

Artykuł

Biologicznie aktywne preparaty z liści dzikich gatunków roślin z rodzaju *Rubus*

Łukasz Kucharski ^{1,*}, Krystyna Cybulska ², Edyta Kucharska ^{3,*} , Anna Nowak ¹ , Robert Pelech ³
i Adam Klimowicz ¹ 

- ¹ Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, PL-70111 Szczecin, Polska
- ² Katedra Mikrobiologii i Chemii Środowiska, Wydział Kształtowania Środowiska i Zarządzania Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, PL-71434 Szczecin, Polska
- ³ Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Materiałów Polimerowych, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, PL-70322 Szczecin, Polska
- * Korespondencja: lukasz.kucharski@pum.edu.pl (L.K.); edyta.kucharska@zut.edu.pl (E.K.); Tel: +48-660-476-340 (L.K.); +48-888-615-273 (E.K.)

Streszczenie: Rośliny z rodzaju *Rubus* (*R.*) są stosowane jako środki antyseptyczne w leczeniu chorób skóry. Pomimo dużego zainteresowania roślinami z tego rodzaju, istnieje niewiele doniesień na temat aktywności przeciwutleniającej i biologicznej preparatów uzyskanych z liści tych roślin. Dlatego postanowiliśmy ocenić aktywność przeciwutleniającą preparatów z liści dzikich gatunków roślin z rodzaju *Rubus* przy użyciu często stosowanych metod DPPH, ABTS i FRAP, a także określić całkowitą zawartość polifenoli metodą Folina-Ciocalteu i przeprowadzić ocenę jakościową za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS). Aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą otrzymanych preparatów oceniono stosując testy laboratoryjne: metodą krążkową i studzienkową w oparciu o normy EN 13697:2019, EN 13697:2015 i EN 1500:2013. Przeprowadzono badania mikrobiologiczne preparatów roślinnych wobec bakterii, grzybów i drożdży izolowanych ze środowiska oraz wobec szczepów referencyjnych. Ponadto dla porównania przeprowadzono testy przeciwdrobnoustrojowe antybiotyków przeciwko badanym szczepom. Współczynnik podziału n-oktanol/woda otrzymanych preparatów wyznaczono metodą kolby wstrząsanej w celu określenia ich lipofilowości. Na podstawie uzyskanych wyników można uznać, że wysoka zawartość polifenoli oraz innych związków antyoksydacyjnych i biologicznie czynnych jest parametrem odpowiedzialnym za skuteczne działanie preparatów roślinnych otrzymanych z dziko rosnących gatunków roślin z rodzaju *Rubus*. Metody oznaczania aktywności bakteriobójczej i grzybobójczej wyraźnie wskazują, że preparaty o obniżonej zawartości etanolu wykazują aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą na powierzchniach. Badanie dezynfekcji rąk poprzez nacieranie preparatami potwierdziło ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *Escherichia coli* K12 NCTC 10538. Uzyskane wyniki wskazują, że badane preparaty wykazują średnio dwukrotnie niższą aktywność wobec referencyjnych szczepów bakterii niż porównywalne antybiotyki. Preparaty otrzymane z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. mogą stanowić uzupełnienie klasycznych antybiotyków. Podczas gdy bakterie środowiskowe wykazywały podobną odpowiedź na preparaty i antybiotyki, ich wrażliwość była o około jedną trzecią mniejsza niż szczepów referencyjnych. Nasze badania wykazały, że otrzymane preparaty są wysoce hydrofilowe (logP < 0). W związku z tym preparaty te mogą być stosowane tylko w dwuwarstwach lipidowych w wodnym rdzeniu liposomów, a nie w otoczce lipidowej.

Słowa kluczowe: liście *Rubus idaeus* L.; liście *Rubus fruticosus* L.; preparaty biologicznie czynne; związki bioaktywne; potencjał antyoksydacyjny; aktywność przeciwdrobnoustrojowa



Cytat: Kucharski, L.; Cybulska, K.; Kucharska, E.; Nowak, A.; Pelech, R.; Klimowicz, A. Biologicznie aktywne preparaty z liści dzikich gatunków roślin z rodzaju *Rubus*. *Molecules* **2022**, *27*, 5486. <https://doi.org/10.3390/molecules27175486>

Redaktorzy naukowcy: Soran Maria Loredana i Vincenzo De Feo

Otrzymano: 6 lipca 2022 r.

Zaakceptowano: 23 sierpnia 2022 r.

Opublikowano: 26 sierpnia 2022 r.

Uwaga wydawcy: MDPI zachowuje neutralność w odniesieniu do rozstrzygnięć jurysdykcyjnych dotyczących publikowanych map i powiązań instytucjonalnych.



Copyright: © 2022 by the authors.

Licencjodawca MDPI, Bazylea, Szwajcaria.

Ten artykuł jest artykułem w otwartym dostępie

rozpowszechnianym zgodnie z warunkami i warunki licencji Creative Commons

Uznanie autorstwa (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Wprowadzenie

Skóra stanowi fizyczną, chemiczną i biologiczną barierę przed czynnikami zewnętrznymi [1–4]. Pod względem strukturalnym skóra stanowi korzystne środowisko dla rozwoju mikroorganizmów, w tym tych zaangażowanych w rozwój wielu chorób [4–9]. W ostatnich latach zaobserwowano

rosnące zainteresowanie preparatami roślinnymi pozyskiwanymi z roślin dziko rosnących. Preparaty stosowane miejscowo na skórę (poza działaniem antyoksydacyjnym, które jest niezwykle istotne w profilaktyce procesów starzenia się komórek) charakteryzują się aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec mikroorganizmów patogennych występujących na skórze [5,6,10-16].

Reaktywne formy tlenu (ROS), główny czynnik starzenia się skóry, powodują zaburzenia metabolizmu komórkowego poprzez zakłócanie struktury białek, lipidów i DNA [6]. Konsekwencją aktywności ROS jest zwiększony stres oksydacyjny, który wpływa na proces degradacji komórek [16-19]. Uważa się, że reaktywne formy tlenu są odpowiedzialne za wiele zaburzeń komórkowych poprzez ich chemiczne ataki na biostrukturę. ROS istnieją zarówno endogennie, jak i egzogennie dla organizmów żywych. Struktury te są stale wytwarzane przez ludzki metabolizm w wyniku utleniania [11]. Doniesiono, że 1-3% cząsteczek tlenu zredukowanych w mitochondriach może być przyczyną powstawania rodnika ponadtlenkowego [12]. Związki przeciwutleniające blokują łańcuchowe reakcje utleniania poprzez wychwytywanie wolnych rodników w metabolizmie. W ciągu ostatnich kilku dekad badania nad nowymi naturalnymi źródłami przeciwutleniaczy stały się bardziej popularne.

Wiele gatunków roślin ma znaczenie gospodarcze i lecznicze ze względu na bogatą zawartość olejków eterycznych. Rośliny te wykazują działanie przeciwskurczowe, przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwbiegunkowe, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Chociaż zawartość związków fenolowych, aktywność przeciwutleniająca i przeciwdrobnoustrojowa wielu roślin została dobrze zbadana, niewiele informacji jest dostępnych na temat preparatów pochodzących z dzikich gatunków roślin. Oczywiście jest, że większość zielonych roślin, warzyw i owoców jest głównym źródłem naturalnych przeciwutleniaczy. Spożywanie tych przeciwutleniaczy w diecie człowieka jest rozsądnym sposobem na zmniejszenie dysfunkcji mózgu, chorób sercowo-naczyniowych, zaćmy i ryzyka nowotworów [11,13,14,20-32].

R. idaeus L. i *R. fruticosus* L. to wieloletnie rośliny należące do rodzaju *Rubus* spp. z rodziny *Rosaceae*. Owoce tych roślin są często wykorzystywane jako ważne źródło cennych minerałów. W medycynie tradycyjnej liście tych roślin stosuje się w postaci naparów ze względu na ich działanie moczopędne, rozkurczowe, przeciwcukrzycowe i przeciwbiegunkowe. Kompresy lub balsamy wykonane z liści tych roślin są stosowane w leczeniu różnych chorób skóry dzięki ich silnemu działaniu ściągającemu [17-24,32-36]. Metanolowe i etanolowe, a także wodno-etanolowe ekstrakty z owoców, pędów i wszystkich części różnych odmian *Rubus idaeus* są skuteczne przeciwko *Streptococcus typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* [17]. Olej z nasion roślin z rodzaju *Rubus* zawiera witaminy, steroidy i lipidy, podczas gdy w częściach nadziemnych zidentyfikowano minerały, flawonoidy, glikozydy, terpeny, kwasy i garbniki. Dlatego oleje z nasion i ekstrakty uzyskane z nadziemnych części tych roślin wykazują różnorodne działania farmakologiczne, takie jak przeciwutleniacze, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwcukrzycowe, przeciwbiegunkowe i przeciwwirusowe. Ponieważ rośliny te są znane ze swoich nadziemnych części i nasion o wartości leczniczej, kosmetycznej i odżywczej oraz są skoncentrowanym źródłem cennych składników odżywczych i bioaktywnych o znaczeniu terapeutycznym, postanowiliśmy zbadać aktywność przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową preparatów z liści tych roślin [17,20-24,37-40].

W niniejszym badaniu zbadano potencjał przeciwutleniający dwóch preparatów, preparatu 1 (P1) uzyskanego z liści *R. idaeus* L. i preparatu 2 (P2) uzyskanego z liści *R. fruticosus* L. Aktywność biobójczą i bakteriobójczą P1 i P2 oceniano wobec referencyjnych szczepów bakterii, grzybów i drożdży. Ponadto przetestowaliśmy dezynfekcję rąk za pomocą pocierania różnymi preparatami. Aby określić lipofilowość preparatów, współczynnik podziału n-oktanol/woda został określony metodą kolby wstrząsowej. Ponadto ogólnym celem tego badania było uzyskanie preparatów roślinnych o obniżonej zawartości etanolu, ponieważ alkohol etylowy stosowany w stężeniu 70 g/100 ml jest obecnie zarejestrowany jako surowiec do produkcji różnych preparatów. Etanol jest wykorzystywany do przygotowywania leków jako surowiec farmaceutyczny i musi być stosowany zgodnie z Prawem Farmaceutycznym w celu dopuszczenia do obrotu przez Urząd Rejestracji. Zgodnie z wymienionymi metodami, preparaty z liści *R. idaeus* L.

i *R. fruticosus* L. wykazały dobrą potencjalną aktywność przeciwutleniającą i redukującą rodniki. Ilościowe metody oznaczania aktywności bakteriobójczej i grzybobójczej chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych jednoznacznie wykazały, że otrzymane preparaty wykazują aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą na powierzchniach. Badanie dezynfekcji rąk poprzez pocieranie preparatami potwierdziło ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *Escherichia coli* K12 NCTC 10538. Działanie preparatów stosowanych na skórę zależy od aktywności substancji biologicznie czynnych, a także od zdolności substancji czynnych do penetracji skóry, zwłaszcza przez tzw. cement międzykomórkowy. Cement międzykomórkowy jest hydrofobowy i lipofilowy, składający się z martwej warstwy rógowej naskórka. Liposomy to kuliste pęcherzyki składające się z jednej lub więcej dwuwarstw lipidowych ułożonych koncentrycznie. Rdzeń liposomów stanowi kropla wody. Nośniki lipofilowe mogą zwiększać dyfuzję substancji poprzez mieszanie się z lipidami międzykomórkowymi. Badania lipofilowości wykazały, że zarówno preparaty P1, jak i P2 są wysoce hydrofilowe ($\log P = -0,18$ w przypadku P1 i $-0,19$ w przypadku P2). Zatem preparaty te można znaleźć w dwuwarstwach lipidowych w wodnym rdzeniu liposomów, a nie w otocze lipidowej.

2. Wyniki

2.1. Składniki fitochemiczne preparatów otrzymanych z liści *Rubus idaeus* L. i *Rubus fruticosus* L.

Preparaty roślinne z liści *Rubus idaeus* L. i *Rubus fruticosus* L. analizowano za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS).

W tabeli 1 przedstawiono składniki preparatów i ich potencjalną aktywność biologiczną.

Głównymi składnikami (>1% całkowitej powierzchni piku) preparatu roślinnego z liści *Rubus idaeus* L. były 4H-piran-4-on, 5-(hydroksymetylo)furfural, pirogallol, kwas heksadekanowy i ester metylowy kwasu linolowego. Te same związki zostały zidentyfikowane w preparacie z liści jeżyny (*Rubus fruticosus* L.), wraz z 2-hydroksy-5-metylobenzaldehydem i kwasem chinowym. Innymi składnikami (<1% całkowitej powierzchni piku) preparatów P1 i P2 były 2-heksenal, 2-heptanon, 2-heksanol-3-metylowy, 4-heptanol-3-etylowy, 3-heksanol-5-metylowy, 2,4-heptadienal i 2-nonanon. Ponadto analiza wykazała obecność dwóch kwasów, kwasu n-dekanowego (tylko w P2) i kwasu dodekanowego. Szczegółowe informacje znajdują się w danych uzupełniających: Chromatogram GC-MS preparatu 1 (P1) otrzymanego z liści *Rubus idaeus* L. (Rysunek S1); chromatogram GC-MS preparatu 2 (P2) otrzymanego z liści *Rubus fruticosus* L. (Rysunek S2) oraz struktury związków zidentyfikowanych w badanych preparatach otrzymanych z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. (Tabela 1, Rysunek S3).

2.2. Badania ATR-FTIR

Rysunek 1 przedstawia widmo IR preparatu 1 otrzymanego z liści *R. idaeus* L..

(a) i preparat 2 otrzymany z liści *R. fruticosus* L. (b).

W widmach IR P1 i P2 występuje pasmo absorpcji przy liczbie falowej około 1655 cm^{-1} , które jest charakterystyczne dla grupy karbonylowej pochodzącej od ketonów (2-heptanon, 4H-piran-4-on, 2-nonanon) i estru (ester metylowy kwasu linolowego). Występują pasma o częstotliwościach około 3300 , 2940 i 2830 cm^{-1} , przypisywane drganiom rozciągającym grupy hydroksylowej (O-H). Grupy te mogą pochodzić od następujących związków: 2-heksanol-3-metylowy, 4-heptanol-3-etylowy, 3-heksanol-5-metylowy, 4H-piran-4-on, 5-(hydroksymetylo) furfural, pirogallol, kwas dodekanowy, kwas heksadekanowy i 2-hydroksy-5-metylobenzaldehyd, przy czym kwas chinowy i kwas n-dekanowy występują tylko w preparacie 2. Występowanie pasm absorpcji przy odpowiednich liczbach falowych (tj. około 3300 , 2940 i 2830 cm^{-1}) przypisuje się drganiom rozciągającym pochodzącym od atomów węgla C-H. Widmo IR pokazuje pasma absorpcyjne w zakresie od 1430 do 1110 cm^{-1} , pochodzące od jednocząsteczkowych wiązań rozciągających 4H-piran-4-onu i 5-(hydroksymetylo)furfuralu (Rysunek 1) [7,49-53].

Tabela 1. Składniki preparatów otrzymanych z liści *Rubus idaeus* L. i *Rubus fruticosus* L., jak określono za pomocą GC-MS.

