

# Utjecaj metoda ekstrakcije na biološku aktivnost i in vitro gastrointestinalnu stabilnost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata iz odabranih biljaka reda brassicales

---

Vrca, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

*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:159:057594>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-16**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ivana Vrca

**UTJECAJ METODA EKSTRAKCIJE NA  
BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO*  
GASTROINTESTINALNU STABILNOST  
GLUKOZINOLATA I NJIHOVIH  
RAZGRADNIH PRODUKATA IZ  
ODABRANIH BILJAKA REDA  
BRASSICALES**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Ivana Vrca

**INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS  
ON BIOLOGICAL ACTIVITY AND *IN VITRO*  
GASTROINTESTINAL STABILITY OF  
GLUCOSINOLATES AND THEIR  
DECOMPOSITION PRODUCTS FROM  
SELECTED PLANTS OF THE ORDER  
BRASSICALES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ivana Vrca

**UTJECAJ METODA EKSTRAKCIJE NA  
BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO*  
GASTROINTESTINALNU STABILNOST  
GLUKOZINOLATA I NJIHOVIH  
RAZGRADNIH PRODUKATA IZ  
ODABRANIH BILJAKA REDA  
BRASSICALES**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:

Dr.sc. Tea Bilušić, red. prof.

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Ivana Vrca

**INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS  
ON BIOLOGICAL ACTIVITY AND *IN VITRO*  
GASTROINTESTINAL STABILITY OF  
GLUCOSINOLATES AND THEIR  
DECOMPOSITION PRODUCTS FROM  
SELECTED PLANTS OF THE ORDER  
BRASSICALES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Prof. Tea Bilušić, PhD

Zagreb, 2022.

Prof. dr. sc. Tea Bilušić rođena je 1973. godine u Splitu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je 1996. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2000. godine stekla je akademski stupanj magistre biotehničkih znanosti, grana nutricionizam, a na istom je fakultetu 2004. godine obranila doktorski rad i stekla akademski stupanj doktorice znanosti u znanstvenom polju prehrambena tehnologija/nutricionizam.

U više navrata se usavršavala u inozemstvu: na Institutu za agronomska istraživanja (INRA) u Parizu (Francuska) od 2000. do 2001. (10 mjeseci) kao stipendistica Vlade Republike Francuske, na Sveučilištu u Fribourgu (Švicarska) od 2002. do 2003. (12 mjeseci) kao stipendistica Švicarske Konfederacije, na Tehničkom Sveučilištu Munchen – TUM (Njemačka) od 2006. do 2007. (12 mjeseci) kao postdoc stipendistica Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ). Kraće boravke u svrhu usavršavanja ostvarila je na Sveučilištima u Regensburgu (2008.), Beogradu (2016.), Barceloni (2017.) i Novom Sadu (2017.)

Od 1997. do 2001. radila je na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša Split, a od 2002. g. je zaposlena na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Splitu na kojem je godine 2018. g. izabrana u znanstveno-nastavno zvanje redovita profesorica u trajnom zvanju. Bila je predstojnica Zavoda za prehrambenu tehnologiju na Kemijsko-tehnološkom fakultetu od 2015. do 2020. godine te članica Senata Sveučilišta u Splitu od 2015. do 2019. godine. Na preddiplomskom i diplomskom studiju Prehrambena tehnologija na Kemijsko-tehnološkom fakultetu nositeljica je kolegija Hrana i prehrana, Mediteranska prehrana, Higijena i sanitacija. Na sveučilišnom integriranom studiju Farmacija nositeljica je kolegija Dijetetika. Pod njezinim mentorstvom obranjeno je preko 40 završnih i diplomskih radova, te jedan doktorski rad (obranjen godine 2019. na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu). Bila je voditeljica i suradnica na više znanstveno-istraživačkih projekata (koordinatrica INTERREG MED projekta na Sveučilištu u Splitu, suradnica na dva HRZZ projekta, voditeljica HRZZ projekta „Projekt razvoja karijera mladih istraživača- izobrazba novih doktorata znanosti“).

Područje znanstvenog interesa T. Bilušić usmjereno je na istraživanje gastrointestinalne stabilnosti biološki aktivnih spojeva iz namirnica biljnog podrijetla te na utjecaj načina pripreme hrane na stabilnost spojeva. Prema WOS bazi podataka, znanstveni radovi na kojima je glavna autorica ili koautorica citirani su 2000 puta, a *h*-indeks je 17 (datum pretrage je 4. listopad 2022). Aktivna je i u području popularizacije znanosti pri čemu je bila suradnica na

projektu „Noć istraživača“ na kojem je bila koordinatorica modula Funkcionalna hrana, a u više je navrata održala popularna predavanja iz područja znanosti o hrani na Festivalu znanosti, autorica je knjige „Zdravlje iz maslinovog ulja“ i stalna je stručna suradnica časopisa „Maslinar“.

