavě hnědá. Odvar z tohoto keře má lahodné medové aroma. Z látek, které honeybush obsahuje, jsou to antioxidanty, minerály a stopové prvky. Jakožto „nečaj“ honeybush neobsahuje kofein a třísloviny [81], [82].

*Obrázek 17: Honeybush*

### 2.5.5. „Lapacho“

V případě nápoje „Lapacho“, který pochází z kůry stromu *Tecome Lapacho* opět mluvíme o tzv. „nečaji“. Tento strom roste v několika zemích – Brazílii, Bolívii, Peru, severní Argentině a Paraguaji. Vnitřní kůra, která má červenou barvu se získává konkrétně z odrůd stromů *Lapacho Colorado* a *Lapacho Morado*. Kůra lapacho je seškrabávána z vnitřní kůry jednou až dvakrát do roka. Velmi kvalitní lapacho čaj se získává z velmi starých stromů volně rostoucích v přírodě [83], [84], [85].

Hlavními složkami čaje lapacho jsou naftochinony, což jsou barviva, která mají antimikrobiální, antifungální, antivirový a antiparazitický účinek. Mezi tyto látky patří lapachol, jedná se o látku podobnou vitaminu K. Mimo to lapacho obsahuje saponiny, katechiny a další látky. Obsaženo je zde i určité množství minerálů [86].

*Obrázek 18: Lapacho*

## 2.6. Guarana

Jedním z extraktů využívaných také v této práci byl extrakt z guarany. Guarana pochází z Amazonie a je využívána již po staletí. V tomo případě byl využíván prášek ze semen rostliny s názvem Paulinie nápojná (*Paullinia cupana).* Semena guarany jsou tmavě hnědá, zatímco květy mohou být žlutooranžové až jasně červené.

Guarana obsahuje vysoké množství kofeinu, 2,5 až 6% což je 2x až 5x více než u semen kávy Arabica. V malém množství byl prokázán v guaraně i obsah theofylinu a theobrominu. V guaraně jsou dále obsaženy taniny s převahou katechinů, flavonoidy zodpovědné za antioxidační aktivitu a saponiny.Informace o přesném složení guarany nejsou však dosud úplné, vzhledem k nesprávné identifikaci některých látek.

Guarana je známá svými účinky jakožto stimulant, afrodisiakum nebo tonikum a je zahrnuta mezi léčivé rostliny. Představuje velký potenciál pro využití ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu [87].

*Obrázek 19: Guarana - prášek*

## 2.7. Antioxidační účinek

### 2.7.1. Volné radikály

Pokud mluvíme o volných radikálech, mluvíme o molekulách, atomech a iontech, které jsou schopny samostatné existence a obsahují ve své valenční vrstvě jeden nebo více nepárových elektronů. Volné radikály jsou vysoce reaktivní díky snaze párovat elektrony.

Tyto vedlejší produkty metabolismu působí oxidačně na buňky a způsobují jejich stárnutí a změny v jejich struktuře. Působí na biologicky významné sloučeniny, jako jsou lipidy, bílkoviny nukleové kyseliny a mohou modifikovat jejich funkce.

Jedná se především o ROS (reaktivní kyslíkové radikály) a RNS (reaktivní dusíkové radikály) [88], [89], [90].

### 2.7.2. Antioxidanty

Poškození biomolekul volnými radikály lze předcházet působením antioxidantů. Jedná se o molekuly, které mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek v buňkách. Antioxidanty mohou chránit organismus jak před exogenními, tak i endogenními volnými radikály [89].

Antioxidanty mohou mít různou chemickou povahu, proto se liší i mechanismus jejich působení. Působení volných radikálů říkáme tzv. oxidační stres, v jeho důsledku jsou poškozovány tkáně organismů. Jako antioxidační kapacitu pak označujeme parametr, který je úměrný schopnosti tkáně odolávat oxidačnímu stresu [90].

Nejznámějšími a nejvýznamnějšími antioxidanty jsou vitamin C, vitamin E a karotenoidy. Dalšími látkami, které mají značné antioxidační účinky, jsou již výše zmíněné polyfenolické sloučeniny, zejména resveratrol, katechiny a flavonoidy [91].
Antioxidační účinek může obecně probíhat třemi mechanismy. Jednak tvorbou volných radikálů, interferencí s již vytvořenými radikály a reparací poškození způsobených oxidanty [91].
Polyfenoly a zejména pak flavonoidy působí jako akceptory hydroxylových a peroxylových radikálů. Vytváří chelátové vazby s kovy a působí jako inhibitory reakcí, které jsou zdrojem aktivních kyslíkových radikálů [92].

## 2.8. Možnosti zvýšení antimikrobiálního účinku

K boji proti rezistentním patogenům je důležité využívat nová antimikrobiální činidla. Tato činidla je důležité hledat i z důvodu rostoucí rezistence k antibiotikům. Rezistenci definujeme jako schopnost mikroorganismu odolávat účinku antibiotik. Rezistence může být absolutní, kdy mikrob nemá cílové struktury ovlivňované příslušnou antimikrobní látkou, nebo relatiní, v tomto případě nemá organismus ve svém těle dostatečnou koncentraci antimikrobní látky k dosažení inhibice růstu mikroorganismů. Rozlišujeme také rezistenci primární (geneticky podmíněnou) a sekundární (získanou). Rezistence může být zprostředkována mnoha mechanismy, jako je např. snížení permeability protiinfekční látky buněčnou stěnou nebo chybění cílové struktury pro zprostředkování účinku protiinfekční látky [2], [93].
Ať už z důvodu rezistence antibiotik tak i z jiných důvodů je důležité zvyšovat antimikrobiální potenciál účinných látek. Zvýšení antimikrobiálního účinku je výhodné jak pro farmaceutický, potravinářský, tak i pro kosmetický a další průmysl [94].

### 2.8.1. Kombinace látek

Jednou z možností jak zvýšit či rozšířit antimikrobiální efekt je kombinace jednotlivých antimikrobiálních látek. Podmínkou pro kombinaci látek, která rozšíří spektrum pokrytí je to, že látky nebudou působit antagonisticky. Lze kombinovat např. jednotlivé přírodní látky mezi sebou, ale i antibiotika, ke kterým mohou být mikroorganismy rezistentní, s přírodními antimikrobiálními látkami. Synergické kombinace by měly umožňovat použití nižších koncentrací léčiv a tak snižovat např. výskyt antibiotické toxicity, nebo mohou způsobit, že účinek antimikrobiálních látek v kombinaci je větší než součet účinků každé látky zvlášť [95], [96].

### 2.8.2. Enkapsulace

Další možností, jak zlepšit antimikrobiální efekt látek je jejich enkapsulace. Enkapsulací dojde např. ke zlepšení adsorpce, zvýšení účinnosti nebo k lepšímu dodávání látek do místa působení. Částice s enkapsulovanými antimikrobiálními látkami mohou mít lepší chemickou stabilitu, mohou být kompatibilnější a mohou mít lepší mezifázové vlastnosti. Do částic je možné také umístit vyšší koncentraci antimikrobiální látky nebo látku, která je jinak nestabilní. Enkapsulace se využívá také pro překonání aktivitních ztrát [97].

## 2.9. Možnosti aplikace vybraných antimikrobiálních látek

Rostlinné látky obsahující polyfenoly mají velký aplikační potenciál. Polyfenoly mají značnou strukturní rozmanitost a variabilitu v chemickém složení. Mohou tak být účinné proti většímu množství patogenních organismů.
Většina studií týkajících se antimikrobiálních látek rostlinného původu zahrnuje působení bylin, koření a sloučenin obsažených v nich.

### 2.9.1. Kosmetika

Přírodní látky s antimikrobiálním a antioxidačním účinkem mohou být využity v kosmetice díky svému antimikrobiálnímu efektu jako konzervanty, a to samotné nebo v kombinaci s jinými chemickými konzervanty [98]. Velké množství kosmetických produktů obsahuje přírodní látky jako aktivní složky – antioxidanty. Ty pak mohou působit proti volným radikálům. Díky tomu, že antioxidanty likvidují meziprodukty, může být zastavena řetězová reakce vzniku volných radikálů nebo mohou být tyto látky samy oxidovány a tím zabránit jiným oxidačním reakcím. Tento proces může chránit kůži před stresem způsobeným volnými radikály [99].

### 2.9.2. Hojení ran

Vzhledem ke značné antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé aktivitě rostlinných přírodních látek narůstá v poslední době zájem o jejich využití při hojení ran.

Hojení představuje třífázový proces, který je složen ze zánětu, růstu buněk a tvorby kolagenové mřížky. Zánětlivá reakce v procesu hojení může být urychlena, pokud zabráníme kolonizování ran bakteriemi.

Pro hojení ran jsou tedy antimikrobiální látky velmi užitečné. Je zde ovšem problém s jejich transportem přes buněčné membrány a se snížením jejich účinnosti. Tyto problémy může vyřešit enkapsulace látek např. do lipozomů nebo do polymerních částic [26].

### 2.9.3. Potraviny

Mikrobiální kontaminace potravin během skladování je velkým problémem, poněvadž může dojít k závažnému poškození zdraví konzumentů. V posledních letech je velký zájem o přírodní antimikrobiální látky, které mohou inhibovat růst bakteriálních a houbových kontaminantů potravin. Cílem je zlepšit kvalitu a skladovatelnost potravin. Dalším z důvodů je znepokojení ohledně bezpečnosti používaných konzervačních látek, v důsledku toho je zde zvyšující se poptávka po přírodních produktech, které mohou být alternativou konzervantů. Pro potravinářský průmysl mohou být využívány jak rostlinné látky, tzv. fytoncidy, obsahující velmi účinné polyfenoly, tak i živočišné látky, např. již zmíněný lysozym. Antimikrobiální látky mohou být přidávány k potravinám v různých formách, a to buď přímo do potraviny, nebo do obalů v systémech, které zajistí jejich pomalé uvolňování, jako např. filmy nebo nanočástice. Nanočástice mohou být připraveny např. z polymerních nosičů nebo mohou být ve formě lipozomů [100].

Antimikrobiální látky jsou využitelné i ve farmaceutickém průmyslu jako výživové doplňky. Opět je zde možnost jejich enkapsulace, která zajistí zvýšení jejich biologické dostupnosti, účinnosti a pozvolného uvolňování [26].

# 3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo studium antimikrobiálního účinku směsí přírodních látek pomocí mikrobiálních testovacích systémů a studium možností stabilizace těchto přírodních směsí.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- Zpracování rešerše zaměřené na přírodní antimikrobiální preparáty rostlinného a živočišného původu a jejich účinek.
- Optimalizace metod stanovení antimikrobiální aktivity a postupů enkapsulace.
- Testování antimikrobiální aktivity vybraných přírodních směsí ve volné a enkapsulované formě.
- Sledování dlouhodobé stability antimikrobiálních směsí.

# 4. EXPERIMETNÁLNÍ ČÁST

## 4.1. Použité mikroorganismy

Všechny použité bakteriální kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

- *Escherichia coli* (CCM 7395)
- *Micrococcus luteus* (CCM 1569)
- *Serratia marcescens* (CCM 8587)

## 4.2. Použité chemikálie

### 4.2.1. Standardní a speciální chemikálie

- Acetonitril pro HPLC, LachNer (Česká republika)
- Agar, Himedia (Indie)
- Ampicilin, Sigma-Aldrich (Německo)
- Dimethylsulfoxid, Lachema (Česká republika)
- Ethanol 99%, LachNer (Česká republika)
- Folin-Ciocalteauovo činidlo, Penta (Česká republika)
- Hovězí extrakt, Himedia (Indie)
- Chitosan (medium molecular weight), Sigma-Aldrich (Německo)
- Cholesterol, Serva (Německo)
- Katechin, Sigma-Aldrich (Německo)
- Kofein, Sigma-Aldrich (Německo)
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (Německo)
- Lecithin, Serva (Německo)
- Lysozym, Serva (Německo)
- Methanol pro HPLC, LachNer (Česká republika)
- Morin, Sigma-Aldrich (Německo)
- Nutrient Broth Medium, Himedia (Indie)
- Pepton, Himedia (Indie)
- Rutin, Sigma-Aldrich (Německo)
- Streptomycin, Himedia (Indie)
- Theobromin, Sigma-Aldrich (Německo)
- Theofylin, Sigma-Aldrich (Německo)
- Tripolyfosfát sodný, Sigma-Aldrich (Německo)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

## 4.3. Přístroje a pomůcky

- Mikrocentrifuga Mikro 120, Hettich Zentrifugen (Německo)
- Spektrofotometr Thermo Spectronic Helios δ (Velká Británie)
- Spektrofotometr Unicam Helios $\alpha$ (Velká Británie)
- Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments (USA)
- Termostat IP60, Biotech (Česká republika)
- Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000, Labicom (Česká republika)
- Vortex REax Top, Heidolph (Německo)
- Analytické váhy BOECO (Německo)
- Předvážky Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (Německo)
- Ultrazvukový homogenizátor/dispergátor - Bandelin Sonoplus HS3200 - Sonorex Technik (Německo)
- ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (Německo)

- Koloidní DLS analyzátor ZetaSizer Nano ZS - Malvern (Velká Británie)
- Sestava HPLC/PDA/MS, Thermo Finnigan SURVEYOR, Thermo Fischer (USA): Pumpa - MS Pump Plus, Detektor PDA - PDA Plus Detector, Hmotnostní detektor LCQ Advantage Max; Termostat – LCO 101, Column Oven (ECOM, Česká republika); Dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157 (ECOM, Česká republika); Vyhodnocovací systém Xcalibur Thermo Fischer (USA)
- Kolona Kolona Kinetex 5u C18, 4,6 x 150 mm, (Agilent Technologies – USA)
- Vakuová odparka Werke RV06-ML: IKA (Německo)
- Průtokový cytometr - Apogee A50, Apogee Flow Systems (Velká Británie)
- Automatické pipety v různém rozsahu objemu – Discovery (Německo)a Biohit (Německo)

## 4.4. Čaje a byliny

- Hřebíček (Avokádo)
- Jitrocel, Léčivé rostliny Brno
- Heřmánek, Léčivé rostliny Brno
- Rakytník, Léčivé rostliny Brno
- Skořice (Avokádo)
- Kopřiva, Léčivé rostliny Brno
- Zelený čaj – Gunpowder formosa (Oxalis, původ Taiwan)
- Černý čaj – Gunpowder black (Oxalis, původ Čína)
- Bílý čaj – Pai Mu Tan - Bílá pivoňka (Oxalis, původ Čína)
- Lapacho (Oxalis, původ Brazílie)
- Honeybush (Oxalis původ, Jihoafrická republika)
- Rooibos červený (Oxalis, původ Jihoafrická republika)
- Rooibos zelený (Oxalis, původ Jihoafrická republika)
- Guarana (EXOTIC HERBS, původ Brazílie)

## 4.5. Příprava bylinných a čajových extraktů

### 4.5.1. Vodné extrakty

Vodné extrakty byly využity pro stanovení základních charakteristik, pro enkapsulaci a pro antimikrobiální testy.

Pro stanovení základních charakteristik a pro enkapsulaci byly čaje připraveny dle návodu na obalu a přefiltrovány přes gázu. V případě bylin bylo naváženo 0,4 g bylinky a zalito 3 ml horké vody. Bylinky byly louhovány 10 min a poté zfiltrovány přes gázu.

K antimikrobiálním testům byly extrakty připraveny navážením 0,75 g čaje nebo byliny a zality 10 ml vroucí vody. Po 10 min louhování byly extrakty zfiltrovány přes gázu a použity k testování.

### 4.5.2. Ethanolové extrakty

Ethanolové extrakty byly využity ke stanovení některých charakteristik a k antimikrobiálním testům.

Extrakty byly připraveny navážením 1 g čaje, který byl zalit 10 ml MeOH. Směs byla umístěna do termostatu nastaveného na 50°C, kde byla 24 h protřepávána. Poté byla zfiltrována přes gázu. Methanol byl odpařen na vakuové rotační odparce a odparek rozpuštěn ve směsi voda:ethanol 1:1,5.

### 4.5.3. DMSO extrakty

DMSO extrakty byly také využity ke stanovení některých charakteristik a k antimikrobiálním testům.

DMSO extrakty byly připraveny navážením 1 g čaje, ten byl zalit 10 ml DMSO a ponechán 10 min extrahovat. Poté byla směs přefiltrována přes gázu a extrakt byl používán ke stanovením.

### 4.5.4. Extrakty pro měření katechinu

Tento typ extraktů byl použit pro stanovení obsahu katechinu v čajích metodou HPLC.

Extrakty byly připraveny zalitím 1 g čaje 10 ml 1 M HCl, Tato směs byla ponechána 20 min ve tmě a chladu. Po 20 min byla provedena filtrace a supernatant byl v dělící baňce protřepáván s ethylacetátem. Poté byla horní organická fáze přelita do odpařovací baňky a spodní vodná fáze znovu protřepávána s ethylacetátem. Vodná fáze byla vylita a organická přidána do odpařovací baňky. Extrakt byl odpařen na vakuové rotační odparce a odparek rozpuštěn v 1 ml MeOH.

## 4.6. Metody pro stanovení základních charakteristik

### 4.6.1. Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo prováděno za použití Folin-Ciocalteauova činidla. Při této reakci jsou fenoly oxidovány v zásaditém prostředí, ve Folin-Ciocalteauově činidle jsou přítomny molybdenany a wolframany, které jsou redukovány na směs svých modrých oxidů. Vzniklé modré zbarvení je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolických sloučenin. Celkový obsah polyfenolů se stanovuje při vlnové délce 750 nm. Jako standard je zde využita kyselina gallová. Výsledky lze tudíž interpretovat buď jako množství celkových polyfenolů, nebo jako ekvivalent kyseliny gallové [101].

Do zkumavky je napipetováno 1 ml 10x zředěného Folin-Ciocalteauova činidla, 1 ml vody a 50 μl vzorku. Po promíchání je směs ponechána 5 min stát při laboratorní teplotě. Poté je přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Směs je opět promíchána a ponechána stát 15 min při laboratorní teplotě. Poté je měřena absorbance při 750 nm. Pro kalibrační křivku byla použita koncentrační řada kyseliny gallové. Rovnice kalibrační křivky je $y = 1{,}3679 \cdot x$. Každý vzorek byl měřen třikrát a z hodnot byly poté v MS Excel vypočteny průměrné hodnoty. Celkový obsah polyfenolů byl vypočítán z rovnice kalibrační křivky.

### 4.6.2. Stanovení celkových flavonoidů

Metoda stanovení celkových flavonoidů je založena na tvorbě komplexů chloridu hlinitého s C4 ketoskupinou a s C3 nebo C5 hydroxyskupinou flavonoidu. Výsledný roztok má pak oranžovou barvu. Toto zbarvení je pak měřeno spektrofotometricky a je úměrné koncentraci flavonoidů ve vzorku. Standardem pro toho stanovení je katechin [102].

Do zkumavky je napipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml vody a 0,2 ml roztoku $NaNO_2$, tato směs je ponechána 5 min stát při laboratorní teplotě. Poté je přidáno 0,2 ml 10% roztoku $AlCl_3$. Po 5 minutách při laboratorní teplotě je přidáno 1,5 ml 1M NaOH a 1 ml vody. Po 15 min stání opět při laboratorní teplotě je měřena absorbance při 510 nm. Pro kalibrační křivku byla použita koncentrační řada katechinu. Rovnice kalibrační křivky je $y = 4{,}4579 \cdot x$. Každý vzorek byl měřen třikrát a z hodnot byly poté v MS Excel vypočteny průměrné hodnoty. Celkový obsah flavonoidů byl vypočítán z rovnice kalibrační křivky.

### 4.6.3. Stanovení kofeinu pomocí HPLC

Kofein byl stanovován ve vzorcích metodou HPLC/PDA. Vzorky čajů byly připraveny dle návodu na obalu a 10x zředěny. Poté byly nastřikovány na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 μl. Pro stanovení byla použita kolona Kinetex 5 μm C18 s reverzní fází. Stanovení probíhalo při 30°C s izokratickou elucí. Jako mobilní fáze byla použita směs voda:acetonitril 80:20, průtok byl nastaven na 600 μl/min. Detekce probíhala na PDA detektoru při 274 nm. Pro zjištění koncentrace kofeinu ve vzorcích byla sestrojena externí kalibrační křivka. Ta byla sestrojena proměřením kalibrační řady kofeinu a odečtením ploch píků z jednotlivých chromatogramů. Rovnice kalibrační křivky je $y = 4{,}42 \cdot 10^8 \cdot x$.