Związek chemiczny	Czas retencji (min)	Formuła	Aktywność biologiczna
2-heksenal ^{1,2}	5.18	C ₍₆₎ H ₁₀ O	-
2-heptanon ^{1,2}	5.31	C ₍₇₎ H ₁₄ O	-
2-heksanol-3-metylu ^{1,2}	5.41	C ₍₇₎ H ₁₆ O	-
4-heptanol-3-etylu ^{1,2}	5.56	C ₍₉₎ H ₂₀ O	-
3-heksanol-5-metylu ^{1,2}	7.81	C ₍₇₎ H ₁₆ O	-
4H-piran-4-on ^{1,2}	10.48	C ₍₆₎ H ₍₈₎ O ₄	(D) (-) (1)
5-(hydroksymetylo)furfural ^{1,2}	11.58	(C) (6) (H) (6) (O) (3)	[35,41]
2,4-heptadienal ^{1,2}	12.98	C ₍₇₎ H ₁₀ O	przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze [42,43]
2-honanon ^{1,2}	13.69	C ₍₉₎ H ₁₈ O	
Pirogallol ^{1,2}	14.54	C ₍₆₎ H ₍₆₎ O ₃	wielokierunkowa aktywność biologiczna [42-44]
2-hydroksy-5-metylobenzaldehyd ²	14.59	C ₍₈₎ H ₍₈₎ O ₂	(D) (-) (1)
kwasy n-dekanowe ²	16.51	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze [42,43]
kwasy chinowe ²	17.01	C ₇ H ₁₂ O ₆	przeciwutleniacz, środek przeciwzapalny [45,46]
kwasy dodekanowe ^{1,2}	19.58	C ₍₁₂₎ H ₍₂₄₎ O ₂	przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze [42,43]
kwasy heksadekanowe ^{1,2}	20.60	C ₍₁₆₎ H ₍₃₂₎ O ₂	przeciwutleniacz, środek przeciwzapalny, antybakteryjne [9,47,48]
ester metylowy kwasu linolowego ^{1,2}	22.37	C ₍₁₉₎ H ₍₃₂₎ O ₂	przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze [6,9,46,48]

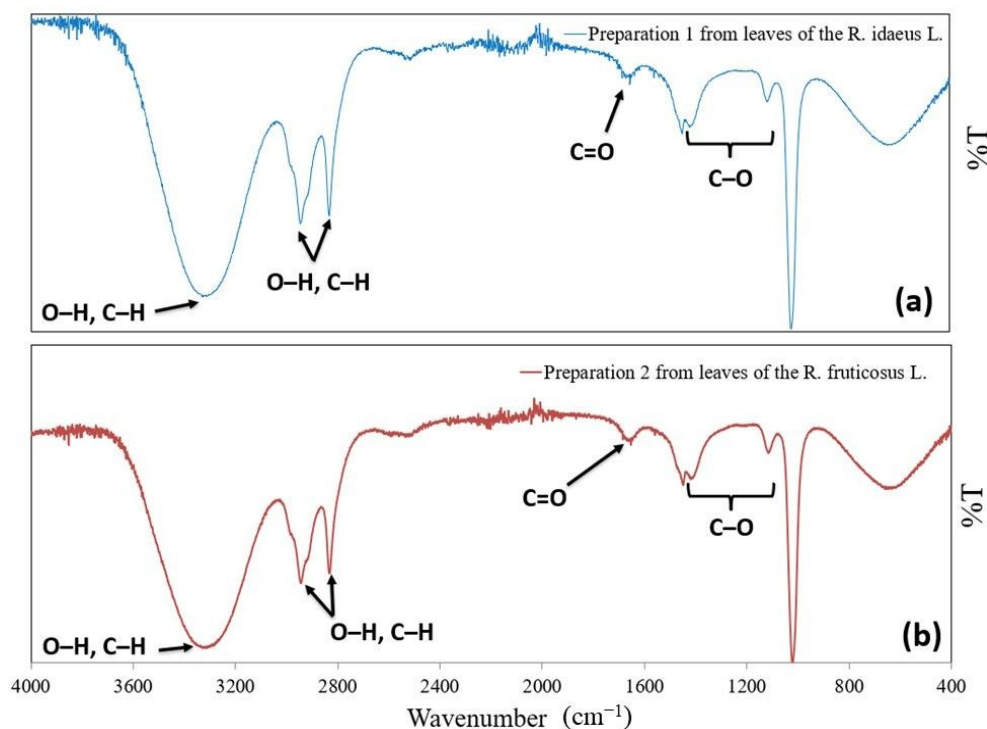
¹ - preparat z liści *Rubus idaeus* L., ² - preparat z liści *Rubus fruticosus* L.

2.3. Ocena aktywności wychwytywania wolnych rodników

Tabela 2 przedstawia aktywność przeciwutleniającą i całkowitą zawartość polifenoli w preparatach uzyskanych z liści *Rubus idaeus* L. i *Rubus fruticosus* L., z pomiarem przeprowadzonym metodami DPPH, ABTS, FRAP i Folin-Ciocalteu.

Ekstrakty etanolowe i etanolowo-wodne uzyskane z materiałów roślinnych charakteryzują się potencjałem przeciwutleniającym [52,54-57]. Ekstrakty etanolowe z liści, pąków i kory *Cinnamomum cassia* wykazują niezwykle potężny potencjał przeciwutleniający, z całkowitą zawartością polifenoli w zakresie od 6,313 do 9,534 g GA/100 g suchej masy materiałów (DW). Najwyższą zawartość polifenoli stwierdzono w ekstraktach etanolowych z kory (9,534 g GA/100 g DW), a następnie z liści (8,854 g GA/100 g DW) i pąków (6,313 g GA/100 g DW) [46,56]. Wyniki te pokazują, że w 95% ekstraktach etanolowych z liści całkowita zawartość polifenoli (8,854 g/100 g DW) była około dwa razy większa niż całkowita zawartość flawonoidów (3,348 g/100 g DW).

50% ekstrakty etanolowe z liści chińskiego *Cinnamomum cassia* mają całkowitą zawartość fenoli 1558,7 µg GA/g DW i całkowitą zawartość flawonoidów 981,1 µg/g DW. Polifenole są wtórnymi metabolitami występującymi w roślinach; mają ważne właściwości, w tym zmniejszanie wolnych rodników i rozkładanie nadtlenków [46,56].



Rysunek 1. Widma absorpcyjne ATR-FTIR (a) preparatu 1 otrzymanego z liści *R. idaeus* L. i (b) preparatu 2 otrzymanego z liści *R. fruticosus* L.

Tabela 2. Aktywność przeciwutleniająca i całkowita zawartość polifenoli w preparatach otrzymanych z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L.

Preparaty	Aktywność przeciwutleniająca:			Całkowita zawartość polifenoli:
	DPPH	ABTS (mg Trolox/g surowca)	FRAP	F-C (mg GA/g surowca)
P1 <i>Rubus idaeus</i> L. *	3.38 ± 0.03 a	17.89 ± 1.07 b	6.13 ± 0.17 a	6.52 ± 0.57 ab
P2 <i>Rubus fruticosus</i> L. *	3.43 ± 0.02 ab	20.01 ± 0.20 a	7.39 ± 0.13 ab	7.55 ± 0.43 a

* Średnia ± S.D. (n = 3), a, b - różne litery: wartości różnią się istotnie pomiędzy analizowanymi preparatami.

Aktywność przeciwutleniająca in vitro 95 i 50% ekstraktów etanolowych z różnych próbek *Tephrosia purpurea* zebranych w sezonie letnim (kwiecień), deszczowym (sierpień) i zimowym (grudzień) została określona przez Edewor i in [58]. *Tephrosia purpurea* wykazała dużą zmienność IC_{50} , w zakresie od 65 do 156 $\mu\text{g/ml}$ [58].

Ekstrakty z owoców dzikiej róży są bogate w związki o właściwościach przeciwutleniających, takie jak witamina C, karotenoidy i fenole. Ekstrakt z owoców dzikiej róży *spinosissima* w 95% etanolu wykazuje wyższą zawartość fenoli i aktywność przeciwutleniającą w porównaniu do ekstraktu w 50% etanolu. Ponadto, całkowita zdolność przeciwutleniająca wodnego i etanolowego ekstraktu z owoców dzikiej róży została oceniona za pomocą testu FRAP. Uzyskany zakres wartości FRAP okazał się podobny do wartości stwierdzonych przez innych autorów, w tym Souza i wsp. [30], Górski i wsp. [50], Mostafa i wsp. [51] oraz Rojas-Vera i wsp. [52].

Wyniki przedstawione w tabeli 2 wskazują, że wyższą aktywność przeciwutleniającą (dla wszystkich metod) i wyższą całkowitą zawartość polifenoli zaobserwowano dla preparatów roślinnych otrzymanych z liści *Rubus fruticosus* L.: $3,43 \pm 0,02$ mg troloksu/g surowca dla metody DPPH,

$20,01 \pm 0,20$ mg troloksu/g surowca dla metody ABTS, $7,39 \pm 0,13$ mg troloksu/g surowca dla metody FRAP i $7,55 \pm 0,43$ mg GA/g surowca dla metody Folin-Ciocalteu. Aktywność przeciwutleniająca i całkowita zawartość polifenoli w preparacie

uzyskany z liści *Rubus idaeus* L. został scharakteryzowany metodami DPPH, ABTS, FRAP i Folin-Ciocalteu i wynosił odpowiednio $3,38 \pm 0,03$ mg troloxu / g surowca, $17,89 \pm 1,07$ mg troloxu / g surowca, $6,13 \pm 0,17$ mg troloxu / g surowca i $6,52 \pm 0,57$ mg GA / g surowca; patrz Tabela 2.

2.4. Testy dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych według normy EN 13697:2019

Tabela 3 i Tabela S2 przedstawiają wyniki testów dezynfekcji powierzchni preparatu 1 (P1) otrzymanego z liści *R. idaeus* L. oraz preparatu 2 (P2) otrzymanego z liści *R. idaeus* L., *R. fruticosus* L. zgodnie z normą EN 13697:2019.

Tabela 3. Wyniki testów dezynfekcji powierzchni preparatów 1 i 2 według normy EN 13697:2019.

Przygotowanie do testu	Leczenie	EN 13697:2019 (faza 2 etap 2)					
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
LR/% redukcji P1 Koncentracja (0,6) (g/100) (mL)	czas kontaktu 60 ± 10 s	$1.45 \pm 0.06b / >96.4$	$1.44 \pm 0.04c / >96.3$	$1.42 \pm 0.01a / >96.1$	$1.38 \pm 0.11a / >95.8$	$0.42 \pm 0.10b / >61.9$	$0.60 \pm 0.03c / >74.8$
LR/% redukcji P1 Stężenie 60 g/100 ml		>4.83/ >99.9	>4.81/ >99.9	>4.79/ >99.9	>4.08/ >99.9	>3.79/ >99.9	>3.67/ >99.9
LR/% redukcji P1 Stężenie 60 g/100 ml	czas kontaktu 300 ± 10 s	>4.83/ >99.9	>4.81/ >99.9	>4.79/ >99.9	>4.76/ >99.9	>3.79/ >99.9	>3.67/ >99.9
LR/% redukcji P2 Koncentracja (0,6) (g/100) (mL)	czas kontaktu 60 ± 10 s	$1.42 \pm 0.06b / >96.1$	$1.35 \pm 0.12a / >95.5$	$1.38 \pm 0.11c / >95.8$	$1.39 \pm 0.14a / >95.9$	$0.62 \pm 0.11d / >76.0$	$0.41 \pm 0.18a / >61.0$
LR/% redukcji P2 Stężenie 60 g/100 ml		$3.90 \pm 0.04a / >99.9$	>4.72/ >99.9	>4.75/ >99.9	>4.76/ >99.9	>3.69/ >99.9	>3.78/ >99.9
LR/% redukcji P2 Stężenie 60 g/100 ml	czas kontaktu 300 ± 10 s	>4.79/ >99.9	>4.72/ >99.9	>4.75/ >99.9	>4.76/ >99.9	>3.69/ >99.9	>3.78/ >99.9

Każda wartość jest średnią z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym w trzech niezależnych eksperymentach. Dowlone dwie średnie w tej samej kolumnie, po których następuje ta sama litera, nie różnią się istotnie ($p > 0,01$) w testach wielokrotnego zakresu Tukeya. LR - r e d u k c j a logarytmiczna, z wartością obliczoną z równania (1); P1 - preparat 1, uzyskany z liści *R. idaeus* L.; P2 - preparat 2, uzyskany z liści *R. fruticosus* L.; a,b,c,d - różne litery oznaczają, że wartości różnią się istotnie między analizowanymi preparatami.

Preparat 1 (P1) otrzymany z liści *R. idaeus* L. i preparat 2 (P2) otrzymany z liści *R. fruticosus* L. zostały ocenione przy użyciu testu dezynfekcji powierzchni. W przypadku tego testu, kryterium "zaliczenia" było zmniejszenie żywotności organizmów testowych o 99,9% ($LR > 3$). Wyniki testów dezynfekcji powierzchni (Tabela 3) wykazały, że P1 i P2 (w stężeniu 60 g/100 mL) wykazywały aktywność biobójczą wobec wszystkich testowanych szczepów zarówno po czasie kontaktu (60 ± 10 s), jak i po 300 ± 10 s. Procent redukcji drobnoustrojów (% redukcji) wynosił powyżej 99,9, a redukcja log wynosiła powyżej 3; patrz Tabela 3.

2.5. Testy dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych według normy EN 13697:2015

Tabela 4 i Tabela S3 przedstawiają wyniki testów dezynfekcji powierzchni preparatu 1 (P1) otrzymanego z liści *R. idaeus* L. i preparatu 2 (P2) otrzymanego z liści *R. fruticosus* L. przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Tabela 4. Wyniki testów dezynfekcji powierzchni preparatów 1 i 2 według normy EN 13697:2015.