*Željela bih se zahvaliti svima koji su mi pomogli i bili podrška u realizaciji ovog doktorskog rada.*

*Zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Tei Bilušić što mi je dala povjerenje i priliku za izradu doktorske disertacije na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu. Mojoj mentorici prof. dr. sc. Tei Bilušić zahvaljujem i na pomoći, podršci i savjetima tijekom izrade i pisanja ovog doktorskog rada.*

*Izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću zahvaljujem što mi je ukazao povjerenje i primio me kao doktoranda na svom projektu „Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala“, HRZZ-IP-2016-06-1316. Zahvaljujem mu na pomoći i uloženom vremenu tijekom izvođenja dijela eksperimentalnog rada na Kemijsko - tehnološkom fakultetu.*

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Franku Burčulu i Azri Đulović, mag. chem. na pomoći i uloženom vremenu tijekom izvođenja dijela eksperimentalnog rada na Kemijsko - tehnološkom fakultetu.*

*Izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić i Sandri Marijan, mag. for. chem. mol. biol. s Medicinskog fakulteta u Splitu od srca zahvaljujem na pomoći tijekom izvođenja dijela antiproliferativne aktivnosti i proapoptotske aktivnosti u sklopu eksperimentalnog dijela ovog doktorskog rada. Vedro, uvijek ću ti biti zahvalna na svemu.*

*Red. prof. Ivani Bočini, doc. dr. sc. Barbari Soldo, doc. dr. sc. Željani Fredotović, doc. dr. sc. Nives Kević, , doc. dr. sc. Matildi Šprung, dr. sc. Luciji Krce, asistentici Josipi Šćurla, mag. phys. s Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Splitu od srca hvala na pomoći tijekom izvođenja dijela eksperimentalnog rada. Drage moje cure, još jednom od srca hvala na svemu, na ljubaznosti, kolegijalnosti i uloženom vremenu.*

*Prof. dr. sc. Sonji Smole Možina i doktorandici Dini Ramić sa Biotehničkog fakulteta u Ljubljani također zahvaljujem na pomoći i uloženom vremenu tijekom izvođenja dijela antimikrobne aktivnosti u sklopu eksperimentalnog rada. Drago mi je što sam vas upoznala ovom prilikom.*



*Zahvale upućujem i doc. dr. sc. Jošku Markiću, dr. med., i doc. dr. sc. Andri Brataniću, dr. med. na osiguranim uzorcima ljudskih probavnih enzima koji su bili neophodni za provođenje ovog istraživanja.*

*Zahvaljujem svim kolegama i prijateljima na Kemijsko-tehnološkom fakultetu koji su mi bili potpora tijekom izrade ovog doktorskog rada.*

*Hvala i mojoj Ivanki Keršić i Ankici Bogić, dvjema predivnim dušama na Kemijsko-tehnološkom fakultetu bez kojih cjelokupno svoje studiranje ne bih mogla ni zamisliti.*

*Zahvaljujem i ostalim članovima projekta „Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala“, HRZZ-IP-2016-06-1316. na savjetima i pruženoj pomoći pri radu u laboratoriju.*

*Ovo istraživanje financirano je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) u okviru projekta „Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala“, HRZZ-IP-2016-06-1316.*

*I na samom kraju ovih zahvala, a u mom srcu na prvom mjestu, hvala mojim roditeljima, obitelji i mojim najdražima. Ispisali ste svaku stranicu u mom životu, stoga bih sve ove stranice mogla ispuniti samo zahvalama vama za sve što ste mi pružili i omogućili. Samo ću napisati da sam neizmjereno zahvalna i blagoslovljena što vas imam.*

*P.s. Nadam se da nikog nisam izostavila, oprostite ako jesam, ali još jednom hvala svima...*

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 543.544.5:582.683:591.132:633.844:66.061(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### **UTJECAJ METODA EKSTRAKCIJE NA BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO* GASTROINTESTINALNU STABILNOST GLUKOZINOLATA I NJIHOVIH RAZGRADNIH PRODUKATA IZ ODABRANIH BILJAKA REDA BRASSICALES**

**Ivana Vrca, mag. ing. cheming. et mag.oec.**

**Rad je izrađen na Kemijsko-tehnološkom fakultetu, Medicinskom fakultetu i Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilište u Splitu.**

