



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**CHARAKTERIZACE ANTIOXIDAČNĚ A
ANTIMIKROBIÁLNĚ AKTIVNÍCH LÁTEK V RŮZNÝCH
TYPECH DŘEVIN**

CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIALY ACTIVE SUBSTANCES IN SOME
TYPES OF WOOD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tomáš Ďatko

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1186/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Tomáš Ďatko**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Charakterizace antioxidačně a antimikrobiálně aktivních látek v různých typech dřevin

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. Literární rešerše zaměřená na přehled aktivních látek s antioxidačním a antimikrobiálním účinkem přítomných v různých typech běžných i vzácných dřevin
2. Optimalizace metod stanovení aktivních látek, antioxidační a antimikrobiální aktivity
3. Analýza a charakterizace aktivních látek z vybraných typů dřevin a srovnání jejich účinku
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Tomáš Ďatko
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto bakalárskej práce je analýza antioxidačne a antimikrobiálne aktívnych látok v drevinách. V teoretickej časti bola spracovaná rešerš, zaoberajúca sa charakterizáciou týchto biologicky aktívnych látok. Okrem toho práca ponúka stručný prehľad o vybraných drevinách a popisuje najčastejšie používané extrakčné techniky. Napokon boli popísané metódy na stanovenie antimikrobiálnej aktivity. V experimentálnej časti sme pripravili extrakty z brezovej, dubovej a vrbovej kôry, za použitia rôznych rozpúšťadiel (voda, metanol, etanol, DMSO), pri rozdielnych parametroch (čas, teplota). Spektrofotometricky sme stanovovali koncentráciu polyfenolov, flavonoidov, trieslovín a antioxidačnej aktivity. Následne boli extrakty testované z hľadiska antimikrobiálnej aktivity oproti trom mikroorganizmom: *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a *Candida glabrata*. Z výsledkov vyplýva, že najviac antioxidačne aktívnych látok sa nachádza vo vrbovej kôre. Z hľadiska antimikrobiálnej aktivity môžeme povedať, že vo vybraných druhoch kôry sa prejavovala antimikrobiálna aktivita len veľmi slabo.

ABSTRACT

The purpose of this bachelor thesis is to analyze antioxidant and antimicrobial active substances in woody plants. The theoretical part deals with characterization of these biologically active substances, the overview of selected types of woody plants and dividing of extraction techniques. Moreover, methods for determination antimicrobial activity were described. The experimental part is focused on preparation of bark extracts of birch, oak and willow using different solvents (water, methanol, ethanol, DMSO) at various parameters (time, temperature). The concentration of polyphenols, flavonoids, tannins and antioxidant activity was set by using spectrophotometrical method. Subsequently antimicrobial activity of extracts was tested against the three microorganisms: *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* and *Candida glabrata*. The results show that the most antioxidant active substances are found in the willow bark and antimicrobial activity was showed very weakly in selected bark extracts.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

antioxidanty, antimikrobiálna aktivita, extrakty z kôry stromov

KEYWORDS

antioxidants, antimicrobial activity, tree bark extracts

ĐATKO, T. *Charakterizace antioxidačně a antimikrobiálně aktivních látek v různých typech dřevin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 47 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, Csc.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcel poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce prof. RNDr. Ivane Márovej, Csc. za odborné rady a ľudský prístup pri konzultáciách. Ďalej by som sa veľmi rád poďakoval konzultantke mojej práce Ing. Jitke Bokrovej za trpezlivosť, za veľa cenných rád pri meraní a vyhodnocovaní, za celý rok. Rovnako by som rád poďakoval rodine, priateľke a priateľom za podporu pri celom doterajšom štúdiu.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1. Charakteristika antioxidačných a antimikrobiálnych látok.....	8
2.1.1. Polyfenoly	8
2.1.2. Flavonoidy.....	8
2.1.3. Taníny (triesloviny)	9
2.2. Vybrané druhy drevín	10
2.2.1. Dub (<i>Quercus</i>)	10
2.2.2. Vŕba (<i>Salix</i>)	10
2.2.3. Breza (<i>Betula</i>).....	11
2.3. Extrakcia	12
2.3.1. Konvenčné extrakčné metódy	12
2.3.2. Nekonvenčné extrakčné metódy.....	13
2.3.3. Faktory ovplyvňujúce extrakciu	15
2.4. Metódy na stanovenie antimikrobiálnej aktivity	16
2.4.1. Difúzne metódy	16
2.4.2. Dilučné metódy.....	16
2.5. Charakteristika použitých mikroorganizmov	17
2.5.1. <i>Serratia marcescens</i>	18
2.5.2. <i>Micrococcus luteus</i>	18
2.5.3. <i>Candida glabrata</i>	19
3 CIELE PRÁCE.....	20
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	21
4.1. Použité chemikálie.....	21
4.1.1. Chemikálie použité na prípravu extraktov	21
4.1.2. Chemikálie použité na stanovenie polyfenolov.....	21
4.1.3. Chemikálie použité na stanovenie flavonoidov.....	21
4.1.4. Chemikálie použité na stanovenie antioxidačnej aktivity.....	21
4.1.5. Chemikálie použité na stanovenie trieslovín.....	21
4.1.6. Chemikálie použité na kultiváciu mikroorganizmov.....	21

4.2. Použité prístroje a pomôcky.....	22
4.3. Použité prírodné materiály	22
4.4. Použité mikroorganizmy	23
4.5. Metódy pre stanovenie antioxidačne aktívnych látok.....	23
4.5.1. Príprava extraktov z kôry	23
4.5.2. Spektrofotometrické stanovenie polyfenolov	24
4.5.3. Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov	24
4.5.4. Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou ABTS.....	25
4.5.5. Spektrofotometrické stanovenie trieslovín	25
4.6. Antimikrobiálne testy	25
4.6.1. Kultivácia mikroorganizmov.....	25
4.6.2. Agarová difúzna metóda	26
4.6.3. Bujónová dilučná metóda.....	26
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	27
5.1. Spektrofotometrické stanovenie polyfenolov.....	27
5.2. Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov.....	29
5.3. Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity.....	31
5.4. Spektrofotometrické stanovenie trieslovín.....	33
5.5. Agarová difúzna metóda	34
5.6. Bujónová dilučná metóda.....	36
6 ZÁVER	40
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	42
8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	43

1 ÚVOD

V posledných rokoch sme sa stali svedkami zvýšeného záujmu o používanie liekov, potravinových doplnkov alebo kozmetických výrobkov pripravených na rastlinnej báze. Spotrebitelia ich začali uprednostňovať pred látkami syntetického pôvodu. Medzi také zaujímavé prírodné materiály patrí aj kôra stromov. Už naši predkovia poznali jej liečivé vlastnosti a používali kôru z rôznych drevín, či už z dubu, vrby alebo brezy k prevencii alebo liečeniu rozličných chorôb. Tieto dreviny totiž obsahujú širokú škálu sekundárnych metabolitov ako sú flavonoidy, antokyány, či triesloviny u ktorých boli preukázané antioxidačné a antimikrobiálne vlastnosti.

Antioxidanty sú látky, ktoré obmedzujú aktivitu voľných radikálov, chránia organizmus pred oxidačným stresom a majú za úlohu posilňovať imunitný systém. Antimikrobiálne látky majú schopnosť inhibovať rast mikroorganizmov, dokážu štiepiť väzby v bunkovej stene, čím im znižujú odolnosť oproti vonkajším vplyvom.

Taktiež sa stretávame s faktom, že narastá rezistencia mikroorganizmov voči dostupným antibiotikám. Preto je dôležité vynaložiť čo najvyššie úsilie, aby sme dokázali nahradiť v súčasnosti dostupné antibiotiká. Rastlinné látky sú preto vhodné kvôli ich minimálnej toxicite, dobrej dostupnosti a takmer žiadnym vedľajším účinkom.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Charakteristika antioxidačných a antimikrobiálnych látok

Antioxidanty sú látky, ktoré spomaľujú alebo potláčajú poškodenie buniek hlavne prostredníctvom vlastnosti zachytávania voľných radikálov. Vďaka ich nízkej molekulovej hmotnosti môžu bezpečne interagovať s voľnými radikálmi a tým ukončiť reťazovú reakciu pred poškodením životne dôležitých molekúl. V prípade antimikrobiálnych látok je potrebné si uvedomiť, že ich hlavnou úlohou je čo najviac postihnúť hostujúce patogény a čo najmenej pri tom poškodiť hostiteľa [1,2].

V posledných desaťročiach výrazne rastie záujem o látky s biologickou aktivitou. Jedná sa o významnú skupinu prírodných antioxidantov s možnými vplyvmi na zdravie človeka, ako sú napríklad antioxidačné, protizápalové, protinádorové či antimikrobiálne účinky. Môžu sa podieľať na ochrane proti škodlivému pôsobeniu voľných radikálov. Voľné radikály sa tvoria vo väčších množstvách pri patologických stavoch a sú zapojené do rozvoja najčastejších chronických degeneratívnych ochorení, ako sú kardiovaskulárne ochorenia alebo rakovina. Výskum sa momentálne zameriava na nové potenciálne využitie vo farmaceutických a poľnohospodárskych produktoch s cieľom zlepšiť zdravie a výživu človeka [3].

Úlohou týchto látok je teda chrániť bunky ľudského organizmu a tkanivá pred škodlivými účinkami reaktívnych foriem kyslíka a ďalšími voľnými radikálmi a pomáhať posilniť imunitný systém. Polyfenoly a flavonoidy patria medzi antioxidanty, ktoré samy majú aj antimikrobiálny efekt, alebo ho podporujú [2].

2.1.1. Polyfenoly

Polyfenoly tvoria jednu z najpočetnejších skupín, ktoré sa vyskytujú v rastlinách a zároveň sú neoddeliteľnou súčasťou potravy ľudí a zvierat. Charakteristické sú prítomnosťou fenolových jednotiek v molekule. Všeobecne ich môžeme deliť na flavonoidy a hydrolyzované taníny [4].

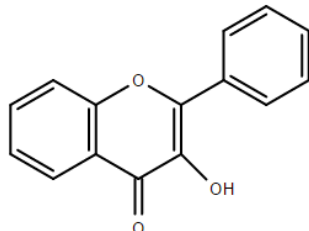
Polyfenoly sa v rastlinách vyskytujú ako sekundárne metabolity, ktoré sa vo všeobecnosti podieľajú na ochrane pred ultrafialovým žiarením a patogénnymi látkami. V rastlinách teda majú polyfenoly rôzne biologické funkcie ako dodávanie farby, chuti, zápachu, horkosti a oxidačnej stability. Nedávne výskumy spojené s polyfenolmi a ich antioxidačnou aktivitou v rastlinách a potravinách ukazujú, že polyfenoly, ako sú flavonoidy a taníny poskytujú ochranu proti rakovine, kardiovaskulárnym ochoreniam, cukrovke, osteoporóze a neurodegeneratívnym ochoreniam. O polyfenolových látkach môžeme povedať, že sú známe tým, že sa prejavujú antioxidačnou a antimikrobiálnou aktivitou [5,6].

2.1.2. Flavonoidy

Flavonoidy sú bežné sekundárne metabolity vyšších rastlín. Chemicky sú flavonoidy polyfenoly, ktoré obsahujú 14 uhlíkových atómov. Sú to látky vyskytujúce sa v rastlinách. Majú aromatický charakter molekuly, odvodený od 2-fenylchromónu. Sú schopné viazať prechodné kovy, indukovať a ovplyvňovať niektoré enzýmy (aryl-a epoxid hydroxylázy, proteinkinázu C), inhibovať XOD, lipoxigenázu a lipoperoxidáciu. Majú protizápalový, protisklerotický a protinádorový účinok, pôsobiaci v hydrofilnom a aj v lipofilnom prostredí.

Flavonoidy predstavujú jednu z najsledovanejších skupín prírodných látok s antimikrobiálnou aktivitou [7,8,9].

Základom flavonoidov je heterocyklická zlúčenina flavon, ktorá je tvorená dvoma benzénovými kruhmi spojená heterocyklickým pyránom. Vo flavonoidoch má na ich antioxidačnú účinnosť najväčší vplyv poloha a počet hydroxylových skupín v molekule [10].



Obrázok 1: Flavon-3-ol

Bolo preukázané, že ľudská strava obsahujúca flavonoidy môže ovplyvniť dlhodobé zdravie a znížiť riziko chronických a degeneratívnych ochorení. V poslednom desaťročí záujem o flavonoidy výrazne vzrástol čoho je dôsledok, že boli zaznamenané viac ako tisíceky prirodzene sa vyskytujúcich flavonoidov [11].

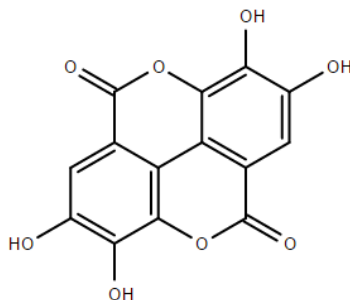
2.1.3. Taníny (triesloviny)

Taníny alebo tiež nazývané triesloviny označujú skupinu prírodných polyfenolov s pomerne širokým rôznorodým zložením, ktorých jednou z vlastností je zrážanie bielkovín. Taníny rozdeľujeme do dvoch veľkých skupín:

a) *gallotaníny a ellagotaníny* (hydrolyzovateľné triesloviny), ktorých základ tvorí kyselina gallová (digallová) alebo kyselina ellagová, esterifikujúca glukózu za tvorby pentadigalloylglukózy. Zlúčenina označovaná ako tanín (kyselina gallotanová) vytvára koloidný roztok kyslej reakcie,

b) *katechínové triesloviny* (kondenzované), ktoré vznikajú na základe kondenzácie pentahydroxyflavanu[9].

Tieto látky majú dobré antimikrobiálne a antiinvazívne účinky (roztok tanínu bol používaný americkou armádou počas 2. svetovej vojny na ošetrovanie rán). Taníny sa viac vyskytujú v dvojklíčnolistových ako v jednoklíčnolistových rastlinách. Najdôležitejšie sú z kôry a dreva niektorých stromov, najmä z dubu. V kmeňoch stromov sa vyskytujú najviac v aktívnych rastových zónach a pod kôrou [7,9].



Obrázok 2: Kyselina ellagová

2.2. Vybrané druhy drevín

2.2.1. Dub (*Quercus*)

Dub je početný rod zahrňujúci viac než 450 druhov. Dub letný je mohutný, až 40 m vysoký strom s košatou korunou. Je to opadavý a veľmi pomaly rastúci strom. Kôra mladých stromov je hladká, sivozelená, neskôr na starších kmeňoch rozpukaná. Listy majú krátku stopku a kožovitú perovito laločnatú celistvo okrajovú čepeľ, na báze srdcovito vykrojenú. Dub je jednodomá rastlina, samčie a samičie kvety sú oddelené, ale vyvíjajú sa na tom istom strome. Samčie kvety sú zoskupené vo visiach zelených jahňadách a rozkvitajú na jar zároveň s pučaním listov. Piestikové kvety sa vyvíjajú po dva až päť v pazuchách tohoročných listov. Sú obalené Stankovou čiaškou. Plodom je svetložltá nažka – žalud', ktorá sedí v čiaške. Dub zimný sa od letného odlišuje dlhostopkatými listami, ktoré sú na rube mäkké, neskôr hviezdovito chlpaté. Báza čepele je klinovitá, kým dub letný ju má srdcovito vykrojenú. Líši sa aj krátkostopkatými alebo sediacimi kvetmi a plodmi, zatiaľ čo žalude duba letného rastú na dlhých stopkách [12].

Výskumom sa zistilo, že kôra rôznych druhov dubov obsahuje polyfenolické zložky. Kôra obsahuje najmä katechínové triesloviny (6 až 20 %), ďalej kyselinu gallovú, kyselinu ellagovú, horčiny, flavonoidy, živice, a ďalšie látky. Kôra dubu letného, ktorá má kvôli obsahu kyseliny tanínovej silno sťahujúci účinok sa tradične pridávala do čaju proti hnačke a dyzentérii a vo vonkajšom použití našla uplatnenie pri liečbe hemoroidov, zapálených d'asien, rán a ekzémov. Odvar zo žalud'ov a dubovej kôry býval považovaný za vynikajúci protijed pri otrave. Z kôry dubu zimného bolo izolovaných viac ako 20 zlúčenín (katechínov a oligomérnych a polymérnych proantokyanidínov [13,14,15].