EN 13697: 2015 (faza 2 etap 2)			
Przygotowanie do testu	Leczenie	(<i>Staphylococcus</i>) (<i>aureus</i>) ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
Przygotowanie 1 (P1)			
LR/% redukcji Stężenie P1 14 g/100 ml	czas kontaktu 60± 10 s	1.74± 0.09 b/>98.1	1.73± 0.14 a/>98.1
LR/% redukcji Stężenie P1 21 g/100 ml		1.98± 0.07 c/>98.9	1.83± 0.04 b/>98.5
LR/% redukcji Stężenie P1 28 g/100 ml		2.25± 0.06 a/>99.4	2.21± 0.01 a/>99.3
LR/% redukcji Stężenie P1 35 g/100 ml		3.28± 0.10 b/>99.9	2.47± 0.08 a/>99.6
LR/% redukcji Stężenie P1 42 g/100 ml		4.35± 0.13 c/>99.9	3.70± 0.09 c/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P1 49 g/100 ml		4.78± 0.04 a/>99.9	4.75± 0.11 d/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P1 56 g/100 ml		>7.10/>99.9	>7.11/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P1 63 g/100 ml		>7.10/>99.9	>7.11/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P1 70 g/100 mL Preparat 2 (P2)		>7.10/>99.9	>7.11/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P2 14 g/100 ml	czas kontaktu 60± 10 s	1.84± 0.01 b/>98.5	1.76± 0.05 b/>98.2
LR/% redukcji Stężenie P2 21 g/100 ml		2.19± 0.06 a/>99.3	1.92± 0.09 a/>98.7
LR/% redukcji Stężenie P2 28 g/100 ml		2.31± 0.07 d/>99.5	2.35± 0.02 b/>99.5
LR/% redukcji Stężenie P2 35 g/100 ml		4.46± 0.01 c/>99.9	4.31± 0.09 b/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P2 42 g/100 ml		>7.12/>99.9	>7.08/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P2 49 g/100 ml		>7.12/>99.9	>7.08/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P1 56 g/100 ml		>7.12/>99.9	>7.08/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P2 63 g/100 ml		>7.12/>99.9	>7.08/>99.9
LR/% redukcji Stężenie P2 70 g/100 mL Etanol (E)		>7.12/>99.9	>7.08/>99.9
LR/% redukcji Stężenie E 80 g/100 ml		>7.12/>99.9	>7.08/>99.9
LR/% redukcji Stężenie E 90 g/100 ml		3.93± 0.05 b/>99.9	3.93± 0.07 c/>99.9
LR/% redukcji Stężenie E 100 g/100 ml		>7.11/>99.9	>7.11/>99.9
		>7.11/>99.9	>7.11/>99.9

Każda wartość jest średnią z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym w trzech niezależnych eksperymentach. Dowolne dwie średnie w tej samej kolumnie, po których następuje ta sama litera, nie różnią się istotnie ($p > 0,01$) w testach wielokrotnego zakresu Tukeya. LR - redukcja logarytmiczna, z wartością obliczoną z równania (1); P1 - preparat 1, otrzymany z liści *R. idaeus* L.; P2 - preparat 2, otrzymany z liści *R. fruticosus* L.; E - etanol; a,b,c,d - różne litery oznaczają, że wartości różnią się istotnie między analizowanymi preparatami.

Wykazano, że preparat 1 w stężeniu 35–70 g/100 ml jest szczególnie aktywny na powierzchniach przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, a w stężeniu 42–70 g/100 ml przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Preparat 2 w stężeniu 35–70 g/100 ml okazał się szczególnie aktywny na powierzchniach przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 - tabela 4.

2.6. Testowanie dezynfekcji rąk za pomocą wcierania preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 1500:2013

Tabela 5 przedstawia analizę statystyczną preparatów uzyskanych z liści (P1 i P2) i preparatu referencyjnego (PR) zgodnie z normą EN 1500:2013 przy użyciu 6 ml odpowiedniego preparatu przeciwko testowemu szczepowi *Escherichia coli* K12 NCTC 10538; Tabela uzupełniająca S1 przedstawia posortowane wartości dla testu statystycznego.

Tabela 5. Analiza statystyczna preparatów roślinnych P1 i P2 oraz preparatu referencyjnego (PR) zgodnie z normą EN 1500:2013 wobec szczepu *Escherichia coli* K12 NCTC 10538.

Numer testera	LR		PR-P1	LR		PR-P2
	PR	P1		PR	P2	
1	3.39±0.11 a	4.31±0.01 a	−0.92±0.05 a	3.39±0.11 d	3.24±0.12 d	0.15±0.14 b
2	4.45±0.09 a	4.76±0.01 a	−0.30±0.05 b	4.45±0.19 d	4.54±0.09 cd	−0.09±0.20 c
3	4.41±0.08 ab	4.52±0.03 ab	−0.12±0.4 ab	4.41±0.06 c	4.44±0.05 c	−0.03±0.08 c
4	3.69±0.21 a	3.83±0.06 b	−0.13±0.12 ab	3.69±0.11 cd	3.59±0.03 c	0.11±0.06 c
5	3.17±0.19 a	3.68±0.09 c	−0.50±0.012 a	3.17±0.13 cd	3.51±0.01 b	−0.34±0.06 bc
6	3.99±0.08 ab	4.07±0.21 c	−0.08±0.02 ab	3.99±0.14 cd	3.74±0.09 bc	0.24±0.21 d
7	4.91±0.16 ab	4.09±0.08 bc	0.82±0.04 b	4.91±0.10 e	5.82±0.06 cd	−0.90±0.12 d
8	3.14±0.19 b	3.26±0.03 ab	−0.12±0.02 a	3.14±0.23 e	3.06±0 d	0.08±0.04 e
9	3.48±0.17 ab	4.06±0.04 bc	−0.58±0.05 ab	3.48±0.05 e	4.04±0.21 cd	−0.56±0.01 e
10	3.78±0.04 a	4.09±0.05 bc	−0.32±0.21 c	3.78±0.05 de	3.64±0.12 ab	0.14±0.10 de
11	3.85±0.09 c	4.22±0.04 cd	−0.37±0.20 d	3.85±0.08 d	4.54±0.10 d	−0.69±0.05 c
12	3.93±0.11 c	3.98±0.03 ab	−0.04±0.12 ab	3.93±0.14 c	3.67±0.07 c	0.27±0.10 d
13	3.49±0.13 d	3.99±0.09 cd	−0.50±0.05 ab	3.49±0.19 d	3.61±0.12 a	−0.13±0.12 cd
14	3.56±0.11 cd	3.94±0.03 de	−0.38±0.18 e	3.56±0.12 de	3.61±0.08 c	−0.05±0.10 e
15	3.49±0.19 e	3.91±0.04 d	−0.43±0.13 c	3.49±0.09 c	3.74±0.08 a	−0.26±0.12 a
16	3.37±0.12 ab	3.51±0.08 e	−0.14±0.10 b	3.37±0.04 b	3.32±0.06 b	0.05±0.14 b
17	3.73±0.19 bc	4.74±0.08 d	−1.01±0.13 de	3.73±0.02 b	3.65±0.05 b	0.08±0.11 ab
18	3.69±0.18 b	4.01±0.01 de	−0.32±0.15 ab	3.69±0.10 bc	3.62±0.09 b	0.07±0.06 cd
19	3.65±0.10 b	4.07±0.03 de	−0.43±0.10 b	3.65±0.13 bc	3.60±0.05 b	0.05±0.07 c
20	3.70±0.10 b	4.12±0.05 b	−0.42±0.04 ab	3.70±0.21 de	3.50±0.20 a	0.20±0.05 d

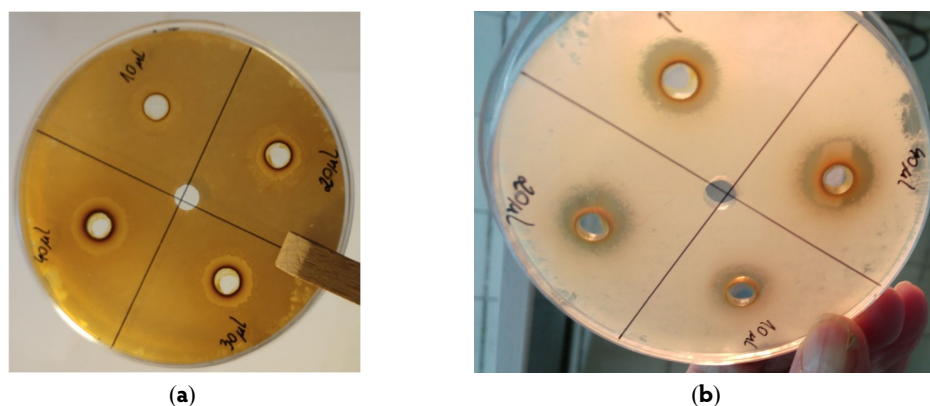
Każda wartość jest średnią z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym w trzech niezależnych eksperymentach. Poziom ufności testu ustalono na $p=0.025$. Produkt jest uważany za mniej aktywny niż preparat referencyjny przy limicie LR wynoszącym 0,60, wartość mediany PRP1 wynosi 0,34, a PRP2 wynosi 0,05, LR - wartość redukcji logarytmicznej obliczona z równania (1); PR - preparat referencyjny (propan-2-ol w stężeniu 60 g/100 ml); P1 - preparat 1, uzyskany z liści *R. idaeus* L.; P2 - preparat 2, uzyskany z liści *R. idaeus* L.

R. fruticosus L.; a,b,c,d,e - różne litery oznaczają, że wartości różnią się istotnie między analizowanymi preparatami.

2.7. Aktywność biologiczna suchych preparatów i antybiotyków

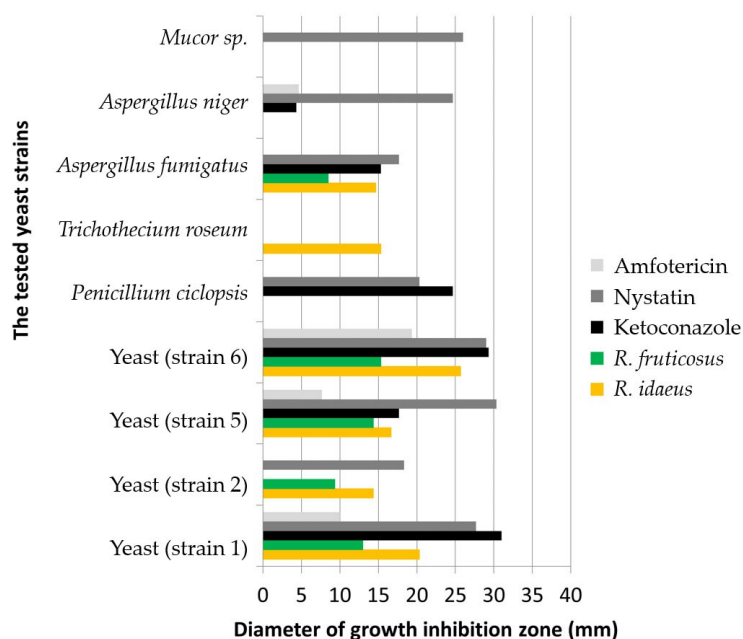
Przeprowadzona przez nas ocena metod nanoszenia preparatów roślinnych na podłoże wykazała, że należy stosować metodę studzienkową. Wynika to prawdopodobnie z różnych parametrów dyfuzji substancji aktywnych zawartych w P1 i P2 oraz ich sorpcji na bibule (rys. 2). Z badań opisanych w punkcie 4.11.1 wynika, że zastosowanie preparatów 1 i 2 w ilości 40 µL powoduje uzyskanie największej strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów. W związku z tym do oceny mikrobiologicznej użyto preparatów w ilości 40 µL.

W przypadku antybiotyków metoda krążkowa jest odpowiednia i powszechnie stosowana. W związku z tym nie przeprowadzono oceny mikrobiologicznej antybiotyków przeciwko badanym szczepom metodą studzienkową.



Rysunek 2. Metody nanoszenia preparatów roślinnych na podłoże Trypticase Soy Agar metodą studzienkową przeciwko (a) *Escherichia coli* i (b) *Bacillus sp.*

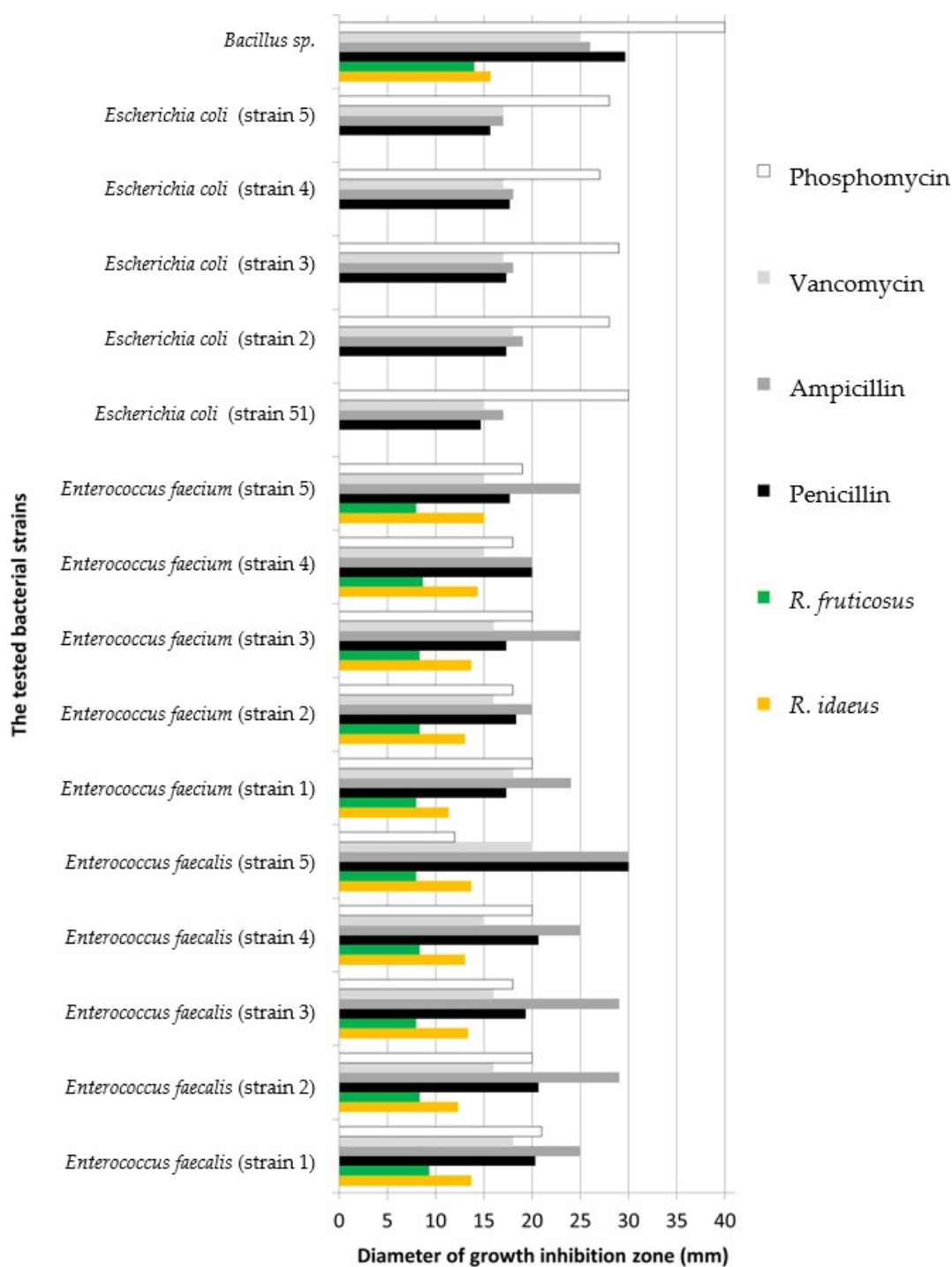
Rysunki 3 i 4 przedstawiają wpływ preparatów roślinnych otrzymanych z liści *Rubus idaeus* L. i *Rubus fruticosus* L. na mikroorganizmy wyizolowane ze środowiska przemysłu spożywczego i ich otoczenia.



Rysunek 3. Interakcja P1, P2 i antybiotyków z izolowanymi szczepami drożdży i grzybów.