**Mentorica: Prof. dr. sc. Tea Bilušić**

#### **Kratki sažetak**

Biljke iz reda Brassicales poznate su kao dobar izvor glukozinolata i njihovih razgradnih produkata - izotiocijanata. U ovom istraživanju korišteni su uzorci eteričnih ulja i ekstrakata, dobivenih primjenom različitih metoda ekstrakcije, iz sjemenki gorušica te visokog dragoljuba. Budući da izotiocijanati imaju širok spektar bioloških aktivnosti od značaja je odrediti njihovu stabilnost i biodostupnost u uvjetima simuliranog procesa probave (želudac i tanko crijevo) koristeći ljudske i komercijalne probavne enzime. Glukozinolati i izotiocijanati iz navedenih uzoraka pokazali su veću gastrointestinalnu stabilnost nakon želučane faze probave u odnosu na crijevu fazu. U ovom je istraživanju određena biološka aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata smeđe i crne gorušice (antiproliferativna na dvije stanične linije karcinoma) i visokog dragoljuba (antiproliferativna na pet staničnih linija karcinoma, proapoptotska na dvije stanične linije karcinoma, vizualiziran je utjecaj uzoraka na stanice karcinom koristeći optičku i mikroskopiju atomskih sila – AFM te je određena antimikrobna aktivnost). Razgradni produkti glukozinolata prisutnih u gorušicama, pokazali su umjerenu i slabu antiproliferativnu aktivnost, dok razgradni produkti glukozinolata glukotropeolina prisutnog u visokom dragoljubu (benzil-izotiocijanat) su pokazali visok stupanj antiproliferativne, proapoptotske, antibakterijske i antiadhezijske aktivnosti.

**Broj stranica: 179**

**Broj slika: 71**

**Broj tablica: 23**

**Broj literaturnih navoda: 197**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Ključne riječi:** gorušice; dragoljub; UHPLC-DAD-MS/MS; GC-MS/MS; glukozinolati; izotiocijanati; *in vitro* probava; biološka aktivnost; Clevenger hidrodestilacija; mikrovalna destilacija (MAD); mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (MHG); mikroskopija

**Datum obrane: 11.11.2022.**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

- 1. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac**
- 2. Prof. dr. sc. Ksenija Durgo**
- 3. Prof. dr. sc. Greta Krešić**

**Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.**

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**University of Zagreb**

**Doctoral Thesis**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutritionism**

**UDK: 543.544.5:582.683:591.132:633.844:66.061(043.3)**

**Scientific Area:** Biotechnical Sciences

**Scientific Field:** Food Technology

### **INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS ON BIOLOGICAL ACTIVITY AND *IN VITRO* GASTROINTESTINAL STABILITY OF GLUCOSINOLATES AND THEIR DECOMPOSITION PRODUCTS FROM SELECTED PLANTS OF THE ORDER BRASSICALES**

**Ivana Vrca, MSc**

**Thesis performed at Faculty of Chemistry and Technology, Faculty of Medicine, and Faculty of Science, University of Split.**

**Supervisor: Prof. Tea Bilušić, PhD**

#### **Short abstract**

Plants of the order Brassicales are known as a good source of glucosinolates and their degradation products - isothiocyanates. In this work, samples of essential oils and extracts, from the mustard and nasturtium seeds were used, obtained by different extraction methods. Since isothiocyanates exhibit a wide range of biological activities, it is important to determine their stability and bioaccessibility under the conditions of a simulated digestion process (stomach and small intestine) with human and commercial digestive enzymes. The glucosinolates and isothiocyanates from the above samples showed higher gastrointestinal stability after the gastric phase of digestion compared to the intestinal phase. In this work, the biological activity of the essential oils and extracts of brown and black mustard (antiproliferative activity on two cancer cell lines) and nasturtium (antiproliferative activity on five cancer cell lines, proapoptotic activity on two cancer cell lines was determined, the effect of the essential oil on cancer cells was visualized by optical and atomic force microscopy - AFM, and the antimicrobial activity was determined). The degradation products of glucosinolates contained in mustard showed moderate and weak antiproliferative activity, while the degradation products of glucosinolate glucotropaeolin contained in nasturtium (benzyl isothiocyanate) showed a high level of antiproliferative, proapoptotic, antibacterial and antiadhesive activity.

**Number of pages: 179**

**Number of figures: 71**

**Number of tables: 23**

**Number of references: 197**

**Original in:** Croatian

**Keywords:** mustards; *Tropaeolum majus* (nasturtium); UHPLC-DAD-MS/MS; GC-MS/MS; glucosinolates; isothiocyanates; *in vitro* digestion; biological activity; Clevenger hydrodistillation; microwave distillation (MAD); microwave hydrodiffusion and gravity (MHG); microscopy

**Date of the thesis defense: 11.11.2022.**

#### **Reviewers:**

- 1. Prof. Verica Dragović-Uzelac, PhD**
- 2. Prof. Ksenija Durgo, PhD**
- 3. Prof. Greta Krešić, PhD**

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg maršala Tita 14.