### 4.6.4. Stanovení katechinů pomocí HPLC

Pro měření katechinů v čajích byla provedena jejich extrakce pomocí HCl. Podrobný postup přípravy extraktů je popsán v odstavci 4.5.4. Pro HPLC analýzu byly extrakty 100x zředěny.
Pro stanovení katechinů v extraktech byl zvolen stejný postup jako při stanovení kofeinu uvedeném v odstavci 4.6.3. Byla použita také kolona Kinetex 5 μm C18 s reverzní fází a stejná mobilní fáze. Detekce probíhala při 280 nm. Pro zjištění koncentrace katechinů ve vzorcích byla sestrojena externí kalibrační křivka. Ta byla sestrojena proměřením kalibrační řady standardů a odečtením ploch píků z jednotlivých chromatogramů. Rovnice kalibrační křivky je $y = 1{,}74 \cdot 10^7 \cdot x$.

### 4.6.5. Sanovení theofylinu a theobrominu pomocí HPLC

Pomocí HPLC byl ve vzorcích stanoven theofylin a theobromin. Pro toto stanovení byly použity vzorky čajů, připravené dle návodu na obalu a před nástřikem 10x zředěné. Vzorky byly nastřikovány na kolonu Kinetex 5 μm C18 s reverzní fází pře dávkovací smyčku o objemu 20 μl. Kolona byla umístěna v termostatu nastaveném na 30°C. Eluce byla izokratická a jako mobilní fáze byla zvolena směs voda:acetonitril 80:20, průtok byl nastaven na 600 μl/min. Detekce obou látek probíhala na PDA detektoru při 274 nm. Pro zjištění koncentrace theofylinu a theobrominu ve vzorcích byly sestrojeny externí kalibrační křivky. Ty byly sestrojeny proměřením kalibračních řad theofylinu a theobrominu a odečtením ploch píků z jednotlivých chromatogramů. Rovnice kalibračních křivek je pro theobromin $y = 5{,}59 \cdot 10^7 \cdot x + 4{,}35 \cdot 10^6$ a pro theofylin $y = 5{,}73 \cdot 10^7 \cdot x$

### 4.6.6. Stanovení individuálních flavonoidů pomocí HPLC

Pro stanovení jednotlivých flavonoidů metodou HPLC/PDA byly vzorky čajů opět připraveny podle návodu a na kolonu nastřikovány 10x zředěné.
Vzorky byly nastřikovány na kolonu pomocí dávkovací smyčky o objemu 20 μl. Pro stanovení byla použita kolona Kinetex 5 μm C18 s reverzní fází. Teplota v termostatu byla nastavena na 30°C a průtok byl 750μl/min, stanovení probíhalo při izokratické eluci. Jako mobilní fáze byla použita směs okyselená voda:acetonitril:methanol 50:30:20. Detekce probíhala na PDA detektoru při 370 nm. Jako standardy byly použity morin a rutin. Z měření kalibračních řad standardů byly sestrojeny externí kalibrační křivky. Ty byly sestrojeny pomocí hodnot ploch píků z jednotlivých chromatogramů. Rovnice kalibračních křivek je pro morin $y = 1{,}03 \cdot 10^8 \cdot x$ a pro rutin $y = 1{,}54 \cdot 10^8 \cdot x$.

### 4.6.7. Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity byla využita metoda $ABTS^{\bullet+}$. Kalibrační křivka byla sestrojena měřením koncentrační řady Troloxu rozpuštěného v 60% EtOH. Rovnice kalibrační křivky je $y = 0{,}0014 \cdot x$. $ABTS^{\bullet+}$ byl rozpuštěn ve vodě na koncentraci 7 mM. Do roztoku byl přidán $K_2S_2O_8$ tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 1,45 mM. Roztok byl inkubován nejméně 12 h ve tmě za laboratorní teploty. Před použitím byl $ABTS^{\bullet+}$ zředěn EtOH na A=0,7±0,02. Poté byla získána $A_0$, k 1 ml zředěného $ABTS^{\bullet+}$ bylo přidáno 10 μl rozpouštědla. Poté byly proměřeny vzorky. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml $ABTS^{\bullet+}$, bylo přidáno 10 μl vzorku a směs byla inkubována 10 min ve tmě. Po 10 min byla měřena absorbance při 734 nm. Každý vzorek byl měřen třikrát. Jako body kalibrační křivky i do kalibrační rovnice byly dosazovány hodnoty $\Delta A$ ($A_0$-$A_{10}$). Antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalentní množství Troloxu ve vzorku.

## 4.7. Příprava a charakterizace částic

V této práci byly připraveny dva druhy částic, u kterých byla sledována jejich dlouhodobá stabilita. Prvním typem částic byly lipozomy, druhým pak chitosanové částice. Do částic byly enkapsulovány roztoky čajů. Ty byly připraveny navážením 1,20 g čaje, který byl zalit 16 ml horké vody. Poté byly extrakty ponechány 10 min louhovat a přefiltrovány přes gázu. Ke každému typu částic byly připraveny pro porovnání i prázdné částice, u kterých extrakt nahradila voda.

### 4.7.1. Příprava lipozomů

Lipozomy byly připraveny za použití ultrasonifikace. K 10 ml čajového extraktu bylo přidáno 180 mg lecithinu a 10 mg cholesterolu. Tato směs byla sonifikována po dobu 1 min, za použití chladící lázně.

### 4.7.2. Příprava chitosanových částic

Chitosanové částice byly připraveny také pomocí ultrazvuku. Do 10 ml čajového extraktu bylo přidáno 30 mg chitosanu a 0,2 ml koncentrované kyseliny octové. Směs byla sonifikována 1 min a po malých dávkách byly přidávány 3 ml 0,5% tripolyfosfátu sodného.

### 4.7.3. Stanovení enkapsulační účinnosti

Při stanovení enkapsulační účinnosti bylo využito stanovení obsahu neenkapsulovaných polyfenolů. Ke stanovení byla použita metoda v kapitole 4.6.1. Roztok částic, byl centrifugován 2 min při 14 000 otáčkách a laboratorní teplotě. Pro stanovení byl odebrán potřebný objem supernatantu a v něm bylo stanoveno množství polyfenolů. Porovnáním hodnot naměřených u vzorků před enkapsulací a po enkapsulaci a hodnot z proměření prázdných částic byla vypočítána enkapsulační účinnost.

### 4.7.4. Stanovení velikosti a stability částic

Velikost částic byla stanovena metodou DLS a stabilita pomocí zeta-potenciálu. Pro stanovení byl využit přístroj Zetasizer Nanoseries. Tento přístroj měří časovou závislost kolísání intenzity rozptýleného světla dané Brownovým pohybem částic. Analýza intenzity rozptýleného světla umožňuje určit difúzní koeficient částic a vypočítat distribuci velikosti částic v daném vzorku [103].

Stabilita částic pomocí zeta-potenciálu byla také zjišťována na přístroji Zetasizer Nanoseries. Měření je založeno na technice „Laser Doppler Velocimetry“, tedy na tom, jak rychle se pohybují částice v kapalině za působení elektrického pole. Zeta potenciál je rozdíl potenciálů na pohybovém rozhraní, který se ustavuje při relativním pohybu tuhé fáze s elektrickou dvojvrstvou vůči roztoku. Znaménko je opačné než znaménko iontů vnější vrstvy elektrické dvojvrstvy. Čím větší náboj částice nese, tím je stabilnější [103]. Pro obě analýzy byly vzorky částic vhodně zředěny a poté měřeny.

## 4.8. Stanovení dlouhodobé stability částic

Předložená diplomová práce zahrnuje také studium stability částic, obsahujících extrakty vybraných čajů, které byly připraveny podle postupů v kapitole 4.7.1 a 4.7.2.
V prvním případě byl roztok připravených částic 5x zředěn vodou, ve druhém případě byly částice ponechány tak, jak byly připraveny a roztoky byly vloženy do plastových zkumavek. Ty byly uchovávány při 5°C. V intervalech 7 dní, měsíc a 2 měsíce bylo měřeno množství uvolněných polyfenolů. Ze zkumavek bylo vždy odebráno potřebné množství roztoku částic, to bylo centrifugováno 2 min při 14 000 otáčkách/min. Poté bylo v supernatantu měřeno dle postupu v kapitole 4.6.1 množství uvolněných polyfenolů a porovnáváno s množstvím, které se enkapsulovalo na počátku. Měření bylo provedeno pro každé částice vždy třikrát a hodnoty byly poté zprůměrovány.

## 4.9. Testování antimikrobiální aktivity

### 4.9.1. Kultivace mikroorganismů

Jako testovací modelové mikroorganismy byly zvoleny tři kmeny bakterií. Jeden grampozitivní – *M. luteus* a dva gramnegativní – *E. coli* a *S. marcescens*. Kultury byly dlouhodobě uchovávány v podobě křížového roztěru na agarové plotně při 4 °C v lednici. Pro kultivaci všech mikroorganismů bylo dle návodu na obalu připraveno vždy médium Nutrient Broth. Pro kultivaci bylo připraveno do 100ml Erlenmayerovy baňky 50 ml média a sterilizováno 50 min v tlakovém hrnci. Z důvodu zachování sterility bylo po 24 h médium sterilováno podruhé. Po vychladnutí bylo médium zaočkováno ze zásobní kultury. Zaočkované médium bylo inkubováno 24 h v termostatu při 37°C za stálého třepání. Takto připravená inokula byla použita pro stanovení antimikrobiální aktivity na mikrotitrační destičce a pro zaočkování médií pro zkumavkový antimikrobiální test.

### 4.9.2. Bujónová diluční metoda

Tato metoda využívá měření zákalu, díky kterému je sledován růst mikroorganismů na mikrotitrační destičce. Do jamky mikrotitrační destičky je vždy ke 150 μl buněčné kultury, připravené dle postupu v kapitole 4.9.1, přidáno 50 μl antimikrobiální látky, extraktu, směsi extraktů, nebo částic. Jako blank byla používána kultura s přídavkem 50 μl vody, případně jiného rozpouštědla. Růst bakterií a absorbance byla měřena po 24 h.

### 4.9.3. Zkumavkový test

V této metodě byl opět sledován růst mikroorganismů. Pro testování byla připravena série zkumavek, které obsahovaly 5 ml sterilního média, a které byly zaočkovány 2 % suspenze buněk z inokula. Do zkumavek byl současně také přidán 1 ml antimikrobiální látky. Takto připravené zkumavky byly inkubovány při 37°C po dobu 24 h. Poté byla pomocí průtokové cytometrie zjišťována viabilita buněk v porovnání s blankem, který obsahoval místo testovaného roztoku vodu. U zjišťování působení kofeinu na bakterie bylo pro porovnání růstu využito spektrofotometrie, kdy byl změřen zákal při 630 nm.

## 4.10. Průtoková cytometrie

Jak již bylo zmíněno výše průtoková cytometrie byla v této práci využita ke stanovení množství buněk a jejich viability při antimikrobiálních testech. Vzorek s buňkami byl vhodně zředěn a byla provedena vizualizace propidiumjodidem. Ke zředěnému roztoku bylo tedy přidáno 5 μl/ml a roztok byl ponechán 10 min ve tmě. Poté byl vzorek umístěn do průtokového cytometru a bylo stanoveno procentuální zastoupení živých buněk.

# 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Předložená práce je zaměřena na enkapsulaci antimikrobiálních látek a jejich směsí, sledování dlouhodobé stability připravených částic a testování antimikrobiální aktivity. Jako antimikrobiální látky byly zvoleny vybrané čaje a byliny jako zástupci rostlinných látek a lysozym jakožto zástupce živočišných antimikrobiálních látek. V této kapitole jsou uvedeny výsledky měření. Používané čaje byly v prvé řadě charakterizovány na obsah polyfenolů, antioxidantů a některých dalších látek, které mohou působit jako antimikrobiální či antioxidační složky. V rámci práce byly připraveny lipozomy a chitosanové částice. Dále je zde tedy shrnuta efektivita enkapsulace. U připravených částic byla sledována jejich dlouhodobá stabilita v neutrálním vodném prostředí. V poslední části kapitoly jsou shrnuty výsledky z antimikrobiálních testů. V práci byl sledován antimikrobiální účinek různých typů extraktů čajů, vodných extraktů bylin a jejich směsných preparátů, včetně kombinací s lysozymem. Antimikrobiální aktivita byla sledována také u připravených částic.

## 5.1. Charakterizace čajů a bylin

V následující části práce jsou shrnuty výsledky charakterizace vybraných čajů a bylin.

### 5.1.1. Stanovení celkových polyfenolů

Ve vodných, etanolových a DMSO extraktech čajů a ve vodných extraktech bylin byl stanoven obsah polyfenolů. Extrakty byly připravovány dle postupů v kapitole 4.5 a podrobný postup stanovení polyfenolů je uveden v kapitole 4.6.1.

Tabulka 4: Obsah celkových polyfenolů v extraktech čajů

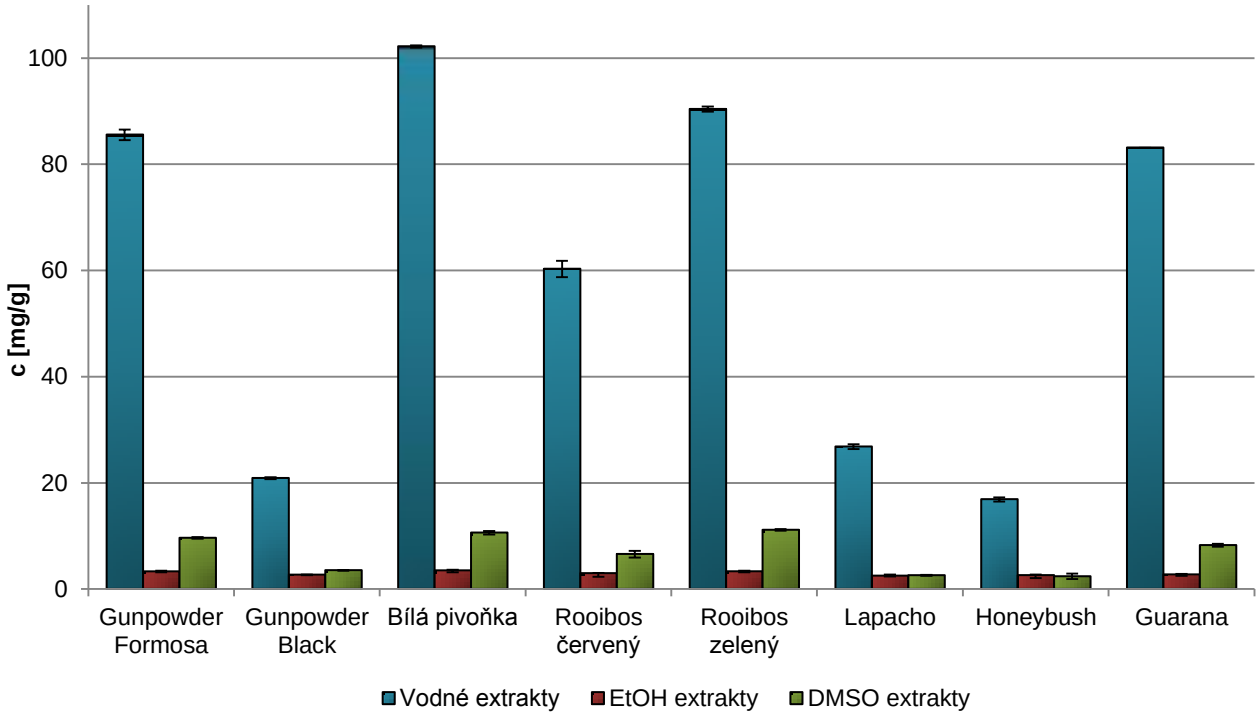
| Čaje | Celkové polyfenoly [mg/g] | | |
|---|---|---|---|
| | Vodné extrakty | EtOH extrakty | DMSO extrakty |
| Gunpowder Formosa | 85,57 ± 1,00 | 3,31 ± 0,16 | 9,63 ± 0,16 |
| Gunpowder Black | 20,89 ± 0,17 | 2,69 ± 0,07 | 3,53 ± 0,08 |
| Bílá pivoňka | 102,19 ± 0,22 | 3,50 ± 0,18 | 10,62 ± 0,34 |
| Rooibos červený | 60,30 ± 1,55 | 2,97 ± 0,04 | 6,58 ± 0,63 |
| Rooibos zelený | 90,39 ± 0,50 | 3,32 ± 0,13 | 11,14 ± 0,13 |
| Lapacho | 26,82 ± 0,44 | 2,50 ± 0,21 | 2,59 ± 0,09 |
| Honeybush | 16,90 ± 0,39 | 2,60 ± 0,16 | 2,39 ± 0,52 |
| Guarana | 83,13 ± 0,00 | 2,74 ± 0,10 | 8,26 ± 0,25 |

Tabulka 5: Obsah celkových polyfenolů v extraktech bylin

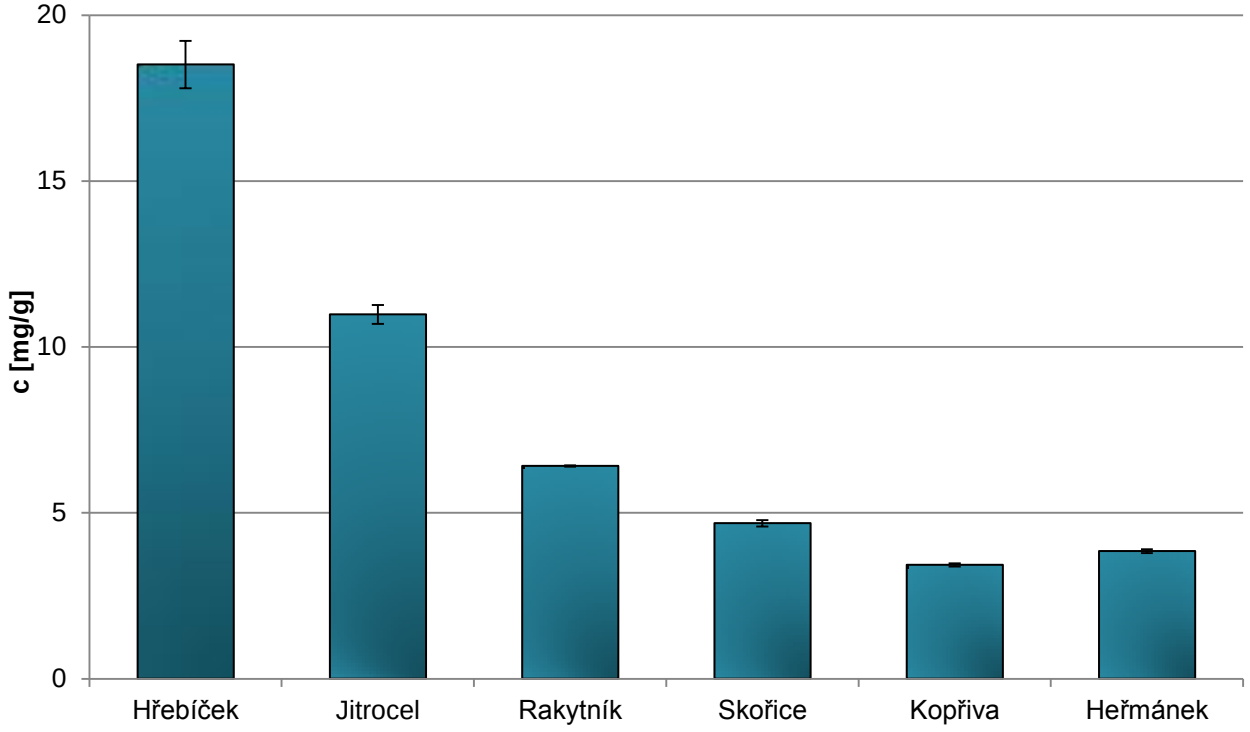
| Byliny | Celkové polyfenoly [mg/g] |
|---|---|
| Hřebíček | 18,51 ± 0,72 |
| Jitrocel | 10,98 ± 0,29 |
| Rakytník | 6,41 ± 0,02 |
| Skořice | 4,69 ± 0,09 |
| Kopřiva | 3,43 ± 0,05 |
| Heřmánek | 3,85 ± 0,06 |

Obsah polyfenolů v extraktech čajů a bylinek jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5. Největší obsah polyfenolů byl v případě vodných extraktů čajů zaznamenán u bílého čaje, nejmenší pak u čaje honeybush. V etanolových extraktech bylo nejvíce polyfenolů také u bílého čaje, nejméně u čaje lapacho. V DMSO extraktech bylo naměřeno nejvíce polyfenolů u zeleného rooibosu a nejméně u čaje honeybush. V případě bylinek obsahoval nejvíce polyfenolů extrakt z hřebíčku a nejméně extrakt z kopřivy. Čaje s nejvyšším a nejnižším množstvím polyfenolů se téměř shodují i dle typů extraktů s výjimkou etanolového extraktu čaje honeybush. Tento extrakt se ale množstvím polyfenolů liší jen nepatrně od etanolového extraktu lapacha, který obsahoval nejméně polyfenolů v rámci etanolových typů extraktů.