Preparat roślinny z liści *R. idaeus* był aktywny wobec siedemnastu mikroorganizmów, a *R. fruticosus* wobec szesnastu testowanych szczepów mikroorganizmów. Nie zaobserwowano aktywności wobec *Penicillium cyclospis*, *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* czy *Escherichia coli*, a w przypadku preparatu jeżynowego dodatkowo wobec szczepu *Trichothecium roseum*.

Działanie antybiotyków na wyizolowane szczepy bakterii było silniejsze niż działanie preparatów. Wszystkie rodzaje antybiotyków były aktywne wobec wyizolowanych bakterii (rysunek 4). Nie stwierdzono natomiast aktywności antybiotyków: amfoterycyny wobec wszystkich grzybów i jednego szczepu drożdży, nystatyny wobec jednego szczepu grzybów i ketokonazolu wobec dwóch grzybów i jednego szczepu drożdży. Preparaty roślinne były aktywne wobec wszystkich drożdży i *Aspergillus fumigatus*. Spośród wszystkich testowanych preparatów i antybiotyków tylko P1 był aktywny wobec *Trichothecium roseum* (ryc. 3). Preparaty 1 i 2 zostały przetestowane pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec szczepów *Escherichia coli*, przy czym nie zaobserwowano stref zahamowania wzrostu tych mikroorganizmów.



Rysunek 4. Interakcja P1, P2 i antybiotyków z wyizolowanymi szczepami bakterii.

Tabela 6 przedstawia strefy zahamowania wzrostu wywołane przez preparaty roślinne i antybiotyki przeciwko trzynastu modelowym szczepom bakteryjnym.

Tabela 6. Wpływ preparatów roślinnych i antybiotyków na testowane referencyjne szczepy bakteryjne. Wyniki pochodzą z trzech niezależnych eksperymentów (n = 3). Średnia (± odchylenie standardowe).

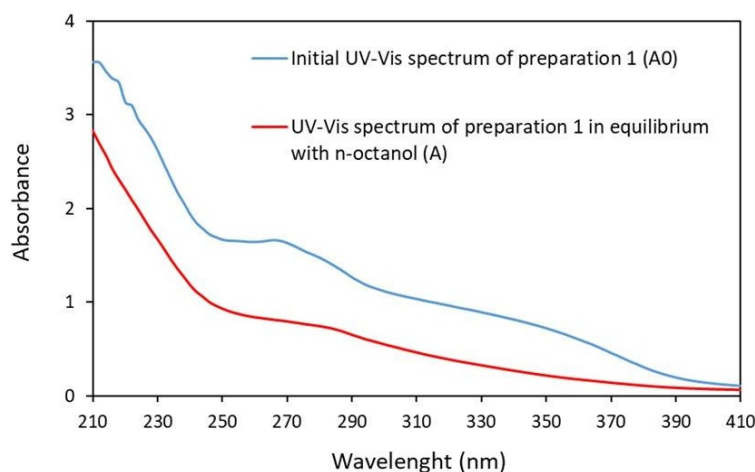
Bakteria/Symbol	<i>R. idaeus</i>	<i>R. fruticosus</i>	Doksycyklina	Ampicylina	Średnica strefy zahamowania wzrostu (mm)
	Cyprofloksacyna				
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	8,7±0,32c	8.3± 0.30 c	20.0± 0.30 b	20.3± 0.30 b	25.0± 0.32 a
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	15,0±0,39c	18.3± 0.12 c	35.0± 0.12 a	18.3± 0.12 c	24.7± 0.06 b
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC700603	8,3±0,30bc	6.3± 0.32 cd	5.7± 0.52 d	9.7± 0.58 b	19.3± 0.01 a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27075	8,7±0,50d	6.0± 0.30 d	49.7± 1.04 a	38.3± 0.06 b	31.7± 0.58 c
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC14028	7,0±0,55d	6.0± 0.52 d	30.3± 0.58 b	17.7± 0.30 c	37.0± 0.12 a
(A) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	16,7±0,06c	18.0± 0.12 c	21.7± 0.30 bc	26.7± 0.32 ab	28.3± 0.58 a
(B) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	17,3±0,01c	15.3± 0.58 c	41.7± 1.00 a	35.3± 0.12 b	33.7± 0.50 b
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	6.3± 0.15 d	6.0± 0.06 d	36.3± 0.30 a	20.0± 0.52 c	32.3± 0.55 b
<i>Streptococcus intermedius</i> ATCC29663	21.7± 0.59 c	19.7± 1.00 c	54.3± 2.00 a	35.3± 0.30 b	32.0± 0.06 b
<i>Sarcina lutea</i> ATCC9341	18.0±0.58d	14.3± 0.30 de	54.0± 0.01 a	35.0± 0.32 b	26.7± 0.12 c
<i>Bacillus subtilis</i>	14.0± 0.52 b	15.8± 0.52 b	32.3± 0.30 a	31.7± 0.30 a	34.3± 0.52 a
<i>Bacillus pseudomycoides</i>	15.3± 0.80 d	12.7± 0.30 d	25.3± 0.58 c	30.0± 0.30 b	37.3± 0.30 a
<i>Bacillus thuringiensis</i>	15.0± 0.12 c	12.3± 0.05 c	14.3± 0.30 c	30.0± 0.30 b	34.3± 0.32 a

Stwierdzono podobną aktywność przeciwbakteryjną obu badanych preparatów roślinnych wobec trzynastu referencyjnych szczepów bakteryjnych (Tabela 6). Średnica stref zahamowania wzrostu badanych szczepów bakteryjnych wynosiła od 6,3 do 21,7 mm dla preparatu otrzymanego z liści malin oraz od 6,0 do 19,7 mm dla preparatu otrzymanego z jeżyn. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną (strefa zahamowania wzrostu 21,7 mm w przypadku preparatu P1 oraz strefa zahamowania wzrostu 19,7 mm w przypadku preparatu P2) wykazano wobec szczepu referencyjnego *Streptococcus intermedius*.

Preparat malinowy wykazywał nieco wyższą aktywność wobec dziesięciu szczepów bakterii niż preparat jeżynowy, który wykazywał nieco wyższe strefy zahamowania wobec *Enterococcus faecalis* (18,3 mm) i *Staphylococcus aureus* (A) (18,0 mm). Przeciwno szczepowi *Enterococcus faecalis*, zarówno preparaty roślinne, jak i antybiotyk Ampicillin wykazały podobne wartości stref zahamowania, bez statystycznie istotnych różnic (15,0–18,3 mm). Przeciwno szczepowi *Bacillus thuringiensis*, P1, P2 i antybiotyk Doxycycline charakteryzowały się podobnymi wartościami stref zahamowania wzrostu i nie wykazano statystycznie istotnych różnic (12,3–15,0 mm). Natomiast wobec szczepu *Klebsiella pneumoniae* preparat z liści malin charakteryzował się wyższą aktywnością niż Doksycyklina i wykazywał statystycznie istotnie większą strefę zahamowania wzrostu (8,3 mm) niż testowany antybiotyk (5,7 mm).

2.8. Pomiar lipofilowości

Nasze wyniki pokazują, że wartości współczynnika podziału określone metodą kolby wstrząsanej dla preparatów otrzymanych z liści *Rubus idaeus* L. (P1) i *Rubus fruticosus* L. (P2) wynosiły odpowiednio $0,18 \pm 0,001$ i $0,19 \pm 0,002$; patrz rysunek 5. Badania lipofilowości wykazały, że oba preparaty są wysoce hydrofilowe.



Rysunek 5. Przykład widma UV-Vis preparatu otrzymanego z liści rośliny *Rubus idaeus* L.

3. Dyskusja

Ekstrakty z materiałów roślinnych mogą być potencjalnym suplementem przeciwutleniającym dla produktów spożywczych i farmaceutycznych oraz mogą być stosowane do ochrony żywności przed degradacją oksydacyjną. Wyniki tego badania wskazują, że preparaty wykonane z liści rodzaju *Rubus* mają skuteczną aktywność zmiatania rodnika ABTS, podobną do standardowych przeciwutleniaczy, tj. butylovanego hydroksyanizolu (BHA), butylovanego hydroksytoluenu (BHT) i α -tokoferolu. Ponadto, badania przeprowadzone przez innych autorów wykazały, że ekstrakt uzyskany z liści

R. fruticosus może być silnym przeciwutleniaczem do stabilizacji oleju słonecznikowego. Ich wyniki wykazały najwyższą skuteczność 1000 ppm tego ekstraktu, a następnie BHT i BHA. Ekstrakty metanolowe i octanu etylu przygotowano z młodych liści *Pistacia atlantica* Desf., które zebrano wiosną i oceniono ich aktywność przeciwutleniającą, chelatującą i zmiatającą. Ekstrakty uzyskane z liści *Pistacia atlantica* Desf. wykazały silną aktywność przeciwutleniającą w porównaniu z syntetycznymi przeciwutleniaczami, takimi jak BHA, BHT i α -tokoferol; patrz Tabela 2 [7,59,60].

Wysoka zawartość polifenoli i zdolność przeciwutleniająca malin, jeżyn i jagód andyjskich (*Rubus glaucus* Benth) sugeruje, że owoce te mogą być bogatym źródłem naturalnych pigmentów, nutraceutyków i naturalnych przeciwutleniaczy. Całkowita zawartość polifenoli (oceniana metodą Folina-Ciocalteu), aktywność przeciwutleniająca (mierzona zdolnością zmiatania rodników ABTS) i moc przeciwutleniająca redukcji żelaza (FRAP) zostały wcześniej określone w ekstraktach z owoców jagody andyjskiej. Całkowita zawartość polifenoli wynosiła $294 \pm 37,2$ mg GA/100g surowca, podczas gdy aktywność przeciwutleniająca i moc przeciwutleniająca redukcji żelaza wynosiła $2,01 \pm 0,12$ i $4,50 \pm 1,22$ mmol troloksu/100 g surowca, odpowiednio [42]. Aktywność zmiatania rodnika DPPH i całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach z owoców z rodzaju *Rubus* została przetestowana przez Benvenuti i in [44]. Całkowita zawartość polifenoli wahała się od 140,6 do 888,5 mg/100 g świeżej masy. Średnie wartości EC50 dla *Rubus fruticosus* i *Rubus idaeus* wynosiły 6,4 i 6,5 mg/100 g świeżej masy.

odpowiednio 8,2 mg świeżej masy. Ich wyniki wskazują, że badane owoce są dobrym źródłem naturalnych przeciwutleniaczy [44]. W związku z farmakologicznym zainteresowaniem substancjami fenolowymi, Lucas i wsp. [43] określili całkowitą zawartość polifenoli w jagodach kilku odmian *Rubus*. Ponadto zbadano aktywność przeciwdrobnikową in vitro surowych ekstraktów na chemicznie generowane rodniki nadtlenkowe, a także ich aktywność hamującą wobec enzymu oksydazy ksantynowej. Wszystkie badane surowe ekstrakty wykazywały aktywność wobec chemicznie generowanych rodników nadtlenkowych

W przypadku owoców z rodzaju *Rubus* oceniano również zawartość polifenoli, witaminy C i antocyjanów, a także aktywność hamującą wobec oksydazy ksantynowej [43]. Oceniano również zawartość polifenoli, witaminy C i antocyjanów w owocach jagodowych należących do rodzaju *Rubus*. Związki te mają interesujące właściwości, takie jak właściwości przeciwzapalne, aromatyczne, lecznicze, przeciwutleniające i chroniące naczynia włosowate. Uzasadnia to szerokie zastosowanie owoców jagodowych zarówno do celów spożywczych, jak i jako źródło dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego [43,45]. Całkowita zawartość polifenoli w otrzymanych preparatach ocenianych w naszym badaniu była wysoka (Tabela 2). Poziom ten jest wyższy niż wcześniej raportowany przez Garz'ón i wsp. [42], Costantino i wsp. [43], Rotundo i wsp. [45] oraz Benvenuti i wsp. [44]; patrz Tabela 2.

Wspólną aktywnością biologiczną związków wchodzących w skład preparatów z liści *Rubus idaeus* L. i *Rubus fruticosus* L. jest działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze [7,42-48,54,59,61]; patrz tabela 1. Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazują na możliwość wykorzystania preparatów z liści *Rubus idaeus* L. i *Rubus fruticosus* L. jako kosmetyków stosowanych miejscowo na skórę. Preparaty otrzymane z liści, dzięki wysokiej zawartości polifenoli i innych związków biologicznie czynnych (tabela 1 i 2), hamują powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS) [7,9,25,47,61], a zatem wydają się obiecujące jako systemy dostarczania przeciwutleniaczy.

Sproszkowane nasiona *Azanza garckeana* zostały wykorzystane przez Momodu [48] do uzyskania ekstraktów metanолоwych i wodnych, które następnie poddano analizie GC-MS. Obecność związków o aktywności przeciwutleniającej obejmowała oleinian metylu, kwas palmitynowy, mirystynowy i heksadekanowy oraz ester metylowy kwasu 11-oktadekenowego. Ekstrakt z nasion *Azanza garckeana* ma użyteczne składniki, które można wykorzystać dla korzyści zdrowotnych [48]. Podobnie w naszych wcześniejszych badaniach [6,7,61] kwas linolowy, ester metylowy i kwas heksadekanowy (kwas palmitynowy) zostały zidentyfikowane jako główne składniki ekstraktu z liści. Obecność estrów metylowych kwasów tłuszczowych (palmitynianu metylu i oleinianu metylu) została potwierdzona przez innych w ekstraktach z suszonych i świeżych liści roślin [46] oraz olejkach eterycznych z *E. angustifolium* [33] i *E. hirsutum* [61-63]. Wśród głównych składników zidentyfikowanych przez Canli et al. [49] przy użyciu GC-MS z ekstraktami etanолоwymi roślin, kwasy tłuszczowe stanowiły dużą grupę [49]. Ekstrakty z *R. perrobustus*, *R. wimmerianus*, *R. pedemontanus* i *R. grabowskii* oceniano pod kątem zawartości związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej. Wykryto trzydzieści trzy związki fenolowe (kwasy hydroksycynamonowe, flawonole, pochodne kwasu elagowego i flawony). Pochodne kwasu elagowego były dominującymi związkami w analizowanych liściach, zwłaszcza sangwinaryna H-6, elagitaniny, lambertianina C, elagitaniny i kazuaryna. Zawartość polifenoli była istotnie skorelowana z aktywnością przeciwutleniającą analizowanych ekstraktów. Istnieje wyraźny potencjał wykorzystania liści jeżyny jako dodatku do żywności, źródła leczniczego lub herbaty ziołowej [50]. Ekstrakty etanолоwe z liści wykazywały silną aktywność zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [41]. Nienasycony aldehyd (2,4-heptadienal) jest znany z działania przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybiczego [43,60]. Ponadto nasza analiza ujawniła obecność dwóch kwasów, kwasu n-dekanowego (tylko w P2) i kwasu dodekanowego, z których oba były wcześniej badane pod kątem ich aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej [43,60].