## **Kratice**

AITC – Alil-izotiocijanat

APS – Amonijev-persulfat

BCN – Benzil-cijanid

BITC – Benzil-izotiocijanat

BTC - Benzil-tiocijanat

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle medij

DMSO – Dimetil-sulfoksid

DNS - Dinitrosalicilna kiselina

ESP - Epitiospecifični protein

FBS - Serum goveđeg fetusa (engl. Fetal Bovine Serum)

GSL - Glukozinolat

HCl - Klorovodična kiselina

INT 2-*p*-jodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-tetrazolij-klorid

ITC – Izotiocijanat

KOH – Kalijev hidroksid

MAD - Mikrovalna destilacija

MBC - Minimalna baktericidna koncentracija

MHA - Mueller-Hinton agar

MHB - Mueller-Hinton bujon

MHG – Mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija

MIC - Minimalna inhibitorna koncentracija

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin-bromid

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - Natrijev karbonat

NaOAc - Natrijev acetat

SC-CO<sub>2</sub> - Superkrična ekstrakcija ugljikovim dioksidom

SDS - (Sodium dodecyl sulfate) Natrijev dodecil-sulfat

TCA - Trikloroocena kiselina

TEMED - Tetrametiletildiamin

PBS - Fosfatni pufer

RGE (Rabbit gastric extract) – Ekstrakt želuca kunića

## **Tablice**

**Tablica 1.** Neke biološke aktivnosti razgradnih produkata GSL-a.

**Tablica 2.** Sadržaj glukozinolata u različitim vrstama gorušica i visokom dragoljubu.

**Tablica 3.** Hlapljivi spojevi u eteričnom ulju i ekstraktima iz sjemenki smeđe i crne gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije, MAD i MHG.

**Tablica 4.** Hlapljivi spojevi u eteričnom ulju i ekstraktu iz sjemenki visokog dragoljuba poslije Clevenger hidrodestilacije, MAD and MHG.

**Tablica 5.** Sadržaj glukosinalbina u bijeloj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 6.** Sadržaj sinigrina u smeđoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 7.** Sadržaj 4-hidroksiglukobrasicina u smeđoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 8.** Sadržaj glukonapina u crnoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 9.** Sadržaj sinigrina u crnoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 10.** Sadržaj 4-hidroksiglukobrasicina u crnoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 11.** Sadržaj glukotropeolina u visokom dragoljubu prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 12.** Koncentracija čistog spoja AITC-a prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 13.** Koncentracija BITC-a iz eteričnog ulja visokog dragoljuba prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 14.** Koncentracija čistog spoja BITC-a prije i poslije *in vitro* metode probave.

**Tablica 15.** Inhibitorna aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze GSL-a glukonapina, sinigrina i glukotropeolina.

**Tablica 16.** Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka dojke MDA-MB-231.

**Tablica 17.** Proapoptotska aktivnost ekstrakta visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka dojke MDA-MB-231.

**Tablica 18.** Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura TCCSUP.

**Tablica 19.** Proapoptotska aktivnost ekstrakta visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura TCCSUP.

**Tablica 20.** Minimalna inhibitorna i baktericidna koncentracija (mg/mL) BITC-a, BCN-a, eteričnog ulja visokog dragoljuba poslije MAD i ekstrakta visokog dragoljuba poslije MHG na *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 11229.

**Tablica 21.** Duljina grebena sjemenki smeđe i crne gorušice prije i nakon različitih tehnika ekstrakcije.

**Tablica 22.** Sastav masnih kiselina i prinos ulja u gorušicama i dragoljubu nakon Soxhlet ekstrakcije.

**Tablica 23.** Sastav masnih kiselina i prinos ulja u gorušicama nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije.

## Slike

**Slika 1.** Biljke kupusnjače: 1. cvijet, 2. plod komuška, 3. plod komuščica.

**Slika 2.** Sjeme bijele gorušice.

**Slika 3.** Hidroliza glukosinalbina enzimom mirozinazom.

**Slika 4.** Sjeme smeđe ili orijentalne gorušice (*Brassica juncea* L.) (a), sjeme crne gorušice (*Brassica nigra* L.) (b).

**Slika 5.** Hidroliza sinigrina enzimom mirozinazom.

**Slika 6.** Glukozinolat glukotropeolin.

**Slika 7.** Sjeme biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.).

**Slika 8.** Opća struktura glukozinolata gdje je R varijabilni dio lanca iz aminokiseline.

**Slika 9.** Hidroliza glukozinolata i njegovi razgradni produkti.

**Slika 10.** Shema hidrolitičke razgradnje glukozinolata i dobivanje izotiocijanata.

**Slika 11.** Prikaz dvofaznog *in vitro* modela probave.

**Slika 12.** Modificirana aparatura po Clevengeru za hidrodestilaciju (1. tikvica s okruglim dnom; 2. povratno hladilo; 3. prostor za prihvata destilata; 4. kalota za zagrijavanje, 5. reostat).

**Slika 13.** Soxhletov ekstraktor.

**Slika 14.** Mikrovalna destilacija (a), mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (b).

**Slika 15.** Schema uređaja za ekstrakciju superkričnim CO<sub>2</sub> (1. Kompresor; 2. CO<sub>2</sub> spremnik; 3. Izmjenjivač topline od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8.

Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sistem grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka).

