Ispitivanje sinergističkog djelovanja mješavine bioaktivnih spojeva određivanjem antioksidacijskih svojstava in vitro

Bertoša, Rea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:236126

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2017.

Rea Bertoša
621/MB

ISPITIVANJE SINERGISTIČKOG DJELOVANJA MJEŠAVINE BIOAKTIVNIH SPOJEVA ODREĐIVANJEM ANTIOKSIDACIJSKIH SVOJSTAVA *IN VITRO*

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo te u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Ane Belščak-Cvitanović Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć izv.prof.dr.sc. Ksenije Durgo.

Zahvaljujem se mojoj mentorici, doc.dr.sc. Ani Belščak-Cvitanović na prenesenom znanju, neizmjernom strpljenju, uloženom trudu i beskrajnoj potpori u svakom trenutku pri izradi ovog rada. Veliko hvala i mojoj suvoditeljici izv.prof.dr.sc. Kseniji Durgo na obilju savjeta i konstruktivnih kritika tijekom provođenja eksperimenata i pisanju ovog rada. Za mene niste samo mentorice, već moji veliki uzori u znanstvenom svijetu.

Veliko hvala mojoj obitelji na neprekidnoj potpori i bodrenju tijekom studiranja, posebno roditeljima, bratu Reneu i mojoj baki Veri. Bez vas ne bih dogurala ovako daleko!

Za kraj, zahvaljujem se mom dragom Filipu, na svoj podršci i utjesi tijekom izrade ovog rada. Hvala ti za svu brigu o meni za vrijeme pisanja ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ISPITIVANJE SINERGISTIČKOG DJELOVANJA MJEŠAVINE BIOAKTIVNIH SPOJEVA ODREĐIVANJEM ANTIOKSIDACIJSKIH SVOJSTAVA *IN VITRO*

Rea Bertoša, 621/MB

Sažetak: Posljednjih godina, ispitivanje bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim svojstvima omogućuje optimizaciju njihovih svojstava i formulaciju novih funkcionalnih svojstava u svrhu prevencije i liječenja različitih bolesti. U ovom radu provedeno je određivanje antioksidacijskih svojstava pojedinačnih i kombinacije bioaktivnih spojeva kvercetina, askorbinske kiseline i aminokiselina lizina i karnitina kako bi se utvrdilo njihovo sinergističko međudjelovanje te učinak inkapsulacije njihove formulirane mješavine u alginatne i etil-celulozne čestice. U tu svrhu primijenjene su *in vitro* metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta putem „gašenja" slobodnih radikala (ABTS i DPPH metode) te metoda na modelnim staničnim linijama karcinoma grkljana (HEp2) i debelog crijeva (CaCo2). Dobiveni rezultati pokazali su da se formuliranjem mješavina kvercetina i askorbinske kiseline u kombinaciji s aminokiselinama lizinom i karnitinom u vodenim otopinama postiže sinergistički učinak na povećanje antioksidacijskog kapaciteta mješavina. Mješavina navedenih spojeva pokazuje citoprotektivno i antioksidacijsko djelovanje na HEp2 stanice, što se pripisuje jednakom djelovanju kvercetina i askorbinske kiseline dok pojedinačne aminokiseline lizin i karnitin ne pokazuju nikakvo djelovanje na HEp2 i CaCo2 stanice. Inkapsulacija navedene mješavine učinkovitija je u slučaju formuliranja alginatnih čestica primjenom ionskog geliranja, no za postizanje izraženijih bioloških učinaka potrebna je daljnja optimizacija inkapsuliranih sustava.

Ključne riječi: antioksidansi, slobodni radikali, sinergija, inkapsulacija, citotoksičnost
Rad sadrži: 67 stranica, 22 slike, 2 tablice, 80 literaturnih navoda, 0 priloga
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Ana Belščak-Cvitanović
Pomoć pri izradi: izv.prof.dr.sc. Ksenija Durgo

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Prof.dr.sc. Draženka Komes
2. Doc.dr.sc. Ana Belščak-Cvitanović
3. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Durgo
4. Prof.dr.sc. Višnja Bačun-Družina

Datum obrane: 23. veljače 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Carbohydrates and Confectionery Products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

ASSESSMENT OF THE SYNERGISTIC EFFECTS OF BIOACTIVE COMPOUNDS MIXTURES BY DETERMINING THEIR *IN VITRO* ANTIOXIDANT

Rea Bertoša, 621/MB

Abstract: During recent years, evaluation of bioactive compounds with antioxidant properties enables the optimization of their properties and formulation of new functional properties aiming at their use in prevention and treatment of different health issues. In this study, antioxidant properties of single and the combination of bioactive compounds quercetin, ascorbic acid, aminoacids lysine and carnitine was assessed to evaluate their synergistic interactions and effects, as well as the potential of their encapsulation in alginate and ethyl-cellulose particles. For that purpose, *in vitro* methods of antioxidant capacity determination by free radical scavenging assays (ABTS and DPHH assays) and methods on model human laryngeal carcinoma (HEp2) and (CaCo2) cell lines were employed. The obtained results indicated that by formulating mixtures of quercetin, ascorbic acid in combination with aminoacids lysine and carnitine in water solutions synergistic effect on the enhancement of antioxidant capacity is achieved. The formulated mixture exhibits cytoprotective and antioxidant activity on HEp2 cells, which is attributed to the same effect of quercetin and ascorbic acid, while single aminoacids lysine and carnitine have no effect on HEp2 and CaCo2 cells. Encapsulation of formulated mixture is more efficient in case of alginate particles obtained by ionic gelation, but for achieving more pronounced biological effects further optimization of encapsulated delivery systems is required.

Keywords: antioxidants, free radicals, synergy, encapsulation, cytotoxicity
Thesis contains: 67 pages, 22 figures, 2 tables, 80 references, 0 supplements
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Ana Belščak-Cvitanović, Assistant professor
Technical support and assistance:. PhD Ksenija Durgo, Associate professor

Reviewers:
1. PhD. Draženka Komes, Full professor
2. PhD. Ana Belščak-Cvitanović, Assistant professor
3. PhD. Ksenija Durgo, Associate professor
4. PhD. Višnja Bačun-Družina, Full professor

Thesis defended: 20 February 2017

1. UVOD ... 1
2. TEORIJSKI DIO ... 3
2.1. NUTRACEUTICI ... 3
2.2. MEHANIZMI DJELOVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA ... 4
2.2.1. Slobodni radikali i oksidativni stres ... 4
2.2.2. Antioksidansi ... 5
2.3. POLIFENOLI ... 6
2.4. KVERCETIN ... 7
2.4.1. Apsorpcija i metabolizam kvercetina ... 8
2.4.2. Bioraspoloživost kvercetina ... 9
2.4.3. Djelovanje kvercetina *in vitro* i *in vivo* ... 9
2.4.4. Antioksidacijska svojstva kvercetina ... 10
2.5. ASKORBINSKA KISELINA ... 10
2.5.1. Antioksidacijsko i prooksidacijsko djelovanje askorbinske kiseline ... 11
2.6. LIZIN ... 12
2.7. KARNITIN ... 13
2.8. INKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA ... 13
2.8.1. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja ... 15
2.8.2. Inkapsulacija metodom isparavanja otapala ... 16
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 17
3.1. MATERIJALI ... 17
3.1.1. Bioaktivni spojevi i njihove mješavine ... 17
3.1.2. Humane stanične linije ... 17
3.1.3. Aparatura i pribor ... 17
3.1.4. Kemikalije ... 18
3.1.5. Otopine ... 20
3.2. METODE ... 21
3.2.1. Priprema otopina odabranih bioaktivnih spojeva i njihovih mješavina ... 22
3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta - ABTS metoda ... 23
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta-DPPH metoda ... 24
3.2.4. Određivanje bioloških učinaka čistih spojeva kvercetina, lizina, vitamina C i karnitina, njihove smjese i ekstrakta na humanim stanicama karcinoma grkljana (HEp2) i humanim stanicama karcinoma debelog crijeva (CaCo2) ... 25
3.2.4.1. Priprema uzoraka za određivanje bioloških učinaka na stanicama ... 25
3.2.4.2. Određivanje citotoksičnosti čistih spojeva kvercetina, lizina, vitamina C, karnitina i njihove smjese te ekstrakta Neutral Red testom ... 26
3.2.4.3. Određivanje prooksidacijskog učinka kvercetina, vitamina C, lizina, karnitina te njihove smjese 2',7'-diklorofluorescein-diacetat fluorimetrijskim testom ... 27

3.2.5. Inkapsulacija mješavine kvercetina, vitamina C, lizina i karnitina 29
3.2.6. Karakterizacija formuliranih čestica s inkapsuliranim bioaktivnim spojevima 30
3.2.6.1. Morfološke karakteristike formiranih čestica 30
3.2.6.2. Određivanje parametara raspodjele veličine čestica 30
3.2.6.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije kvercetina, vitamina C, lizina i karnitina 31
3.2.6.4. Određivanje udjela kvercetina u ekstraktima tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) 31
3.2.6.5. Određivanje udjela askorbinske kiseline u ekstraktima – DCPIP metoda 32
3.2.6.6. Određivanje udjela aminokiselina u ekstraktima 33
3.2.6.7.Priprema otopina za istraživanje bioloških učinaka formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva na modelnim staničnim linijama 34
4. REZULTATI I RASPRAVA 35
4.1. PRELIMINARNA ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ČISTIH SPOJEVA I NJIHOVIH MJEŠAVINA 36
4.2. BIOLOŠKI UČINCI ČISTIH BIOAKTIVNIH SPOJEVA I NJIHOVE MJEŠAVINE NA MODELNIM STANIČNIM LINIJAMA 40
4.2.1. Citotoksični učinak kvercetina, askorbinske kiseline, lizina, karnitina i njihove smjese na HEp2 i CaCo2 stanične linije 40
4.2.2. Prooksidacijski učinak kvercetina, askorbinske kiseline, lizina, karnitina i njihove smjese na HEp2 i CaCo2 stanice 43
4.3. KARAKTERIZACIJA FORMULIRANIH HIDROGEL ČESTICA S INKAPSULIRANOM MJEŠAVINOM BIOAKTIVNIH SPOJEVA 46
4.4. BIOLOŠKI UČINCI FORMULIRANIH HIDROGEL ČESTICA S INKAPSULIRANOM MJEŠAVINOM BIOAKTIVNIH SPOJEVA NA MODELNIM STANIČNIM LINIJAMA 49
4.4.1. Citotoksični učinak etil-celuloznih i alginatnih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva na HEp2 i CaCo2 staničnim linijama 50
4.4.2. Prooksidacijsko djelovanje etil-celuloznih i alginatnih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva na HEp2 i CaCo2 staničnim linijama 54
5. ZAKLJUČCI 59
6. LITERATURA 60

1. UVOD

Posljednjih desetljeća antioksidansi pobuđuju velik interes, većinom zbog novih saznanja o njihovom preventivnom djelovanju na različite poremećaje uzrokovane oksidativnim stresom što uključuje i kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, starenje i određene tipove raka. Za potrebe njihove učinkovite upotrebe u očuvanju zdravlja putem primjene u prehrani i proizvodnji hrane, farmaceutskoj te kozmetičkoj industriji, potrebno je dobro poznavanje mehanizama antioksidacijskog djelovanja (Fabre i sur., 2015). Poznato je da je konzumacija voća i povrća, zbog velikog udjela bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem, povezana sa smanjenjem rizika od razvoja kroničnih bolesti. Međutim, ispitivanja pojedinačnih bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem ne pokazuju dosljedne rezultate preventivnog djelovanja kao što to pokazuju fitokemijski ekstrakti dobiveni iz voća i povrća. Brojna takva ispitivanja dovela su do saznanja da je za značajno antioksidacijsko i antikancerogeno djelovanje voća i povrća odgovorno aditivno i sinergističko međudjelovanje prisutnih fitokemikalija. Upravo zbog ovog efekta dokazano je kako nijedan pojedinačni antioksidans, kao dodatak prehrani, ne može imati jednako djelotvoran učinak kao kombinacija bioaktivnih spojeva prisutnih u nekom biljnom supstratu (Liu, 2004). Cilj mnogih znanstvenih istraživanja te farmaceutskih industrija stoga je postići što bolje učinke koristeći što manje koncentracije spojeva, i u tu svrhu istražuju se kombinacije spojeva s najboljim sinergističkim djelovanjem. Posljednjih godina, velika pozornost znanstvenika pridana je skupini polifenolnih spojeva zbog njihovih iznimnih antioksidacijskih karakteristika te potencijalne primjene u liječenju različitih bolesti, primjene u kozmetičkim formulacijama protiv starenja ili u nutraceutičkim formulacijama. Velika prepreka pri korištenju većine polifenolnih spojeva su niska topljivost u vodi, što rezultira slabijom bioraspoloživosti nakon konzumacije, gorak i opor okus koji ograničava njihovu uporabu u hrani ili oralnim lijekovima, podložnost oksidaciji i degradaciji te interakcijama s drugim prisutnim komponentama u hrani. Kako bi se premostili ti nedostaci i poboljšala funkcionalna svojstva polifenolnih i drugih bioaktivnih spojeva primjenjuju se tehnike mikro- i nanoinkapsulacije. Inkapsulacija bioaktivnih spojeva i nutraceutika omogućuje ciljanu isporuku do mjesta njihovog djelovanja te kontrolirano, postupno otpuštanje spojeva što pridonosi povećanju bioraspoloživosti i biodostupnosti tih spojeva (Munin i Edwards-Lévy, 2011; Augustin i Sanguansri, 2015).

Cilj ovog rada je primjenom *in vitro* metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta putem neutralizacije odn. „gašenja“ slobodnih radikala (ABTS i DPPH metode) te metoda na biološkim staničnim modelima ispitati antioksidacijski kapacitet pojedinačnih bioaktivnih spojeva te formulacijom različitih kombinacija tih spojeva proizvesti njihove mješavine kako bi se utvrdilo postojanje sinergističkog antioksidacijskog učinka. U tu svrhu, u ovom radu ispitat će se antioksidacijska svojstva polifenolnog spoja kvercetina, askorbinske kiseline i aminokiselina lizina i karnitina, te njihovih međusobnih kombinacija. Nakon formuliranja najučinkovitijih mješavina, provesti će se inkapsulacija formulirane mješavine u različite sustave nosača te usporediti njihova učinkovitost u inkapsuliranom obliku sa neinkapsuliranim mješavinama na biološkim staničnim modelima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NUTRACEUTICI

Nutraceutik je svaka tvar koja je hrana (ili dio hrane) čijim se unosom u organizam postižu medicinske ili zdravstvene pogodnosti uključujući prevenciju ili liječenje bolesti. To su proizvodi koji se mogu naći u raznovrsnim oblicima kao pročišćeni i koncentrirani nutrijenti, dodaci prehrani, biljni proizvodi ili prirodne komponente biljaka i prerađena hrana poput žitarica, juha i pića (DeFelice, 1995). Izvori hrane koji se koriste kao nutraceutici su prirodni i mogu se kategorizirati kao:

- Prehrambena vlakna
- Probiotici
- Prebiotici
- Polinezasićene masne kiseline
- Vitamini antioksidansi
- Polifenoli
- Začini (Chauhan i sur., 2013).

Istraživanja u posljednjih nekoliko desetljeća pružila su opsežne dokaze o velikoj svestranosti nutraceutika i brojnih ciljeva koje ih čine grupom spojeva s velikim potencijalom da se počnu koristiti kao antikancerogeni agensi (Arora i Jaglan, 2016). Uz potencijalne antikancerogene učinke, nutraceutici iskazuju i brojne terapeutske učinke sprečavajući debljanje, nastanak kardiovaskularnih bolesti, djelujući antidijabetički, poboljšavajući imunitet, a često imaju prirodno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje (Kuppusamy i sur., 2014).

Veliki broj nutraceutika diljem svijeta istražuje se za prevenciju raka, međutim većina njih je slabo topljiva u vodenom mediju, imaju slabu permeabilnost što posljedično vodi do slabe biodostupnosti u ljudi (Arora i Jaglan, 2016). Također, na biodostupnost nutraceutika osim topljivosti u vodi utječe i njegova stabilnost u gastrointestinalnom sustavu, podložnost biotransformaciji u jetri prije nego dospije do krvi oralnim putem (Ratnam i sur., 2006) te promjene do kojih može doći u crijevima gdje se veliki broj nutraceutika razgradi djelovanjem crijevne mikroflore, te se apsorbiraju njihovi metaboliti koji često pokazuju slabije biološko djelovanje.

2.2. MEHANIZMI DJELOVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Nutraceutici sprječavaju pojavu raka preko nekoliko mehanizama poput inhibicije stanične proliferacije i diferencijacije, inhibicije efluks transportera poput BCRP proteina, P-glikoproteina (P-gp), MRP proteina ili smanjujući toksičnost kemoterapeutskih lijekova (Arora i Jaglan, 2016). Dosadašnje studije pokazale su da fitokemikalije iz voća i povrća mogu imati komplementarne i preklapajuće mehanizme djelovanja:

- antioksidativna aktivnost i vezanje slobodnih radikala;
- regulacija ekspresije gena kod stanične proliferacije, diferencijacije onkogena i tumor supresor gena;
- indukcija zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze;
- modulacija enzimskih aktivnosti u detoksikaciji, oksidaciji i redukciji;
- stimulacija imunološkog sustava;
- regulacija hormonalnog metabolizma;
- antibakterijski i virusni učinci (Liu, 2004).

2.2.1. Slobodni radikali i oksidativni stres

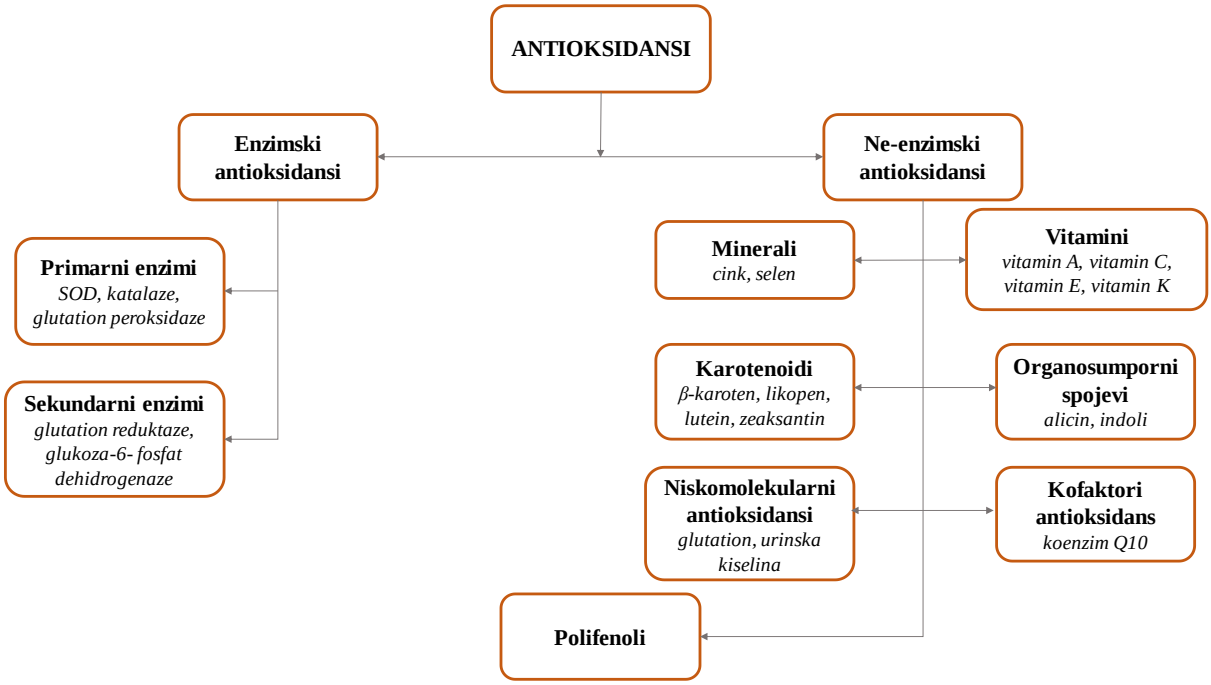
Slobodni radikali i drugi kisikovi reaktivni spojevi nastaju kao produkti normalnih esencijalnih metaboličkih procesa u ljudskom tijelu ili egzogeni putem zračenja, ozona, cigareta, zagađivača zraka i industrijskih kemikalija (Bagchi i Puri, 1998). Najvažniji slobodni radikali s kisikom su hidroksil radikal (OH•), superoksidni anion radikal (O_2•), vodikov peroksid (H_2O_2), atomarni kisik ($^1O_2$), hipoklorit (OCl•), radikal dušikovog (II) oksida (NO•) i peroksinitrit radikal ($ONOO^-$). To su vrlo reaktivne vrste spojeva, koje mogu oštetiti biološki značajne molekule poput DNA, proteina, ugljikohidrata i lipida u jezgri i membranama stanica (Young i Woodside, 2001).

U normalnim uvjetima postoji ravnoteža između nastanka slobodnih radikala i endogenih antioksidacijskih obrambenih mehanizama. Neravnoteža dovodi do oksidativnog stresa uslijed pretjeranog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) ili poremećaja razine antioksidansa. Stanje oksidativnog stresa može uzrokovati oštećenja staničnih i vanstaničnih komponenti stanica i dovesti do stanične smrti (Sen, 1995).

2.2.2. Antioksidansi

Antioksidansi imaju fiziološku ulogu u prevenciji oštećenja staničnih komponenti uslijed kemijskih reakcija slobodnih radikala. Glavni mehanizmi koje antioksidansi pokazuju uključuju redukciju metala poput željeza i bakra, hvatanje slobodnih radikala doniranjem elektrona ili protona, kreiranje kompleksa s metalnim prooksidansima (keliranje metala), vezanje singletnog kisika te stimuliranje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Predložena su 2 mehanizma djelovanja antioksidansa. Prvi je mehanizam razbijanja lanca prema kojem primarni antioksidans donira elektron slobodnom radikalu prisutnom u sustavu. Drugi mehanizam uključuje uklanjanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (NOS) uklanjajući katalizator koji započinje lančanu reakciju (Lobo i sur., 2010; Sahari i Ardestani, 2014).

Prema prirodi antioksidansi se mogu podijeliti u dvije velike kategorije, enzimske i ne-enzimske antioksidanse. Neki od njih proizvode se endogenim putem (enzimi, niskomolekularni antioksidansi i enzimski kofaktori), dok se ne-enzimski antioksidansi unose putem prehrane. Prehrambeni antioksidansi mogu se podijeliti u različite razrede, od kojih su polifenoli, koji obuhvaćaju fenolne kiseline i flavonoide, najveći razred. Ostali razredi prehrambenih antioksidansa uključuju vitamine, karotenoide, organosulfatne spojeve i minerale (Slika 1) (Bunaciu i sur., 2015).