Řádové rozdíly mezi vodnými a etanolovými a DMSO extrakty jsou dobře patrné v grafu 1. V grafech 1 a 2 jsou také dobře viditelné rozdíly v obsahu polyfenolů u jednotlivých čajů a bylin. Z hlediska množství uvolněných polyfenolů při extrakci jsou pro využití nejlepší vodné extrakty.




*Graf 1: Obsah celkových polyfenolů v extraktech čajů*




*Graf 2: Obsah celkových polyfenolů v extraktech bylin*

### 5.1.2. Stanovení celkových flavonoidů

Dále byl sledován obsah flavonoidů ve vodných extraktech čajů a bylin, ty byly připraveny dle postupů v kapitole 4.5. Postup stanovení celkových flavonoidů je uveden v kapitole 4.6.2. Koncentrace flavonoidů ve vodných extraktech čajů a bylin jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.

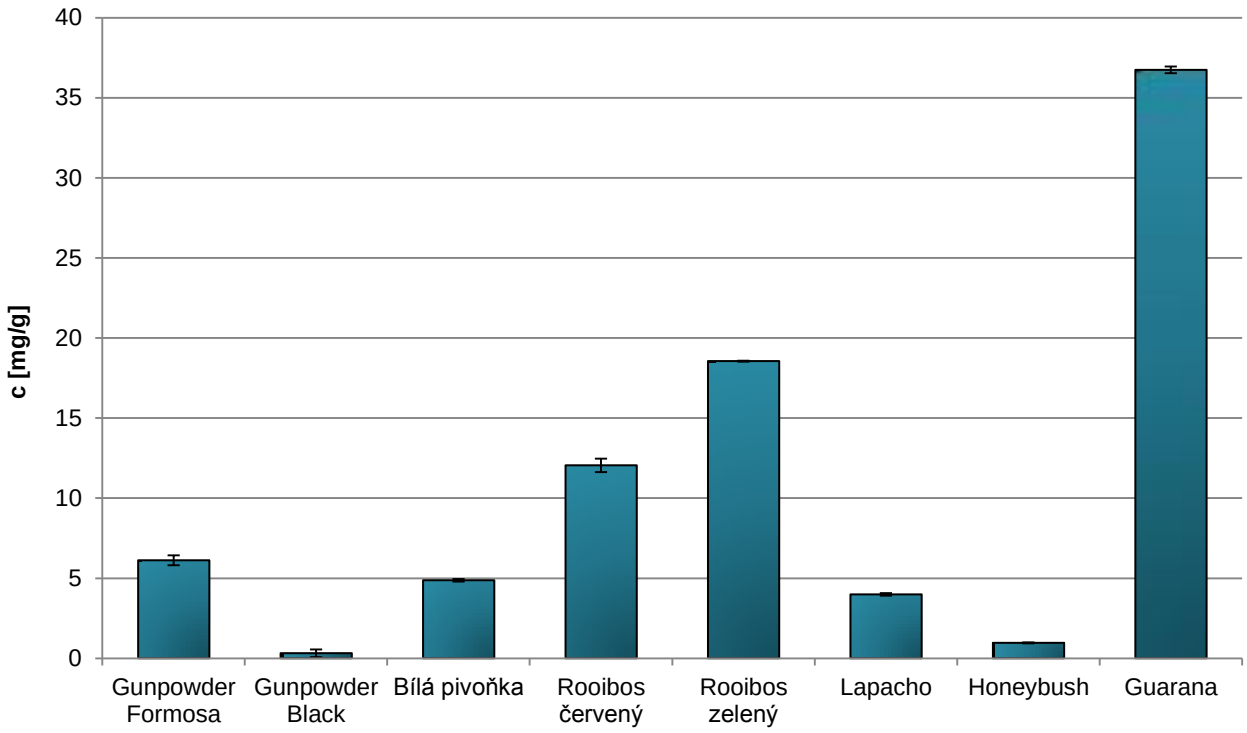
Tabulka 6: Obsah celkových flavonoidů ve vodných extraktech čajů

| Čaje | Celkové flavonoidy [mg/g] |
|---|---|
| Gunpowder Formosa | 6,12 ± 0,31 |
| Gunpowder Black | 0,32 ± 0,24 |
| Bílá pivoňka | 4,87 ± 0,09 |
| Rooibos červený | 12,05 ± 0,42 |
| Rooibos zelený | 18,56 ± 0,03 |
| Lapacho | 3,99 ± 0,08 |
| Honeybush | 0,96 ± 0,03 |
| Guarana | 36,74 ± 0,20 |

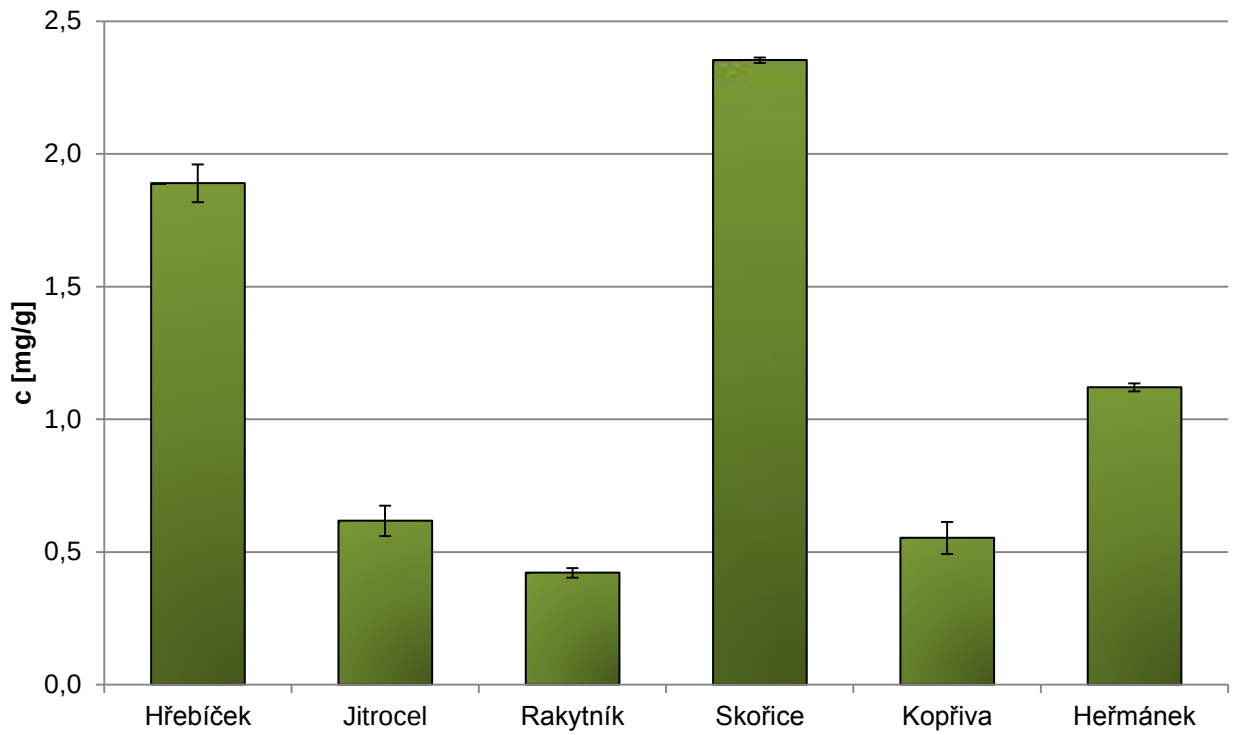
Tabulka 7: Obsah celkových flavonoidů ve vodných extraktech bylin

| Byliny | Celkové flavonoidy [mg/g] |
|---|---|
| Hřebíček | 1,89 ± 0,07 |
| Jitrocel | 0,62 ± 0,06 |
| Rakytník | 0,42 ± 0,02 |
| Skořice | 2,35 ± 0,01 |
| Kopřiva | 0,55 ± 0,06 |
| Heřmánek | 1,12 ± 0,01 |

Nejvíce flavonoidů obsahovala v případě čajů guarana, nejméně pak černý čaj. Z bylinek měla nejvíce flavonoidů skořice a nejméně obsahoval rakytník. V případě guarany představují flavonoidy 44 % polyfenolů, u černého čaje jsou to jen 2 %. U skořice tvoří flavonoidy 50 % celkových polyfenolů a u rakytníku to je pouze 7 %. Rozdíly v obsahu flavonoidů mezi jednotlivými čaji a bylinkami jsou pak zobrazeny i v grafech 3 a 4.




*Graf 3: Obsah celkových flavonoidů ve vodných extraktech čajů*




*Graf 4: Obsah celkových flavonoidů ve vodných extraktech bylin*

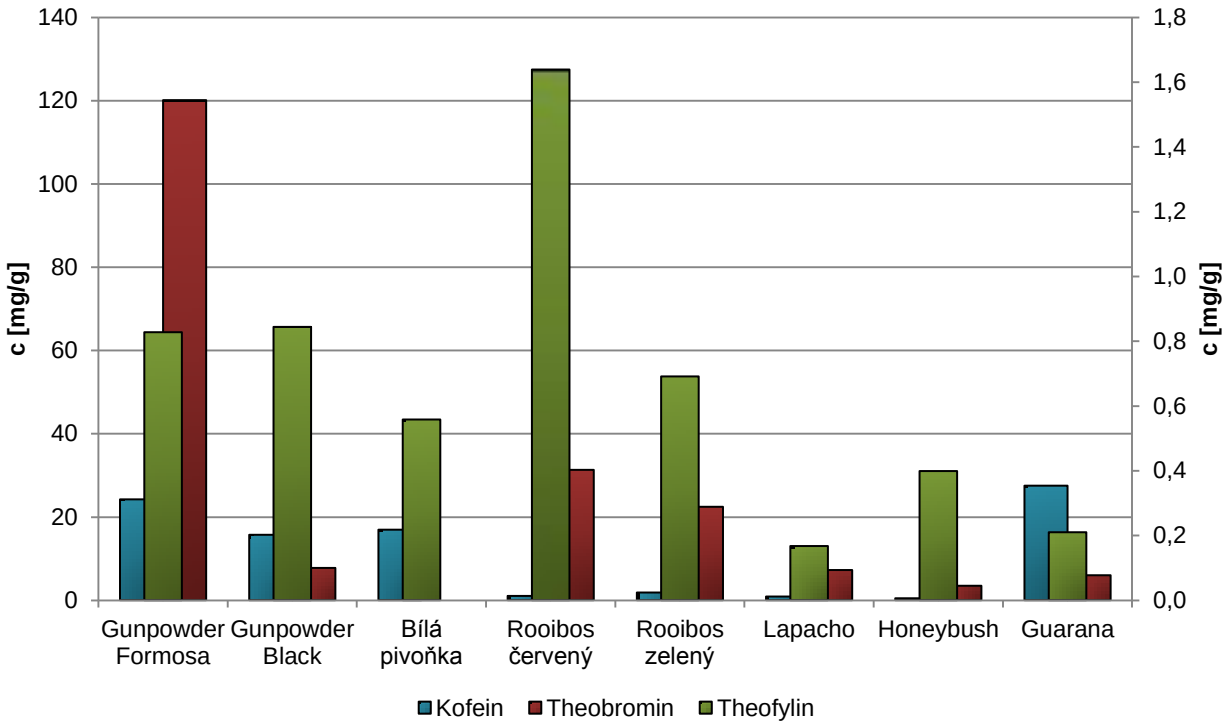
### 5.1.3. HPLC stanovení kofeinu, theobrominu a theofylinu

V rámci charakterizace byl také v čajích stanoven obsah kofeinu, theobrominu a theofylinu. K tomuto stanovení byla využita metoda HPLC. Tyto tři látky byly stanovovány ve vodných roztocích, jejichž příprava je popsána v kapitole 4.5.1. Postup stanovení je uveden v kapitolách 4.6.3 a 4.6.5.

Tabulka 8: Obsah kofeinu, theobrominu a theofylinu v čajích

| Čaje | Obsah [mg/g] | | |
|---|---|---|---|
| | Kofein | Theobromin | Theofylin |
| Gunpowder Formosa | 24,21 | 120,08 | 0,83 |
| Gunpowder Black | 15,70 | 7,74 | 0,84 |
| Bílá pivoňka | 16,92 | 0,00 | 0,56 |
| Rooibos červený | 1,01 | 31,29 | 1,64 |
| Rooibos zelený | 1,83 | 22,42 | 0,69 |
| Lapacho | 0,87 | 7,23 | 0,17 |
| Honeybush | 0,45 | 3,46 | 0,40 |
| Guarana | 27,49 | 5,98 | 0,21 |

Obsah kofeinu, theobrominu a theofylinu v jednotlivých čajích je uveden v tabulce 8. Vzorky byly měřeny 2x, v tabulkách je uvedena průměrná hodnota ze dvou měření. Nejméně kofeinu bylo obsaženo v čaji honeybush, lapacho a v obou čajích rooibos. Tyto čaje se vyznačují tím, že kofein neobsahují, jeho minimální přítomné množství může být způsobenou odchylkami měření. Nejvíce kofeinu obsahovala guarana. V případě theobrominu byl jeho největší obsah v zeleném čaji. Žádný theobromin nebyl detekován v bílém čaji. Červený rooibos byl nejbohatší na obsah theofylinu a nejméně ho bylo obsaženo v lapacho čaji. Rozdíly mezi obsahem theofylinu v jednotlivých čajích nejsou tak značné jako např. u kofeinu. V grafu 5 bylo nutné vynést theofylin na vedlejší osu vzhledem k tomu, že jeho koncentrace se v čajích o řád, případně až o dva liší od koncentrace u kofeinu a u některých čajů i od koncentrace theobrominu.




*Graf 5: Obsah kofeinu, teobrominu a teofylinu v čajích*

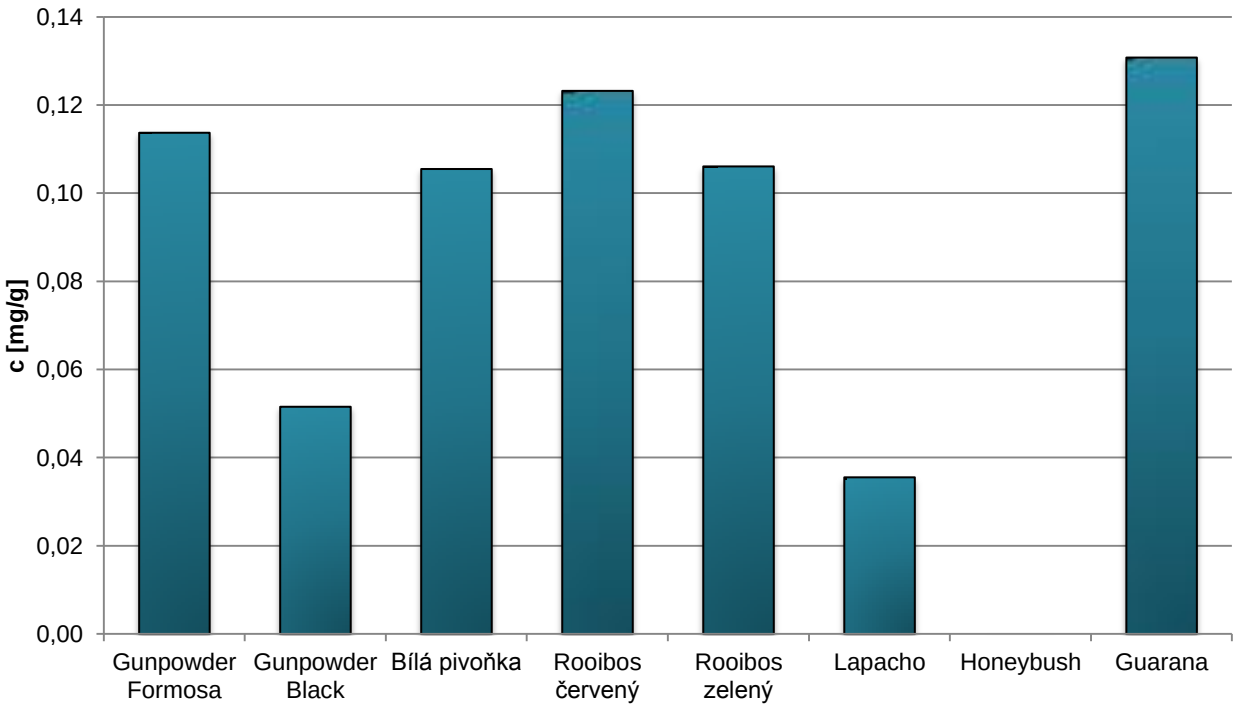
### 5.1.4. HPLC stanovení katechinu

Dále byl v čajích stanoven obsah katechinu. Příprava extraktů čajů pro měření katechinu je popsána v kapitole 4.5.4. Podrobný postup stanovení katechinu metodou HPLC je popsán v kapitole 4.6.4.

Tabulka 9: Obsah katechinu v extraktech čajů

| Čaje | Obsah [mg/g] |
|---|---|
| Gunpowder Formosa | 0,11 |
| Gunpowder Black | 0,05 |
| Bílá pivoňka | 0,11 |
| Rooibos červený | 0,12 |
| Rooibos zelený | 0,11 |
| Lapacho | 0,04 |
| Honeybush | 0,00 |
| Guarana | 0,13 |

Obsah katechinu je uveden v tabulce 9, vzorky byly měřeny 2x, v tabulkách je uvedena průměrná hodnota ze dvou měření. Jak je patrné i z grafu 6, obsah katechinu v jednotlivých čajích se příliš neliší. Nejvíce katechinu je obsaženo v extraktu z guarany. V extraktu z honeybush čaje nebyl detekován žádný katechin, minimální obsah pak byl u čaje lapacho a černého čaje.




*Graf 6: Obsah katechinu v čajích*

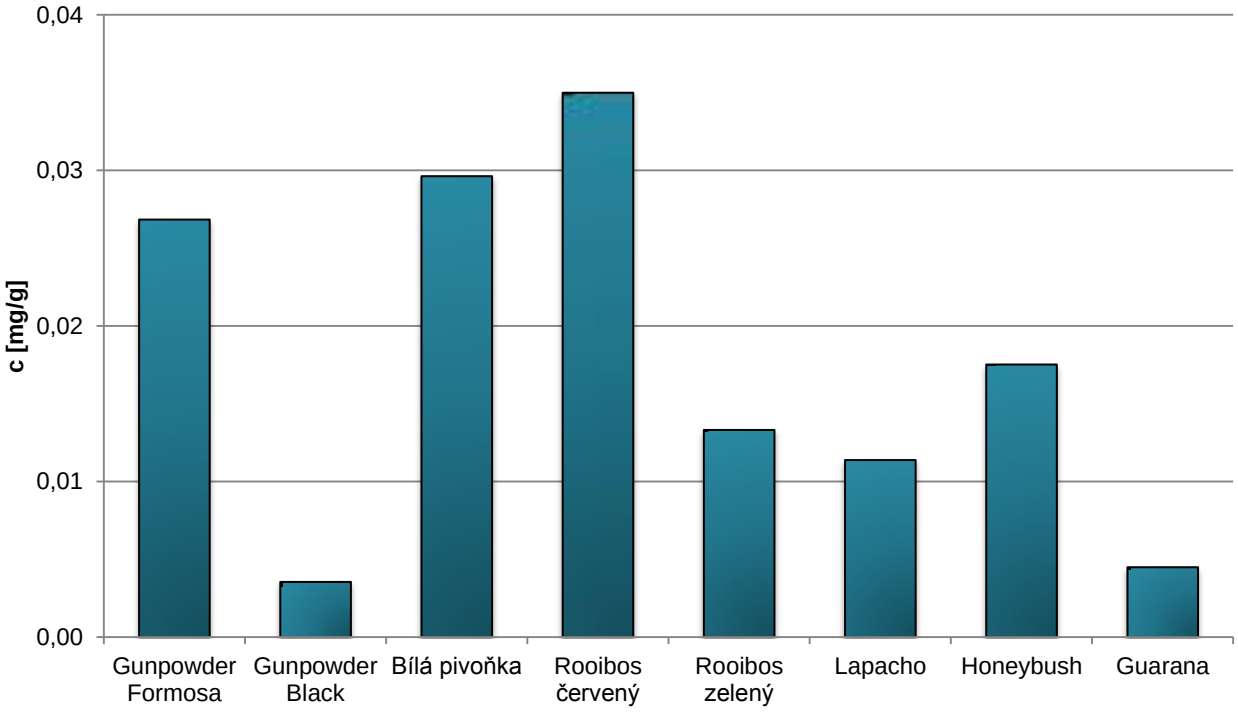
### 5.1.5. HPLC stanovení individuálních flavonoidů

Metoda HPLC byla využita také ke stanovení obsahu dvou flavonoidů – morinu a rutinu. Flavonoidy byly stanoveny ve vodných roztocích čajů, připravených dle postupu v kapitole 4.5.1. Postup stanovení je popsán v kapitole 4.6.6.