Obrázok 3: Dub zimný [16]



Obrázok 4: Kôra dubu [17]

2.2.2. Vrbá (*Salix*)

Vrbá je až do 20 m vysoký strom alebo ker. Má sivohnedú rozpukanú kôru a pružné konáre. Listy sú krátkostopkaté, kopijovité, žliazkaté pílkovité, na líci zelené, na rube bledozelené až sivozelené. Mladé listy sú obojstranne chlpaté a celému stromu dodávajú bielosivý vzhľad.

Jednopohlavné kvety sú usporiadané v žltkastých samčích a zelenkastých samičích jahňadách. Plody sú lysé tobolky. Zbiera sa kôra z dvojročných až trojročných vetví, najlepšie skoro na jar (marec) [15].

Vrbová kôra je súčasťou mnohých bylinných liečiv, doplnkov stravy, alebo prostriedkov na chudnutie. Prípravky z vrbovej kôry pacienti tolerujú lepšie ako prípravky pochádzajúce zo syntetických derivátov. Kôra obsahuje fenolový glykozid, salicín, triesloviny, flavonoidy, živice, soli kyseliny šťaveľovej a ďalšie látky. Pretože salicín je chemicky veľmi podobný kyseline acetylsalicylovej, ktorá je účinnou látkou v známom aspiríne, je aj použitie vrbovej kôry podobné ako použitie tohto lieku, t.j. znižuje horúčku a zmiernuje bolesť (najmä pri reumatizme, ale pomáha aj pri rôznych bolestiach hlavy, zubov, svalov a pod.). Užíva sa pri prechladnutí, reumatizme, dyspeptických zápaloch tráviaceho ústrojenstva, na niektoré choroby obličiek a močového ústrojenstva, zvonka ju možno použiť na hnisavé rany alebo vyrážky. Mierneho upokojujúceho účinku možno využiť pri nespavosti alebo pri ľahších neurasténií [15,18].



Obrázok 5: *Vrba biela* [16]



Obrázok 6: *Kôra vrby* [17]

2.2.3. Breza (*Betula*)

Breza je strom so štíhlým kmeňom, dorastajúci do výšky asi 20 m, s výrazne bielou kôrou, ktorá sa po praskaní odlupuje vo forme priečných pásikov. Previsajúce mladé konáre má pokryté bradavičnatými žliazkami. Striedavé listy sú dlhostopkaté so srdcovito vajcovitou čepeľou, na líci sýto zelenou, na rube svetlejšou [12].

Brezy boli široko používané ako ľudové liečivá, najmä vďaka schopnosti hojenia rán. Olej z brezovej kôry sa využíva aj na liečbu ochorení kože, ako exémov alebo psoriázy. Okrem toho bielu brezovú kôru poznali aj naši predkovia na prípravu čajov a iných nápojov na liečbu infekcií zažívacieho traktu [19].

Betulín je prirodzene sa vyskytujúci triterpén, ktorý sa nachádza v podstatných množstvách vo vonkajšej kôre brezy. Betulín, hlavná zložka brezy, bol skúmaný spočiatku pre svoje rôzne biologické vlastnosti. Zistilo sa, že má široké spektrum aktivít. Vyznačuje sa antiseptickými,

protizápalovými a antivírusovými vlastnosťami, rovnako ako aj antimikrobiálnou, antifungálnou a protinádorovou aktivitou. Vo farmaceutickom a kozmetickom priemysle sa používa v starostlivosti o pleť [19].



Obrázok 7: Breza previsnutá [16]



Obrázok 8: Kôra brezy [17]

2.3. Extrakcia

Všetky živé organizmy pozostávajú z komplexných zmesí chemických látok. Zvyčajne sú zakomponované v bunkových štruktúrach. Ak potrebujeme tieto chemické látky z biologického materiálu extrahovať, či už za účelom stanovenia ich štruktúry alebo zistenia ich biologických účinkov, musíme ich oddeliť od bunkových štruktúr. Tieto štruktúry sú najčastejšie tvorené proteínmi, polysacharidmi a lipidmi. Samozrejme niekedy aj tieto bunkové štruktúry môžu byť samotné extrahované chemické látky.

Počiatočným krokom pre oddelenie častí chemických látok z organickej vzorky je samotný výber vhodnej extrakčnej metódy. Voľba extrakčnej metódy závisí od rôznych faktorov. Sú to jednak chemicko-fyzikálne vlastnosti zlúčenín, ktoré majú byť extrahované ako je polarita, termostabilita, vplyv pH. Ďalším faktorom je účel použitia získaného extraktu, vlastnosti rozpúšťadla, výťažnosť, ekonomika celého procesu, bezpečnosť atď.[21].

Voľba vhodnej extrakčnej techniky je preto náročná, pretože na výber je veľké množstvo metód. Finálna analýza musí byť zvážená pred výberom metódy prípravy vzorky, aby sa minimalizovalo znečistenie, skreslenie alebo strata obsahových látok. Spoločným cieľom všetkých techník je extrakcia analytu z ich matrice [22].

2.3.1. Konvenčné extrakčné metódy

Bioaktívne látky z rastlinných materiálov môžu byť získavané rôznymi klasickými extrakčnými metódami. Väčšina z týchto metód je založená na extrakčnej sile rôznych rozpúšťadiel, aplikáciou tepla alebo miešania. Za účelom získania biologicky aktívnych látok

z rastlín existujú klasické techniky: a) Soxhletova extrakcia, b) macerácia a c) hydrodestilácia [23].

a) Pri Soxhletovej extrakcii sa najčastejšie separujú lipidy, ale dá sa použiť aj na extrahovanie bioaktívnych látok z prírodných zdrojov. Extrakcia je časovo náročná (4 až 24 h) a vyžaduje veľké objemy extrahovadla (100 ml). Automatizácia činnosti Soxhletovho prístroja čiastočne eliminuje nedostatky pôvodného prístroja: čas extrakcie je kratší (2 až 4 h) a zníži sa spotreba extrahovadla (50 ml) [23, 24].

b) Najlepšie sa macerácia používa u prchavých a tepelne nestabilných látkach, jedná sa o extrakciu surového alebo práškového rastlinného materiálu v ľubovoľnom rozpúšťadle za studena. Macerácia všeobecne pozostáva z niekoľkých krokov. Najprv sa rastlinný materiál rozdrví na malé časti, aby sa zväčšila povrchová plocha a tým sa uľahčilo miešanie. Potom sa pridá vhodné rozpúšťadlo do uzavretej nádoby. A nakoniec sa tekutina precedí a vylisuje a tak sa získa macerát z rastlinnej vzorky [22, 23].

c) Hydrodestilácia patrí medzi tradičné extrakčné metódy, pri ktorej dochádza k extrakcii bioaktívnych látok a esenciálnych olejov z rastlín. Existujú tri typy hydrodestilácie: vodná destilácia a destilácia vodou a parou a priama parná destilácia. Pri hydrodestilácii sú najprv rastlinné materiály umiestnené do destilačnej nádoby, potom sa pridá dostatočné množstvo vody a privedie sa do varu. Pôsobenie horúcej vody a pary sa považuje za hlavný faktor na získavanie bioaktívnych zložiek z rastlín [23].

2.3.2. Nekonvenčné extrakčné metódy

Hlavnými nevýhodami konvenčných extrakcií sú dlhší čas extrakcie, výrazné požiadavky na vysoko čisté rozpúšťadlo, odparenie veľkého množstva rozpúšťadla, nízka selektivita extrakcie a tepelný rozklad termolabilných látok. Na prekonanie týchto obmedzení pri bežných extrakčných metódach boli zavedené nové, sľubné extrakčné techniky. Sú označované ako nekonvenčné extrakčné metódy [22].

Medzi najvýznamnejšie patria napríklad extrakcia podporovaná ultrazvukom, extrakcia podporená mikrovlnovým žiarením, superkritická fluidná extrakcia, extrakcia pulzným elektrickým pólom, ale aj tlaková extrakcia rozpúšťadlom. Niektoré z týchto metód sú považované za tzv. zelené metódy, čiže spĺňajú isté environmentálne kritériá. Ide hlavne o menej nebezpečné chemické syntézy, navrhovanie bezpečnejších chemikálií, návrh pre energetickú účinnosť, využívanie obnoviteľných surovín, zníženie derivátov a katalýz, doba analýzy pre prevenciu znečistenia. Vo svojej podstate ide o bezpečnejšiu chémiu kvôli prevencii pred prípadnými nehodami [23].

2.3.2.1. Extrakcia podporená ultrazvukom (UAE)

Pri extrakcii podporenej ultrazvukom (Ultrasound Assisted Extraction; UAE) sú vzorka a rozpúšťadlo vystavené pôsobeniu ultrazvuku (US), čo sú mechanické vlny s frekvenciami 20–40 kHz. Pri prechode ultrazvuku následne dochádza k expanzii a stlačovaniu molekúl média. V kvapalinách dochádza k vzniku, rastu a zániku bublín a dutín. Prítomnosť tuhej látky v kvapaline spôsobuje, že je rozpad bublín asymetrický a v kvapaline vzniká prúdenie. Nárazmi prúdov do tuhej látky dochádza k prieniku rozpúšťadla do vzorky. Rýchlosť prieniku kvapaliny môže byť až 400 km/h, a preto je účinok veľmi silný. V praxi sú

používané dva typy zariadení pre extrakciu podporenú ultrazvukom, a to ultrazvukové vane alebo ultrazvukové sondy [25].

Hlavné faktory, ktoré ovplyvňujú výsledok extrakcie ultrazvukom sú teplota, tlak, frekvencia a dĺžka pôsobenia ultrazvuku. Pri použití s niektorými konvenčnými metódami sa zistilo, že zvyšujú ich účinnosť, preto sa spájajú pri používaní [23].

2.3.2.2. Extrakcia podporená mikrovlnovým žiarením (MAE)

Princíp extrakcie podporenej mikrovlnovým žiarením (Microwave-Assisted Extraction; MAE) spočíva vo využití mikrovlnového žiarenia pri ohrievaní vzorky a extraktu počas extrakcie [25].

Princíp je zhruba taký, že vzorka a vhodné rozpúšťadlo (alebo zmes rozpúšťadiel) sa vloží do nádoby, ktorá je pod tlakom a zahrievaná mikrovlnami. Po zvyčajne 5 až 20 minútach je extrakcia dokončená a nádoby sa nechajú vychladnúť pred odstránením zmesi vzorky a rozpúšťadla. Rozpúšťadlo musí byť filtrované, aby sa odstránili častice vzorky ešte pred analýzou extrahovaných látok [26].

Ďalším znakom MAE je, že zahrievanie rozpúšťadla je rýchle. Ide od vnútra vzorky smerom von a schopnosť zahrievania závisí od mikrovlnných a absorbujúcich vlastností rozpúšťadla. Polárne rozpúšťadla, medzi ktoré patrí acetón, budú absorbovať mikrovlnnú energiu efektívne, pretože majú molekuly s trvalým dipólovým momentom, ktorý môže mať interakcie s mikrovlnami. Nepochopiteľne rozpúšťadla, ako je napríklad hexán, nebudú ohriať, keď budú vystavené mikrovlnám, ale môžu byť použité v zmesi s polárnym rozpúšťadlom, aby sa dosiahlo žiadanych ohrievacích vlastností. Mikrovlnná extrakcia bola použitá pri stanovení polycyklických aromatických uhlíkov v kôre borovice prímorskej a borovice píniovej [26,27].

2.3.2.3. Superkritická fluidná extrakcia (SFE)

Superkritická (nadkritická) fluidná extrakcia (Supercritical Fluid Extraction; SFE) je extrakčná metóda, ktorá využíva na extrakciu analytu z tuhej matrice nadkritickou kvapalinu. Nadkritická kvapalina (tekutina, fluidum) nie je plyn a nie je kvapalina. Má fyzikálne (difúzne vlastnosti plynu a chemické (rozpúšťacie) vlastnosti kvapaliny [24,25].

Nadkritická fluidná extrakcia je extrakcia, pri ktorej plynné extrahovadlo má vlastnosti kvapaliny, pretože sa nachádza pri nadkritickej teplote a nadkritickom tlaku. Najčastejšie používané extrahovadlo je vysokočistý oxid uhličitý, ktorý má nízku kritickú teplotu (31 °C) a nízky kritický tlak (7,38 MPa). Oxid uhličitý je netoxický, nehorľavý a málo reaktívny. Polarita a extrakčná sila nadkritického oxidu uhličitého je porovnateľná s n-hexánom a podstatné zvýšenie rozpustnosti analytov sa môže dosiahnuť prídavkom modifikátora do CO₂. Modifikátor je polárne rozpúšťadlo, ktoré sa pridá k extrakčnému fluidu na zvýšenie jeho rozpúšťacej sily. Ako modifikátor sa často používa voda alebo iné polárne rozpúšťadlo (etanol, metanol, acetonitril, acetón, toluén, kyselina octová) [24].

2.3.2.4. Tlaková extrakcia rozpúšťadlom (PLE)

Pri tlakovej extrakcii rozpúšťadlom (Pressurized Liquid Extraction; PLE) sa využíva vysoký tlak počas extrakcie, ktorý udržiava rozpúšťadlo pri vysokej teplote, ale v kvapalnom stave [23].

Je teda založená na extrakcii rozpúšťadlom pri zvýšených teplotách (asi do 200 °C na urýchlenie extrakcie) a vysokých tlakoch (do 20 MPa na udržanie rozpúšťadla v kvapalnom stave). Zvýšená extrakčná teplota vplýva na rozpustnosť vody v organickom rozpúšťadle, ale zníži sa viskozita extrahovadla. Táto skutočnosť dovoľuje lepšie preniknutie extrahovadla do matrice, a pretože sa zníži povrchové napätie roztokov, analyt sa rozpúšťa rýchlejšie. Zvýšená teplota extrakcie pomáha prekonať silné interakcie roztok-matrica a na udržanie extrahovadla v kvapalnom stave musí byť použitý zvýšený pracovný tlak. Zvýšený pracovný tlak uľahčí extrakciu analytu z matrice tým, že extrahovadlo sa natlačí do pórov matrice [24,28].

2.3.3. Faktory ovplyvňujúce extrakciu

2.3.3.1. Teplota

Teplota je jednoznačne jedným z najdôležitejších parametrov ovplyvňujúcich priebeh extrakcie. Je známe, že vyššia teplota výrazne zväčšuje účinnosť a rýchlosť extrakčného procesu. Zvýšenie teploty ovplyvňuje interakcie medzi analytom a matricou, taktiež má vplyv na vlastnosti rozpúšťadla. S rastúcou teplotou, sa zvyšuje rozpustnosť látky, pretože sa zvyšuje aj hodnota tepelnej kinetickej energie. Táto energia uľahčuje roztrhnutie intra- a intermolekulárnych síl, ako sú napríklad van der Waalove sily, vodíkové väzby a dipólová príťažlivosť, existujúca medzi matricou a analytom. Vysoká teplota ovplyvňuje fyzikálne vlastnosti rozpúšťadiel, vo význame zníženia viskozity a povrchového napätia, čo umožní lepší kontakt a infiltráciu rozpúšťadla do matrice vzorky. [21,29].

Tieto vlastnosti pre zmenu zlepšujú difúzny koeficient rozpúšťadla a tým zvyšujú účinnosť extrakcie. Okrem toho „zmáčanie“ matrice je tiež zlepšené nízkou viskozitou a povrchovým napätím rozpúšťadla. Stručne povedané, vyššie teploty vedú k zlepšeniu desorpcie analytov z aktívnych miest v matrici [21,29].

2.3.3.2. Výber vhodného rozpúšťadla

Výber vhodného rozpúšťadla je jedným z hlavných faktorov pri procese extrakcie. Rozpúšťadlo musí mať správne chemické vlastnosti, ako je polarita a pH, na rozbitie intra- a intermolekulárnych síl medzi matricou a analytom. Vhodné rozpúšťadlo by malo zvlhčovať matricu dôkladne, byť selektívne pre cieľový analyt a vhodné pre konečnú analýzu alebo produkt. Niekedy aj malé množstvo vody v rozpúšťadle rapídne zvyšuje účinnosť extrakcie. Voda v extrakčnom rozpúšťadle interaguje s molekulami vody v okolí analytu a tak umožňuje extrakciu rozpustenej látky do rozpúšťadla. Najbežnejšie extrakčné rozpúšťadlá pre látky polyfenolového charakteru sú metanol, acetón a dietyléter. Tieto rozpúšťadlá sa zvyčajne používajú pri extrakcii látok z rastlinných materiálov. S ohľadom na dnešný stav životného prostredia je vhodné uvedené rozpúšťadlá vymeniť za čistú vodu alebo superkritický oxid uhličitý (SC-CO₂) [21,30].