Preparat 1 w stężeniu 35-70 g/100 ml okazał się szczególnie aktywny na powierzchniach przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, podczas gdy stężenie 42-70 g/100 ml było skuteczne przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Preparat 2 w stężeniu 35-70 g/100 ml okazał się szczególnie aktywny na powierzchniach przeciwko zarówno *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, jak i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. W przypadku P1 w stężeniu 14-28 g/100 ml wobec *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i w stężeniu 14-35 g/100 ml wobec *Pseudomonas aeruginosa* AT CC 15442, procent redukcji drobnoustrojów (% redukcji) był wysoki i utrzymywał się powyżej 98,1. W przypadku preparatu 2 otrzymanego z liści *R. fruticosus* L. przeciwko *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, procentowa redukcja wynosiła powyżej 98,3; patrz Tabela 4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa została potwierdzona we wcześniejszych badaniach oceniających aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów z pędów i liści *Rubus idaeus* i *Rubus occidentalis* przeciwko bakteriom Gram-ujemnym i Gram-dodatnim [17]. Oceniano etanолоwo-wodne ekstrakty z odmian *Rubus idaeus* "Ljulin", "Veten" i "Poranna Rosa" oraz *Rubus occidentalis* "Litacz" w celu określenia właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

zakres ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Test przeciwdrobnoustrojowy przeprowadzono przy użyciu piętnastu szczepów bakterii. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów różniła się w zależności od analizowanego szczepu bakterii i odmiany odmiany, z wyjątkiem *Helicobacter pylori*, wobec którego ekstrakty wykazywały taką samą aktywność hamującą wzrost. Dwa ludzkie patogeny, *Corynebacterium diphtheriae* i *Moraxella catarrhalis*, okazały się najbardziej wrażliwe na ekstrakty z malin. Najwyższa wrażliwość *Corynebacterium diphtheriae* na wyciągi zarówno z *R. idaeus*, jak i *R. occidentalis* może wynikać z jej wrażliwości na kwas elagowy i sanganinę H-6 [17]. Co więcej, aktywność przeciwdrobnoustrojowa ekstraktów z owoców roślin typu dzikiego *R. moluccanus* i *R. alpestries* oraz *E. fraxinifolius* przeciwko *B. subtilis*, *S. aureus* i *E. fraxinifolius*. *E. coli* [51].

4. Materiały i metody

4.1. Materiały

Materiał roślinny (liście *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L.) w stanie naturalnym został zebrany w okresie od maja do października 2018 r. ze wsi Siecino w Polsce (województwo zachodniopomorskie) przez dr Łukasza Kucharskiego. Próbkki zostały zdeponowane w Zakładzie Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Materiał został zidentyfikowany przez dr inż. nauk rolniczych Annę Nowak. Zebrany materiał został poddany naturalnemu suszeniu do stałej masy, a następnie zmielony w maszynie o oczkach 8 mm przed ekstrakcją.

4.2. Substancje chemiczne

Związki chemiczne: 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH), kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy (troloks), kwas 2,2-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy (ABTS), 2,4,6-trifiridylo-s-triazyna (TPTZ) zostały zakupione w firmie Sigma Aldrich (Polska). Odczynnik Folin-Ciocalteu został dostarczony przez firmę Merck (Darmstadt, Niemcy). Bezwodny octan sodu, nadsiarczan potasu, octan potasu, chlorek żelaza, 36% kwas solny i alkohol etylowy otrzymano z firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska). Wszystkie odczynniki były klasy analitycznej.

4.3. Preparaty roślinne z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L.

Preparaty roślinne z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. otrzymano w następujący sposób: 5,0 g wysuszonego materiału roślinnego i 45 mL etanolu o stężeniu 70 g/100 mL wprowadzono do kolby stożkowej i przeprowadzono ekstrakcję metodą wspomaganą ultradźwiękami przy użyciu łaźni ultradźwiękowej o częstotliwości 40 kHz przez 1 h. Ekstrakty poddano filtracji na lejek ciśnieniowym przez filtr papierowy Whatman (oznaczony kodem EEA03), otrzymując w ten sposób preparaty roślinne preparat 1 (P1), otrzymany z liści *R. idaeus* L., oraz preparat 2 (P2), otrzymany z liści *R. fruticosus* L.

Etanol został użyty jako rozpuszczalnik polarny w tym badaniu, ponieważ poprzednie badania wykazały, że związki czynne obecne w liściach *Rubus* mają charakter polarny, a ekstrakty wytwarzane przy użyciu mniej polarnych rozpuszczalników są w dużej mierze pozbawione aktywności [52].

4.4. Skład chemiczny preparatów z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L.

Składniki fitochemiczne preparatów roślinnych z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. analizowano metodą GC-MS za pomocą aparatu TRACE serii GC wyposażonego w detektor masowy VOYAGER i wykorzystującego kolumnę kapilarną DB5 (30 m × 0,25 μm × 0,5 μm). Do analizy zastosowano następujące parametry separacji: przepływ helu 1,0 ml/min, napięcie detektora 350 V i temperatura komory próbki 240° C. Temperaturę termostatu zwiększano zgodnie z następującym programem: izotermiczna przy 50° C przez 1 min, zwiększana przy 8° C/min, izotermiczna przy 260° C przez 5 min, następnie schładzana do 50° C. Objętość dozowanej próbki wynosiła 0,1 μL [53,54].

4.5. Badania ATR-FTIR

Analizy preparatów 1 i 2 z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. przeprowadzono przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z całkowitym odbiciem i transformatą Fouriera (ATR-FTIR). An

Jednostka ATR uzyskiwała widma przy użyciu spektrometru Thermo Scientific Nicolet 380 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zarejestrowane widmo stanowiło średnią z 32 skanów uzyskanych przy 4 cm^{-1} . Widma zostały zebrane w zakresie $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Wewnętrznym elementem odbijającym (IRE) używanym w tym badaniu była płytka diamentowa ATR. Preparaty zostały nałożone na IRE.

4.6. Pomiar zdolności antyoksydacyjnej przy użyciu metod DPPH, ABT, S i FRAP

Badania nad aktywnością przeciwutleniającą preparatów roślinnych z liści *R. idaeus* L. (P1) i *R. fruticosus* L. (P2) przeprowadzono metodami redukcji wolnych rodników (DPPH) [62] i (ABTS) [55]. Aktywność przeciwutleniającą określono za pomocą metody FRAP [56] w celu oznaczenia siły redukcji żelaza.

Analizy wykonano na aparacie Merck Spectroquant Pharo 300 przy następujących długościach fali λ : 517 nm w przypadku metody DPPH, 734 nm w przypadku metody ABTS oraz 593 nm w przypadku metody FRAP. W przypadku tych metod jako substancję referencyjną zastosowano troloks, a uzyskane wyniki aktywności antyoksydacyjnej wyrażono w mg troloksu/g surowca. Pomiar aktywności antyoksydacyjnej metodami DPPH i ABTS przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną wcześniej [53]. W skrócie, aktywność przeciwutleniającą przy użyciu DPPH mierzono w następujący sposób: 2850 μL etanolu

roztwór rodnika DPPH wprowadzono do probówki (jego absorbancja przy λ 517 nm wynosiła około 1.000 ± 0.020) wraz z 150 μL otrzymanego preparatu roślinnego. Probówkę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej i przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne przy 517 nm w trzech powtórzeniach. Aktywność przeciwutleniającą przy użyciu ABTS mierzono w następujący sposób: 2500 μL 7 mM roztworu ABTS [53] i 25 μL otrzymanego preparatu roślinnego wprowadzono do kuwety spektrofotometrycznej. Kuwetę inkubowano przez 6 minut w temperaturze pokojowej i przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 734 nm w trzech powtórzeniach.

Aktywność przeciwutleniającą mierzono za pomocą odczynnika FRAP w następujący sposób: 2900 μL pre-

Przygotowany odczynnik i 100 μL otrzymanego preparatu roślinnego zmieszano w kuwecie. Kuwetę inkubowano przez 8 minut w temperaturze pokojowej i przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne przy długości fali 593 nm w trzech powtórzeniach [56]. W celu przygotowania odczynnika zmieszano 25 ml buforu octanowego (0,3 M, pH = 3,6) z 2,5 ml roztworu 2,4,6-tripirydylo-s-triazyny (0,01 M TPTZ) w HCl (0,04 M HCl) oraz z 2,5 ml roztworu FeCl_3 (0,02 M).

4.7. Pomiar całkowitej zawartości polifenoli przy użyciu metody Folin-Ciocalteu

Całkowitą zawartość polifenoli w preparatach roślinnych z liści *R. idaeus* L. (P1) i *R. fruticosus* L. (P2) oznaczono metodą Folina-Ciocalteu zgodnie z wcześniejszym opisem [7,60]. Pomiary spektrofotometryczne przeprowadzono na aparacie Merck Spectroquant Pharo 300 przy długości fali $\lambda = 765\text{ nm}$. Jako substancję referencyjną zastosowano kwas galusowy (GA), a całkowitą zawartość polifenoli wyrażono w mg GA/g surowca.

Całkowitą zawartość polifenoli przy użyciu odczynnika Folin-Ciocalteu mierzono w następujący sposób: 1350 μL wody destylowanej i 1350 μL roztworu węglanu sodu ($0,01\text{ mol/dm}^3$) wprowadzono do kuwety spektrofotometrycznej wraz ze 150 μL przygotowanego roztworu Folin-Ciocalteu [53] i 150 μL otrzymanego preparatu roślinnego. Próbkę inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej i przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne przy długości fali 765 nm w trzech powtórzeniach.

4.8. Testy dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych według normy EN 13697:2019

Badania dezynfekcji powierzchni preparatem 1 (P1) otrzymanym z liści *R. idaeus* L. i preparatem 2 (P2) otrzymanym z liści *R. fruticosus* L. według normy EN 13697:2019 obejmowały rozcieńczenie tych preparatów i ich neutralizację, w której mikroorganizmy poddawano działaniu preparatów w stężeniach 0,6 i 60 g/100 mL przez czas $60 \pm 10\text{ s}$ i $300 \pm 10\text{ s}$ oraz w temperaturze $20 \pm 1^\circ\text{C}$ z dodatkiem substancji obciążającej (albuminy surowicy bydlęcej). Zgodnie z wytycznymi normy EN 13697:2019, w celu określenia działania bakteriobójczego

i grzybobójcze otrzymanych preparatów należy je odpowiednio rozcieńczyć w celu zbadania aktywności przeciwdrobnoustrojowej danego preparatu od stężenia aktywnego 60 g/100 mL do stężenia nieaktywnego (0,6 g/100 mL) [57].

Po pierwsze, metoda została zwalidowana przy użyciu techniki neutralizacji roztworu (woda zawierająca tiosiarczan sodu, lecytynę sojową i polisorbitat 80). Zastosowany neutralizator umożliwił walidację metody (Tabela 7). Aktywność przeciwdrobnoustrojową preparatów roślinnych oceniano na krążkach wobec następujących szczepów referencyjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Candida albicans* ATCC 10231 i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Najpierw dyski (2 × 2 cm) były sterylizowane izopropanolem (stężenie 70 g/100 mL) przez 15 minut przed każdym testem. Zawiesiny bakterii, drożdży i grzybów rozcieńczono (w stosunku 1:1) 0,03 g/100 mL albuminy surowicy bydlęcej w celu naśladowania odpowiednich warunków pracy (jako w normie EN 13697:2019). Następnie 50 µl otrzymanego inokulum ($6,98 \pm 0,17$ – $7,06 \pm 0,11$ w próbkach) zostało pobrane do analizy.

w przypadku bakterii, $5,90 \pm 0,23$ – $6,01 \pm 0,10$ w przypadku drożdży i grzybów) naniesiono na sterylne krążki i suszono w temperaturze 20 °C przez 15 minut. Następnie na zaszczerpione krążki naniesiono po 100 µl preparatów 1 i 2 (P1 i P2) w stężeniu 0,6 i 60 g/100 mL rozcieńczonych wodą destylowaną jako rozcieńczalnikami zgodnie z normą EN 13697:2019, po czym inkubowano w temperaturze 20 ± 1 °C przez 60 ± 10 s i 300 ± 10 s. Następnie działanie preparatów zatrzymano, przenosząc krążki do kolby z 10 mL neutralizatora. Następnie, poprzez wytrząsanie z prędkością 240 obrotów na minutę, komórki bakterii, drożdży i grzybów zostały policzone w sposób opisany powyżej. Oceniono stabilność preparatów w mieszaninie z wodą destylowaną jako rozcieńczalnikami. Podczas testu nie zaobserwowano żadnego osadu. Zastosowana metoda ma na celu potwierdzenie działania preparatów w warunkach laboratoryjnych podobnych do zamierzonego zastosowania jako środki dezynfekujące i antyseptyczne w gospodarstwach domowych, przemyśle spożywczym i obiektach użyteczności publicznej; patrz Tabela 7 (EN 13697:2019). Ponadto przeprowadzono ocenę stężenia, przy którym preparaty roślinne rozcieńczone w wodzie destylowanej wykazywały aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec badanych szczepów referencyjnych na badanych powierzchniach przez 60 ± 10 s i 300 ± 10 s, w temperaturze 20 ± 1 °C i w warunkach brudnych. Dodatkowo celem tej części badań było wskazanie stężenia, przy którym badane preparaty w wymienionych warunkach charakteryzowały się pełną aktywnością przeciwdrobnoustrojową.

Redukcja liczby mikroorganizmów podczas testu (log reduction (LR)) została obliczona przy użyciu następującego wzoru i wyrażona jako logarytmiczna różnica w liczbie żywych komórek przed i po leczeniu [64]:

$$LR = \frac{N}{N_{ts}} = N_{ts} \quad (1)$$

gdzie N jest logarytmem liczby żywych komórek naniesionych na powierzchnię testową (N), a N_{ts} jest logarytmem liczby żywych komórek pozostałych na powierzchni po teście.

Tabela 7 przedstawia warunki określania testów dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 13697:2019.

4.9. Testy dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych według normy EN 13697:2015

Testy dezynfekcji powierzchni preparatem 1 (P1) otrzymanym z liści *R. idaeus* L. i preparatem 2 (P2) otrzymanym z liści *R. fruticosus* L. według normy EN 13697:2015 polegały na metodzie rozcieńczania tych preparatów i ich neutralizacji, w której mikroorganizmy poddawano działaniu preparatów w stężeniach 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 i 70 g/100 mL przez czas 60 ± 10 s i w temperaturze 20 ± 1 °C z dodatkiem substancji obciążającej (albuminy surowicy bydlęcej). Stosując normę EN 13697:2015, aktywność bakteriobójczą określono w stosunku do nierozcieńczonych preparatów 1 i 2 o stężeniu 70 g/100 mL, a także w stosunku do odpowiednio rozcieńczonych preparatów o stężeniach 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 i 63 g/100 mL w celu oceny aktywności bakteriobójczej danego preparatu od stężenia aktywnego (63 g/100 mL) do stężenia nieaktywnego (14 g/100 mL) [65].

Tabela 7. Warunki określania testów dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych według normy EN 13697:2019.