Slika 1. Podjela antioksidansa (prema Bunaciu i sur., 2015)

2.3. POLIFENOLI

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti čija je uloga obrana od ultraljubičastog zračenja te različitih patogena i do sada ih je identificirano preko 8000 u različitim biljnim vrstama. Fenilalanin je zajednički intermedijar a šikiminska kiselina bliži prekursor svih biljnih fenolnih spojeva. S obzirom na broj fenolnih prstenova i na temelju strukturnih elemenata koji ih povezuju, polifenoli se mogu podijeliti na fenolne kiseline, flavonoide, stilibene i lignane (Pandey i Rizvi, 2009). S obzirom na njihovu sveprisutnost u svim biljnim dijelovima, polifenoli su sastavni dio ljudske prehrane, a njihova velika zastupljenost u hrani biljnog podrijetla (voće, povrće, žitarice, masline, mahunarke, čokolada itd.) i napitcima (čaj, kava, pivo, vino itd.) odgovorna je i za cjelokupna organoleptička svojstva biljne hrane (Dai i Mumper, 2010).

Svojstvo polifenola da doniraju vodik odgovorno je za sprječavanje nastanka slobodnih radikala. Nakon što polifenol donira vodikov atom, nastaje polifenolni radikal koji je manje reaktivan od prvog zbog intramolekulske stabilizacije (Kazazić, 2004). Antioksidacijski učinak polifenola očituje se i u njihovoj sposobnosti keliranja potencijalnih prooksidativnih metalnih iona kao što su Fe^{3+}, Cu^{2+} i Al^{3+} vezanjem na hidroksilnu i ili karboksilnu skupinu (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Keliranjem ovih iona sprječavaju odvijanje Fentonove reakcije koja generira slobodne radikale. Fentonova reakcija je reakcija vodikovog peroksida s reduciranim željezom ili bakrom pri čemu nastaje hidroksilni radikal (Kazazić, 2004). Generalno, fenolni spojevi pri niskim koncentracijama pokazuju antioksidacijska svojstva te s povećanjem koncentracije počinju pokazivati prooksidacijska svojstva, dok pri još većim koncentracijama ponovno pokazuju antioksidacijska svojstva (Sahari i Ardestani, 2014).

Međutim, unatoč poželjnom antioksidacijskom djelovanju, polifenolni spojevi pod određenim uvjetima (visoka koncentracija fenolnog antioksidansa, visok pH, prisutnost željeza) mogu inicirati auto-oksidacijske procese te pritom mogu djelovati kao prooksidansi. Oksidacijom polifenola nastaju štetni spojevi poput O_2•, H_2O_2 i kompleksne smjese semikinona i kinona (Halliwell, 2008).

Najistraživanije i najzastupljenije polifenole u prehrani čine flavonoidi. Njihova se struktura sastoji od dva aromatska prstena povezana s tri atoma ugljika koji zatvaraju heterociklički prsten. S obzirom na oksidacijsko stanje centralnog aromatskog prstena, flavonoidi se mogu podijeliti u šest podgrupa:

- flavoni

- flavanoli
- flavonoli
- flavanoni
- izoflavoni
- antocijani (Dai i Mumper, 2010).

Razni flavonoidi pokazali su pozitivno djelovanje na prevenciju i odgodu različitih kronični i degenerativnih bolesti poput raka, kardiovaskularnih bolesti, artritisa, starenja, gubitka pamćenja, moždanog udara, Alzheimerove bolesti, upala i infekcija (Sen i Chakraborty, 2011). Bioraspoloživost flavonoida određena je različitim faktorima koji uključuju šećerni dio fenolnog spoja i daljnji metabolizam putem crijevne mikroflore, što pokazuje da različite grupe flavonoida mogu imati drugačija farmakokinetička svojstva (Sak, 2014).

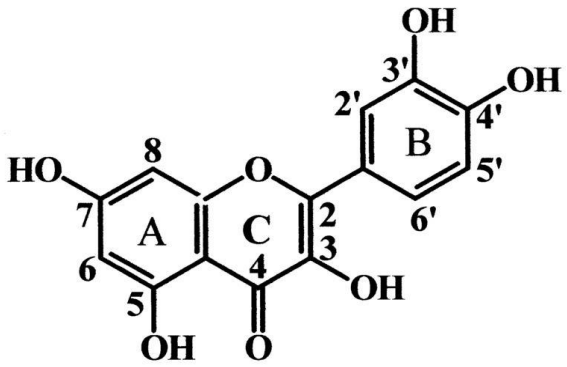
Flavonoidi djeluju kao antioksidansi na više načina od kojih su hvatanje slobodnih radikala i prekidanje lančane reakcije slobodnog radikala najvažniji mehanizmi. Također, kod flavonoida je primijećen sinergistički učinak u kombinaciji s drugim fiziološkim antioksidansima poput vitamina C ili vitamina E. Primijećeno je da askorbinska kiselina djeluje na povećanje antiproliferativnog učinka kvercetina (Kazazić 2004).

Najzastupljeniji polifenoli u našoj prehrani ne moraju nužno biti oni s oni s najboljim bioraspoloživim profilom. Stoga, nije toliko bitno znati zastupljenost pojedinog spoja u određenoj hrani i dodacima prehrani već je bitnije znati kolika količina je bioraspoloživa. Premda određeni spoj ima jake antioksidacijske ili druge biološke aktivnosti *in vitro*, ako spoj ne dođe do ciljnih tkiva njegova biološka aktivnost *in vivo* je vrlo mala (D'Archivio i sur., 2010).

2.4. KVERCETIN

Kvercetin (Slika 2) je glavni predstavnik flavonola u ljudskoj prehrani budući da se nalazi u raznovrsnom voću, povrću, napitcima, sjemenkama i orašastim plodovima. Najzastupljeniji je u luku (0,3 mg g^{-1} svježeg luka) i čaju (10-25 mgL^{-1}). Iz tog razloga, danas je jedan od najistraživanijih fenolnih spojeva. Kvercetin je aglikon, što znači da nema vezanu šećernu skupinu. Kvercetin karakterizira žarko žuta boja, a u čistom stanju pojavljuje se u

obliku igličastih kristala. Gotovo je netopljiv u hladnoj vodi, u toploj vodi je slabo topljiv, a lako se otapa u alkoholima i lipidima. U hrani se pretežno nalazi u obliku glikozida kojih je do danas identificirano više od 170, od kojih su najzastupljeniji O-glikozidi sa D-glukozom. Kvercetin-glikozid nastaje vezanjem glikozilne skupine (šećer poput glukoze, ramnoze ili rutinoze) umjesto jedne od OH skupina kvercetina (najčešće na poziciji 3). Ovisno o prisutnosti glikozilne skupine mijenja se topljivost u vodi odnosno dolazi do povećanja topljivosti u odnosu na aglikon kvercetina (Sak, 2013; Li i sur., 2016).



Slika 2. Kemijska struktura kvercetina (Lemańska i sur., 2001)

Unos kvercetina znatno varira, ovisno o konzumaciji namirnica bogatih ovim spojem, te varira između 5 i 40 mg po danu (Mojzer i sur., 2016). Nakon unosa, koncentracija u ljudskoj plazmi kreće se u mikromolarnom rasponu 0,5-1,5 μM (Sak, 2013).

Zbog svoje potencijalne koristi za dobrobit ljudskog zdravlja, kvercetin je privlačan za korištenje kao nutraceutski sastojak u hrani i farmaceutskoj industriji. Njegova se stabilnost opsežno istražuje kako bi se ispitale njegove kemijske promjene tijekom procesiranja i skladištenja hrane. Međutim, njegova kemijska nestabilnost, slaba topljivost u vodi (0,01 gL^{-1}) te time i slaba bioraspoloživost otežavaju primjenu kvercetina kao takvog u hrani i farmaceutskoj industriji (Cai i sur., 2013; Gao i sur., 2011).

2.4.1. Apsorpcija i metabolizam kvercetina

Kvercetin se, nakon unosa, oslobađa iz hrane već u usnoj šupljini gdje stupa u interakciju s proteinima iz sline pri čemu se formiraju kvercetin-protein binarni agregati (Manach i sur., 2004) koji ne mijenjaju znatno apsorpciju kvercetina (Cai i Bennick, 2006).

U želucu se zbog vrlo niskog pH i djelovanja bakterija kvercetin može razgraditi do fenolnih kiselina (Weldin i sur., 2003) koje se mogu apsorbirati u želucu (Wang i sur., 2016) za razliku od kvercetin aglikona i kvercetin-glikozida koji se ne apsorbiraju u želucu (Crespy i sur., 2002). Dospijećem u tanko crijevo kvercetin-aglikon podliježe glukuronidaciji i metilaciji, a kvercetin glikozidi se deglikoziliraju do kvercetin-aglikona uz pomoć crijevne mikroflore (Nemeth i sur., 2003). Nastali kvercetin-aglikon se dalje metabolizira do glukuronidiranih i sulfatiranih derivata. Nastali derivati kvercetina transportiraju se do jetre gdje se nastavlja metilacija, sulfatacija i glukuronidacija (Spencer, 2003). Metaboliti nastali u jetri ulaze u cirkulaciju ili se izlučuju putem žuči (Arts is sur., 2004). Međutim, potrebno je bolje istražiti potencijalna pozitivna djelovanja metabolita kvercetina i utjecaj sastava crijevne mikroflore na njihov nastanak (D'Andrea, 2015).

2.4.2. Bioraspoloživost kvercetina

Bioraspoloživost se definira kao frakcija oralno primijenjene tvari koja se apsorbira i dostupna je za fiziološku aktivnost ili skladištenje. Bioraspoloživost kvercetina važan je posrednik za njegove blagotvorne učinke na zdravlje. Kvercetin karakterizira slaba bioraspoloživost kad se unosi kao suspenzija ili s obrocima. Na njegovu bioraspoloživost utječu endogeni i egzogeni faktori. Endogeni faktori koji mogu utjecati na bioraspoloživost kvercetina su spol, dob, status vitamina C u organizmu i crijevna propusnost, a endogeni faktori obuhvaćaju glikozilaciju kvercetina, prisutnost šećernih komponenti, neprobavljiva vlakna, prerađivanje hrane, prehrambene masti i nano-formulaciju (Guo i Bruno, 2015).

2.4.3. Djelovanje kvercetina *in vitro* i *in vivo*

U posljednja dva desetljeća istraživanja kvercetina najviše su fokusirana na njegovo antioksidacijsko i antitumorsko djelovanje. Brojna istraživanja pokazala su konzistentne rezultate antitumorskog djelovanja kvercetina na niz staničnih linija raka podrijetlom iz prostate, dojke, vrata grlića maternice, jajnika, endometrija, debelog crijeva, jetre, jednjaka, želuca, gušterače, pluća, nazofarinksa, jezika, usne šupljine te glave i vrata. Također, antitumorska svojstva dokazana su i na stanicama glioma, osteosarkoma, melanoma, nekoliko

leukemija i limfoma. *In vivo,* kvercetin je pokazao kemoprevencijska svojstva na glodavcima kao modelima karcinogeneze tankog crijeva, usta, grlića maternice i pluća (Sak, 2014). Djelovanje kvercetina na ljudsko zdravlje i dalje se istražuje, a klinička ispitivanja nastoje poduprijeti rezultate dobivene *in vitro* i *in vivo.*

2.4.4. Antioksidacijska svojstva kvercetina

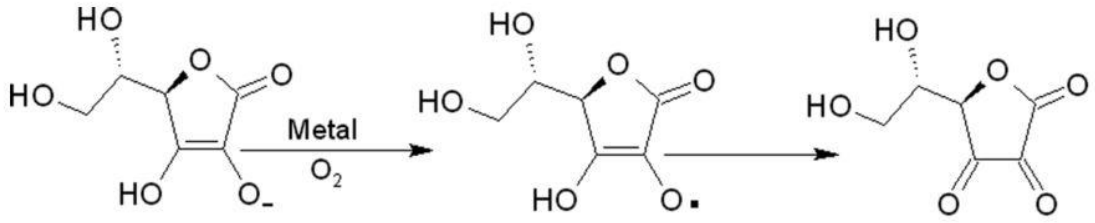
Snažno antioksidacijsko djelovanje kvercetina pripisuje se njegovoj mogućnosti da ukloni slobodne radikale i veže ione prijelaznih metala. Za antioksidacijski kapacitet kvercetina odgovorne su dvije farmakofore unutar molekule, kateholna skupina unutar B prstena i OH skupina na poziciji 3 unutar A prstena, koje imaju optimalnu konfiguraciju za vezanje slobodnih radikala (Slika xy). Unutar grupe flavonoida, kvercetin pokazuje najveći učinak na uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Prema tome, kvercetin ima svojstvo inhibicije lipidne peroksidacije koja ima štetne učinke na ljudsko tijelo. Također, kvercetin povećava razinu glutationa što doprinosi prevenciji stvaranja slobodnih radikala. Uklanjanje slobodnih radikala može utjecati na smanjenje upalnih procesa u organizmu. Istraživanja provedena na 40 sportaša pokazala su da kvercetin djeluje i na prevenciju povećanog oksidativnog stresa nastalog uslijed vježbanja (D'Andrea, 2015).

Poput većine antioksidansa, kvercetin može djelovati prooksidacijski u određenim uvjetima. Kvercetin kinon (QQ) je glavni produkt oksidacije kvercetina i snažno reagira s tiolima što rezultira gubitkom proteinske funkcije. Boots (2007) je toksičnost kvercetin-kinona definirao kao kvercetin paradoks. Uslijed pružanja učinkovite zaštite uklanjanjem ROS, kvercetin se konvertira u potencijalno toksični produkt koji reagira s glutationom, najzastupljenijim endogenim tiolom.

2.5. ASKORBINSKA KISELINA

L-askorbinska kiselina ili vitamin C je vodotopljivi ketolakton s dvije hidroksilne grupe (slika xy). U čistom stanju nalazi se u obliku bijelog kristaličnog praha, a otapanjem nastaje bezbojna otopina. Pri fiziološkoj pH vrijednosti askorbinska kiselina nalazi se u obliku askorbatnog monoaniona ($AscH^-$). Askorbat je izvrsno redukcijsko sredstvo i lako se oksidira

do askorbat radikala ($Asc^{\bullet-}$) i dehidroaskorbinske kiseline (DHA) (Slika 3). Askorbatni radikal je relativno nereaktivan zbog svoje rezonancijske stabilizacije nesparenog elektrona i pri pH 7,0 lako dismutira u askorbat i dehidroaskorbinsku kiselinu (Du i sur, 2012).



Askorbatni monoanion Askorbatni radikal Dehidroaskorbinska kiselina

Slika 3. Oksidacija askorbatnog aniona (Abbas i sur., 2012)

Budući da ljudi nemaju sposobnost sinteze tog spoja, važno je da se askorbinska kiselina unosi putem prehrane. Askorbinska kiselina je esencijalni faktor za sintezu kolagena, karnitina i norepinefrina. Dnevni preporučeni unos askorbinske kiseline iznosi 75 mg za žene i 90 mg za muškarce (Pacier i Martirosyan, 2015).

2.5.1. Antioksidacijsko i prooksidacijsko djelovanje askorbinske kiseline

Prosječna vrijednost askorbata u plazmi zdravog čovjeka iznosi oko 40-80 μM i pri tim vrijednostima askorbat djeluje kao endogeni antioksidans. Djeluje kao ko-antioksidans s vitaminom E u zaštiti LDL lipoproteina od oksidativnog oštećenja induciranog peroksil radikalima. Askorbat brzo donira svoj elektron potencijalno štetnim oksidirajućim radikalima poput hidroksil radikala, alkoksil radikala, peroksil radikala, tiolnih radikala i tokoferol radikala, pri čemu oksidacijom askorbatnog aniona nastaje askorbatni radikal koji je relativno nereaktivan i reducira se natrag u askorbat pomoću NADH i NADPH ovisnih reduktaza ili dismutira (Du i sur., 2012).

U prisutnosti katalitičkih metalnih iona askorbat pokazuje prooksidativno djelovanje. U reakciji redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} askorbat se oksidira do askorbatnog radikala [1]. Nastali Fe^{2+} može brzo reagirati [2] s O_2 i pritom ga reducirati u peroksid radikal koji može dismutirati do H_2O_2 i O_2 pri čemu se Fe^{2+} oksidira do Fe^{3+}. Prisutnost askorbata omogućava reciklaciju Fe^{3+} natrag u Fe^{2+} koji u reakciji s H_2O_2 daje vrlo reaktivni hidroksil radikal [4].

[1] $AscH^- + Fe^{3+} \rightarrow Asc^{\bullet-} + Fe^{2+}$

[5] $Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O^{\bullet-}$

[3] $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

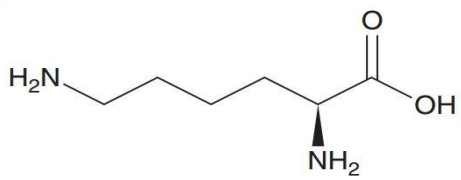
[4] $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet}$

Prooksidacijsko ili antioksidacijsko djelovanje askorbata ovisi o primijenjenoj koncentraciji. Dosadašnja literatura pokazuje različite rezultate uslijed različitih primijenjenih koncentracija te nastanka iona prijelaznih metala u eksperimentima i u mediju (Du i sur., 2012).

2.6. LIZIN

Lizin (Slika 4) je jedna od 20 L-aminokiselina koje sudjeluju u sintezi proteina. Lizin je esencijalna aminokiselina što znači da ju sisavci ne mogu sintetizirati i ne sudjeluje u reakcijama transaminacije, pa se u organizam pretežno putem mesnih proizvoda. Pojavljuje se u dvije stereoizomerne strukture, D-lizin i L-lizin, a u prirodi se može naći i u obliku poli-L-lizina. L-lizin je biološki aktivni oblik koji se nalazi u svim živim stanicama. Lizin je pri neutralnom pH pozitivno nabijena bazična aminokiselina. Lizin sudjeluje u izgradnji kolagena i vezivnog tkiva koji su važni za rast, te kao prekursor u sintezi karnitina. Gornja granica za dnevni unos lizina nije definirana za ljude. Katabolizam lizina odvija se u najvećim udjelom u jetri, a katabolizira se do glutamata i acetil-CoA. (Tome i Bos, 2007; Ebrahimi).

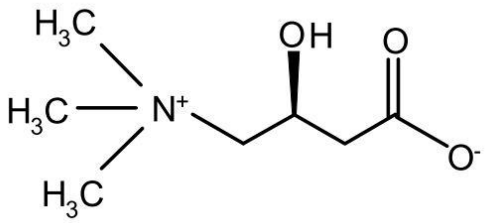
L-lizin ima najveću primjenu kao dodatak prehrani svinja i peradi te u farmaceutskim pripravcima i kozmetici. U farmaceutskoj industriji korišten je za prevenciju ateroskleroze i u liječenju određenih virusnih infekcija (Brautaset i Ellingsen, 2011).



Slika 4. Kemijska struktura L-lizina (Brautaset i Ellingsen, 2011)

2.7. KARNITIN

Karnitin je kvaternarni amin prisutan u gotovo svim životinjskim vrstama te nekim mikroorganizmima i višim biljkama (Slika 5). U prirodi, karnitin se pojavljuje u dva enantiomerna oblika, L-karnitin koji ima važnu ulogu u proizvodnji stanične energije i D-karnitin koji je fiziološki neaktivan te djeluje toksično na biokemijske procese. L-karnitin je endogena molekula uključena u metabolizam masnih kiselina. Uloga L-karnitina je transport aktiviranih dugolančanih masnih kiselina iz citosola u mitohondrij gdje se odvija β-oksidacija masnih kiselina. L-karnitin se u organizmu biosintetizira iz aminokiselina lizina i metionina ili se unosi egzogeno putem prehrane. U određenim uvjetima, kada potreba za L-karnitinom nadilazi kapacitet sinteze kod pojedinaca možemo ga smatrati uvjetno esencijalnim mikronutrijentom. Biosinteza karnitina odvija se u bubrezima, jetri i mozgu dok se ostala tkiva opskrbljuju putem krvi aktivnim transportom. Vrlo je važno da dovoljna količina karnitina dospije do tkiva koja su ovisna o energiji dobivenoj β-oksidacijom. Istraživanja posljednjih nekoliko godina upućuju da L-karnitin može imati važnu ulogu u regulaciji staničnog stresa, najvjerojatnije djelovanjem na ugradnju ugljikohidrata i metabolizam lipida. (Pekala i sur., 2011).



Slika 5. Kemijska struktura L-karnitina (Zhang i sur., 2012)

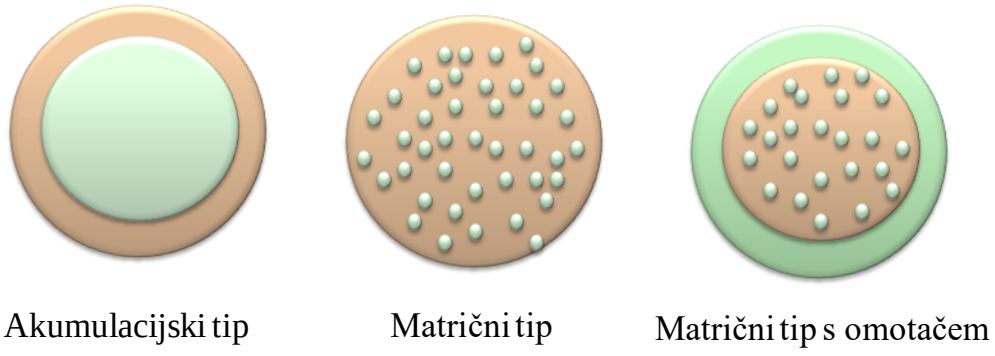
2.8. INKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Slaba topivost, nestabilnost, podložnost oksidaciji te biotransformacija bioaktivnih spojeva samo su neki od razloga razvitka i primjene inkapsulacijskih tehnika. Većinom bioaktivne spojeve karakterizira brza inaktivacija. Inkapsulacija je proces kojim se jedna ili više tvari imobilizira unutar druge tvari pri čemu nastaju kapsule promjera od nekoliko nm do nekoliko mm. Izbor metoda za proizvodnju mikrokapsula ovisi o vrsti materijala jezgre i ovojnice te o konačnoj primjeni mikrokapsula. Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, aktivna tvar, punjenje ili interna faza, dok se tvar u koju se inkapsulira naziva membrana,

ljuska, nosač, eksterna faza ili matriks. U prehrambenoj industriji mikroinkapsuliranje sastojaka primjenjuje se radi:

- imobilizacije aktivnog sastojka u sustavima procesiranja prehrambenih proizvoda
- praktičnijeg rukovanja aktivnim sastojkom
- mogućnosti stvaranja vizualnih i teksturalnih efekata
- mogućnosti prilagodbe svojstava aktivne tvari (veličina čestica, struktura, topljivost u vodi ili ulju, boja)
- maskiranja nepoželjnih okusa
- kontroliranog otpuštanja (Belščak-Cvitanović, 2013).