2.4. Metódy na stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Antimikrobiálnymi látkami sa označujú liečivá používané pri profylaxii alebo terapii infekčných ochorení. Tieto látky môžu byť v podstate dva druhy – antibiotiká, ktoré sú prírodného pôvodu (dnes často chemicky modifikované alebo synteticky vyrábané) a chemoterapeutiká, ktoré sú pripravené iba chemicky. Pôsobenie antimikrobiálnych látok môže byť mikrobistatické (reverzibilné zastavenie rastu a množenie mikroorganizmov), alebo mikrobicídne (schopnosť usmrcovania mikroorganizmov) [31].

Na stanovenie antibakteriálnej aktivity rastlinných extraktov a ich zmesí sa využívajú metódy, ktoré delíme na difúzne a dilučné [31,32].

2.4.1. Difúzne metódy

Základom difúznej metódy je fenomén inhibičnej zóny: antibiotikum sa kvapne na agar, na ktorom je husto naočkovaný citlivý mikrób, následne po inkubácii sa vytvorí okolo tejto kvapky kruhová zóna, aby zabránila rastu, tzv. inhibičná zóna. V praxi sa namiesto kvapkania na Petriho misku položí na naočkovaný agar papierový disk napustený zvoleným množstvom antibiotika. Antibiotikum tak môžeme dávkovať a tak zaistiť rovnomernú difúziu.

Tieto metódy nachádzajú uplatnenie zväčša pri rutinnom skríningu citlivosti mikroorganizmov k antimikrobiálnym látkam. V praxi sa najviac používa diskový test [31,33].

2.4.1.1. Disková difúzna metóda

Diskový test je typický experiment pre zistenie antibakteriálnych vlastností materiálov. Antibakteriálny účinok sa hodnotí podľa inhibičnej zóny (zóny s nulovým rastom baktérií) vzniknutej okolo materiálu počas kultivácie baktérií [34].

Prvýkrát bola táto metóda použitá v roku 1954. Napriek svojej jednoduchosti je disková difúzna metóda založená na sofistikovaných fyzikálno-chemických princípoch, ktoré upravujú dynamiku šírenia antibiotika vo vzťahu k rastom baktérií v agarovom systéme. Po kontakte disku napusteného antibiotikom s povrchom inokulovaného agaru, začnú molekuly antibiotika okamžite difundovať do agaru a vytvoria dynamicky sa meniaci gradient koncentrácie antimikrobiálnej látky. Mikroorganizmy sa začínajú deliť, ich počet narastá až do kritického množstva. Okraj inhibičnej zóny vzniká v okamihu, keď je koncentrácia antibiotika ešte schopná inhibovať mikroorganizmus narastajúci do veľkej masy buniek. Súčasne je hustota buniek dostatočne vyššia ako absorbovateľné množstvo antibiotika v bezprostrednej blízkosti. Subinhibičné množstvo antibiotika dovoľuje mikroorganizmu rásť. Tento test je kvalitatívny, zisťuje iba či je izolát rezistentný alebo citlivý [31].

2.4.2. Dilučné metódy

Dilučná metóda je kvantitatívna, slúži na zistenie miery citlivosti alebo rezistencie. Je určená na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), teda najnižšej testovanej koncentrácie daného antibiotika, ktorá inhibuje viditeľný rast mikroorganizmov. Stanovenie hodnoty MIC je dôležité pre určenie terapeutickej dávky antimikrobiálnej látky.

Medzi najpoužívanéjšie metódy patrí agarová dilučná metóda, dilučná mikrometóda a Etest [31, 33].

2.4.2.1. Agarová dilučná metóda

Agarová dilučná metóda je referenčná metóda na stanovenie citlivosti mikroorganizmov k antibakteriálnym látkam, používa sa tiež na overenie spoľahlivosti ostatných metód.

Ako živné médium sa používa agar, ktorý je obohatený o testovanú antimikrobiálnu látku. Táto látka sa potom nariedi a jednotlivé riedenia sa pridávajú k rozpustenému a vytemperovanému agaru, ktorý sa po premiešaní rozlieva do Petriho misiek tak, aby výsledná vrstva agaru bola 3-4 mm. Obyčajne sa pripravuje 12-15 koncentrácií.

Výhodou agarovej dilučnej metódy je vysoká štandardizovanosť prevedenia (referenčná metóda). Môžeme ňou vyšetriť veľký súbor kmeňov za štandardných podmienok. Využíva sa tiež k hodnoteniu účinku nových antibiotík [31].

2.4.2.2. Bujónová dilučná metóda

Pri tejto dilučnej metóde sa roztok antibiotika známeho koncentráту postupne riedi bujónom. Bujónový test sa uskutočňuje v polystyrénových mikrotitračných doštičkách s dvanástimi stĺpcami a ôsmymi radami jamiek. Vyšetří sa tak naraz 12 izolátov. Pre jedno antibiotikum sa väčšinou používa osem koncentrácií. V jamkách je pre každé antibiotikum rada rovnomerne klesajúcich koncentrácií. Každá jamka sa naočkuje baktériami a po inkubácii sa bujón v niektorých jamkách nezakalí, pretože antibiotikum inhibuje v danej koncentrácii rast baktérií. Najnižšia koncentrácia antibiotika, ktorá zabraňuje rastu baktérií je minimálna inhibičná koncentrácia [33].

2.4.2.3. Etest

Etest je moderná gradientová metóda kombinujúca princípy diskovej difúznej a agarovej dilučnej metódy. Pre vysoký stupeň zhody s výsledkami MIC získanými agarovou dilučnou metódou je Etest vhodný na stanovenie MIC u väčšiny mikroorganizmov, vrátane náročných baktérií a anaeróbov [31].

Vlastný Etest je plastový prúžok, ktorý má na spodnej strane imobilizovaný preddefinovaný koncentračný gradient daného antibiotika vo vysušenom stave. Koncentračný gradient je kalibrovaný ako odpovedajúca hodnota MIC, jedná sa o stupnicu najmenej 15-tich dvojnásobných geometrických riedení, ktoré sú umiestnené na hornej strane Etestu. Táto metóda je pre rutinné používanie pomerne nákladná, aj samotná patentovaná metóda prípravy gradientu na prúžku papiera je prácna [31,33].

2.5. Charakteristika použitých mikroorganizmov

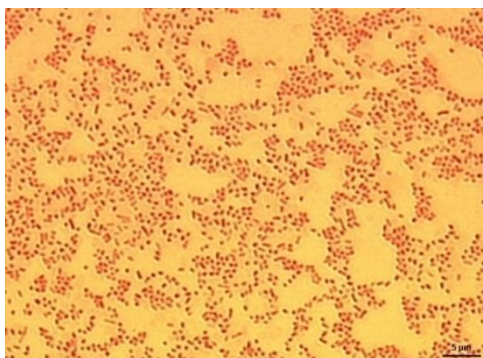
Mikroorganizmy sú jednobunkové organizmy, viditeľné iba pod mikroskopom a môžu byť rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. Majú veľmi špecifický metabolizmus, ktorý spôsobuje ich rýchly rast a rozmnožovanie. Každá mikrobiálna bunka je od vonkajšieho prostredia oddelená silnou, pevnou väčšinou neohybnou štruktúrou, ktorá sa nazýva bunková stena.

Na základe metódy Gramovho farbenia rozlišujeme dva typy baktérií – grampozitívne baktérie, ktoré pri tomto teste ne strácajú svoje modrofialové farbivo, pôsobením etanolu a zostávajú modré a druhé sú – gramnegatívne baktérie, ktoré sa etanolom odfarbujú, a ktoré je možné po odfarbení znova zafarbiť [35,36].

2.5.1. *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je primárnym patogénnym druhom radu *Serratia*. Tento druh môžeme zaradiť medzi gramnegatívne nefermentujúce baktérie. Nájdeme ju skôr vo vonkajšom prostredí ako v potrave. Druh *Serratia marcescens* dokáže produkovať pigment nazývaný prodigiozín, ktorého farebná škála je od tmavo červenej až po svetlo ružovú, v závislosti od veku kolónií. Tento pigment je dobre rozpustný v tukových rozpúšťadlách, ale veľmi málo až vôbec rozpustný vo vode.

Táto baktéria bola pred časom známa aj pod menom *Bacillus prodigiosus*. Mikrób spôsobuje infekcie močového systému. A taktiež predstavuje nebezpečného pôvodcu nozokomiálnych nákaz. Liečba je veľmi náročná, nakoľko je *Serratia* rezistentná na väčšinu antibiotík a chemoterapeutík. V oblasti potravinárstva môže spôsobiť znehodnotenie mäsa z rýb a hydiny [37,38].



Obrázok 9: Farbenie podľa Grama – *Serratia marcescens*[39]

2.5.2. *Micrococcus luteus*

Micrococcus je prísne aeróbnny druh, ktorý tvorí nepravidelné zhľuky buniek, rastúce v prítomnosti 5% NaCl. Niektoré druhy *Micrococcus* produkujú farbivo. *M. luteus* vytvára žltý karotenoidný pigment, ktorý chráni bunky pred letálnymi účinkami ultrafialovej zložky slnečného svetla. Vyskytuje sa ako častá vzdušná kontaminácia. Baktérie rodu *Micrococcus* sú výhradne saprofytické mikroorganizmy vyskytujúce sa aj na povrchu potravinárskych výrobkov a surovín. Je to baktéria, ktorá je takmer prítomná všade. Môžeme ju nájsť vo vzduchu, v pôde aj na ľudskej koži [38,40].

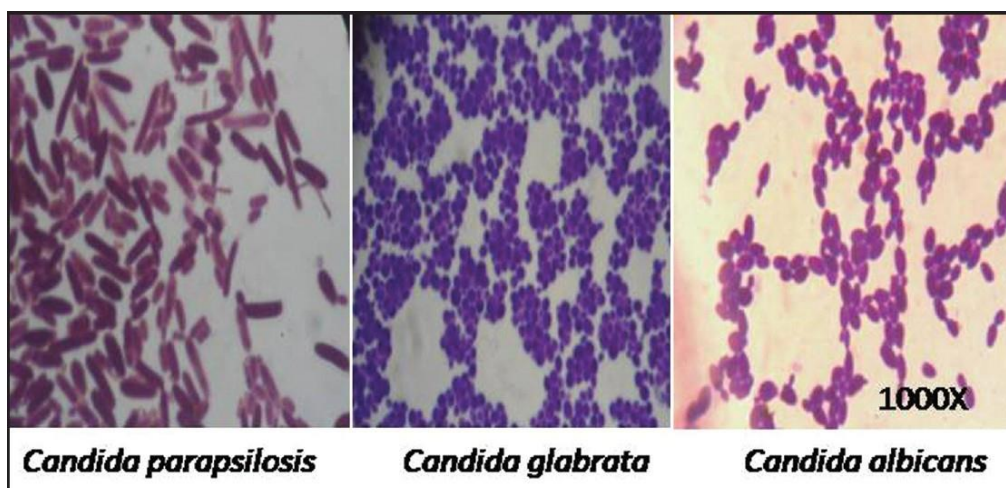


Obrázok 10: Farbenie podľa Grama – *Micrococcus luteus*[39]

2.5.3. *Candida glabrata*

Candida glabrata patrí medzi 8 druhov rodu *Candida* spôsobujúcich ochorenia človeka. Rod *Candida* sa vyznačuje tvorením oválnych blastospór o veľkosti 4–6 μm typického kvasinkového vzhľadu s pučiacimi novými bunkami. Pokiaľ sa vypučená bunka neoddelí, preťahuje sa do dĺžky a vzniká pseudomycélium alebo pseudohýfa, ktorá môže byť dlhá niekoľko desiatok mikrometrov. Kvasinky rodu *Candida* sú prítomné u zdravého človeka normálne v ústnej dutine a v stolici. Preto je infekcia najčastejšie endogénna [33].

Candida glabrata je druhým najčastejším pôvodcom kandidózy u ľudí po *Candida albicans*. Donedávna bola táto kvasinka považovaná za relatívne nepatogénny komenzálny organizmus tkanív ľudských slizníc. Avšak v dôsledku zvýšeného používania imunosupresívnych látok, sa zvýšili slizničné infekcie spôsobené touto kvasinkou. Od ostatných druhov sa odlišuje tým, že nie je dimorfná, teda vyznačuje sa svojou blastokonidickou morfológiou a haploidným genómom. Je vnútorne rezistentná na flukonazol, triazolový fungicíd ktorý sa často používa na kontrolu infekcií spôsobených rodom *Candida* [41].



Obrázok 11: Gramovo farbenie rôznych druhov *Candida*[42]

3 CIELE PRÁCE

1. Literárna rešerš zameraná na prehľad aktívnych látok s antioxidačným a antimikrobiálnym účinkom prítomných v rôznych typoch bežných a vzácných drevín
2. Optimalizácia metód stanovenia aktívnych látok, antioxidačnej a antimikrobiálnej aktivity
3. Analýza a charakterizácia aktívnych látok z vybraných typoch drevín a porovnanie ich účinkov
4. Vyhodnotenie výsledkov a diskusia

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použité chemikálie

4.1.1. Chemikálie použité na prípravu extraktov

- Metanol – p.a., Lach-Ner s.r.o , (ČR)
- Etanol – p.a., Lach-Ner s.r.o, (ČR)
- Dimetylsulfoxid – p.a., Lach-Ner, s.r.o (ČR)

4.1.2. Chemikálie použité na stanovenie polyfenolov

- Folin-Ciocalteu činidlo – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Uhličitan sodný – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina gallová – Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.1.3. Chemikálie použité na stanovenie flavonoidov

- Dusitan sodný – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Chlorid hlinitý – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Hydroxid sodný – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Katechín – Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.1.4. Chemikálie použité na stanovenie antioxidačnej aktivity

- ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina]) – Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Peroxodisíran draselný – Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Trolox – Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Etanol – p.a., Lach-Ner s.r.o, (ČR)

4.1.5. Chemikálie použité na stanovenie trieslovín

- Kyselina octová – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Chlorid sodný – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Albumín zo slepačieho vaječného bielka – Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Trietanolamín – Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Dodecylsulfát sodný – Sigma-Aldrich (Nemecko)
- Chlorid železitý – p.a., Lach-Ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina chlorovodíková – p.a., Lach.Ner, s.r.o. (ČR)
- Kyselina tanínová – Sigma-Aldrich (Nemecko)

4.1.6. Chemikálie použité na kultiváciu mikroorganizmov

- Glukóza – p.a., Lach-Ner s.r.o, (ČR)
- Peptón – HiMedia, (India)
- Kvasničný autokatalyzát – HiMedia, (India)
- Agar – HiMedia, (India)

- Nutrient Broth w/1% Pepton – HiMedia, (India)

4.2. Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boecco, (Nemecko)
- Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)
- Spektrofotometer – Helios γ Unicam (V. Británie)
- Vysokorychlostná centrifúga Boecco U-32R, Hettich Zentrifugen (Nemecko)
- Laminárny box Aura mini, BioAir
- Temperovaná trepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (ČR)
- ELISA Reader BioTek ELx808, BioTek, (Nemecko)

4.3. Použité přírodní materiály

- Breza – kôra rezaná, Yzop LTD, Česká republika, 100 g
- Dubová kôra (*Cortex quercus*), Rosa Canina, Česká republika, 50 g
- Vřbová kôra (*Cortex salicis*), Rosa Canina, Česká republika, 50 g



Obrázok 12: Použité prírodné materiály



Obrázok 13: Vzorky vybraných druhov kôr

4.4. Použité mikroorganizmy

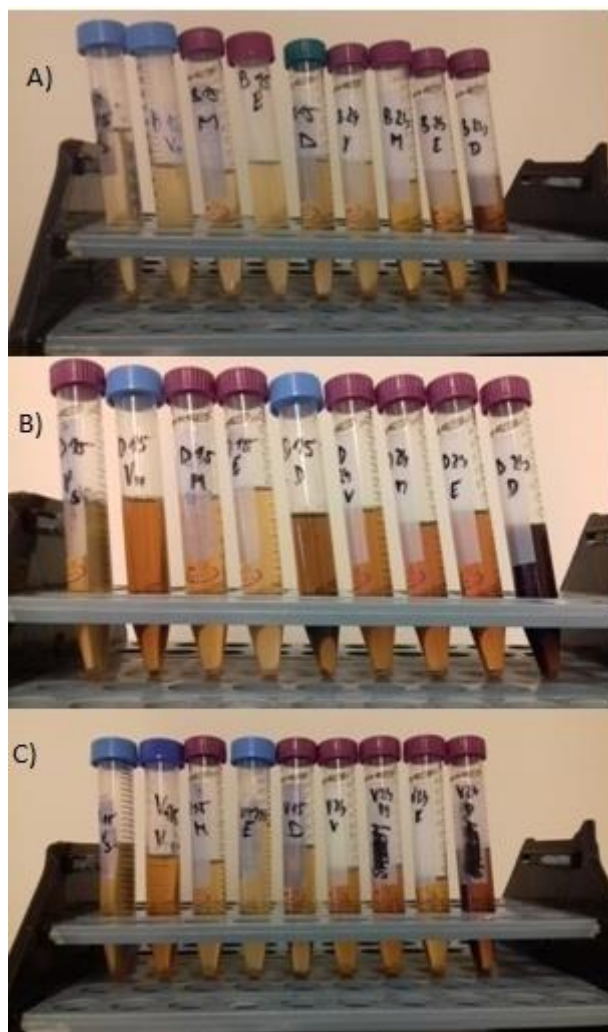
V experimentálnej časti práce sme používali na zisťovanie antimikrobiálnej aktivity bakteriálne kultúry *Micrococcus luteus* CCM 1569 a *Serratia marcescens* CCM 8587 a taktiež kvasinku *Candida glabrata* CCM 8270, ktoré pochádzali z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

4.5. Metódy pre stanovenie antioxidačne aktívnych látok

V úvodnej časti experimentálnej práce sme sa zamerali na všeobecnú charakteristiku prírodných látok vo vybraných vzorkách stromovej kôry. Stanovovali sme koncentráciu celkových polyfenolov, flavonoidov, antioxidačnej aktivity a na záver aj trieslovín. Všeobecnú charakteristiku sme vykonávali spektrofotometrickou metódou. Najprv bolo nutné zostrojiť kalibračné krivky, ktoré popisujú závislosť meranej absorbancie pri istej vlnovej dĺžke roztokov so známou koncentráciou stanovovanej zložky. Oproti ktorým sme následne prepočítavali zmerané hodnoty jednotlivých roztokov na uniformné obsahy stanovovaných látok.