EN 13697:2019 (faza 2 etap 2)							
Przygotowanie do testu	Leczenie	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
Przygotowanie 1 (P1)							
N		7.04± 0.41 b	6.99± 0.10 ab	6.98± 0.17 ab	7.06± 0.11 bc	5.90± 0.23 a	6.01± 0.10 ab
NT		6.94± 0.43 b	6.92± 0.31 ab	6.91± 0.19 c	6.86± 0.14 a	5.79± 0.18 ab	5.92± 0.17 ab
NC		6.95± 0.49 b	6.90± 0.21 ab	6.92± 0.25 bc	6.89± 0.07 b	5.79± 0.13 bc	5.91± 0.20 ab
NW		6.97± 0.37 a	6.96± 0.17 b	6.94± 0.24 c	6.90± 0.12 bc	5.81± 0.19 cd	5.94± 0.18 b
ND Stężenie P1 0,6 g/100 ml (czas)	(kontakt)	>5.52	>5.52	>5.52	>5.52	>5.22	>5.52
ND Stężenie P1 60 g/100 ml	60± 10 s	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15	<20.09	<2.15
ND Stężenie P1 60 g/100 ml	czas kontaktu 300±10s	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15
Przygotowanie 2 (P2)							
N		6.99± 0.21 a	6.95± 0.19 c	6.97± 0.32 a	7.02± 0.19 a	5.89± 0.08 d	5.98± 0.23 b
NT		6.91± 0.15 d	6.83± 0.04 a	6.86± 0.31 b	6.89± 0.14 a	5.80± 0.03 e	5.90± 0.23 b
NC		6.90± 0.12 cd	6.84± 0.05 b	6.88± 0.35 b	6.87± 0.09 b	5.77± 0.04 d	5.90± 0.27 a
NW		6.94± 0.11 bc	6.87± 0.05 c	6.90± 0.35 b	6.91± 0.23 bc	5.83± 0.32 a	5.92± 0.32 b
ND Stężenie P2 0,6 g/100 ml (czas)	(kontakt)	>5.52	>5.52	>5.52	>5.52	>5.22	>5.22
ND Stężenie P2 60 g/100 ml	60± 10 s	3.04± 0.12 a	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15
ND Stężenie P2 60 g/100 ml	czas kontaktu 300±10s	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15	<2.15

Każda wartość jest średnią z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym w trzech niezależnych eksperymentach. Dowlone dwie średnie w tej samej kolumnie, po których następuje ta sama litera, nie różnią się istotnie ($p > 0,01$) w testach wielokrotnego zakresu Tukeya; a, b, c, d - różne litery wskazują, że wartości różnią się istotnie między analizowanymi mikroorganizmami. NT-log ilości mikroorganizmów/ml, która została naniesiona na badaną powierzchnię szkła podczas testu toksyczności neutralizatora; N-log ilości mikroorganizmów/ml, która została naniesiona na badaną powierzchnię szkła podczas testu EN 13697:2019; NC-log ilości mikroorganizmów/ml, która została naniesiona na badaną powierzchnię szkła podczas testu walidacyjnego; NW-log ilości mikroorganizmów/ml, która została naniesiona na badaną powierzchnię szkła podczas testów kontrolnych z wodą destylowaną; ND-log ilości mikroorganizmów/ml, która została naniesiona na badaną powierzchnię szkła podczas testów przeciwdrobnoustrojowych.

Po pierwsze, metoda została zwalidowana przy użyciu techniki neutralizacji roztworu (woda zawierająca tiosiarczan sodu, lecytynę sojową i polisorbit 80). Zastosowany neutralizator pozwolił na walidację metody (Tabela 8). Aktywność przeciwdrobnoustrojową preparatów roślinnych oceniano na krążkach wobec następujących szczepów referencyjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Najpierw krążki (2× 2 cm) sterylizowano izopropanolem w stężeniu 70 g/100 mL przez 15 minut przed każdym testem. Zawiesiny bakterii rozcieńczono (w stosunku 1:1) 0,3 g/100 mL albuminy surowicy bydłowej, aby naśladować odpowiednie warunki pracy, zgodnie z normą EN 13697:2015. Następnie 50 µl otrzymanego inokulum (6,79± 0,42 w przypadku *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i 6,77± 0,41 w przypadku *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) nanoszono punktowo na sterylne krążki i suszono w temperaturze 20° C przez 15 minut. Następnie na zaszczerpione krążki nanoszono po 100 µl preparatów 1 i 2 rozcieńczonych sterylną twardą wodą jako rozcieńczalnikami zgodnie z normą EN 13697:2015, po czym inkubowano w temperaturze 20 ± ° C przez 60± 10 s. Następnie działanie preparatów zatrzymywano przez

Po przeniesieniu krążków do kolby z 10 ml neutralizatora, komórki bakteryjne poddano enukleacji we wstrząsarce przy 240 obr. Oceniono stabilność preparatów w mieszaninie ze sterylną twardą wodą zawierającą węglan wapnia w stężeniu 30 mg/100 mL CaCO_3 jako rozcieńczalnik. Podczas badania nie zaobserwowano wytrącania się osadu. Zastosowana metoda miała na celu potwierdzenie działania preparatów w warunkach laboratoryjnych zbliżonych do zamierzonego zastosowania jako środka dezynfekującego stosowanego w sektorze spożywczym, w warunkach przemysłowych i domowych oraz w obiektach użyteczności publicznej na nieporowatych powierzchniach; patrz tabela 8 (EN 13697:2015). Ponadto określono stężenie, przy którym preparaty roślinne rozcieńczone w twardej wodzie wykazywały aktywność bakteriobójczą wobec testowanych szczepów referencyjnych na badanych powierzchniach przez 60 ± 10 s w temperaturze $20 \pm 1^\circ \text{C}$ i w nieczystych warunkach. Dodatkowo oceniono stężenie, przy którym badane preparaty w wymienionych warunkach charakteryzowały się pełnym działaniem bakteriobójczym.

Tabela 8. Warunki określania testów dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych według normy EN 13697:2015.

EN 13697:2015 (faza 2, etap 2)			
Przygotowanie do testu	Leczenie	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
Przygotowanie 1 (P1)			
N	czas kontaktu 60± 10 s	6.79± 0.42 b	6.77± 0.41 b
NT		7.17± 0.43 b	7.17± 0.43 b
NC		7.20± 0.48 b	7.19± 0.49 b
NW		7.20± 0.36 a	7.21± 0.37 a
ND Stężenie P1 14 g/100 ml		5.46± 0.37 a	5.48± 0.23 b
ND Stężenie P1 21 g/100 ml		5.22± 0.09 b	5.38± 0.19 a
ND Stężenie P1 28 g/100 ml		4.95± 0.11 a	5.00± 0.15 b
ND Stężenie P1 35 g/100 ml		3.92± 0.11 a	4.74± 0.37 a
ND Stężenie P1 42 g/100 ml		2.85± 0.19 a	3.51± 0.33 a
ND Stężenie P1 49 g/100 ml		2.33± 0.10 a	2.46± 0.39 a
ND Stężenie P1 56 g/100 ml		<0.10	<0.10
ND Stężenie P1 63 g/100 ml		<0.10	<0.10
ND Stężenie P1 70 g/100 ml		<0.10	<0.10
Przygotowanie 2 (P2)			
N		6.84± 0.41 b	6.80± 0.10 ab
NT		7.22± 0.43 b	7.16± 0.31 ab
NC		7.21± 0.49 b	7.17± 0.21 ab
NW		7.22± 0.37 a	7.18± 0.17 b

Tabela 8. Cont.

EN 13697:2015 (faza 2, etap 2)			
Przygotowanie do testu	Leczenie	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
ND Stężenie P2 14 g/100 ml	czas kontaktu 60± 10 s	5.38± 0.14 a	5.42± 0.33 a
ND Stężenie P2 21 g/100 ml		5.03± 0.37 a	5.26± 0.33 a
ND Stężenie P2 28 g/100 ml		4.91± 0.31 a	4.83± 0.35 a
ND Stężenie P2 35 g/100 ml		2.76± 0.39 a	2.87± 0.37 a
ND Stężenie P2 42 g/100 ml		<0.10	<0.10
ND Stężenie P2 49 g/100 ml		<0.10	<0.10
ND Stężenie P1 56 g/100 ml		<0.10	<0.10
ND Stężenie P2 63 g/100 ml		<0.10	<0.10
ND Stężenie P2 70 g/100 ml		<0.10	<0.10
Etanol (E)			
N		6.76± 0.37 a	6.77± 0.10 a
NT		7.19± 0.31 a	7.18± 0.12 a
NC		7.21± 0.34 a	7.20± 0.42 a
NW		7.21± 0.38 a	7.21± 0.37 a
ND Stężenie E 80 g/100 ml		3.29± 0.29 a	3.29± 0.30 a
ND Stężenie E 90 g/100 ml		<0.10	<0.10
ND Stężenie E 100 g/100 ml		<0.10	<0.10

Każda wartość jest średnią z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym w trzech niezależnych eksperymentach. Dowolne dwie średnie w tej samej kolumnie, po których następuje ta sama litera, nie różnią się istotnie ($p > 0,01$) w testach wielokrotnego zakresu Tukeya. Zastosowana pożywka: Trypticasein Soy LAB-Agar (TSA); użyty neutralizator: roztwór polisorbatu 80 (3,0 g/100 mL), tiosiarczanu sodu (0,3 g/100 mL) i lecytyny sojowej (0,3 g/100 mL); warunki inkubacji: 24 h w temperaturze $37 \pm 1^\circ \text{C}$; substancja obciążająca: albumina surowicy bydlęcej (0,3 g/100 mL); rozcieńczalnik użyty podczas badania: sterylna twarda woda 30 mg/100 g CaCO_3 ; metoda badania i jej walidacja: metoda neutralizacji roztworów; temperatura badania: $20 \pm 1^\circ \text{C}$; metoda liczenia drobnoustrojów: inokulacja na płytkę głębokodołkową; stabilność mieszaniny preparat/rozcieżalnik: podczas badania nie tworzył się osad. NT-log ilości mikroorganizmów/mL naniesionych na badaną powierzchnię szkła podczas testu toksyczności neutralizatora; N-log ilości mikroorganizmów/mL naniesionych na badaną powierzchnię szkła podczas testów EN 13697:2015; NC-log ilości mikroorganizmów/mL naniesionych na badaną powierzchnię szkła podczas testu walidacyjnego; NW-log ilości mikroorganizmów/mL naniesionych na badaną powierzchnię szkła podczas testów kontrolnych z twardą wodą; ND-log ilości mikroorganizmów/mL naniesionych na badaną powierzchnię szkła podczas testów przeciwdrobnoustrojowych.

Dla porównania, w tych samych warunkach oceniono aktywność bakteriobójczą nierozcieńczonego etanolu w stężeniu 100 g/100 ml i etanolu rozcieńczonego twardą wodą w stężeniach odpowiednio 80 i 90 g/100 ml wobec *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

Tabela 8 przedstawia warunki określania testów dezynfekcji powierzchni preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 13697:2015.

4.10. Testowanie dezynfekcji rąk za pomocą wcierania preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 1500:2013

Badanie dezynfekcji rąk za pomocą wcierania preparatu 1 (P1) otrzymanego z liści *R. idaeus* L. oraz preparatu 2 (P2) otrzymanego z liści *R. fruticosus* L. przeprowadzono zgodnie z normą EN 1500:2013. Celem tej części badania było ustalenie, czy preparaty roślinne P1 i P2 zmniejszają uwalnianie mikroorganizmów przejściowych po zastosowaniu na sztucznie zanieczyszczone ręce uczestników. Badanie dezynfekcji rąk preparatami zgodnie z normą EN 1500:2013 polegało na wcieraniu preparatów w objętości 6 ml przez czas 60 ± 5 s w temperaturze $20 \pm 1^\circ \text{C}$ [66].

Walidację metody przeprowadzono przy użyciu techniki neutralizacji roztworu. Jako metodę liczenia mikroorganizmów zastosowano hodowlę wgłębną na płytkach. Przeprowadzono analizę statystyczną wyników badań przy założeniu, że aktywność wobec *Escherichia coli* K12 NCTC 10538 badanych preparatów (P1 i P2) była niższa niż preparatu referencyjnego (PR). Obliczenia wykonano przy użyciu testu Wilcoxon, a uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 9. Zgodnie z normą otrzymane preparaty uznaje się za skuteczne, jeżeli uzyskane wyniki spełniają kryteria akceptacji, a analiza statystyczna uzyskanych danych dowodzi, że badany preparat nie wykazuje niższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej niż preparat referencyjny (propan-2-ol w stężeniu 60 g/100 mL) wobec badanego szczepu referencyjnego *Escherichia coli* K12 NCTC 10538.

Tabela 9. Warunki oznaczania aktywności przeciwdrobnoustrojowej preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 1500:2013.

Przygotowanie do testu	EN 1500:2013	
	<i>Escherichia coli</i> K12 NCTC 10538	
	Przygotowanie 1 (P1)	Przygotowanie 2 (P2)
N	8.63 ± 0.11 a	8.63 ± 0.17 a
Nvb	97×10^4	98×10^4
B	88 ± 0.23 b	93 ± 0.43 b
Nv	750 ± 0.31 a	860 ± 0.21 a
C	71 ± 0.28 a	81 ± 0.13 a

Każda wartość jest średnią z trzech powtórzeń z odchyleniem standardowym w trzech niezależnych eksperymentach. Dowlone dwie średnie w tej samej kolumnie, po których następuje ta sama litera, nie różnią się istotnie ($p > 0,01$) w testach wielokrotnego zakresu Tukeya. Zastosowana pożywka: Trypticasein Soy LAB-Agar (TSA) oznaczanie parametrów N, B i C oraz Trypticasein Selective Soy LA B Agar (TSSA) oznaczanie liczby mikroorganizmów w badanych preparatach; zastosowany neutralizator: roztwór Polysorbate 80 (3,0 g/100 mL), tiosiarczanu sodu (1,0 g/100 mL) i lecytyny sojowej (0,3 g/100 mL); warunki inkubacji: 24 h w temperaturze $37 \pm 1^\circ \text{C}$; substancja obciążająca: albumina surowicy bydlęcej (0,03 g/100 mL); rozcieńczalnik stosowany podczas badania: woda destylowana; metoda badania i jej walidacja: metoda neutralizacji dla roztworów; temperatura badania: $20 \pm 1^\circ \text{C}$; metoda liczenia drobnoustrojów: posiew na płytce głębokodółkową; zastosowana metoda wcierania: zgodna z normą PN-EN 1500:2013; biocyd referencyjny: propan-2-ol o stężeniu 60 g/100 mL; ilość preparatu użytego w badaniu: 6 mL; czas kontaktu preparatu z zawiesiną bakterii: 60 ± 5 s. N-log ilości mikroorganizmów/mL w mieszaninie testowej EN 1500:2013; Nvb-ilość mikroorganizmów/mL użyta podczas testu toksyczności neutralizatora; Nv-ilość mikroorganizmów/mL użyta podczas testu walidacyjnego.

Tabela 9 przedstawia warunki określania aktywności przeciwdrobnoustrojowej preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 1500:2013.