Kapsule prema vrsti dijelimo na akumulacijske i matrične (Slika 6). Akumulacijski tip mikrokapsula karakterizira čahura odnosno kapsula oko aktivne tvari. Kod matričnog tipa kapsula aktivni sastojak je raspršen unutar materijala nosača, homogeno raspodijeljen ili u obliku vrlo malih kapljica. Za razliku od akumulacijskog tipa, kod matričnog tipa kapsule aktivna tvar je prisutna i na površini kapsule (osim ako nemaju dodatan omotač). Osim sferičnog oblika, kapsule mogu poprimiti cilindrični, ovalni ili nepravilni oblik (Belščak-Cvitanović, 2013).



Slika 6. Vrste kapsula (Belščak-Cvitanović, 2013)

Razvijene su brojne tehnike za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva koje se mogu klasificirati na temelju reakcija koje se odvijaju prilikom procesa. Prema tome, razlikujemo fizikalne, fizikalno-kemijske te kemijske metode inkapsulacije. Fizikalne metode obuhvaćaju sušenje raspršivanjem, oblaganje u fluidizirajućem sloju, ekstruziju te procese koji koriste superkritične fluide. Pod fizikalno-kemijske procese ubrajaju se hladno raspršivanje, ionsko geliranje, isparavanje/ekstrakcija otapala te jednostavna ili kompleksna koacervacija. U

kemijske metode ubrajaju se polikondenzacija na granici faza, *in situ* polimerizacija, polimerizacija na granici faza i unakrsno povezivanje na granici faza (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Neke od ovi metoda su već dobro ispitane i našle su primjenu u industrijskim procesima (sušenje raspršivanjem), dok je učinkovitost i primjenjivost nekih drugih tehnika tek nedavno utvrđena (inkapsulacija bazirana na taloženju superkritičnim tekućinama) (Đorđević i sur., 2015). Materijali koji se koriste pri inkapsulaciji ovise o brojnim kriterijima među kojima su najvažniji tip spoja koji se inkapsulira i njegove karakteristike te svrha primjene mikrokapsula. Također, materijal koji se koristi kao zaštitni omotač inkapsulata mora biti prikladan za primjenu u hrani. Potrebno je proučiti i analizirati sva svojstva potencijalnog nosača kako bi se predvidjelo njegovo ponašanje u formuliranoj hrani. (Nedović i sur., 2011).

Imobilizacija polifenolnih spojeva tehnikama mikroinkapsulacije tek se odnedavno počela koristiti. Budući da su polifenoli raznovrsna skupina spojeva potrebno je ispitati sve postojeće tehnike mikroinkapsulacije koje bi se mogle primijeniti za imobilizaciju pojedinih polifenolnih spojeva. Do sada najčešće korištene tehnike mikroinkapsulacije pojedinih polifenolnih spojeva obuhvaćaju:

- kompleksiranje inkluzijom
- sušenje raspršivanjem
- inkapsulaciju u stanice
- ekstruziju
- ionsko geliranje
- metodu separacije faza
- geliranje formiranjem emulzije
- emulzifikaciju
- liofilizaciju (Belščak-Cvitanović, 2013).

2.8.1. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja

Ionsko geliranje bazira se na sposobnosti polielektrolita da se unakrsno povezuje u prisutnosti suprotno nabijenih iona pri čemu se stvara hidrogel. Hidrogel kuglice proizvode se ukapavanjem otopine polimera s aktivnom tvari u vodenu otopinu polivalentnih kationa. Kationi difundiraju u polimerne kapljice s aktivnom tvari formirajući trodimenzionalnu mrežu

unakrsno povezanih polimera. Polimerne gel čestice proizvode se od brojnih prirodnih i biorazgradivih polimera. Najkorišteniji prirodni ili polusintetski polimeri koji se koriste u procesu ionskog geliranja su alginat, gelan, kitozan, pektin i karboksimetil-celuloza (Patil i sur., 2010).

Pri korištenju metode ionskog geliranja za proizvodnju hidrogel čestica važno je obratiti pozornost na nekoliko faktora koji utječu na uspješnost procesa kao što su omjer polimera i elektrolita, temperatura, pH otopine za povezivanje, koncentracija aktivne tvari koja se inkapsulira (Patil i sur., 2012).

Alginat je netoksični, biorazgradivi i biokompatibilni prirodni polisaharid dobiven iz morskih smeđih algi i određenih vrsta bakterija (Patil i sur., 2010). Kemijsku strukturu alginata čine nerazgranati binarni kopolimeri, ß-D-manuronska i α-L-guluronska kiselina, međusobno povezani 1,4-glikozidnim vezama. Otapanjem alginata u vodi nastaje viskozna otopina, čija viskoznost raste s porastom dužine alginatnih lanaca. U otopini natrijevog alginata proces umrežavanja započinje dodatkom otopine u kojoj su prisutni ioni nekog dvovalentnog kationa (najčešće Ca^{2+}) (Belščak-Cvitanović, 2011).

2.8.2. Inkapsulacija metodom isparavanja otapala

Metoda isparavanja otapala koristi se za pripremu biokompatibilnih polimernih nanočestica poput PLGA, PLA, etil-celuloze, akrilatnih polimera i akrilatnih kopolimera (Reddy i Sailaja, 2014). Priprema mikročestica sastoji se od četiri glavna koraka koji uključuju otapanje ili disperziju bioaktivne komponente u organskom otapalu koje sadrži otopljeni nosač, emulzifikaciju pripremljene organske faze u fazi koja se ne miješa s prvim otapalom, isparavanje otapala i skupljanje i sušenje dobivenih mikročestica.

Ovom metodom mogu se proizvesti čestice mikrometarskih i nanometarskih veličina. Kako bi se postigla što bolja inkapsulacijska učinkovitost potrebno je pomno izabrati materijale i podesiti uvjete inkapsulacije tako da na kraju zaostane što manje otapala (Freitas i sur., 2005).

Glavni razlozi raširene upotrebe etil-celuloze kao nosača su netoksičnost, biokompatibilnost i bionerazgradivost tog polimera. Posebno je prikladna za formulacije s postupnim otpuštanjem. Mikrokapsule obložene etil-celulozom odlikuju se sposobnošću da apsorbiraju pritisak i tako sprječavaju frakturu omotača (Murtaza i sur., 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Bioaktivni spojevi i njihove mješavine

U svrhu ispitivanja sinergističkog učinka kombinacije kemijski različitih skupina bioaktivnih spojeva, u ovom radu korišteni su sljedeći spojevi s dokazanim nutraceutskim djelovanjem:

- Polifenolni spojevi: kvercetin (Q)
- Vitamini: askorbinska kiselina (C)
- Aminokiseline: lizin (L) i karnitin (K).

3.1.2. Humane stanične linije

Za određivanje citotoksičnih i antioksidacijskog/prookisdacijskog učinka čistih bioaktivnih spojeva i njihovih mješavina korištene su stanična linija stanica karcinoma grkljana (HEp2) i stanična linija karcinoma debelog crijeva (CaCo2). Stanice su uzgojene kao jednoslojna kultura u RPMI 1640 mediju kompletiranom s 10 % fetalnog goveđeg seruma. Stanice su uzgojene na 37 °C i u prisustvu 5% CO_2.

3.1.3. Aparatura i pribor

Laboratorijsko stakleno i plastično posuđe (čaše, odmjerne tikvice, pipete, falkon i eppendorf kivete), lijevci, staklene epruvete volumena 3-10 mL, štapići za miješanje i keramički tarionik s tučkom. Za dodavanje malih i preciznih volumena korištene su automatske mikropipete od 2-1000 μL.

Priprema otopina uzoraka

1) Analitička vaga (Mettler-Toledo, Švicarska)
2) Magnetska miješalica, RT 5 power (IKAMAG, Njemačka)
3) Miješalica (Tehnica, Slovenija)

Spektrofotometrijske metode

1) Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
2) Spektrofotometar, Helios γ (Thermo Spectronic, Velika Britanija)

Određivanje bioloških učinaka spojeva

1) Analitička vaga, MC1 Laboratory LC 6205 (Sartorius, Njemačka)
2) Tresilica (Hoefer, Pharmacia, SAD)
3) Inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2 (Forma Scientific, SAD)
4) Komora za sterilni rad (Iskra, Slovenija)
5) Mikropipete, 10-1000 μL (Eppendorf, Njemačka)
6) Mikrotitarske pločice s 96 bunarića (Falcon BD Company, SAD)
7) Čitač mikrotitarskih pločica (Cecil Instruments Ltd, Engleska)
8) Spektrofotometar (Tecam, Švicarska)
9) Svjetlosni mikroskop/invertni svjetlosni mikroskop (Carl Zeiss Jena, Njemačka; Optika Microscopes, Italija)
10) T-boce, Falcon (BD Company, SAD)
11) Türken- Bürkova komora

Inkapsulacija spojeva

1) Magnetska miješalica, RT 5 power (IKAMAG, Njemačka)
2) Plastične šprice, volumena 5-10 mL
3) Igla za kromatografiju, veličine 18-23 Gauge

HPLC metoda

1) Agilent 11100/1200 Series HPLC uređaj (Agilent, SAD)
2) Detektor s nizom dioda (DAD) (Agilent, SAD)
3) RP HPLC kolona ACE C-18, (Agilent, SAD) (250 x 4,6 mm, veličina stacionarne faze 5 μm)
4) Celulozno-acetatni mikrofilteri 0,45 μm (Nylon Membranes, Supelco, SAD)

3.1.4. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće (p.a.)

Ispitivani čisti spojevi

1) Kvercetin (Sigma-Aldrich, USA)
2) Lizin
3) Karnitin
4) Taurin
5) Askorbinska kiselina (Sigma-Aldrich, SAD)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

1) Etanol (96%-tni) (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
2) Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, Njemačka)
3) 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve soli (ABTS), (Sigma-Aldrich, Njemačka)
4) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

1) Metanol (J.T. Baker B.V., Nizozemska)
2) 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), (Fluka, Švicarska)
3) 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Određivanje bioloških učinaka čistih spojeva na stanice

1) Dimetilsulfoksid (DMSO), (Kemika, Hrvatska)
2) Fetalni goveđi serum, toplinski inaktiviran (FBS), (Gibco, SAD)
3) Ledena octena kiselina (Kemika, Hrvatska)
4) Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), (Sigma, Njemačka)
5) RPMI 1640 medij (L-glutamin, 25 mM Hepes), (Lonza, BioWhittaker, SAD)
6) Tripsin (Gibco, SAD)
7) Trikloroctena kiselina (TCA), (Kemika, Hrvatska)
8) Diklofluorescein-diacetat (Sigma, Njemačka)
9) Natrijev hidroksid (Kemika, Hrvatska)

Određivanje askorbinske kiseline u ekstraktima

1) 2,6-diklorofenolidnofenol (DCPIP), (Sigma-Aldrich, Njemačka)

2) Natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Hrvatska)
3) Metafosforna kiselina (MPA), (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Određivanje ukupnih aminokiselina u ekstraktima

1) Ninhidrin (triketohidrindene hidrat), (Sigma-Aldrich, Njemačka)
2) Kositrov (II) klorid (SnCl2), (Sigma-Aldrich, Njemačka)
3) Natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), (Kemika, Hrvatska)
4) Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Hrvatska)

Određivanje kvercetina u ekstraktima

1) Metanol (J.T. Baker B.V., Nizozemska)

3.1.5. Otopine

1) Otopina ABTS
   - Kalijev persulfat (140 mM) 0,088 mL
   - ABTS (7 mM) 4,91 mL

2) Otopina DPPH
   - DPPH 0,0037 g
   - Metanol 100 mL

3) Fosfatni pufer (PBS 1x, pH=7,4):
   - KCl 0,2 g
   - KH2PO4 0,2 g
   - NaCl 8,0 g
   - Na2HPO4x7H2O 2,2 g
   - destilirana voda 1000 mL

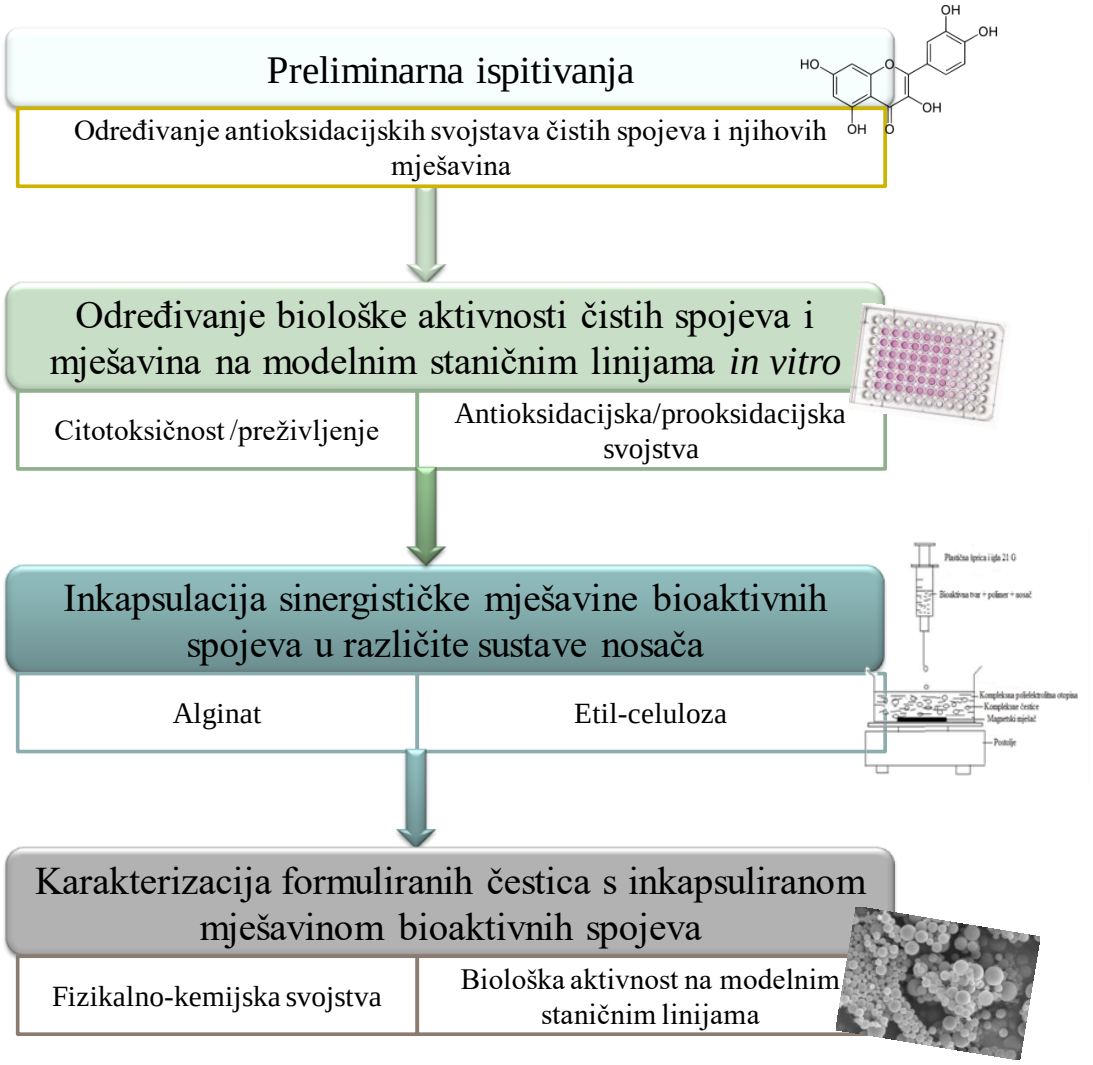
4) Otopina Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid, 5 g L^{-1}):
   - Neutral Red 0,005 g
   - Etanol 1,0 mL

5) Otopina za odbojavanje:
   - Ledena octena kiselina 1 %-tna (v/v)
   - Etanol 50 %-tni (v/v)
   - destilirana voda 49 %-tna (v/v)

6) Diklorfluorescein-diacetat (2 mM) (DCFH-DA):
   - Diklofluorescein-diacetat 0,002 g
   - DMSO 2 mL

3.2. METODE

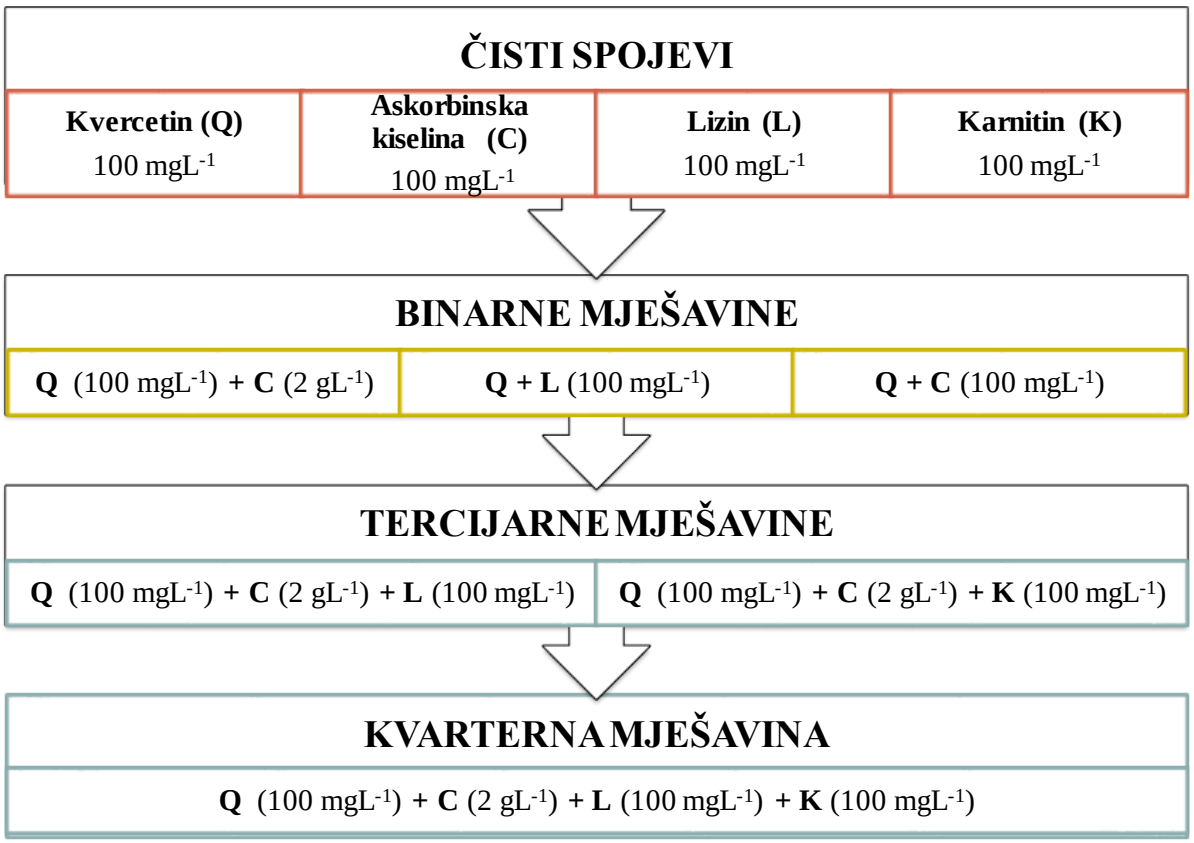
U ovom radu, eksperimentalni dio istraživanja proveden je u nekoliko faza, prema shematskom prikazu na Slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja

3.2.1. Priprema otopina odabranih bioaktivnih spojeva i njihovih mješavina

U svrhu preliminarnog određivanja antioksidacijskog kapaciteta čistih bioaktivnih spojeva i utvrđivanja sinergističkog učinka njihovih mješavina, askorbinska kiselina (C) i aminokiseline lizin (L) i karnitin (K) pripremljeni su kao čiste vodene otopine koncentracije 100 mgL^{-1}. Kvercetin je zbog svoje slabe topljivosti u vodi pripremljen kao metanolna otopina jednake koncentracije (100 mgL^{-1}) (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz formulacije čistih bioaktivnih spojeva i njihovih mješavina za potrebe izrade eksperimentalnog dijela

Binarna mješavina kvercetina i askorbinske kiseline (Q + C) pripremljena je otapanjem 1 mg izvaganog kvercetina u 10 mL 2%-tne vodene otopine askorbinske kiseline, tako da koncentracija kvercetina u tako pripremljenoj otopini iznosi također maksimalnih 100 mgL^{-1}.

Tercijarna mješavina kvercetina, askorbinske kiseline i lizina (Q + C + L) pripremljena je otapanjem 1 mg kvercetina i 1 mg lizina u 10 mL 2%-tne otopine askorbinske

kiseline, a mješavina kvercetina, askorbinske kiseline i karnitina (Q + C + K) pripremljena je otapanjem 1 mg kvercetina i 1 mg karnitina u 10 mL 2%-tne otopine askorbinske kiseline, kako je prikazano na shematskom prikazu.

Za potrebe određivanja biološke aktivnosti na staničnim linijama pripremljena je kvaterna mješavina sastavljena od kvercetina, askorbinske kiseline, lizina i karnitina (Q + C + L + K). Prvo su pripremljene pojedinačne otopine spojeva od kojih je zatim pripremljena njihova mješavina kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.1.

3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta - ABTS metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) diamonijeve soli (ABTS radikal-kationa), koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Za oksidaciju otopine ABTS-a koristi se otopina kalijevog persulfata, pri čemu se maksimum apsorbancije dostiže na valnim duljinama od 645, 734 ili 815 nm. Dodatak antioksidansa rezultira redukcijom prethodno generiranog ABTS radikala, što uvelike ovisi o vremenu, i mjeri se praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi, pri istim uvjetima (Re i sur., 1999).

Postupak rada:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka pripremi se otopina $ABTS^+$ radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS reagensa (7 mM) s kalijevim persulfatom (140 mM) do konačne koncentracije otopine kalijevog persulfata od 2,45 mM. Za pripremu ove otopine potrebno je pomiješati 0,088 mL otopine kalijevog persulfata (140 mM) te nadopuniti s otopinom ABTS (7 mM) reagensa do volumena 5 mL. Budući da ABTS i kalijev persulfat reagiraju u stehiometrijskom odnosu 1:0,5 neće doći do potpune oksidacije te je stoga potrebno pripremljenu otopinu omotati folijom i ostaviti stajati preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi. Na dan analize otopina se razrijedi etanolom (96%-tnim) do konačne koncentracije $ABTS^+$ radikala od 1 %, tako da apsorbancija te otopine iznosi 0,70 ± 0,02. Za provedbu analitičkog određivanja, volumen od 0,04 mL uzorka pomiješa se s 4 mL otopine

ABTS+ radikala u epruveti zaštićenoj od svjetla te se izmjeri apsorbancija na 734 nm nakon točno 6 minuta. Prije mjerenja uzoraka potrebno je izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja se priprema tako da se umjesto uzorka, 0,04 mL destilirane vode pomiješa s istom količinom reagensa (4 mL otopine $ABTS^+$ radikala).

