

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra rostlinné výroby



**Inhibice *Aspergillus niger* pomocí těkavých látek z rostlin
uzavřených do mezoporézního křemičitého materiálu
MCM-41**

Diplomová práce

Autor práce: Anežka Janatová
Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Inhibice *Aspergillus niger* pomocí těkavých látek z rostlin uzavřených do mezoporézního křemičitého materiálu MCM-41" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

Podpis autora práce:

Poděkování

Ráda bych velmi poděkovala Panu Docentu Pavlovi Kloučkovi jako člověku, i jako vedoucímu práce za jeho moudrost, ochotu, trpělivost a především cenné zkušenosti, které jsem si pod jeho vedením mohla osvojit. Dále mé velké poděkování patří Slečně Dr. Andree Bernardos za poskytnutí potřebného materiálu a spolupráci při vývoji metodiky tohoto experimentu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Slečně Ing. Adéle Fraňkové, která mě zasvětila do tajů laboratoře a naučila pracovat s laboratorním vybavením, Panu Ing. Jakubovi Šmídovi za konzultace při psaní této práce a všem jmenovaným za jejich nepostradatelné rady a drahocenný čas.

Souhrn

V poslední době významně stoupá poptávka po přírodních produktech bez chemických aditiv či reziduí a je stále více kladen důraz na zdravý životní styl, jako prevenci proti civilizačním chorobám. Antimikrobiální těkavé látky z rostlin se zde nabízejí jako vhodná alternativa syntetických pesticidů a konzervantů potravin. *Aspergillus niger* je významným patogenem skladovaných zemědělských produktů a některé jeho kmeny produkují ochratoxin A, který má na organismus nefrotoxické, imunotoxické, karcinogenní a teratogenní účinky. Byla testována fungicidní aktivita sedmi těkavých látek z rostlin s proklamovanou fungicidní aktivitou: tymol, karvakrol, tymochinon, eugenol, cinnamaldehyd, diallyl disulfid a allyl isotiokyanát. Pro zajištění dlouhodobějších účinků řízeným uvolňováním a snadnější aplikace byly tyto látky enkapsulovány do mezoporézního křemičitého materiálu MCM-41 s velikostí pórů 2-3 nm a porovnávány s účinností látek v čistém stavu. Významná fungicidní aktivita byla zjištěna u pěti ze sedmi testovaných látek. Nejvyšší fungicidní aktivitu vykazoval karvakrol při minimální inhibiční dávce (MID) 0,5 mg nebo nižší a cinnamaldehyd při MID 1 mg, ale nebyl patrný žádný rozdíl mezi enkapsulovanou a čistou variantou. Tymol, tymochinon a karvakrol se jevily mnohem účinnější proti *A. niger* v enkapsulovaném stavu. Při vyhodnocení po čtrnácti dnech bylo zapotřebí osmkrát vyšší dávky tymolu v čistém stavu (4 mg) než tymolu enkapsulovaného (0,5 mg), dvakrát vyšší dávky eugenolu v čistém stavu (4 mg) než eugenolu enkapsulovaného (2 mg) a tymochinon v čistém stavu po čtrnácti dnech neúčinkoval vůbec, zatímco enkapsulovaného tymochinonu bylo k úplné inhibici zapotřebí dávky 1 mg. Tyto výsledky byly v korelaci s výsledky rychlosti evaporace enkapsulovaných a čistých látek, která byla také sledována. Diallyl disulfid a allyl isotiokyanát se jevily jako téměř neúčinné proti *A. niger* a v testu rychlosti evaporace se v čistém stavu zcela odpařily během 24 hodin. Bylo prokázáno, že enkapsulací vybraných těkavých látek, kromě sirných sloučenin, je řízeným uvolňováním zajištěna jejich dlouhodobá účinnost a snadná manipulace i aplikace, aniž by byla negativně ovlivněna jejich fungicidní aktivita. Tato technologie by mohla mít zásadní význam především v medicíně, v potravinářství a v zemědělství

Klíčová slova: tymol, karvakrol, tymochinon, eugenol, cinnamaldehyd, diallyl disulfid, allyl isotiokyanát, *Aspergillus niger*, MCM-41

Abstract

Recently, a demand for natural products without chemical additives or residues has received a significant attention and there is a much greater pressure to maintain a healthy lifestyle as a means of preventing diseases of affluence. Antimicrobial volatile substances from plants came forward to be a suitable alternative to synthetic pesticides and food preservatives. *Aspergillus niger* is an important pathogen of stored agricultural products and some of its strains produce ochratoxin A, which has nephrotoxic, immunotoxic, carcinogenic and teratogenic effects on the body. The subject of testing was the fungicidal activity of seven volatile compounds from plants with claimed antimycotic activity - thymol, carvacrol, thymoquinone, eugenol, cinnamaldehyde, diallyl disulfide and allyl isothiocyanate. To provide longer-term effects by controlled release and ease of application, these substances were encapsulated into mesoporous silica MCM-41 material with a pore size of 2-3nm and compared to the effects of pure substances. Significant fungicidal activity was verified in five out of the seven tested substances. Carvacrol in MID (minimal inhibitory dosage) of 0.5mg or less and cinnamaldehyde in MID of 1mg have shown the highest fungicidal activity, but there was no significant difference in the results between the encapsulated and the pure form. Thymol, carvacrol and thymoquinone have appeared to be much more effective against *A. niger* in the encapsulated state. When evaluating after fourteen days, it was necessary to implicate an eight times larger dose of pure thymol (4mg) compared to just the encapsulated thymol (0.5mg), two times larger dose of pure eugenol (4 mg) compared to encapsulated eugenol (2 mg) and pure thymoquinone did not work at all, while the dose necessary for complete inhibition was 1 mg of encapsulated thymoquinone. These results were correlated with the evaporation rate of pure and encapsulated substances, which had been evaluated as well. Diallyl disulphide and allyl isothiocyanate appeared to be almost ineffective against *A. niger* and in testing the evaporation rate, the pure state of both had completely evaporated within 24 hours. It has been proven that by the encapsulation of selected volatiles, excluding sulfur compounds, their long-term effectiveness is ensured by controlled release and easy handling, including application, without negative effects for their fungicidal activity. This technology could have a significant impact, especially in medicine, food industry and agriculture.

Keywords: thymol, carvacrol, thymoquinone, eugenol, cinnamaldehyde, diallyl disulphide, allyl isothiocyanate, *Aspergillus niger*, MCM-41

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Hypotéza a cíle.....	8
3 Literární přehled	9
3.1 Silice.....	9
3.1.1 Historie	10
3.1.2 Chemické složení.....	11
3.1.3 Biologická aktivita.....	13
3.2 Tymol	14
3.2.1 Chemické vlastnosti.....	15
3.2.2 Fungicidní aktivita.....	15
3.3 Karvakrol.....	16
3.3.1 Chemické vlastnosti.....	17
3.3.2 Fungicidní aktivita.....	17
3.4 Tymochinon	18
3.4.1 Chemické vlastnosti.....	19
3.4.2 Fungicidní aktivita.....	19
3.5 Eugenol	20
3.5.1 Chemické složení.....	20
3.5.2 Fungicidní aktivita.....	21
3.6 Cinnamaldehyd	21
3.6.1 Chemické vlastnosti.....	22
3.6.2 Fungicidní aktivita.....	23
3.7 Diallyl disulfid	23
3.7.1 Chemické vlastnosti.....	24
3.7.2 Fungicdní aktivita	25
3.8 Allyl isotiokyanát	25
3. 8. 1 Chemické vlastnosti.....	25
3. 8. 2 Fungicidní aktivita.....	26
3. 9 Enkapsulace těkavých látek do porézních materiálů	27
3. 9. 1 MCM-41	28
3.10 <i>Aspergillus niger</i>	29

4 Materiál a metody	32
4.1 Chemikálie a biologický materiál	32
4.2 Enkapsulace.....	32
4.3 Příprava inokula <i>Aspergillus niger</i>	32
4.4 Test antifungální aktivity	33
4. 5 Test rychlosti evaporace.....	34
5 Výsledky	35
5. 1 Antifungální aktivita	35
5. 2 Rychlost evaporace	37
6 Diskuze	43
7 Závěr	46
8 Seznam použité literatury	47
9 Samostatné přílohy	55
10 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	58
11 Seznam obrázků.....	60
12 Seznam tabulek	62
13 Seznam samostatných příloh	63

1 Úvod

V posledních letech významně přibývá pacientů trpících různými civilizačními chorobami, jako jsou alergie, poruchy centrální nervové soustavy či rakovina. K jejich propuknutí mohou přispět jedovaté mykotoxiny (sekundární metabolity všudypřítomných plísní a hub), ale také rezidua pesticidů v potravním řetězci a tzv. „éčka“ (aditiva potravin pro dlouhodobé uchování požadovaných vlastností). Zdravá strava je nejlepší prevencí proti těmto závažným chorobám. V současné době je kladen velký důraz na zdravý životní styl a výrazně se zvýšila poptávka po přírodních produktech bez chemických aditiv a reziduí.

Zde se těkavé látky z rostlin s antimikrobiální aktivitou jeví jako vhodná alternativa syntetických pesticidů a konzervantů potravin. Antimikrobiální aktivita silic byla rozsáhle studována a testována na řadě mikroorganismů, obvykle pomocí přímých kontaktních antimikrobiálních testů, jako jsou různé typy difúzních a ředících metod. Vzhledem k vysoké hydrofobnosti a těkavosti silic se při těchto kontaktních testech potýkáme s mnoha problémy. Pro snadné rozpuštění silic nebo jejich těkavých složek a vytvoření tak homogenního roztoku je třeba přidat rozpouštědla nebo emulgátory, jako je například Tween 80, DMSO (dimethylsulfoxid), etanol a další, které však mohou ovlivňovat jejich antimikrobiální aktivitu. Enkapsulace těkavých látek z rostlin do mezoporézního křemičitého materiálu MCM-41 by měla významně usnadnit jejich aplikaci a zajistit dlouhodobější účinnost s řízeným uvolňováním, aniž by byla ovlivněna jejich antimikrobiální aktivita. Velikost částic MCM-41 je přibližně 50-1000 nm, díky čemuž mají schopnost prostupovat buněčné membrány a sloužit tak především v medicíně jako nosiče léčiv. Očekává se, že nanotechnologie a nanomateriály na přírodní bázi přinesou revoluci ve většině oborů lidské činnosti.

Významným producentem Ochratoxinu A, který má pro organismus nefrotoxické, imunotoxické, karcinogenní a teratogenní účinky, je vláknitá houba *Aspergillus niger*. K inhibici jeho růstu a klíčení spor byly vybrány hlavní účinné látky silic rostlin, které jsou proklamované vědeckými pracemi jako antimykotika. Tyto rostliny mají historicky dlouhou tradici využívání v mnoha národech či kulturách a jsou dobře známé na světovém i českém trhu jako rostliny léčivé i jako oblíbené koření mnoha pokrmů.

2 Hypotéza a cíle

Některé těkavé látky z rostlin jsou popsány a z vědeckého pohledu validovány jako přirozená antimykotika. Enkapsulací těchto látek lze zlepšit jejich technologické a aplikační vlastnosti, zejména zajistit řízené uvolňování a prodloužení tak doby jejich účinnosti.

Hlavním cílem této práce bylo ověřit a porovnat fungicidní aktivitu sedmi těkavých látek z rostlin enkapsulovaných do mezoporézního křemičitého materiálu MCM-41 se stejnými látkami v čistém stavu. Dalším cílem bylo sledovat průběh evaporace sedmi enkapsulovaných látek a stejných látek v čistém stavu a výsledky porovnat s časovým průběhem antifungální aktivity.

3 Literární přehled

3.1 Silice

Silice neboli éterické či esenciální oleje patří k jednomu z prvních léčebných prostředků lidstva (Higley a Higley, 1998). Tyto přírodní aromatické směsi těkavých sloučenin (Bakkali et al, 2008) jsou obecně považovány za bezpečné pro životní prostředí i lidské zdraví, na rozdíl od přípravků chemických, v zemědělské výrobě hojně rozšířených a používaných. Zájem o využití přírodních látek pro trvale udržitelné zemědělství se v poslední době výrazně zvýšil, bylo provedeno mnoho experimentů a v mnohých případech prokázáno, že silice a extrakty z rostlin mohou být efektivně využity jako léčiva, přírodní pesticidy či jako konzervanty potravin (Antunes a Cavaco, 2010).

Silice jsou komplexní směsi těkavých sloučenin, až na výjimky kapalné s různým zabarvením, rozpustné v tucích a organických rozpouštědlech, většinou s hustotou nižší než má voda (Bakkali et al., 2008). Jsou extrahovány pomocí fyzikálních metod (lisování a destilace) z aromatických rostlin různých čeledí (*Lamiaceae*, *Rosaceae*, *Pinaceae*, *Laureaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae* aj.) vyskytujících se téměř po celém světě, v zemích od mírného až po tropické pásmo, kde představují důležitou součást tradičního lékopisu. Jako produkty sekundárního metabolismu rostlin mohou být silice syntetizovány ve všech rostlinných orgánech, tj. listy, stonky, pupeny, květy, plody, kořeny, kůra, dřevo a jsou uloženy v sekrečních buňkách (*Rosaceae*, *Violaceae* aj.), dutinách či sekrečních kanálech (*Apiaceae*, *Hypericaceae*, *Pinaceae* aj.) nebo v epidermálních buňkách a žlázatých trichomech (*Lamiaceae*, *Cannabiaceae*, *Pelargonium* sp.). Množství silic v rostlinách se značně liší, průměrný obsah v rostlinném materiálu se obvykle pohybuje od 0,3% do 2% silice v sušině, až na výjimky, jako jsou některé tropické dřeviny, hřebíček (*Syzygium aromaticum*) a muškátový oříšek (*Myristica fragrans*), které průměrně obsahují mezi 15 a 17% silice, kardamom (*Elettaria cardamomum*) s obsahem okolo 8% aj. V přírodě mají silice nezastupitelnou roli, svou toxicitou slouží rostlinám jako přirozená ochrana proti virům, bakteriím, plísním i hmyzu a jejich typické silné aroma odrazuje býložravce. Naproti tomu mohou svou vůní některé druhy hmyzu přilákat v rámci opylování (Baser a Buchbauer, 2009).

V dnešní době je známo přibližně 3000 silic, z nichž asi 300 je komerčně uplatňováno v mnoha odvětvích (Burt, 2004), zejména farmaceutickém, kosmetickém, zemědělském a potravinářském (Bakkali et al., 2008). Největším producentem světa je Brazílie, dále Indie,

USA, Čína a Argentina, v Evropě patří k největším producentům Itálie, Španělsko, Portugalsko, Francie, Kréta, Albánie a Řecko. Na kvalitu i kvantitu silic má velký vliv termín sklizně, stanovištní podmínky, stresové faktory a především extrakční metoda (Baser a Buchbauer, 2009).

Silice je možné extrahovat z rostlinných částí různými metodami, jako je vodní a parní destilace, extrakce pomocí organických rozpouštědel, superkritická extrakce kapalným oxidem uhličitým, macerace, enfleurage (nejstarší metoda založená na osmotickém rozpouštění v tuku) a lisování (Janardhanan a Thoppil 2004), které je nejčastěji používáno pro citrusové plody (Bakkali et al., 2008). Pro komerční účely je nejběžněji používanou metodou parní destilace, přestože v porovnání s ostatními metodami byly zaznamenány rozdíly v organoleptických vlastnostech i složení silic, které by mohly ovlivňovat jejich antimikrobiální aktivitu. Další výhodou parní destilace je, že oproti ostatním metodám je méně časově i finančně náročná (Burt, 2004).

3.1.1 Historie

Z Egyptských hieroglifů a Čínských rukopisů je známo, že silice byly nápomocny kněžím a lékařům po tisíce let. Ve starém Egyptě byly silice nalezeny dobře zachované v alabastrových nádobách v hrobkách faraonů a jsou záznamy o jejich používání při balzamování mrtvých. Egyptské chrámy, mimo jiné, sloužily k výrobě a míchání léčivých silic a recepty byly zaznamenávány na jejich zdech (Higley a Higley, 1998). Ve 4. století př. Kr. doporučoval inhalovat silice při bolesti v krku známý biolog a filosof Theophrastos. Plinius v 1. století n. l. předepisoval požívání či vdechování silic před jídlem proti nevolnosti a žaludečním křečím (Laird a Phillips, 2011). V Bibli můžeme nalézt 188 odkazů o silicích, jako například o oleji z kadidlovníku, myrhy, rozmarýnu či yzopu, které byly užívány k pomazání nebo při léčení nemocných (Higley a Higley, 1998) a též o známé vonné masti z nardovníku pravého (*Nardostachys jatamansi*) v Janově evangeliu (12:3) „Maria pak vzavši libru masti drahé z nardu výborného, pomazala noh Ježíšových a vytřela vlasy svými nohy jeho. I naplněn jest dům vůní té masti“.

Destilace jako metoda byla používána ve starověkých kulturách (Egypt, Persie, Indie) před více než 2000 lety, kterou v 9. století zdokonalili Arabové. První písemné záznamy o destilaci však pocházejí ze 13. století, kde je její objev připisován katalánskému fyzikovi Villanovovi

(1235-1311). V této době byly také poprvé zaznamenány účinky silic v lékopisu. V Evropě však silice nebyly používány k léčení až do století 16., ve kterém také švýcarský reformátor medicíny Paracelsus von Hohenheim vyslovil myšlenku, že každá rostlina obsahuje určitou složku zodpovědnou za její účinky. Tuto účinnou složku drogy nazval „Quinta essential“, od čehož je odvozen dnešní název „esenciální olej“. V 17. století byla již separace silic dobře známá a v lékárnách se běžně nacházelo 15-20 různých silic. Používání silice z kajeputu (*Melaleuca alternifolia*) neboli tea-tree oleje pro léčebné účely, je poprvé dokumentováno od kolonizace Austrálie na konci 18. století, i když se dá předpokládat, že byl používán již dávno před tím australskými domorodci. V roce 1881 byl De la Croixem proveden první výzkum baktericidních vlastností silic (Burt, 2004) a jako první popsal inhibiční účinky silic na spory anthraxu (*Bacillus anthracis*) Chamberlain v roce 1887 (Maruzzella a Sicurella, 1960).