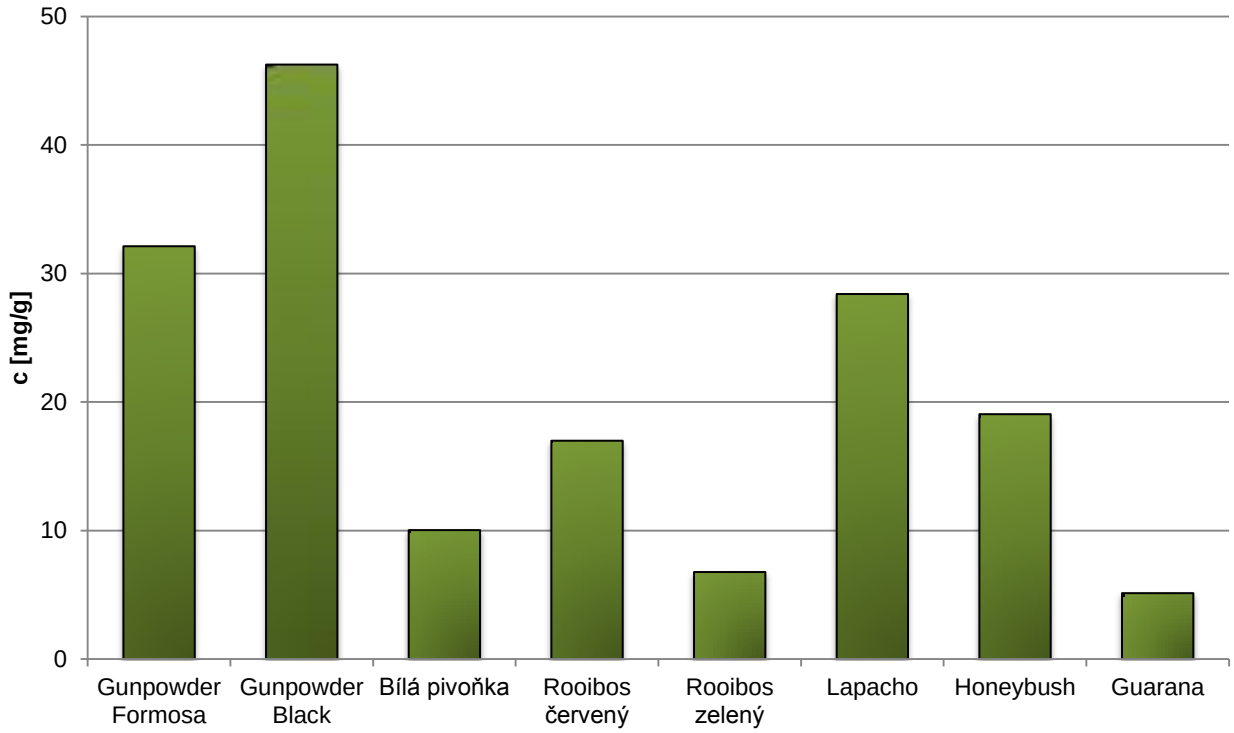
Tabulka 10: Obsah morinu a rutinu v čajích

| Čaje | Obsah [mg/g] | |
|---|---|---|
| | Morin | Rutin |
| Gunpowder Formosa | 0,027 | 32,11 |
| Gunpowder Black | 0,004 | 46,24 |
| Bílá pivoňka | 0,030 | 10,03 |
| Rooibos červený | 0,035 | 16,98 |
| Rooibos zelený | 0,013 | 6,77 |
| Lapacho | 0,011 | 28,39 |
| Honeybush | 0,018 | 19,05 |
| Guarana | 0,004 | 5,12 |

Obsah dvou vybraných flavonoidů ve vodných extraktech čajů je shrnut v tabulce 10. Vzorky byly měřeny 2x, v tabulkách je uvedena průměrná hodnota ze dvou měření. Řádově se obsah morinu a rutinu značně liší. Pro přehlednost a lepší viditelnost rozdílů mezi jednotlivými čaji jsou hodnoty koncentrace vyneseny pro morin v grafu 7 a pro rutin v grafu 8. Nejvíce morinu bylo obsaženo v červeném rooibosu, nejméně pak v černém čaji a guaraně. Největší obsah rutinu měl černý čaj a nejméně ho bylo detekováno v guaraně.




*Graf 7: Obsah morinu v čajích*




*Graf 8: Obsah rutinu v čajích*

### 5.1.6. Stanovení antioxidační aktivity

V rámci charakterizace bylo posledním bodem stanovení antioxidační aktivity. Antioxidační aktivita byla stanovena ve třech typech extraktů čajů a ve vodných extraktech bylin. Příprava extraktů je uvedena v kapitole 4.5. Antioxidační aktivita byla stanovena metodou využívající ABTS, jejíž postup je uveden v kapitole 4.6.7.

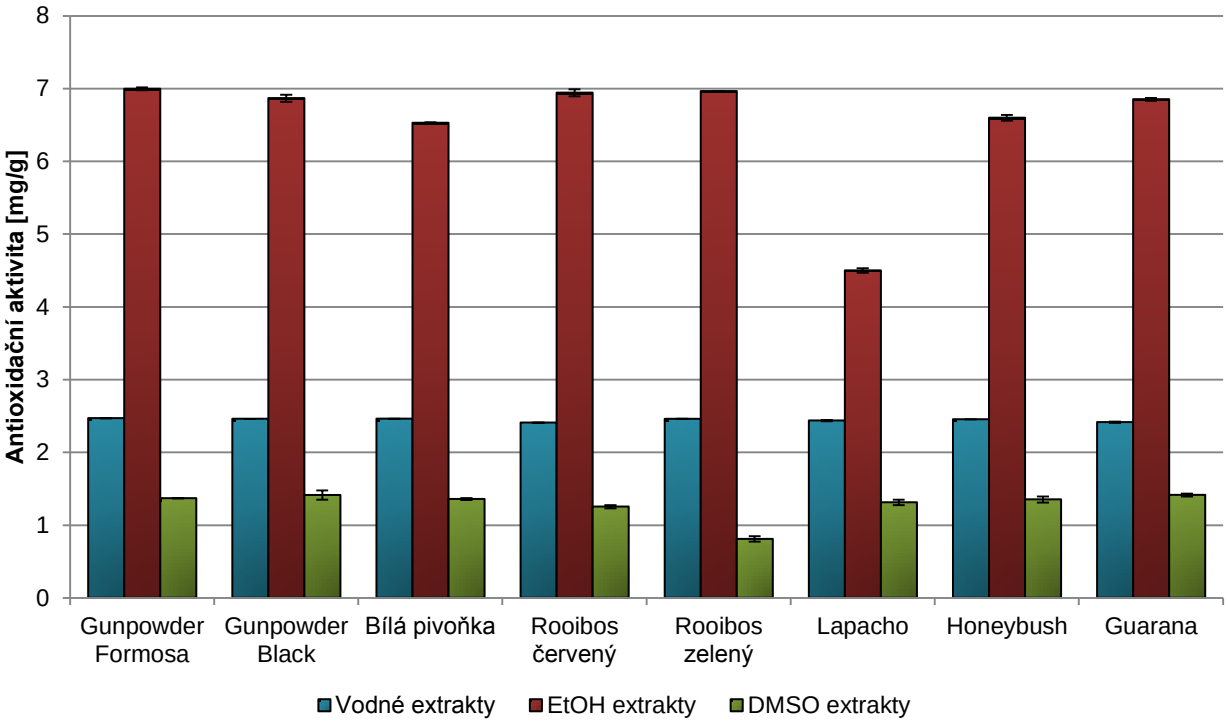
Tabulka 11: Antioxidační aktivita extraktů čajů

| Čaje | Antioxidační aktivita [mg/g] | | |
|---|---|---|---|
| | Vodné extrakty | EtOH extrakty | DMSO extrakty |
| Gunpowder Formosa | 2,47 ± 0,00 | 7,00 ± 0,02 | 1,37 ± 0,00 |
| Gunpowder Black | 2,46 ± 0,00 | 6,87 ± 0,05 | 1,41 ± 0,06 |
| Bílá pivoňka | 2,46 ± 0,00 | 6,53 ± 0,01 | 1,36 ± 0,01 |
| Rooibos červený | 2,41 ± 0,00 | 6,94 ± 0,05 | 1,25 ± 0,02 |
| Rooibos zelený | 2,46 ± 0,00 | 6,96 ± 0,00 | 0,81 ± 0,04 |
| Lapacho | 2,44 ± 0,01 | 4,50 ± 0,03 | 1,31 ± 0,04 |
| Honeybush | 2,45 ± 0,00 | 6,60 ± 0,04 | 1,35 ± 0,04 |
| Guarana | 2,41 ± 0,01 | 6,85 ± 0,02 | 1,41 ± 0,02 |

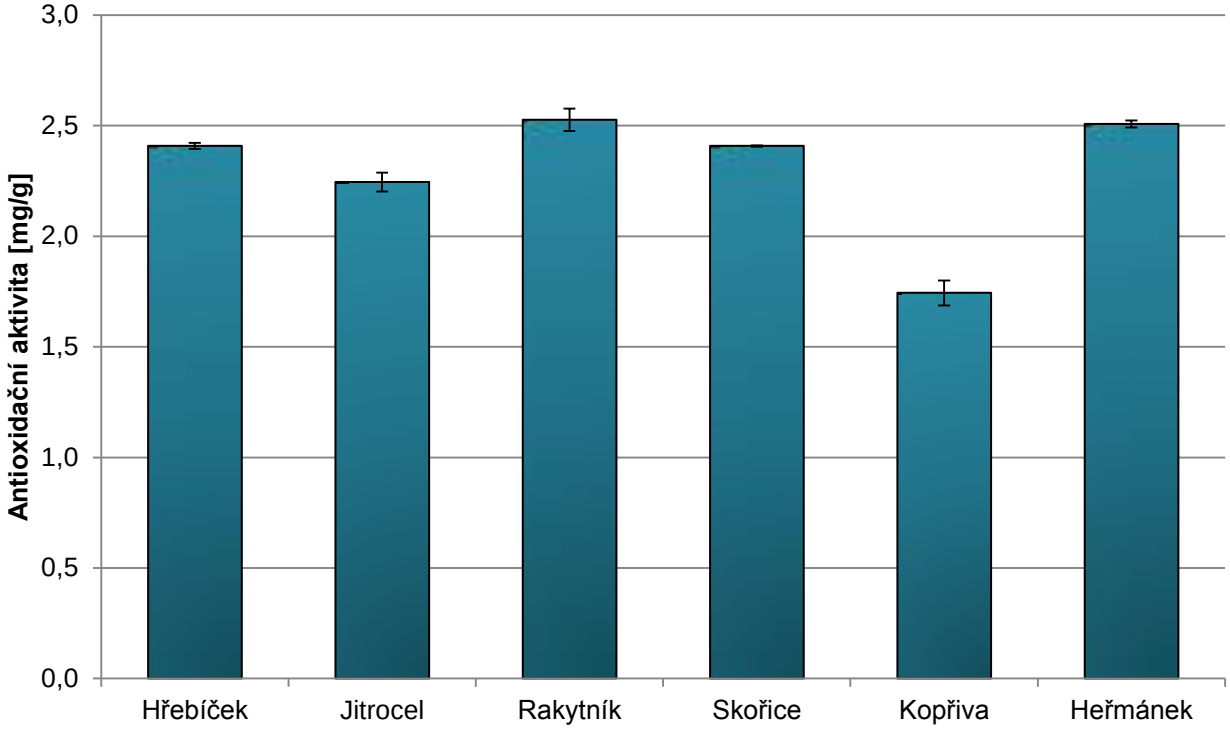
Tabulka 12: Antioxidační aktivita bylin

| Byliny | Antioxidační aktivita [mg/g] |
|---|---|
| Hřebíček | 2,41 ± 0,01 |
| Jitrocel | 2,24 ± 0,04 |
| Rakytník | 2,53 ± 0,05 |
| Skořice | 2,41 ± 0,00 |
| Kopřiva | 1,74 ± 0,06 |
| Heřmánek | 2,51 ± 0,02 |

Antioxidační aktivita extraktů čajů je uvedena v tabulce 11, antioxidační aktivita vybraných bylinek v tabulce 12. Z vodných extraktů čajů měl největší antioxidační aktivitu zelený čaj, nejmenší pak červený rooibos, přičemž hodnoty u jednotlivých čajů se zásadně neliší. V případě extrakce čajů do etanolu měl poté největší antioxidační aktivitu také extrakt ze zeleného čaje a nejmenší hodnota byla naměřena u extraktu z čaje lapacho. U DMSO extraktů byla antioxidační aktivita v porovnání s vodnými a etanolovými extrakty nejnižší, což je patrné i v grafu 9. V rámci DMSO extraktů měla nejvyšší hodnotu antioxidační aktivity guarana, nejnižší hodnota byla změřena u zeleného rooibosu. V rámci bylin měl největší antioxidační aktivitu heřmánek a nejmenší kopřiva. V grafu 10 jsou opět dobře vidět rozdíly v antioxidační aktivitě mezi jednotlivými bylinkami. Vzhledem k tomu, že čaje ani bylinky s nejvyšší antioxidační aktivitou neodpovídají těm, které obsahovaly nejvíce polyfenolů a flavonoidů, lze usuzovat, že byly ve vzorcích obsaženy i jiné látky, které mohou působit antioxidačně.




*Graf 9: Antioxidační aktivita extraktů čajů*




*Graf 10: Antioxidační aktivita bylin*

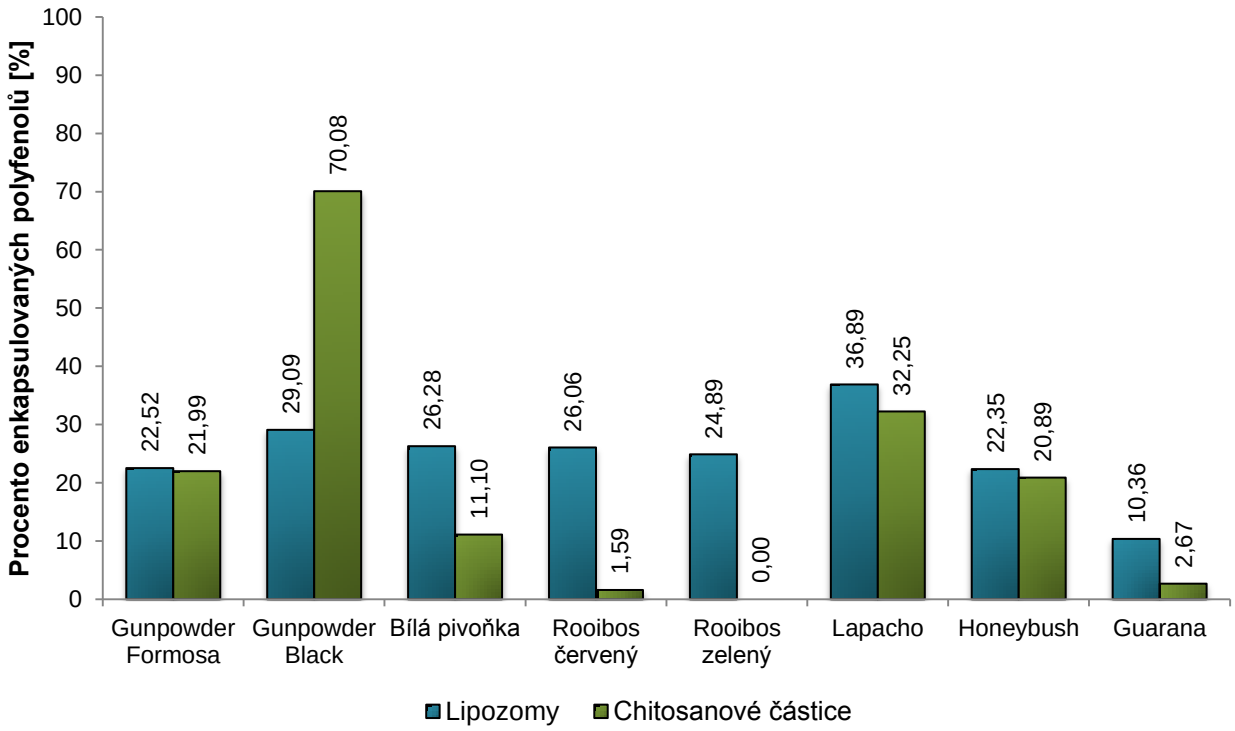
## 5.2. Charakterizace částic

Jak do lipozomů tak do chitosanových částic byly enkapsulovány vodné roztoky čajů. Ty byly připraveny zalitím 1,2 g čaje 16 ml horké vody a ponechány 10 min louhovat. Z 10 ml extraktu pak byl připraven roztok částic dle postupů v kapitolách 4.7.1 a 4.7.2. K oběma typům částic byly pro srovnání připraveny i částice bez enkapsulovaného čaje, kdy extrakt byl nahrazen vodou. U všech částic byla zjištěna efektivita enkapsulace, jejich stabilita v podobě zeta-potenciálu a velikost. Také byla stanovena jejich antioxidační aktivita. Výsledky charakterizace částic jsou uvedeny v této kapitole.

### 5.2.1. Enkapsulační účinnost částic

U všech připravených částic byla zjištěna efektivita enkapsulace. Bylo postupováno podle metody popsané v kapitole 4.7.3. Výsledky stanovení jsou uvedeny v grafu 11.

V případě lipozomů se enkapsulační účinnosti polyfenolů u jednotlivých čajů zásadně nelišily a dosahovaly hodnot do 37 %. U chitosanových částic byly rozdíly mezi množstvím enkapsulovaných polyfenolů markantnější, nevyšší množství bylo 70 % a ostatní hodnoty nepřesáhly 33 %. Z grafu 11 je také dobře patrné, že u lipozomů byla ve většině případů enkapsulační účinnost vyšší než u chitosanových částic. Do lipozomů se enkapsulovalo nejvíce polyfenolů z extraktu z čaje lapacho, nejméně pak z extraktu guarany. Do chitosanových částic bylo enkapsulováno nejvíce polyfenolů u extraktu z černého čaje, v případě zeleného rooibosu byla enkapsulační účinnost nulová. Vzorky byly měřeny 2x, v tabulkách je uvedena průměrná hodnota ze dvou měření. Vyšší enkapsulační účinnosti by se dalo zřejmě dosáhnout snížením koncentrace čajů, které mohou obsahovat látky destabilizující částice.