4.5.1. Príprava extraktov z kôry

Pre všeobecnú charakteristiku, bolo nutné si najprv pripraviť extrakty. Na prípravu prírodných extraktov sme navážili 1 g kôry, ktorý sme zaliali 15 ml rozpúšťadla. Ako rozpúšťadlo sme zvolili vodu pri teplote 20 °C a 100 °C, metanol, etanol a DMSO. Okrem vplyvu teploty na výťažok z extrakcie, ktorý sme pozorovali pri vodných extraktoch, sme sa zamerali aj na čas. Všetky vzorky sa lúhovali po dobu 15 min a 24 h.



Obrázok 14: Vzorky vybraných druhov kôr v rôznych rozpúšťadlách, obr. A – extrakty z brezovej kôry, obr. B – extrakty z dubovej kôry, obr. C – extrakty z vrbovej kôry

4.5.2. Spektrofotometrické stanovenie polyfenolov

Kalibračným roztokom pri stanovení celkových polyfenolov je kyselina gallová. Z jej roztoku o koncentrácií 1 mg/ml sme pripravili sedem kalibračných roztokov s koncentráciou 0,1 – 0,7 mg/ml. Z každého z týchto roztokov sme do pripravených skúmaviek odpipetovali 50 μ l. K nim sme pridali 1 ml 10x zriedeného Folin-Ciocalteuovho činidla a 1 ml destilovanej vody. Následne sme skúmavky premiešali na zariadení Vortex a ponechali sme ich v pokoji stáť 5 min pri laboratórnej teplote. Po uplynutí 5 min sme napipetovali do skúmaviek 1,5 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného a znova premiešali. Po 15 min sme zmerali absorbanciu našich roztokov pri $\lambda = 750$ nm. Ako blank sme použili destilovanú vodu. Pri vlastnom stanovení sme použili miesto kalibračného roztoku 50 μ l vzorky extraktu.

4.5.3. Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov

Kalibračným roztokom pri stanovení flavonoidov je katechín. Rozpúšťame ho v etanole. Z jeho roztoku o koncentrácií 1 mg/ml bolo pripravených šesť kalibračných roztokov, ktorých

koncentrácie boli v rozmedzí 0,05 – 0,3 mg/ml. Z každého z týchto pripravených roztokov sme do skúmaviek odpipetovali 0,5 ml a následne pridali 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5 % roztoku dusitanu sodného. Roztok sme premiešali pomocou zariadenia Vortex a nechali stáť pri laboratórnej teplote. Po 5 min sme pridali 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého a znova premiešali. Následne opäť po 5 minútach sme k roztoku pridali 1,5 ml 1 M roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilovanej vody. Roztok sme premiešali a nechali stáť. Po 15 min sme merali absorbanciu pripravených roztokov pri $\lambda = 510$ nm. Ako blank sme použili rovnako pripravený roztok, kde sme miesto vzorky použili destilovanú vodu. Pri vlastnom stanovení sme použili miesto kalibračného roztoku 0,5 ml vzorky extraktu.

4.5.4. Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou ABTS

V prvom rade bol pripravený roztok ABTS, ktorý bol v destilovanej vode rozpustený na koncentráciu 7 mmol/l. K nemu bol pridaný peroxodisíran draselný o koncentrácii 2,45 mmol/l. Reakciou oboch látok sme získali radikálový kation ABTS^{•+}. Roztok bol ponechaný v tme pri laboratórnej teplote minimálne 12 hodín. Pred meraním bolo nutné roztok zriediť UV-VIS etanolom na absorbanciu $A = 0,700 \pm 0,020$ pri $\lambda = 734$ nm. Blankom je UV-VIS etanol. Následne sme stanovili východiskovú absorbanciu roztoku A_0 a to tak, že do zúženej kyvety bolo napipetované 1 ml zriedeného ABTS^{•+} a 10 μ l vzorky.

4.5.5. Spektrofotometrické stanovenie trieslovín

Najprv sme si pripravili tlmivý roztok (pufer), obsahujúci 0,20 M ľadovej kyseliny octovej a 0,17 M chloridu sodného. pH roztoku bolo upravené na hodnotu 4,9. Ďalším pripraveným činidlom bol ALB (albumín zo slepačieho vaječného bielka) o koncentracii 1 mg/ml, rozpustený v tlmivom roztoku. Do centrifugačných skúmaviek boli napipetované 2 ml ALB. Ku nemu sme pridali 1 ml vzorky. V tomto prípade šlo o 50 % metanolvé extrakty. Roztok bol ponechaný 24 hodín v chladničke pri teplote 4 °C. Po uplynutí tejto doby boli vzorky scentrifugované. Supernatant sme vyliali. V skúmavkách nám zostal pevný podiel, ktorý sme rozpustili v 4 ml SDS/TEA, následne pridali 1 ml chloridu železitého. Roztok sme premiešali na zariadení Vortex a roztok nechali stáť 15 minút pri laboratórnej teplote. Po uplynutí tejto doby sme zmerali absorbanciu pripravených roztokov pri $\lambda = 510$ nm. Ako blank sme použili chlorid železitý v SDS/TEA.

4.6. Antimikrobiálne testy

Na testovanie pripravených extraktov z hľadiska antimikrobiálnej aktivity, sme vybrali po jednom zástupcovi z grampozitívnych baktérií – *Micrococcus luteus*, z gramnegatívnych baktérií – *Serratia marcescens* a z kvasiniek – *Candida glabrata*.

4.6.1. Kultivácia mikroorganizmov

Tekuté živné médium pre kultiváciu bakteriálnych druhov bolo pripravené zmiešaním Nutrient Broth média s destilovanou vodou na koncentráciu 25 g/l. V prípade pevného média, bol pridaný agar o koncentrácii 20 g/l. Pre kultiváciu kvasinky sme pripravili tekuté médium nasledovne. Ku 1 g kvasničného autokatalyzátu sme pridali 2 g glukózy a 2 g peptónu.

Pri príprave pevného média boli pridané 2 g agaru. Uvedené množstvá boli zmiešané v 100 ml destilovanej vody. Následne sme pripravené médiá sterilizovali po dobu 1 hodiny v tlakovom hrnci pri otvorenom ventile.

Do tekutého média sme preočkovali kultúru mikroorganizmov. Zaočkované médium bolo uložené v trepačke po dobu 24 hodín. Kultúry boli medzičasom udržiavané v chlade pri teplote 4 °C v Petriho miskách vo forme krížového rozteru.



Obrázok 15: Kultúry mikroorganizmov vo forme krížového rozteru

4.6.2. Agarová difúzna metóda

Do vopred pripravených Petriho misiek so stuhnutým médiom sme napipetovali a zároveň po celom povrchu rozotreli 100 µl kultúry z pripraveného zaočkovaného tekutého média. Po zaschnutí sme pomocou špičky na pipetu rovnomerne vykrojili po 5 jamiek na 1 misku. Do jamiek bolo napipetované 50 µl vzorky. Petriho misky sme dali na trepačku. Po 24 hodinách sme sledovali vytvorenie inhibičných zón v okolí jamiek, ktoré sme odmerali a porovnali oproti blanku.

4.6.3. Bujónová dilučná metóda

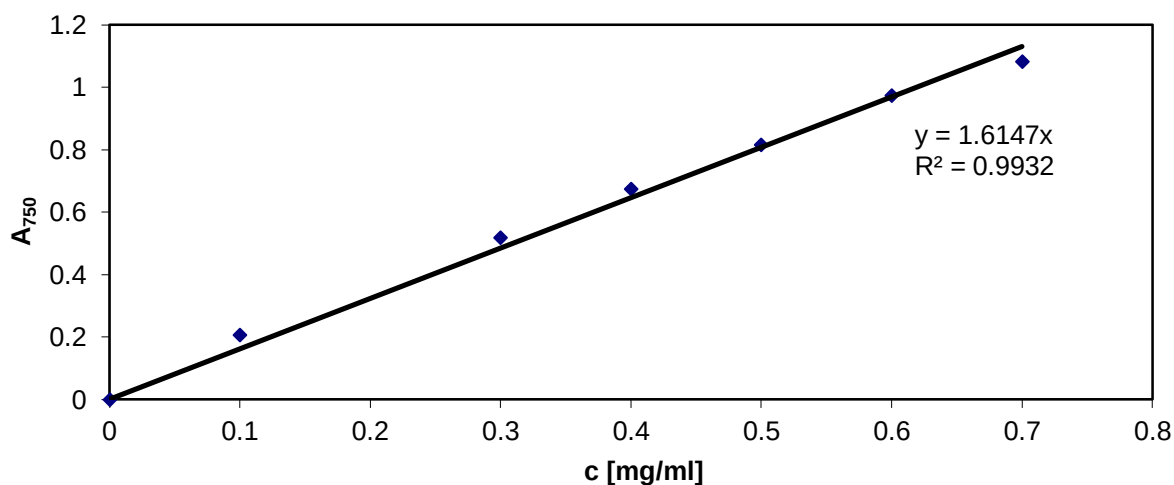
Pri tejto metóde sme najprv napipetovali 50 µl vzorky do jamiek na mikrotitračnej doštičke. Ku nim sme pridali 150 µl bunkovej suspenzie. Po dokončení sme doštičku zobrali na zariadenie Elisa reader, pomocou ktorého boli zaznamenané hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke $\lambda = 650 \text{ nm}$ v čase 0. Po 24 hodinách, kedy bola mikrodostička uložená na trepačke, sme získali z Elisa reader nové dáta. Rozdiel týchto hodnôt predstavoval rast.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1. Spektrofotometrické stanovenie polyfenolov

Množstvo polyfenolov v našich vzorkách sme stanovovali podľa postupu v bode 4.5.2. Ich koncentrácia bola 1 g/15 ml destilovanej vody, metanolu, etanolu, DMSO. Absorbanciu sme zmerali vždy trikrát a z ich priemerov sme pomocou rovnice kalibračnej krivky určili výslednú koncentráciu. Nakoniec sme ju prepočítali na množstvo polyfenolov na 1 g vzorky.

K vyhodnotenie konečných výsledkov bol použitý program MS Excel.



Graf 1: Kalibračná krivka pre stanovenie polyfenolov – kyselina gallová

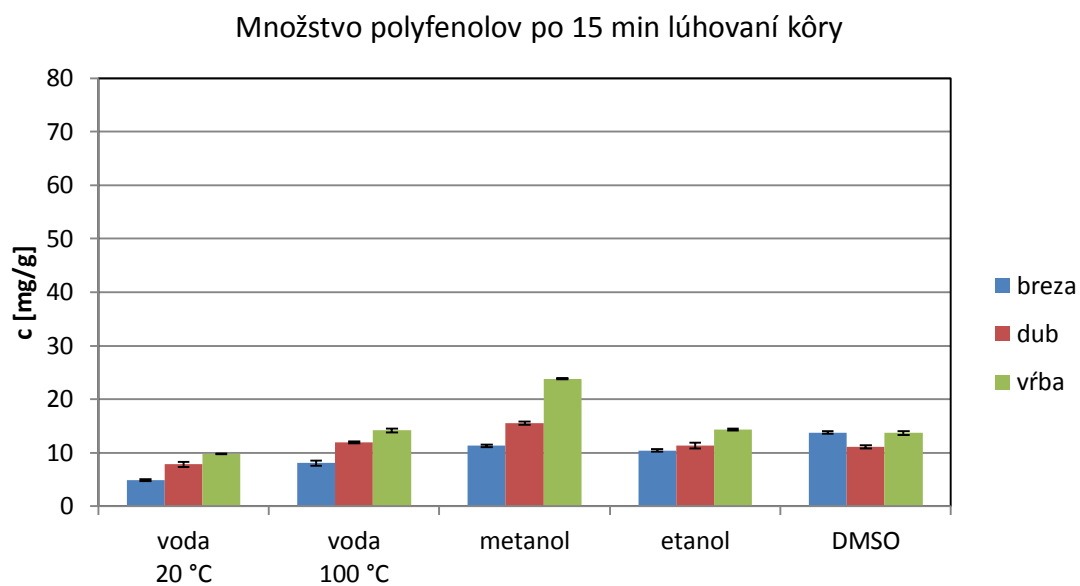
Na namerané údaje sa môžeme pozrieť z viacerých hľadísk. Jedným z nich je, ako vplýval odlišný čas lúhovania na konečný obsah polyfenolov vo vzorkách. Ak porovnáme grafy 2 a 3, tak je zjavné, že po 24 hodinovom lúhovaní vzoriek sa uvoľnilo z rastlinnej matrice vždy väčšie množstvo polyfenolov ako po 15 minútach extrakcie.

Pri vodných extraktoch sme sa zamerali na vplyv teploty rozpúšťadla na priebeh extrakcie. Jednoznačne môžeme povedať, že vyššia teplota u vodných extraktov má vplyv na vyextrahovanie väčšieho množstva polyfenolov. Tento fakt potvrdzuje graf 2.

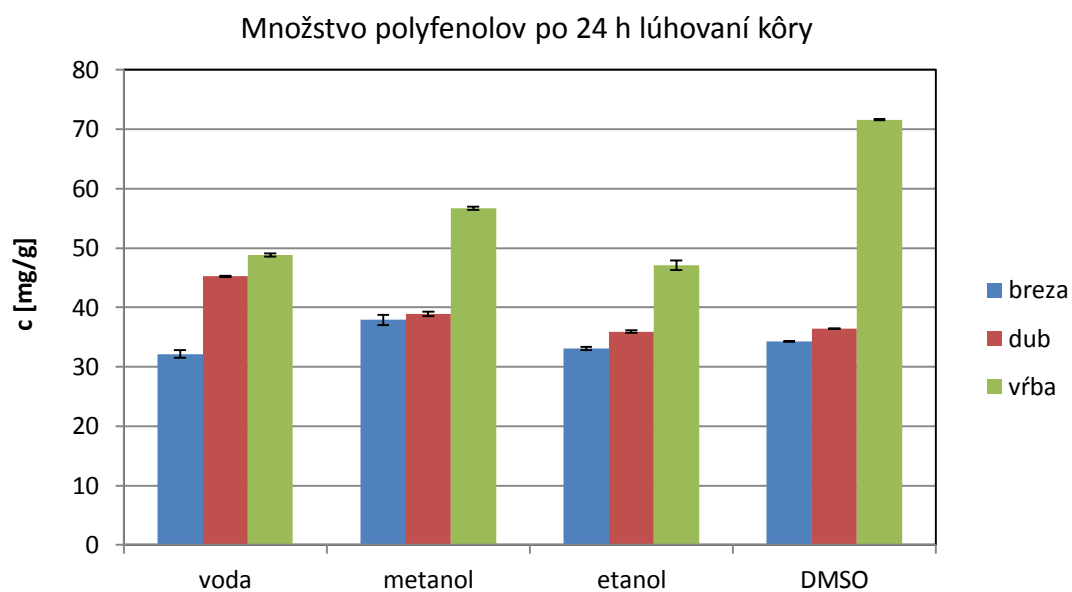
Podľa grafu 2, ktorý zobrazuje obsah polyfenolov v 15-minútových extraktoch, sa najnižší obsah polyfenolov nachádzal vo vodnom extrakte brezovej kôry – 4,86 mg/g. Najvyšší obsah bol zase zistený v metanолоvom extrakte z kôry vrbu – 23,83 mg/g.