3.1.2 Chemické složení

Silice jsou velice složité přírodní sloučeniny, jež mohou obsahovat 20-60 různých složek ve zcela odlišných koncentracích. Jsou charakteristické 1-3 složkami, které jsou zastoupeny v poměrně vysokém množství (30-70%) proti zbývajícím složkám zastoupeným pouze v množství stopovém. Například karvakrol (30%) a tymol (27%) jsou hlavní složky oreganové silice nebo linalol (68%) ze silice koriandrové (Bakkali et al., 2008). V mnohých studiích byla prokázána vyšší biologická aktivita silic, než jejich jednotlivých částí, což naznačuje, že minoritní složky se podílejí na mnohých synergických účincích, i když byly pozorovány také aditivní a antagonistické účinky mezi jednotlivými složkami (Bassolé a Juliani, 2012).

Složení silic a koncentrace jejich účinných látek je dána rostlinným druhem, stanovištěm a obdobím sklizně (Burt, 2004). Periodicky se mění také v průběhu vegetace i během dne (Bulánková, 2005). Podrobná analýza složení silic se provádí plynovou chromatografií (GC), hmotnostní spektrometrií (MS), nejčastěji však jejich kombinací (GC-MS) nebo metodou headspace (Burt, 2004).

Z chemického hlediska můžeme tyto komponenty rozdělit na tři hlavní skupiny, první skupinu tvoří terpeny a terpenoidy, druhou skupinu aromatické sloučeniny derivátů fenylypropanu a třetí skupinu tvoří dusíkaté a sirné sloučeniny, které jsou tvořeny zejména u čeledí *Brassicaceae* a *Alliaceae* (Bakkali et al., 2008).

Terpeny

Hlavními terpeny zastoupenými v silicích jsou monoterpeny (C₁₀) a seskviterpeny (C₁₅), ale existují i diterpeny (C₂₀), triterpeny (C₃₀) a tetraterpeny (C₄₀), terpen obsahující kyslík se nazývá terpenoid. Monoterpeny, tvořeny spojením dvou izoprenových jednotek (C₅), jsou nejvíce zastoupenými molekulami v silicích, kde představují asi 90% a mohou být v rostlině obsaženy jako uhlovodíky (myrcen, terpinen, pinen aj.), alkoholy (geraniol, mentol, borneol aj.), aldehydy (geranial, neral, citronellal aj.), ketony (karvon, tujon aj.), estery (linalyl acetát aj.), étery (metofuran aj.), peroxidy (askaridol aj.) a fenoly (tymol, karvakrol aj.). Seskviterpeny jsou svými vlastnostmi podobné monoterpenům, ale jsou tvořeny třemi isoprenovými jednotkami, což umožňuje vytváření široké škály biochemických struktur, jako jsou uhlovodíky (azulen, zingiberen aj.), alkoholy (bisabol, cedrol aj.), ketony (germakron, tuberon) a epoxidy (karyofyllen oxid, humulen epoxid aj.) Můžeme je nalézt například v blahovičníku (*Eukalyptus* sp.), jalovci (*Juniperus communis*), koriandru, levanduli (*Levandula officinalis*), tymiánu aj (Bakkali et al., 2008).

Fenylpropanoidy

Aromatické sloučeniny derivátů fenylpropanu se v silicích vyskytují podstatně méně než terpeny a zahrnují skupiny alkoholů (cinnamický alkohol aj.), aldehydů (cinnamaldehyd aj.), fenolů (chavikol, eugenol aj.) a methoxy sloučenin (anetol, estragol aj.). Jsou to typické složky anýzu (*Pimpinella anisum*), skořice (*Cinnamomum* sp.), hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), muškátového oříšku a dalších (Bakkali et al., 2008).

Dusíkaté a sírné sloučeniny

Aromatické látky obsahující dusík jsou převážně deriváty pyrazinu (vznikají při tepelné úpravě potravin např. kávy, kakaa, ořechů aj.), pyrrolu (např. indol obsažený v květech jasmínu a citrusů), pyridinu (kyselina nikotinová, nikotinamid aj.), chinoxalinu a podobné sloučeniny (Vonášek et al., 1987).

Sírné sloučeniny produkují zejména brukvovité rostliny v podobě glukosinolátů. Tato skupina látek a jejich deriváty a metabolity (např. isotiokyanáty) slouží rostlinám jako přírodní pesticidy a je jim připisována vysoká antimikrobiální aktivita. Další plejádu sírných

sloučenin obsahují rostliny z čeledi *Alliaceae* (např. allicin a jeho sulfidické deriváty), (Lapčík et al., 2011).

3.1.3 Biologická aktivita

Jako potenciální antimikrobiální látky se silice jeví v mnoha případech svými účinky příznivěji, než látky chemicky syntetizované (Seow et al, 2014), které zaznamenaly v průběhu 20. století nebývalého rozmachu ve všech průmyslových odvětvích. Časem však bylo zjištěno, že nadměrné používání syntetických látek vede k mnoha problémům, jako jsou rezidua v potravním řetězci, které mají neblahý vliv na naše zdraví a životní prostředí nebo problémy se vznikem rezistentních populací patogenů a škůdců (Pavela, 2011). Naproti tomu silice jsou po generace přirozenou součástí lidské stravy a jejich biologická rozložitelnost je snadná, což naznačuje nízkou toxicitu pro lidský organismus a minimální problémy s rezidui v přírodě (Nedorostova et al., 2009).

Z mnoha studií je známo, že těkavé látky obsažené v silicích se kromě antimikrobiálních vlastností, vyznačují také insekticidními, antioxidačními, anti-alergickými, protizánětlivými, protinádorovými účinky (Seow et al., 2014) a působí stimulačně na imunitní systém. Vzhledem k jejich nízké molekulové hmotnosti a jejich rozpustnosti v tucích mohou velmi rychle pronikat buněčnými membránami a dostat se tak bez problému k postiženému místu uvnitř organismu. Silice obsahující seskviterpeny jsou schopny projít hematoencefalickou bariérou, jejíž poruchy mohou způsobovat Alzheimerovu chorobu, Lou Gehrigovu chorobu, Parkinsonovu chorobu a roztroušenou sklerózu. Pro tyto vlastnosti se zdají být vhodnými adepty při léčbě civilizačních i mnoha jiných chorob (Higley a Higley, 1998).

Velký důraz by měl být kladen na preventivní opatření proti patogenům způsobujícím bakteriální onemocnění, s čímž souvisí ochrana a ošetřování rostlin i potravin. Mnohé epidemie zmítající lidstvem v průběhu civilizace byly bakteriálního původu, především *Salmonella* spp. ale i *Shigella* spp., *Clostridium botulinum* a *Listeria monocytogenes* (Antunes a Cavaco, 2010). Dalšími společnými původci alimentárních infekcí jsou *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* aj., kdy se jedinec nakazí obvykle kontaminovanou vodou či potravou. Problémem dnešní doby je nadměrné a neuvážené používání antibiotik a tak vznikající rezistence bakteriálních kmenů. Bylo provedeno mnoho studií o silicích a jejich působení na tyto bakteriální kmeny a u některých byla prokázána vysoká antibakteriální

aktivita. Například u směsi karvakrolu s tymolem (*Origanum* sp., *Thymus* sp.) podaných ve správném množství a poměru byla zjištěna totální inhibice některých kmenů, například *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (Seow et al., 2014).

Na snížené kvalitě a toxicitě zemědělských produktů a potravin se nemalou měrou podílí také plísně a houby produkující škodlivé mykotoxiny, jež jsou pro lidský organismus neodbouratelné. Tyto mykotoxiny jsou produkovány mnoha kmeny, které napadají hospodářsky významné plodiny a také potraviny, především jsou to *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* a další. I zde mohou být silice vhodnou alternativou nešetrných syntetických prostředků, neboť jejich fungicidní aktivita byla potvrzena v mnohých experimentech (Antunes and Cavaco, 2010).

Je známo, že silice, vyznačující se silnou vůní, jsou-li rozptýleny v prostředí, přispívají k čištění vzduchu. Odstraňují ze vzduchu toxické částice a likvidují pachy plísní, cigaret, zvířat a další. Naplňují vzduch čerstvou a dle typu silice příjemnou vůní, což přispívá k udržení fyzického a psychického zdraví, rovnováhy a pohody (Higley a Higley, 1998).

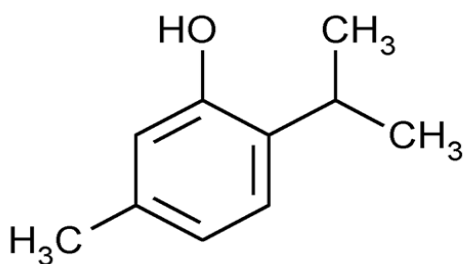
3.2 Tymol

Tymol patří k hlavním účinným látkám silic mnohých rostlin, různých čeledí. Nejčastěji bývá ve velkém množství identifikován u rostlin patřících do čeledi *Lamiaceae*, ale můžeme ho nalézt také u mnoha rostlin z čeledi *Orchideaceae* a u některých zástupců z čeledí *Oleaceae*, *Asteraceae*, *Laureaceae*, *Rosaceae* a *Clusiaceae* (Pherobase). Tymol a karvakrol jsou hlavními účinnými složkami silic rostlin rodu *Thymus* (Lang and Buchbauer, 2011), jejichž vzájemný poměr je velice variabilní (Fachini-Queiroz, 2012). Největší koncentrace tymolu byly nalezeny u druhů *Thymus vulgaris*, *T. decussatus*, *T. bovei* a *T. serpyllum*, kde tvoří průměrně 60% silice. Toto množství je závislé na stanovišti a klimatických podmínkách, ze kterých rostlina pochází, jiné hodnoty tymolu byly naměřeny u tymiánu ze Saudské Arábie (62,2%) a jiné hodnoty například u tymiánu z Kamerunu (27,2%), (Stahl-Biskup a Saez, 2003). V lidovém léčitelství jsou některé druhy rodu *Thymus* používány jako antihelmintikum, spasmolytikum, karminativum a expektorans, dále pro své antiseptické, antimikrobiální, antimykotické a antioxidační účinky, při léčbě kožních a revmatických potíží a proti pocení a nadýmání (Fachini-Queiroz, 2012). Tymol je spolu s karvakrolem hlavní účinnou složkou také oreganových (*Origanum* sp.) silic (Lambert et al., 2001) a byl nalezen

jako jedna z hlavních složek silic rostlin patřících do rodu *Satureja* (Čavar et al., 2008; Lang and Buchbauer, 2011).

3.2.1 Chemické vlastnosti

Tymol je bílá krystalická látka s charakteristickou fenolickotymiánovou vůní (Vonášek et al., 1987). Bod tání se nachází mezi 48°C až 51°C, počáteční bod varu při 232°C a bod vzplanutí v uzavřené nádobě při 110°C (Sigma-Aldrich). Svou chemickou strukturou je řazen mezi monoterpenické fenoly (Bakkali et al., 2008) a vyznačuje se jednou hydroxylovou skupinou navázanou na fenolickém kruhu. Dle příbalového letáku Sigma-Aldrich je při 99% čistotě zdraví škodlivý při požití, způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí a je toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky.

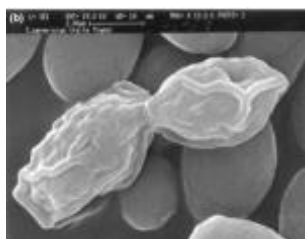


Obrázek č. 1: Vzorec tymolu (2-isopropyl-5-methylfenol) (Sigma-Aldrich)

3.2.2 Fungicidní aktivita

Mnoha autory je proklamována vysoká fungicidní aktivita silic, které jako hlavní komponentu obsahují tymol (Ahmad et al., 2010; Zambonelli et al., 2004; Tatsadjieu et al., 2007; Reichling et al., 2009). Bylo prokázáno, že fungicidní aktivita tymiánové silice je v korelaci s jejím obsahem tymolu (Zambonelli et al., 2004), přičemž v experimentu Klarić et al. (2007) prováděném na plísňích z vlhkých bytů, kde převládaly druhy rodu *Aspergillus* (44%) a *Penicillium* (18%), vykazoval třikrát větší inhibici než kompletní silice. U sedmnácti fytopatogenních hub bylo zjištěno, že tymol zcela inhibuje růst mycelia (Kordali et al., 2008) a ve studii Klarić et al., 2007, byla fungicidní aktivita tymolu dokonce vyšší než u komerčního fungicidu benomylu, který byl v experimentech používán jako kontrola. Na dermatofytních

druzích hub byla testována antimykotická aktivita tymiánové silice s obsahem tymolu 48,9%, která se ukázala účinnější než komerční fungicid bifonazol (Soković et al., 2009). Velký potenciál má tymol také při konzervaci a skladování potravin, neboť bylo zjištěno, nejen že inhibuje myceliární růst ale brzdí také produkci mykotoxinů (Vázquez et al., 2001). Fungicidní aktivita tymolu byla úspěšně testována také na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans*, kde bylo prokázáno, že tymol poškozují a deformují buněčné stěny i membrány (Bennis et al., 2004) a inhibuje H^+ -ATPázu, což vede k intracelulárnímu okyselení a buněčné smrti (Ahmad et al., 2010).



Obrázek č. 2: *Saccharomyces cerevisiae* ošetřená tymolem pod elektronovým mikroskopem (Bennis et al., 2004)

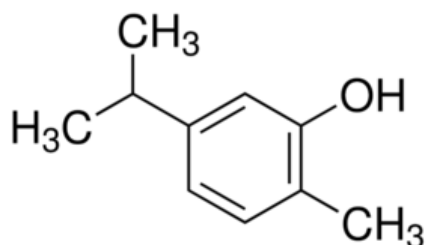
3.3 Karvakrol

Karvakrol je hlavní účinnou látkou rostlin čeledi *Lamiaceae*, většiny rodů *Origanum*, *Satureja*, *Thymus* a *Thymbra*. Mnoho zástupců obsahující ve své silici karvakrol je z čeledi *Orchideaceae* a v malém rozsahu ho najdeme u čeledi *Caryophyllaceae*, *Asteraceae*, *Primulaceae*, *Laureaceae* a *Cupressaceae* (Pherobase). Ve studii Saad et al. (2013) bylo v silici z dobromysli (*Origanum vulgare*) naměřeno 78% karvakrolu, avšak v jiných výzkumech byla u tohoto druhu ve složení silice prokázána značná variabilita. *O. vulgare* susp. *hirtum* byla velmi bohatá na silici, v některých případech bylo naměřeno až 8% a obsah karvakrolu byl v rozmezí od 2,4% až 95%, naproti tomu *O. vulgare* susp. *vulgare* obsahovala pouze malé množství silice - 0,3%, s obsahem karvakrolu pouze 0,1% (Kokkini a Vokou, 1989). Pro test antimikrobiální aktivity jednotlivých složek silice bylo u druhu *Origanum acutidens* naměřeno 87% karvakrolu, v silici *Satureja hortensis* 86,6%, *Zataria multiflora* 71,1%, *Thymus caramanicus* 68,9% a v silici druhu *Thymbra spicata* 60,4% karvakrolu (Lang a Buchbauer, 2011). Rostlinám z čeledi *Lamiaceae*, které obsahují jako hlavní složky tymol a karvakrol, jsou v lidovém léčitelství připisovány antibakteriální, antioxidační a antimykotické

účinky a používají se při léčbě dýchacích cest, jako expektorans a proti křečím (Fachini-Queiroz, 2012).

3.3.1 Chemické vlastnosti

Karvakrol je čirá nažloutlá kapalina, která vůní i některými dalšími vlastnostmi připomíná tymol. Karvakrol je sloučenina jejíž bod varu se nachází při 236-237°C, s relativní hustotou 0,976 g/cm³ při 20°C a bodem vzplanutí v uzavřené nádobě 106°C. Při 98% čistotě je zdraví škodlivý při požití a způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí (Sigma-Aldrich). Spolu s tymolem patří mezi monoterpenické fenoly (Bakkali et al., 2008), které jsou si strukturně velmi podobné, ale hydroxylovou skupinu mají navázanu na jiném místě fenolického kruhu.



Obrázek č. 3: Vzorec karvakrolu (5-isopropyl-2-methylfenol) (Sigma-Aldrich)

3.3.2 Fungicidní aktivita

Antifungální testy prokázaly, že karvakrol stejně jako tymol zcela inhibují růst sedmnácti fytopatogenních hub a jejich fungicidní účinek byl vyšší než u komerčního fungicidu benomylu (Kordali et al, 2008). Na ekologicky pěstované kukuřici byl proveden experiment proti třem patogenům rodu *Penicillium*, *Fusarium* a *Pythium*. Semena byla ošetřena osmnácti silicemi. Oreganová, saturejková i tymiánová silice, jejichž hlavní komponentou je karvakrol, působily u všech kmenů fungicidně při MIC 800 µl/L⁻¹. V testu klíčivosti ošetřených semen se na rostlinách neprojevily žádné známky fytotoxicity (Christian a Goggi, 2008). Fytotoxicita posledně zmiňovaných silic se však velmi silně projevila při testování klíčivosti na laskavci (*Amarathus retroflexus*), merlíku (*Chenopodium album*) a šťovíku (*Rumex crispus*), což poukazuje na to, že tyto látky lze použít nejen jako fungicid ale také herbicid (Kordali et al., 2008). Karvakrol je také pro své silné antimikrobiální vlastnosti používán k uchování různých

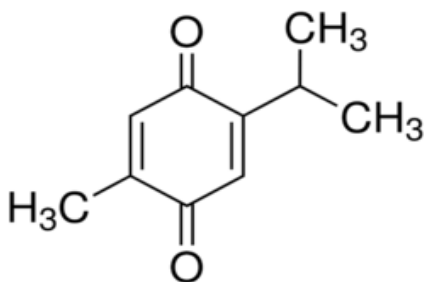
potravin a je přidáván například do pečených potravinových výrobků (až 15,74 ppm), nealkoholických nápojů (až 28,54 ppm) a žvýkaček (až 8,42 ppm), (Saad, 2013). Také se jeví jako vhodná alternativa sířičitanů při skladování hroznů, které byly inokulovány *Botrytis cinerea* a následně ošetřeny karvakrolem. Míra infekce i rozměry plochy plísně byly oproti kontrole výrazně sníženy a *in vitro* byla prokázána úplná inhibice růstu *B. cinerea* (Martínez-Romero et al., 2007). Mechanismus účinku zůstává u této složky stále plně neobjasněný, můžeme se pouze domnívat, že funguje podobně jako u tymolu a jiných fenolů. Hydrofobní molekuly pravděpodobně mohou mít vliv na biologické membrány (Saad, 2013), především narušují buněčné stěny a cytoplazmatické membrány, čímž dojde k poruchám protonové hybné síly, toku elektronů, aktivního transportu a koagulaci obsahu buněk (Burt, 2004).