4.11. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej preparatów roślinnych przeciwko wyizolowanym szczepom bakterii, drożdży i grzybów

W celu określenia aktywności mikrobiologicznej przeciwko szesnastu wyizolowanym szczepom bakterii, czterem szczepom drożdży i pięciu szczepom grzybów, zastosowano preparat 1 (P1) uzyskany z liści

R. idaeus L. i preparat 2 (P2) otrzymany z liści *R. fruticosus* L. umieszczono w wyparce próżniowej w celu odparowania rozpuszczalnika, uzyskując w ten sposób 4,55 g suchego preparatu z liści malin i 4,55 g suchego preparatu z liści jeżyn. Następnie, szesnaście szczepów bakterii (*Enterococcus faecalis* szczep 1-5, *Enterococcus faecium* szczep 1-5, *Escherichia coli* szczep 1-5, *Bacillus spp.*), cztery szczepy drożdży (drożdże szczep 1, 2, 5 i 6) i pięć szczepów grzybów

(*Penicillium ciclopsis*, *Trichothecium roseum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Mucor* sp.) zostały wyizolowane ze środowiska naturalnego. Wyizolowane szczepy zostały zidentyfikowane i wyhodowane jako czyste kultury. Następnie przeprowadzono ocenę mikrobiologiczną otrzymanych preparatów z suchych liści malin i jeżyn wobec wyizolowanych mikroorganizmów.

Dodatkowo w celach porównawczych przeprowadzono ocenę mikrobiologiczną antybiotyków metodą antybiogramu wobec izolatów (antybiotyki Penicylina, Ampicylina, Wankomycyna, Fosfomycyna, Amfo-terycyna, Nystatyna, Ketokonazol) i szczepów referencyjnych (antybiotyki Doksylicyna, Ampicylina, Ciprofloksacyna) oraz wpływ preparatów P1 i P2 na trzynaście szczepów referencyjnych *Escherichia coli* (ATCC25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), *Staphylococcus aureus* A (ATCC29213), *Staphylococcus aureus* B (ATCC25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC49619), *Streptococcus intermedius* (ATCC29663), *Sarcina lutea* (ATCC9341), *Bacillus subtilis*, *Bacillus pseudomycoides* i *Bacillus thuringiensis*. Dla każdej grupy mikroorganizmów zastosowano odpowiednią pożywkę: dla hodowli bakterii - TSA (Trypticase Soy Agar), a dla drożdży - (Malt Extract Agar). Działanie hamujące preparatów roślinnych oceniano na podstawie strefy zahamowania wzrostu hodowli. Pomiary wykonywano co 24 godziny, a do ostatecznej analizy wykorzystano wyniki po 72 godzinach.

Szczepy wyizolowane ze środowiska gruntowego pochodziły z kolekcji Katedry Mikrobiologii i Chemii Środowiska Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Szczepy oznaczono klasycznymi metodami mikrobiologicznymi.

4.11.1. Metody stosowania preparatów roślinnych w podłożu

Preparaty uzyskane z suchych liści malin i jeżyn (p. 4.10) rozpuszczono następnie w 5 mL etanolu (70 g/100 mL) uzyskując roztwór etanolowy zawierający 9100 µg suchych preparatów w 10 µL etanolu. Wrażliwość badanych mikroorganizmów na przygotowane roztwory etanolowe zawierające suche preparaty z liści malin i jeżyn określono metodą studzienkową i krążkową [67].

W przypadku metody studzienkowej, odpowiednią pożywkę wlewano do szalek Petriego; po zestaleniu się pożywki, za pomocą sterylnego korka wycinano studzienki o średnicy 8 mm, do których następnie wprowadzano 10–40 µL etanolowego roztworu zawierającego suche preparaty. W przypadku metody krążkowej, papierowe krążki o średnicy 5 mm umieszczano na powierzchni odpowiedniej pożywki i наносzono na nie 10–40 µL etanolowego roztworu zawierającego suche preparaty. Działanie hamujące badanych roztworów oceniano na podstawie średnicy strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów.

4.11.2. Metody stosowania antybiotyków w podłożu

Oznaczenie wrażliwości szczepów na antybiotyki wykonano metodą antybiogramu. Zakupiono gotowe krążki nasączone antybiotykami (Pol-Aura), następnie na powierzchnię odpowiedniej pożywki наносzono badany szczep. W kolejnym etapie krążki z antybiotykami umieszczano na tak przygotowanym podłożu, a pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach. Wpływ na poszczególne szczepy oceniano mierząc wielkość stref zahamowania wzrostu.

4.12. Pomiar lipofilowości preparatów naturalnych

W celu określenia lipofilowości P1 i P2 zbadano wartości współczynnika podziału n-oktanol/woda (P). Ocena lipofilowości preparatów polegała na wyznaczeniu ich współczynnika podziału pomiędzy dwie niemieszające się cieczce, n-oktanol i wodę, które dobrze modelują właściwości struktur komórkowych. Współczynnik podziału wyrażono jako stosunek logarytmów stężeń substancji w obu fazach [53].

Logarytm współczynnika podziału (logP) n-oktanol/woda wyznaczono metodą spektrofotometryczną. Analizy przeprowadzono na aparacie Thermo Scientific GENESYS 50. LogP wyznaczono dla sumy związków posiadających

w zakresie długości fal 230–400 nm. Stosunek stężeń związków w P1 i P2 wyznaczono na podstawie bilansu masowego i założenia, że prawo Lamberta-Beera jest spełnione w badanym zakresie 230–400 nm, co można zilustrować równaniem

$$P = \frac{C_{(o)}}{C_{(w)}} = \frac{C_0 - C_w}{C_w} = \frac{S_0 - S}{S} = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} A_{(o)} d\lambda - \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} A_{(w)} d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} A_{(w)} d\lambda} \quad (2)$$

gdzie $C_{(o)}$ i $C_{(w)}$ to stężenie sumy związków odpowiednio w warstwie n-oktanolu i w warstwie wodnej, S to obszar pod widmem UV-Vis, A to absorbancja, 0 to indeks górny w preparacie przed ekstrakcją, a λ to długość fali.

Następnie zmieszano 5 mL n-oktanolu z 5 mL wody w stosunku 1:1, zawierając badany preparat (P1 i P2) w ilości 50 μ L. Następnie mieszaninę wytrząsano na wytrząsarce (TS-2 Orbital Shaker) w stałej temperaturze 25° C przez odpowiedni czas, aż do osiągnięcia stanu równowagi, przy czym temperaturę kontrolowano za pomocą termostatu zanurzeniowego. Sumy stężeń związków obecnych w analizowanych preparatach zostały wyznaczone.

za pomocą spektrofotometrii przy długości fali 230–400 nm (rysunek 5). Ponadto dla każdego badanego preparatu wykonano próby ślepej w tych samych warunkach. W tym celu n-oktanol zmieszano z wodą w stosunku 1:1, a następnie zastosowano powyższą procedurę [53].

4.13. Analiza statystyczna

Wyniki zostały przedstawione jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Do analizy mikrobiologicznej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Przeprowadzono analizę skupień w celu określenia wpływu na badane mikroorganizmy roztworów etanolowych zawierających suche preparaty z liści malin i jeżyn. Na tej podstawie oceniono wpływ różnych dawek roztworu etanolowego na badane mikroorganizmy. Istotność różnic pomiędzy poszczególnymi grupami oceniano testem Tukeya ($p < 0,05$). Ponadto, istotność różnic między grupami w testach dezynfekcji powierzchni i dezynfekcji rąk oceniano za pomocą testu Wilcoxona ($p > 0,01$). Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13 PL (StatSoft, Kraków, Polska).

Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone niezależnie w trzech powtórzeniach i wykonano co najmniej trzy analizy na replikację.

5. Wnioski

W niniejszym badaniu szczególną uwagę poświęciliśmy gatunkom z rodzaju *Rubus* ze względu na ich aktywność biologiczną i przeciwutleniającą, związki biologicznie czynne oraz zawartość polifenoli. Wykazano, że preparaty 1 i 2 zawierają związki biologicznie czynne (tabela 1, rysunki S1–S3) oraz wykazują aktywność przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową wobec szczepów wyizolowanych ze środowiska, a także wobec bakterii referencyjnych (tabele 2–5, tabele S1–S3, rysunki 3 i 4).

Dodatkowo, ilościowa metoda oznaczania aktywności bakteriobójczej i grzybobójczej chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych (PN-EN 13697:2019) jednoznacznie wykazała, że otrzymane preparaty o obniżonej zawartości etanolu wykazują aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą na powierzchniach. Ponadto badania dezynfekcji rąk zgodnie z normą PN-EN 1500:2013 z wykorzystaniem preparatów otrzymanych z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. potwierdziły ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *Escherichia coli* K12 NCTC 10538. Dodatkowo Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Warszawa, Polska) wydał pozwolenia na stosowanie naturalnych produktów biobójczych (P1 i P2).

Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną (strefa zahamowania wzrostu 21,7 mm w przypadku P1 i strefa zahamowania wzrostu 19,7 mm w przypadku P2) wykazano wobec szczepu referencyjnego *Streptococcus intermedius* (Tabela 6). *Trichothecium roseum* był wrażliwy na preparat malinowy, w przeciwieństwie do wszystkich testowanych antybiotyków, które nie wykazywały aktywności wobec wyizolowanego szczepu *Trichothecium roseum* (rysunek 3). Co więcej, preparat malinowy wykazywał wyższą aktywność niż doksycyklina wobec szczepu *Klebsiella pneumoniae* i wykazywał wyższą aktywność niż doksycyklina.

statystycznie istotnie większą strefę zahamowania wzrostu (8,3 mm) niż testowany antybiotyk (5,7 mm); patrz Tabela 6.

Badania lipofilowości wykazały, że badane preparaty otrzymane z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. są wysoce hydrofilowe. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, wysoką zawartość polifenoli i innych związków biologicznie czynnych można uznać za jeden z parametrów odpowiedzialnych za skuteczną aktywność biologiczną preparatów roślinnych pozyskiwanych z dzikich gatunków roślin z rodzaju *Rubus*. Naturalne preparaty mogą działać jako środki dezynfekujące stosowane w sektorze spożywczym, przemysłowym i domowym oraz w obiektach użyteczności publicznej. Ponadto ich wysoki potencjał antyoksydacyjny może pozwolić na zastosowanie ich jako dobrych naturalnych źródeł do wykorzystania w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym.

Materiały uzupełniające: Następujące informacje uzupełniające można pobrać ze strony: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27175486/s1>. Dane uzupełniające: Chromatogram GC-MS preparatu 1 (P1) otrzymanego z liści *Rubus idaeus* L. (Rysunek S1), Chromatogram G C - M S preparatu 2 (P2) otrzymanego z liści *Rubus fruticosus* L. (Rysunek S2), Struktury związków zidentyfikowanych w badanych preparatach otrzymanych z liści *R. idaeus* L. i *R. fruticosus* L. (Rysunek S3), Wartości posortowane dla analizy statystycznej preparatów roślinnych P1 i P2 oraz preparatu referencyjnego (PR), zgodnie z normą EN 1500:2013 przeciwko szczepowi *Escherichia coli* K12 NCTC 10538 (Tabela S1), Wyniki testów dezynfekcji preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 13697:2019 (Tabela S2), Wyniki testów dezynfekcji preparatów roślinnych zgodnie z normą EN 13697:2015 (Tabela S3).

Wkład autorów: Konceptualizacja, Ł.K., E.K.; pisanie - recenzja i edycja, Ł.K., A.N. i E.K.; metodologia, Ł.K., A.N. i K.C.; recenzja, R.P. i A.K.; analiza formalna, Ł.K., E.K. i A.N.; pisanie - przygotowanie oryginalnego projektu, Ł.K., A.N. i E.K.; oraz nadzór, A.K. i R.P. Wszyscy autorzy przeczytali i zgodzili się na opublikowaną wersję manuskryptu.

Finansowanie: To badanie nie otrzymało żadnego zewnętrznego

finansowania. **Oświadczenie Institutional Review Board:** Nie dotyczy.

Oświadczenie o świadomej zgodzie: Nie dotyczy.

Oświadczenie o dostępności danych: Dane przedstawione w tym badaniu są dostępne w tym artykule.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Referencje

1. Kasemsarn, P.; Bosco, J.; Nixon, R.L. Rola bariery skórnej w zawodowych chorobach skóry. *Curr. Probl. Dermatol.* **2016**, *49*, 135–143. [\[CrossRef\]](#)
2. Lowrey, L.; Woodhams, D.C.; Tacchi, L.; Salinas, I. Topographical Mapping of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Microbiome Reveals a Diverse Bacterial Community with Antifungal Properties in the Skin. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 6915–6925. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Zhang, L.; Cao, H.; Li, L.; Zhao, W.; Zhang, F. Oral and External Intervention on the Crosstalk between Microbial Barrier and Skin via Foodborne Functional Component. *J. Funct. Foods* **2022**, *92*, 105075. [\[CrossRef\]](#)
4. Milani, C.; Duranti, S.; Bottacini, F.; Casey, E.; Turróni, F.; Mahony, J.; Belzer, C.; Delgado Palacio, S.; Arbolea Montes, S.; Mancabelli, L.; et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, *81*, e00036–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Barbulova, A.; Apone, F.; Colucci, G. Plant Cell Cultures as Source of Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics* **2014**, *1*, 94–104. [\[CrossRef\]](#)
6. Ribeiro, A.S.; Estanqueiro, M.; Oliveira, M.B.; Lobo, J.M.S. Główne korzyści i zastosowanie ekstraktów roślinnych w produktach do pielęgnacji skóry. *Kosmetyki* **2015**, *2*, 48–65. [\[CrossRef\]](#)
7. Cui, H.; Kong, Y.; Zhang, H. Stres oksydacyjny, dysfunkcja mitochondriów i starzenie się. *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, 646354. [\[CrossRef\]](#)
8. Michalak, I.; Chojnacka, K. Algi jako systemy produkcji związków bioaktywnych. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 160–176. [\[CrossRef\]](#)
9. Xie, X.; He, Z.; Chen, N.; Tang, Z.; Wang, Q.; Cai, Y. Rola czynników środowiskowych w regulacji stresu oksydacyjnego u roślin. *BioMed Res. Int.* **2019**, *2019*, 21–27. [\[CrossRef\]](#)
10. Verma, R.; Gangrade, T.; Ghulaxe, C.; Punasiya, R. *Rubus Fruticosus* (Blackberry) Use as an Herbal Medicine. *Pharmacogn. Rev.* **2014**, *8*, 101. [\[CrossRef\]](#)
11. Kashif, M.; Akhtar, N.; Mustafa, R. An Overview of Dermatological and Cosmeceutical Benefits of Diospyros Kaki and Its Phytoconstituents. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2017**, *27*, 650–662. [\[CrossRef\]](#)