**Slika 16.** Prikaz komponenti HPLC uređaja.

**Slika 17.** Prikaz komponenti uređaja za plinsku kromatografiju.

**Slika 18.** Sjeme bijele i smeđe gorušice (a), crne gorušice (b) i divlje gorušice (c).

**Slika 19.** Sjeme cijelog zrna (a) i mljevenog (b) zrna visokog dragoljuba.

**Slika 20.** Uzorci u vrućoj vodenoj kupelji (a) i ultrazvučnoj kupelji (b).

**Slika 21.** Kolone za ekstrakciju glukozinolata.

**Slika 22.** Clevenger hidrodestilacija.

**Slika 23.** Mikrovalna destilacija (MAD).

**Slika 24.** Mikrovalna ekstrakcija hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG) (a), ekstrakcija diklormetanom u lijevku (b).

**Slika 25.** Prikaz uređaja za uparavanje eteričnih ulja i ekstrakata inertnim dušikom.



- Slika 26.** UHPLC-DAD-MS/MS uređaj.
- Slika 27.** GC-MS/MS uređaj.
- Slika 28.** Spektrofotometar.
- Slika 29.** Termostat za grijanje (denaturacija enzima).
- Slika 30.** Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu.
- Slika 31.** Ljudski želučani i crijevni sokovi.
- Slika 32.** Simuliranje dvofaznog *in vitro* modela probave: stavljanje uzoraka na probavu u inkubator (a) i centrifugiranje uzoraka (b).
- Slika 33.** Antiproliferativno djelovanje MTT metodom.
- Slika 34.** Ispitivanje proapoptotske aktivnost Aneksinom V-FITC.
- Slika 35.** GC-FID uređaj.
- Slika 36.** MS spektar glukosinalbina u bijeloj gorušici. Masa  $m/z = 368$  odgovara natrijevom aduktu desulfoglukosinalbina.
- Slika 37.** MS spektar sinigrina u smeđoj gorušici. Masa  $m/z = 302$  odgovara natrijevom aduktu desulfosinigrina.
- Slika 38.** MS spektar 4-hidroksiglukobracicina u smeđoj gorušici. Masa  $m/z = 407$  odgovara natrijevom aduktu desulfo-4-hidroksiglukobracicina.
- Slika 39.** MS spektar glukonapina u crnoj gorušici. Masa  $m/z = 316$  odgovara natrijevom aduktu desulfoglukonapina.
- Slika 40.** HPLC kromatogram sjemena visokog dragoljuba. Pik na 17 min je glukotropeolin.
- Slika 41.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju smeđe gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije.
- Slika 42.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju smeđe gorušice nakon MAD tehnike.
- Slika 43.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u ekstraktu smeđe gorušice nakon MHG tehnike.
- Slika 44.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju crne gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije.
- Slika 45.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju crne gorušice nakon MAD tehnike.
- Slika 46.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u ekstraktu crne gorušice nakon MHG tehnike.
- Slika 47.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju sjemenki visokog dragoljuba nakon Clevenger hidrodestilacije.

**Slika 48.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju sjemenki visokog dragoljuba nakon MAD tehnike.

**Slika 49.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju sjemenki visokog dragoljuba nakon MHG tehnike.

**Slika 50.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta smeđe gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 u koncentracijama od 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije.

**Slika 51.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta crne gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 u koncentracijama od 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije.

**Slika 52.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta smeđe gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP u koncentracijama 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije.

**Slika 53.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta crne gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP u koncentracijama 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije.

**Slika 54.** Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba na staničnu liniju raka dojke MDA-MB 231 nakon Clevenger hidrodestilacije (a), MAD (b) i MHG (c).

**Slika 55.** Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP nakon Clevenger hidrodestilacije (a), MAD (b) i MHG (c).

**Slika 56.** Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja visokog dragoljuba nakon MAD-a i ekstrakta visokog dragoljuba nakon MHG (a), te antiproliferativna aktivnost benzil izotiocijanata (BITC) i benzil cijanida (BCN) (b) na staničnoj liniji raka vrata maternice (HeLa), stanična linija humanog raka debelog crijeva (HCT116) i stanična linija humanog osteosarkoma (U2OS) određene testom stanične proliferacije na temelju MTS-a.

**Slika 57.** Netretirane TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura snimane optičkom mikroskopijom.

**Slika 58.** TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura tretirane eteričnim uljem visokog dragoljuba raka snimane optičkom mikroskopijom.

**Slika 59.** TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura tretirane eteričnim uljem visokog dragoljuba snimane optičkom mikroskopijom.

**Slika 60.** Netretirana cijela TCCSUP stanica raka mokraćnog mjehura mjerena AFM-om.

**Slika 61.** Netretirani (a) i tretirani (b) dio TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura eteričnim uljem visokog dragoljuba mjereno AFM-om.

**Slika 62.** Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određene su metodom mikrodilucije.

**Slika 63.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u različitim koncentracijama (mg/mL) na rast *S. aureus*.