3.4 Tymochinon

Obsah tymochinonu, ditymochinonu a tymohydrochinonu byl testován u 47 rostlin patřících do sedmi čeledí, které byly analyzovány pomocí GC a GC-MS. Výsledky ukázaly, že detekovatelné množství alespoň jedné z těchto sloučenin bylo zjištěno u tří druhů rodu *Monarda* (*M. didyma*, *M. media* a *M. menthifolia*) a *Thymus* (*T. pulegioides*, *T. serpyllum* a *T. vulgaris*), u dvou druhů rodu *Satureja* (*S. hortensis* a *S. montana*) a jednotlivých zástupců rodů *Eupatorium* (*E. cannabinum*), *Juniperus* (*J. communis*) a *Nigella* (*N. sativa*). Nejvyšší obsahy tymochinonu a tymohydrochinonu byly detekovány v nadzemních částech *M. media* a květenství *M. didyma* a výrazně převyšují množství těchto sloučenin nalezených v semenech *N. sativa*, které jsou obecně považovány za hlavní přírodní zdroj obou těchto sloučenin (Táborský et al., 2012). Olej ze semen *N. sativa* (černý kmín) je používán již tisíce let na blízkém i dálném východě jako koření a součást tradiční medicíny. V lidovém léčitelství je užíván jako karminativum, diuretikum, laktogogum, antihelmintikum, ale také proti horečce a zimnici, astmatu, revmatismu a jako protijed při bodnutí škorpií nebo kousnutí hadem. Z mnohých studií bylo možné prokázat, že extrakt ze semen černého kmínu se vyznačuje svými antimikrobiálními, imunostimulačními, protizánětlivými, protinádírovými a antioxidačními účinky a může být účinně používán při léčbě spasmolytických a bronchodilatačních infekčních chorob (Halawani, 2009). Požívání velkých dávek může u těhotných žen stimulovat děložní svalstvo a způsobit tak potraty (Aggarwal et al., 2009).

3.4.1 Chemické vlastnosti

Tymochinon je žlutá krystalická sloučenina, jejíž bod tání se nachází mezi 45 a 47°C, rozmezí bodu varu je 230-232°C a bod vzplanutí v uzavřené nádobě je 104°C. Tymochinon 99% čistoty může být zdraví škodlivý při požití, způsobuje podráždění kůže a očí a může způsobit podráždění dýchacích cest (Sigma-Aldrich). Tymochinon je svou chemickou strukturou řazen mezi monoterpenoidní chinony (Nickavar, et al., 2003).



Obrázek č. 4: Vzorec tymochinonu (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzochinon) (Sigma-Aldrich)

3.4.2 Fungicidní aktivita

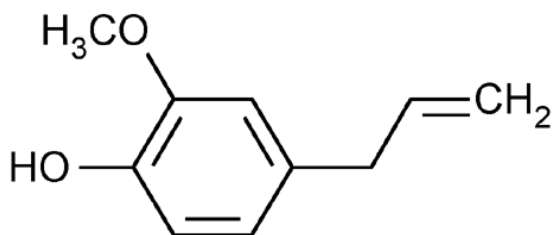
Biologická aktivita tymochinonu byla testována na houbových kmenech rodů *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* a *Issatchenkia*. Antimykotická aktivita tymochinonu byla prokázána téměř u všech testovaných patogenních hub, kromě *Candida tropicalis* a *Aspergillus flavus*. Největší antimykotická aktivita byla zjištěna proti *Candida parapsilosis* a *Cryptococcus laurentii*. V některých případech také tymochinon prokázal silnější fungicidní aktivitu, než komerční lék proti plísňovým infekcím Amfotericin B (Suthar et al., 2010). Z fytopatogenních hub byla *in vitro* prokázána úplná inhibice *Fusarium solani* i po deseti dnech při koncentraci tymochinonu 1 mg/ml⁻¹ agaru (Randhawa et al., 2005). V polním pokusu byl olej z *N. sativa* s vysokým obsahem tymochinonu testován na padlí okurkovém (*Podosharea xanthii*) a padlí ječmene (*Blumeria graminis*). Po ošetření 0,1% olejovou emulzí 2 dny po inokulaci, byla listová plocha infikovaná padlím okurkovým snížena po dvou dnech od ošetření z 54% (kontrola) na 7,7% a infikovaná plocha padlí ječmene z 63,4% (kontrola) na 9,4% z celkové listové plochy (Hafez, 2008).

3.5 Eugenol

Eugenol byl identifikován v mnoha silicích rostlin různých čeledí, například *Myrtaceae*, *Arecaceae*, *Lamiaceae*, *Orchideaceae*, *Oleaceae*, *Theophrastaceae*, *Rubiaceae*, *Laureaceae*, *Magnoliaceae* a dalších (Pherobase). Je hlavní účinnou složkou především hřebíčkové silice extrahované z květních poupat *Syzygium aromaticum* u níž byla prokázána antimikrobiální, antioxidační, antifungální a antivirová aktivita. V lidovém léčitelství jsou hřebíčkové silici připisovány protizánětlivé, cytotoxické, repelentní a anestetické vlastnosti a je používána pro lokální aplikaci k úlevě od bolesti, pro podporu hojení ran a hojně v kosmetice a parfumerii (Chaieb et al., 2007). Ve větším množství byl eugenol identifikován v rostlinách rodu *Ocimum*, v kůře rostlin rodu *Cinnamomum* (Rusu, 2007), v plodech rodu *Pimenta* (Saad, 2013), v muškátovém oříšku (*Myristica fragrans*), v kořeni kozlíku lékařského (*Valeriana officinalis*) a dalších (Rusu, 2007). Obsahy jednotlivých složek silic jsou proměnlivé, v různých studiích bylo zjištěno, že v hřebíčkové silici se nachází od 70 do 85% eugenolu, v silici z listů skořicovníku cejlonského bylo naměřeno přes 70% a v rostlinách rodu *Pimenta* (*P. dioica* a *P. racemosa*) 45-76% eugenolu (Saad, 2013; Lang, 2012).

3.5.1 Chemické složení

Eugenol je čirá světle žlutá kapalina na vzduchu a světle hnědnoucí (Vonášek et al, 1987) jehož rozmezí bodu tání je -12 až -10°C, počáteční bod varu se nachází při 254°C a bod vzplanutí v uzavřené nádobě byl stanoven při 112°C. Jak uvádí příbalový leták Sigma Aldrich je eugenol při 98% čistotě látka v přírodě snadno biologicky odbouratelná, avšak toxická pro některé ryby a vodní bezobratlé, proto je doporučeno nevypouštět jej do kanalizace a okolního prostředí. Dále je zde uvedeno, že může vyvolat alergickou kožní reakci a způsobuje vážné podráždění očí (Sigma-Aldrich). Eugenol je řazen mezi aromatické fenoly odvozené od fenylypropanu (Bakkali et al., 2008).



Obrázek č. 5: Vzorec eugenolu (2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol) (Sigma-Aldrich)

3.5.2 Fungicidní aktivita

Byla testována fungicidní aktivita hřebíčkové silice s vysokým obsahem eugenolu (85,3%) na houbových kmenech *Candida*, *Aspergillus* a dalších dermatofytech, napadajících kůži lidí a zvířat. Byla prokázána úplná inhibice růstu všech testovaných kmenů, kdy mechanismus účinku na kvasinkách a vláknitých houbách byl testován průtokovou cytometrií a testem inhibice syntézy ergosterolu (specifické složky buněčných membrán hub). Výsledky ukázaly, že po ošetření eugenolem došlo ke značnému snížení množství ergosterolu a tím k rozpadu buněčných membrán (Pinto et al., 2009). Eugenol vykazoval vysokou fungicidní aktivitu také u fytopatogenních hub. Byly testovány jeho účinky na kmenech *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium moniliforme* a *Rhizoctonia solani*, po jehož aplikaci došlo po 24 hodinách k rozpadu spor a po 96 hodinách byla detekována úplná inhibice růstu mycelia (Thobunluepop, 2008). Eugenol by také mohl být vhodnou alternativou při léčbě kvasinkových infekcí, bylo prokázáno, že inhibuje růst buněk *Candida albicans*, přičemž byla testována i hemolytická aktivita na lidských erytrocytech, která se jevila jako velmi nízká (On et al., 2007).

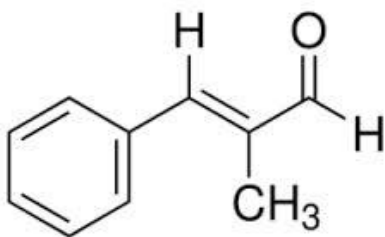
3.6 Cinnamaldehyd

Cinnamaldehyd byl detekován v silicích mnoha rostlin z čeledi *Orchideaceae*, u některých druhů z čeledi *Apiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Fabaceae*, *Oleaceae*, *Magnoliaceae*, v některých druzích tabáku (*Nicotiana* sp.) z čeledi *Solanaceae* a dalších (Pherobase). Z mnoha studií je známo, že cinnamaldehyd je hlavní účinnou složkou silic nejčastěji extrahovaných z rostlin čeledi *Laureaceae*, především ze skořicové kůry (*Cortex Cinnamomi*) získávané ze

skořicovníku čínského (*Cinnamomum cassia*), který je používán spíše v tradiční čínské medicíně a skořicovníku pravého (*Cinnamomum verum*), dobře známého a používaného téměř po celém světě. Destilací byla izolována silice z kůry skořicovníku čínského a pomocí GC-MS stanoven poměrně vysoký obsah cinnamaldehydu - 85% (Ooi et al., 2006), obvykle se obsah pohybuje okolo 75% (Parthasarathy et al., 2008). V listech skořicovníku je hlavní komponentou eugenol, tvořící okolo 70% silice (Senanayake, 1978). Skořice je používána jako koření i v tradiční medicíně po celá staletí (Gruenwald et al., 2010) a v současnosti je skořicová silice hojně využívána v parfumerii, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Skořicovou kůru můžeme nalézt v mnoha kořenících směsích, jako je kari, indické koření garam masala nebo ve směsi na svažené víno. Léčebné účinky skořice jsou známy již z Ajurvédských spisů, ve farmacii a lidovém léčitelství je skořicová silice používána proti astmatu a kašli, při potížích gastrointestinálního traktu a také je známo její působení jako diuretikum, spasmolitikum a hemostatikum. Pro své prohřívací vlastnosti je podávána při zimnici a proti revmatismu (Ravindran et al., 2003). Z experimentů *in vitro* a na zvířatech *in vivo* bylo prokázáno, že skořice má protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální, protinádorové, imunomodulační účinky a podílí se na snižování hladiny cholesterolu v krvi. Dále experimenty na zvířatech prokázaly její silné hypoglykemické vlastnosti (Gruenwald et al., 2010). Skořicová silice a cinnamaldehyd jsou také dobře známy jako insekticid, především proti larvám mravenců (Koul et al., 2008).

3.6.1 Chemické vlastnosti

Cinnamaldehyd je těkavá žlutá kapalina s typickou skořicovou vůní (Vonášek et al., 1987). *Trans*-cinnamaldehyd je jediná forma přirozeně se vyskytující v rostlinách, jehož bod tání byl stanoven při -7,5°C, bod varu při 248°C a bod vzplanutí v uzavřené nádobě při 71°C. Jeho relativní hustota byla naměřena 1,050 g/cm³. Výrobce uvádí, že při 98% čistotě způsobuje podráždění kůže, vážné podráždění očí a může vyvolat kožní alergickou reakci (Sigma-Aldrich). Chemickou strukturou je řazen mezi aromatické sloučeniny odvozené od fenylypropanu s aldehydovou skupinou (Bakkali et al., 2008).



Obrázek č. 6: Vzorec cinnamaldehydu (*trans*-3-phenyl-2-propenal) (Sigma-Aldrich)

3.6.2 Fungicidní aktivita

Čínští vědci Ooi et al. (2006) testovali antimikrobiální aktivitu silice skořicovníku čínského a čistého cinnamaldehydu. U různých izolátů bakterií (1 izolát Gram-pozitivní a 7 izolátů Gram-negativní) bylo prokázáno, že silice i čistý cinnamaldehyd vykazovaly při inhibici růstu stejnou účinnost, což potvrzuje, že za antimikrobiální aktivitu skořicové silice je zodpovědný právě cinnamaldehyd. Současně byla testována jeho fungicidní aktivita u čtyř druhů rodu *Candida*, u třech druhů rodu *Aspergillus*, jednoho druhu rodu *Fusarium* a u třech druhů dermatofytických hub. Výsledky prokázaly, že silice i cinnamaldehyd vykazovaly nejvyšší fungicidní aktivitu u fytopatogenních a dermatofytických hub. U bakterií a kvasinek musely být pro totální inhibici aplikovány mnohem vyšší koncentrace. Ve studii Ranasinghe et al. (2002) bylo prokázáno, že skořicovou i hřebíčkovou silici lze použít pro posklizňové ošetření proti houbovým chorobám banánu: antraknóze slupky (*Colletotrichum musae*) a hnilobám věnce banánového souplodí (*Lasiodiplodia theobromae*, *C. musae*, *Fusarium proliferatum*); na místo Benomylu, kterého bylo pro zajištění úplné inhibice zapotřebí mnohem vyšší dávky.

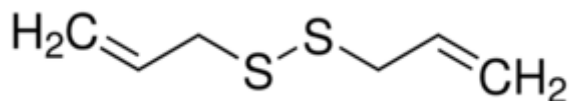
3.7 Diallyl disulfid

Diallyl sulfidy (diallyl sulfid, diallyl disulfid (DD), diallyl trisulfid, diallyl tetrasulfid) byly detekovány jako jedny z hlavních účinných sloučenin rostlin čeledi *Alliaceae*, především, česneku (*Allium sativum*), pažitky (*Allium schoenoprasum*), cibule (*Allium cepa*), póru (*Allium porrum*) a dalších. Česnek obsahuje biologicky aktivní a silně charakteristicky páchnoucí allicin, který je tvořen enzymem aliinázou z nepáchnoucího aliinu, tedy, je-li česnek rozdrcen (Lapčík et al., 2011). Allicin se při teplotě 25°C po 24 hodinách rozkládá na

diallyl sulfidy (Brodnitz et al., 1971). Pomocí kapalné chromatografie byl v česnekové silici zjištěn obsah 53,6% sirných sloučenin, z nichž největší podíl zaujímá DD (24%) a u pažitkové silice byl zjištěn obsah 42,3% sirných sloučenin, kdy obsah DD (18,9%) také zaujímal největší podíl (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008). Klouček et al. (2011) naměřili v česnekové silici pomocí GC-MS 43,8% DD a 27,1% diallyl trisulfidu. Při testech antimikrobiální aktivity na bakteriích způsobujících choroby z kontaminovaných potravin byla prokázána nejvyšší účinnost u diallyl tetrasulfidu. Bylo zjištěno, že čím vyšší je počet sirných atomů v řetězci sloučenin, tím vyšší je i jejich antimikrobiální aktivita (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008). Téměř po celém světě jsou již výše zmiňované rostliny z čeledi *Alliaceae* využívány jako součást tradiční kuchyně i medicíny. Bylo zjištěno, že česnek setý působí jako analgetikum a byly prokázány jeho protizánětlivé, antimykotické, antioxidační a antikancerogenní účinky. U cibule kuchyňské bylo zjištěno její antiseptické, diuretické a protinádorové působení a bylo prokázáno, že se podílí na snižování hladiny cholesterolu v krvi a má antialergenní, antiastmatické a protizánětlivé účinky. Při studiích pažitky bylo zjištěno, že účinkuje jako antihelmintikum, karminativum, diuretikum a antiseptikum (Ramawat and Merillon, 2013).

3.7.1 Chemické vlastnosti

Diallyl disulfid je těkavá sirná bezbarvá až nažloutlá kapalná sloučenina s charakteristickou česnekovou vůní (Vonášek et al., 1987). Rozmezí počátečního bodu varu bylo stanoveno mezi 180 až 195°C a bod vzplanutí v uzavřené nádobě při 62°C. Výrobce uvedeno, že již při 80% čistotě je toxický při požití (LD₅₀ u krysy při orální aplikaci - 260 mg/kg), dráždí kůži (LD₅₀ u králíka při kožní aplikaci - 3,6 mg/kg) a způsobuje vážné podráždění očí (Sigma-Aldrich).



Obrázek č. 7: Vzorec diallyl disulfidu (4,5-dithia-1,7-octadien) (Sigma-Aldrich)

3.7.2 Fungicidní aktivita

Klouček et al. (2011) testovali fungicidní aktivitu šedesáti devíti silic v plynné fázi, z nichž česneková silice s obsahem 43,8% DD vykazovala oproti ostatním testovaným silicím vysokou fungicidní aktivitu. Silice byla testována na kmenech *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* a *Penicillium digitatum* a MIC byla stanovena při 31,25 $\mu\text{l/l}^{-1}$ u všech třech testovaných kmenů. Silice rostlin čeledi *Alliaceae* byly testovány Pyun and Shin (2006) na třech druzích rodu *Trichophyton* způsobujících závažné mykózy u lidí. Nejsilnější inhibiční aktivitu vykazovala česneková silice, zatímco silice cibule kuchyňské a cibule zimní jen velmi mírnou.