Izračun rezultata:

Oduzimanjem apsorbancije uzorka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA, koja se koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Antioksidacijski kapacitet u ispitivanim uzorcima izračunava se pomoću baždarnog pravca konstruiranog za standard Trolox-a (1) koji prikazuje ovisnost apsorbancije (ΔA) o koncentraciji standarda (mgL^{-1}):

$$y = 0,303x + 0,0006 \qquad (1)$$

gdje su:

x - antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a L^{-1})

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 734 nm.

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću ABTS metode provedeno je u dvije paralelene probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol ekvivalenata Trolox-a L^{-1} uzorka. Za razrijeđene uzorke, rezultate je potrebno pomnožiti s faktorom razrjeđenja.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta-DPPH metoda

Princip metode:

Ova metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje otopine u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).

$$DPPH^{\cdot} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot}$$

$$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow DPPH\text{-}R$$

Postupak rada:

Pripremi se 0,094 mM otopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u metanolu. U epruvetu se otpipetira 0,1 mL uzorka te se doda 3,9 mL otopine DPPH (0,094 mM). Nakon 30 minuta mjeri se apsorbancija pri 515 nm. U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka doda se 0,1 mL metanola te 3,9 mL otopine DPPH.

Izračun rezultata:

Antioksidacijski kapacitet u ispitivanim uzorcima izračunava se pomoću baždarnog pravca konstruiranog za standard Trolox-a (2) koji prikazuje ovisnost apsorbancije (ΔA) o koncentraciji standarda (mmol L^{-1}):

$$y = 0{,}603x - 0{,}006 \qquad (2)$$

gdje je:

x - antioksidacijski kapacitet uzorka (mmol Trolox-a L^{-1})

y - izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm.

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta pomoću DPPH metode provedeno je također u dvije paralelene probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mmol ekvivalenata Trolox-a L^{-1} uzorka. Za razrijeđene uzorke, rezultate je potrebno pomnožiti s faktorom razrjeđenja.

3.2.4. Određivanje bioloških učinaka čistih spojeva kvercetina, lizina, vitamina C i karnitina, njihove smjese i ekstrakta na humanim stanicama karcinoma grkljana (HEp2) i humanim stanicama karcinoma debelog crijeva (CaCo2)

3.2.4.1. Priprema uzoraka za određivanje bioloških učinaka na stanicama

Priprema čistih otopina bioaktivnih spojeva i njihove mješavine:

Ishodišne otopine bioaktivnih spojeva pripremljene su u koncentracijama od 0,2 gL^{-1}. Kvercetin je, zbog svoje slabe topljivosti u vodi, otopljen u DMSO-u. Askorbinska kiselina i karnitin otopljeni su u 1%-tnoj otopini NaOH radi podešavanja pH vrijednosti a lizin je otopljen u PBS puferu.

Radne koncentracije 0,01 – 0,2 mg mL^{-1} za kvercetin, odnosno 0,2 – 20 mgL^{-1} za askorbinsku kiselinu, lizin i karnitin pripremljene su razrjeđivanjem ishodišnih otopina u RPMI mediju za uzgoj stanica. Mješavine otopina bioaktivnih spojeva pripremljene su koristeći prethodno napravljena razrjeđenja pojedine koncentracije bioaktivnih spojeva tako da je koncentracija svakog pojedinačnog spoja u mješavini 0,2 – 20 mgL^{-1} , odnosno 0,01 – 0,2 mg mL^{-1} za kvercetin.

3.2.4.2. Određivanje citotoksičnosti čistih spojeva kvercetina, lizina, vitamina C, karnitina i njihove smjese te ekstrakta Neutral Red testom

Princip metode:

Jedan od najčešće korištenih testova citotoksičnosti je Neutral red (NR) test kojim se kvantitativno određuje broj živih stanica. Ovaj jednostavan test temelji se na svojstvu živih stanica da se, nakon inkubacije s ispitivanim ksenobioticima, Neutral red boja (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) unosi u stanice aktivnim transportom i veže se u lizosomima (Repetto i sur., 2008).

Ksenobiotici koji oštećuju staničnu ili lizosomalnu membranu smanjuju unos i zadržavanje boje. Stanice koje su djelovanjem istraživanog ksenobiotika oštećene, ne zadržavaju boju nakon ispiranja i procesa fiksacije (Babich i Borenfreund, 1991). Dakle, ako ne dođe do nakupljanja boje unutar lizosoma pretpostavlja se da je došlo do oštećenja stanice. Nakupljena boja u stanici se zatim ekstrahira i mjeri se apsorbancija pri 540 nm ekstrahirane boje koja je u direktnoj ovisnosti o broju stanica (Babich i Borenfreund, 1991).

Postupak rada:

Ishodišna otopina boje Neutral red potrebna za ispitivanje citotoksičnosti, otopi se u etanolu do konačne koncentracije od 5 mg mL^{-1} te inkubira 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, ishodišna otopina boje Neutral red spremna je za otopanje u mediju za uzgoj stanica, a prije nanošenja na stanice potrebno ju je filtrirati kako bi se uklonili neotopljeni dijelovi spoja. Suspenzije stanica obje stanične linije nasađuju se na prozirnu pločicu s 96

bunarića u koncentraciji od 10^5 stanica mL^{-1}. Sljedećeg dana, nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i nakon što je započela dioba stanica, stanice su tretirane s otopinama kvercetina (Q), askorbinske kiseline (C), lizina (L), karnitina (K) te otopinom mješavine sva četiri spoja (M). Stanice su tretirane s C, L i K u koncentracijama 0,2 - 20 mg mL^{-1} te s Q u koncentracijama 0,01 - 0,2 mg mL^{-1} (zbog svoje slabe topljivosti u mediju, za pripremu ishodne otopine Q korišten je DMSO, za C i K 1% NaOH, a L je otopljen u PBS puferu). Obje stanične linije tretirane su s pripremljenim koncentracijama spojeva, a kao kontrola koristio se medij. Tretman s uzorcima provodio se 1 sat u inkubatoru pri 37 °C. Nakon tretmana, uzorci se uklanjaju sa stanica te bunarići ispiru dva puta PBS-om. Na stanice se dodaje 0,1 mL radne otopine boje Neutral red (1:100) i inkubira 45 sat na 37°C. Nakon inkubacije lagano se uklanja otopina boje Neutral red i dodaje po 0,1 mL PBS-a dva puta u svaki bunarić kako bi se stanice isprale od ostatka boje.

Nakon drugog dodavanja PBS-a dodaje se 0,1 mL otopine za odbojavanje pri čemu dolazi do ekstrakcije Neutral reda iz lizosoma u otopinu za odbojavanje. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju preživjelih stanica, a određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 540 nm.

Izračun rezultata:

Postotak preživljenja stanica izračunava se usporedbom intenziteta obojenja u stanicama tretiranih s različitim koncentracijama Q, C, L, K te njihove smjese (M) i kontrolnih stanica (3).

$$\% \text{ preživljenja} = (A_{540}\text{ nm ekstrakata} / A_{540}\text{ nm kontrole}) \times 100\ \% \qquad (3)$$

Ispitivanje citotoksičnosti različitih koncentracija Q, C, L, K i M provedeno je u 2 paralelne probe (n=2), svaki eksperiment ponovljen je barem dva puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama, u postotcima (%).

3.2.4.3. Određivanje prooksidacijskog učinka kvercetina, vitamina C, lizina, karnitina te njihove smjese 2',7'-diklorofluorescein-diacetat fluorimetrijskim testom

Princip metode:

Za određivanje slobodnih radikala tj. ROS-a nastalih bazalnim metabolizmom ili metabolizmom ksenobiotika kojima su stanice izložene koristi se 2',7'-diklorofluorescein-diacetatfluorimetrijski test.

2',7'-diklorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) je neionski, nepolarni, nefluorescentni spoj koji difuzijom lako prolazi kroz staničnu membranu te se u citosolu stanica djelovanjem intracelularnih esteraza prevodi u nefluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCFH) (Wang i Joseph, 1999). Osjetljiv je na nekoliko slobodnih radikala i može biti oksidiran u vrlo fluorescentan 2′, 7′-diklorofluorescein (DCF). Mjeri se jačina fluorescencije koja ukazuje na nastanak oksidativnog stresa zbog prekomjernog nastanka slobodnih radikala ili trošenja antioksidansa bez specifične identifikacije istih (Marchesi i sur., 1999).

Postupak rada:

Ishodišna otopina DCFH-DA (2 mM) dobiva se otapanjem DCFH-DA u DMSO-u. Za tretman stanica iz ishodišne otopine potrebno je pripremiti u PBS-u 50 μM otopinu DCFH-DA (Silveira i sur., 2003).

Suspenzije stanica su nasađene na crne mikrotitarske ploče s 96 bunarića u koncentraciji od 10^5 st mL^{-1}. U svaki bunarić unosi se 0,1 mL stanične suspenzije. Sljedećeg dana, nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i nakon što je počela dioba stanica, uklanja se medij sa stanica. Stanice se tretiraju s 0,1 mL otopine C, L i K u rasponu koncentracija 0,2-20 mg mL^{-1} , te Q u rasponu koncentracija 0,01-0,2 mg mL^{-1} . Kao negativna kontrola korišten je medij. Nakon 1 sat inkubacije uklanjaju se dodani uzorci, a stanice ispiru dva puta s 0,1 mL PBS-a i tretiraju s 0,1 mL 50 μM otopine DCFH-DA i inkubiraju 30 minuta na 37 °C. S obzirom na to da je metoda osjetljiva na fotooksidaciju, otopina DCFH-DA priprema se neposredno prije korištenja (Wang i Joseph, 1999). Mjeri se intenzitet fluorescencije pri valnoj dužini ekscitacije od 485 nm i valnoj dužini emisije 520 nm.

Izračun rezultata:

Prooksidacijsko se djelovanje izračunava se kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljenja koji je izračunat u odnosu na negativnu kontrolu.

Ispitivanje prooksidacijskog djelovanja različitih koncentracija Q, C, L i K provedeno je u dvije paralelne probe (n=2), svaki je eksperiment ponovljen barem dva puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama, u postotcima (%).

3.2.5. Inkapsulacija mješavine kvercetina, vitamina C, lizina i karnitina

Inkapsulacija mješavine bioaktivnih spojeva provedena je formuliranjem hidrogel čestica od dvije vrste prirodnih biopolimera kao nosača različitih funkcionalnih i kemijskih svojstava: **alginata niske viskoznosti** (**A**) i **etil-celuloze** (**EC**). Inkapsulacija odnosno formuliranje čestica provedeno je primjenom tehnika ionskog geliranja alginata s kalcijevim ionima prema postupku opisanom u radu Belščak-Cvitanović i suradnika (2011) ili metodom separacije faza u slučaju primjene etil-celuloze. Iz navedenih polimera pripremljena su 4 različita sustava tj. vrsta čestica i to:

- 2 kontrolna sustava nosača s inkapsuliranim kvercetinom (A_{kont} i EC_{kont}) te
- 2 sustava s razvijenom mješavinom kvercetina, lizina, karnitina i askorbinske kiseline (A_M i EC_M).

Za inkapsulaciju u alginatni hidrogel i pripremu alginatnih čestica pripremljena je otopina nosača otapanjem 1 g alginata i 50 mg kvercetina u 25 mL destilirane vode (za kontrolne čestice – A_{kont}). Za inkapsulaciju mješavine bioaktivnih spojeva s mješavinom uzoraka (A_M), otopina nosača pripremljena je otapanjem 1 g alginata, 50 mg kvercetina, 0,5 g lizina, 0,5 g karnitina i 0,5 g askorbinske kiseline u 25 mL destilirane vode. Otopina za geliranje pripremljena je otapanjem 1g kalcijevog klorida u 50 mL destilirane vode i 50 mg kvercetina. Formiranje alginatnih čestica tehnikom ionskog geliranja provedeno je ukapavanjem otopine nosača (25 mL) pomoću plastične šprice i igle od 20 G (unutrašnji promjer ~ 300-500 μm) u prethodno pripremljenu otopinu za geliranje na magnetskoj miješalici.

Za pripremu kontrolnih etil-celuloznih mikročestica (EC_{kont}), te čestica s mješavinom bioaktivnih spojeva (EC_M), otopina nosača pripremljena je otapanjem 2.5 g etil-celuloze i 0,5 g kvercetina u 20 mL acetona i 20 mL etil-acetata. Medij za formiranje čestica pripremljen je otapanjem 10 g karnitina, 10 g lizina, 10 g askorbinske kiseline u 500 mL destilirane vode uz dodatak 1 mL emulgatora (Tween 80). Za kontrolne čestice korištena je samo destilirana voda i emulgator. Formiranje etil-celuloznih mikročestica provedeno je ukapavanjem otopine nosača (40 mL) pomoću plastične šprice u prethodno pripremljen medij za formiranje čestica, te miješanjem do potpunog isparavanja organskog otapala pod strujom cirkulirajućeg zraka (digestor).

Prilikom oba postupka inkapsulacije ukapavanjem mješavine su miješane magnetskom miješalicom, pri čemu je dolazilo do očvršćivanja kapi u čestice sfernog oblika, bilo usred

umrežavanja djelovanjem kalcijevih iona (alginat) ili usred isparavanja organske faze (etil celuloza). Nakon formiranja čestica, čestice su ostavljene u otopini za geliranje ili emulziji cca. 30 min, nakon čega su formirane čestice izdvojene iz otopine filtriranjem i ispiranjem destiliranom vodom.

3.2.6. Karakterizacija formuliranih čestica s inkapsuliranim bioaktivnim spojevima

3.2.6.1. Morfološke karakteristike formiranih čestica

U cilju određivanja oblika i strukture alginatnih i etil-celuloznih čestica provedeno je snimanje hidrogel čestica optičkim mikroskopom AM413T5 (Dino-lite Pro, Taiwan) uz odgovarajuće povećanje (1 - 40x).

3.2.6.2. Određivanje parametara raspodjele veličine čestica

Veličina proizvedenih čestica odn. raspodjela veličine čestica dobivenih inkapsulacijom, određena je primjenom analitičkih opcija softvera optičkog mikroskopa u slučaju alginatnih čestica ili je analizirana laserskom difrakcijom, korištenjem laserskog analizatora veličine čestica Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, Velika Britanija), u slučaju etil-celuloznih mikročestica.

Analiza veličine čestica temelji se na činjenici da čestice prilikom prolaska kroz izvor svjetlosti (lasersku zraku) raspršuju svjetlost pod određenim kutevima koji izravno ovise o veličini čestica. Laserska zraka ulazi u radnu ćeliju pod kutem od 0,02° do 140° te omogućuje određivanje veličine čestica u rasponu od 0,2 do 2000 μm. Uređaj za lasersku difrakciju opremljen je jedinicom za tekuću disperziju Hydro 2000S, te je uzorak prilikom mjerenja dodan u vodeni medij u kojem je provedeno ultrazvučna disperzija za ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Zasićenje laserske zrake je podešeno na 2-6%, a za svaki uzorak provedena su tri paralelna mjerenja. Parametar raspodjele veličine čestica korišten u slučaju etil-celuloznih mikročestica bio je d(0,5) odn. medijan veličine čestica koji označava promjer čestica za koji vrijedi da 50% ukupnog broja čestica ima promjer manji od tog promjera.

3.2.6.3. Određivanje učinkovitosti inkapsulacije kvercetina, vitamina C, lizina i karnitina

Udio inkapsuliranih spojeva imobiliziran u alginatnim i etil-celuloznim česticama određen je analizom usitnjenih otopljenih čestica pomoću HPLC-a i spektrofotometra. Za određivanje kvercetina otapanje je rađeno u metanolu, a za određivanje aminokiselina i askorbinske kiseline otapanje je rađeno u 1%-tnoj metafosfornoj kiselini (MPA). Udio kvercetina u otopini usitnjenih čestica određen je HPLC analizom, dok je udio aminokiselina i askorbinske kiseline određen spektrofotometrijskim metodama.

3.2.6.4. Određivanje udjela kvercetina u ekstraktima tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Princip metode:

Kod kromatografije obrnutih faza (RP-HPLC) stacionarna faza je nepolarna dok je mobilna faza polarna. Odvajanje analita temelji se na hidrofobnim interakcijama između polarnog eluensa, relativno nepolarnog analita i nepolarne stacionarne faze.

Postupak rada:

Analiza kvercetina u pripremljenim ekstraktima provedena je kromatografijom obrnutih faza na ACE C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) koloni (nepolarna stacionarna faza), eluacijom polarnim otapalima na temelju različitosti u polarnosti pojedinih komponenata. Razdvajanje komponenata postignuto je uspostavljanjem linearnog gradijenta dolje navedenog sastava mobilne faze u vremenu kako slijedi:

Mobilna faza: A - 0,1% *o*-fosforna kiselina u vodi
B – 0,1% *o*-fosforna kiselina u metanolu
Gradijent: 0 min: 10% mobilne faze B
30 min: 100% mobilne faze B
Protok: 1 mL min^{-1}
Temperatura kolone: 25°C
Duljina trajanja analize: 30 min + 5 min (uspostavljanje početnog sastava mobilne faze).

Identifikacija i kvantifikacija detektiranih spojeva:

Razdvojene komponente detektirane su pomoću Diode Array Detector-a pri valnim duljinama od 190 do 400 nm, uz rezoluciju od 1,2 nm. Detekcija spojeva provedena je snimanjem eluata na valnoj duljini 278 nm (UV područje) pomoću PDA detektora, pri čemu su dobiveni karakteristični kromatogrami. Usporedbom vremena zadržavanja (Rt) izdvojenih pikova na kromatogramima s vremenom zadržavanja vanjskog standarda kvercetina te usporedbom s UV-spektrom standarda identificirani su spojevi na kromatogramu. Kvantitativna determinacija kvercetina omogućena je korištenjem jednadžbe baždarnog pravca standarda. Poseban software Chem32 Chromatography Workstation omogućio je prikupljanje i obradu podataka dobivenih HPLC analizom.

Pomoću baždarnog pravca kvercetina, iz vrijednosti dobivenih površina (nakon integracije) identificiranog pika u kromatogramima ekstrakata, izračunata je pripadajuća koncentracija kvercetina. HPLC analize provedene su u duplikatu, a udjel kvercetina izražen kao srednja vrijednost s pripadajućom standardnom devijacijom.

3.2.6.5. Određivanje udjela askorbinske kiseline u ekstraktima – DCPIP metoda

Princip metode:

Ova metoda temelji se na redukciji 2,6-diklorofenolidnofenol (DCPIP) boje i praćenju smanjenja apsorpcije pri 520 nm. U oksidiranom stanju DCPIP je plave boje, dok redukcijom dolazi do obezbojenja (Omaye i sur., 1979).

Postupak rada:

Za pripremu radne otopine reagensa, pripremi se otopina 2,6-diklorofenolidnofenola (DCPIP) koncentracije 0,25 g L^{-1} u vrućoj vodi s natrijevim hidrogenkarbonatom u koncentraciji od 0,21 g L^{-1}. U epruvetu se otpipetira po 4,5 mL pripremljenog DCPIP reagensa i 0,5 mL uzorka. Nakon 30 minuta po dodatku DCPIP reagensa mjeri se apsorbancija pri 515 nm, uz 4,5 mL destilirane vode za prvu slijepu probu i 4,5 mL MPA za drugu slijepu probu.

Izračun rezultata:

Oduzimanjem izmjerene apsorbancije uzoraka od apsorbancije slijepe probe dobiva se vrijednost ΔA. Koncentracija askorbinske kiseline u uzorcima izračunava se pomoću

jednadžbe baždarnog pravca konstruiranog za standard askorbinske kiseline (4) koji prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mgL^{-1}):

$$y = 0{,}0021x - 0{,}0272 \quad (4)$$

gdje je:

x – koncentracija askorbinske kiseline (mgL^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 515 nm

Određivanje koncentracije askorbinske kiseline spektrofotometrijskom metodom pomoću DCPIP provedeno je u dvije paralelne probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja.

3.2.6.6. Određivanje udjela aminokiselina u ekstraktima

Princip metode:

Ova metoda temelji se na reakciji aminokiselina s ninhidrinom pri pH vrijednosti 4 – 8 pri čemu nastaje ljubičasto obojeni produkt diketohidrin. Reakcija se prati mjerenjem apsorbancije pri 570 nm (Friedman, 2004).

Postupak rada:

U epruveti se pomiješa 0,5 mL uzorka s 0,25 mL pripremljenog reagensa ninhidrina (2%) i 0,25 mL fosfatnog pufera (pH 8.0) te se mješavina inkubira u vodenoj kupelji 15 minuta. Prije mjerenja uzorci se ohlade te se doda 11,5 mL destilirane vode do postizanja ukupnog volumena od 12.5 mL. Tako pripremljenim uzorcima mjeri se apsorbancija na 570 nm. Najprije je potrebno izmjeriti apsorbanciju slijepe probe koja je pripremljena na isti način kao i uzorci samo što je umjesto uzoraka dodano 0,5 mL destilirane vode.

Izračun rezultata:

Koncentracija aminokiselina u ekstraktima izračunava se pomoću baždarnog dijagrama konstruiranog za standard L-glutaminske kiseline (5) koji prikazuje ovisnost apsorbancije (ΔA) o koncentraciji standarda (mgL^{-1}):

$$y = 0{,}0022x - 0{,}0785 \quad (5)$$

gdje je:

x – koncentracija standarda otopine glutaminske kiseline (mgL^{-1})

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 570 nm.

Određivanje koncentracije aminokiselina u ekstraktima provedeno je u dvije paralelne probe (n=2), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u mgL^{-1} ekstrakta.

3.2.6.7. Priprema otopina za istraživanje bioloških učinaka formuliranih hidrogel čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva na modelnim staničnim linijama

Nakon usitnjavanja alginatnih, odnosno etilceluloznih čestica pripremljene su ishodišne otopine, pri čemu je za ekstrakciju askorbinske kiseline korišten MPA, a za ekstrakciju kvercetina metanol. Koncentracija askorbinske kiseline u ishodišnoj otopini ekstrakta alginata bila je 343,1 mg AA/mL, odnosno 116 mg AA/mL ekstrakta dobivenog iz etil-celuloznih čestica. Koncentracija kvercetina dobivena ekstrakcijom iz alginatne čestice iznosila je 2192,8 mg Q/mL, odnosno 1133,6 mg Q/ mL dobivenog ekstrakcijom iz 1 g čestice etil-celuloze.