V grafe 3 sú zobrazené obsahy polyfenolov v 24-hodinových extraktoch. Najnižšie množstvo polyfenolov bolo opäť vo vodnom extrakte z brezy – 32,16 mg/g. Naopak najlepšie sa ukázala vzorka vrbovej kôry v DMSO, ktorá obsahovala až 71,60 mg/g.

Z uvedených výsledkov môžeme vo všeobecnosti tvrdiť, že najviac polyfenolov sa nachádza vo vrbovej kôre. Ak sa pozrieme na vplyv rozpúšťadla, tak zistíme, že najviac polyfenolov sa nachádzalo v metanолоvých extraktoch. Hodnoty sú veľmi podobné. Avšak zaujímavosťou je, že pri 24 hodinovom lúhovaní dubovej kôry – sa najlepšie javí vodný extrakt.



Graf 2: Množstvo polyfenolov po 15 min lúhovaní kôry v uvedených rozpúšťadlách



Graf 3: Množstvo polyfenolov po 24 h lúhovaní kôry v uvedených rozpúšťadlách

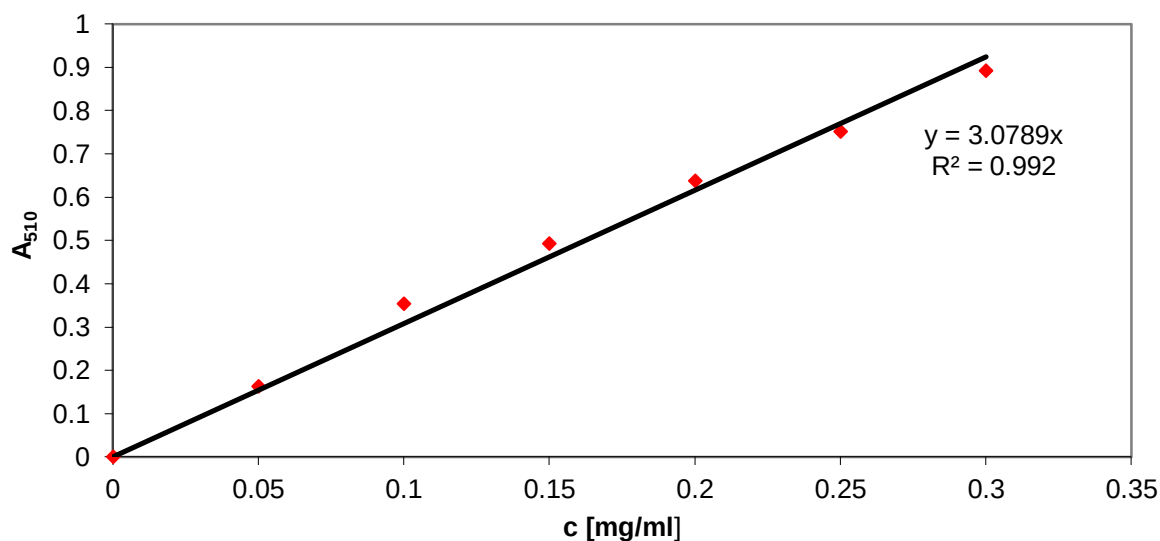
Tabuľka 1: Obsah polyfenolov v extraktoch z kôry uvedený v mg na g suchej hmotnosti vzorky

Extrakt z kôry	Čas lúhovania	Voda 20 °C	Voda 100 °C	Metanol 20 °C	Etanol 20 °C	DMSO 20 °C
		c [mg/g]				
Breza	15 min	4,86 ± 0,17	8,09 ± 0,48	11,30 ± 0,19	10,45 ± 0,27	13,80 ± 0,30
	24 h	32,16 ± 0,62		37,88 ± 0,83	33,11 ± 0,25	34,31 ± 0,06
Dub	15 min	7,83 ± 0,44	11,93 ± 0,17	15,53 ± 0,27	11,34 ± 0,54	11,14 ± 0,29
	24 h	45,22 ± 0,07		38,91 ± 0,42	35,91 ± 0,24	36,41 ± 0,06
Vrba	15 min	9,79 ± 0,08	14,18 ± 0,36	23,83 ± 0,13	14,36 ± 0,18	13,72 ± 0,35
	24 h	48,79 ± 0,28		56,68 ± 0,25	47,08 ± 0,79	71,60 ± 0,12

5.2. Spektrofotometrické stanovenie flavonoidov

Množstvo flavonoidov nachádzajúcich sa v kôre vybraných drevín sme stanovovali podľa postupu v bode 4.5.3. Koncentrácia vzoriek bola 1 g/15 ml destilovanej vody, metanolu, etanolu, DMSO. Absorbanciu sme zmerali vždy trikrát a z ich priemerov sme pomocou rovnice z kalibračnej krivky určili výslednú koncentráciu. Nakoniec sme ju prepočítali na množstvo flavonoidov na 1 g vzorky.

K vyhodnotenie konečných výsledkov bol použitý program MS Excel.



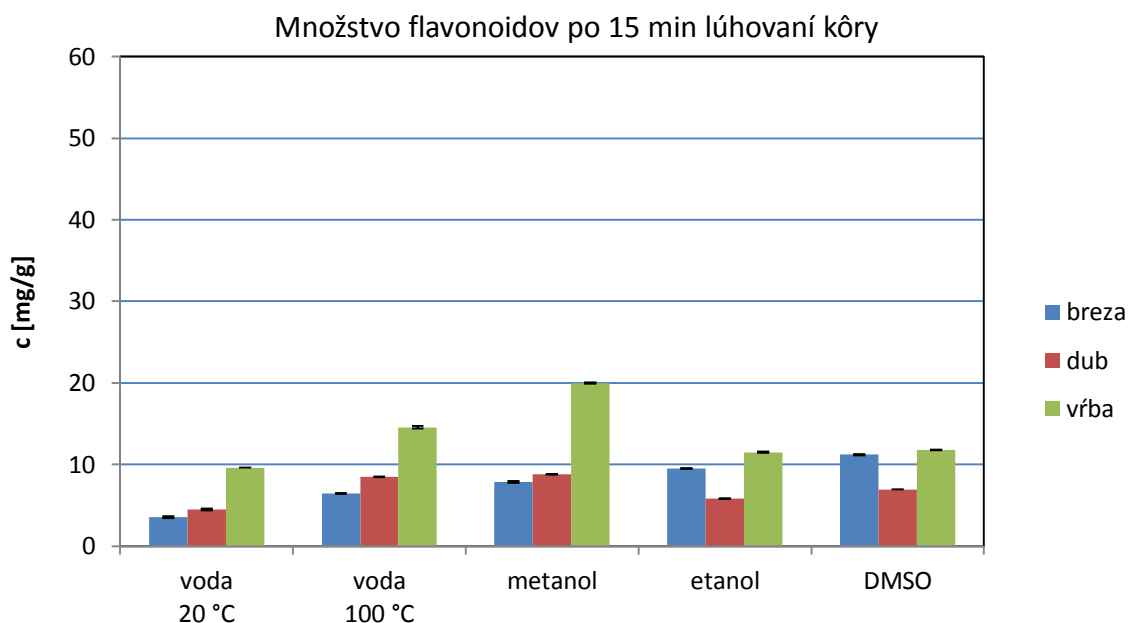
Graf 4: Kalibračná krivka pre stanovenie flavonoidov – katechín

Keď porovnáme grafy 5 a 6 je zjavné, že väčšie množstvo flavonoidov sa uvoľnilo po 24 hodinách lúhovania kôry vo všetkých rozpúšťadlách. Takisto môžeme tvrdiť, že vriaca voda má lepší vplyv na extrahovanie látok, než voda pri teplote 20 °C.

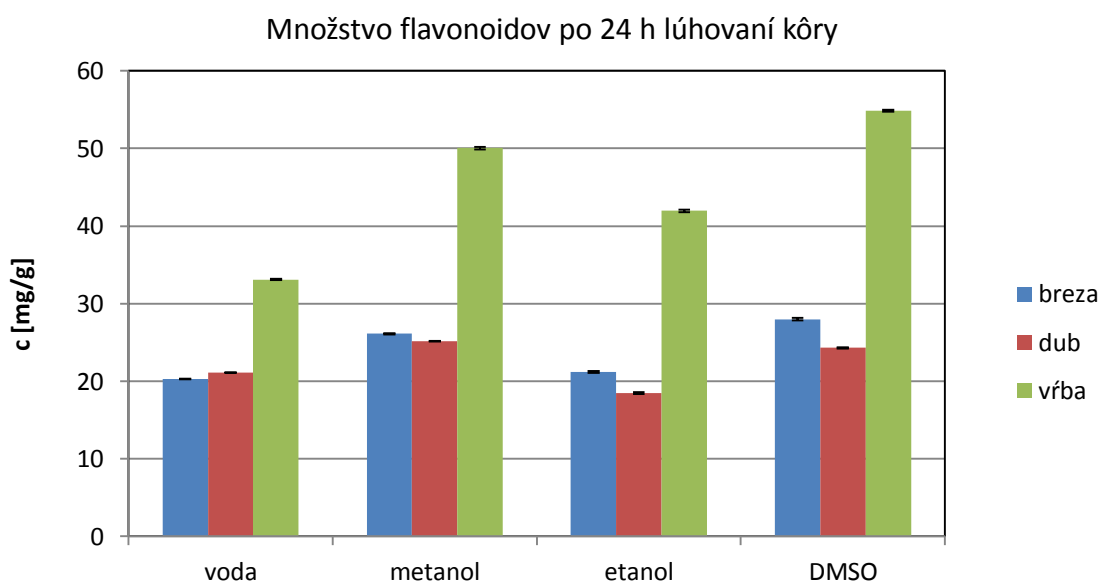
Graf 5 zobrazuje koncentráciu flavonoidov po 15 min lúhovaní. Najnižší obsah flavonoidov bol nameraný vo vodnom extrakte brezovej kôry – 3,53 mg/g. Najvyšší obsah bol v metanолоvom extrakte vrbovej kôry – 19,99 mg/g .

Graf 6 hovorí o množstve flavonoidov vyextrahovaných po 24 hodinách. Najnižšie množstvo flavonoidov sa vyskytovalo v etanolovom extrakte dubovej kôry, a to 18,48 mg/g. Na druhej strane, najväčší podiel flavonoidov bol nameraný v DMSO extrakte vrbovej kôry 54,87 mg/g.

Najviac flavonoidov obsahovala vrbová kôra a z hľadiska rozpúšťadiel sa najlepšie javili metanolové a DMSO extrakty.



Graf 5: Množstvo flavonoidov po 15 min lúhovaní kôry v uvedených rozpúšťadlách



Graf 6: Množstvo flavonoidov po 24 h lúhovaní kôry v uvedených rozpúšťadlách

Tabuľka 2: Obsah flavonoidov v extraktoch z kôry uvedený v mg na g suchej hmotnosti vzorky

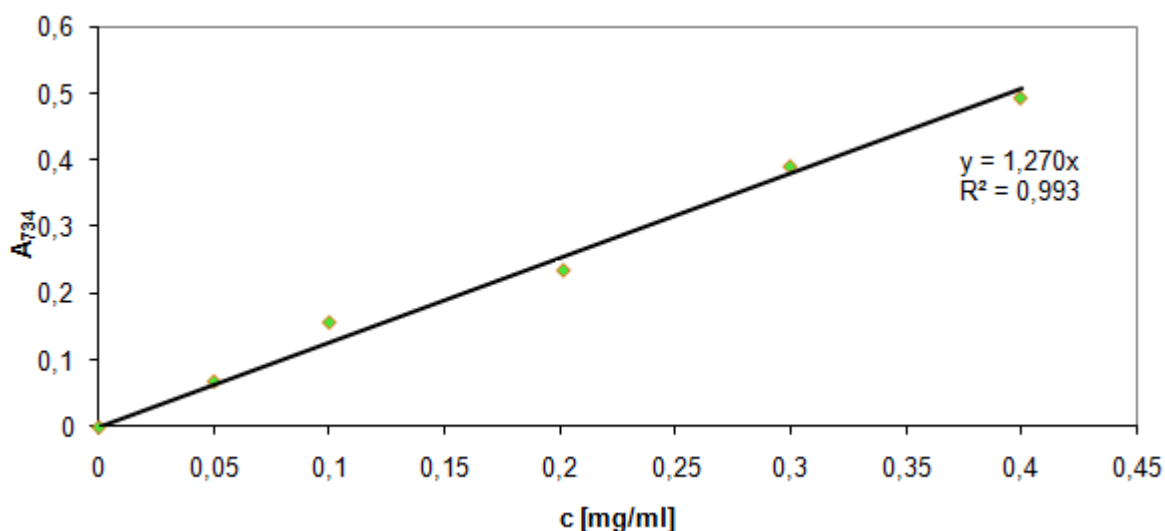
Extrakt z kôry	Čas lúhovania	Voda 20 °C	Voda 100 °C	Metanol 20 °C	Etanol 20 °C	DMSO 20 °C
		c [mg/g]				
Breza	15 min	3,53 ± 0,12	6,44 ± 0,04	7,88 ± 0,14	9,51 ± 0,06	11,21 ± 0,05
	24 h	20,29 ± 0,05		26,13 ± 0,09	21,19 ± 0,10	27,98 ± 0,16
Dub	15 min	4,51 ± 0,10	8,51 ± 0,06	8,83 ± 0,04	5,82 ± 0,06	6,96 ± 0,01
	24 h	21,13 ± 0,06		25,15 ± 0,04	18,49 ± 0,11	24,31 ± 0,10
Vrba	15 min	9,63 ± 0,01	14,57 ± 0,13	19,99 ± 0,06	11,52 ± 0,10	11,83 ± 0,04
	24 h	33,10 ± 0,06		50,03 ± 0,16	41,96 ± 0,18	54,87 ± 0,12

5.3. Spektrofotometrické stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačnú aktivitu sme merali podľa postupu v kapitole 4.5.3. Koncentrácia vzoriek bola 1 g/15 ml destilovanej vody, metanolu, etanolu, DMSO. Absorbanciu sme zmerali vždy trikrát a z ich priemerov sme pomocou rovnice kalibračnej krivky určili výslednú koncentráciu.

Trolox je látka, ktorá sa používa pre štandardizáciu merania sily antioxidantov, antioxidačná kapacita je potom ekvivalentom antioxidačnej sily Troloxu (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

K vyhodnotenie konečných výsledkov bol použitý program MS Excel.