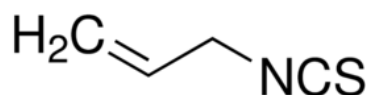
3.8 Allyl isothiokyanát

Bylo zjištěno, že allyl isothiokyanát (štiplavá složka hořčičného oleje) vzniká jako hlavní produkt při pH 4 a vyšším enzymatickou hydrolýzou allyl glukosinolátů především sinigrinu, obsažených v pletivech rostlin čeledi *Brassicaceae*. Sinigrin byl identifikován jako hlavní glukosinolát v hořčičném semínku u druhů *Brassica nigra*, *B. carinata* a *B. juncea* (Mayton et al., 1996; Pecháček et al., 2000). Také v kořeni i nadzemních částech křenu selského (*Armoracia rusticana*) byl zjištěn obsah devíti glukosinolátů, z nichž sinigrin při analýze plně vyvinutého kořene představoval 83% (Li and Kushad, 2004). Glukosinoláty a jejich rozkladné produkty jsou již dlouho známy pro své baktericidní, fungicidní, nematocidní a allelopatické účinky a v poslední době je věnován velký zájem výzkumu jejich chemoprotektivních účinků a působení na rakovinné buňky (Fahey et al., 2001). Rozumný příjem glukosinolátů a jejich rozkladných produktů (indoly, isothiokyanáty aj.) v potravě může být pro organismus velmi prospěšný, však při nadměrném a dlouhodobém příjmu, by mohlo dojít k hypertrofii štítné žlázy, ke snížení produkce thyroxinu T4, poškození jater a v některých případech ke snížení plodnosti (Lapčík et al., 2011).

3. 8. 1 Chemické vlastnosti

Allyl isothiokyanát je čirá kapalná látka se světle žlutým zabarvením a silným zápachem. Jeho počáteční bod varu byl stanoven při 150°C, bod tání při -80°C a relativní hustota je 1,013 g/cm³ při 25°C. Při 97% čistotě je toxický po požití (LD₅₀ u krysy při orální aplikaci -

112 mg/kg) a při vdechování, dráždí kůži a její potřísnění touto sloučeninou může vyvolat alergické reakce, dokonce i smrt (LD₅₀ u králíka při kožní aplikaci - 88 mg/kg). Způsobuje vážné podráždění očí a při vdechování může vyvolat příznaky alergie, astmatu nebo dýchací potíže. Je vysoce toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky (Sigma-Aldrich).



Obrázek č. 8: Vzorec allyl isotiokyanátu (3-isothiocyantopropen) (Sigma-Aldrich)

3. 8. 2 Fungicidní aktivita

Klouček et al. (2011) testovali antimikrobiální aktivitu křenové silice s obsahem 63,7% allyl isotiokyanátu u třech plísní (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* a *Penicillium digitatum*) a třech bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* a *Pseudomonas aeruginosa*). U všech testovaných kmenů byla prokázána silná inhibiční aktivita při MIC 31,25 ul/l⁻¹ vzduchu, podobně jako u česnekové a skořicové silice. MIC ostatních šedesátišesti testovaných silic se pohybovala ve stovkách ul/ l⁻¹ vzduchu. Také ve studii Mari et al. (1993) byla testována inhibice růstu mycelia a klíčení konidií pěti fytopatogenních hub, pomocí různých isotiokyanátů odvozených z šesti přírodních glukosinolátů. Isotiokyanáty odvozené od Glukorafeninu, sinalbinu a sinigrinu se jeví jako zvláště účinné při inhibici klíčení konidií u všech pěti testovaných hub (*Botritis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Monillnia laxa*, *Mucor piriformis* a *Penicillium expansum*). Isotiokyanáty ze sinigrinu inhibovaly i růst mycelia, buď zcela, nebo se zpožděním 3-6 dní proti kontrole. Glukosinoláty a jejich deriváty jsou pro svou toxicitu a repelentní účinky řazeny mezi přírodní pesticidy, které si vyšší rostliny produkují ke zvýšení odolnosti proti nepříznivým vlivům predátorů, konkurentů a parazitů. Jejich používání v integrované a biologické ochraně rostlin se jeví jako vhodná alternativa chemických fungicidů.

3. 9 Enkapsulace těkavých látek do porézních materiálů

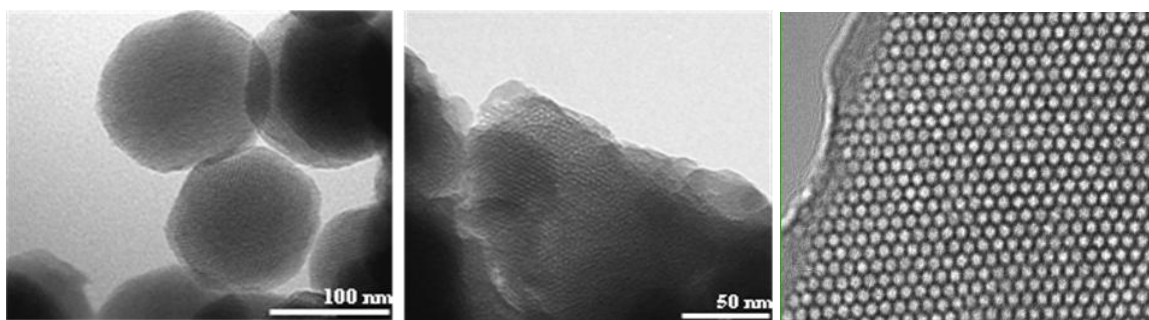
Enkapsulace, neboli zapouzdření, je obecně proces, při kterém je chráněno aktivní jádro a zachovávány jeho přirozené vlastnosti, přičemž malé molekuly různých materiálů mohou pronikat ven i dovnitř skrze póry ve stěně nano-, mikro- či makrokapsuly. Zapouzdřené materiály můžeme přirozeně nalézt v přírodě, například ptačí vejce, mušle či spory bakterií, hub, řas, rostlin a prvků. Za jednu z prvních technologií makroenkapsulace lze pokládat posmrtnou mumifikaci lidských těl ve starověkém Egyptě. Zapouzdřování do mikrokapsulí bylo vyvinuto pro ochranu a zachování účinnosti syntetických, rostlinných a živočišných bioaktivních látek (Kailasapathy, 2009).

V současné době představují nové a převratné možnosti rozvoje v mnoha oborech lidské činnosti nanotechnologie a nanomateriály. Očekává se, že nanomateriály přinesou revoluci především v medicíně, neboť díky své velikosti vykazují schopnost prostupovat buněčné membrány a sloužit tak jako nosiče léčiv nebo kontrastní látky v lékařské diagnostice. Tyto technologie a materiály již začaly být využívány v mnoha spotřebitelských produktech ke zlepšení jejich povrchových a fyzikálních vlastností. Mají velký potenciál v potravinářství, zejména jako komponenty obalových materiálů zajišťujících konzervaci potravin (Filipová et al, 2012). Pro zemědělství by enkapsulace přírodních i syntetických pesticidů do porézních materiálů mohla mít zásadní význam, spočívající v řízeném uvolňování těchto látek dle potřeb vegetace a v důsledku toho snížení znečištění životního prostředí. Je známo mnoho materiálů, které by mohly být vhodnými nosiči těkavých látek. Jsou to polysacharidy (např. cyklodextriny), přírodní polymery a křemičité mezoporézní materiály (Prado et al., 2011). Tradiční systémy nosičů jsou ve většině případů na bázi polymerů, které obvykle uvolňují svůj obsah řízenou difúzí nebo degradací polymerického nosiče. V posledních letech byly jako alternativa polymerů vyvinuty anorganické mezoporézní materiály na bázi oxidu křemičitého, jejichž příprava je snadná a struktura pórů umožňuje snadné ukládání i uvolňování léčiv a organických molekul (Bernardos et al, 2010). Za objevitele mezoporézních křemičitanů je považována americká firma Mobil, která v roce 1991 patentovala syntézu těchto materiálů. První syntéza křemičitanových materiálů s organizovanou strukturou však byla patentována již o 20 let dříve, ale autoři materiál dostatečně neprozkoumali a nebyli si vědomi významu svého objevu (Zukal, 2007). Mezoporézní nosiče oxidu křemičitého jsou schopné zajistit jedinečné funkce, jako je stabilita, biokompatibilita, velká kapacita a možnost

uzavřít póry organickými látkami (polysacharidy, peptidy aj) a na potřebnou dobu tak zabránit úniku uloženého materiálu (Bernardos et al, 2010).

3. 9. 1 MCM-41

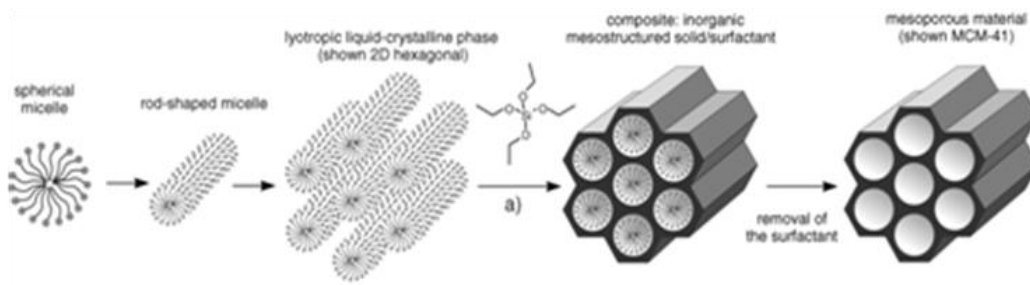
MCM-41 je název pro mezoporézní nanočástice a mikročástice čistého oxidu křemičitého. Zkratka MCM je někdy vysvětlována jako: „Mobil Composition of Matter“. V současné době je jediným mezoporézním molekulovým sítem, jehož porézní struktura byla plně identifikována. Struktura je tvořena rovnoběžnými kanály, které mají přibližně šestiúhelníkový průřez a jsou uspořádány do hexagonální voštinové struktury (Rathouský et al., 1997). Je syntetizován pomocí koloidního roztoku oxidu křemičitého tetraethylortosilikátu (TEOS), který slouží jako anorganický prekurzor a hexadecyltrimethylamonium bromidu (CTAB), který utváří požadovanou strukturu. Velikost nanočástic MCM-41 se obvykle pohybuje v rozmezí od 50 do 120 nm a velikost mikročástic v rozmezí od 150 do 1000 nm. Póry jsou uniformní o průměru 2-3 nm (Bernardos et al., 2012) a tloušťka jejich stěn se pohybuje v rozmezí 0,8-1 nm. Relativně tenké stěny ve srovnání s průměrem pórů způsobují, že texturní parametry molekulového síta MCM-41 nabývají vysokých hodnot. Plocha povrchu kanálů dosahuje až $1100 \text{ cm}^2/\text{g}^{-1}$ a jejich objem kolísá mezi $0,8\text{-}0,9 \text{ cm}^3/\text{g}^{-1}$ (Rathouský et al., 1997). Přítomnost silanolových skupin na povrchu MCM-41 umožňuje ukotvení uzavíracího systému (polysacharydy, peptidy aj.) a zabránění tak předčasnému uvolňování enkapsulovaných látek (Bernardos et al., 2012).



Obrázek č. 9: Velikost nanočástic MCM-41(vlevo), velikost mikročástic MCM-41 (uprostřed) a struktura pórů MCM-41 (vpravo) pod elektronovým mikroskopem (Bernardos et al., 2008; Bernardos et al., 2012).

Syntéza MCM-41

Syntéza MCM-41 probíhá pomocí reakčního činidla za přítomnosti křemičitanových aniontů a tetraalkylamoniových tenzidů (např. CTAB), jejichž micely jsou šablonou, kolem níž se vytvářejí stěny pórů (Zukal, 2007). Pro přípravu MCM-41 byl jako reakční činidlo použit triethanolamin (TEAH_3). Molární poměr reakčních složek v roztoku byl stanoven na 8 TEAH_3 :2 TEOS :0,52 CTAB :0,5 NaOH :180 H_2O . Při teplotě 70°C je k roztoku TEAH_3 přidán TEOS a vzniklá směs je míchána 24 hodin, čímž je zajištěna dostatečná koncentrace křemičitanových aniontů. K této směsi je při 118°C za stálého míchání přidán CTAB a po hodině je při 70°C za intenzivního míchání pomalu přidávána destilovaná voda. Po několika minutách se vytvoří bílá suspenze, která je ponechána odstát 24 hodin při pokojové teplotě. Výsledný prášek je pak oddělen filtrací, promyt od reakčního činidla (TEAH_3) destilovanou vodou a etanolem a vysušen při 70°C . Závěrečným krokem syntézy MCM-41 je odstranění micel surfaktantu (CTAB), které vyplňují póry připraveného materiálu. Tento krok se provádí tzv. kalcinací, kdy je materiál ponechán na vzduchu při teplotě 550°C po dobu 5 hodin (Bernardos et al., 2008).

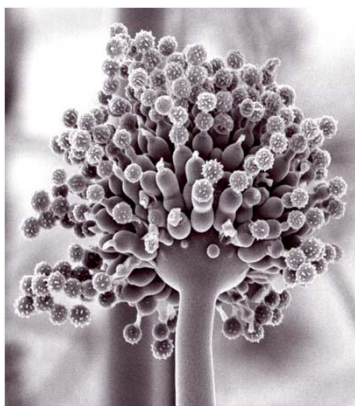


Obrázek č. 10: Schéma syntézy MCM-41 (Hoffmann et al., 2006).

3.10 *Aspergillus niger*

Plísně, přesněji vláknité mikromycety, patří k nejstarším živým organismům na Zemi. V současné době je známo více než 100000 druhů plísní, z nichž nejčastěji se vyskytující patří do rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (Dohnal a Jun, 2012). *Aspergillus niger* (*A. niger*) patří mezi nejrozšířenější druhy rodu *Aspergillus* a mnoho kmenů *A. niger* bylo izolováno po celém světě. Je řazen do čeledi plísnivkovité (*Trichocomaceae*), řádu

plesnivkotvaré (*Eurotiales*), třídy *Eurotiomycetes* z oddělení hub vřeckovýtrusých (*Ascomycota*). Své druhové jméno tento kmen dostal podle barvy konidií, které v rámci nepohlavního rozmnožování vytváří (Schuster et al., 2002). Řetízky konidií (spor) jsou tvořeny na konidioforech, které vyrůstají z přehrádkovaného mycelia a skládají se ze stopky, měchýřku, metul a fialid (Broderick a Greenshields, 1981). Je to aerobní vláknitá houba, která se v přírodě vyskytuje v půdě, kompostech a na rozkládajících se rostlinných zbytcích. *A. niger* je nenáročný na podmínky prostředí, je schopen růst ve velmi širokém rozmezí teplot (6-47°C), kdy optimální je 35-37°C a snáší také extrémní pH (1.4-9.8). Díky této schopnosti a vysoké produkci konidií, které jsou šířeny vzduchem, je zajištěna jeho všudypřítomnost (Schuster et al., 2002). Ze studie Klarić et al. (2007) je známo, že se může vyskytovat a šířit například na zdech ve vlhkých prostorech. V teplém a vlhkém prostředí je sporulace zvýšena (Schuster et al., 2002).



Obrázek č. 11: Konidiofor sporulujícího *A. niger* pod elektronovým mikroskopem (Hertz-Fowler a Pain, 2007)

A. niger je významným patogenem ovoce a zeleniny, zejména v posklizňovém období a dalších skladovaných zemědělských produktů, jako je osivo, rýže, káva, ořechová jádra, slunečnicová semínka a jiné substráty. (Krijgsheld, 2013). *A. niger* i ostatní druhy plísní mají extracelulární trávení, do substrátu vylučují trávicí enzymy, které degradují organickou hmotu, a tráveninu pak zpětně resorbují. Jejich působením na substrát dochází ke změně jeho organoleptických vlastností a jsou snižovány nutriční hodnoty substrátu, především aminokyselin, sacharidů a tuků (Dohnal a Jun, 2012). Mnohem závažnější je však produkce toxických sekundárních metabolitů – mykotoxinů. Bylo prokázáno, že některé kmeny *A. niger*

produkují ochratoxin A (Schuster et al., 2002). Z mnohých studií bylo zjištěno, že ochratoxin A poškozuje ledviny, má karcinogenní a teratogenní účinky (poruchy centrální nervové soustavy u plodu) a potlačuje funkce imunitního systému (Kuiper-Goodman a Scott, 1989). U pacientů s narušenou imunitou se mohou vyskytnout alergie na spory *A. niger* a různé aspergilózy, například plicní infekce nebo infekce zvukovodu, která se vyskytuje hlavně v tropických oblastech (Schuster et al., 2002).

V průmyslové výrobě slouží *A. niger* jako buněčná továrna na výrobu enzymů. Tyto enzymy se používají například do ovocných šťáv, při výrobě sýrů, k degradaci fytátu v krmivech aj. V roce 1917 bylo prokázáno, že *A. niger* také produkuje velké množství kyseliny citrónové (Krijgsheld, 2013) a v současné době představuje 99% její celosvětové produkce (Dohnal a Jun, 2012).

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie a biologický materiál

Tymol 99% (THY), karvakrol 98% (CARV), tymochinon 99% (TQ), eugenol 99% (EUG), trans-cinnamaldehyd 99% (CA), diallyl disulfid 80% (DD) a allyl isothiokyanát 98% (AI) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (CZ). MCM-41 bylo vyrobeno v laboratoři ČZU Andreou Bernardos Ph.D ve spolupráci s Polytechnickou univerzitou ve Valencii, ESP. *Aspergillus niger* (A. niger) ATCC 6275 byl zakoupen z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovi univerzity v Brně, CZ. Pro kultivaci (*A. niger*) byly jako živná media použity Sabouraud Dextrose agar (SDA) a Mueller-Hinton bujón (MHB) od firmy Oxoid (Brno, CZ).