*Graf 11: Enkapsulační účinnost částic*

### 5.2.2. Velikost a stabilita částic

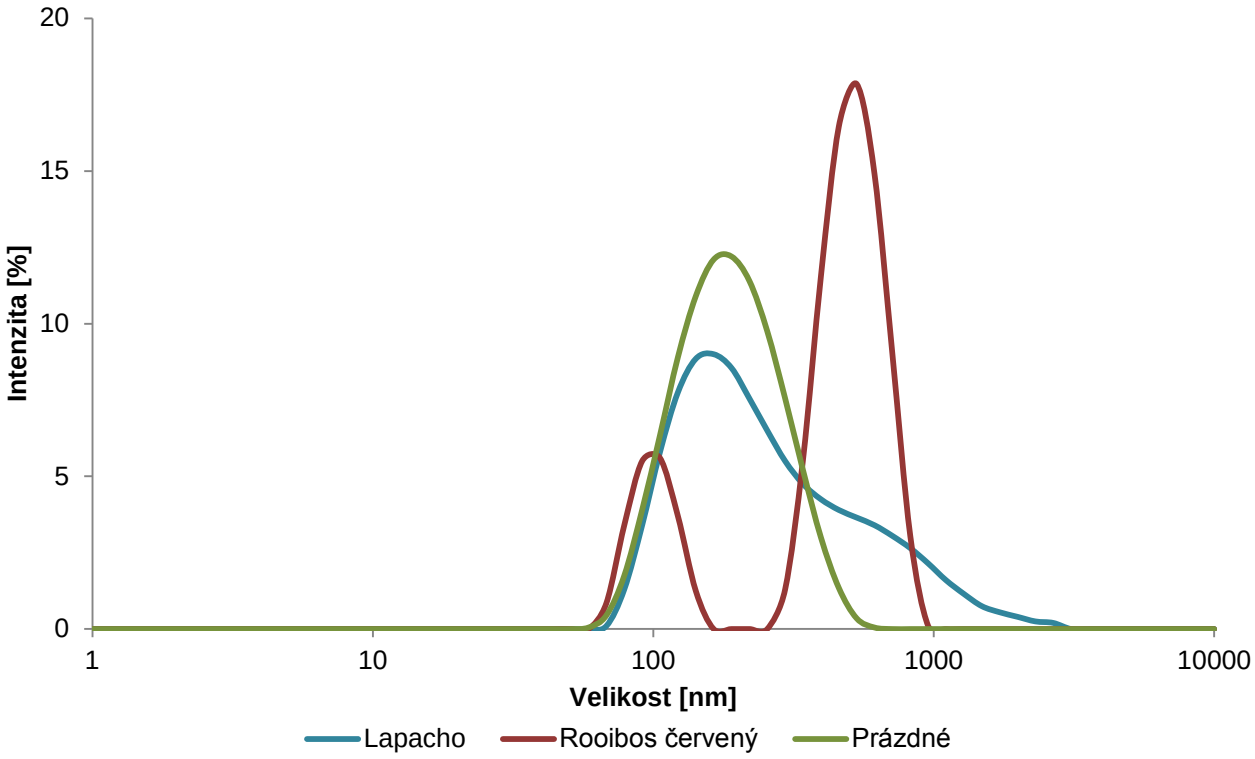
Klíčové parametry pro stanovení fyzikální stability částic jsou velikost částic a distribuce velikostí částic. Pro stanovení velikosti částic byla v této práci využita metoda DLS, která je v tomto směru nejběžnější používanou technikou.

K měření byl v práci použit koloidní analyzátor ZetaSizer Nano ZS, který po proměření roztoků částic vyhodnotil průměrné velikosti částic a jejich velikostní distribuce. Za použití nástavce s elektrodou byl změřen rovněž zeta potenciál. Z hodnot zeta potenciálu jednotlivých částic byla odhadnuta jejich stabilita, pro kterou platí obecné pravidlo, kdy absolutní hodnota ZP nad 60 mV odpovídá vynikající stabilitě částic, 30 mV značí, že částice mají dobrou stabilitu, při 20 mV jsou částice ještě relativně stabilní a hodnoty menší než 5 mV značí, že částice budou rychle agregovat a budou nestabilní.

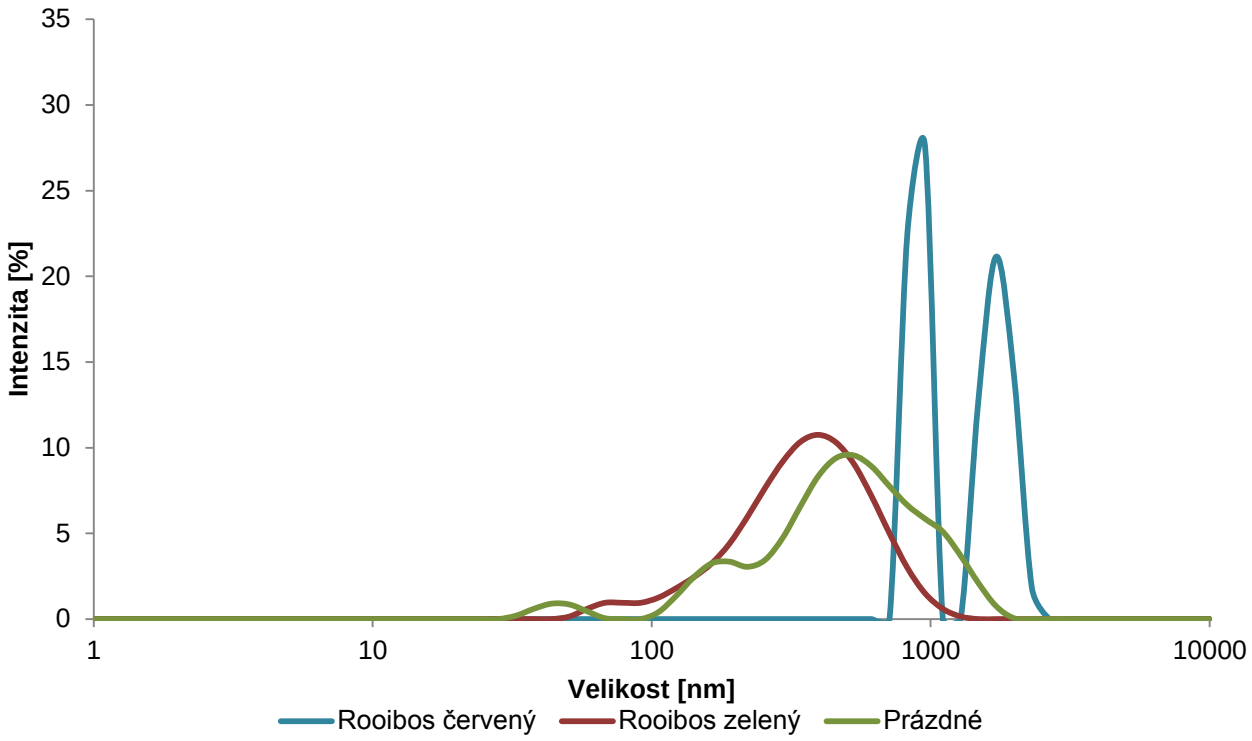
Tabulka 13: Velikost a stabilita částic

| | Lipozomy | | Chitosanové částice | |
|---|---|---|---|---|
| | ∅ velikost [nm] | ∅ zeta potenciál [mV] | ∅ velikost [nm] | ∅ zeta potenciál [mV] |
| Gunpowder Formosa | 328,2 | -38,5 | 2953,5 | 22,9 |
| Gunpowder Black | 262,3 | -35,5 | 2344,0 | 20,3 |
| Bílá pivoňka | 249,2 | -47,0 | 2715,0 | 22,6 |
| Rooibos červený | 423,7 | -38,5 | 3424,0 | 19,2 |
| Rooibos zelený | 319,2 | -36,7 | 333,3 | 39,4 |
| Lapacho | 222,0 | -37,4 | 2461,5 | 26,2 |
| Honeybush | 294,1 | -37,5 | 1989,0 | 29,4 |
| Guarana | 337,2 | -36,1 | 3358,0 | 7,5 |
| Prázdné | 187,0 | -43,5 | 455,8 | 30,3 |

V tabulce 13 jsou shrnuty výsledky z měření metodou DLS, tedy průměrné velikosti částic a jejich zeta-potenciál. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze dvou měření. V případě lipozomů se průměrná velikost částic pohybovala v rozmezí zhruba 200 – 400 nm. Největší byly lipozomy vytvořené z extraktu červeného rooibosu a nejmenší naopak lipozomy z extraktu lapacha.
Průměrná velikost chitosanových částic se pohybovala s výjimkou částic z extraktu zeleného rooibosu v rozmezí cca 2000 – 3 500 nm. Největší velikost měly také částice s červeným rooibosem tak jako u lipozomů, nejmenší byly ty, které obsahovaly extrakt ze zeleného rooibosu. Velikosti lipozomů byly tedy o řád menší než velikosti chitosanových částic.
Podle hodnot zeta-potenciálu lze konstatovat, že všechny lipozomy byly stabilní a průměrná hodnota zeta-potenciálu byla -39 mV. U chitosanových částic je stabilita nižší, tudíž je pravděpodobné, že u nich bude docházet k častější agregaci. Vzhledem k průměrné hodnotě zeta-potenciálu 24,2 mV budou ale chitosanové částice ještě relativně stabilní.




*Graf 12: Ukázka distribuce velikostí vybraných lipozomů*




*Graf 13: Ukázka distribuce velikostí vybraných chitosanových částic*

### 5.2.3. Antioxidační aktivita částic

U čerstvě připravených částic byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.7 také antioxidační aktivita. Antioxidační aktivita byla stanovena pro roztok částic, dále byla část částic centrifugována 2 min při 14 000 otáčkách a v supernatantu pak byla stanovena antioxidační aktivita. Stočené částice byly také rozsuspendovány v odpovídajícím množství vody a v tomto roztoku byla také stanovena antioxidační aktivita. Výsledky z této části měření jsou shrnuty v tabulce 14.

Tabulka 14: Antioxidační aktivita částic

| | Antioxidační aktivita [mg/g] | | |
|---|---|---|---|
| LIPOZOMY | Roztok částic | Supernatant | Částice v $H_2O$ |
| Gunpowder Formosa | 9,85 ± 0,02 | 5,48 ± 0,01 | 10,11 ± 0,00 |
| Gunpowder Black | 9,83 ± 0,08 | 5,48 ± 0,05 | 8,34 ± 0,21 |
| Bílá pivoňka | 9,95 ± 0,01 | 5,48 ± 0,02 | 10,11 ± 0,01 |
| Rooibos červený | 9,79 ± 0,09 | 5,46 ± 0,00 | 6,60 ± 0,07 |
| Rooibos zelený | 9,71 ± 0,13 | 5,44 ± 0,02 | 10,05 ± 0,04 |
| Lapacho | 8,30 ± 0,19 | 3,87 ± 0,34 | 5,36 ± 0,19 |
| Honeybush | 9,83 ± 0,07 | 5,25 ± 0,15 | 5,50 ± 0,10 |
| Guarana | 9,44 ± 0,03 | 5,18 ± 0,09 | 9,98 ± 0,00 |
| CHITOSANOVÉ | Roztok částic | Supernatant | Částice v $H_2O$ |
| Gunpowder Formosa | 11,82 ± 0,02 | 12,87 ± 0,01 | 12,20 ± 0,00 |
| Gunpowder Black | 11,69 ± 0,04 | 12,88 ± 0,02 | 9,78 ± 0,20 |
| Bílá pivoňka | 11,80 ± 0,04 | 12,83 ± 0,01 | 12,25 ± 0,01 |
| Rooibos červený | 11,70 ± 0,01 | 12,81 ± 0,01 | 9,84 ± 0,41 |
| Rooibos zelený | 11,83 ± 0,01 | 12,82 ± 0,02 | 11,90 ± 0,09 |
| Lapacho | 9,34 ± 0,20 | 9,50 ± 0,02 | 7,04 ± 0,10 |
| Honeybush | 11,24 ± 0,03 | 11,50 ± 0,08 | 7,62 ± 0,14 |
| Guarana | 11,22 ± 0,01 | 12,43 ± 0,06 | 11,77 ± 0,05 |

Antioxidační aktivita jak částic v roztoku, tak supernatantu i rozsuspendovaných částic se oproti vodným extraktů čajů značně zvýšila. Antioxidační aktivita lipozomů v roztoku se zvýšila oproti vodným extraktům čajů v průměru 4x, u supernatantu to bylo 2x a u lipozomů rozsuspendovaných ve vodě se antioxidační aktivita zvýšila 3x. V případě chitosanových částic se antioxidační aktivita v porovnání s vodnými extrakty čajů zvýšila v průměru 5x, u supernatantu to bylo také 5x a u částic rozsuspendovaných ve vodě bylo navýšení 4-násobné.
Nejvyšší antioxidační aktivitu měly u lipozomů ve všech třech případech (částice v roztoku, supernatant, rozsuspendované částice) částice s extraktem z bílé pivoňky, stejnou hodnotu u supernatantu měly částice s extraktem z černého čaje. Nejmenší antioxidační aktivitu měly opět ve všech případech lipozomy s extraktem z lapacha.
U chitosanových částic se částice s nejvyšší antioxidační aktivitou lišily. U roztoku částic to byly částice s extraktem ze zeleného rooibosu. V případě supernatantu částice s extraktem z černého čaje a u částic ve vodě pak měly největší antioxidační aktivitu částice s extraktem z bílého čaje. Nejmenší antioxidační aktivitu měly pro všechny tři typy vzorků stejně jako u lipozomů částice s extraktem z lapacha.

## 5.3. Dlouhodobá stabilita částic

U připravených částic byla sledována dlouhodobá stabilita ve vodném prostředí. Stabilita byla sledována u roztoku připravených částic bez úprav a rovněž u částic, které byly 5x zředěny destilovanou vodou. Ve stanovených intervalech bylo sledováno množství uvolněných polyfenolů. Podrobný postup sledování dlouhodobé stability je popsán v kapitole 4.8.

### 5.3.1. Lipozomy

Množství uvolněných polyfenolů v různých časových intervalech v porovnání s čerstvými lipozomy je uvedeno v tabulce 15.

Tabulka 15: Dlouhodobá stabilita - procento uvolněných polyfenolů z lipozomů

| NEZŘEDĚNÉ | Týden | Měsíc | 2 měsíce |
|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | 117,6 % | -108,9 % | 102,5 % |
| Gunpowder Black | -14,7 % | 107,7 % | 61,2 % |
| Bílá pivoňka | 104,8 % | 88,0 % | 84,2 % |
| Rooibos červený | 67,4 % | 62,3 % | 32,1 % |
| Rooibos zelený | 100,8 % | 55,8 % | 109,0 % |
| Lapacho | 117,9 % | 106,2 % | 105,8 % |
| Honeybush | 111,1 % | 69,6 % | 91,5 % |
| Guarana | 120,6 % | -55,0 % | -108,2 % |
| ZŘEDĚNÉ | Týden | Měsíc | 2 měsíce |
| Gunpowder Formosa | 115,1 % | 20,7 % | -13,8 % |
| Gunpowder Black | 108,6 % | -11,3 % | 3,3 % |
| Bílá pivoňka | 103,7 % | -28,8 % | -30,4 % |
| Rooibos červený | 105,8 % | 11,2 % | 0,6 % |
| Rooibos zelený | 107,0 % | 26,6 % | 15,4 % |
| Lapacho | 47,8 % | 19,9 % | 17,1 % |
| Honeybush | 18,9 % | -10,1 % | -7,0 % |
| Guarana | 120,3 % | -12,4 % | 10,1 % |

V případě lipozomů v původním roztoku se u většiny částic po týdnu uvolnilo veškeré množství polyfenolů, které se do nich enkapsulovalo. U lipozomů s extraktem z černého čaje se naopak jako u jediných neuvolnilo po týdnu žádné množství polyfenolů. Záporná hodnota zde značí degradaci volných polyfenolů v supernatantu. Jedinými částicemi kde se po týdnu polyfenoly uvolnily jen částečně, jsou částice s extraktem z červeného rooibosu.
Po měsíci je patrné u všech lipozomů až na částice s extraktem z černého čaje pokles množství uvolněných polyfenolů, což značí jejich degradaci. U lipozomů s černým čajem došlo po měsíci k uvolnění veškerých polyfenolů.
Po dvou měsících je z tabulky opět patrná další degradace uvolněných polyfenolů.
U zředěného roztoku lipozomů bylo opět téměř u všech lipozomů uvolněno již po týdnu veškeré množství polyfenolů. U lipozomů s extrakty z lapacha a honeybushe došlo k uvolnění pouze malého množství polyfenolů. Po měsíci i dvou je z tabulky opět patrná degradace uvolněných polyfenolů.

### 5.3.2. Chitosanové částice

Množství uvolněných polyfenolů v různých časových intervalech v porovnání s čerstvými chitosanovými částicemi je uvedeno v tabulce 16.

Tabulka 16: Dlouhodobá stabilita - procento uvolněných polyfenolů z chitosanových částic

| NEZŘEDĚNÉ | Týden | Měsíc | 2 měsíce |
|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | -83,9% | -77,8% | 41,8% |
| Gunpowder Black | 22,5% | 17,6% | 20,2% |
| Bílá pivoňka | 108,0% | 115,3% | 118,7% |
| Rooibos červený | 0,0% | 0,0% | 0,0% |
| Rooibos zelený | 4,7% | 10,0% | 50,1% |
| Lapacho | -81,1% | -115,8% | -107,0% |
| Honeybush | -103,9% | -99,5% | -92,4% |
| Guarana | -107,7% | -108,5% | 107,6% |
| ZŘEDĚNÉ | Týden | Měsíc | 2 měsíce |
| Gunpowder Formosa | 23,2% | 39,3% | 40,8% |
| Gunpowder Black | 0,4% | 0,7% | 13,4% |
| Bílá pivoňka | 115,3% | 116,0% | 117,7% |
| Rooibos červený | 0,0% | 0,0% | 0,0% |
| Rooibos zelený | 21,1% | 26,1% | 27,8% |
| Lapacho | -40,4% | -25,7% | -23,6% |
| Honeybush | -30,6% | -36,9% | -33,8% |
| Guarana | 109,3% | 102,3% | 113,5% |

U chitosanových částic v původním roztoku došlo po týdnu k uvolnění veškerých enkapsulovaných polyfenolů jen u částic s extraktem z bílého čaje. Degradace volných polyfenolů v roztoku a žádné uvolnění enkapsulovaných polyfenolů proběhlo u částic se zeleným čajem, lapachem, honeybushem a guaranou. V případě částic s extraktem z červeného rooibosu nedošlo k uvolnění ani degradaci polyfenolů po celou dobu sledování stability.
Po měsíci i dvou se zvýšilo procento uvolněných polyfenolů pouze u částic se zeleným rooibosem. U částic s extraktem z bílého čaje je možné, že uvolněné polyfenoly zůstaly po měsíci i dvou v roztoku nezměněny, rozdíly v procentech mohou být způsobeny odchylkami při měření. U ostatních částic byla detekována opět pouze degradace volných polyfenolů.

Po dvouměsíčním sledování stability chitosanových částic bylo zjištěno, že došlo k uvolnění veškerých polyfenolů z částic s guaranou a části polyfenolů z částic se zeleným čajem.
Sledováním stability zředěného roztoku částic bylo po týdnu zjištěno uvolnění části enkapsulovaných polyfenolů u částic se zeleným čajem a zeleným rooibosem. Z částic, které obsahovaly černý čaj, se uvolnilo pouze nepatrné množství polyfenolů, které se jen o malé procento postupně zvyšovalo. U částic s červeným rooibosem nedošlo tak jako u původního roztoku ani k degradaci volných ani k uvolnění enkapsulovaných polyfenolů, a to po celou dobu sledování stability. Po měsíci a dvou se navýšilo procento uvolněných polyfenolů u částic se zeleným čajem a nepatrně se zvyšovalo i procento u částic s extraktem ze zeleného rooibosu. U ostatních částic je většinou patrná degradace neenkapsulovaných i uvolněných polyfenolů. Pouze u částic s extrakty z bílého čaje a guarany se již po týdnu uvolnilo veškeré množství enkapsulovaných polyfenolů, které zůstalo nadále téměř nezměněno.