Iz ishodišnih otopina pripremljene su radne otopine kojima su tretirane stanice raka grkljana i debelog crijeva u rasponu:35 ng AA/mL – 34,3 mg AA/mL (ekstrakcija iz alginatnih čestica, odnosno 116 ng AA/mL – 11.6 ng AA/ mL (ekstrakcija iz etilceluloznih čestica). Koncentracije kvercetina kojima su bile izložene stanice, kretale su se u rasponu od: 2192 ng Q/mL – 219,28 mg Q/mL (ekstrakt iz alginatnih čestica). Što se tiče etil-celuloznih čestica, raspon koncentracija kvercetina bio je: 1120 ng/mL – 113,36 mg Q/mL. S obzirom da je izmjerena koncentracija kvercetina u kontrolnim česticama alginata i etil-celuloze slična (42,71 odnosno 42,65 mg/g čestica alginata tj. etil-celuloze), istražene su koncentracije kvercetina eluirane iz alginatnih odnosno etil-celuloznih čestica u rasponu 854,2 ng/mL – 85,42 mg/mL.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta odabranih čistih bioaktivnih spojeva; kvercetina, askorbinske kiseline, lizina i karnitina, te njihovih mješavina, u svrhu postizanja sinergističkog djelovanja i pojačane antioksidacijske aktivnosti konačnih mješavina s nutraceutskim djelovanjem. Kombinacija navedenih bioaktivnih spojeva, posebice askorbinske kiseline i kationskih aminokiselina (lizin, karnitin), primijenjena je u svrhu povećanja topljivosti lipofilnog polifenolnog antioksidansa kvercetina u hidrofilnom mediju. Biološka aktivnost čistih i mješavina bioaktivnih spojeva ispitana je određivanjem njihovog citotoksičnog i prooksidacijskog djelovanja na humane stanice raka grkljana (HEp2) i debelog crijeva (CaCo2). U svrhu očuvanja antioksidacijskih svojstava, provedena je inkapsulacija pripremljene sinergističke mješavine bioaktivnih spojeva u dvije vrste nosača te su karakterizirana fizikalno-kemijska i biološka svojstva formuliranih alginatnih i etil-celuloznih hidrogel čestica na ispitivanim staničnim linijama.

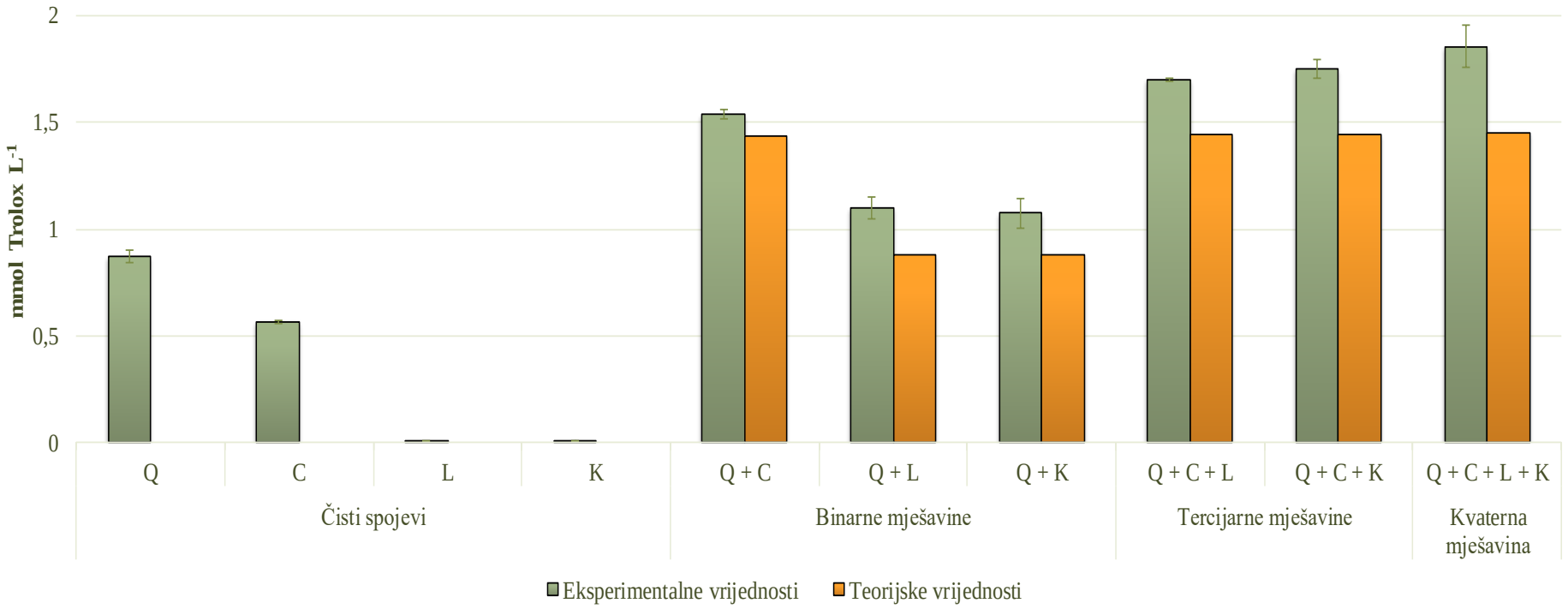
Preliminarna karakterizacija i usporedba antioksidacijskog kapaciteta čistih spojeva i njihovih mješavina provedena je spektrofotometrijskim ABTS i DPPH metodama, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 9 (metanolna otopina kvercetina i mješavina s potpunom topljivosti kvercetina) te slici 10 (vodene otopine čistih spojeva i njihovih mješavina).

Na temelju rezultata određivanja antioksidacijskog kapaciteta, čisti bioaktivni spojevi i njihova sinergistička mješavina koristili su se za ispitivanje preživljenja HEp2 i CaCo2 stanica Neutral red metodom (slike 11 i 12), i indukcije stvaranja slobodnih radikala 2',7'-DCFH-DA metodom (slike 13 i 14). Rezultati fizikalne karakterizacije formuliranih hidrogel i liofiliziranih alginatnih i etil-celuloznih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva prikazani su u Tablici 1, a u Tablici 2 prikazana je učinkovitost inkapsulacije te udjeli bioaktivnih spojeva u formuliranim hidrogel česticama. Na slikama 15-22 prikazani su rezultati djelovanja dobivenih alginatnih i etil-celuloznih hidrogel čestica s inkapsuliranom sinergističkom mješavinom na stanice, pripremljenih u dva različita otapala.

Na slikama 15 i 16 prikazan je citotoksični učinak, a na slikama 17 i 18 prooksidacijski učinak formuliranih etil-celuloznih (EC) i alginatnih čestica (A) otopljenih u metafosfornoj kiselini. Na slikama 19 i 20 prikazan je citotoksični učinak, a na slikama 21 i 22 prooksidacijski učinak formuliranih etil-celuloznih (EC) i alginatnih čestica (A) otopljenih u metanolu.

.

4.1. PRELIMINARNA ANALIZA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ČISTIH SPOJEVA I NJIHOVIH MJEŠAVINA

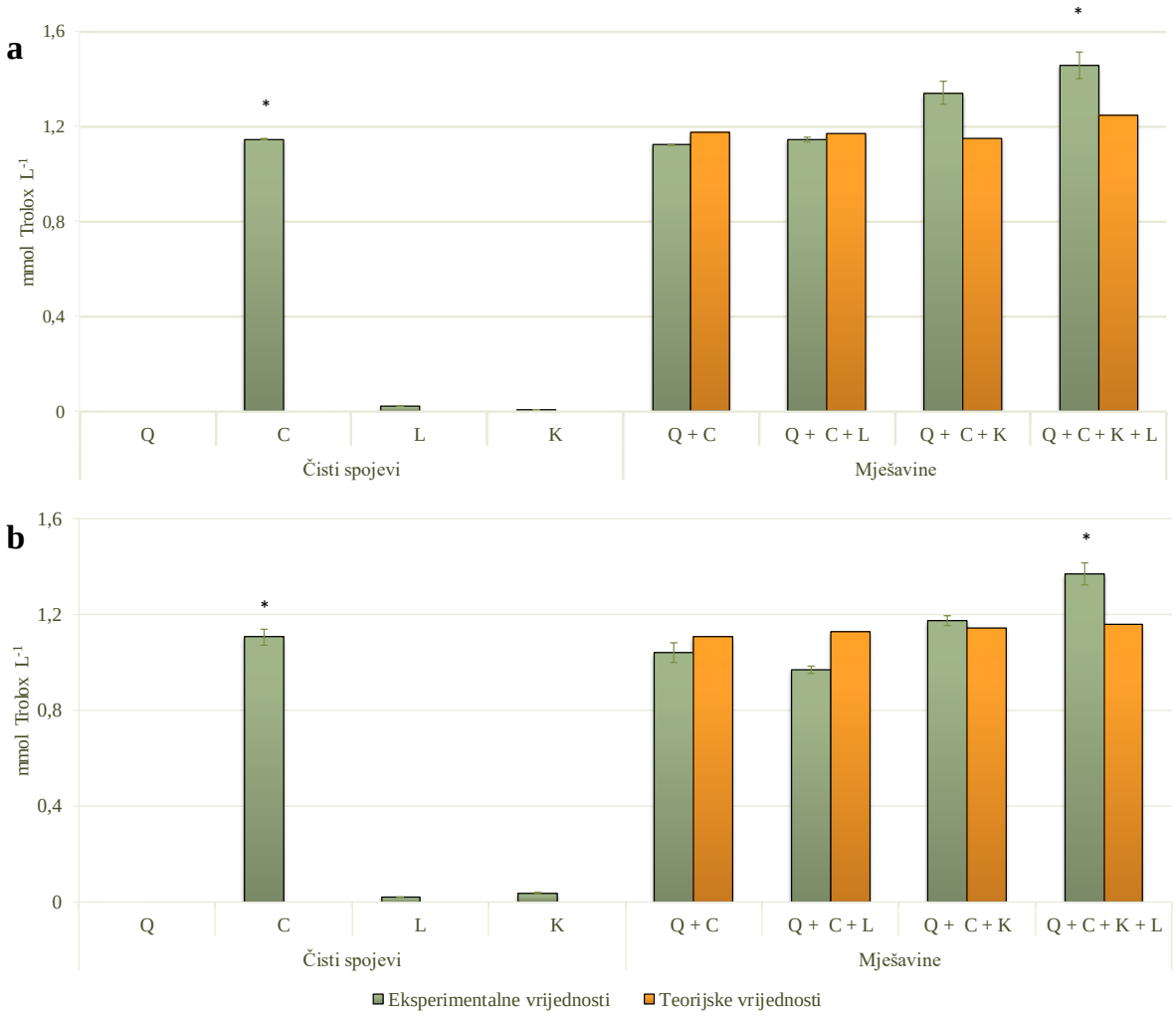


Q – kvercetin, C – askorbinska kiselina, L – lizin, K – karnitin

Slika 9. Antioksidacijski kapacitet određen ABTS metodom (mmol Trolox L^{-1}) metanolnih (kvercetin) i vodenih (askorbinska kiselina, lizin, karnitin) otopina bioaktivnih spojeva i njihovih mješavina

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom pokazalo je da između čistih spojeva najveći antioksidacijski kapacitet posjeduje metanolna otopina kvercetina (0,875 ± 0,003 mmol Trolox L^{-1}), nakon čega slijedi askorbinska kiselina (0,564 ± 0,007 mmol Trolox L^{-1}), dok aminokiseline pokazuju gotovo zanemariv antioksidacijski kapacitet u vodenim otopinama. S obzirom da je otopina kvercetina pripremljena u metanolu pokazala potpunu topljivost, ispitane su binarne i tercijarne mješavine metanolne otopine kvercetina te vodenih otopina drugih bioaktivnih spojeva (askorbinske kiseline, lizina, karnitina) pri čemu je vidljivo da je postignuto značajno povećanje antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na pojedine čiste spojeve.

Na slici 9 vidljivo je da su eksperimentalno dobivene vrijednosti binarnih, tercijarnih i kvaterne mješavine značajno veće od teorijskih vrijednosti (dobivenih kao zbroj antioksidacijskog kapaciteta čistih spojeva). Prema priloženim rezultatima antioksidacijskih kapaciteta binarnih mješavina može se primijetiti da mješavina kvercetina i askorbinske kiseline ima najveći antioksidacijski kapacitet (1,536 ± 0,021 mmol Trolox L^{-1}) u usporedbi s drugim binarnim mješavinama. Najveća razlika eksperimentalne i teorijske vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta binarnih mješavina vidljiva je kod mješavine kvercetina i lizina čija je eksperimentalna vrijednost (1,101 ± 0,051 mmol Trolox L^{-1}) 25,08 % veća od teorijske vrijednosti, dok mješavina kvercetina i karnitina (1,074 ± 0,07 mmol Trolox L^{-1}) pokazuje neznatno nižu razliku sa 22,02 % većom eksperimentalnom vrijednosti od teorijske. Ovaj efekt posebice je primjetljiv u slučaju formiranja tercijarnih i kvaternih mješavina. Od tercijarnih mješavina najveći antioksidacijski kapacitet pokazuje mješavina kvercetina, askorbinske kiseline i karnitina (1,752 ± 0,046 mmol Trolox L^{-1}) sa 21,19 % većom eksperimentalnom vrijednosti u odnosu na teorijsku. Kvaterna mješavina kvercetina, askorbinske kiseline, lizina i karnitina pokazuje najveći antioksidacijski kapacitet (1,857 ± 0,098 mmoL Trolox L^{-1}) u usporedbi sa svim mješavinama, koji je za 28,08 % veći u odnosu na teorijsku vrijednost.



* - između uzoraka označenih istom oznakom (*) nema statistički značajnih razlika ($p>0.05$)

Q – kvercetin, C – askorbinska kiselina, L – lizin, K – karnitin

Slika 10. Antioksidacijski kapacitet vodenih otopina čistih bioaktivnih spojeva i njihovih mješavina određen a) ABTS i b) DPPH metodama

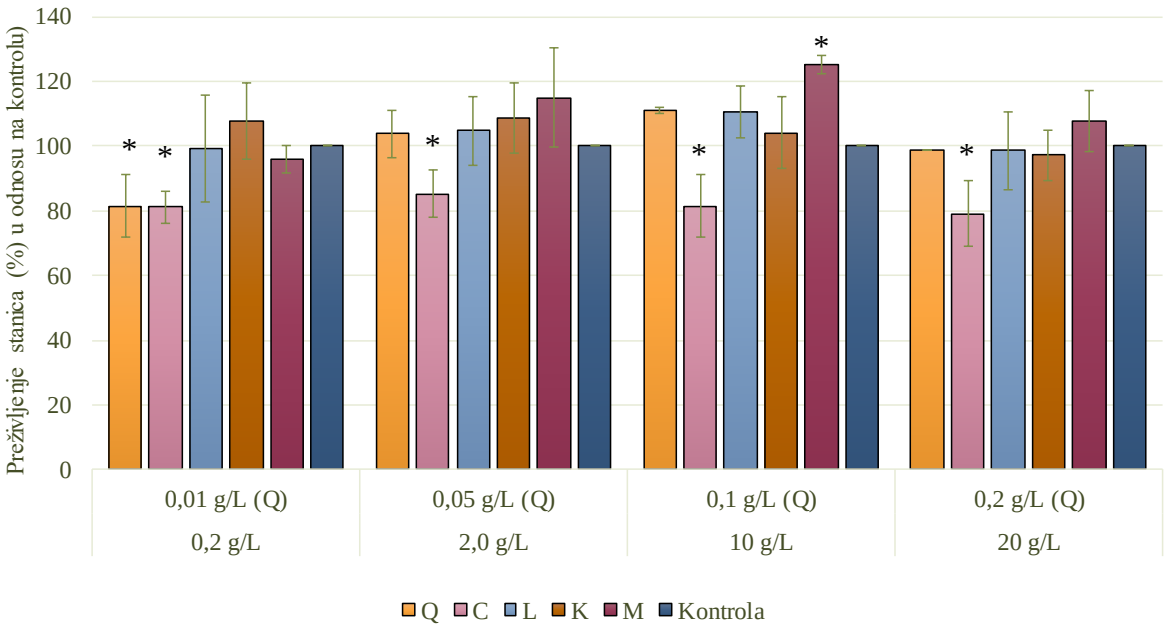
Zbog izražene toksičnosti metanola kao otapala (Paine i Dayan, 2001; Hamzeloo-Moghadam i sur., 2014) u kojem se postiže potpuna topljivost kvercetina, kako bi se izbjegla njegova primjena potrebno je primijeniti medij (otapalo) niske toksičnosti, prikladno za ljudsku upotrebu. S obzirom na lipofilna svojstva kvercetina i njegovu netopljivost u vodi, vodene otopine kvercetina nemaju sposobnost solubilizacije tog spoja, te je posljedično i antioksidacijski kapacitet takve otopine jednak nuli, kao što je vidljivo na Slici 10. U svrhu povećanja topljivosti kvercetina u vodenim otopinama te povećanja apsorpcije, prethodna istraživanja (Woude i sur., 2003; Chabane i sur., 2009) pokazala su kako se isto može postići promjenom pH vodene otopine, što je u ovom radu postignuto primjenom askorbinske

kiseline te kiselih aminokiselina (lizin, karnitin) u protoniranom stanju pri niskim pH vrijednostima. Postepenim formiranjem kombinacija mješavina ovih spojeva primijećene su neznatne razlike u antioksidacijskom kapacitetu u odnosu na čistu askorbinsku kiselinu, bez obzira na primijenjenu metodu određivanja antioksidacijskog kapaciteta (Slika 10 a,b). Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da antioksidacijski kapacitet mješavina bioaktivnih spojeva dominantno potječe isključivo od čiste askorbinske kiseline, dok prisutnost ostalih spojeva nema izraženiju ulogu i značajnije djelovanje na povećanje ovog parametra. Međutim, bez obzira na nedostatak značajnijih razlika u antioksidacijskom kapacitetu binarne (Q+C) ili tercijarnih (Q+C+L, Q+C+K) mješavina u odnosu na čistu askorbinsku kiselinu, eksperimentalni rezultati pokazali su statistički signifikantno povećanje antioksidacijskog kapaciteta kvaterne mješavine sva 4 navedena spoja (Q+C+L+K). Na taj način postignuto je značajno povećanje antioksidacijskog kapaciteta mješavine, što se može pripisati povećanoj topljivosti kvercetina u navedenom mediju, ali i sinergističkom djelovanju svih primijenjenih spojeva (povećanje antioksidacijskog kapaciteta eksperimentalnih rezultata u odnosu na teorijske vrijednosti). Potvrda o postizanju topljivosti kvercetina primijećena je već tijekom formiranja mješavina, što se očitovalo kao postizanje bistrih, prozirnih otopina kvercetina žute boje (u usporedbi s čistom vodenom otopinom kvercetina koja je neprozirna, koloidna suspenzija krutih čestica kvercetina u vodi). Izraženije povećanje antioksidacijskog kapaciteta mješavina u odnosu na čistu askorbinsku kiselinu nije postignuto zbog potrebnih radnji razrjeđivanja otopina vodom kako bi se postigla odgovarajuća koncentracija spojeva za analitičko mjerenje primijenjenim metodama za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (ABTS, DPPH) i njihovo podešavanje na radno područje navedenih metoda. Naime prilikom razrjeđivanja otopina mješavina bioaktivnih spojeva vodom, došlo je do promjene pH otopina (povećanje pH) što je rezultiralo smanjenjem topljivosti kvercetina i njegovom precipitacijom, te očiglednim taloženjem i smanjenjem topljivosti. Zbog nemogućnosti eliminacije ovog problema, prikazani su rezultati dobiveni brzom reakcijom i mjerenjem pri realnim uvjetima, koji su uspjeli dokazati povećanu topljivost i sinergističko djelovanje kvaterne mješavine, dok su realne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u slučaju nerazrjeđivanja otopina vjerojatno čak i značajnije veće.

S obzirom da su rezultati preliminarnog ispitivanja antioksidacijskog kapaciteta pokazali sinergistički potencijal mješavine spojeva u odnosu na čiste spojeve, provedena su određivanja antioksidacijskog/prooksidacijskog djelovanja i citotoksičnosti na staničnim linijama kako bi se sinergistički potencijal kvaterne mješavine dodatno dokazao.

4.2. BIOLOŠKI UČINCI ČISTIH BIOAKTIVNIH SPOJEVA I NJIHOVE MJEŠAVINE NA MODELNIM STANIČNIM LINIJAMA

4.2.1. Citotoksični učinak kvercetina, askorbinske kiseline, lizina, karnitina i njihove smjese na HEp2 i CaCo2 stanične linije



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 11. Preživljenje (%) HEp2 stanica u odnosu na kontrolu nakon tretmana s kvercetinom (Q) u rasponu koncentracija 0,01-0,2 gL^{-1}, s askorbinskom kiselinom (C), lizinom (L), karnitinom (K) te njihovom mješavinom (M) u rasponu koncentracija 0,2-20 gL^{-1}

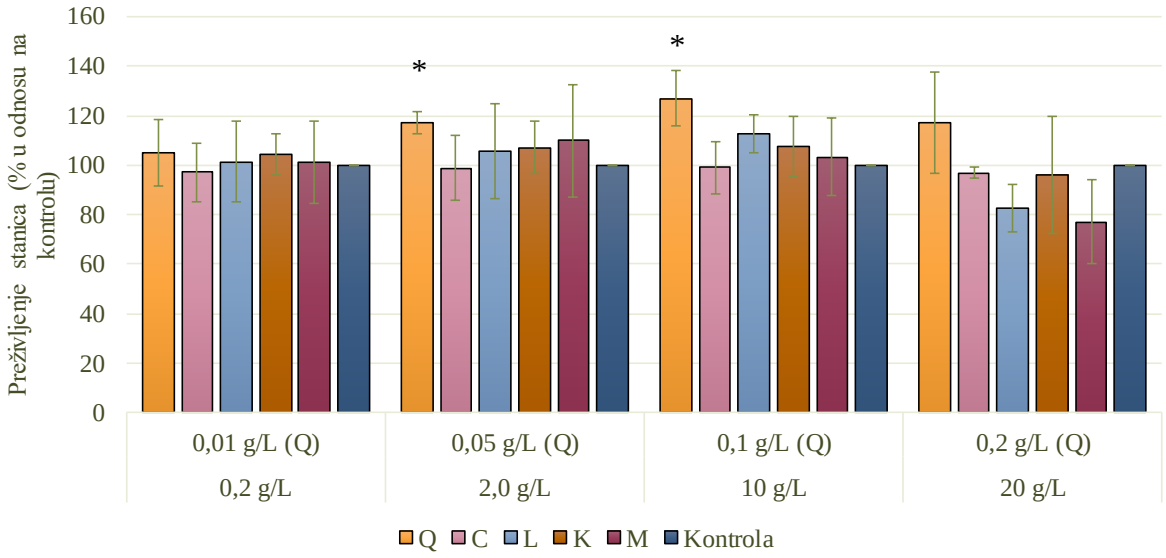
Prema rezultatima prikazanim na Slici 11, vidljiv je različit utjecaj tretmana pojedinim čistim bioaktivnim spojevima na preživljenje HEp2 stanica, u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji. Statistički signifikantno smanjenje preživljenja HEp2 stanica u odnosu na kontrolu primijećeno je samo nakon tretmana stanica najnižom koncentracijom kvercetina (0,01 gL^{-1}) te askorbinskom kiselinom. Međutim, askorbinska kiselina je pri svim koncentracijama (0,2 gL^{-1} - 20 gL^{-1}) statistički značajno smanjila preživljenje stanica u odnosu na kontrolu, što dokazuje značajan utjecaj ovog bioaktivnog spoja na preživljenje HEp2

stanica, bez obzira na koncentraciju. Slično djelovanje askorbinske kiseline pokazali su Chen i suradnici (2005, 2008) prema čijim istraživanjima koncentracije askorbata (anion askorbinske kiseline) manje od 5 mM mogu uzrokovati smanjenje preživljenja određenih staničnih linija, te da askorbinska kiselina djeluje citotoksično na 75% ispitivanih tumorskih staničnih linija. Utjecaj askorbinske kiseline na HEp2 stanice, u ovom radu, pokazao je statističku značajnost, međutim nije postignuto 50 %-tno smanjenje broja živih stanica premda su korištene visoke (1,13-113,6 mM) koncentracije. Za to bi moguće objašnjenje bilo kraće vrijeme tretmana stanica nego u drugim radovima te određivanje preživljenja stanica neposredno nakon tretmana bioaktivnim spojem, odnosno manje intenzivni uvjeti tretiranja stanica u ovom radu.