4.2 Enkapsulace

V poměru 1:1 bylo do 2 ml viálek (Chromservis s.r.o., CZ) naváženo 10 mg MCM-41 a přidáno 10 mg vybrané sloučeniny, viálky byly vloženy do vortexu a za stálého třepání ponechány 24 hodin v sušárně při teplotě 40°C. Pro ověření, že byly látky enkapsulovány, byl materiál charakterizován infračervenou spektroskopií a GC-MS.

4.3 Příprava inokula *Aspergillus niger*

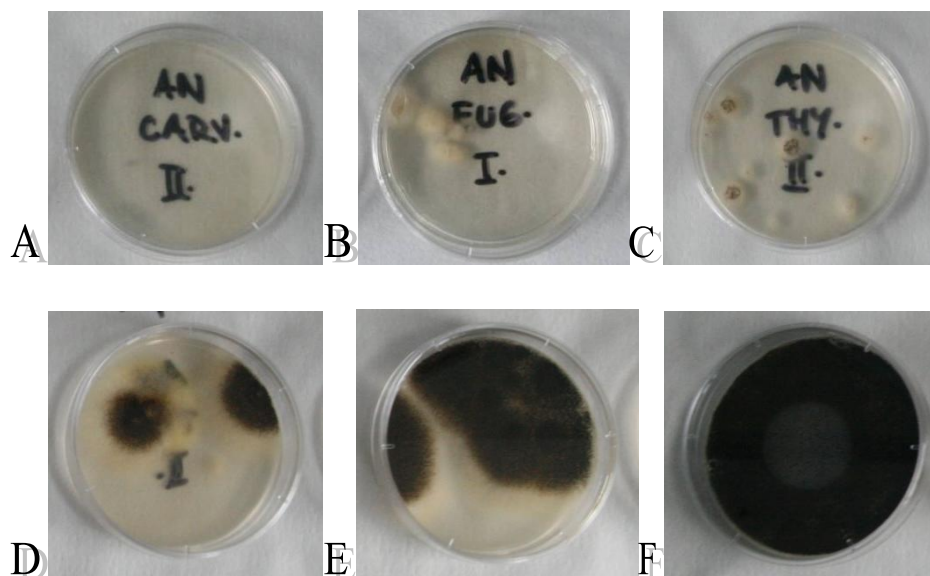
Na plíseň s plně vyzrálými černými konidiofory bylo kápnuto 0,65 ml MHB a kapka smáčedla (Tween 80). Do tohoto roztoku byly pomocí injekční stříkačky s jehlou lehce uvolněny černé konidie a přeneseny do zkumavky s 2 ml MHB, která byla proměřena na Densi-La-Metru. Roztok s konidii byl do zkumavky přidáván tak, aby hodnota na Densi-La-Metru byla o 0,5 McFarlanda vyšší, než hodnota čistého MHB, což by mělo odpovídat 10^6 KTJ.ml⁻¹ (kolonie tvořící jednotky).

4.4 Test antifungální aktivity

Test byl prováděn *in vitro* v Petriho miskách o průměru 60 mm. Do každé misky bylo nalito 5 ml SDA, jako živné medium pro *A. niger*. Antifungální aktivita enkapsulovaných výše zmíněných těkavých látek z rostlin byla porovnávána v dávkách 0,5 mg, 1 mg, 2 mg a 4 mg se stejnými dávkami látek v čisté formě. Enkapsulované i čisté látky byly aplikovány v přímém kontaktu s inokulem *A. niger* a lehkým protřepáním rovnoměrně rozptýleny po agaru. Inokula byla aplikována 1 kapka (0,05 ml), což odpovídá přibližně 25000 spor v jedné Petriho misce. Před aplikací byly enkapsulované látky rozptýleny v 0,5 ml MHB a látky ve formě čisté byly pro svou hydrofobnost rozpuštěny ve 30 µl dimethylsulfoxidu (Penta, CZ) a 150 µl MHB. Kontrolní Petriho misky byly očkovány stejně, ale nebyly ošetřeny rostlinnými látkami. Ošetřené inokulované Petriho misky a neošetřené kontroly byly vloženy do tmavého boxu a ponechány při teplotě 25°C. Všechny vybrané látky všech stanovených dávek byly testovány ve třech opakováních. Stupeň nárůstu plísně byl hodnocen vizuálně a dokumentován fotoaparátem po třech, šesti a čtrnácti dnech. Misky s koncentracemi látek, které zůstaly po čtrnácti dnech zcela bez nárůstu *A. niger*, byly podruhé přeočkovány inokulem *A. niger* a opět byly hodnoceny a dokumentovány. Několik málo vzorků zůstalo čistých i po čtrnácti dnech od druhého přeočkování, tzn. po měsíci od ošetření. Stupeň nárůstu plísně byl hodnocen dle stupnice uvedené v tabulce č. 1. Ze zjištěných hodnot (viz přílohy: tabulka č. 1), byly vybrány mediány, které jsou uvedeny v tabulce č. 2 (viz přílohy), ze které byly stanoveny MID (minimální inhibiční dávky) vybraných látek (tabulka č. 2)

Tabulka č. 1: Stupnice pro vizuální vyhodnocení nárůstu *A. niger*

Stupeň nárůstu		Charakteristika
0	žádný	0% celkové plochy (CP) porostlé myceliem
1	velmi slabý	do 25% (CP) porostlé bílým myceliem bez konidioforů
2	slabý	do 25% (CP) porostlé bílým myceliem, začínající tvorba konidioforů
3	střední	do 50% (CP) porostlé myceliem s černými konidiofory
4	silný	nad 50% (CP) porostlé myceliem s černými konidiofory
5	velmi silný	od 95% (CP) porostlé myceliem s černými konidiofory



Obrázek č. 12: Stupnice pro vizuální hodnocení nárůstu *A. niger*: A) 0 – žádný, B) 1 – velmi slabý, C) 2 – slabý, D) 3 – střední, E) 4 – silný, F) velmi silný

4. 5 Test rychlosti evaporace

Byla sledována a porovnávána rychlost evaporace sedmi vybraných těkavých látek enkapsulovaných do mezoporézního materiálu MCM-41 a látek v čisté formě. Rychlost evaporace byla sledována při dvou různých teplotách, při teplotě 25°C (vhodné pro kultivaci hub a plísní) a teplotě 37°C (vhodné pro kultivaci bakterií). Jednotlivé látky byly naváženy na malá hodinová sklíčka ve třech opakováních. Navážka enkapsulovaných látek v poměru 1:1 činila 20 mg, tzn. 10 mg čisté sloučeniny a navážka látek v čisté formě činila 10 mg. Sklíčka s navážkou byla opětovně vážena po 24, 48, 72 a 144 hodinách. Ze třech opakování navážených hodnot přepočtených na % odpařené sloučeniny, byla vypočtena průměrná rychlost evaporace jednotlivých látek.

5 Výsledky

5.1 Antifungální aktivita

Antifungální aktivita byla ověřena u všech testovaných látek. Jak je patrné z tabulky č. 1 (viz přílohy), testované látky buď zcela inhibovaly, nebo omezily či zpomalily klíčení konidiospor *A. niger*. Fungicidní aktivita proti *A. niger* byla potvrzena u pěti ze sedmi testovaných látek, tymolu, karvakrolu, tymochinonu, eugenolu a cinnamaldehydu, kdy ošetřené Petriho misky těmito sloučeninami nebyly ani po 14 dnech porostlé *A. niger* (viz přílohy: tabulka č. 1). Hlavním cílem této práce bylo porovnat fungicidní a antifungální aktivitu vybraných látek v čistém stavu s látkami enkapsulovanými. Z tabulky č. 2 je zřejmé, že karvakrol a cinnamaldehyd účinkují proti *A. niger* stejně jak v čistém, tak i enkapsulovaném stavu. Karvakrol s MID 0,5 mg a cinnamaldehyd s MID 1 mg. Tymol, tymochinon a eugenol jsou prokazatelně účinnější ve stavu enkapsulovaném (tabulka č. 2). Kontrolní varianty byly vždy již po třech dnech zcela (100%) porostlé.

Úplnou inhibiční aktivitu při všech testovaných dávkách (0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg), ve třech opakováních vykazoval karvakrol v enkapsulovaném i čistém stavu (viz přílohy: tabulka č. 1) Na žádné misce nebyl ani po čtrnácti dnech patrný náznak nárůstu mycelia *A. niger*. MID karvakrolu v enkapsulovaném i čistém stavu proti *A. niger* je tedy rovna 0,5 mg nebo nižší (tabulka č. 2).

Tymol vykazoval úplnou inhibiční aktivitu i po čtrnácti dnech ve všech testovaných dávkách pouze v enkapsulovaném stavu, MID je tedy rovna 0,5 mg tymolu v silikátu nebo nižší. Tymol v čistém stavu při nejnižší dávce (0,5 mg) zcela inhiboval nárůst *A. niger* pouze po 3 dny, 6. den bylo k úplné inhibici zapotřebí 2 mg a 14. den 4 mg tymolu. Tymolu v čistém stavu je pro úplnou inhibici zapotřebí osm krát vyšší dávky, než tymolu enkapsulovaného (tabulka č. 2).

Tymochinon v silikátu byl zcela účinný při dávce 1 mg po 3, 6 i 14 dnech. V čistém stavu účinkoval tymochinon i při dávce 0,5 mg, ale pouze 3 dny. 6. den bylo zapotřebí 1 mg k úplné inhibici a po 14 dnech neúčinkoval vůbec, ani při dávce nejvyšší (tabulka č. 2).

Enkapsulovaný eugenol byl účinný po 3 i 6 dnech při MID 1 mg. Po 14 dnech bylo k úplné inhibici zapotřebí dávky 2 mg eugenolu v silikátu. V čistém stavu byl eugenol účinný po 3 dny při dávce 0,5 mg. Pro jeho účinnost 6. a 14. den bylo zapotřebí 4 mg této sloučeniny, což

je dvakrát vyšší dávka, než která stačila k úplné inhibici u eugenolu enkapsulovaného (tabulka č. 2).

Cinnamaldehyd účinkoval velmi podobně v enkapsulovaném i čistém stavu. Po 3 dnech stačila k úplné inhibici *A. niger* u obou dvou variant dávka 0,5 mg. Po 6 dnech lépe účinkoval cinnamaldehyd v čistém stavu při MID 0,5 mg, kdyžto enkapsulovaného bylo zapotřebí MID 1 mg. Po 14 dnech byla MID obou variant 1 mg (tabulka č. 2).

Diallyl disulfid a allyl isotiokyanát se jeví jako nejméně účinné, spíše neúčinné. Inhibičně působily pouze po 3 dny v enkapsulovaném stavu při dávce 1 mg, 2 mg a 4 mg (tabulka č. 2). 6. den byly všechny Petriho misky obou sloučenin celé (100% CP) porostlé *A. niger* (viz přílohy: tabulka č. 1), až na enkapsulovaný allyl isotiokyanát při MID 4 mg (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: MID (mg) vybraných sloučenin v enkapsulovaném a čistém stavu testovaných na *A. niger*, hodnocené po 3, 6 a 14 dnech (tabulka vychází z nulových hodnot v tabulce č. 1 uvedené v přílohách).

Minimální inhibiční dávky látek v enkapsulovaném a čistém stavu (mg)						
	3. den		6. den		14. den	
	enkaps.	čistý	enkaps.	čistý	enkaps.	čistý
Tymol	0,5	0,5	0,5	2	0,5	4
Karvakrol	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tymochinon	1	0,5	1	1	1	N
Eugenol	1	0,5	1	4	2	4
Cinnamaldehyd	0,5	0,5	1	0,5	1	1
Diallyl disulfid	1	N	N	N	N	N
Allyl isotiokyanát	1	N	4	N	N	N

N – *Aspergillus niger* nebyl inhibován ani nejvyšší testovanou dávkou

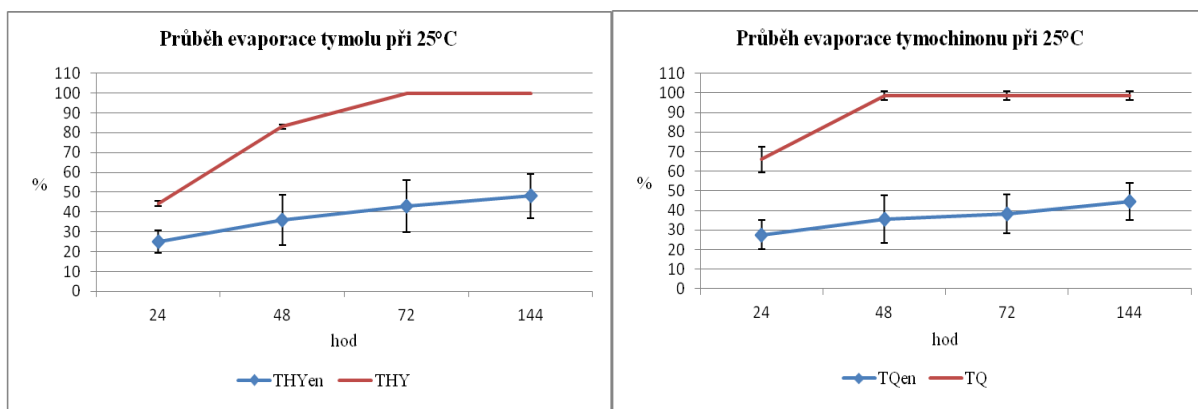
Po čtrnácti dnech zůstaly zcela bez nárůstu Petriho misky ošetřené enkapsulovaným tymolem a tymochinonem při dávkách 1 mg, 2 mg a 4 mg a enkapsulovaným eugenolem při dávkách 2 mg a 4 mg. Tyto varianty byly proto znovu zaočkovány inokulum *A. niger*. Po

třech dnech byly misky ošetřené eugenolem všechny zcela bez nárůstu mycelia *A. niger* ve všech třech opakováních. Misky ošetřené tymolem při koncentraci 1 mg byly ve všech třech opakováních zcela porostlé myceliem s černými konidiosporami a při dávkách 2 mg 4 mg byly bez nárůstu (viz přílohy: obrázek č. 1). Misky ošetřené tymochinonem byly po 3 dnech všechny zcela porostlé. Po 6 dnech od druhého přeočkování byly misky ošetřené dávkou 2 mg tymolu a 2 mg eugenolu zcela porostlé s tím rozdílem, že ošetření eugenolem zbrzdilo tvorbu konidiospor a na miskách bylo po 6 dnech patrné pouze bílé mycelium (viz přílohy: obrázek č. 2). Po 14 dnech od druhého přeočkování tzn. po 28 dnech od ošetření, zůstaly zcela bez nárůstu mycelia *A. niger* misky ošetřené dávkou 4 mg enkapsulovaného eugenolu (viz přílohy: obrázek č. 3).

5. 2 Rychlost evaporace

U všech testovaných látek bylo zjištěno, že při teplotě 25°C i 37°C byla rychlost evaporace průkazně nižší u enkapsulovaných látek, než u látek v čistém stavu. Enkapsulované látky testované při 25°C lze podle rychlosti evaporace rozdělit do třech skupin:

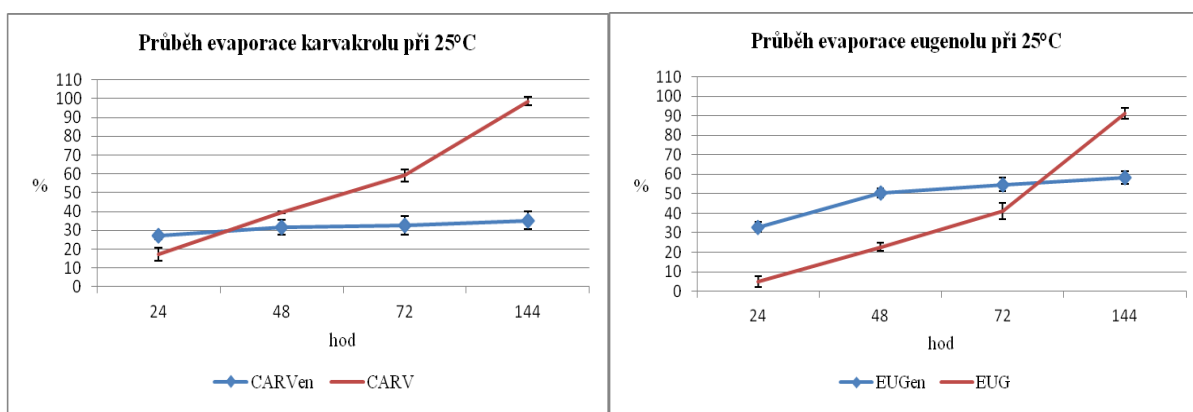
První skupinou jsou látky, které se při 25°C v enkapsulovaném stavu odpařují od prvního dne významně pomaleji, než látky v čistém stavu. Mezi ně patří tymol a tymochinon, jak je patrné z obrázků č. 13 a č. 14. Enkapsulovaného tymolu se po 24 hod odpařilo $25 \pm 6\%$, zatímco v čistém stavu se odpařilo $44 \pm 1\%$ tymolu. Tymol v silikátu se odpařoval velice pozvolna, po 144 hod bylo ze silikátu odpařeno $48 \pm 11\%$ tymolu. Tymol v čistém stavu se odpařoval výrazně rychleji, po 48 hod bylo odpařeno $83 \pm 1\%$ a již po 72 hod 100% (obrázek č. 13). Tymochinon v silikátu se oproti tymochinonu v čistém stavu odpařoval také velice pozvolna, po 24 hod bylo ze silikátu odpařeno $28 \pm 8\%$ a po 144 hod $45 \pm 10\%$. Tymochinon se v čistém stavu odpařoval ještě rychleji než tymol v čistém stavu, po 24 hod se odpařilo $66 \pm 7\%$ a po 48 hod již bylo odpařeno $99 \pm 2\%$, což je považováno jako 100%, protože váha vzorku se již dále neměnila (obrázek č. 14).