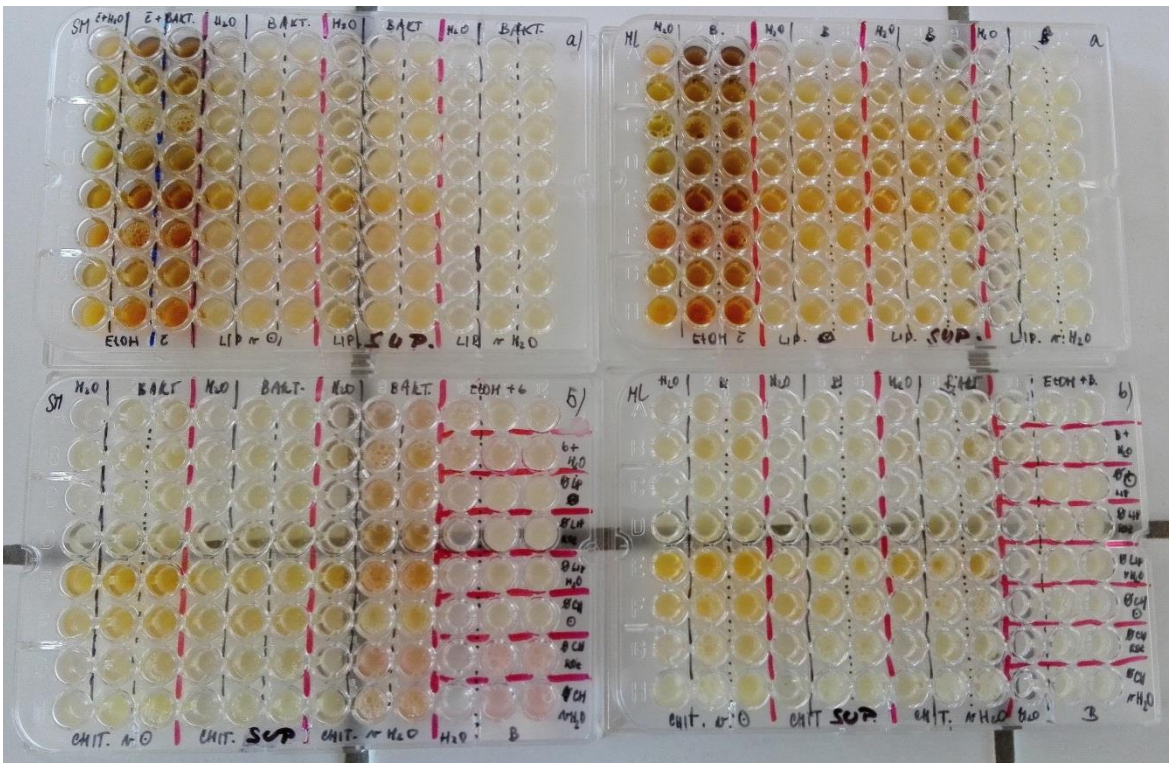
## 5.4. Testy antimikrobiální aktivity

Značnou část experimentální části této práce tvořilo testování antimikrobiální aktivity. Byly využity dva typy testů – diluční bujónová metoda s použitím mikrotitračních destiček, u které byl sledován zákal, který byl měřen pomocí ELISA readeru a zkumavkový test, u kterého byl sledován růst buněk v médiu s přídavkem antimikrobiální látky ve zkumavce a poté byla stanovována viabilita s použitím průtokové cytometrie.
Antimikrobiální účinek byl sledován vůči třem druhům bakterií. Pro základní testování byl využit G+ kmen – *Micrococcus luteus* a G- kmen – *Serratia marcescens*. Poté byl u vybraných preparátů sledován jejich účinek na dalším G- kmeni – *Escherichie coli*.

### 5.4.1. Bujónová diluční metoda

V případě této metody je hodnocen zákal či sediment, který vyjadřuje růst mikroorganismu po inkubaci v tekutém médiu. Je zde sledován antimikrobiální účinek preparátů na mikroorganismy ve stacionární fázi růstu. Podrobný postup těchto testů je popsán v kapitole 4.9.2. Na obrázku 20 je zobrazen příklad testu antimikrobiální aktivity na mikrotitračních destičkách.
Pomocí tohoto testu byla stanovena antimikrobiální aktivita extraktů čajů a bylin, aktivita směsí čistě rostlinných preparátů, směsí rostlinných a živočišných antimikrobiálních vzorků. Dále byla sledována antimikrobiální aktivita rostlinných preparátů s přídavkem antibiotika a antimikrobiální aktivita připravených částic.

Tabulka 17 shrnuje antimikrobiální účinek vodných extraktů čajů a bylin, a ethanolových a DMSO extraktů čajů. Příprava extraktů, které byly testovány je uvedena v kapitole 4.5.
Z vodných extraktů čajů měl střední antimikrobiální účinek bílý čaj, a to na kmen *Escherichia coli* (dále EC). Ostatní vodné extrakty měly buď nízký antimikrobiální účinek, nebo na bakterie nepůsobily inhibičně. U ethanolových extraktů čajů již byl antimikrobiální účinek vyšší.
Nejvýrazněji pak na kmen *Serratia marcescens* (dále SM) působily bílý čaj a guarana. Kmen SM byl proti antimikrobiálnímu působení ethanolových extraktů odolnější. Nejvýraznější antimikrobiální aktivitu vykazovaly DMSO extrakty čajů, přičemž velmi dobrými antimikrobiálními vlastnosti disponovaly černý čaj, honeybush a guarana, a to při použití kmene *Micrococcus luteus* (dále ML). Jediná guarana neměla u kmene SM žádný antimikrobiální efekt. Z vodných extraktů bylinek měly výraznou antimikrobiální aktivitu kopřiva a rakytník.



*Obrázek 20: Ukázka testu antimikrobiální aktivity na mikrotitračních destičkách*

Tabulka 17: Antimikrobiální účinek extraktů čajů a bylin

| VODNÉ EXTRAKTY | SM | ML | EC | DMSO EXTRAKTY | SM | ML | EC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | + | - | + | Gunpowder Formosa | ++ | ++ | N |
| Gunpowder Black | + | - | - | Gunpowder Black | ++ | +++ | N |
| Bílá pivoňka | - | - | ++ | Bílá pivoňka | + | + | N |
| Rooibos červený | - | - | - | Rooibos červený | ++ | ++ | N |
| Rooibos zelený | - | - | - | Rooibos zelený | ++ | ++ | N |
| Lapacho | - | - | + | Lapacho | ++ | ++ | N |
| Honeybush | + | - | + | Honeybush | ++ | +++ | N |
| Guarana | - | - | + | Guarana | - | +++ | N |
| EtOH EXTRAKTY | SM | ML | EC | BYLINKY | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | - | - | N | Hřebíček | + | - | - |
| Gunpowder Black | + | ++ | N | Jitrocel | - | - | + |
| Bílá pivoňka | +++ | - | N | Rakytník | ++ | - | - |
| Rooibos červený | + | - | N | Skořice | N | N | - |
| Rooibos zelený | ++ | + | N | Kopřiva | ++ | +++ | - |
| Lapacho | + | + | N | Heřmánek | N | N | - |
| Honeybush | ++ | ++ | N | | | | |
| Guarana | +++ | + | N | | | | |

*Koncentrace buněk ve srovnání s kontrolou (+++) 0-30%, (++) 30-60%, (+) 60 až 90%, (-) 90-100%, (N) - netestováno, (SM) - Serratia marcescens* , (ML) - *Micrococcus luteus (EC) - Escherichia coli*

Tabulka 18: Antimikrobiální účinek extraktů čajů s přídavkem lysozymu

| VODNÉ EXTRAKTY | SM | ML | EC |
|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | + | - | N |
| Gunpowder Black | + | +++ | N |
| Bílá pivoňka | - | + | N |
| Rooibos červený | + | - | N |
| Rooibos zelený | + | - | N |
| Lapacho | + | ++ | N |
| Honeybush | + | - | N |
| Guarana | - | - | N |
| **Bakterie + lysozym** | - | - | N |
| EtOH EXTRAKTY | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | - | - | N |
| Gunpowder Black | + | ++ | N |
| Bílá pivoňka | - | - | N |
| Rooibos červený | - | - | N |
| Rooibos zelený | - | - | N |
| Lapacho | - | - | N |
| Honeybush | - | - | N |
| Guarana | +++ | +++ | N |

*Koncentrace buněk ve srovnání s kontrolou (+++) 0-30%, (++) 30-60%, (+) 60 až 90%, (-) 90-100%, (N) – netestováno, (SM) - Serratia marcescens* , (ML) - *Micrococcus luteus (EC) - Escherichia coli*

V tabulce 18 je shrnuto antimikrobiální působení vodných a ethanolových extraktů čajů s přídavkem lysozymu v poměru čaj:lysozym 1:1. Základní roztok lysozymu, který byl přidáván k extraktům čajů, měl koncentraci 1 mg/ml. V tabulce je také uveden samostatný antimikrobiální účinek tohoto roztoku. Preparáty s přídavkem lysozymu byly testovány na kmenech SM a ML. U vodných extraktů došlo oproti etanolovým k častějšímu zvýšení antimikrobiálního účinku v porovnání s účinkem samotného lysozymu. Slabé zvýšení bylo pozorováno u kmene SM, nejvýrazněji pak antimikrobiální účinek zvýšil černý čaj u kmene ML. V případě ethanolových extraktů došlo k výraznému navýšení antimikrobiální aktivity ve srovnání se samotným lysozymem u guarany pro oba kmeny.
Vzhledem k tomu, že lysozym má antimikrobiální účinek především proti G+ bakteriím, přidáním další antimikrobiální látky, působící proti G- bakterií, by mohl vzniknout komplexnější preparát s širším spektrem účinku.

Pro srovnání byly provedeny i experimenty testující účinek přírodních antimikrobiálních látek a vybraných druhů antibiotik.

Tabulka č. 19 shrnuje antimikrobiální účinek vodných extraktů čajů s přídavkem antibiotika v poměru 1:1. Vzhledem k vzrůstající rezistenci mnoha kmenů bakterií k antibiotikům by přídavek další antimikrobiální látky v podobě extraktu čaje mohl tomuto jevu zabránit, popřípadě zvýšit účinnost antibiotika nebo rozšířit jeho spektrum. V tabulce 19 jsou uvedeny také samostatné antimikrobiální účinky antibiotik na bakterie. Samotná antibiotika měla vysoký antimikrobiální účinek, který u velké části preparátů s čaji zůstal zachován i přes to, že ve směsi byla poloviční koncentrace antibiotika. Červeně jsou v tabulce 19 zvýrazněny směsné preparáty s vysokým antimikrobiálním účinkem.

Tabulka 19: Antimikrobiální účinek vodných extraktů čajů s přídavkem antibiotika

| AMPICILIN | SM | ML | EC |
|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | ++ | +++ | N |
| Gunpowder Black | +++ | +++ | N |
| Bílá pivoňka | ++ | ++ | N |
| Rooibos červený | ++ | - | N |
| Rooibos zelený | ++ | ++ | N |
| Lapacho | +++ | ++ | N |
| Honeybush | +++ | +++ | N |
| Guarana | +++ | +++ | N |
| **Bakterie + ampicilin** | +++ | +++ | N |
| STREPTOMYCIN | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | +++ | +++ | N |
| Gunpowder Black | +++ | ++ | N |
| Bílá pivoňka | +++ | + | N |
| Rooibos červený | ++ | ++ | N |
| Rooibos zelený | +++ | ++ | N |
| Lapacho | ++ | + | N |
| Honeybush | +++ | ++ | N |
| Guarana | +++ | ++ | N |
| **Bakterie + streptomycin** | +++ | ++ | N |

*Koncentrace buněk ve srovnání s kontrolou (+++) 0-30%, (++) 30-60%, (+) 60 až 90%, (-) 90-100%, (N) – netestováno, (SM) - Serratia marcescens* , (ML) - *Micrococcus luteus (EC) - Escherichia coli*

Dalšími směsnými preparáty, které byly podrobeny testům antimikrobiální aktivity, jsou směsi obsahující vodný extrakt čaje a bylinky. Výsledky těchto antimikrobiálních testů jsou uvedeny v tabulce 20. Obsah extraktu čaje a bylinky ve směsi byl 1:1.

Tabulka 20: Antimikrobiální účinek čajů s přídavkem bylinek

| HŘEBÍČEK | SM | ML | EC | SKOŘICE | SM | ML | EC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | + | - | N | Gunpowder Formosa | - | - | N |
| Gunpowder Black | + | + | + | Gunpowder Black | - | - | N |
| Bílá pivoňka | + | - | - | Bílá pivoňka | - | - | N |
| Rooibos červený | + | + | N | Rooibos červený | - | - | N |
| Rooibos zelený | - | - | N | Rooibos zelený | - | - | N |
| Lapacho | + | + | ++ | Lapacho | - | - | N |
| Honeybush | - | ++ | N | Honeybush | - | - | N |
| Guarana | + | + | - | Guarana | - | - | N |
| JITROCEL | SM | ML | EC | KOPŘIVA | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | + | + | N | Gunpowder Formosa | - | - | N |
| Gunpowder Black | - | - | N | Gunpowder Black | + | - | N |
| Bílá pivoňka | - | - | N | Bílá pivoňka | - | - | N |
| Rooibos červený | - | - | N | Rooibos červený | - | - | N |
| Rooibos zelený | - | - | N | Rooibos zelený | - | - | N |
| Lapacho | - | - | N | Lapacho | - | | N |
| Honeybush | - | - | N | Honeybush | - | - | N |
| Guarana | - | - | N | Guarana | - | - | N |

| RAKYTNÍK | SM | ML | EC | HEŘMÁNEK | SM | ML | EC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | - | ++ | N | Gunpowder Formosa | - | ++ | - |
| Gunpowder Black | - | - | N | Gunpowder Black | - | + | N |
| Bílá pivoňka | - | + | N | Bílá pivoňka | - | - | N |
| Rooibos červený | - | + | N | Rooibos červený | - | ++ | N |
| Rooibos zelený | - | + | N | Rooibos zelený | - | - | N |
| Lapacho | - | + | N | Lapacho | - | - | N |
| Honeybush | - | - | N | Honeybush | - | - | N |
| Guarana | - | - | N | Guarana | - | - | N |

*Koncentrace buněk ve srovnání s kontrolou (+++) 0-30%, (++) 30-60%, (+) 60 až 90%, (-) 90-100%, (N) – netestováno, (SM) - Serratia marcescens* , (ML) - *Micrococcus luteus (EC) - Escherichia coli*

Jak je patrné z tabulky 20, ve většině případů bylinky radikálně nezvýšily antimikrobiální účinek čaje. Všechny preparáty byly testovány na kmenech SM a ML a vybrané preparáty zejména s hřebíčkem pak ještě na kmeni EC. Synergicky působily některé preparáty v případě testování na kmeni ML. Většina preparátů však nepůsobila inhibičně na žádný z kmenů. Je tedy možné, že látky obsažené v jednotlivých extraktech na sebe působí antagonisticky a ruší tak svůj individuální antimikrobiální účinek.

Po otestování směsí čajů a bylin byl k těmto preparátům přidán navíc ještě roztok lysozymu, jehož základní koncentrace byla 1 mg/ml. Poměr jednotlivých složek preparátů byl 1:1:1. Tabulka 21 shrnuje antimikrobiální působení těchto preparátů.

Tabulka 21: Antimikrobiální účinek čajů s přídavkem lysozymu a bylinek

| HŘEBÍČEK | SM | ML | EC | SKOŘICE | SM | ML | EC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | + | ++ | ++ | Gunpowder Formosa | - | ++ | N |
| Gunpowder Black | + | +++ | - | Gunpowder Black | - | + | N |
| Bílá pivoňka | - | ++ | N | Bílá pivoňka | - | ++ | - |
| Rooibos červený | - | ++ | N | Rooibos červený | - | ++ | - |
| Rooibos zelený | - | ++ | N | Rooibos zelený | - | +++ | N |
| Lapacho | - | ++ | N | Lapacho | - | ++ | N |
| Honeybush | - | ++ | N | Honeybush | - | - | N |
| Guarana | + | ++ | N | Guarana | + | + | N |
| JITROCEL | SM | ML | EC | KOPŘIVA | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | - | ++ | N | Gunpowder Formosa | + | +++ | N |
| Gunpowder Black | - | ++ | N | Gunpowder Black | - | + | N |
| Bílá pivoňka | - | + | N | Bílá pivoňka | - | - | N |
| Rooibos červený | + | + | N | Rooibos červený | - | + | N |
| Rooibos zelený | - | ++ | N | Rooibos zelený | - | ++ | N |
| Lapacho | - | + | N | Lapacho | - | + | N |
| Honeybush | - | +++ | N | Honeybush | + | +++ | N |
| Guarana | - | - | N | Guarana | - | +++ | N |
| RAKYTNÍK | SM | ML | EC | HEŘMÁNEK | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | + | + | N | Gunpowder Formosa | - | - | N |
| Gunpowder Black | - | +++ | - | Gunpowder Black | - | +++ | N |
| Bílá pivoňka | - | +++ | N | Bílá pivoňka | - | ++ | N |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rooibos červený | - | ++ | N | Rooibos červený | - | ++ | N |
| Rooibos zelený | - | - | N | Rooibos zelený | - | +++ | N |
| Lapacho | - | - | N | Lapacho | - | + | N |
| Honeybush | - | ++ | N | Honeybush | - | - | N |
| Guarana | - | + | N | Guarana | - | ++ | N |

*Koncentrace buněk ve srovnání s kontrolou (+++) 0-30%, (++) 30-60%, (+) 60 až 90%, (-) 90-100%, (N) - netestováno, (SM) - Serratia marcescens* , (ML) - *Micrococcus luteus (EC) - Escherichia coli*

Preparáty byly opět testovány především na kmenech SM a ML, u vybraných byl poté účinek sledován i na kmeni EC. Vzhledem k účinkům preparátů, které obsahovaly pouze čaj a bylinku, zde došlo k výraznějšímu antimikrobiálnímu působení především na kmen ML a to i přesto, že koncentrace lysozymu byla třikrát menší než u základního roztoku. Preparáty s vysokým antimikrobiálním účinkem jsou v tabulce zvýrazněny červeně. Jsou to především ty, které obsahovaly černý čaj a zelený rooibos. Opět je zde snaha o rozšíření spektra účinku lysozymu.

Testování antimikrobiální aktivity byly podrobeny také připravené lipozomy a chitosanové částice aplikované v původním roztoku. Dále byly částice centrifugovány 2 min při 14 000 otáčkách a byla testována i antimikrobiální aktivita supernatantu a usazených částic rozsuspendovaných ve vodě. Antimikrobiální aktivity těchto vzorků jsou shrnuty v tabulce 22.

Tabulka 22: Antimikrobiální účinek částic

| LIPOZOMY – ROZTOK | SM | ML | EC | CHITOSANOVÉ – ROZTOK | SM | ML | EC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gunpowder Formosa | - | - | + | Gunpowder Formosa | ++ | - | ++ |
| Gunpowder Black | - | - | + | Gunpowder Black | ++ | - | +++ |
| Bílá pivoňka | - | - | + | Bílá pivoňka | - | - | ++ |
| Rooibos červený | - | - | - | Rooibos červený | + | - | ++ |
| Rooibos zelený | - | - | + | Rooibos zelený | ++ | - | ++ |
| Lapacho | - | - | ++ | Lapacho | +++ | +++ | + |
| Honeybush | - | - | - | Honeybush | ++ | - | ++ |
| Guarana | - | - | + | Guarana | + | - | ++ |
| LIPOZOMY – SUPERNATANT | SM | ML | EC | CHITOSANOVÉ - SUPERNATANT | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | - | - | - | Gunpowder Formosa | +++ | +++ | ++ |
| Gunpowder Black | - | - | - | Gunpowder Black | +++ | +++ | + |
| Bílá pivoňka | - | - | - | Bílá pivoňka | ++ | ++ | + |
| Rooibos červený | - | - | - | Rooibos červený | + | ++ | - |
| Rooibos zelený | - | - | - | Rooibos zelený | +++ | ++ | + |
| Lapacho | - | - | ++ | Lapacho | - | + | - |
| Honeybush | - | - | - | Honeybush | + | ++ | - |
| Guarana | - | - | - | Guarana | + | ++ | - |
| LIPOZOMY – VE VODĚ | SM | ML | EC | CHITOSANOVÉ - VE VODĚ | SM | ML | EC |
| Gunpowder Formosa | + | - | - | Gunpowder Formosa | - | + | - |
| Gunpowder Black | + | - | - | Gunpowder Black | + | + | - |
| Bílá pivoňka | ++ | - | + | Bílá pivoňka | ++ | + | - |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rooibos červený | ++ | - | - | Rooibos červený | ++ | + | - |
| Rooibos zelený | + | + | - | Rooibos zelený | + | - | - |
| Lapacho | + | + | + | Lapacho | - | - | - |
| Honeybush | + | - | - | Honeybush | ++ | + | - |
| Guarana | - | - | - | Guarana | + | + | - |

*Koncentrace buněk ve srovnání s kontrolou (+++) 0-30%, (++) 30-60%, (+) 60 až 90%, (-) 90-100%, (N) - netestováno, (SM) - Serratia marcescens* , (ML) - *Micrococcus luteus (EC) - Escherichia coli*

Výraznější antimikrobiální účinek vykazovaly chitosanové částice jak v roztoku, rozsuspendované ve vodě tak i jejich supernatant. Červeně jsou v tabulce opět vyznačeny částice s výraznějším působením.
Nízký antimikrobiální účinek lipozomů je zřejmě způsoben značnou degradací polyfenolů po uvolnění z částic. V případě jejich odstranění z roztoku (lipozomy rozsuspendované ve vodě) však lipozomy alespoň minimální antimikrobiální aktivitu vykazovaly.