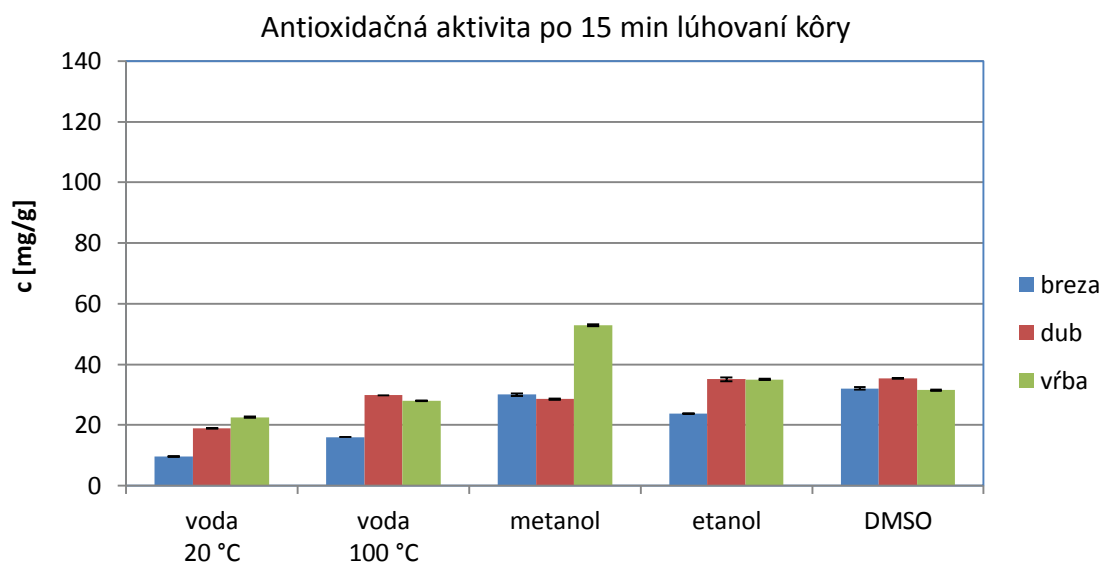
Graf 7: Kalibračná krivka pre stanovenie antioxidačnej aktivity – Trolox

Rovnako ako pri stanovení polyfenolov a flavonoidov, takisto aj pri stanovení antioxidačnej aktivity sa potvrdil fakt, že s dlhšou dobou lúhovania, rastie vyextrahované množstvo látok. So zvýšenou teplotou sa zvyšuje aj antioxidačná aktivita

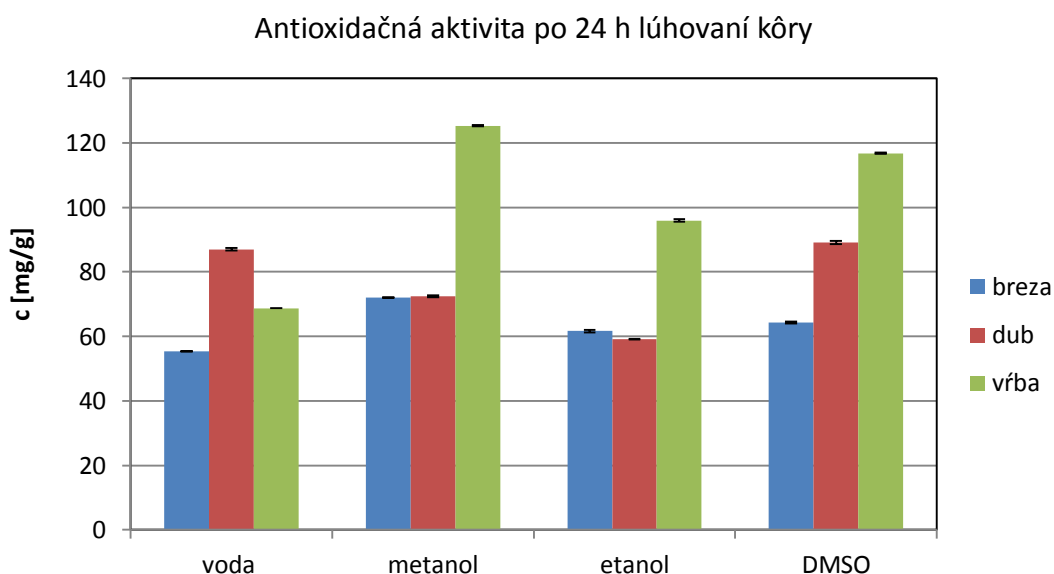
Graf 8 zobrazuje antioxidačnú aktivitu kôry po 15 min lúhovania. Najnižšia aktivita bola nameraná vo vodnom extrakte brezovej kôry – 9,60 mg/g. Najväčšou antioxidačnou aktivitou disponoval metanolový extrakt vŕbovej kôry – 52,86 mg/g.

V grafe 9 je zobrazená antioxidačná aktivita kôry po 24 h lúhovania. Vzorky sa správali ekvivalentne ako pri 15 min výluhu. Najnižší podiel sa prejavil vo vodnom extrakte brezovej kôry, 55,44 mg/g. Najväčšia antioxidačná aktivita sa nachádzala v metanolovom extrakte vŕbovej kôry – 125,33 mg/g.

Z nameraných údajov môžeme dospieť k záveru, že najväčšou antioxidačnou aktivitou sa prezentovala vŕbová kôra. A z hľadiska vplyvu rozpúšťadiel sa najlepšie javili metanolové extrakty.



Graf 8: Antioxidačná aktivita po 15 min lúhovaní kôry v uvedených rozpúšťadlách



Graf 9: Antioxidačná aktivita po 24 h lúhovaní kôry v uvedených rozpúšťadlách

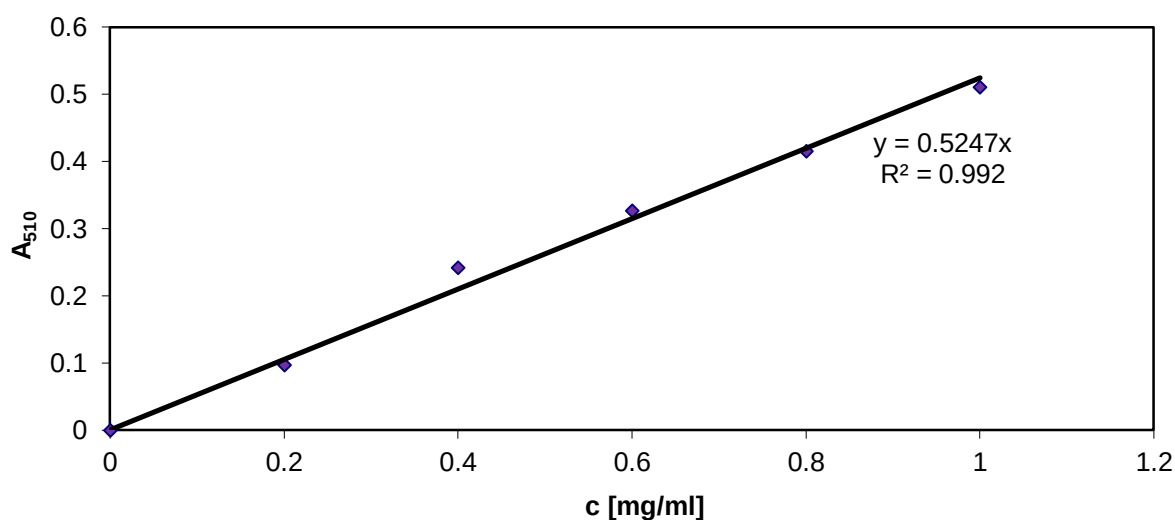
Tabuľka 3: *Antioxidačná aktivita v extraktoch z kôry uvedená v mg na g suchej hmotnosti vzorky*

Extrakt z kôry	Čas lúhovania	Voda 20 °C	Voda 100 °C	Metanol 20 °C	Etanol 20 °C	DMSO 20 °C
		c [mg/g]				
Breza	15 min	9,60 ± 0,14	16,07 ± 0,09	30,10 ± 0,42	23,77 ± 0,15	32,08 ± 0,41
	24 h	55,44 ± 0,11		72,08 ± 0,12	61,93 ± 0,41	64,35 ± 0,32
Dub	15 min	18,89 ± 0,11	29,79 ± 0,07	28,56 ± 0,20	35,14 ± 0,65	35,36 ± 0,13
	24 h	87,02 ± 0,44		72,50 ± 0,26	59,10 ± 0,09	89,09 ± 0,51
Vrba	15 min	22,55 ± 0,18	28,06 ± 0,12	52,86 ± 0,26	35,03 ± 0,20	31,52 ± 0,16
	24 h	68,76 ± 0,05		125,33 ± 0,15	95,94 ± 0,38	116,81 ± 0,19

5.4. Spektrofotometrické stanovenie trieslovín

Množstvo trieslovín nachádzajúcich sa v kôre vybraných drevín sme stanovovali podľa postupu v bode 4.5.5. Koncentrácia vzoriek bola 1 g/15 ml metanolu. Absorbanciu sme zmerali vždy trikrát a z ich priemerov sme pomocou rovnice kalibračnej krivky určili výslednú koncentráciu. Nakoniec sme ju prepočítali na množstvo trieslovín na 1 g vzorky.

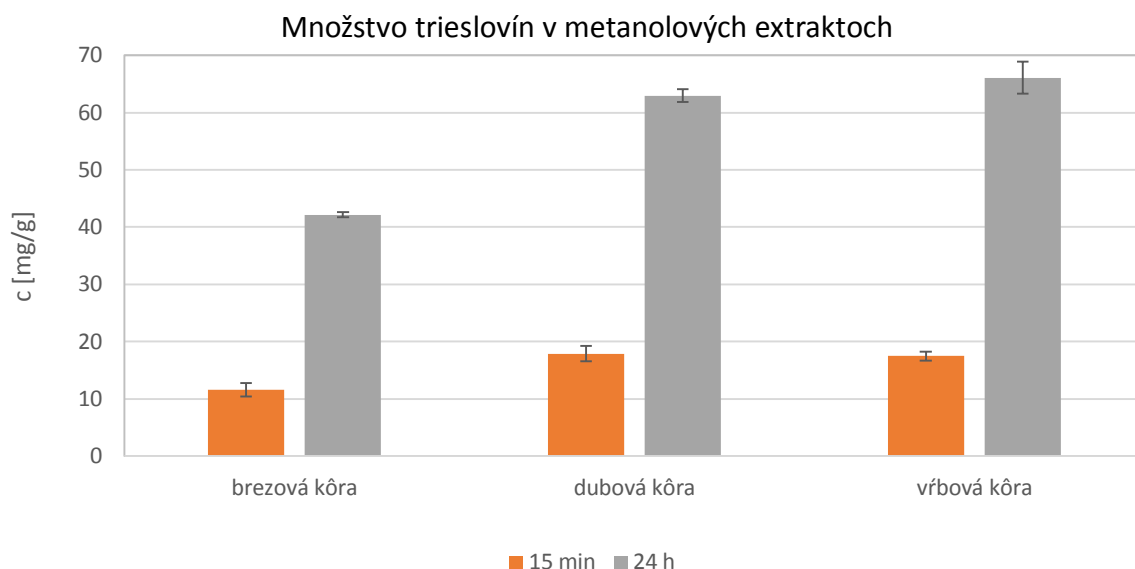
K vyhodnotenie konečných výsledkov bol použitý program MS Excel.



Graf 10: Kalibračná krivka pre stanovenie trieslovín – kyselina tanínová

Opäť sa nám potvrdilo, že dlhšia doba lúhovania vzoriek v rozpúšťadle spôsobuje väčšie množstvo uvoľnenej látky do rozpúšťadla. Tento fakt potvrdzuje graf 11. Ako môžeme vidieť pri 15-minútovom výluhu sa nachádzalo najviac trieslovín v dubovej kôre, a to 17,89 mg/g. O niečo nižšie množstvo trieslovín bolo v kôre vrbovej. Po 24 hodinách lúhovania sa najviac trieslovín prejavilo vo vrbovej kôre – 66,10 mg/g.

Z daných výsledkov vyplýva, že najmenej trieslovín obsahuje brezová kôra. Dubová a vrbová kôra obsahuje viac trieslovín. Ich hodnoty boli približne rovnaké.



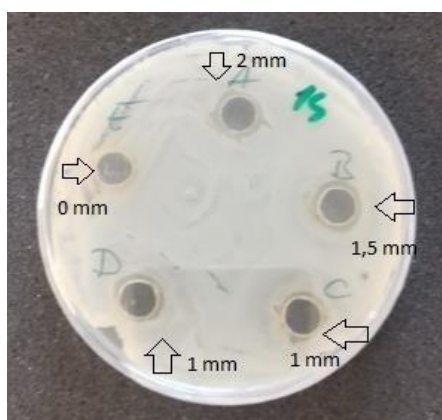
Graf 11: Množstvo trieslovín v metanolových extraktoch

Tabuľka 4: Obsah trieslovín v extraktoch z kôry uvedené v mg na g vzorky

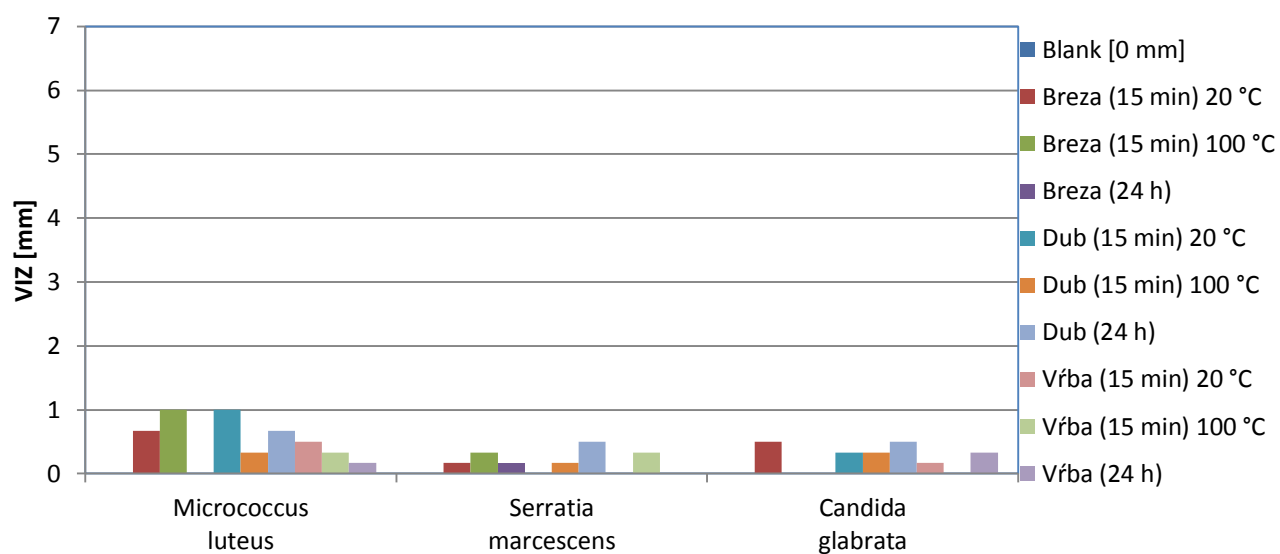
Čas lúhovania	15 min	24 h
Extrakt z kôry	c [mg/g]	
Breza	11,54 ± 1,17	42,14 ± 0,46
Dub	17,89 ± 1,30	62,92 ± 1,12
Vrba	17,49 ± 0,49	66,10 ± 2,78

5.5. Agarová difúzna metóda

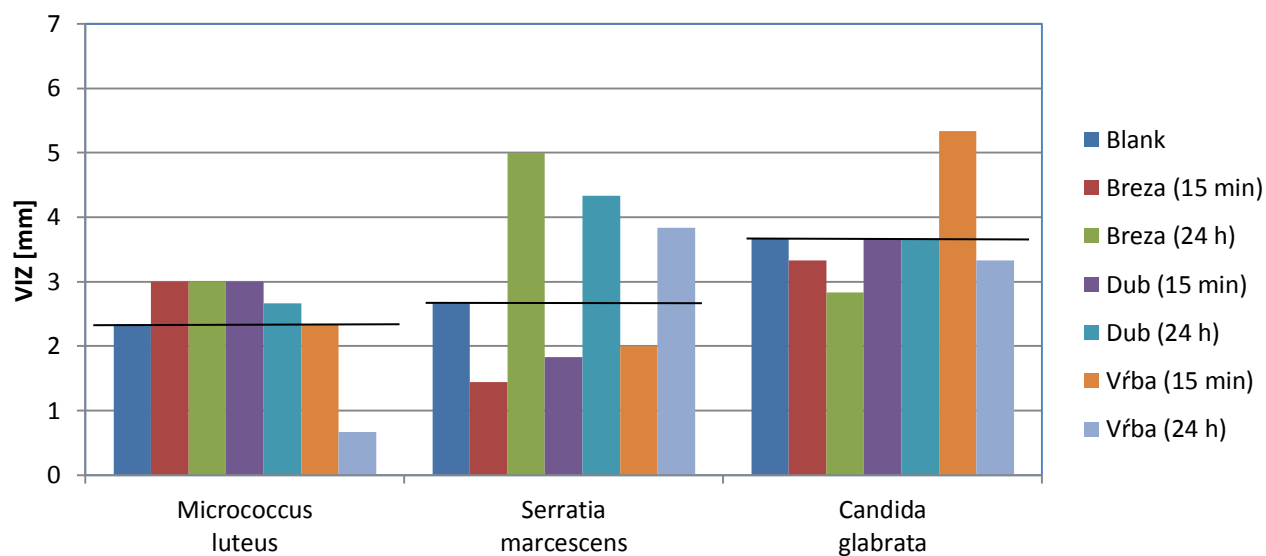
Pomocou pracovného postupu podľa bodu 4.6.2 sme urobili antimikrobiálne testy. Princípom testu je, že do pripravených jamiek sa napipetoval roztok, ktorý obsahoval antimikrobiálnu látku. Po inkubačnej dobe 24 hodín boli pozorované inhibičné zóny.