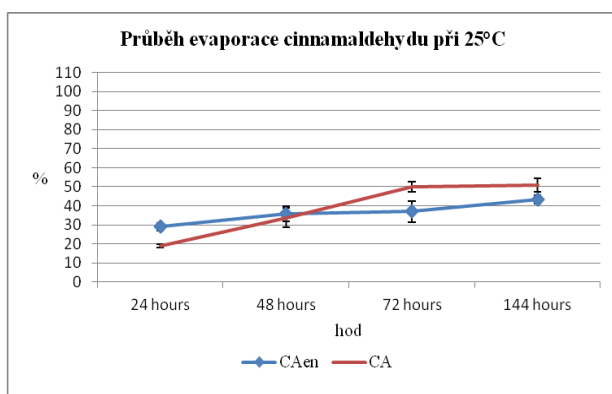
Obrázek č. 13 (vlevo) a č.14 (vpravo): Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného tymolu (THYen) a thymochinonu (TQen) s rychlostí evaporace tymolu (THY) a thymochinonu (TQ) v čistém stavu při 25°C.

Druhou skupinou jsou látky, které se při 25°C v enkapsulovaném stavu odpařovaly zpočátku pomaleji než látky v čistém stavu. Po určité době se rychlost evaporace enkapsulovaných látek ustálila a stoupala pozvolna, zatímco látky v čistém stavu se zcela odpařily. Patří mezi ně karvakrol, eugenol a cinnamaldehyd. Enkapsulovaného karvakrolu se odpařilo po 24 hod $27 \pm 2\%$, kdežto karvakrolu v čistém stavu pouze $17 \pm 4\%$. Po 48 hod se rychlost těkání enkapsulovaného karvakrolu ustálila a zvyšovala se velmi pomalu, zatímco evaporace karvakrolu v čistém stavu se výrazně zrychlila. Po 72 hod bylo ze silikátu odpařeno $33 \pm 5\%$ zatímco karvakrolu v čistém stavu jednou tolik ($59 \pm 3\%$). Po 144 hod byl karvakrol v silikátu téměř na stejné hodnotě jako při vážení před třemi dny ($35 \pm 5\%$) tzn., že ze silikátu se karvakrol odpařuje třikrát pomaleji než v čistém stavu, kdy bylo po 144 hod odpařeno vše (obrázek č. 15). Rychlost evaporace enkapsulovaného eugenolu zpočátku výrazně převyšovala rychlost evaporace eugenolu v čistém stavu. Po 24 hod se ze silikátu odpařilo $33 \pm 3\%$ a eugenolu v čistém stavu se odpařilo pouze $5 \pm 3\%$. Po 48 hod se rychlost evaporace enkapsulovaného eugenolu ustálila a stoupala pozvolna, ale odpařené množství bylo stále dvakrát vyšší, než odpařené množství eugenolu v čistém stavu. Po 72 hod byla rychlost evaporace enkapsulovaného eugenolu stále vyšší, než eugenolu v čistém stavu, ale rozdíl v odpařeném množství se začal výrazně zmenšovat. Po 144 hod se již projevil výrazný rozdíl mezi oběma variantami ve prospěch enkapsulovaného eugenolu. Ze silikátu bylo odpařeno $58 \pm 3\%$ a v čistém stavu $91 \pm 3\%$ (obrázek č. 16). U cinnamaldehydu byly rozdíly v rychlosti evaporace poměrně malé a i po 144 hod se v obou formách jevil jako relativně

stabilní. Zpočátku se odpařoval rychleji enkapsulovaný cinnamaldehyd, když po 72 hod se situace změnila a mírně se zvýšila rychlost evaporace cinnamaldehydu v čistém stavu. Po 144 hod mezi rychlostí evaporace obou variant příliš velký rozdíl nebyl. Po šesti dnech bylo enkapsulovaného cinnamaldehydu odpařeno $43 \pm 2\%$ a cinnamaldehydu v čistém stavu $51 \pm 4\%$ (obrázek č. 17).

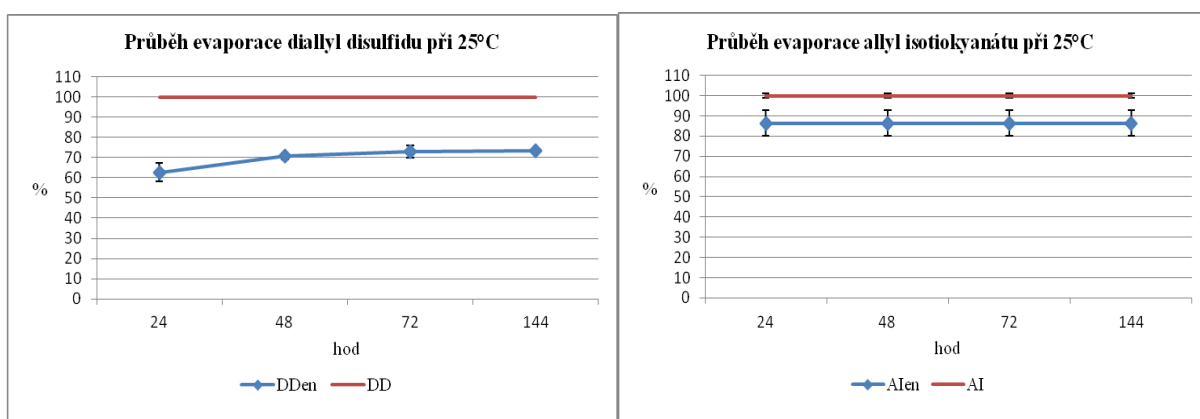


Obrázek č. 15 (vlevo) a č 16 (vpravo): Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného karvakrolu (CARVen) a eugenolu (EUGen) s rychlostí evaporace karvakrolu (CARV) a eugenolu (EUG) v čistém stavu při 25°C.



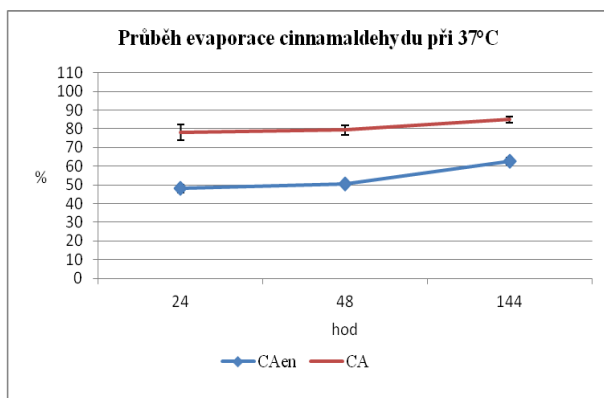
Obrázek č. 17: Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného cinnamaldehydu (CAen) s rychlostí evaporace cinnamaldehydu (CA) v čistém stavu při 25°C.

Třetí skupinou jsou látky, které při 25°C vykazovaly nejvyšší rychlost evaporace a v čisté formě byly odpařeny během prvních 24 hod. Jsou to sirné sloučeniny diallyl disulfid a allyl isotiokyanát. Diallyl disulfid byl v čistém stavu odpařen během prvních 24 hod, zatímco u enkapsulovaného diallyl disulfidu bylo po 24 hod odpařeno $63 \pm 5\%$ a po 72 hod $73 \pm 3\%$, dále se již hodnota neměnila (obrázek č. 18). Allyl isotiokyanátu v čistém stavu bylo stejně jako u diallyl disulfidu odpařeno během prvních 24 hod 100%. V enkapsulovaném stavu bylo po 24 hod odpařeno $86 \pm 6\%$ allyl isotiokyanátu, což lze brát také jako 100%, protože tato hodnota se již dále neměnila (obrázek č. 19).



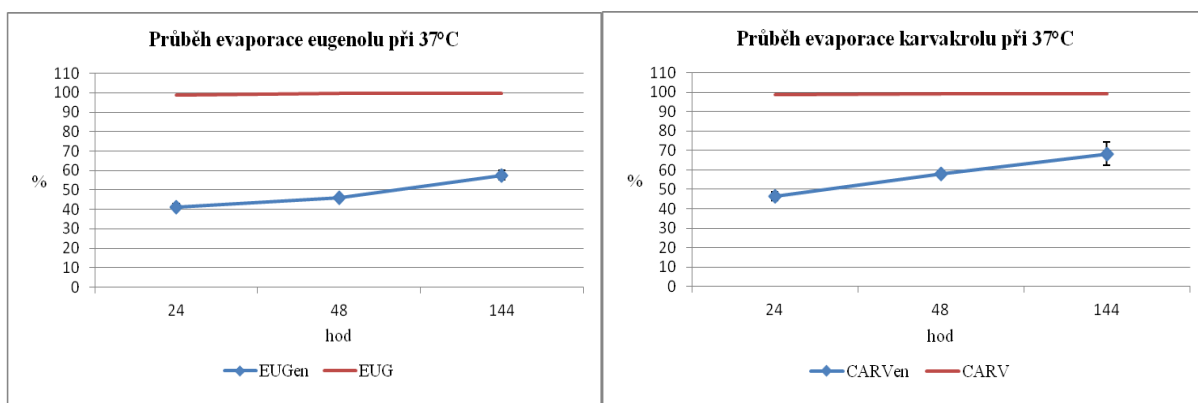
Obrázek č. 18 (vlevo) a č. 19 (vpravo): Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného diallyl disulfidu (DDen) a allyl isotiokyanátu (AIEn) s rychlostí evaporace diallyl disulfidu (DD) a allyl isotiokyanátu (AI) v čistém stavu při 25°C.

Při teplotě 37°C je z výsledků patrné, že enkapsulace výrazně zpomaluje rychlost evaporace testovaných látek. Tymol, eugenol, karvakrol, diallyl disulfid a allyl isotiokyanát se v čistém stavu odpařily během prvních 24 hod (obrázek č. 21, č. 22, č. 23, č. 25 a č. 26). Tymochinonu v čistém stavu bylo 100% odpařeno po 48 hod (obrázek č. 24). Cinnamaldehyd v čistém stavu se ze všech testovaných látek jevil při 37°C jako nejstabilnější, stejně jako při teplotě 25°C. Jak je patrné z obrázku č. 20, nebyl cinnamaldehyd zcela odpařen ani po šesti dnech ($85 \pm 2\%$). V enkapsulovaném stavu bylo po šesti dnech odpařeno $63 \pm 2\%$, což je o 20% cinnamaldehydu více, než co se odpařilo při teplotě 25°C.



Obrázek č. 20: Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného cinnamaldehydu (CAen) s rychlostí evaporace cinnamaldehydu (CA) v čistém stavu při 37°C.

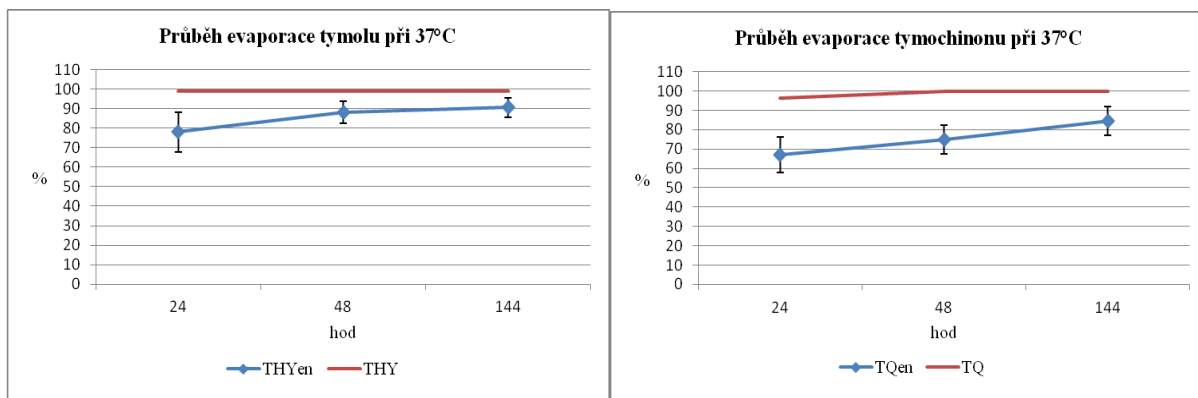
Eugenol a karvakrol v enkapsulovaném stavu vykazovaly podobnou stabilitu jako enkapsulovaný cinnamaldehyd. Po šesti dnech bylo ze silikátu odpařeno $58 \pm 2\%$ eugenolu (obrázek č. 21) a $68 \pm 6\%$ karvakrolu (obrázek č. 22). Rychlost evaporace těchto dvou enkapsulovaných látek i cinnamaldehydu je prvních 24 hod rychlejší (odpaří se 40-50%) a dále se zvyšuje velice pozvolna (obrázky č. 20, č. 21 a č. 22).



Obrázek č. 21 (vlevo) a č. 22 (vpravo): Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného eugenolu (EUGen) a karvakrolu (CARVen) s rychlostí evaporace eugenolu (EUG) a karvakrolu (CARV) v čistém stavu při 37°C.

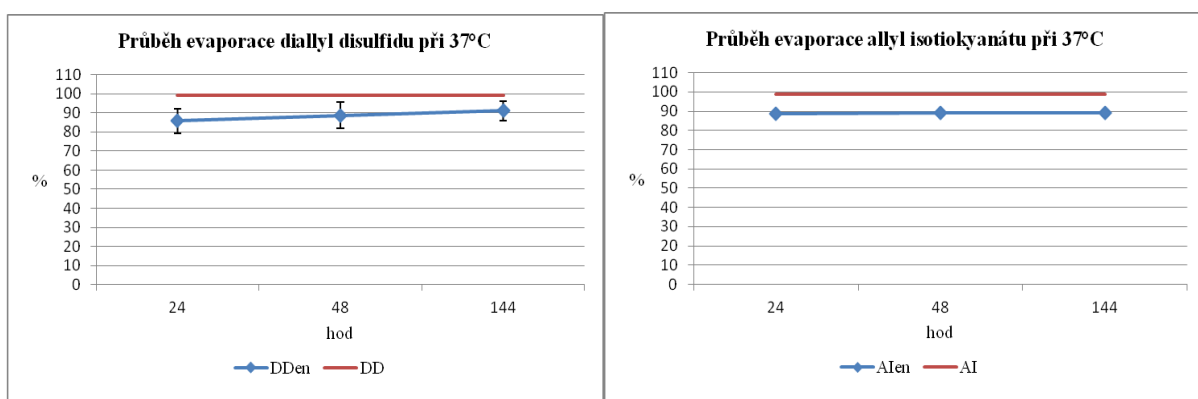
Rychlost evaporace enkapsulovaného tymolu a tymochinonu byla během prvních 24 hod vysoká, tymolu bylo odpařeno $78 \pm 10\%$ a tymochinonu $67 \pm 9\%$. Po 24 hod se rychlost

evaporace výrazně zpomalila a ustálila a po šesti dnech bylo ze silikátu odpařeno $91 \pm 5\%$ tymolu a $84 \pm 8\%$ tymochinonu (obrázek č. 23 a č. 24).



Obrázek č. 23 a č. 24: Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného tymolu (THYen) a tymochinonu (TQen) s rychlostí evaporace tymolu (THY) tymochinonu (TQ) v čistém stavu při 37°C.

Enkapsulovaného diallyl disulfidu bylo po 24 hod odpařeno $86 \pm 6\%$ a během následujících pěti dní se bez mála odpařila procenta zbývajících (obrázek č. 25). Enkapsulovaného allyl isotiokyanátu bylo po 24 hod odpařeno 89% a tato hodnota se dále neměnila (obrázek č. 26).



Obrázek č. 25 a č. 26: Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného diallyl disulfidu (DDen) a allyl isotiokyanátu (AIen) s rychlostí evaporace diallyl disulfid (DD) a allyl isotiokyanátu (AI) v čistém stavu při 37°C.

6 Diskuze

V testu antifungální aktivity nejlépe účinkoval karvakrol v enkapsulovaném i v čistém stavu. V obou variantách byl účinný při MID 0,5 mg nebo nižší. V testu rychlosti evaporace při 25°C se však po šesti dnech odpařilo 100% karvakrolu v čistém stavu. Z těchto údajů lze usuzovat, že karvakrol při dávce 0,5 mg nebo nižší zcela zničil spory *A. niger* během prvních tří dní od inokulace. Ve studii Paster et al. (1995) byla proti *A. niger* testována fungicidní aktivita silice z dobromysli (*Origanum vulgare*) v plynné fázi. Bylo prokázáno, že silice z dobromysli během 24 hod při MIC (minimální inhibiční koncentrace) 2,0 $\mu\text{l/l}^{-1}$ vzduchu zcela inhibovala růst mycelia a při vyšší koncentraci zničila spory *A. niger*. Také byl v této studii testována tymiánová silice, které bylo k totální inhibici zapotřebí vyšší dávky než silice z dobromysli, podobně jako v naší studii vykazoval karvakrol oproti tymolu vyšší inhibiční aktivitu. V další studii (Daouk et al., 1995) byla proti *A. niger* sledována fungicidní aktivita silice z dobromysli syrské (*Origanum syriacum*), která obsahovala 62% karvakrolu. MIC silice byla 1 $\mu\text{l/l}$ ml agaru tzn., že na 5 ml agaru bylo aplikováno 3,1 μl karvakrolu, což byla přibližně šestkrát vyšší dávka, než kterou jsme na stejné množství agaru aplikovali v naší studii. Ve studii Martos et al. (2007) byla metodou ředění agaru testována proti *A. niger* antifungální aktivita silic z tymiánu, dobromysli a hřebíčku. Z testovaných mikroorganismů byl *A. niger* nejcitlivější k silici z dobromysli, jejíž hlavní složkou je karvakrol, při MIC 1,1 $\mu\text{l/5 ml}$ agaru, což je přibližně jednou tolik vyšší dávka než byla pro totální inhibici potřebná v naší studii.