Chitosanové částice vykazovaly oproti lipozomům mnohem výraznější antimikrobiální účinek. V případě částic v původním roztoku působily především na kmenech SM a EC, supernatant účinkoval antimikrobiálně výrazně u kmenů SM a ML, jakož i částice rozsuspendované ve vodě. Výraznější antimikrobiální efekt mohl být způsoben pozvolnějším uvolňováním polyfenolů a částečně také mohl antimikrobiální účinek zvýšit sám chitosan, který je rovněž antimikrobiální.

### 5.4.2. Zkumavkový test

U kofeinu, lysozymu a u vybraných směsných preparátů byl testován jejich antimikrobiální účinek také s využitím zkumavkového testu. Postup této metody je uveden v kapitole 4.9.3 a výsledky shrnuty v tabulkách 23, 24 a 25. Vesměs se jedná o průměrné hodnoty ze dvou měření. Při tomto testu je sledováno působení antimikrobiální látky již od začátku růstu mikroorganismů, nikoli až po přídavku ve stacionární fázi, jako tomu bylo u dilučního testu provedeném na mikrotitračních destičkách.

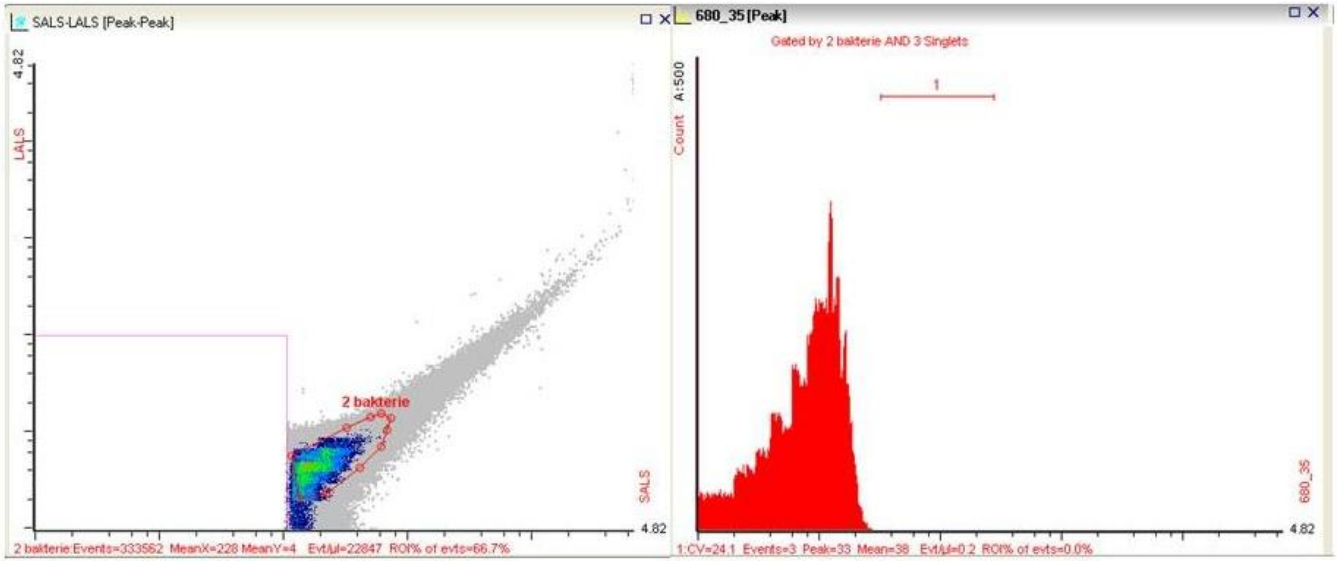
Tabulka 23: Antimikrobiální účinek kofeinu

| Vzorek | Koncentrace bakterií [%] | |
|---|---|---|
| | ML | SM |
| Kofein 1 mg/5ml | 78,4 | 101,0 |
| Kofein 2 mg/5ml | 63,3 | 96,2 |
| Kofein 4 mg/5ml | 91,0 | 86,4 |
| Kofein 8 mg/5ml | 82,2 | 77,5 |

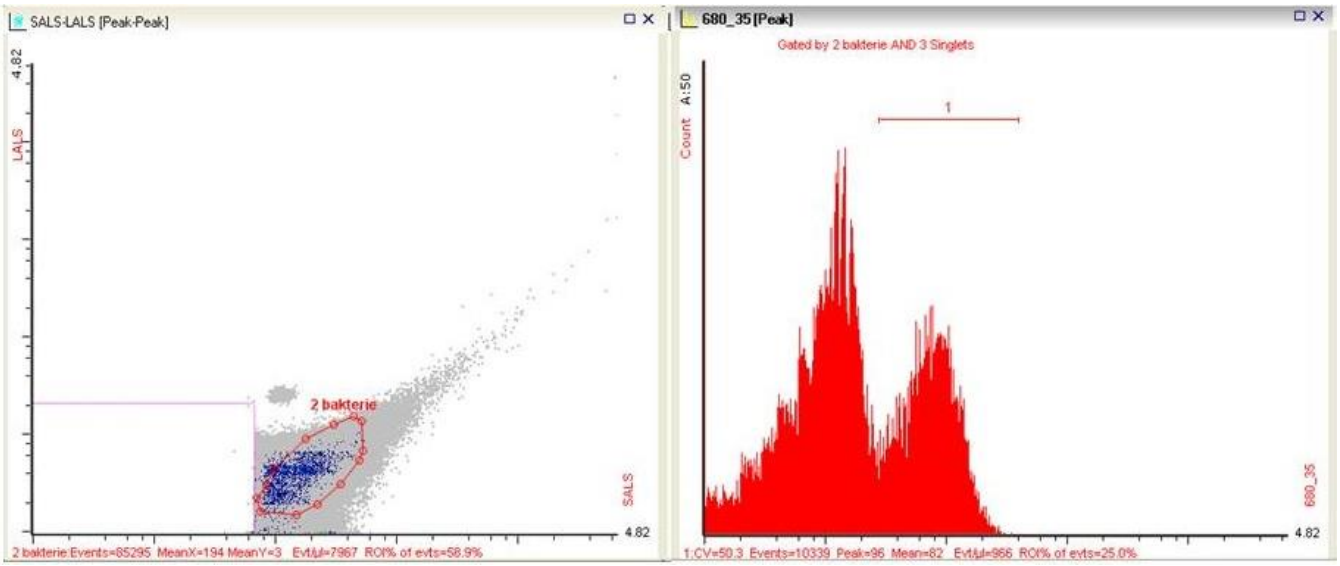
*(SM) - Serratia marcescens*, (ML) - *Micrococcus luteus*

V tabulce 23 je uveden antimikrobiální účinek různých koncentrací kofeinu v médiu. Uvedené hodnoty jsou ve formě procentuální koncentrace vzhledem ke kontrolnímu vzorku, který kofein neobsahoval. U kmene ML účinkoval nejlépe kofein s koncentrací 2 mg na 5 ml média, u SM to byla koncentrace 8 mg na 5 ml média. Z těchto hodnot lze předpokládat, že i kofein se může podílet v testovaných rostlinných antimikrobiálních preparátech na jejich účinku.

Pro zkumavkové testy bylo využito stanovení viability pomocí průtokového cytometru. Podle hodnoty koncentrace buněk ve vzorku a procentuálního zastoupení mrtvých buněk byla stanovena viability buněk ve vzorku. Ukázka výstupu z průtokového cytometru je uvedena na obrázku 21 a 22. Na obrázku 21 je vidět koncentrace 22647 buněk/1 ml vzorku a viability ukazuje 100 % živých buněk. Na obrázku 22 je vidět koncentrace 7967 buněk/1 ml vzorku a viability ukazuje 75 % živých buněk.




*Obrázek 21: Stanovení koncentrace a viability buněk – blank SM*




*Obrázek 22: Stanovení koncentrace a viability buněk – vzorek SM ampicilin 0,4 mg/ml*

V tabulce 24 jsou uvedeny výsledky antimikrobiálního testu různých koncentrací lysozymu a antibiotik. S využitím zkumavkového testu byl ověřen účinek lysozymu na G+ bakterie v podobě kmene *Micrococcus luteus*. Dále byl ověřen i účinek antibiotik, které vyjma nejmenší koncentrace při působení na kmen SM vykazovaly 100% antimikrobiální účinek na oba kmeny.

Tabulka 24: Antimikrobiální účinek lysozymu a antibiotik

| Vzorek | Živé buňky [%] | |
|---|---|---|
| | SM | ML |
| Lysozym 0,1 mg/ml | 16,6 | 2,9 |
| Lysozym 0,4 mg/ml | 127,4 | 27,1 |
| Lysozym 1,0 mg/ml | 129,9 | 4,9 |
| Lysozym1,4 mg/ml | 107,1 | 11,2 |
| Ampicilin 0,1 mg/ml | 183,8 | 0 |
| Ampicilin 0,4 mg/ml | 0 | 0 |
| Ampicilin 1,0 mg/ml | 0 | 0 |
| Ampicilin 1,4 mg/ml | 0 | 0 |
| Streptomycin 0,1 mg/ml | 180,5 | 0 |
| Streptomycin 0,4 mg/ml | 0 | 0 |
| Streptomycin 1,0 mg/ml | 0 | 0 |
| Streptomycin 1,4 mg/ml | 0 | 0 |

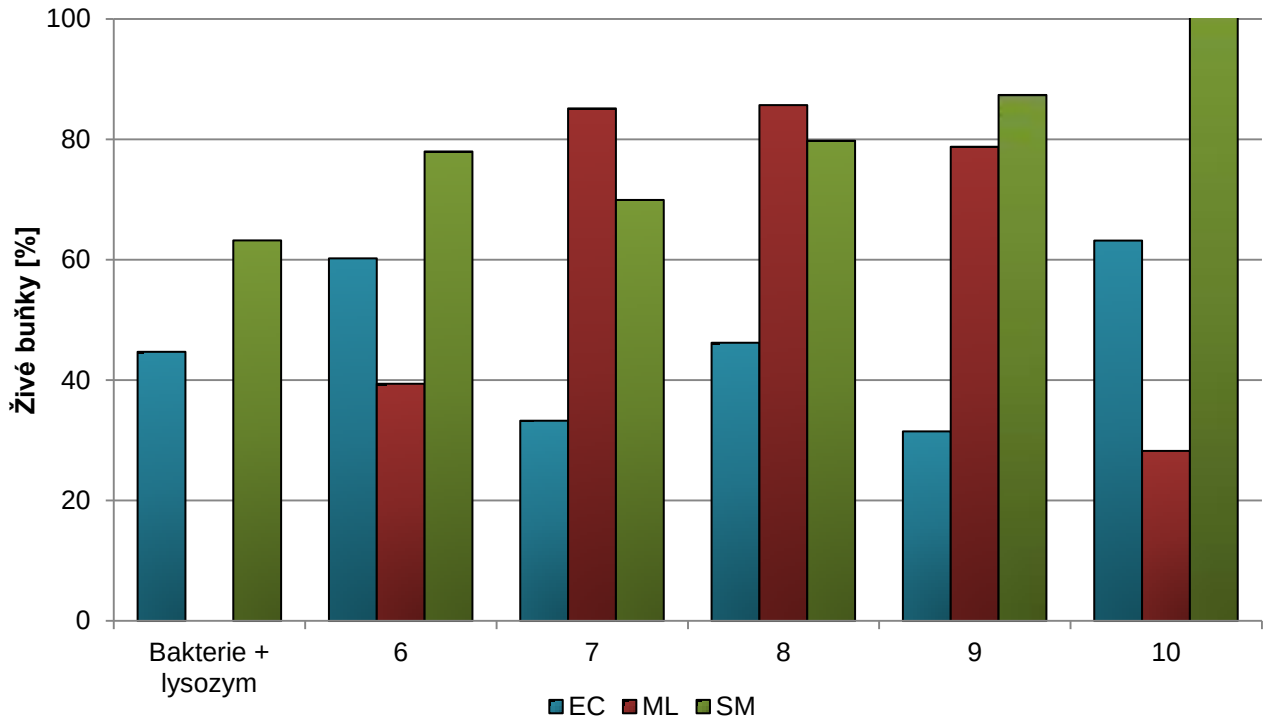
*(SM) - Serratia marcescens*, (ML) - *Micrococcus luteus*

Zkumavkový test byl také využit pro studium antimikrobiálního účinku některých směsných preparátů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 25.

Tabulka 25:Antimikrobiální účinek vybraných směsných preparátů

| Testovaný preparát | | Živé buňky [%] | | |
|---|---|---|---|---|
| | | EC | ML | SM |
| Bakterie + lysozym | | 44,7 | 0,0 | 63,2 |
| 1 | lapacho+hřebíček | 76,3 | 141,1 | 92,2 |
| 2 | černý+hřebíček | 80,3 | 118,3 | 84,1 |
| 3 | zelený+heřmánek | 66,4 | 37,8 | 35,1 |
| 4 | bílý+heřmánek | 81,5 | 42,6 | 84,3 |
| 5 | guarana+hřebíček | 80,0 | 64,2 | 81,3 |
| 6 | L+lapacho+hřebíček | 60,2 | 39,4 | 78,0 |
| 7 | L+černý+hřebíček | 33,3 | 85,1 | 69,9 |
| 8 | L+zelený+skořice | 46,2 | 85,7 | 79,8 |
| 9 | L+bílý+skořice | 31,5 | 78,8 | 87,4 |
| 10 | L+černý+rakytník | 63,2 | 28,3 | 102,3 |

*(L) – lysozym, (SM) - Serratia marcescens*, (ML) - *Micrococcus luteus*,
*(EC) - Escherichia coli*




*.Graf 14: Antimikrobiální účinek směsných preparátů*

V případě působení na kmen EC vykazovaly antimikrobiální účinek všechny testované preparáty. U kmene ML byly antimikrobiální mimo směs 1 a 2 také všechny ostatní směsi. Na SM nepůsobila antimikrobiálně pouze směs 10. V grafu 14 je dobře viditelné případné zvýšení antimikrobiálního účinku směsných preparátů s lysozymem (tabulka 25 - vzorky 6, 7, 8, 9, 10) v porovnání s působením samotného lysozymu. U kmene ML neproběhlo oproti samotnému lysozymu zvýšení účinnosti v žádném vzorku. V případě působení na kmen EC se účinek zvýšil u vzorku 7 a 9. Proti kmenu SM se také nezvýšil účinek v porovnání s lysozymem ani u jednoho z preparátů.

# 6. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium přírodních antimikrobiálních preparátů, které obsahovaly jednak rostlinné antimikrobiální látky v podobě extraktů čajů a bylin, lysozym jakožto zástupce živočišných antimikrobiálních látek a pro srovnání také dvě vybraná antibiotika. Dále byla ověřena jedna z možností stabilizace rostlinných antimikrobiálních preparátů, a to enkapsulace do organických částic.

Teoretická část této diplomové práce je věnována přehledu přírodních antimikrobiálních látek. Jsou zde uvedeni zástupci jak živočišných, tak rostlinných antimikrobiálních a antioxidačních látek, jako jsou polyfenoly, flavonoidy a některé z alkaloidů. V teoretické části práce je také uveden stručný přehled antibiotik a je zde popsáno jejich působení na mikroorganismy. V další části je uvedena charakteristika čajů, používaných v experimentální části práce. Část práce je rovněž věnována antioxidační aktivitě a možnostem zvýšení antimikrobiálního účinku.

Experimentální část práce je zaměřena zejména na testování antimikrobiální aktivity přírodních antimikrobiálních látek. Dalším cílem bylo provedení enkapsulace rostlinných extraktů, charakterizace částic a v neposlední řadě také sledována dlouhodobá stabilita částic s enkapsulovanými přírodními látkami.

V rámci experimentální části byla nejprve provedena charakterizace vybraných přírodních antimikrobiálních látek. Testování proběhlo ve třech typech extraktů – vodných, ethanolových a DMSO. Pro práci bylo vybráno 7 druhů čajů, guarana a 6 druhů bylin. V rámci charakterizace byl stanoven obsah celkových a některých individuálních polyfenolů a flavonoidů, byla zjišťována i antioxidační aktivita. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly ethanolové extrakty. V rámci vodných a ethanolových extraktů vykazovala největší antioxidační aktivitu guarana. Z testovaných bylin byl nejsilnějším antioxidantem heřmánek. Dále byl u testovaných čajů sledován i obsah kofeinu, theobrominu a theofylinu. Nejvyšší obsah kofeinu byl detekován v guaraně, theobrominu v čaji Gunpowder Formosa a theofylinu v červeném rooibosu.

Zvolené extrakty byly následně použity k enkapsulaci do dvou typů částic – lipozomů a chitosanových částic. U obou typů částic byla stanovena jejich enkapsulační účinnost, velikost a koloidní stabilita hodnocená ve formě zeta-potenciálu.

V rámci charakterizace připravených částic byla stanovována i jejich antioxidační aktivita. Antioxidační aktivita částic se oproti samotným extraktům čajů značně zvýšila, což může být způsobeno stabilizací obsahu i příspěvkem materiálu částic. Připravené částice byly dále podrobeny sledování jejich dlouhodobé stability z hlediska uvolňování polyfenolů. Časové intervaly, ve kterých byla stabilita zjišťována, byly týden, měsíc a dva měsíce. Částice byly ponechány ve vodném prostředí. Z hlediska dlouhodobé stability jsou lepší chitosanové částice, u kterých nedocházelo k tak markantní degradaci polyfenolů a k jejich uvolňování jako u lipozomů, kde se veškeré enkapsulované polyfenoly uvolnily ve většině případů již po týdnu skladování.

Využití připravených částic se může lišit dle množství uvolněných polyfenolů v různých časových intervalech. Částice, u nichž dojde k uvolnění účinných látek v krátkém časovém úseku, by se daly využít k hojení ran. Částice v podobě lyofilyzátu by se po hydrataci aplikovaly na postižené místo, kde by mohlo dojít k okamžitému antimikrobiálnímu působení. Díky vysokému množství uvolněných účinných složek najednou by byla zajištěna jejich dostatečná koncentrace a tím by byl zajištěn jejich účinek.