12. Vasiliadou, I.A.; Molina, R.; Martínez, F.; Melero, J.A. Biological Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products by a Mixed Microbial Culture: Sorpcja, desorpcja i biodegradacja. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *81*, 108–119. [\[CrossRef\]](#)
13. Silinsin, M.; Bursal, E. UHPLC-MS/MS Phenolic Profiling and in Vitro Antioxidant Activities of *Inula Graveolens* (L.) Desf. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 1467–1471. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Nasution, F.; Theanhom, A.A.; Unpaprom, Y.; Ramaraj, R.; Manmai, N.; Chumpookam, J. Muntingia Calabura Fruits as Sources of Bioactive Compounds and Fermentative Ethanol Production. *Biomass Convers. Biorefin.* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
15. Gülçin, I. Aktywność przeciwutleniająca składników żywności: An Overview. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 345–391. [\[CrossRef\]](#)
16. Efenberger-Szmechtyk, M.; Nowak, A.; Czyżowska, A. Ekstrakty roślinne bogate w polifenole: Antibacterial Agents and Natural Preservatives for Meat and Meat Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 149–178. [\[CrossRef\]](#)
17. Krauze-Baranowska, M.; Majdan, M.; Hałas, R.; Głód, D.; Kula, M.; Fecka, I.; Orzeł, A. The Antimicrobial Activity of Fruits from Some Cultivar Varieties of *Rubus Idaeus* and *Rubus Occidentalis*. *Food Funct.* **2014**, *5*, 2536–2541. [\[CrossRef\]](#)
18. Krzepiło, A.; Praz'ak, R.; Świeciło, A. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Raspberry, Blackberry i hybrydowych pąków liściowych maliny i jeżyny. *Molecules* **2021**, *26*, 327. [\[CrossRef\]](#)
19. Vlad, I.; Goji, G.; Dinuliță, F.; Barthă, S.; Vasilescu, M.; Mihăiescu, T. Consuming Blackberry as a Traditional Nutraceutical Resource from an Area with High Anthropogenic Impact. *Forests* **2019**, *10*, 246. [\[CrossRef\]](#)
20. Singh, M.; Purohit, R. Study on Phytochemical Characterization and Antibacterial Activity of Fruit Trees of Chamoli District, Uttarakhand, India. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **2019**, *9*, 226–231.
21. Riaz, N.; Havel, J.J.; Makarov, V.; Desrichard, A.; Urba, W.J.; Sims, J.S.; Hodi, F.S.; Martín-Algarra, S.; Mandal, R.; Sharfman, W.H.; et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* **2017**, *171*, 934–949.e15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Meng, Q.; Manghwar, H.; Hu, W. Study on Supergenous *Rubus* L.: Edible, Medicinal, and Phylogenetic Characterization. *Rośliny* **2022**, *11*, 1211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Edewor Theresa, I.; Owa Stephen, O.; Oladipupo, S.S.; Oyelakin, R.A. Determination of the Total Phenolic, Flavonoid Contents; Antioxidant Activity and GC-MS Study of the Leaves of the Medicinal Plant *Sarcocephalus Latifolius*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2015**, *34*, 82–86.
24. Menegazzo, F.; Ghedini, E.; Signoretto, M. Produkcja 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF) z prawdziwych biomas. *Molecules* **2018**, *23*, 2201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Mascal, M.; Nikitin, E.B. High-Yield Conversion of Plant Biomass into the Key Value-Added Feedstocks 5-(Hydroxymethyl)Furfural, Levulinic Acid, and Levulinic Esters via 5-(Chloromethyl)Furfural. *Green Chem.* **2010**, *12*, 370–373. [\[CrossRef\]](#)
26. Bellincontro, A.; De Santis, D.; Botondi, R.; Villa, I.; Mencarelli, F. Different Postharvest Dehydration Rates Affect Quality Characteristics and Volatile Compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese Grapes for Wine Production. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1791–1800. [\[CrossRef\]](#)
27. Bueno, P.I.; Machado, D.; Lancellotti, M.; Gonçalves, C.P.; Marcucci, M.C.; Sawaya, A.C.H.F.; Melo, A. de In Silico Studies, Chemical Composition, Antibacterial Activity and in Vitro Antigen-Induced Phagocytosis of *Stryphnodendron Adstringens* (Mart.) Coville. *Res. Soc. Dev.* **2022**, *11*, e35911225748. [\[CrossRef\]](#)
28. Costantini, V.; Bellincontro, A.; De Santis, D.; Botondi, R.; Mencarelli, F. Metabolic Changes of Malvasia Grapes for Wine Production during Postharvest Drying. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3334–3340. [\[CrossRef\]](#)
29. Zeng, K.; Thompson, K.E.; Yates, C.R.; Miller, D.D. Synthesis and Biological Evaluation of Quinic Acid Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5458–5460. [\[CrossRef\]](#)
30. de Souza, F.G.; de Araújo, F.F.; Orlando, E.A.; Rodrigues, F.M.; Chávez, D.W.H.; Pallone, J.A.L.; Neri-Numa, I.A.; Sawaya, A.C.H.F.; Pastore, G.M. Characterization of Buritirana (*Mauritiella armata*) Fruits from the Brazilian Cerrado: Biometric and Physicochemical Attributes, Chemical Composition and Antioxidant and Antibacterial Potential. *Foods* **2022**, *11*, 786. [\[CrossRef\]](#)
31. Krishnaveni, M.; Dhanalakshmi, R.; Nandhini, N. GC-MS Analysis of Phytochemicals, Fatty Acid Profile, Antimicrobial Activity of *Gossypium* Seeds. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2014**, *27*, 273–276.
32. Balaji, M.; Thamilvanan, D.; Chidambara Vinayagam, S.; Balakumar, B.S. Anticancer, antioxidant activity and gc-ms analysis of selected micro algal members of chlorophyceae. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2017**, *13*, 3302–3314.
33. Zeng, Q.Y.; Wu, J.; Lin, P.C. Skład chemiczny i aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejku eterycznego z *Epilobium Angustifolium*. *Chem. Nat. Compd.* **2016**, *52*, 1113–1115. [\[CrossRef\]](#)
34. Nowak, A.; Ossowicz-Rupniewska, P.; Rakoczy, R.; Konopacki, M.; Łyńska, M.; Drożdżik, M.; Makuch, E.; Duchnik, W.; Kucharski, Ł.; Wenelska, K.; et al. Bacterial Cellulose Membrane Containing *Epilobium Angustifolium* L. Extract as a Promising Material for the Topical Delivery of Antioxidants to the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6269. [\[CrossRef\]](#)
35. Makuch, E.; Nowak, A.; Günther, A.; Pelech, R.; Kucharski, Ł.; Duchnik, W.; Klimowicz, A. The Effect of Cream and Gel Vehicles on the Percutaneous Absorption and Skin Retention of a New Eugenol Derivative with Antioxidant Activity. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 658381.
36. Kurt, A.; Kaya, E. Medyczne i kosmetyczne zastosowania persymony (*Diospyros Kaki*): Ocena toksyczności - przegląd. *IJTCMR* **2020**, *1*, 162–176.
37. Yang, C.-H.; Li, R.-X.; Chuang, L.-Y. Antioxidant Activity of Various Parts of *Cinnamomum Cassia* Extracted with Different Extraction Methods. *Molecules* **2012**, *17*, 7294–7304. [\[CrossRef\]](#)

38. Nowak, A.; Klimowicz, A.; Duchnik, W.; Kucharski, Ł.; Florkowska, K.; Muzykiewicz, A.; Wira, D.; Zielonkabrzezicka, J.; Siedłowska, A.; Nadarzewska, K. Application of Green-Extraction Technique to Evaluate of Antioxidative Capacity of Wild Population of Fireweed (*Epilobium Angustifolium*). *Herba Pol.* **2020**, *65*, 18–30. [\[CrossRef\]](#)
39. Toure, H.A.; Bouatia, M.; Idrissi, M.O.B.; Draoui, M. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Aqueous-Ethanol Extracts of *Opuntia Ficus Indica*. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 409–415.
40. Prasad, K.N.; Yang, B.; Dong, X.; Jiang, G.; Zhang, H.; Xie, H.; Jiang, Y. Zawartość flawonoidów i aktywność przeciwutleniająca z *Cinnamomum Species*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2009**, *10*, 627–632. [\[CrossRef\]](#)
41. Nowak, A.; Cybulska, K.; Makuch, E.; Kucharski, Ł.; Różalska, M.; Prowans, P.; Czaplă, N.; Bargiel, P.; Petriczko, J.; Klimowicz, A. Penetracja ludzkiej skóry in vitro, aktywność przeciwutleniająca i przeciwdrobnoustrojowa etanolowo-wodnego ekstraktu z chwastnicy (*Epilobium angustifolium* L.). *Molecules* **2021**, *26*, 329. [\[CrossRef\]](#)
42. Garzón, G.A.; Riedl, K.M.; Schwartz, S.J. Determination of Anthocyanins, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity in Andes Berry (*Rubus Glaucus* Benth). *J. Food Sci.* **2009**, *74*, C227–C232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. de Lucas, A.; Martinez de la Ossa, E.; Rincón, J.; Blanco, M.A.; Gracia, I. Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym koncentratów tokoferolu z liści drzewa oliwnego. *J. Supercrit. Fluids* **2002**, *22*, 221–228.
44. Benvenuti, S.; Pellati, F.; Melegari, M.; Bertelli, D. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *J. Food Sci.* **2006**, *69*, FCT164–FCT169. [\[CrossRef\]](#)
45. Rotundo, A.; Bounous, G.; Benvenuti, S.; Vampa, G.; Melegari, M.; Soragni, F. Quality and Yield of Ribes and Rubus Cultivars Grown in Southern Italy Hilly Locations. *Phytother. Res.* **1998**, *12*, S135–S137. [\[CrossRef\]](#)
46. Kaškonienė, V.; Stankevičius, M.; Drevinskas, T.; Akunec, I.; Kaškonas, P.; Bimbiraite-Surviliene, K.; Maruška, A.; Ragažinskiene, O.; Kornysheva, O.; Briedis, V.; et al. Evaluation of Phytochemical Composition of Fresh and Dried Raw Material of Introduced *Chamerion Angustifolium* L. Using Chromatographic, Spectrophotometric and Chemometric Techniques. *Phytochemistry* **2015**, *115*, 184–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Pillai, S.; Oresajo, C.; Hayward, J. Ultraviolet Radiation and Skin Aging: Roles of Reactive Oxygen Species, Inflammation and Protease Activation, and Strategies for Prevention of Inflammation-Induced Matrix Degradation—A Review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2005**, *27*, 17–34. [\[CrossRef\]](#)
48. Momodu, I.B.; Okungbowa, E.S.; Agoreyo, B.O.; Maliki, M.M. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Identification of Bioactive Compounds in Methanol and Aqueous Seed Extracts of Azanza Garckeana Fruits. *Niger. J. Biotechnol.* **2022**, *38*, 25–38. [\[CrossRef\]](#)
49. Canli, K.; Yetgin, A.; Akata, I.; Altuner, E.M. Antimicrobial Activity and Chemical Composition Screening of *Epilobium Montanum* Root. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* **2017**, *51*, S239–S243. [\[CrossRef\]](#)
50. Głuski, J.; Wojdyło, A.; Nowicka, P.; Teleszko, M.; Cebulak, T.; Wolanin, M. Determination of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Leaves from Wild *Rubus* L. Species. *Molecules* **2015**, *20*, 4951–4966. [\[CrossRef\]](#)
51. Mostafa, A.A.; Al-Askar, A.A.; Almaary, K.S.; Dawoud, T.M.; Sholkamy, E.N.; Bakri, M.M. Antimicrobial Activity of Some Plant Extracts against Bacterial Strains Causing Food Poisoning Diseases. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *25*, 361–366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Rojas-Vera, J.; Patel, A.V.; Dacke, C.G. Działanie relaksujące ekstraktu z liści maliny (*Rubus Idaeus*) w jelicie krętym świnki morskiej in vitro. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 665–668. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Makuch, E.; Nowak, A.; Günther, A.; Pelech, R.; Kucharski, Ł.; Duchnik, W.; Klimowicz, A. Enhancement of the Antioxidant and Skin Permeation Properties of Eugenol by the Esterification of Eugenol to New Derivatives. *AMB Express* **2020**, *10*, 187.
54. Peksel, A.; Arisan-Atac, I.; Yanardag, R. Evaluation of antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of the extracts of pistacia atlantica desf. leaves. *J. Food Biochem.* **2010**, *34*, 451–476. [\[CrossRef\]](#)
55. Lissi, E.A.; Modak, B.; Torres, R.; Escobar, J.; Urzua, A. Total Antioxidant Potential of Resinous Exudates from *Heliotropium Species*, and a Comparison of the ABTS and DPPH Methods. *Free. Radic. Res.* **1999**, *30*, 471–477. [\[CrossRef\]](#)
56. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [\[CrossRef\]](#)
57. Perugini, P.; Bonetti, M.; Guerini, M.; Musitelli, G.; Grisoli, P. A New In Vitro Model to Evaluate Anti-Adhesive Effect against Fungal Nail Infections. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1977. [\[CrossRef\]](#)
58. Osama, A.; Awadelkarim, S.; Omer, M.; Yasser, S.; Basher, Y.; Elmabrouk, T.; Abdalmerged, A. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa i skład pierwiastkowy owoców *Sarcocephalus latifolius*: Ocena etnofarmakologiczna. *JAMB* **2017**, *3*, 1–5.
59. Özer, Z.; Gören, A.C.; Kılıç, T.; Öncü, M.; Çarıkçı, S.; Dirmenci, T. The Phenolic Contents, Antioxidant and Anticholinesterase Activity of Section *Amaracus* (Gled.) Vogel and *Anatolicon* Ietsw. of *Origanum* L. Species. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 5027–5039. [\[CrossRef\]](#)
60. Bauters, T.; Mondelaers, V.; Robays, H.; De Wilde, H.; Benoit, Y.; De Moerloose, B. Methemoglobinemia i niedokrwistość hemolityczna po podaniu rasburiyazy u dziecka z białaczką. *Int. J. Clin. Pharm.* **2011**, *33*, 58–60. [\[CrossRef\]](#)
61. Bajer, T.; Šilha, D.; Ventura, K.; Bajerová, P. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil, Distilled Aromatic Water and Herbal Infusion from *Epilobium Parviflorum* Schreb. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *100*, 95–105. [\[CrossRef\]](#)
62. Günther, A.; Makuch, E.; Nowak, A.; Duchnik, W.; Kucharski, Ł.; Pelech, R.; Klimowicz, A. Enhancement of the Antioxidant and Skin Permeation Properties of Betulin and Its Derivatives. *Molecules* **2021**, *26*, 3435. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.L.W.T. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [\[CrossRef\]](#)

-
64. Lee, H.H.; Hong, S.I.; Kim, D. Microbial Reduction Efficacy of Various Disinfection Treatments on Fresh-Cut Cabbage. *Food Sci. Nutr.* **2014**, *2*, 585–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 65. Falcó, I.; Verdeguer, M.; Aznar, R.; Sánchez, G.; Randazzo, W. Sanitizing Food Contact Surfaces by the Use of Essential Oils. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *51*, 220–228. [[CrossRef](#)]
 66. Villa, C.; Russo, E. Hydrożele w środkach do dezynfekcji rąk. *Materials* **2021**, *14*, 1577. [[CrossRef](#)]
 67. Valgas, C.; De Souza, S.M.; Smânia, E.F.A.; Smânia, A. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Braz. J. Microbiol.* **2007**, *38*, 369–380. [[CrossRef](#)]