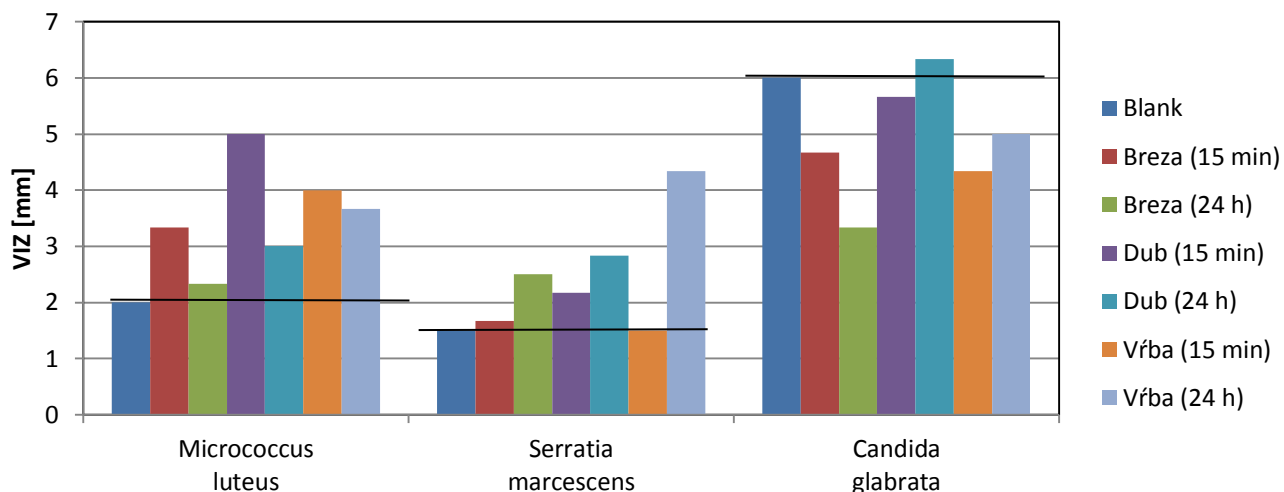
Obrázok 16: Jamkový test, inhibičné zóny A) vrba (15min) etanol, B) C) D) vrba (15min) DMSO E) vrba (24 h) voda; použitý MO: S. marcescens



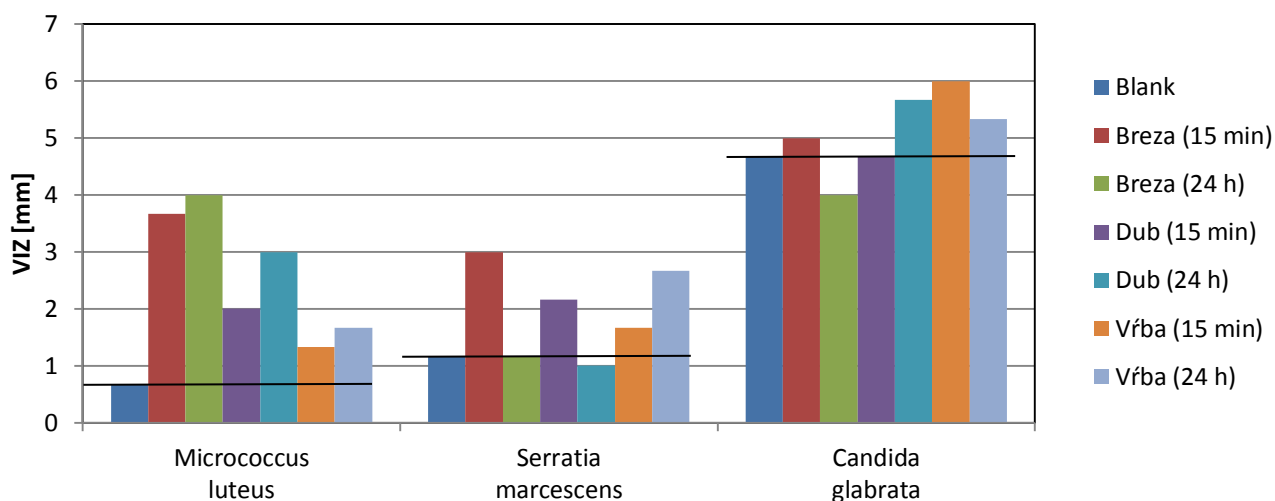
Graf 12: Veľkosť inhibičných zón vodných extraktov



Graf 13: Veľkosť inhibičných zón metanolvých extraktov



Graf 14: Veľkosť inhibičných zón etanolových extraktov

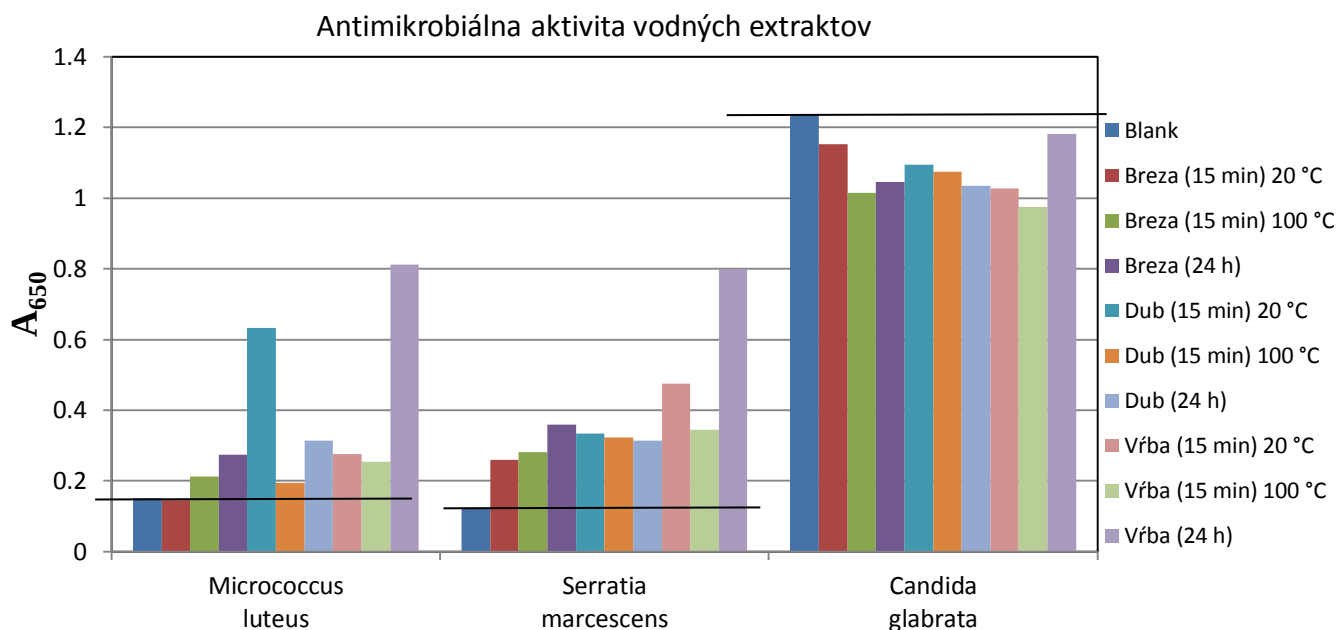


Graf 15: Veľkosť inhibičných zón DMSO extraktov

Na grafoch 12 až 15 môžeme vidieť veľkosti inhibičných zón vytvorených okolo jamiek. Na grafe 12 vidíme, že vodné extrakty nevytvárali takmer žiadne inhibičné zóny, čo môže znamenať, že v ostatných vzorkách malo vplyv na vytvorenie inhibičných zón viac samotné rozpúšťadlo než antimikrobiálna látka. Ak zoberieme do úvahy, že táto metóda je viacmenej orientačná a že inhibičné zóny sa merali veľmi nepresne, bolo by vhodné sa zamerať v budúcnosti na iné metódy určovania antimikrobiálnej aktivity.

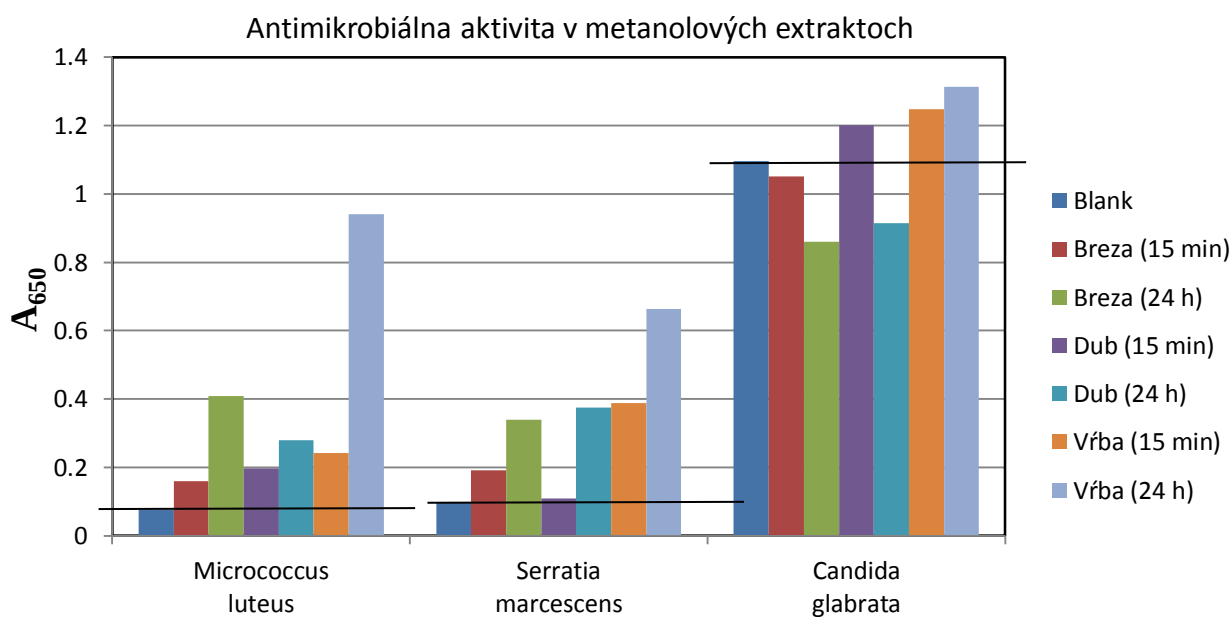
5.6. Bujónová dlučná metóda

Pri tomto teste sme určovali inhibičnú koncentráciu antimikrobiálnych látok pomocou mikrotitračných doštičiek na vybrané kmene mikroorganizmov. Postup metódy je uvedený v bode 4.6.3.



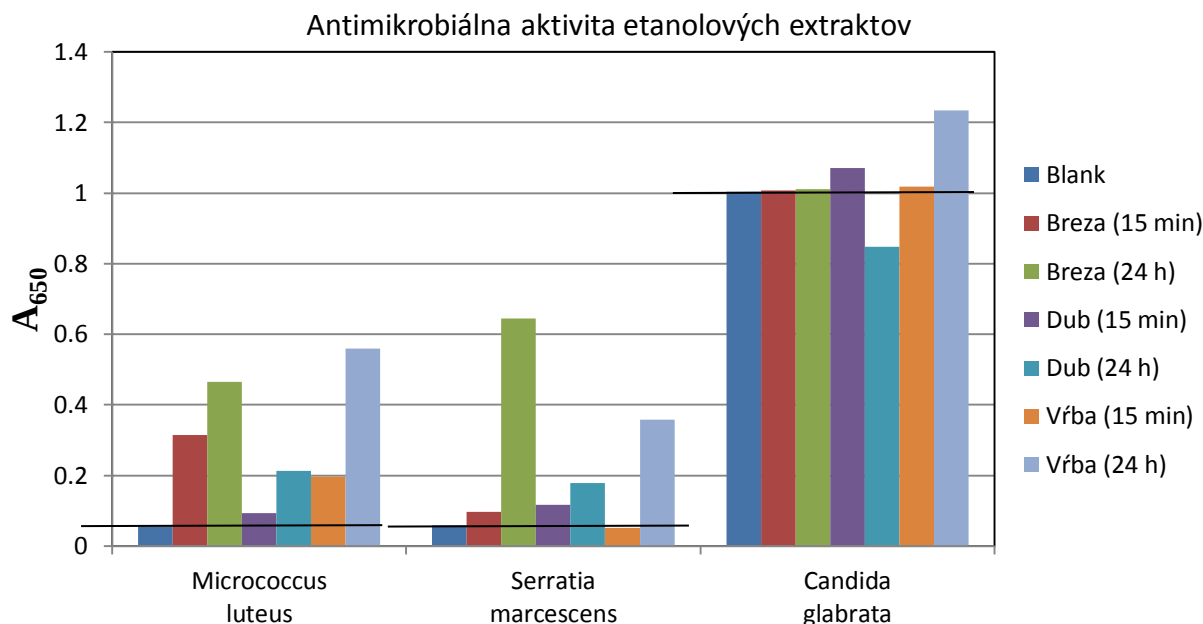
Graf 16: Grafické zobrazenie antimikrobiálnej aktivity vodných extraktov kôry na vybrané kmene MO po 24 hodinách

Podľa grafu 16, kde sú uvedené výsledky vodných extraktov, oproti testovaným bakteriálnym druhom neprejavil antimikrobiálny účinok žiaden extrakt. Avšak pri *Candida glabrata* sa prejavila mierna antimykotická aktivita u všetkých extraktov. V prípade 15 min výluhu vřbovej kôry vo vriacej vode došlo k 79% nárastu buniek v porovnaní s blankom.