**Slika 64.** Učinci BITC-a i BCN-a u omjeru 1:1 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *S. aureus*.

**Slika 65.** Učinci BITC-a i BCN-a u omjeru 1:2 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *S. aureus*.

**Slika 66.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u različitim koncentracijama (mg/mL) na rast *E. coli*.

**Slika 67.** Učinci BITC-a i BCN-a u različitim omjerima 1:1 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *E. coli*.

**Slika 68.** Učinci BITC-a i BCN-a u različitim omjerima 1:2 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *E. coli*.

**Slika 69.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u koncentraciji MIC,  $\frac{1}{2}$  MIC i  $\frac{1}{4}$  MIC na prianjanje na polistirensku površinu *S. aureus*.

**Slika 70.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u koncentraciji MIC,  $\frac{1}{2}$  MIC i  $\frac{1}{4}$  MIC na prianjanje na polistirensku površinu *E. coli*.

**Slika 71.** Optičke i SEM slike tretiranih i netretiranih uzoraka smeđe gorušice (a,g-netretirane, b,h-nakon Clevenger hidrodestilacije, c,i-nakon MAD-a) i crne gorušice (d,j-netretirane, e,k - nakon Clevenger hidrodestilacije, f,l-nakon MAD-a) pri različitim povećanjima.

## SAŽETAK

### UTJECAJ METODA EKSTRAKCIJE NA BIOLOŠKU AKTIVNOST I *IN VITRO* GASTROINTESTINALNU STABILNOST GLUKOZINOLATA I NJIHOVIH RAZGRADNIH PRODUKATA IZ ODABRANIH BILJAKA REDA BRASSICALES

Biljke reda Brassicales poznate su kao izvor glukozinolata (GSL-a) i njihovih razgradnih produkata - izotiocijanata (ITC-a). Ovo istraživanje fokusirano je na karakterizaciju hlapljivih i nehlapljivih sjemenki iz bijele (*Sinapis alba* L.), smeđe (*Brassica juncea* L.), crne (*Brassica nigra* L.) i divlje gorušice (*Sinapis arvensis* L.) te visokog i niskog dragoljuba (*Tropaeolum majus* L. var. *altum* i *Tropaeolum majus* L. var. *nanum*). Za ekstrakciju hlapljivih i nehlapljivih spojeva iz navedenih biljnih vrsta korištene su klasična (hidrodestilacija u aparaturi po Clevengeru) i napredne (mikrovalna destilacija - MAD i mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija - MHG) metode izolacije te je koristeći optičku i pretražnu/skenirajuću mikroskopiju (SEM) ispitan utjecaj tehnika izolacije na površinu sjemenki gorušica. U dobivenim izolatima određen je kemijski sastav GSL-a koristeći UHPLC-DAD-MS/MS tehniku, dok je analiza ITC-a u eteričnim uljima i ekstraktima sjemenki provedena korištenjem GC-MS/MS tehnike. Ispitan je stupanj *in vitro* gastrointestinalne stabilnosti GSL-a i ITC-a iz bijele, smeđe i crne gorušice te visokog dragoljuba nakon simuliranog dvofaznog modela probave koristeći komercijalne i ljudske probavne enzime (želudac i tanko crijevo). Ispitana je hipoglikemijska aktivnost (inhibicija enzima  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze) GSL-a prisutnih u gorušicama i visokom dragoljubu. Nadalje, ispitana je biološka aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata smeđe i crne gorušice (antiproliferativna aktivnost na dvije stanične linije karcinoma) i visokog dragoljuba (antiproliferativna aktivnost na pet staničnih linija karcinoma, proapoptotska aktivnost na dvije stanične linije karcinoma, određivanje antiproliferativnog mehanizma koristeći optičku i mikroskopiju atomskih sila – AFM, antimikrobna aktivnost).

Sjemenke gorušica i dragoljuba bogat su izvor ulja pa je kao dodatak ovom istraživanju određen kemijski sastav masnih kiselina iz ulja dobivenih nakon Soxhlet i superkritične CO<sub>2</sub> ekstrakcije što je izuzetno važno zbog određivanja njihove potencijalne i optimalne primjene u industriji.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da različiti uvjeti i tehnike izolacije mogu utjecati na prinos i produkte razgradnje koji potječu od GSL-a. Prinosi eteričnih ulja, odnosno ekstrakata iz različitih sjemenki gorušice i visokog dragoljuba bili su veći nakon konvencionalne tehnike ekstrakcije u odnosu na napredne tehnike ekstrakcije. Glavni