S obzirom na biološke učinke kvercetina na stanice, brojna istraživanja potvrdila su citotoksično djelovanje kvercetina, u ovisnosti o koncentraciji, pri koncentracijama višim od 10-50 μM na HEp2 (tretman u trajanju od 72h), A549 (tretman u trajanju od 24 sata) i HL-60 stanicama (Durgo i sur., 2007; Robaszkiewicz i sur., 2007; Sergediene i sur., 1999). Međutim, na HEp2 stanice u ovom radu, kvercetin (tretman u trajanju od 1h) nije djelovao citotoksično u doznoj ovisnosti, već samo pri najnižoj primijenjenoj koncentraciji (0,1 gL^{-1}). Također, u usporedbi s kontrolom, obje ispitivane aminokiseline, i lizin i karnitin, bez obzira na koncentraciju nisu pokazale značajan utjecaj na preživljenje HEp2 stanica.

Mješavina sva četiri čista bioaktivna spoja, za koju je preliminarnim ispitivanjima primjenom ABTS i DPPH metoda dokazan sinergistički učinak na antioksidacijski kapacitet, u odnosu na kontrolu nije pokazala značajan utjecaj na preživljenje HEp2 stanica, osim koncentracije od 10 gL^{-1} za koju je čak utvrđen i citoprotektivni učinak (statistički značajno povećanje preživljenja stanica u odnosu na kontrolu).

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako kombinacija navedenih bioaktivnih spojeva u primijenjenim koncentracijama nema značajan utjecaj na preživljenje HEp2 stanica. Premda bi s obzirom na pozitivan učinak smanjenja preživljenja stanica nakon tretmana askorbinskom kiselinom i kvercetinom, bilo očekivano pojačano djelovanje i daljnje smanjenje preživljenja stanica tretmanom sinergističkom mješavinom, rezultati upućuju da su navedeni pozitivni učinci vjerojatno potisnuti djelovanjem i kombinacijom drugih spojeva, najvjerojatnije aminokiselina koje mogu djelovati citoprotektivno na toksičnost uzrokovanu određenim spojevima (Endo i sur., 2002).



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 12. Preživljenje (%) CaCo2 stanica u odnosu na kontrolu nakon tretmana s kvercetinom (Q) u rasponu koncentracija 0,01-0,2 gL^{-1} te s askorbinskom kiselinom (C), lizinom (L), karnitinom (K) te njihovom mješavinom (M) u rasponu koncentracija 0,2-20 gL^{1}

Prema rezultatima određivanja preživljenja CaCo2 stanica (slika 12) nakon tretmana pojedinim čistim bioaktivnim spojevima, vidljiv je različit učinak primijenjenih koncentracija pojedinih spojeva na preživljenje. Statistički značajno povećanje preživljenja, u odnosu na kontrolu, vidljivo je samo kod stanica tretiranih s 0,05 i 0,1 gL^{-1} kvercetina. Mogući razlog povećanju preživljenja CaCo2 stanica nakon djelovanja kvercetina pri višim koncentracijama može biti njegovo antioksidacijsko djelovanje, no treba napomenuti da je taloženje kvercetina, koje je najviše bilo vidljivo pri većim koncentracijama, moglo uzrokovati pogreške pri mjerenju preživljenja Neutral red metodom. Tretman stanica s askorbinskom kiselinom, bez obzira na koncentraciju, nije pokazao značajan utjecaj na CaCo2 stanice u usporedbi s kontrolom. Isto tako, u usporedbi s kontrolom, aminokiseline lizin i karnitin nisu pokazale značajan utjecaj na CaCo2 stanice ni pri jednoj primijenjenoj koncentraciji.

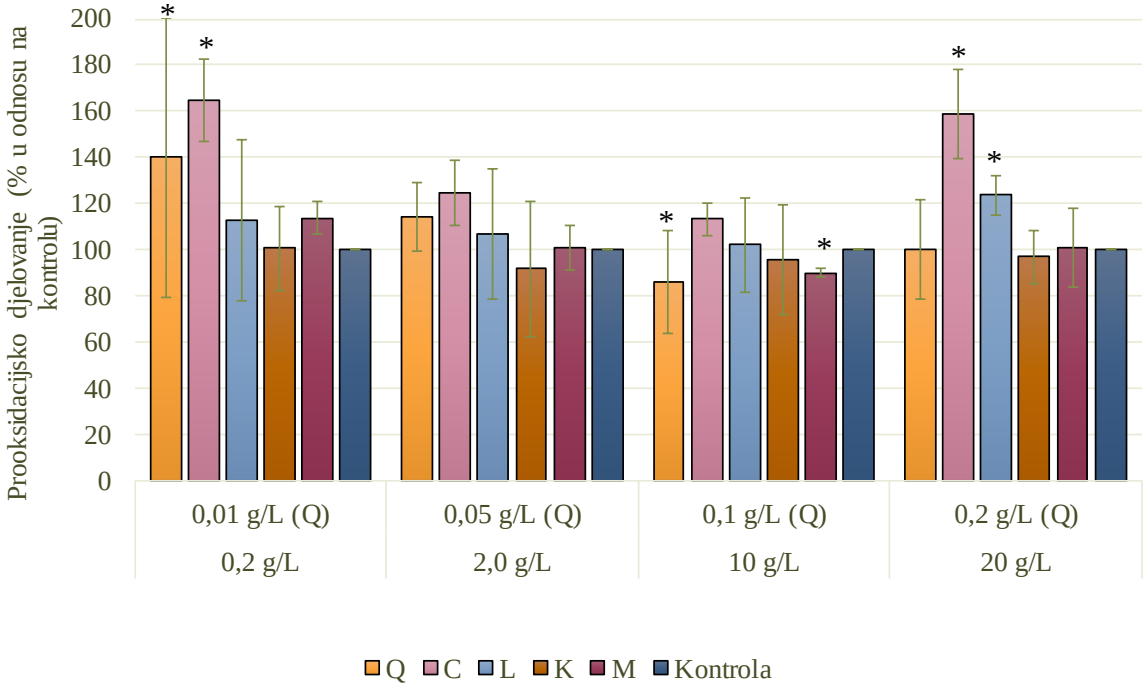
Usporedbom rezultata preživljenja dvije stanične linije, HEp2 i CaCo2 nakon tretmana ispitivanim čistim bioaktivnim spojevima i njihovom mješavinom može se primijetiti da su CaCo2 stanice manje osjetljive na djelovanje ispitivanih spojeva i mješavine u odnosu na HEp2 stanice (Slika 11) budući da nije došlo do smanjenja preživljenja stanica nakon tretmana bioaktivnim spojevima. Kod HEp2 stanica kvercetin je uzrokovao smanjenje

preživljenja stanica (što je zapaženo pri najmanjoj primijenjenoj koncentraciji), dok je na CaCo2 stanicama imao suprotan učinak, odnosno uzrokovao je povećanje preživljenja stanica. Prema tome, može se zaključiti da kvercetin pokazuje i antioksidacijsko i prooksidacijsko djelovanje s obzirom na vrstu tumorskih stanica te primijenjenu koncentraciju.

Robaszkiewicz i sur. (2007) pokazali su da niske koncentracije kvercetina (do 10 μM) nakon tretmana od 24 sata mogu uzrokovati blago povećanje preživljenja i proliferacije A549 stanica, dok više koncentracije (50-200 μM) uzrokuju citotoksičnost ovisnu o koncentraciji. Suprotno njihovim rezultatima, rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su da i tretman u trajanju od 1h s višim koncentracijama kvercetina (0,1 gL^{-1}, ekvivalentno 331 μM) može uzrokovati povećanje preživljenja, a ne citotoksičnost CaCo2 stanica. Manju osjetljivost CaCo2 stanica u odnosu na HEp2 i druge stanične linije pri istraživanju citotoksičnosti različitih spojeva, potvrdili su brojni radovi (Oteri i sur, 1998; Stammati i sur., 2005). Razlog manje osjetljivosti CaCo2 stanica može biti u manjoj metaboličkoj aktivnosti kao rezultat niske razine određenih izoformi citokroma P450 (Küblbeck i sur., 2016).

4.2.2. Prooksidacijski učinak kvercetina, askorbinske kiseline, lizina, karnitina i njihove smjese na HEp2 i CaCo2 stanice

Prema rezultatima određivanja formiranja reaktivnih kisikovih radikala (ROS) (Slika 13) ustanovljene su značajne fluktuacije i nejednolik učinak pojedinih spojeva na formiranje ROS s obzirom na primijenjene koncentracije. Kvercetin pri koncentraciji od 0,01 gL^{-1} pokazuje statistički značajno prooksidacijsko djelovanje, dok pri koncentraciji od 0,1 gL^{-1} pokazuje antioksidacijsko djelovanje na HEp2 stanice u odnosu na kontrolu. Kod askorbinske kiseline značajno prooksidacijsko djelovanje određeno je kod tretmana najmanjom (0,2 gL^{-1}) i najvećom koncentracijom (20 gL^{-1}), dok koncentracije od 2 i 10 gL^{-1}, kao i u slučaju kvercetina nisu imale značajan utjecaj na antioksidacijsko/prooksidacijsko djelovanje. Od ispitivanih aminokiselina, značajan učinak na HEp2 stanice imao je lizin kod kojega je najveća koncentracija (20 gL^{-1}) djelovala prooksidacijski u odnosu na kontrolu.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

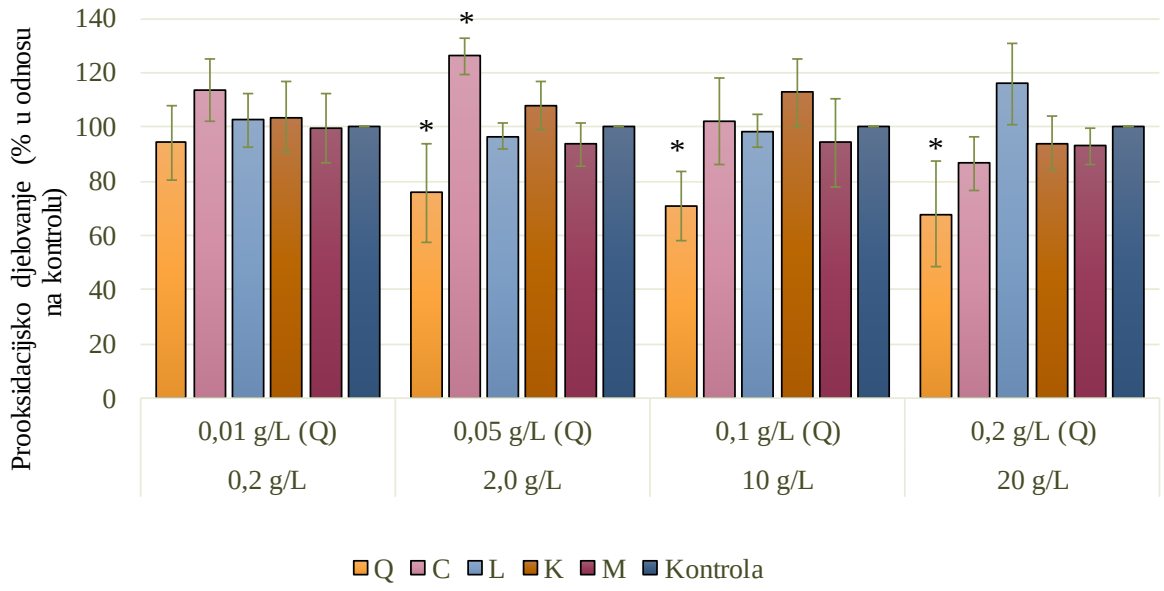
Slika 13. Prooksidacijsko djelovanje (%) različitih koncentracija čistih bioaktivnih spojeva kvercetina (Q), askorbinske kiseline (C), lizina (L), karnitina (K) i njihove mješavine (M) na HEp2 stanice. Stanice su tretirane s Q u rasponu koncentracija 0,01-0,2 gL^{-1} te C, L i K i M u rasponu koncentracija 0,2-20 gL^{-1}

Mješavina bioaktivnih spojeva pokazala je blago antioksidacijsko djelovanje na HEp2 stanice u koncentraciji od 10 gL^{-1} (odnosno, 0,1 gL^{-1} za kvercetin). Budući da čisti kvercetin pri koncentraciji istoj kao i u mješavini (0,1 gL^{-1}) djeluje antioksidacijski na HEp2 stanice, može se zaključiti da upravo on u mješavini uzrokuje smanjenje slobodnih radikala s obzirom da ostali spojevi ne pokazuju nikakvo (prooksidacijsko ni antioksidacijsko) djelovanje pri toj koncentraciji.

Chen i suradnici (2004) u svom radu ispitivali su sinergistički učinak askorbinske kiseline i kvercetina na HL-60 stanicama pri čemu su pokazali da askorbinska kiselina (1mM) povećava antitumorsko i antioksidacijsko djelovanje kvercetina smanjivanjem slobodnih kisikovih radikala (ROS). Sličan sinergistički utjecaj u ovom radu može se primijetiti kod djelovanja nižih koncentracija mješavine bioaktivnih spojeva, koje premda u usporedbi s kontrolom nemaju značajnog djelovanja na HEp2 stanice, u usporedbi s čistim spojevima

pokazuju da je došlo do smanjenja proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala koje su čisti kvercetin i askorbinska kiselina formirali pri istim koncentracijama.

S obzirom na mali broj ispitivanja citotoksičnog i antioksidacijskog djelovanja aminokiselina, pregledom postojeće literature nije pronađeno da aminokiseline, u ovom slučaju lizin, pokazuju prooksidativno djelovanje na stanične kulture.



* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 14. Prooksidacijsko djelovanje (%) različitih koncentracija čistih bioaktivnih spojeva kvercetina (Q), askorbinske kiseline (C), lizina (L), karnitina (K) i njihove mješavine (M) na CaCo2 stanice. Stanice su tretirane s Q u rasponu koncentracija 0,01-0,2 gL^{-1} te C, L i K i M u rasponu koncentracija 0,2-20 gL^{-1}

Prema rezultatima prikazanim na Slici 14, vidljiv je različit utjecaj tretmana pojedinim čistim bioaktivnim spojevima na formiranje kisikovih radikala (ROS) kod CaCo2 stanica, s obzirom na primijenjenu koncentraciju. Statistički značajno prooksidacijsko djelovanje pokazala je askorbinska kiselina u koncentraciji od 2 gL^{-1}. Suprotno od askorbinske kiseline, kvercetin je pokazao antioksidacijsko djelovanje, odnosno uzrokovao je statistički značajno smanjenje slobodnih kisikovih radikala u odnosu na kontrolu, i to u doznoj ovisnosti (0,05 gL^{-1}, 0,1 gL^{-1} i 0,2 gL^{-1}). Zanimljivo je da nijedna ispitivana koncentracija mješavine bioaktivnih spojeva nije pokazala nikakvo djelovanje (prooksidacijsko ni antioksidacijsko) na CaCo2

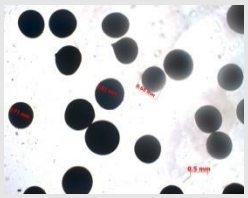
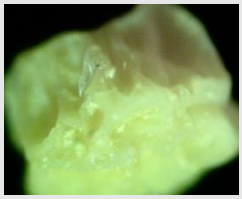
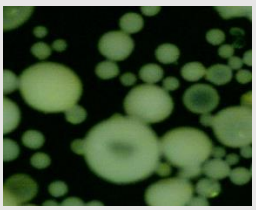
stanice s obzirom na određeno antioksidacijsko djelovanje kvercetina. Pri nižim ispitivanim koncentracijama razlog tome može biti da se antioksidacijsko djelovanje kvercetina i prooksidacijsko djelovanje askorbinske kiseline međusobno poništavaju.

Iz rezultata bioloških učinaka čistih spojeva i mješavina može se zaključiti da kvercetin pri koncentraciji 0,1 gL^{-1} ima antioksidacijsko djelovanje na HEp2 (Slika 13) i CaCo2 stanice (Slika 14) te posljedično pri toj koncentraciji povećava postotak preživljenja u odnosu na kontrolu kod obje stanične linije (slike 11 i 12). Usporedbom različitog dobivenog prooksidacijskog djelovanja askorbinske kiseline na obje stanične linije ne može se utvrditi povećanje proizvodnje ROS s obzirom na primijenjenu dozu. Kod ispitivanja indukcije proizvodnje slobodnih radikala askorbinskom kiselinom na staničnim linijama rezultati mogu varirati zbog prisustva Fe^{3+} ili Cu^{2+}u mediju za uzgoj stanica (Duarte i Lunec, 2005; Clement i sur.,2006; Mojić i sur., 2014).

4.3. KARAKTERIZACIJA FORMULIRANIH HIDROGEL ČESTICA S INKAPSULIRANOM MJEŠAVINOM BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Karakterizacija osnovnih fizikalno-kemijskih svojstava formuliranih alginatnih i etil-celuloznih čestica pokazala je da su primijenjenim tehnikama ionskog geliranja alginata te separacije faza u emulziji etil-celuloze u vodi dobivene hidrogel čestice pravilnog, sferičnog oblika. Između hidrogel kontrolnih čestica (samo s imobiliziranim kvercetinom), te čestica s imobiliziranom mješavinom svih bioaktivnih spojeva nije bilo razlike u morfološkim svojstvima i izgledu čestica, stoga su u Tablici 1 prikazane samo slike za pojedinu vrstu nosača. Osnovna razlika u morfološkim karakteristikama čestica, pokazala se nakon liofilizacije čestica, što je rezultiralo narušavanjem sferične strukture i izgleda alginatnih čestica (koje su u odnosu na pravilne etil-celulozne zadržanog sferičnog oblika) bile karakterizirane smežuranom, nepravilnom i narušenom površinskom strukturom. Takvo narušavanje strukture i sferičnosti alginatnih čestica proizvedenih ionskim geliranjem već je prethodno primijećeno u istraživanjima mnogih autora (Belščak-Cvitanović i sur., 2015; 2016) a posljedica je naglog gubitka vode i urušavanja mrežne strukture alginatnog gela nakon fizikalnih procesa koji se odvijaju tijekom postupka liofilizacije.

Tablica 1. Veličina čestica te mikroskopske fotografije hidrogel i liofiliziranih alginatnih i etil-celuloznih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva

	Veličina čestica	**Morfološki izgled čestica**	
	mm	*Povećanje 1x*	**Povećanje 4-10x*
A_{kont}	1,97 ± 0,05		
A_M	2,01 ± 0,12		
EC_{kont}	0,62 ± 0,07		
EC_M	0,52 ± 0,08		

$_{kont}$ – kontrolne čestice

$_M$ - čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva

* liofilizirane čestice

Osim navedenih morfoloških svojstava, osnovna razlika u formuliranim hidrogel česticama na bazi alginata i etil-celuloze, kao što se može vidjeti u Tablici 1 je veličina čestica. Naime, postupkom ionskog geliranja alginata proizvode se signifikantno veće čestice u odnosu na etil-celulozne čestice, koje su prema dobivenim rezultatima i do 4 puta manje u odnosu na alginatne čestice. S obzirom na veličinu alginatnih hidrogel čestica i do 2 mm, te značajno manju veličinu etil-celuloznih čestica (500-600 µm), prema uobičajenoj klasifikaciji inkapsuliranih čestičnih sustava po veličini, etil-celulozne čestice mogu se smatrati mikročesticama (< 1000 µm) a njihov postupak dobivanja postupkom mikroinkapsulacije (Nedović i sur., 2011). Međutim postupkom ionskog geliranja alginata, proizvedene su čestice homogene veličine, dok se postupkom mikroinkapsulacije etil-celuloze dobivaju čestice puno većeg raspona veličine čestica, odn. nehomogene raspodjele veličine čestica. Između kontrolnih čestica te čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva nije bilo značajne razlike u veličini istih.