Enkapsulovaný tymol vykazoval fungicidní aktivitu při osmkrát nižší dávce (0,5 mg) a při 25°C se odpařoval podstatně pomaleji, než tymol v čistém stavu. Tymol v čistém stavu byl zcela odpařen třetí den, což vysvětluje, že po tři dny fungoval při MID 0,5 mg nebo nižší stejně jako enkapsulovaný tymol. Ze silikátu bylo po šesti dnech odpařeno pouze $48 \pm 11\%$, což by mohlo vysvětlovat, že enkapsulovaný tymol účinkoval proti *A. niger* při MID 0,5 mg i po čtrnácti dnech. Paster et al. (1990) testovali fungicidní aktivitu tymiánové silice proti *A. niger* a k úplné inhibici růstu mycelia i klíčení spor bylo zapotřebí MIC 0,7 mg/ml agaru, tzn. 3,5 mg/5 ml agaru, což je o 0,5 mg nižší dávka, než byla aplikována v naší studii pro zajištění totální inhibice po čtrnáct dní. V našem experimentu se ošetření *A. niger* karvakrolem, tymolem a cinnamaldehydem oproti ostatním látkám jeví nejúčinnější, zatímco ve studii Klouček et al. (2012) byla v plynné fázi testována antifungální aktivita tymiánové silice s obsahem 42% tymolu a k úplné inhibici *A. niger* bylo zapotřebí MIC 250 $\mu\text{l/L}$ vzduchu, což

byla osmkrát vyšší dávka, než byla potřebná například u česnekové nebo křenové silice. Sírné sloučeniny v posledně jmenovaných silicích, diallyl disulfid a allyl isotiokyanát, přitom v našich experimentech vykazovaly nejnižší fungicidní aktivitu. Ve studii Martos et al. (2007) byly testovány tři silice s fungicidní aktivitou, kde výsledky potvrdily nejvyšší aktivitu u silice oregánové, nižší u silice hřebíčkové a nejnižší u silice tymiánové, zatímco v našem experimentu se lépe než eugenol z hřebíčkové silice jevil tymol ze silice tymiánové.

Tymochinon velmi dobře účinkoval proti *A. niger* v enkapsulovaném stavu, což koreluje s jeho rychlostí odpařování. Tymochinon v čistém stavu byl při 25°C zcela odpařen po dvou dnech, což vysvětluje, že během prvních tří dní ještě stačila k inhibici růstu *A. niger* dávka 0,5 mg nebo nižší, ale po čtrnácti dnech nefungovala ani dávka nejvyšší. Naproti tomu enkapsulovaný tymochinon se při 25°C odpařoval velice pozvolna.

V testu rychlosti evaporace se eugenol v čistém stavu na rozdíl od enkapsulovaného odpařoval zpočátku paradoxně podstatně pomaleji, čímž by se dal vysvětlit rozdíl v MID proti *A. niger*, který byl patrný po třech dnech od inokulace. Eugenolu v čistém stavu stačilo 0,5 mg, zatímco enkapsulovaného bylo zapotřebí 1 mg. První den se odpařilo pouze $5 \pm 3\%$ eugenolu v čistém stavu a poté se začal odpařovat stejnoměrně – rychlostí okolo $18 \pm 3\%/24$ h. Po šesti dnech bylo odpařeno $91 \pm 3\%$, což vysvětluje, že se situace v testu antifungální aktivity změnila a začal lépe účinkovat enkapsulovaný eugenol. Z našich výsledků je patrné, že eugenol v čistém stavu by měl být účinnější v akutních případech a enkapsulovaný má potenciál při dlouhodobé ochraně před *A. niger*. Ve studii Klouček et al. (2012) byla testována fungicidní aktivita hřebíčkové silice s obsahem 88,3% eugenolu, která účinkovala proti *A. niger* při MIC 500 μ L/vzduchu, což byla šestnáctkrát vyšší koncentrace, než které bylo zapotřebí například u skořicové silice. V naší studii bylo k úplné inhibici *A. niger* zapotřebí pouze čtyřikrát vyšší dávky eugenolu než cinnamaldehydu.

Cinnamaldehyd se jevil jako velmi stabilní, v průběhu odpařování byly patrné pouze malé rozdíly mezi enkapsulovaným cinnamaldehydem a cinnamaldehydem v čistém stavu. V této studii je cinnamaldehyd řazen k látkám s vysokou fungicidní aktivitou, stejně jako ve studii Klouček et al. (2012), kde z 69 testovaných silic vykazovala skořicová silice s obsahem $79 \pm 3\%$ cinnamaldehydu, spolu s česnekovou a křenovou silicí nejvyšší fungicidní aktivitu proti *A. niger*. Matan (2007) testoval inhibiční účinky cinnamaldehydu a eugenolu proti *A. niger* a zjistil, že eugenolu bylo k úplné inhibici po čtrnáct dní zapotřebí dvaapůlkrát vyšší koncentrace než cinnamaldehydu, zatímco v naší studii bylo zapotřebí k úplné inhibici čtyřikrát

vyšší dávky eugenolu než cinnamaldehydu. Ve studii Matan (2007) stačilo k úplné inhibici po čtrnáct dní 40 µg cinnamaldehydu na 1 ml agaru, což odpovídá 0,2 mg/5ml agaru, zatímco v našem experimentu bylo pro úplnou inhibici *A. niger*, zapotřebí aplikovat 1 mg/5 ml agaru.

Sírné sloučeniny diallyl disulfid a allyl isothiokyanát se v našem experimentu jevily jako téměř neúčinné. Inhibovaly růst *A. niger* pouze v enkapsulovaném stavu první tři dny při dávce 1 mg. Naproti tomu ve studii Klouček et al. (2012) česneková (43,8% diallyl disulfidu) a křenová (63,7% allyl isothiokyanátu) silice vykazovaly nejvyšší inhibiční aktivitu proti všem testovaným mikroorganismům včetně *A. niger*. V testu rychlosti evaporace při 25 i 37°C bylo potvrzeno, že se obě sloučeniny zcela odpařily během prvních 24 hod. V enkapsulovaném stavu se diallyldisulfid odpařoval pomaleji než v čistém stavu, ale allyl isothiokyanátu se během prvních 24 hodin odpařilo $86 \pm 6\%$ a tato hodnota se již dále neměnila. Lze tedy říci, že se odpařil všechnen enkapsulovaný obsah, přičemž chybějící procenta allyl isothiokyanátu se odpařila během přípravy a manipulace s materiálem. Ve studii Park et al. (2012) bylo zjištěno, že rychlost evaporace allyl isothiokyanátu enkapsulovaného do MCM-41 je přibližně 1%/hod. Vzhledem k rychlosti evaporace těchto dvou látek v našem experimentu jak v enkapsulovaném, tak v čistém stavu, se nelze divit, že nebyly zvláště účinné v testu antifungální aktivity.

7 Závěr

Lze konstatovat, že hypotéza byla naplněna, neboť příprava i aplikace enkapsulovaných látek byla ve srovnání s látkami v čistém stavu časově i technicky podstatně méně náročná. U pěti ze sedmi testovaných látek bylo prokázáno, že v enkapsulovaném stavu vykazovaly větší stabilitu, čímž byla zajištěna delší doba inhibičního působení na *A. niger*. Zlepšení těchto technologických vlastností bylo prokázáno u tymolu, tymochinonu, eugenolu a v menší míře u diallyl disulfidu a allyl isotiokyanátu.

Byla ověřena fungicidní aktivita pěti ze sedmi testovaných látek, které byly schopny po více než čtrnáct dnů inhibovat růst *A. niger*, oproti kontrole která byla během tří dnů zcela porostlá sporulujícím *A. niger*. Karvakrol a cinnamaldehyd vykazovaly vysokou fungicidní aktivitu, ale po čtrnácti dnech nebyl mezi enkapsulovanými a čistými látkami patrný žádný rozdíl. Tymol, tymochinon a eugenol v enkapsulovaném stavu vykazovaly prokazatelně vyšší fungicidní aktivitu po čtrnácti dnech, než stejné látky v čistém stavu, což je v korelaci s rychlostí jejich evaporace. Diallyl disulfid a allyl isotiokyanát se odpařovaly velmi rychle a v našem experimentu sejevily jako minimálně účinné.

U tymolu, tymochinonu a eugenolu se v této studii podařilo ověřit jejich fungicidní aktivitu a prokázat, že enkapsulací do MCM-41 byly zlepšeny jejich technologické vlastnosti. V mnoha studiích bylo prokázáno, že tyto sloučeniny, jež jsou hlavní komponentou léčivých rostlin, po tisíciletí celosvětově využívaných v tradiční medicíně, mnohdy účinkují lépe než komerční syntetické fungicidy. Jejich enkapsulace do MCM-41 by mohla výrazně usnadnit využívání těchto látek zejména v medicíně, v potravinářství a v zemědělství. Vzhledem ke své velikosti, mají částice MCM-41 možnost pronikat do buněčných membrán a sloužit tak v medicíně jako nosiče léčiv v podobě antimikrobiálních rostlinných látek namísto antibiotik. V potravinářství by mohla mít enkapsulace těkavých látek z rostlin s fungicidní aktivitou velký potenciál zejména jako komponenta obalových materiálů zajišťujících trvanlivost potravin i bez syntetických aditiv. V zemědělství by tymol, tymochinon a eugenol enkapsulované do MCM-41 mohly nalézt uplatnění v integrované ochraně rostlin, na kterou jsou Evropskou Unií aktuálně kladeny vysoké požadavky. Enkapsulace těchto látek je schopna zajistit řízené uvolňování dle potřeb vegetace a zároveň se tak podílí na snižování znečištění prostředí.

8 Seznam použité literatury

- Aggarwal, BB, Kunnumakarra, AB (2009) Molecular targets and therapeutic uses of spices: modern uses for ancient medicine. Singapore: World Scientific
- Ahmad, A, Khan, A, Yousuf, S, Khan, LA, Manzoor, N (2010) Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia* 8, 1157-1162
- Antunes, MDC, Cavaco, AM (2010) The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 351-366.
- Bakkali, F, Averbeck, S, Averbeck, D, Idaomar, M (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475
- Baser, KHC, Buchbauer, G (2009) Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Taylor & Francis Group
- Bassolé, IHN, Juliani, HR (2012) Essential oils in combination and their antimicrobials properties. *Molecules* 17, 3989-4006
- Bennis, S, Chami, F, Chami, N, Bouchikhi, T, Remmal, A (2004) Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology* 38, 454-458
- Bernardos, A, Aznar, E, Coll, C, Martínez-Mañez, R, Barat, JM, Marcos, MD, Sancenón, F, Benito, A, Soto, J (2008) Controlled release of vitamin B₂ using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffoldings. *Journal of Controlled Release* 131, 181-189
- Bernardos, A, Mondragón, L, Aznar, E, Marcos, MD, Martínez-Mañez, R, Sancenón, F, Soto, J, Barat, JM, Pérez-Payá, E, Guillem, C, Amorós, P (2010) Enzyme-responsive intracellular controlled release using nanometric silica mesoporous supports capped with „saccharides“. *American Chemical Society* 4, 6353-6368.
- Bernardos, A, Mondragón, L, Javakhishvili, I, Mas, N, Torre, C, Martínez-Mañez, R, Sancenón, F, Barat, JM, Hvilsted, S, Orzaez, M, Pérez-Payá, E, Amorós, P (2012) Azobenzene polyesters used as gate-like scaffolds in nanoscopic hybrid systems. *Chemistry – A European Journal* 18, 13068-13078.

- Broderick, AJ, Greenshields, RN (1981) Sporulation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus* in continuous submerged liquid culture. *Microbiology* 126, 193-202
- Brodnitz, MH, Pascale, JV, Van Derslice, L 1971 Flavor component of garlic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19, 273-275
- Bulánková, I (2005) Léčivé rostliny na naší zahradě. V Praze: Grada Publishing a. s.
- Burt, S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253
- Ćavar, S, Maksimović, M, Šolić, ME, Jerković-Mujkić, A, Bešta, R (2008) Chemical composition and antioxidant and microbial activity of two *Satureja* essential oils. *Food chemistry* 111, 648-653
- Daouk, RK, Dagher, SM, Sattout, EJ (1995) Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection* 10, 1059-1064
- Dohnal, V, Jun, D (2012) Metody detekce a identifikace plísní. *Biomedicína* 14, 497-504
- Fahey, JW, Zalcmann, AT, Talalay, P (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5-51
- Fachini-Queiroz, FC, Kummer, R, Estevão-Silva, CF, de Barros Carvalho, MD, Cunha, JM, Grespan, R, Bersani-Amado, CA, cuman, RKN (2012) Effect of thymol and carvacrol of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 10
- Filipová, Z, Kukutschová, J, Mašláň, M (2012) Rizika nanomateriálů. V Olomouci: Papírtisk s. r. o.
- Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Verlag der Zeitschrift für Naturforsch* 58, 629-631
- Gruenwald, J, Freder, J, Ambruester, N (2010) Cinnamon and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50, 822-834

- Hafez, YM (2008) Effectiveness of the antifungal black seed oil against powdery mildews of cucumber (*Podosphaera xanthii*) and barley (*Blumeria graminis* sp. *hordei*). *Acta Biologica Szegediensis* 52, 17-25
- Halawani, E (2009) Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research* 3, 148-152
- Hertz-Flower, C, Pain, A (2007) Specialist fungi, versatile genomes. *Nature Reviews Microbiology* 5, 332-333
- Higley, A, Higley, C (1998) Reference guide for essential oils. Spanish Fork: Abundant Health
- Hoffmann, F, Cornelius, M, Morell, J, Froba, M (2006) Silica-based mesoporous organic–inorganic hybrid materials. *Angewandte Chemie International Edition* 45, 3216-3251
- Chaieb, K, Hajlaoui, H, Zmantar, T, Kahla-Nakbi, AB, Rouabhia, M, Mahdouani, K, Bakhrouf, A (2007) The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. *Phytotherapy Research* 21, 501-506
- Christian, EJ, Goggi, S (2008) Aromatic plant oils as fungicide for organic corn production. *Digital Library* 48, 1941-1951
- Janardhanan, M, Thoppil, JE (2004) Herb and spice essential oils. Delhi: Discovery Publishing House
- Kailasapathy, K (2009) Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4, 1-19
- Klarić, MŠ, Kosalec, I, Mastelić, J, Piecková, E, Pepeljnak, S (2007) Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology* 44, 36-42

- Klouček, P, Šmíd, J, Fraňková, A, Kokoška, L, Valterová, I, Pavela, R (2011) Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International* 47, 161-165
- Kokkini, S, Vokou, D (1989) Carvacrol-rich plants in Greece. *Flavour and Fragrance Journal* 4, 1-7
- Koul, O, Walia, S, Dhaliwal, GS (2008) Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International* 4, 63-84
- Kordali, S, Cakir, A, Ozer, H, Cakmakci, R, Kesdek, M, Mete, E (2008) Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresource Technology* 99, 8788-8795
- Krijghsheld, P, Bleichrodt, R, Veluw, GJ, Wang, F, Muller, WH, Dijksterhuis, J, Wosten, HAB (2013) Development in *Aspergillus*. *Studies in Microbiology* 74, 11-29
- Kuiper-Goodman, T, Scott, PM (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences* 2, 179-248
- Laird, K, Phillips, C (2011) Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology* 54, 169–174
- Lambert, RJW, Skandamis, PN, Coote, PJ, Nychas, G-JE (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462
- Lang, G, Buchbauer, G (2011) A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 27, 13-39
- Lapčík, O, Opletal, L, Moravcová, J, Čopíková, J, Drašar, P (2011) Přírodní látky a jejich deriváty chuti pálivé. *Chemické Listy* 105, 452-457
- Li, X, Kusdah MM (2004) Correlation of glucosinolate content to myrosinase in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6950-6955

- Mari, M, Iori, R, Leoni, O, Marchi (1993) In vitro activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. *Annals of Applied Biology* 123, 155-164
- Martínez-Romero, D, Guillén, F, Valverde, JM, Bailén, G, Zapata, P, Serrano, M, Castillo, Valero, D (2007) Influence of carvacrol on survival *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology* 115, 144-148
- Martos, MV, Ruiz, YN, López, JF, Álvarez, JAP (2007) Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety* 27, 91-101
- Maruzzella, JC, Sicurella, NA (1960) Antibacterial activity of essential oil vapors. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 49, 629-694
- Matan, N (2007) Growth inhibition of *Aspergillus niger* by cinnamaldehyde and eugenol. *Walailak Journal of Science and Technology* 4, 41-51
- Mayton, HS, Olivier, C, Vaughn, SF, Loria R (1996) Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *The American Phytopathological Society* 86, 267-271
- Nedorostová, L, Klouček, P, Kokoška, L, Štolcová, M, Pulkrábek, J (2008) Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20, 157-160
- Nickavar, B, Mojab, F, Javidnija, K, Amoli, MAR (2003) Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Verlag der Zeitschrift für Naturforsch* 58, 629-631
- On, M, Du, M, Fan, M, Bian, Z (2007) In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 163, 137-143
- Ooi, LSM, Li, Y, Kam, S-L, Wang, H, Wong, EYL, Ooi, VEC (2006) Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* blume. *The American Journal of Chinese Medicine* 34, 511
- Park, SY, Barton, M, Pendleton, P (2012) Controlled release of allyl isothiocyanate for bacteria growth management. *Food Control* 23, 478-484

Parthasarathy, VA, Chempakam, B, Zachariah, TJ (2008) Chemistry of species. Oxfordshire: CAB International

Paster, N, Juven, BJ, Shaaya, E, Menasherov, M, Nitzan, R, Weisslowicz, H, Ravid, U (1990) Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. Letters in Applied Microbiology 11, 33-37

Paster, N, Menasherov, M, Ravid, U, Juven, B (1995) Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. Journal of Food Protection 1, 81-85

Pavela, R (2011) Botanické pesticidy. V Českých Budějovicích: Kurent, s.r.o.