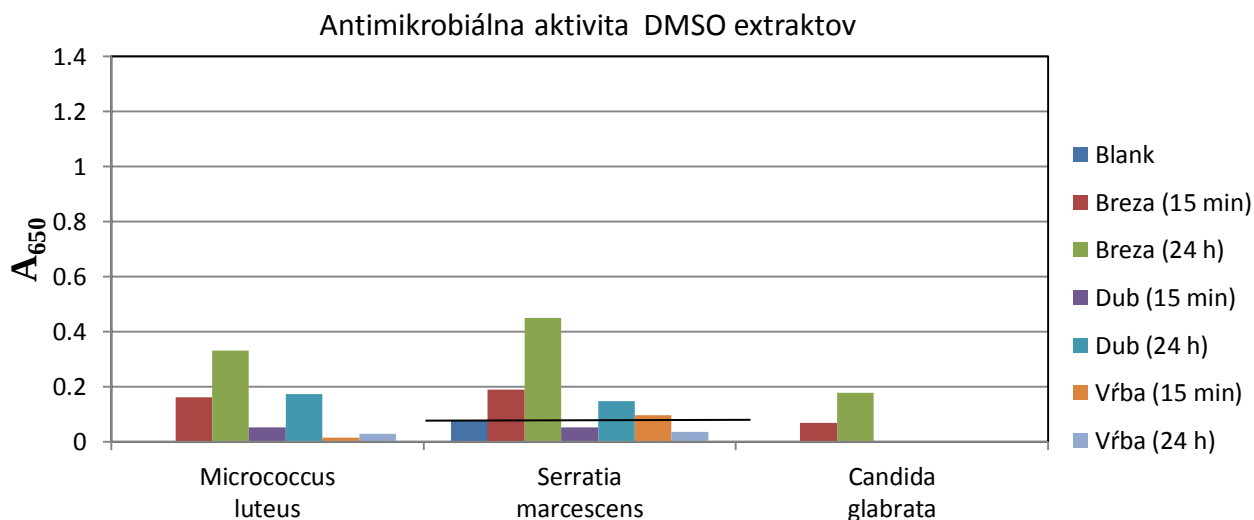
Graf 17: Grafické zobrazenie antimikrobiálnej aktivity metanoloých extraktov kôry na vybrané kmene MO po 24 hodinách

Na základe grafu 17 zobrazujúceho metanolové extrakty opäť môžeme tvrdiť, že všetky výluhy len stimulovali rast buniek, teda neprejavila sa žiadna antibakteriálna aktivita. Mierna antimykotická aktivita bola zistená v 24 hodinovom výluhu dubovej kôry a v oboch výluhoch kôry brezovej, pričom pri 24 h výluhu došlo k 79 % nárastu buniek



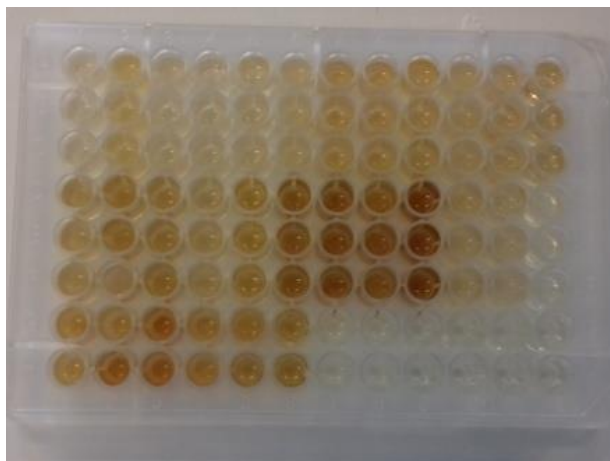
Graf 18: Grafické zobrazenie antimikrobiálnej aktivity etanolových extraktov kôry na vybrané kmene MO po 24 hodinách

Na základe grafu 18 môžeme tvrdiť, že pri etanolových extraktoch znova nepozorujeme antimikrobiálnu aktivitu oproti baktériám. V prípade kvasinky *Candida glabrata* sa prejavila mierna antimykotická aktivita v 24 h výluhu dubovej kôry



Graf 19: Grafické zobrazenie antimikrobiálnej aktivity DMSO extraktov kôry na vybrané kmene MO po 24 hodinách

Graf 19 sa výrazne líši od predošlých grafov. DMSO sa na rozdiel od ostatných rozpúšťadiel správal odlišne. DMSO totiž usmrtil kvasinku a takisto aj baktériu *Micrococcus luteus*. Na druhej strane môžeme pozorovať antimikrobiálnu aktivitu pri 15 min výluhu dubovej kôry a 24 h výluhu vŕbovej kôry.



Obrázok 17: Ilustračný príklad použitej mikrotitračnej doštičky (*Serratia marcescens*) po 24 h inkubácii

Na základe zistených údajov môžeme povedať, že aj napriek výrazným antioxidantným vlastnostiam sa v extraktoch z brezovej, dubovej ani vŕbovej kôre neprejavovala výraznejšia antimikrobiálna aktivita.

6 ZÁVER

Táto bakalárska práca sa zaoberá charakterizáciou antioxidačne a antimikrobiálne aktívnych látok v rôznych druhoch drevín. Rozhodli sme sa, že budeme skúmať tieto bioaktívne látky v brezovej, dubovej a vrbovej kôre.

V teoretickej časti sú charakterizované prírodné látky, ktoré vykazujú antioxidačné a antimikrobiálne vlastnosti. Do tejto skupiny látok patria sekundárne metabolity, napríklad polyfenoly, flavonoidy, či triesloviny. Ďalej sme sa v tejto časti práce zamerali na extrakciu bioaktívnych látok. Dnes existuje mnoho moderných metód, ktorými sa dá zjednodušiť celý priebeh či výťažok extrakcie. Na záver sú spomenuté možnosti antimikrobiálnych testov a stručná charakteristika použitých mikroorganizmov.

Experimentálnu časť by sme mohli rozdeliť na dva väčšie celky. Najprv sme pomocou spektrofotometrie stanovovali množstvo polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu v extraktoch z brezovej, dubovej a vrbovej kôre. Zamerali sme sa na viac faktorov. Zaujímal nás vplyv rôznych rozpúšťadiel, vplyv teploty a ako vplýva čas na výťažok extrakcie. Zo spomenutých kôr stromov sme pripravili vodné, metanolové, etanolové a DMSO extrakty. Pri vodných extraktoch sme sa zamerali aj na vplyv teploty. Pripravili sme extrakty vo vode pri teplote 20 °C a pri teplote 100 °C. Všetky uvedené vzorky sme lúhovali po dobu 15 min a 24 h. Podľa dosiahnutých výsledkov môžeme potvrdiť fakt, že so zvýšenou teplotou sa zvyšuje množstvo extrahovanej látky z rastlinnej matrice. Rovnako sme overili, že dlhšia doba lúhovania mala zakaždým väčší vplyv na výťažok extrakcie. Rozpúšťadlá sa nie vždy správali rovnako. Avšak možno povedať, že najväčšie výťažky sa nachádzali v metanolových extraktoch, jednoznačne pri 15 min výluhoch. DMSO extrakty sa prejavovali najmä pri 24 h výluhoch. Voda ako rozpúšťadlo mala lepšie výťažky zase v dubovej kôre. Najväčšiu koncentráciu polyfenolov sme zaznamenali v 24 h DMSO extrakte vrbovej kôry, a to 71,66 mg/g suchej vzorky. V rovnakom extrakte sme zaznamenali aj najväčšiu koncentráciu flavonoidov, a to 54,87 mg/g suchej vzorky. Najvyššou antioxidačnou aktivitou sa prezentovala opäť vrbová kôra v 24 h metanolovom extrakte, a to 125,33 mg/g suchej vzorky. Naopak najnižšie množstvá stanovovaných látok boli v 15 min vodných extraktoch z brezovej kôry získaných pri 20 °C. Podľa vyhodnotených údajov môžeme tvrdiť, že najviac antioxidačne aktívnych látok sa nachádzalo vo vrbovej kôre, ktorá sa prejavovala väčšinou najlepšie pri rôznych podmienkach. Na záver sme stanovovali tiež triesloviny, avšak len v metanolových extraktoch. Tu sa najlepšie prejavila opäť vrbová kôra, ale takmer rovnaké hodnoty sme namerali aj v kôre dubovej.

Druhým veľkým celkom boli antimikrobiálne testy. Používali sme dve metódy. Jednou z nich bola agarová difúzna metóda, tiež známa ako jamkový test. Druhou bola bujónová dilučná metóda, ktorá patrí medzi kvantitatívne testy a je teda presnejšia. Stanovovali sme teda antimikrobiálnu aktivitu extraktov z kôry oproti trom testovacím mikroorganizmom. Dve z nich boli baktérie – grampozitívna baktéria *Micrococcus luteus* a gramnegatívny druh *Serratia marcescens*. Tretím mikroorganizmom bola kvasinka *Candida glabrata*. Na rozdiel od značných antioxidačných vlastností sa v kôrach neprejavovali výraznejšie antimikrobiálne vlastnosti.

Na základe zistených charakteristík a poznatkov predpokladáme, že extrakty z kôry pozorovaných stromov sú vhodné na ďalšie použitie. Vďaka svojim antioxidačným

vlastnostiam by boli ideálne na ďalšie použitie napríklad ako potravinový doplnok či už vo forme kvapiek alebo tabliet.

Keďže sa u vzoriek neprejavila veľmi ich antibakteriálna a antimykotická aktivita, bolo by vhodné sa v budúcnosti viac zamerať na ďalšie typy extrakcie a podrobnejšie antimikrobiálne testovanie. Ďalej by bolo vhodné vzorky otestovať z hľadiska ich stability, toxicity alebo možnosti použitia v enkapsulovanej forme.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABTS	2'-azino-bis-[3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina]
ALB	albumín zo slepačieho vaječného bielka
CCM	Česká zbierka mikroorganizmov
DMSO	dimetylsulfoxid
MAE	extrakcia podporená mikrovlnným žiarením
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
MO	mikroorganizmus
PLE	tlaková extrakcia rozpúšťadlom
SC-CO ₂	superkritický oxid uhličitý
SDS	dodecylsulfát sodný
SFE	superkritická fluidná extrakcia
TEA	trietanolamín
TEAC	Trolox ako ekvivalent antioxidačnej aktivity
UAE	extrakcia podporená ultrazvukom
US	ultrazvuk
VIZ	veľkosť inhibičnej zóny
XOD	xantínoxidáza

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] LOBO, Vijaya, Anil PATIL, Anita PHATAK a Naresh CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2010, **4**(8), 118- [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.4103/0973-7847.70902. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2010/4/8/118/70902>
- [2] MOKRÝ, Juraj, Igor PORVAZNÍK a Juraj VÁŇA. *Vybrané kapitoly z klinickej farmakológie: Antimikrobiálne látky I. - farmakológia: Vysokoškolské skriptá* [online]. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2005, 160 s. [cit. 2017-04-24]. ISBN 978-80-89544-48-6. Dostupné z: <http://portal.jfmed.uniba.sk>
- [3] VALENTOVÁ, Eva. *Co jsou to antioxidanty?* [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/co-jsou-to-antioxidanty>
- [4] BRAVO, Laura. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* [online]. 1998, **56**(11), 317-333 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x. ISSN 00296643. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- [5] PANDEY, Kanti Bhooshan a Syed Ibrahim RIZVI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2005, **2**(5), 270-278 [cit. 2017-04-25]. DOI:10.4161/oxim.2.5.9498. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835915/>
- [6] 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**, 75-90 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.017. ISSN 00039861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611400174X>
- [7] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 1.vyd. Ostrava: P. Klouda, 2000, 155 s. ISBN 80-86369-00-5
- [8] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada, 2000, 320 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [9] OPLETAL, Lubomír a Věra SKŘIVANOVÁ. *Přírodní látka a jejich biologická aktivita*. 2. vyd. Univerzita Karlova, Praha: Karolinum, 2010, 653 s. ISBN 978-80-246-1801-2

- [10] GROTEWOLD, Erich. *The science of flavonoids*. New York: Springer, 2006.
[online] ISBN 978-0387-28821-5. Dostupné z: <http://rushim.ru/books/mechanizms/the-science-of-flavonoids.pdf>
- [11] RICE-EVANS, Catherine, Nicholas MILLER a George PAGANGA. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* [online]. 1997, 2(4), 152-159 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)01018-2. ISSN 13601385. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138597010182>
- [12] *Herbár* [online]. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <http://www.herbar.org/liecive-rastliny>
- [13] POPOVIĆ, Boris M., Dubravka ŠTAJNER, Ružica ŽDERO, Saša ORLOVIĆ a Zoran GALIĆ. Antioxidant Characterization of Oak Extracts Combining Spectrophotometric Assays and Chemometrics. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, **2013**, 1-8 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1155/2013/134656. ISSN 1537-744x. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/134656/>
- [14] HAGENEDER, Fred. *Moudrost stromů*. Vyd. 2. Praha: Knížní klub, 2006, 224 s. ISBN 978-80-242-3520-2.
- [15] *Herbář Wendys* [online]. [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/>
- [16] SAN-MIGUEL-AYANZ, Jesus, Daniele DE RIGO, Giovanni CAUDULLO, Tracy HOUSTON DURRANT a Achille MAURI. *European Atlas of Forest Tree Species* [online]. Luxemburg: European Commission, 2016 [cit. 2017-05-13]. DOI: 10.2788/038466. ISBN 978-92-79-36740-3.
- [17] *Forest portál, o lesoch Slovenska* [online]. [cit. 2017-05-13]. Dostupné z: <http://www.forestportal.sk/lesne-hospodarstvo/hospodarska-uprava-lesov/Stranky/atlas-drevin.aspx>
- [18] DURAK, Agata a Urszula GAWLIK-DZIKI. The Study of Interactions between Active Compounds of Coffee and Willow (*Salix* sp.) Bark Water Extract. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 1-11 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1155/2014/386953. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/386953/>
- [19] HAQUE, Shafiul, Dorota A. NAWROT, Sami ALAKURTTI, Leo GHEMTIO, Jari YLI-KAUHALUOMA a Päivi TAMMELA. Screening and Characterisation of Antimicrobial Properties of Semisynthetic Betulin Derivatives. *PLoS ONE* [online]. 2014, 9(7) [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1371/journal.pone.0102696. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102551/>

- [20] IRAVANI, Saeed a Behzad ZOLFAGHARI. Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus Pinaster* bark extract. *Research in Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, 6(1) [cit. 2017-05-01].
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3203267/>
- [21] HOUGHTON, Peter J. a Amala RAMAN. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Boston, MA: Springer US, 1998. ISBN 9781461376620.
- [22] BART, Hans-Jörg. Extraction of Natural Products from Plants - An Introduction. *Industrial Scale Natural Products Extraction* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2011, s. 1 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1002/9783527635122.ch1. ISBN 9783527635122. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527635122.ch1>
- [23] AZMIR, Jafaar, Islam S.M. ZAIDUL a Mohd M. RAHMAN, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. 2013, **117**(4), 426-436 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. ISSN 02608774. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413000277>
- [24] TEKEL, Jozef a Peter MIKUŠ. *Vybrané kapitoly z analytickej chémie: analýza látok v biologických systémoch*. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2005. ISBN 8022319880.
- [25] HAGAROVÁ, Ingrid. Extrakcie spĺňajúce princípy zelenej chémie využívané v stopovej analýze. In: *Chemické listy*. 2015, **109**, s. 269-275. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2015_04_269-275.pdf
- [26] DELAZAR, Abbas, Lutfun NAHAR, Sanaz HAMEDEYAZDAN a Satyajit D. SARKER. *Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation* [online]. s. 89 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1007/978-1-61779-624-1_5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-624-1_5
- [27] RATOLA, Nuno, Sílvia LACORTE, Damiá BARCELÓ a Arminda ALVES. Microwave-assisted extraction and ultrasonic extraction to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in needles and bark of *Pinus pinaster* Ait. and *Pinus pinea* L. by GC-MS. *Talanta* [online]. 2009, **77**(3), 1120-1128 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.08.010. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914008006206>

- [28] KIRCHNER, Michal a Eva MATISOVÁ. Súčasné metódy a nové trendy v izolácii rezíduí pesticídov z beztukových potravín. In: *Chemické listy*. 2004, **98**, s. 396-405. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_07_04.pdf
- [29] CAMEL, Valérie. Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Analyst* [online]. **126**(7), 1182-1193 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1039/b008243k. ISSN 00032654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b008243k>
- [30] BIESAGA, Magdalena a Krystyna PYRZYNSKA. Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2009, **39**(2), 95-107 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1080/10408340902820718. ISSN 1040-8347. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408340902820718>
- [31] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renata KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. 80 s. ISBN 978-80-7305-676-6
- [32] KLANČNIK, Anja, Saša PISKERNIK, Barbara JERŠEK a Sonja Smole MOŽINA. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2010, **81**(2), 121-126 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.02.004. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701210000618>
- [33] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 9788024747712.
- [34] PIŠLOVÁ, Markéta, Michaela OPLTOVÁ, Kateřina KOLÁŘOVÁ, Vladimíra VOSMÁNKOVÁ a Václav ŠVORČÍK. Vliv podmínek skladování na vybrané vlastnosti oxycelulosity. In: *Chemické listy*. 2016, **110**, s. 698-702. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2016_10_698-702.pdf
- [35] BEDNÁŘ, Marek, Věra FRANKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie. Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. 558 s.
- [36] ŠILHÁKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vydanie. Praha: ACADEMIA, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [37] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

- [38] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-7262-341-9.
- [39] *Miniatlas mikroorganismů* [online]. [cit. 2017-05-13].
Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>
- [40] HUDECOVÁ, Daniela a Martin ŠIMKOVIČ. *Mikrobiológia*. Bratislava: STU, 2011. ISBN 9788022736008
- [41] FIDEL, Paul L., Jose A. VAZQUEZ a Jack D. SOBEL. Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparision to C. albicans. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, **12**(1), 80-96 [cit. 2017-05-01].
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88907/>
- [42] TILAK, Ragini, Varsha KUMARI, Tuhina BANERJEE, Pankaj KUMAR a Sulekha PANDEY. Emergence of non-albicans Candida among candidal vulvovaginitis cases and study of their potential virulence factors, from a tertiary care center, North India. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* [online]. 2013, **56**(2), 144- [cit. 2017-05-01]. DOI: 10.4103/0377-4929.118703. ISSN 0377-4929. Dostupné z: <http://www.ijpmonline.org/text.asp?2013/56/2/144/118703>