Tablica 2. Inkapsulacijska učinkovitost i udjel kvercetina, askorbinske kiseline i aminokiselina u formuliranim hidrogel česticama

	Učinkovitost inkapsulacije kvercetin	**Sadržaj kvercetina**	**Učinkovitost inkapsulacije askorbinska kiselina**	**Sadržaj askorbinske kiseline**	**Učinkovitost inkapsulacije aminokiselina**	**Sadržaj aminokiselina**
	%	*mg g^{-1} čestica*	*%*	*mg g^{-1} čestica*	*%*	*mg g^{-1} čestica*
A_{kont}	56,82[a]	42,71 ± 0,09[b]	-	-	-	-
A_M	94,57	109,64 ± 0,25	51,28	17,15 ± 0,64	64,54	25,82 ± 1,14
EC_{kont}	61,17[a]	42,65 ± 0,34[b]	-	-	-	-
EC_M	57,89[a]	56,68 ± 0,12	21,07	5,80 ± 1,29	35,27	14,11 ± 0,74

$_{kont}$ – kontrolne čestice

$_M$ - čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva

* Isto slovo abecede (a-b) u pojedinoj koloni označava nesignifikantne razlike ($p>0.05$) između uzoraka

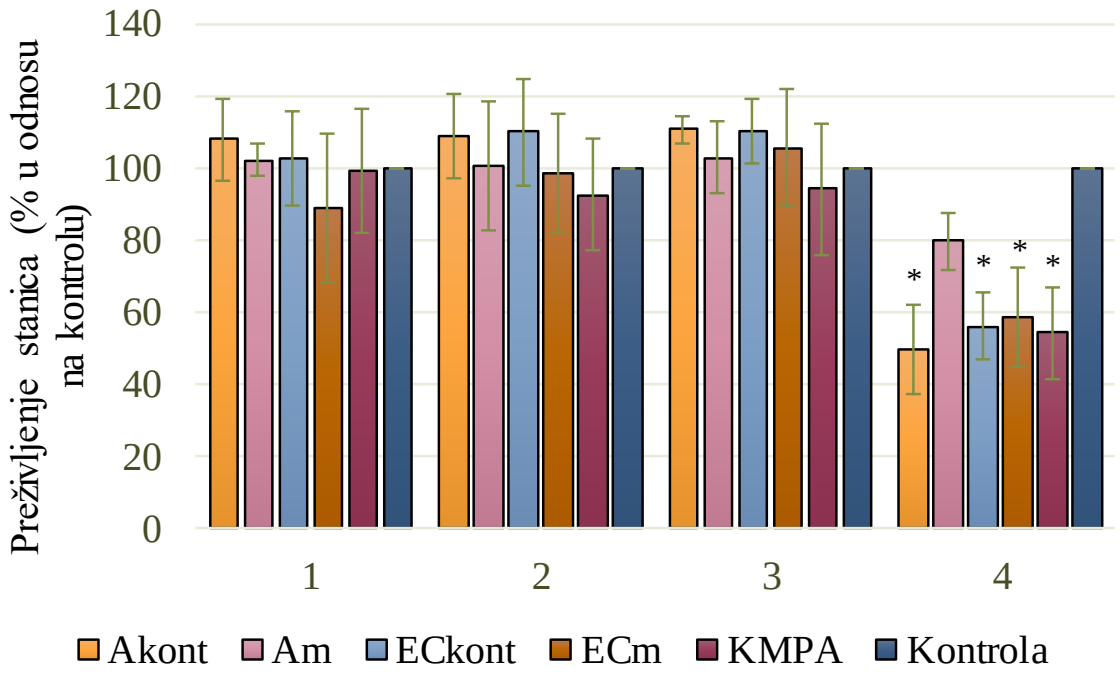
S obzirom na kemijska svojstva, odnosno učinkovitost zadržavanja aktivnih spojeva u hidrogel strukturi dva ispitivana sustava, prema rezultatima prikazanim u Tablici 2, vidljivo je da alginatne hidrogel čestice općenito pokazuju veću inkapsulacijsku učinkovitost svih bioaktivnih spojeva u odnosu na etil-celulozne mikročestice. U prosjeku je primjenom alginata kao nosača za inkapsulaciju postignuta 1,73x veća inkapsulacijska učinkovitost svih bioaktivnih spojeva (kvercetina, askorbinske kiseline i aminokiselina) u odnosu na etil-celulozne mikročestice s mješavinom bioaktivnih spojeva (EC_M). Osim toga, primijećeno je povećanje zadržavanja, odnosno inkapsulacijske učinkovitosti kvercetina prilikom inkapsulacije mješavine svih spojeva u odnosu na kontrolne čestice samo s kvercetinom. Tako pripremljene alginatne čestice s mješavinom bioaktivnih spojeva (A_M) pokazuju značajno veću učinkovitost inkapsulacije kvercetina (94,57 %) te veći udjel kvercetina (109,64 ± 0,25 mg g^{-1} čestica) u usporedbi s odgovarajućim kontrolnim česticama (A_{kont}) i etil-celuloznim hidrogel mikročesticama. Etil-celulozne mikročestice, bez obzira na povoljnija morfološka svojstva i manju veličinu čestica, što bi moglo pokazati povoljan učinak na biološka svojstva tog inkapsuliranog sustava, pokazale su značajno manju inkapsulacijsku učinkovitost pojedinih bioaktivnih spojeva u odnosu na alginatne čestice.

4.4. BIOLOŠKI UČINCI FORMULIRANIH HIDROGEL ČESTICA S INKAPSULIRANOM MJEŠAVINOM BIOAKTIVNIH SPOJEVA NA MODELNIM STANIČNIM LINIJAMA

Rezultati citotoksičnog i pro/antioksidativnog djelovanja eluata hidrogel čestica dobiveni su nakon tretmana stanica raka grkljana i debelog crijeva s pripremljenim otopinama u rasponu: 35 ng AA/mL (1) – 34,3 mg AA/mL (4) (ekstrakcija iz alginatnih čestica, odnosno 116 ng AA/mL (1) – 11.6 ng AA/ mL (4) (ekstrakcija iz etil-celuloznih čestica).

Koncentracije kvercetina kojima su bile izložene stanice, kretale su se u rasponu od: 2192 ng Q/mL (1) – 219,28 mg Q/mL (4) (ekstrakt iz alginatnih čestica). Što se tiče etil-celuloznih čestica, raspon koncentracija kvercetina bio je: 1120 ng/mL (1)– 113,36 mg Q/mL (4). Eluati kontrolnih alginatnih i etil-celuloznih čestica istraženi su u rasponu 854,2 ng/mL (1) – 85,42 mg/mL (4).

4.4.1. Citotoksični učinak etil-celuloznih i alginatnih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva na HEp2 i CaCo2 staničnim linijama



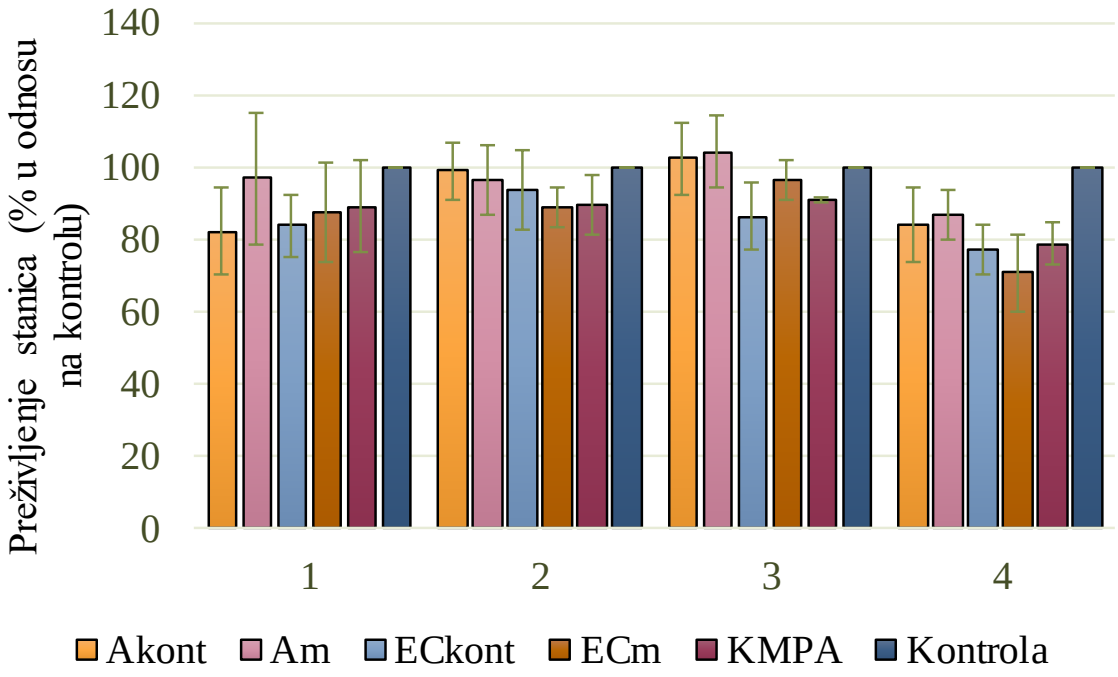
kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMPA – kontrola s metafosfornom kiselinom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 15. Preživljenje (%) HEp2 stanica nakon tretmana s različitim koncentracijama etil-celuloznih (EC) i alginatnih čestica (A) bioaktivne mješavine otopljenih u 1%-tnoj metafosfornoj kiselini (MPA)

Kako bi se utvrdio biološki učinak formuliranih čestica na humanim modelnim staničnim linijama, proizvedene čestice su dezintegrirane te ekstrahirane otopinom metafosforne kiseline i metanola u svrhu solubilizacije inkapsuliranih spojeva i ispitivanja njihovog djelovanja na modelnim staničnim linijama.

Prema rezultatima prikazanim na Slici 15, vidljivo je da statistički značajno smanjenje preživljenja HEp2 stanica u odnosu na negativnu kontrolu pokazuju najveće koncentracije etil-celuloznih mikročestica EC_M (58,81 ± 13.85 %) i EC_{kont} (56,05 ± 9.37 %) te alginatne kontrolne čestice A_{kont} (49,77 ± 12,68 %). Međutim, s obzirom da pozitivna kontrola s MPA (K_{MPA}) također pokazuje statistički značajno smanjenje preživljenja, čak 54,29 ± 12,9 %,

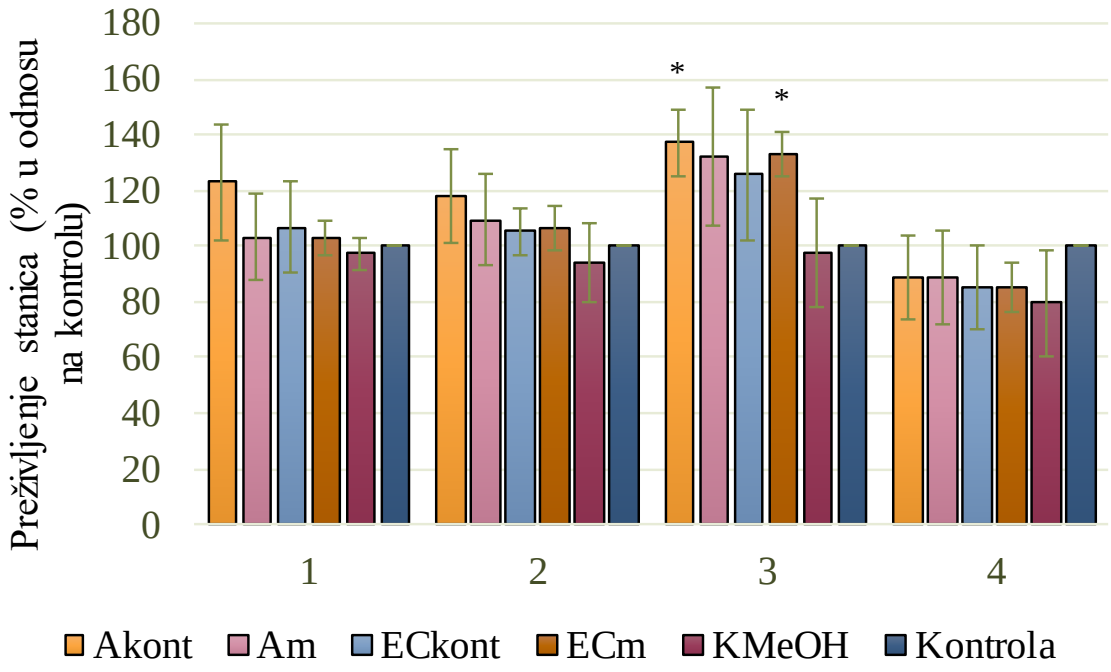
ovakav rezultat upućuje da metafosforna kiselina u najvećim ispitivanim koncentracijama djeluje citotoksično na HEp2 stanice zbog čega je upitna citotoksičnost $EC_{M,}$ EC_{kont} i A_{kont} pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji. Unatoč citotoksičnosti metafosforne kiseline pri najvećoj koncentraciji, stanice tretirane s A_M pokazuju najveći postotak preživljenja u usporedbi s ostalim česticama što je najvjerojatnije rezultat većeg udjela inkapsuliranih spojeva (Tablica 2) koji djeluju citoprotektivno na HEp2 stanice.



kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMPA – kontrola s metafosfornom kiselinom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 16. Preživljenje (%) CaCo2 stanica nakon tretmana s različitim koncentracijama etil-celuloznih (EC) i alginatnih čestica (A) bioaktivne mješavine otopljenih u 1%-tnoj metafosfornoj kiselini (MPA)

Tretiranje CaCo2 stanica, metafosfornom otopinom formuliranih čestica nije pokazalo statistički značajne razlike u preživljenju stanica bez obzira na primijenjene koncentracije i vrstu čestica (Slika 16). Iako se može primijetiti blago povećana citotoksičnost uslijed najveće korištene koncentracije čestica, posebice etil-celuloznih mikročestica (EC_{kont} i EC_M) ovakav rezultat može se pripisati citotoksičnom djelovanju metafosforne kiseline (K_{MPA}).

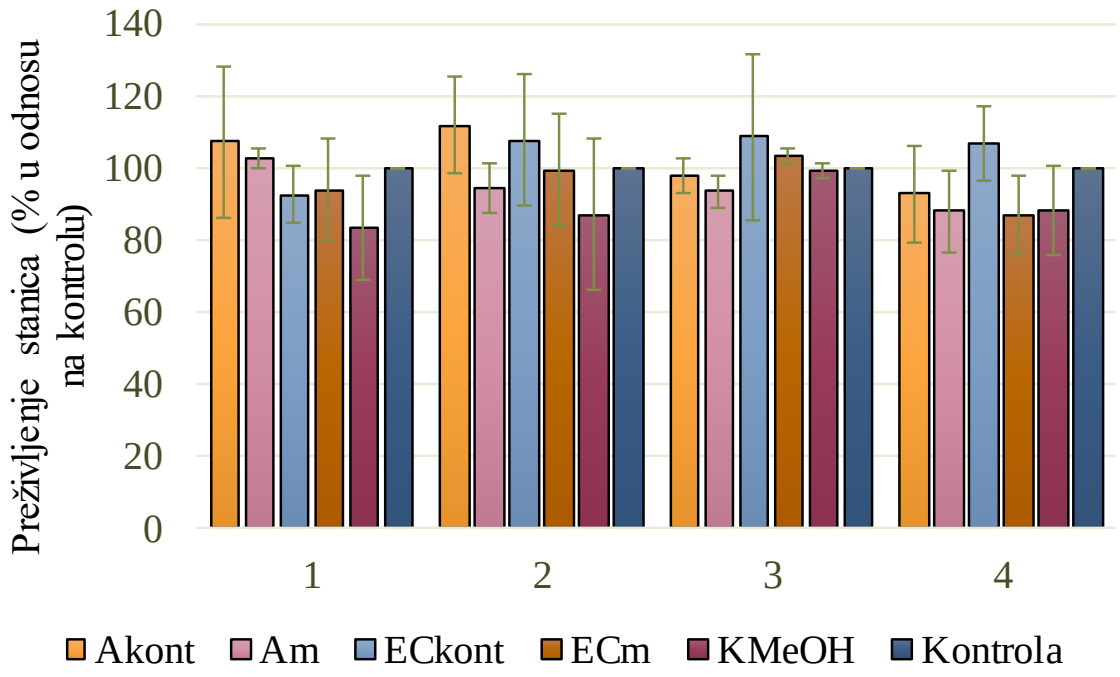


kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMeOH – kontrola s metanolom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 17. Preživljenje (%) HEp2 stanica nakon tretmana s različitim koncentracijama etil-celuloznih (EC) i alginatnih čestica (A) bioaktivne mješavine otopljenih u metanolu

U slučaju preživljenja HEp2 stanica tretiranih s metanolnim otopinama formuliranih čestica (Slika 17) primjetljivo je da dolazi do povećanja preživljenja HEp2 stanica nakon tretmana stanica otopinama koncentracije 3 (A_{kont} i EC_M), pri čemu kontrolne alginatne čestice ($A_{kont)}$ statistički značajno povećavaju preživljenje pri koncentraciji 3, dok pri najvećoj koncentraciji 4 uzrokuju blago smanjenje preživljenja u odnosu na kontrolu najvjerojatnije uslijed citotoksičnosti metanola pri toj koncentraciji (vidljivo prema K_{MeOH}). Isto tako, tretman stanica otopinom etil-celuloznih mikročestica (EC_M) u koncentraciji 3 također statistički povećava preživljenja stanica u odnosu na kontrolu. Usporedbom svih ispitivanih koncentracija otopljenih čestica, koncentracija 3 pokazala je povećanje preživljenja kod svih vrsta čestica (kontrolnih i s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva). Daljnje povećanje koncentracije čestica u otopini (koncentracija 4) uzrokovalo je smanjenje preživljenja odnosno povećanu citotoksičnost na HEp2 stanicama, što se može pripisati većim koncentracijama inkapsuliranih bioaktivnih spojeva pri toj koncentraciji. Takvi rezultati

upućuju na činjenicu da je potrebna veća doza (količina) mikročestica od onih primijenjenih u ovom radu kako bi se postigao citotoksičan učinak.

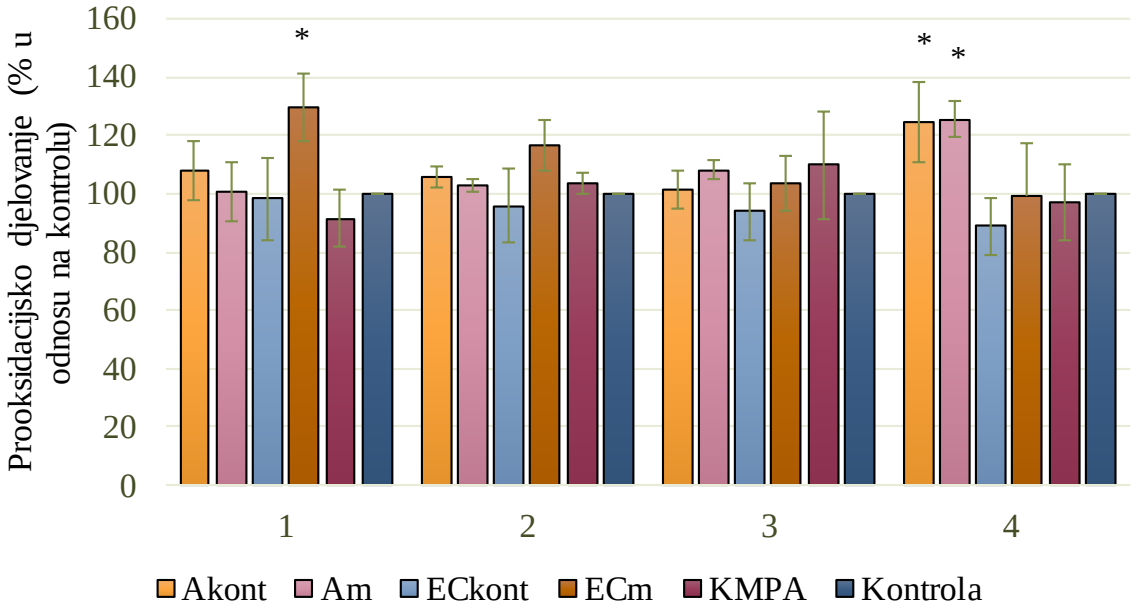


kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMeOH – kontrola s metanolom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 18. Preživljenje (%) CaCo2 stanica nakon tretmana s različitim koncentracijama etil-celuloznih (EC) i alginatnih čestica (A) bioaktivne mješavine otopljenih u metanolu

Metanolne otopine formuliranih alginatnih i etil-celuloznih čestica na CaCo2 stanicama (Slika 18) nisu imale značajan učinak na preživljenje. Blago povećanje preživljenja uzrokovale su EC_{kont} mikročestice pri koncetracijama 2, 3 i 4 te A_{kont} pri koncentraciji 2, no bez statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolu. Ovakvi rezultati već su prethodno primijećeni prilikom tretiranja CaCo2 stanica čistim bioaktivnim spojevima i njihovom mješavinom, gdje se već pokazalo kako CaCo2 stanice nisu toliko osjetljive na djelovanje ispitivanih bioaktivnih tvari kao i HEp2 stanična linija.

4.4.2. Prooksidacijsko djelovanje etil-celuloznih i alginatnih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva na HEp2 i CaCo2 staničnim linijama

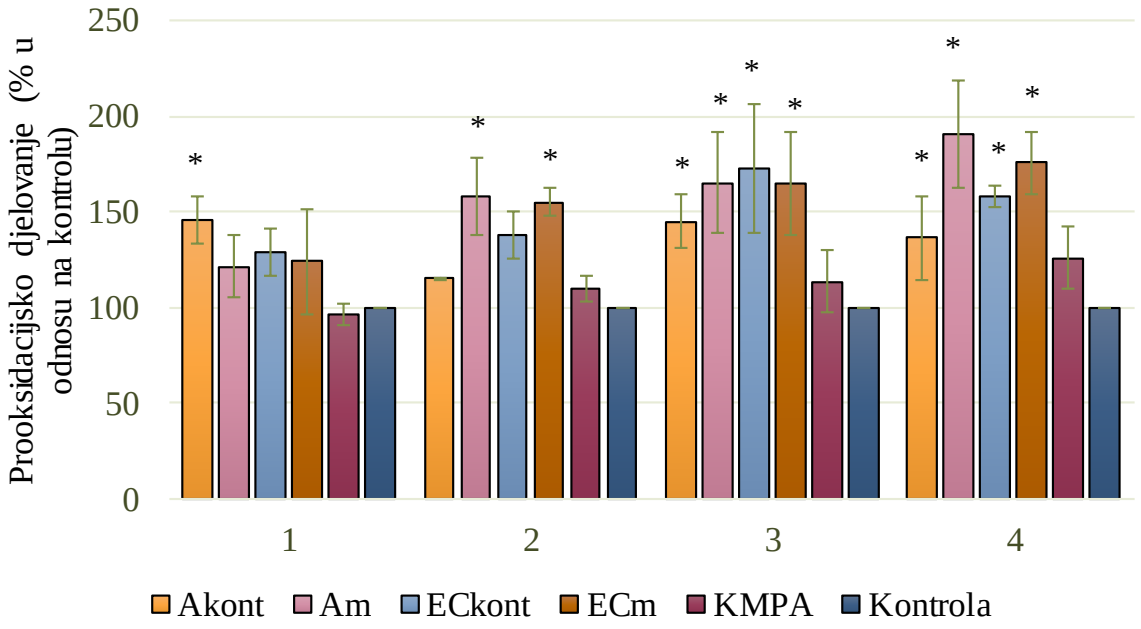


kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMPA – kontrola s metafosfornom kiselinom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 19. Prooksidacijsko djelovanje (% u odnosu na kontrolu) različitih koncentracija etil-celuloznih (EC) i alginatnih inkapsulata (A) bioaktivne mješavine otopljenih u metafosfornoj kiselini (MPA) na HEp2 stanice

Ispitivanje učinkovitosti generiranja reaktivnih kisikovih radikala odnosno antioksidacijskog/prooksidacijskog djelovanja otopina čestica u metafosfornoj kiselini na HEp2 stanicama (Slika 19) pokazalo je da pri koncentraciji 1 (najmanja koncentracija) etil – celulozne mikročestice ($EC_{M)}$ pokazuju statistički značajno prooksidativno djelovanje na HEp2 stanice, dok alginatne čestice (A_{kont} i $A_{M)}$ pokazuju statistički značajno prooksidativno djelovanje pri najvećoj koncentraciji (4).