Pecháček, R, Velíšek, J, Davídek, J (2000) Decomposition of sinigrin by methanol/ammonia/water treatment in model systems and mustard (*Brassica nigra* L.) seed meal. European Food Research and Technology 210, 196-201

Pinto, E, Vale-Silva, L, Cavaleiro, C, Salgueiro, L (2009) Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology 58, 1454-1462

Prado, AGS, Moura, AO, Nunes, AR (2011) Nanosized silica modified with carboxylic acid as support for controlled release of herbicides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 8847-8852

Pyun, MS, Shin, S (2006) Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazol. Phytomedicine 13, 394-400

Ranasinghe, L, Jayawardena, B, Abeywickrama, K (2002) Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. Letters in Applied Microbiology 35, 208-211

Ramawat, KG, Merillon, JM (2013) Bulbous Plants: Biotechnology. CRC Press

Randhawa, MA, Alakloby, OM, Aljabre, SHM, Alqurashi, AM, Akhtar, N (2005) Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Fusarium solani*. Pakistan Journal of Medical Research 44,

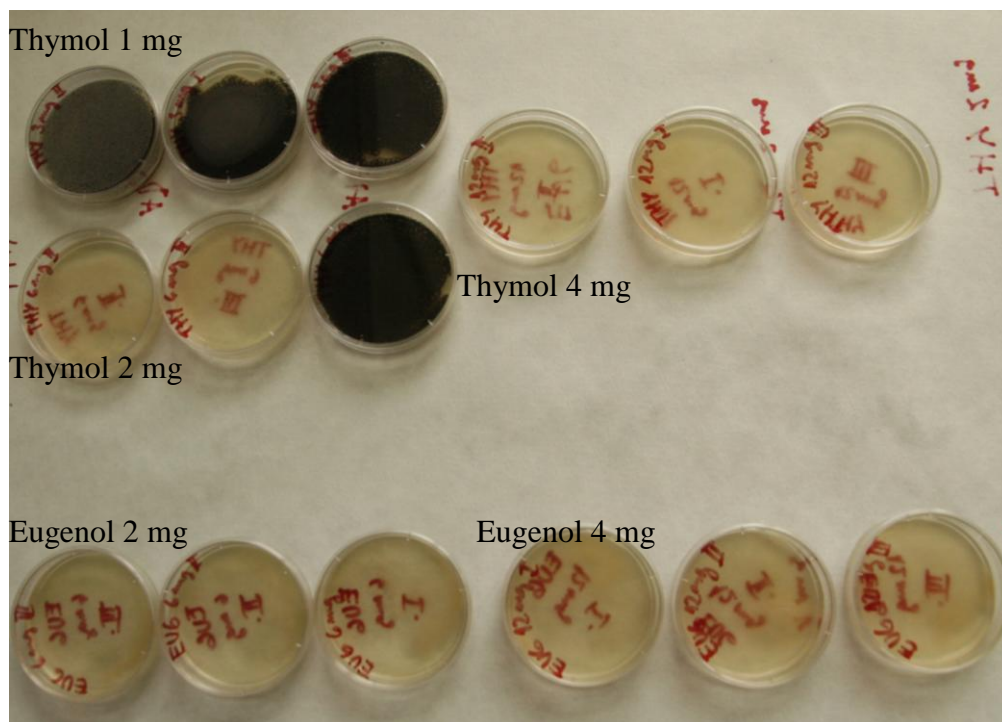
- Rathouský, J, Zukalová, M, Zukal, A (1997) Supramolekulární templátování: nová strategie syntézy mezoporézních molekulových sít. *Chemické Listy* 91, 413-420
- Rattanachaikunsopon, P, Phumkhachorn, P (2008) Diallyl sulfide content and antimicrobial activity food-borne pathogenic bacteria of chives (*Allium schoenoprasum*). *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 72, 2987-2991
- Ravindran, PN, Nirmal-Babu, K, Shylaja, M (2003) Cinnamon and cassia: the genus cinnamon. CRC Press
- Reichling, J, Schnitzler, P, Suschke, U, Saller, R (2009) Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Froschende Komplementärmedizin* 16, 79-90
- Rusu, ML, Marutolu, C, Sandu, I, Tita, D, Gogoasa, I, Barbu, CH, Popescu, A (2007) HPTLC and GC-MS for separation and identification of eugenol in plants. *Journal of Planar Chromatography* 20, 139-140
- Saad, NY, Muller, CD, Lobstein, A (2013) Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal* 28, 269-279
- Senanayake, UM, Lee, TH, Wills, RBH (1978) Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 822-824
- Seow, YX, Yeo, CR, Chung, HL, Yuk, HG (2014) Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, 625-644
- Schuster, E, Dunn-Coleman, N, Frisvad, JC, Dijck, PWM (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 426-435
- Sigma-Aldrich – bezpečnostní list. Aktualizace z 27. 3. 2013 [citováno dne 10. 4. 2014]
Dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>>
- Soković, MD, Vukojević, J, Marin, PD, Brkić, DD, Vajs, V, Van Griensven, LJLD (2009) Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules* 14, 238-249
- Stahl-Biskup, E, Saez, F (2003) Thyme: the genus thymus. CRC Press

- Suthar, MP, Patel, PN, Shah, TG, Patel, RK (2010) In vitro screening of *Nigella sativa* seeds for antifungal activity. *International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* 1, 84-91
- Táborský, J, Kunt, M, Klouček, P, Lachman, J, Zelený, V, Kokoška, L (2012) Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, and *Ranunculaceae* families. *Central European Journal of Chemistry* 10, 1899-1906
- Tatsadjieu, LN, Ngassoum, MB, Nukenine, EN, Mbawala, A, Yaouba, A (2007) Antifungal and anti-insect activities of three essential oils on *Aspergillus flavus* Link and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Natural Product Communications* 2, 1291-1294
- The Pherobase: Database of insect pheromones and semiochemicals. Aktualizováno El-Sayed, AM (2014) [citováno 10. 4. 2014] Dostupné z <<http://www.pherobase.com/>>
- Thobunluepop, P (2008) Characterization of a botanical fungicide from thai origin and its efficiency in rice production. In Göttingen: Cuvillier Verlag
- Vázquez, BI, Fente, C, Franco, CM, Vázquez, MJ, Capeda, A (2001) Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology* 67, 157-163
- Vonášek, F, Trepková, E, Novotný, L (1987) Látky vonné a chuťové. V Praze: Nakladatelství technické literatury.
- Zambonelli, A, D'Aulerio, AZ, Severi, A, Benvenuti, S, Maggi, L, Bianchi, A (2004) Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *Journal of Essential oil Research* 16, 69-74
- Zukal, A, Thommes, M, Čejka, J (2007) Synthesis of highly ordered MCM-41 silica with spherical particles. *Microporous and Mesoporous Materials* 104, 52-58

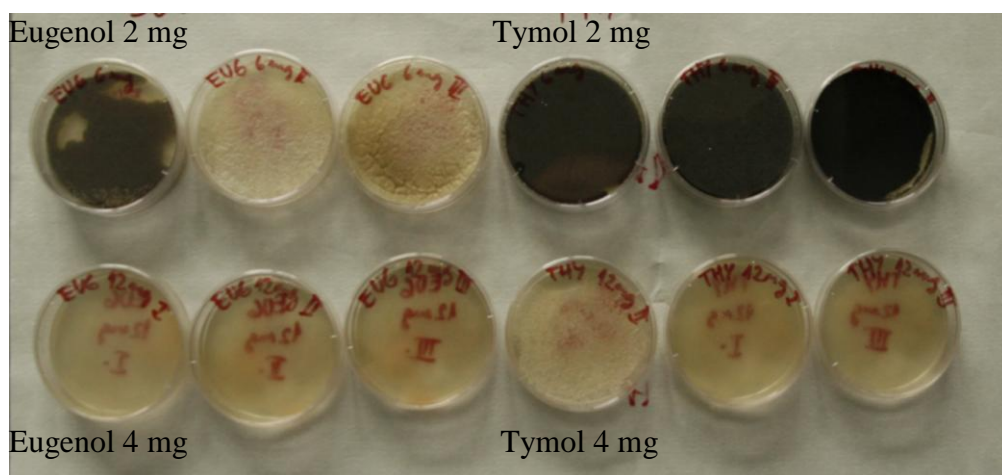
9 Samostatné přílohy

Tabulka č. 1: Střední hodnoty (medián) stupně nárůstu mycelia *A. niger* ze třech opakování, po ošetření vybranými sloučeninami v enkapsulovaném a čistém stavu hodnocených po 3, 6 a 14 dnech (hodnoceno dle stupnice pro vizuální hodnocení uvedené v tabulce č. 1 v textu).

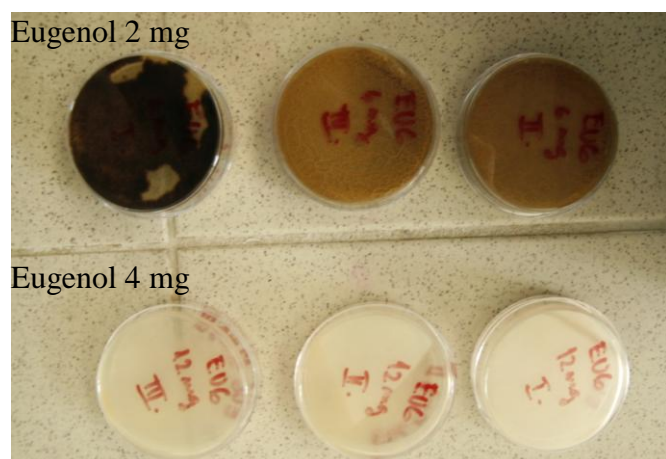
		3. den		6. den		14. den	
		enkaps.	čistý	enkaps.	čistý	enkaps.	čistý
Tymol	0,5 mg	0	0	0	3	0	4
	1 mg	0	0	0	3	0	4
	2 mg	0	0	0	0	0	3
	4 mg	0	0	0	0	0	0
Karvakrol	0,5 mg	0	0	0	0	0	0
	1 mg	0	0	0	0	0	0
	2 mg	0	0	0	0	0	0
	4 mg	0	0	0	0	0	0
Tymochinon	0,5 mg	2	0	3	4	4	5
	1 mg	0	0	0	0	0	5
	2 mg	0	0	0	0	0	5
	4 mg	0	0	0	0	0	5
Eugenol	0,5 mg	4	0	5	4	5	4
	1 mg	0	0	0	4	3	5
	2 mg	0	0	0	2	0	5
	4 mg	0	0	0	0	0	0
Cinnamaldehyd	0,5 mg	0	0	5	0	5	5
	1 mg	0	0	0	0	0	0
	2 mg	0	0	0	0	0	0
	4 mg	0	0	0	0	0	0
Diallyl disulfid	0,5 mg	5	5	5	5	5	5
	1 mg	0	5	5	5	5	5
	2 mg	0	5	5	5	5	5
	4 mg	0	5	2	5	5	5
Allyl isotiokyanát	0,5 mg	5	5	5	5	5	5
	1 mg	0	5	5	5	5	5
	2 mg	0	5	5	5	5	5
	4 mg	0	3	0	5	5	5



Obrázek č. 1: Varianty ošetřené enkapsulovaným tymolem a eugenolem dokumentované po třech dnech od druhého přeočkování, tzn. po sedmnácti dnech od očkování prvního.



Obrázek č. 2: Varianty ošetřené enkapsulovaným tymolem a eugenolem dokumentované po šesti dnech od druhého přeočkování, tzn. po dvaceti dnech od očkování prvního.



Obrázek č. 3: Varianty ošetřené enkapsulovaným eugenolem po čtrnácti dnech od druhého přeočkování, tzn. po dvacetiosmi dnech od očkování prvního.

10 Seznam použitých zkratk a symbolů

AI – allyl isotiokyanát (allyl isothiocyanate)

AIen – enkapsulovaný allyl isotiokyanát (encapsulated allyl isothiocyanate)

C5, C10, C15, C20, C30, C40 – počet atomů uhlíku v řetězci terpenických sloučenin

CA – cinnamaldehyd (cinnamaldehyde)

CAen – enkapsulovaný cinnamaldehyd (encapsulated cinnamaldehyde)

CARV – karvakrol (carvacrol)

CARVen – enkapsulovaný karvakrol (encapsulated carvacrol)

KTJ – kolonie tvořící jednotky (colony-forming unit)

CTAB - hexadecyltrimethylamonium bromid (Cetyl Trimethylammonium Bromide)

DD – diallyl disulfid (diallyl disulphide)

DDen – enkapsulovaný diallyl disulfid (encapsulated diallyl disulphide)

EUG – eugenol (eugenol)

EUGen – enkapsulovaný eugenol (encapsulated eugenol)

GC – plynová chromatografie (Gas Chromatography)

MCM – název pro mezoporézní křemičitý materiál (Mobil Composition of Matter)

MHB – Mueller-Hinton bujón (Mueller-Hinton Broth)

MIC – minimální inhibiční koncentrace (Minimal Inhibitory Concentration)

MID – minimální inhibiční dávka (Minimal Inhibitory Dosage)

MS – hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

SDA – Sabouraud Dextrose agar (Sabouraud Dextrose Agar)

TEAH₃ - triethanolamin

TEOS – tetraethylortosilikát

THY – tymol (thymol)

THYen – enkapsulovaný tymol (encapsulated thymol)

TQ – tymochinon (thymoquinone)

TQen – enkapsulovaný tymochinon (encapsulated thymoquinone)

11 Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Vzorec tymolu (Sigma-Aldrich)

Obrázek č. 2: *Saccharomyces cerevisiae* ošetřená tymolem pod elektronovým mikroskopem (Bennis et al., 2004)

Obrázek č. 3: Vzorec karvakrolu (Sigma-Aldrich)

Obrázek č. 4: Vzorec tymochinonu (Sigma-Aldrich)

Obrázek č. 5: Vzorec eugenolu (Sigma-Aldrich)

Obrázek č. 6: Vzorec cinnamaldehydu (Sigma-Aldrich)

Obrázek č. 7: Vzorec diallyl disulfidu (Sigma-Aldrich)

Obrázek č. 8: Vzorec allyl isotiokyanátu (Sigma-Aldrich)

Obrázek č. 9: Velikost nanočástic MCM-41, velikost mikročástic MCM-41 a struktura pórů MCM-41 pod elektronovým mikroskopem (Bernardos et al., 2013)

Obrázek č. 10: Schéma syntézy MCM-41 (Bernardos et al., 2013)

Obrázek č. 11: Konidiofor sporulujícího *A. niger* pod elektronovým mikroskopem (Hertz-Fowler a Pain, 2007)

Obrázek č. 12: Stupnice pro vizuální hodnocení nárůstu *A. niger*

Obrázek č. 13: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného tymolu (THYen) s rychlostí evaporace tymolu (THY) v čistém stavu při 25°C

Obrázek č. 14: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného tymochinonu (TQen) s rychlostí evaporace tymochinonu (TQ) v čistém stavu při 25°C

Obrázek č. 15: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného karvakrolu (CARVen) s rychlostí evaporace karvakrolu (CARV) v čistém stavu při 25°C

Obrázek č. 16: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného eugenolu (EUGen) s rychlostí evaporace eugenolu (EUG) v čistém stavu při 25°C

Obrázek č. 17: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného cinnamaldehydu (CAen) s rychlostí evaporace cinnamaldehydu (CA) v čistém stavu při 25°C

Obrázek č. 18: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného diallyl disulfidu (DDen) s rychlostí evaporace diallyl disulfidu (DD) v čistém stavu při 25°C

Obrázek č. 19: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného allyl isotiokyanátu (AIen) s rychlostí evaporace allyl isotiokyanátu (AI) v čistém stavu při 25°C

Obrázek č. 20: Porovnání rychlosti evaporace enkapsulovaného cinnamaldehydu (CAen) s rychlostí evaporace cinnamaldehydu (CA) v čistém stavu při 37°C

Obrázek č. 21: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného eugenolu (EUGen) s rychlostí evaporace eugenolu (EUG) v čistém stavu při 37°C

Obrázek č. 22: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného karvakrolu (CARVen) s rychlostí evaporace karvakrolu (CARV) v čistém stavu při 37°C

Obrázek č. 23: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného tymolu (THYen) s rychlostí evaporace tymolu (THY) v čistém stavu při 37°C

Obrázek č. 24: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného tymochinonu (TQen) s rychlostí evaporace tymochinonu (TQ) v čistém stavu při 37°C

Obrázek č. 25: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného diallyl disulfidu (DDen) s rychlostí evaporace diallyl disulfidu (DD) v čistém stavu při 37°C

Obrázek č. 26: Porovnání průběhu evaporace enkapsulovaného allyl isotiokyanátu (AIen) s rychlostí evaporace allyl isotiokyanátu (AI) v čistém stavu při 37°C

12 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Stupnice pro vizuální vyhodnocení nárůstu *A. niger*

Tabulka č. 2: MID (mg) vybraných sloučenin v enkapsulovaném a čistém stavu testovaných na *A. niger*, hodnocené po 3, 6 a 14 dnech

13 Seznam samostatných příloh

Tabulka č. 1: Střední hodnoty (medián) stupně nárůstu mycelia *A. niger* ze třech opakování, po ošetření vybranými sloučeninami v enkapsulovaném a čistém stavu hodnocených po 3, 6 a 14 dnech (hodnoceno dle stupnice pro vizuální hodnocení uvedené v tabulce č. 1 v textu)

Obrázek č. 1: Varianty ošetřené enkapsulovaným tymolem a eugenolem dokumentované po třech dnech od druhého přeočkování, tzn. po sedmnácti dnech od očkování prvního.

Obrázek č. 2: Varianty ošetřené enkapsulovaným tymolem a eugenolem dokumentované po šesti dnech od druhého přeočkování, tzn. po dvaceti dnech od očkování prvního.

Obrázek č. 3: Varianty ošetřené enkapsulovaným eugenolem po čtrnácti dnech od druhého přeočkování, tzn. po dvacetiosmi dnech od očkování prvního.