identificirani GSL-i su: glukosinalbin u ekstraktu bijele gorušice, sinigrin u smeđoj gorušici, glukonapin u crnoj gorušici te glukotropeolin u visokom dragoljubu. Glavni identificirani ITC-i su: alil-ITC (AITC) u smeđoj gorušici nakon svih tehnika ekstrakcije, but-3-enil-ITC i AITC u crnoj gorušici nakon Clevenger ekstrakcije, a 4,5-epitiopentanonitril i 3,4-epitiobutanonitril nakon mikrovalne ekstrakcije, dok je benzil-ITC (BITC) glavni spoj u visokom dragoljubu nakon svih tehnika ekstrakcije. GSL-i i ITC-i su pokazali veću stabilnost nakon želučane faze probave kod svih analiziranih uzoraka. GSL-i nisu pokazali hipoglikemijsku aktivnost (inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze). Visoku antiproliferativnu aktivnost pokazalo je eterično ulje visokog dragoljuba na svih pet testiranih staničnih linija karcinoma (MDA-MB-231, TCCSUP, HeLa, HCT116 i U2OS), dok su eterična ulja i ekstrakti gorušica pokazali slabu do umjerenu antiproliferativnu aktivnost. BITC prisutan u eteričnom ulju i ekstraktu visokog dragoljuba također je pokazao proapoptotsku aktivnost na MDA-MB-231 i TCCSUP staničnim linijama. Optička i AFM analiza tretiranih stanica TCCSUP stanične linije raka ukazuje na relevantne morfološke promjene kao što su mjehurići na membrani, skupljanje stanice, gubitak formiranja kolonija, dok su neke stanice poprimile sferni oblik kao dio antiproliferativnog mehanizma eteričnog ulja visokog dragoljuba. BITC iz visokog dragoljuba je pokazao snažno antimikrobno i antiadhezijsko djelovanje protiv *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.

Rezultati analiza sastava masnih kiselina prisutnih u uljima sjemenki gorušica i dragoljuba nakon dvije tehnike ekstrakcije pokazuju najveći udio erukinske kiseline u dragoljubu i najveći prinos ulja u crnoj gorušici nakon Soxhlet ekstrakcije od svih analiziranih uzoraka.

**Ključne riječi:** gorušice; dragoljub; UHPLC-DAD-MS/MS; GC-MS/MS; glukozinolati; izotiocijanati; *in vitro* probava; biološka aktivnost; Clevenger hidrodestilacija; mikrovalna destilacija (MAD); mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (MHG); mikroskopija

## SUMMARY

### INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS ON BIOLOGICAL ACTIVITY AND *IN VITRO* GASTROINTESTINAL STABILITY OF GLUCOSINOLATES AND THEIR DECOMPOSITION PRODUCTS FROM SELECTED PLANTS OF THE ORDER BRASSICALES

Plants of the order Brassicales are known as a source of glucosinolates (GSLs) and their degradation products - isothiocyanates (ITCs). This work focuses on the study of seeds of white (*Sinapis alba* L.), brown (*Brassica juncea* L.), black (*Brassica nigra* L.) and wild (*Sinapis arvensis* L.) mustard, and nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). Classical (Clevenger hydrodistillation) and modern (microwave distillation - MAD and microwave hydrodiffusion and gravity - MHG) extraction techniques were used to extract volatile and non-volatile compounds from these plant species, and the influence of the extraction techniques on the surface morphology of the mustard seeds was studied by optical and scanning electron microscopy (SEM). The chemical composition of GSLs was determined in the extracts obtained using the UHPLC-DAD-MS/MS technique, while the analysis of ITCs in the essential oils and extracts was performed using the GC-MS/MS technique. The degree of *in vitro* gastrointestinal stability of GSLs and ITCs from white, brown, and black mustard, and from *T. majus* was studied after a simulated two-phase digestion model using commercial and human digestive enzymes (stomach and small intestine). The hypoglycemic activity (inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes) of GSLs present in mustards and *T. majus* was investigated. In addition, the biological activity of the essential oils and extracts of brown and black mustard (antiproliferative activity against two cancer cell lines) and *T. majus* (antiproliferative activity against five cancer cell lines, proapoptotic activity on two cancer cell lines, determination of antiproliferative mechanism by optical and atomic forces - AFM, antimicrobial activity) was determined.

Mustard and *T. majus* seeds are a rich source of oil. Therefore, in addition to this PhD work, the chemical composition of fatty acids was determined from the oils obtained after Soxhlet and supercritical CO<sub>2</sub> extraction, which is extremely important for determining their potential and optimal application in industry.

The results of this work showed that different isolation conditions and techniques can affect on the yield and degradation products of GSLs. The yields of essential oils, and extracts from different mustard seeds and *T. majus* were higher after conventional extraction technique

than after modern extraction techniques. The major GSLs identified are: glucosinalbin in white mustard, sinigrin in brown mustard, gluconapin in black mustard, and glucotropaeolin in *T. majus* extract. The major ITCs are: allyl ITC (AITC) in brown mustard after all extraction techniques, but-3-enyl ITC and AITC in black mustard after Clevenger extraction, and 4,5-epithiopentanitrile and 3,4-epithiobutanonitrile after microwave extraction, while benzyl ITC (BITC) is the major compound in *T. majus* after all extraction techniques. GSLs and ITCs showed higher stability after gastric digestion than intestinal digestion in all analyzed samples. GSLs did not show hypoglycemic activity (inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes). *T. majus* essential oil showed high antiproliferative activity against all five cancer cell lines tested (MDA-MB-231, TCCSUP, HeLa, HCT116, and U2OS), whereas mustard essential oils and extracts showed weak to moderate antiproliferative activity. BITC present in the *T. majus* essential oil and extract also showed proapoptotic activity on MDA-MB-231 and TCCSUP cell lines. Optical and AFM analyzes of the treated TCCSUP cancer cell lines indicated relevant morphological changes, such as cell membrane deformation, cell shrinkage, loss of colony formation, while some cells adopted a spherical shape as consequence of the antiproliferative mechanism of the essential oil. BITC from *T. majus* showed strong antimicrobial and anti-adhesive activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