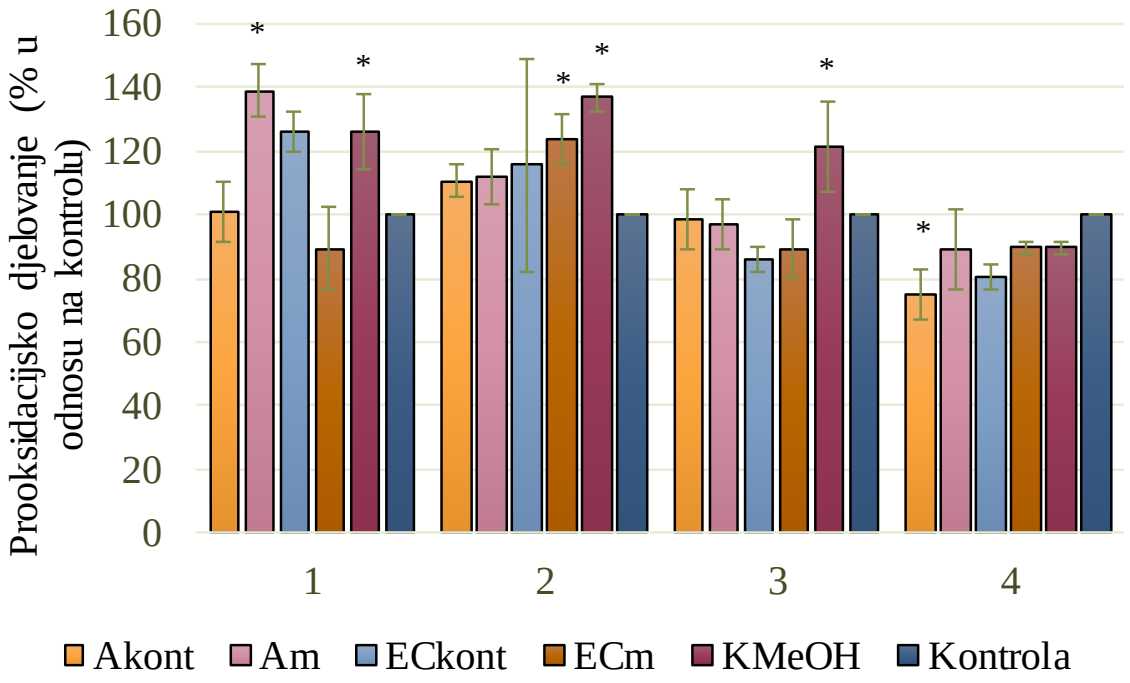
Za razliku od djelovanja na HEp2 stanicama, kod CaCo2 stanica (Slika 20) čestice pripremljene u metafosfornoj kiselini pokazale su značajno veće prooksidativno djelovanje u odnosu na kontrolu. Statistički značajno prooksidativno djelovanje pokazuju sve formulirane čestice u ovisnosti o koncentraciji.



kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMPA – kontrola s metafosfornom kiselinom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 20. Prooksidacijsko djelovanje (% u odnosu na kontrolu) različitih koncentracija etil-celuloznih (EC) i alginatnih inkapsulata (A) bioaktivne mješavine otopljenih u metafosfornoj kiselini (MPA) na CaCo2 stanice

Niti jedna koncentracija ispitivanih čestica nije uzrokovala smanjenje slobodnih radikala (antioksidacijsko djelovanje) kod CaCo2 stanica za razliku od ispitivanih čistih spojeva (Slika 14) kod kojih je kvercetin imao antioksidacijsko djelovanje u rasponu koncentracija 0,05-0,2 gL^{-1} (33,1-661,7 μM). Izraženiji prooksidativni učinak može se objasniti kompleksnim sastavom i raznovrsnošću svih sastojaka bioaktivnih spojeva zadržanih u mikročesticama, koje u kombinaciji s primijenjenim nosačima odnosno u inkapsuliranom obliku djeluju povoljno na povećanje formiranja reaktivnih kisikovih radikala. Razlog tome može biti prisustvo iona određenih metala koji su dospjeli u čestice putem procesa inkapsulacije, što je bio slučaj kod formuliranja alginatnih čestica korištenjem kalcijevih iona, uz određenu prisutnu koncentraciju iona metala u mediju dospjelu putem seruma.

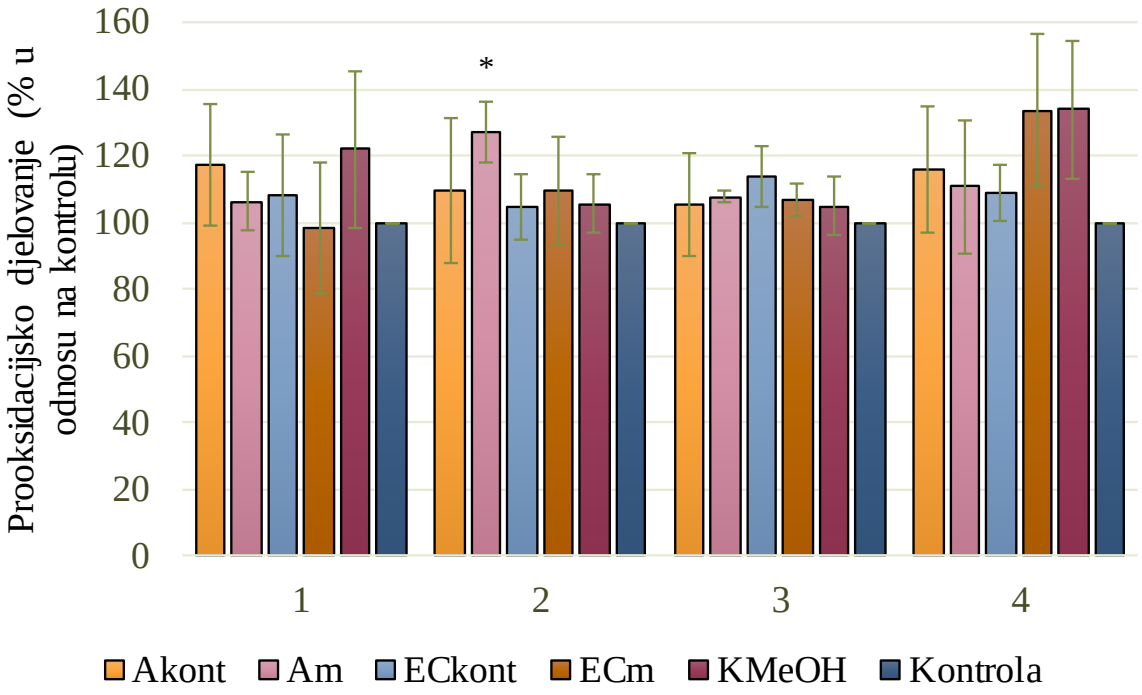


kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMeOH – kontrola s metanolom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 21. Prooksidacijsko djelovanje (%) na HEp2 stanice nakon tretmana s različitim koncentracijama etil-celuloznih (EC) i alginatnih inkapsulata (A) bioaktivne mješavine otopljenih u metanolu (MetOH)

Prilikom tretmana stanica metanolnim suspenzijama formuliranih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva, također je vidljiv izraženiji prooksidativni učinak mikročestica na HEp2 staničnoj liniji. Ovakav ishod, prema rezultatima prikazanim na slici 21, može se objasniti i povećanim prooksidativnim djelovanjem samog metanola kao otapala (K_{MeOH}). U slučaju tretmana HEp2 stanica metanolnim suspenzijama formuliranih čestica pri koncentracijama 1, 2 i 3 također je primijećeno povećano prooksidativno djelovanje, koje se pri koncentraciji 4 smanjuje, no u neznačajnoj razlici u odnosu na kontrolu. Kao i u slučaju tretmana stanica metafosfornom otopinom čestica, može se zaključiti da je potrebna veća koncentracija svih ispitivanih čestica, odnosno, veća koncentracija inkapsuliranih bioaktivnih spojeva za postizanje izraženijeg antioksidacijskog učinka. S obzirom na vrstu čestica, primijećeno je kako kontrolne alginatne čestice (A_{kont}) te

etil-celulozne mikročestice s mješavinom bioaktivnih spojeva (ECM) i pri najmanjoj (1) i pri najvećoj (4) koncentraciji imaju blago antioksidacijsko djelovanje (< u odnosu na kontrolu).



kont – kontrolne čestice
m- čestice s inkapsuliranom mješavinom spojeva
KMeOH – kontrola s metanolom
* - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$)

Slika 22. Prooksidacijsko djelovanje (%) na CaCo2 stanice nakon tretmana s različitim koncentracijama etil-celuloznih (EC) i alginatnih inkapsulata (A) bioaktivne mješavine otopljenih u metanolu (MetOH)

U slučaju tretmana CaCo2 stanica metanolnim otopinama formuliranih čestica (Slika 22), ponovno je primijećena manja osjetljivost ove modelne stanične linije na djelovanje aktivnih tvari u usporedbi s HEp2 stanicama. Bez obzira na primijenjenu koncentraciju, nisu postignute statistički značajne razlike u razini ROS (antioksidacijskom/prooksidacijskom) djelovanju svih vrsta čestica u odnosu na kontrolu. Kao iznimka može se izdvojiti samo statistički značajno prooksidativno djelovanje alginatnih čestica s inkapsuliranom mješavinom bioaktivnih spojeva (A_M) u odnosu na kontrolu pokazuje pri koncentraciji 2. Ovakve izražene fluktuacije i nedostatak statističke značajnosti među rezultatima upućuju na činjenicu da su za

izraženije biološko djelovanje na CaCo2 stanicama potrebne puno veće koncentracije čestica s inkapsuliranim spojevima, koje bi mogle izazvati povoljne metaboličke reakcije u stanicama. Dobiveni rezultati dijelom potvrđuju zaključke utvrđene prilikom ispitivanja citotoksičnog i antioksidacijskog/prooksidacijskog djelovanja čistih bioaktivnih spojeva i njihove sinergističke mješavine, s glavnim rezultatom koji upućuje na nedovoljan udjel, odnosno nedovoljnu inkapsulaciju učinkovitost aktivnih spojeva u primijenjenim sustavima nosača (alginat i etil-celuloza). U tom kontekstu, potrebna su daljnja istraživanja s ciljem optimizacije sustava nosača i postizanja većeg udjela inkapsuliranih spojeva kako bi se postigli zadovoljavajući biološki učinci.

5. ZAKLJUČCI

1. Od ispitivanih čistih bioaktivnih spojeva, polifenol kvercetin pokazuje najveći antioksidacijski kapacitet, nakon čega slijedi askorbinska kiselina, dok aminokiseline lizin i karnitin pokazuju zanemariv antioksidacijski kapacitet u vodenim otopinama.

2. Formuliranjem mješavina kvercetina i askorbinske kiseline u kombinaciji s aminokiselinama lizinom i karnitinom u vodenim otopinama, postiže se sinergistički učinak na povećanje antioksidacijskog kapaciteta mješavina.

3. Među čistim bioaktivnim spojevima, samo kvercetin i askorbinska kiselina pokazuju značajno djelovanje, dok aminokiseline lizin i karnitin nemaju citotoksično i antioksidacijsko/prooksidacijsko djelovanje na HEp2 i CaCo2 stanične linije.

4. Kvaterna mješavina svih bioaktivnih spojeva, koja sadrži 0,1 gL^{-1} kvercetina te po 10 gL^{-1} askorbinske kiseline, lizina i karnitina, pokazuje citoprotektivno i antioksidacijsko djelovanje na HEp2 staničnu liniju.

5. Inkapsulacijom kvercetina i kvaterne mješavine sva 4 bioaktivna spoja u alginat i etil-celulozu kao sustave nosača, dobivaju se sferične čestice raspona veličine od mikro (cca. 500-600 μm za etil-celulozu) do makro čestica (< 2 mm za alginatne čestice).

6. Alginatne čestice u usporedbi s etil-celuloznim mikročesticama pokazuju značajno veću inkapsulacijsku učinkovitost svih bioaktivnih spojeva formulirane mješavine.

7. Alginatne i etil-celulozne čestice pripremljene u metafosfornoj kiselini kao otapalu pokazale su izrazito prooksidativno djelovanje na CaCo2 stanice, među kojima su alginatne čestice s inkapsuliranom mješavinom imale najizraženiji učinak ovisan o koncentraciji.

8. CaCo2 stanična linija pokazuje manju osjetljivost na djelovanje čistih bioaktivnih spojeva i otopina čestica s inkapsuliranom bioaktivnom mješavinom spojeva u odnosu na HEp2 staničnu liniju.

6. LITERATURA

Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K., Xiaoming, Z. (2012) Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends - A Review, *Food Rev. Int.* **28**, 343-374.

Arora, D., Jaglan, S. (2016) Nanocarriers Based Delivery of Nutraceuticals for Cancer Prevention and Treatment: A Review of Recent Research Developments. *Trends. Food. Sci. Tech*. **54**, 114-126.

Arts, I.C.W., Sesink, A.L.A, Faassen-Peters, M., Hollman, P.C.H. (2004) The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *Brit. J. Nutr.* **91**, 841-847.

Augustin, M.A., Sanguansri, L. (2015) Challenges and solutions to incorporation of nutraceuticals in foods.*Annu. Rev. Food. Sci. Technol.* **6**, 463-477.

Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity of T-2 Toxin and Its Metabolites Determined with Neutral Red Cell Viability Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2101-2103.

Bagchi, K, Puri, S. (1998) Free radicals and antioxidants in health and disease. *East. Mediterranean Health Jr.* **4**, 350-360.

Belščak-Cvitanović, A. (2013) Utjecaj dodatka polifenolnih ekstrakata biljnoga podrijetla na funkcionalna svojstva čokolade. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, J.I., Nedović, V., Bugarski, B. (2011) Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.* **44**, 1094-1101.

Bethune, S.J., Schultheiss, N., Henck, J.O. (2011). Improving the poor aqueous solubility of nutraceutical compound pterostilbene through cocrystal formation. Crystal Growth & Design, **11**, 2817-2823.

Boots, A.W., Li, H., Schins, R.P.F., Duffin, R., Heemskerk, J.W.M., Bast, A., Haenen, R.M.M. (2007) The quercetin paradox. *Toxicol. Appl. Pharm.* **222**, 89-96.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*. **28**, 25-30.

Brautaset, T., Ellingsen, T.E. (2011) Lysine: Industrial Uses and Production. U: Comprehensive Biotechnology, (Moo-Young, M., ured.), Elsevier, str. 541-554.

Bunaciu, A.A., Danet, A.F., Fleschin, S., Aboul-Enein, H.Y. (2015) Recent Applications for *In Vitro* Antioxidant Activity Assay. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **46,** 389-399**.**

Cai, K., Bennick, A. (2006) Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 974-980.

Cai, X., Fang, Z., Dou, J., Yu, A., Zhai, G. (2013) Bioavailability of quercetin: problems and promises.*Curr. Med. Chem.* **20**, 2572-2582.

Chabane, M.N., Ahmad, A.A., Peluso, J., Muller, C.D., Ubeaud, G. (2009) Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 1473-1483.

Chauhan, B., Kumar, G., Kalam, N., Ansari, S.H. (2013) Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *J. Adv. Pharm. Tech. Res.* **4**, 4-8.

Chen, J., Kang, J., Da, W., Ou, Y. (2004) Combination with water-soluble antioxidants increases the anticancer activity of quercetin in human leukemia cells. *Pharmazie* **59**, 859-863.

Chen, Q., Espey, M.G., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., Corpe, C.P., Buettner, G.R., Shacter, E. (2005) Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13604-13609.

Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Pooput, C., Kirk, K.L., Krishna, M.C., Khosh, D.B. (2008) Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11105-11109.

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. (2002) Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 618-621.

Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **10**, 7313-7352.

D'Andrea, G. (2015) Quercetin: A flavonol with multifaced therapeutic applications? *Fitoterapia* **106**, 256-271.

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R. (2010) Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1321-1342.

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng. Rev.* **7**, 452-490.

Du, J., Cullen, J.J., Buettner, G.R. (2012) Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *BBA-Rev. Cancer* **1826**, 443-457.

Durgo, K., Vuković, L., Rusak, G., Osmak, M., Čolić, J.F. (2007) Effect of flavonoids on glutathione level, lipid peroxidation and cytochrome P450 CYP1A1 expression in human laryngeal carcinoma cell lines. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 69-79.

Endo, Y., Hanada, K., Miyake, M., Ogawara, K. I., Higaki, K., Kimura, T. (2002) Mechanisms of cytoprotective effect of amino acids on local toxicity caused by sodium laurate, a drug absorption enhancer, in intestinal epithelium. *J. Pharm. Sci.* **91**, 730-743.

Fabre, G., Bayach, I., Berka, K., Paloncýová, M., Starok, M., Rossi, C., Duroux, J.L., Otyepka, M., and Trouillas, P. (2015) Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chem. Commun*. **51**, 7713-7716.

Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B. (2005) Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J. Control. Release* **102**, 313-332.

Friedman, M. (2004) Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 385-406.

Gao, L., Liu, G., Wang, X., Liu, F., Xu, Y., & Ma, J. (2011) Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *Int. J. Pharmaceut*. **404**, 231-237.

Guo, Y., Bruno, R.S. (2015) Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J. Nutr. Biochem*. **26,** 201-210.

Halliwell, B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 107-112.

Hamzeloo-Moghadam, M., Taiebi, N. (2014) The effect of some cosolvents and surfactants on viability of cancerous cell lines. *Research Journal of Pharmacology* **1**, 41-45.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. **55,** 279-290.

Küblbeck, J., Hakkarainen, J.J., Petsalo, A., Vellonen KS., Tolonen, A., Reponen, P., Forsberg, M.M., Honkakoski, P. (2016) Genetically Modified Caco-2 Cells With Improved Cytochrome P450 Metabolic Capacity. *J. Pharm. Sci.* **105**, 941-949.

Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Maniam, G.P., Ichwan, S.J.A., Soundharrajan I., Govindan N. (2014) Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharm. Sin. B.* **4**, 173-181.

Lemańska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zieliński, R., Soffers, A.E., Rietjens, I.M. (2001) The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free. Radic. Biol. Med*. **31**, 869-881.

Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M.T., Wang, S., Liu, H., Yin, Y. (2016) Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* **8**, 167.

Liu, R. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* **134**, 3479-3485.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118–126.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**. 727-747.

Marchesi, E., Rota, C., Fann, Y.C., Chignell, C.F., Mason, R.P. (1999) Photoreduction of the fluorescent dye 2′,7′-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med*. **26**, 148–161

McClements, D. J., Li, F., Xiao, H. (2015) The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. *Annu. Rev. Food Sci. T.* **6**, 299-327.

Mojić, M., Pristov, J.B., Maksimović-Ivanić, D., Jones, D.R., Stanić, M., Mijatović, S., Spasojević, I. (2014) Extracellular iron diminishes anticancer effects of vitamin C: an *in vitro* study. *Sci. Rep.* **4**, 5955.

Mojzer, E.B., Hrnčič, M.K., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U. (2016) Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* **21**.

Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011) Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics* **3**, 793-829.

Murtaza, G., Ahamd, M., Akhtar, N., Rasool, F. (2009) A comparative study of various microencapsulation techniques: Effect of polymer viscosity on microcapsule characteristics. *Pak. J. Pharm. Sci.* **22**, 291-300.

Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* **1**, 1806-1815.

Németh, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y. (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr*. **42**, 29-42.

Omaye, S.T., Turbull, T.P and Sauberchich, H.C. (1979). Selected methods for determination of ascorbic acid in cells, tissues and fluids. *Methods Enzymol.* **6**, 3-11.

Oteri, G. Stammati, A., Zampaglioni, F., Zucco, F. (1998) Evaluation of the use of two human cell lines for okadaic acid and DTX-1 determination by cytotoxicity assays and damage characterization. *Nat. Toxins* **6**, 197-209.

Pacier, C., Martirosyan, D.M. (2015) Vitamin C: optimal dosages, supplementation and use in disease prevention. *Funct.Food. Health Dis.* **5**, 89-107.

Paine, A.J., Dayan, A.D. (2001) Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Hum. Exp. Toxicol.* **20**, 563-8.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2**, 270-278.

Patil, J.S., Kamalapur, M.V., Marapur, S.C., Kadam, D.V. (2010) Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: the Novel Techniques To Design Hydrogel Particulate Sustained , Modulated Drug Delivery System: a Review. *Dig. J. Nanomater. Bios.* **5**, 241-248.

Patil, P.,Chavanke, D.,Wagh, M. (2012) A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelispheres. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 27-32.

Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., Kumar, M.N.V.R. (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control. Release.* **113**, 189-207.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* **26**, 1231-1237.

Reddy, S.A., Sailaja, A.K. (2014) Preparation and Characterisation of Aspirin Loaded Ethylcellulose Nanoparticles By Solvent Evaporation Technique. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, 1781-1793.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc*. **3**, 1125-31.

Robaszkiewicz, A., Balcerczyk, A., Bartosz, G. (2007) Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol. Int*. **31**, 1245-1250.

Sahari, M.A., Ardestani, B.S. (2014) Bio-antioxidants Activity: Their Mechanisms and Measurement Methods. *Applied Food Biotechnology* **1**, 3-8.

Sak, K. (2013) Site-Specific Anticancer Effects of Dietary Flavonoid Quercetin. *Nutr. Cancer* **66**. 177-193.

Sak, K. (2014) Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Phcog. Rev.* **8**, 122-146.

Saneja, A., Khare, V., Alam, N., Dubey, R.D., Gupta, P.N. (2014) Advances in P-glycoprotein-based approaches for delivering anticancer drugs: pharmacokinetic perspective and clinical relevance. *Expert Opin. Drug Del.* **11**, 121-138.

Sen C.K. (1995) Oxygen toxicity and antioxidants: State of the art. *Indian J. Physiol. pharmacol*. **39**, 177-196.

Sen, S., Chakraborty, R. (2011) The Role of Antioxidants in Human Health. U: Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy (Andreescu, S., Hepel, M., ured.), American Chemical Society, Washington DC, str. 1-37.

Sergediene, E., Jönsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I.M.C.M., Čenas, N. (1999) Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: Description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Letters* **462**, 392-396.

Silveira, L.R., Pereira-Da-Silva, L., Juel, C., Hellsten, Y. (2003) Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radical Bio. Med*. **35**, 455-464.

Spencer, J. P. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr*. **133**, 3255-3261.

Stammati, A, Nebbia C., De Angelis, I., Albo, A.G., Crletti, M., Rebecchi, C., Zampaglioni, F., Dacasto, M. (2005) Effects of malachite green and its major metabilite, leucomalachite green, in two human cell lines. *Toxicol. in vitro* **19,** 835-858.

Trottier, G., Boström, P.J., Lawrentschuk, N., Fleshner, N.E. (2010) Nutraceuticals and prostate cancer prevention: a current review. *Nat. Rev. Urol*. **7**, 21-30.

Van Der Woude, H., Gliszczyńska-Świgło, A., Struijs, K., Smeets, A., Alink, G.M., Rietjens, I.M.C.M. (2003) Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett.* **200**, 41-47.

Wang, H., Joseph, J. A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio. Med.* **27**, 612-616.

Wang, W., Sun, C., Mao, L., Ma, P., Liu, F., Yang, J., Gao, Y. (2016) The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends Food Sci. Tech*. **56**, 21-38.

Weldin, J., Jack, R., Dugaw, K., Kapur, R.P., (2003) Quercetin, an over- the-counter supplement, causes neuroblastoma-like elevation of plasma homovanillic acid. *Pediatr. Dev. Pathol*. **6**, 547-551.

Young, I.S., Woodside, J.V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol*. **54**, 176-186.

Zhang, R., Zhang, H., Zhang, Z., Wang, T., Niz, J., Cui, D., Xu, S. (2012) Neuroprotective effects of pre-treament with L-carnitine and Acetyl-L-carnitine on ischemic injury in vivo and *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 2078-2090.