V případě částic, u kterých dochází k pozvolnému uvolňování látek, by mohla být průběžně uvolňována požadovaná koncentrace účinných složek. To znamená, že jejich např. antimikrobiální efekt by byl zajištěn po delší dobu a takovéto preparáty by mohly

být využity namísto chemických konzervantů, nebo jako jejich doplněk v potravinářském a kosmetickém průmyslu.
V poslední části experimentální práce byly provedeny testy antimikrobiální aktivity. K tomuto účelu byly využity dvě metody – bujónová diluční metoda a zkumavkový test. Antimikrobiální aktivita byla testována proti třem kmenům bakterií - *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* a *Escherichia coli*.
Nejdříve byl zjišťován antimikrobiální účinek různých extraktů čajů a bylin, z nichž byly nejúčinnější DMSO extrakty. U vodných extraktů bylin nejlépe účinkoval heřmánek.
Dále byla sledována antimikrobiální aktivita u lysozymu v kombinaci vodných a etanolových extraktů čajů. U vodných extraktů došlo oproti etanolovým k častějšímu zvýšení antimikrobiálního účinku v porovnání s účinkem samotného roztoku lysozymu. Slabé zvýšení bylo pozorováno u kmene *Serratia marcencens*, nejvýrazněji pak antimikrobiální účinek zvýšil černý čaj – Gunpowder Black u kmene *Micrococcus luteus*. V případě ethanolových extraktů došlo k výraznému navýšení antimikrobiální aktivity ve srovnání se samotným lysozymem u guarany pro oba testované kmeny.
Obecně je známo, že lysozym vykazuje antimikrobiální účinek především proti G+ bakteriím. Pokud by se k preparátu s lysozymem přidala např. rostlinná složka působící proti G- bakterii, vznikl by komplexní preparát se spektrem účinku proti oběma typům bakterií.
Dalším z testovaných preparátů byla směs čaje a antibiotika. U velké části těchto směsných preparátů byl zachován vysoký antimikrobiální účinek i přes menší koncentraci jednotlivých látek ve směsi. Toho by mohlo být využito pro snížení nepříznivého vlivu antibiotik na lidský organismus nebo pro snížení množství používaných antibiotik.
Součástí antimikrobiálních testů bylo i zjištění antimikrobiální aktivity směsí, které obsahovaly čaj v kombinaci s bylinkou. V rámci tohoto stanovení však nebyly pozorovány žádné výrazné změny antimikrobiálních účinků těchto směsí. Dále byl ke směsi čaj-bylinka přidán roztok lysozymu. K výraznějšímu antimikrobiálnímu působení těchto kombinací docházelo především na kmen *Micrococcus luteus*, i když koncentrace lysozymu byla třikrát menší než u základního roztoku. Vyšší antimikrobiální účinek měly především směsi, které obsahovaly černý čaj – Gunpowder Black a zelený rooibos.
Na závěr byl sledován také antimikrobiální účinek připravených částic. Výraznější antimikrobiální účinek vykazovaly především chitosanové částice.
V rámci zkumavkového testu antimikrobiální aktivity byl nakonec ověřen účinek lysozymu proti G+ bakteriím, účinek antibiotik a potvrzen efekt kofeinu, který zřejmě také ovlivňuje antimikrobiální aktivitu některých preparátů. Pomocí této metody byla také zjišťována antimikrobiální aktivita některých vybraných směsí bylin s čaji a lysozymem. U kmene *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens* nedošlo v porovnání s působením lysozymu zvýšení účinnosti nikde. U *Escherichia coli* se zvýšil účinek u směsi, která obsahovala lysozym, černý čaj a hřebíček a u směsi s obsahem lysozymu, bílého čaje a skořice.
Závěrem, lze konstatovat, že výzkum v oblasti přírodních antimikrobiálních látek je v dnešní době velmi důležitý. Lidé se opět vrací k jejich výraznému využívání namísto klasických chemických preparátů. Jak již bylo zmíněno, přírodní antimikrobiální látky a jejich směsi lze ať už ve volné či enkapsulované formě využít např. v oblasti medicíny, kosmetického a potravinářského průmyslu.

# 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ


[1] KALEMBA, D. a A. KUNICKA. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, 10(10), 813-829. DOI: 10.2174/0929867033457719. ISSN 09298673. Dostupné také z: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article

[2] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0657-7.

[3] HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. 2., přeprac. vyd. V Praze: Triton, 2001. ISBN 80-725-4181-1.

[4] LANDOVÁ, Pavlína. *Problematika výskytu penicilinových antibiotik ve vodách*. Brno, 2014. Bakalářská práce. VUT Brno. Vedoucí práce Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

[5] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Překlad Maxmilián Wenke. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3908-3.

[6] DEMNEROVÁ, Kateřina a Igor HOCHEL. *Úvod do farmaceutické mikrobiologie* [online]. 2014 [cit. 2016-04-01].

[7] NEUBAUEROVÁ, Tereza, Martina MACKOVÁ, Tomáš MACEK a Bohumír KOUTEK. Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické listy*. 103. 2009, (6), 460-468.

[8] JENSSEN, H., P. HAMILL a R. E. W. HANCOCK. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006, 19(3), 491-511. DOI: 10.1128/CMR.00056-05. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00056-05

[9] ANDREU, David; RIVAS, Luis. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Peptide Science*, 1998, 47.6: 415-433.

[10] MIKUT, Ralf, Serge RUDEN, Markus REISCHL, Frank BREITLING, Rudolf VOLKMER a Kai HILPERT. Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016, 1858(5), 1024-1033. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.12.013. ISSN 00052736. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273615004113

[11] BMRB Featured System: Lysozyme. *Biological Magnetic Resonance Data Bank* [online]. Wisconsin: BioMagResBank, 2008 [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: http://www.bmrb.wisc.edu/featuredSys/Lysozyme/index.shtml

[12] DOLEŽÍLKOVÁ, Ivana, Martina MACKOVÁ a Tomáš MACEK. Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antimikrobiální aktivitou. *Chemické Listy*. 2011, č. 105, s. 346-355.

[13] Lysozyme. In: *Lysozyme* [online]. 2006 [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: http://lysozyme.co.uk/

[14] RAU, Astrid. *The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution*. Jena, 2005. Dissertation. Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

[15] Lysozyme from chicken egg white. In: *SERVA Electrophoresis* [online]. 2007 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z:

http://www.serva.de/enDE/ProductDetails/592_28262_Lysozyme_from_chicken_egg_white_min_100_000_units_mg_cryst.html

[16] VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. Enzymologie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.

[17] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií.* Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1986.

[18] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře.* Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1983.

[19] Energy and Enzymes [online]. 2008 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: http://www.bio.miami.edu/tom/courses/bil255/bil255goods/05_enzymes.html

[20] DAVÍDEK, Jiří. *Chemie potravin: určeno pro posl. fak. potravinářské a biochemické technologie*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-708-0097-6.

[21] COWAN, Marjorie Murphy. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews: a publication of the American Society for Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1999, 12(4), 564 -82. ISSN 0893-8512.

[22] RADULOVIC, N.S., P.D. BLAGOJEVIC, Z.Z. STOJANOVIC-RADIC a N.M. STOJANOVIC. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. *Current Medicinal Chemistry*. 2013, 20(7), 932-952. DOI: 10.2174/0929867311320070008. ISSN 09298673. Dostupné také z: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article

[23] Caffeine. *Chemspieder* [online]. Royal Society of Chemistry [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2424.html?rid=a874cf51-961c-4396-bf52-112498236041

[24] PATOČKOVÁ, Klára. *Charakterizace nápojů a doplňků stravy osahujících kofein*. Brno, 2014. Diplomov práce. Vysoké učení techniské v Brně. Vedoucí práce Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

[25] FREDHOLM, Bertil B., Karl BÄTTIG, Janet HOLMÉN, Astrid NEHLIG a Edvin E. ZVARTAU. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacologicals Reviews*. 1999, 51(no. 1), 83-133.

[26] ING. MATOUŠKOVÁ, Petra. *Využití různých technik enkapsulace k řízenému uvolňování aktivních látek v potravinářských a kosmetických výrobcích*. Brno, 2015. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

[27] Caffeine. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2424.html?rid=8bd77b63-ecfd-4a32-9908-0f2ebc2427c9

[28] NAFISI, Shohreh, Firouzeh MANOUCHEHRI, Heidar-Ali TAJMIR-RIAHI a Maryam VARAVIPOUR. Structural features of DNA interaction with caffeine and theophylline. *Journal of Molecular Structure*. 2008, 875(1-3), 392-399. DOI: 10.1016/j.molstruc.2007.05.010. ISSN 00222860. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286007003791

[29] NONTHAKAEW, A., Na. MATAN, T. AEWSIRI a Ni. MATAN. Caffeine in foods and its antimicrobial activity. *International Food Research Journal*. 2015, 22(1), 9-14.

[30] JAŠKOVÁ, Martina. *Analýza polyfenolických látek v různých typech kávy*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

[31] PETRIKOVÁ, Veronika a Jiří PATOČKA. Káva očima toxikologa. *Vojenské zdravotnické listy*. 2006, LXXV(3-4), 120-125.

[32] AZAM, Sonis, Naghma HADI a Nizam Uddin KHAN. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical Science Monitor*. 2003, 9(9), BR325-BR330.

[33] Theobromine. *PubChem* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information., 2004 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/theobromine#section=Top

[34] SHINDE, Vaibhav, Kamlesh DHAMWAL a K.R. MAHADIK. Review on antioxidant potential of some important medicinal plants. *Pharmacology online Newsletter*. 2007, 2, 1-11.

[35] Theobromine. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5236.html

[36] Theophylline. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2068.html?rid=74ea08db-bd34-4a7b-b35a-62d5151605a7

[37] BORKOWSKI, Andrzej, Łukasz ŁAWNICZAK, Tomasz CŁAPA, Dorota NAROŻNA, Marek SELWET, Daria PĘZIAK, Bartosz MARKIEWICZ a Łukasz CHRZANOWSKI. Different antibacterial activity of novel theophylline-based ionic liquids – Growth kinetic and cytotoxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016, 130, 54-64. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.004. ISSN 01476513. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651316301117

[38] DUTHIE, Garry G., Peter T. GARDNER a Janet A. M. KYLE. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*. 2003, 62(03), 599-603. DOI: 10.1079/PNS2003275. ISSN 0029-6651. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S002966510300082X

[39] STAGOS, Dimitrios, Gregorios D. AMOUTZIAS, Antonios MATAKOS, Argyris SPYROU, Aristides M. TSATSAKIS a Dimitrios KOURETAS. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, 50(6), 2155-2170. DOI: 10.1016/j.fct.2012.04.002. ISSN 02786915. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512002748

[40] SANDOVAL-ACUÑA, Cristian, Jorge FERREIRA a Hernán SPEISKY. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2014, 559(1), 75-90 [cit. 2016-04-14]. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.017. ISSN 00039861. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611400174X

[41] ZENDULKA, Ondřej. *POLYFENOLY VE VÝŽIVĚ JAKO MOŽNÁ PREVENCE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ*. Brno, 2008. Disertační práce. Masarykova univerzita v Brně.

[42] FARAH, Adriana a Carmen Marino DONANGELO. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2006, 18(1), 75-90. DOI: 10.1590/S1677-04202006000100003. ISSN 1677-0420. Dostupné také z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext

[43] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Pavel DOSTÁLEK a Petr HULÍN. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladinách a pivech. *Kvasný průmysl*. 2006, 52(4), 111-114.

[44] MACHÁLKOVÁ, Iva. *Srovnání metod stanovení veškerých polyfenolů*. Lednice, 2010. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici. Vedoucí práce Doc. Ing. Josef Balík, Ph.D.

[45] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.

[46] PETTI, Stefano a Crispian SCULLY. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*. 2009, 37(6), 413-423. DOI: 10.1016/j.jdent.2009.02.003. ISSN 03005712. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300571209000414

[47] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.

[48] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5902-X.

[49] 2-Phenylchromane. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.84973.html?rid=093da574-8329-44ce-9f93-d08d646815e1

[50] HEIM, Kelly E, Anthony R TAGLIAFERRO a Dennis J BOBILYA. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, 13(10), 572-584. DOI: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5. ISSN 09552863. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286302002085

[51] IWASHINA, Tsukasa. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*. 2000, 113(3), 287-299. DOI: 10.1007/PL00013940. ISSN 0918-9440. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/PL00013940

[52] Glykosidy. *Toxikon* [online]. Pavel Krmenčík, 2007 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/glykosidy.php

[53] GRAHAM, T.L. Biosynthesis and Distribution of Phytoestrogens and Their Roles in Plant Defense, Signal Transduction, and Cell-to-Cell Signaling. *Journal of Medicinal Food*. 2009, 2(3-4), 93-97. DOI: 10.1089/jmf.1999.2.93. ISBN 10.1089/jmf.1999.2.93. Dostupné také z: http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jmf.1999.2.93

[54] STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007, 30(18), 3268-3295. DOI: 10.1002/jssc.200700261. ISSN 16159306. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700261

[55] BANSAL, Sumit, Shivani CHOUDHARY, Manu SHARMA, Suthar Sharad KUMAR, Sandeep LOHAN, Varun BHARDWAJ, Navneet SYAN a Saras JYOTI. Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research International*. 2013, 53(2), 568-584.

DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.032. ISSN 09639969. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913000598

[56] HRUBÝ, Radoslav. *Zdravotní význam čaje a kombuchy*. Zlín, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

[57] (−)-Epigallocatechin gallate. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58575.html?rid=1e1e0e5d-8388-4c9d-bf15-25bf8941a1dc

[58] (+)-epicatechin-3-O-gallate. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58567.html?rid=1b876dee-cec8-4adf-8b69-7ab40671b718

[59] (-)-Epigallocatechin. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.65231.html?rid=88ad94d7-0024-4ffc-a1d6-7825687e2c24

[60] (+)-Epicatechin. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.158494.html?rid=7d529ddb-ec01-4f1d-9325-fef8ad9fee94

[61] (+)-Gallocatechin. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58594.html?rid=09d6ddf8-0cc0-4b3e-998a-aaa463c7266c&page_num=0

[62] LEIFERTOVÁ, Irena a Milena LISÁ. *Pohanka zdravá a léčivá i dnes*. 1. vyd. Praha: Art Press Servis, 1991. Edice rad a návodů. ISBN 80-900-7300-X.

[63] JIANG, P., F. BURCZYNSKI, C. CAMPBELL, G. PIERCE, J.A. AUSTRIA a C.J. BRIGGS. Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species Fagopyrum esculentum, F. tataricum, and F. homotropicum and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*. 2007, 40(3), 356-364. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.10.009. ISSN 09639969. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996906001773

[64] PRUGAR, Jaroslav. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. 1. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, 2008. ISBN 978-80-86576-28-2.

[65] KONDERLA, Patrik. *Antimikrobiální účinky rostlinných extraktů*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

[66] MOUDRÝ, Jan. *Pohanka a proso*. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2005. ISBN 80-727-1162-8.

[67] Rutin. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444362.html?rid=76336ab2-9a03-4e9f-87ee-ec9597344c77&page_num=0

[68] NASO, Luciana G., Luis LEZAMA, Teófilo ROJO, et al. Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as antio-xidant and specific anti-cancer agents. *Chemico-Biological Interactions*. 2013, 206(2), 289-301. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.10.006. ISSN 00092797. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279713002603

[69] Morin. *ChemSpider* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444989.html?rid=c808bd2d-1a62-4954-a184-42bcf804845f

[70] PÁNEK, Jan, Jan POKORNÝ a Jana DOSTÁLOVÁ. *Základy výživy a výživová politika*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0468-8.

[71] PENDELL, Dale. *Pharmako dynamis: excitanty a empatogenika ; [moc rostlin a cesta jedů]*. 1. vyd. Překlad Miroslav Krůta, Martin König. Praha: Dybbuk, 2005. ISBN 80-868-6206-2.

[72] NOVÁKOVÁ, Radmila. *Charakteristika, vlastnosti a využití pochutin*. Zlín, 2007. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.

[73] *Zelený čaj: [pohoda pro tělo i duši*. 1. české vyd. Praha: Svojtka, 2003. Malá knihovnička zdraví. ISBN 80-723-7651-9.

[74] Třídy čaje Gunpowder. *Gunpowder* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.gunpowder.cz/tridy

[75] *Oxalis* [online]. 2016 [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: www.oxalis.cz

[76] *Internetový obchod LYPO* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.lypo.cz/

[77] Recenze na čaj Pai Mu Tan - Bílá pivoňka. *Čaj Room* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://cajroom.webnode.cz/products/recenze-na-caj-pai-mu-tan-bila-pivonka/

[78] CHINA PAI MU TAN - bílý čaj. *SypanýČaj.eu* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: https://www.sypanycaj.eu/china-pai-mu-tan-bily-caj-x1227

[79] Rooibos a jeho účinky na naše zraví. *RooibosCaj.cz* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.rooiboscaj.cz/ucinky

[80] ROOIBOS ZELENÝ. *SypanýČaj.eu* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: https://www.sypanycaj.eu/rooibos-zeleny-x1408

[81] Čaj rooibos a čaj honeybush. *Www.rooibos-honeybush.cz* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.rooibos-honeybush.cz/

[82] Honeybush. *Oxalis* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.oxalis.cz/cs/honeybush

[83] Zázračný čaj Lapacho. *Celostní Medicína* [online]. 2007 [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/zazracny-caj-lapacho.htm

[84] Lapacho. *SypanýČaj.eu* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: https://www.sypanycaj.eu/lapacho-x2v10032

[85] Pěstování a sklizeň lapacha. *Čaje-Čaje.cz* [online]. 2013 [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://www.caje-caje.cz/clanek-pestovani-a-sklizen-lapacha.html

[86] Složení lapacha aneb špetka chemie. *Dify.cz* [online]. [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: http://lapacho.dify.cz/slozeni-lapacha.html#.VxamInpcp0w

[87] SCHIMPL, Flávia Camila, José Ferreira DA SILVA, José Francisco de Carvalho GONÇALVES a Paulo MAZZAFERA. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013, 150(1), 14-31. DOI:

10.1016/j.jep.2013.08.023. ISBN 10.1016/j.jep.2013.08.023. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874113005771

[88] HALLIWELL, Barry a John M. GUTTERIDGE. *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015. ISBN 01-987-1748-2.

[89] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004, 98(4), 174-179.

[90] ŠTINDLOVÁ, Jitka. *Zmeny antioxidantu ve vybraných druzích ovoce v prubehu dlouhodobého zmražení*. Brno, 2010. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická. Vedoucí práce Doc.RNDr. Ivana Márová, CSc.

[91] HLÚBIK, Pavol, Hana STŘÍTECKÁ a Jana FAJFROVÁ. Antioxidanty v klinické praxi. *Praktické lékárenství*. 2006, 2(6), 254-256.

[92] LUGASI, Andrea a Judit HÓVÁRI. Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food*. 2003, 47(2), 79-86. DOI: 10.1002/food.200390031. ISSN 0027769x. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/food.200390031

[93] PUCCI, M. J. a K. BUSH. Investigational Antimicrobial Agents of 2013. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013, 26(4), 792-821. DOI: 10.1128/CMR.00033-13. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00033-13

[94] RODRÍGUEZ, Julia, María J. MARTÍN, María A. RUIZ a Beatriz CLARES. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*. 2016, 83, 41-59. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.01.032. ISBN 10.1016/j.foodres.2016.01.032. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916300333

[95] MOELLERING, Robert C. Rationale for use of antimicrobial combinations. *The American Journal of Medicine*. 1983, 75(2), 4-8. DOI: 10.1016/0002-9343(83)90088-8. ISBN 10.1016/0002-9343(83)90088-8. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934383900888

[96] BHARAT, Amrita, Irene MARTIN, George G. ZHANEL a Michael R. MULVEY. In vitro potency and combination testing of antimicrobial agents against Neisseria gonorrhoeae. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2016, 22(3), 194-197. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.10.002. ISBN 10.1016/j.jiac.2015.10.002. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X15002421

[97] GUSTAVO V. BARBOSA-CANOVAS .. *Global Issues in Food Science and Technology*. 1st ed. Amsterdam: Academic Press, 2009. ISBN 978-012-3741-240.

[98] KUNICKA-STYCZYŃSKA, A., M. SIKORA a D. KALEMBA. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology*. 2009, 107(6), 1903-1911. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04372.x

[99] KUSUMAWATI, Idha a Gunawan INDRAYANTO. Natural Antioxidants in Cosmetics. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2013, 40, 485-505. DOI: 10.1016/B978-0-444-59603-1.00015-1. ISBN 10.1016/B978-0-444-59603-1.00015-1. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444596031000151

[100] GYAWALI, Rabin a Salam A. IBRAHIM. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. 2014, 46, 412-429. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047. ISSN 09567135. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351400320X

[101] CHANG, Chia-Chi, Ming-Hua YANG, Hwei-Mei WEN a Jiing-Chuan CHERN. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002, 10(3), 178-182.

[102] CHANG C. Y. M., WEN H., CHERN J.. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10(3): 178-182.

[103] Particle size distribution. In: *Malvern* [online]. © 2013 [cit. 2016-04-24].

# 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|---|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) |
| AMP | antimikrobiální peptidy |
| Asp-52 | *aspartát-52* |
| ATB | antibiotika |
| DLS | dynamický rozptyl světla |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| EC | *Escherichia coli* |
| EtOH | ethanol |
| G+ | grampozitivní |
| G- | gramnegativní |
| Glu-35 | *glutamát-35* |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography) |
| MeOH | methanol |
| L | lysozym |
| ML | *Micrococcus luteus* |
| PDA | detektor diodového pole (Photodiode Array Detector) |
| ROS | reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species) |
| RNS | reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species) |
| SM | *Serratia marcescens* |
| UV | ultrafialová-viditelná oblast |
| ZP | zeta potenciál |