The results of the analyzes of fatty acid composition in mustards and *T. majus* seed oils after two extraction techniques show the highest content of erucic acid in *T. majus* and the highest oil yield in black mustard after Soxhlet extraction of all analyzed samples.

**Keywords:** mustards; *Tropaeolum majus* (nasturtium); UHPLC-DAD-MS/MS; GC-MS/MS; glucosinolates; isothiocyanates; *in vitro* digestion; biological activity; Clevenger hydrodistillation; microwave distillation (MAD); microwave hydrodiffusion and gravity (MHG); microscopy

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 2. OPĆI DIO .....   | 3  |
| 2.1. Red Brassicales.....   | 4  |
| 2.1.1. Porodica Brassicaceae.....   | 4  |
| 2.1.1.1. Gorušice.....  | 5  |
| 2.1.1.1.1. Bijela gorušica ( <i>Sinapis alba</i> L.) .....                                      | 6  |
| 2.1.1.1.2. Smeđa ( <i>Brassica juncea</i> L.) i crna gorušica ( <i>Brassica nigra</i> L.) ..... | 7  |
| 2.1.2. Porodica Tropaeolocaceae .....   | 9  |
| 2.1.2.1. Dragoljub ( <i>Tropaeolum majus</i> L.) .....  | 9  |
| 2.2. Glukozinolati .....  | 11 |
| 2.2.1. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata.....                                     | 12 |
| 2.2.2. Razgradni produkti glukozinolata .....   | 14 |
| 2.2.2.1. Izotiocijanati .....   | 16 |
| 2.2.2.2. Nitrili i epitionitrili .....  | 16 |
| 2.3. Biološka dostupnost i bioraspoloživost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata       | 17 |
| 2.3.1. <i>In vitro</i> probava .....  | 18 |
| 2.3.1.1. <i>In vitro</i> probava glukozinolata i izotiocijanata .....                           | 19 |
| 2.4. Biološka aktivnost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata .....                     | 20 |
| 2.4.1. Hipoglikemijska aktivnost .....  | 22 |
| 2.4.2. Antikancerogena aktivnost.....   | 23 |
| 2.4.3. Proapoptotska aktivnost .....  | 24 |
| 2.4.4. Antimikrobna i antifungalna aktivnost .....  | 24 |
| 2.5. Udio ulja i sastav masnih kiselina u biljkama iz porodice Brassicaceae .....               | 25 |
| 2.5.1. Primjena ulja biljaka iz porodice Brassicaceae .....                                     | 27 |
| 2.6. Ekstrakcija .....  | 28 |



|   |    |
|---|----|
| 2.6.1. Zelena ekstrakcija .....   | 30 |
| 2.6.2. Ekološki prihvatljive metode ekstrakcije .....   | 31 |
| 2.6.2.1. Mikrovalna ekstrakcija .....   | 32 |
| 2.6.2.2. Ekstrakcija superkričnim fluidom .....   | 33 |
| 2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....                                       | 35 |
| 2.8. Plinska kromatografija .....   | 37 |
| 2.8.1. Plinska kromatografija – masena spektrometrija .....                                     | 38 |
| 2.9. Protočna citometrija .....   | 39 |
| 2.10. Mikroskopija atomskih sila.....   | 39 |
| 2.11. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....   | 40 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....  | 42 |
| 3.1. Kemikalije i aparatura .....   | 43 |
| 3.2. Priprema biljnog materijala .....  | 45 |
| 3.2.1. Biljni materijal.....  | 45 |
| 3.2.2. Priprema biljnog materijala za ekstrakciju glukozinolata.....                            | 46 |
| 3.2.3. Priprema biljnog materijala za ekstrakciju eteričnih ulja i ekstrakata.....              | 46 |
| 3.3. Metode ekstrakcije .....   | 46 |
| 3.3.1. Metoda ekstrakcije glukozinolata.....  | 46 |
| 3.3.2. Metode ekstrakcije eteričnih ulja i ekstrakata .....                                     | 48 |
| 3.3.2.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva Clevenger hidrodestilacijom .....                       | 48 |
| 3.3.2.2. Mikrovalna ekstrakcija .....   | 49 |
| 3.3.2.2.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva destilacijom potpomognutom mikrovalovima (MAD) .....  | 49 |
| 3.3.2.2.2. Ekstrakcija hlapljivih spojeva mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG) ..... | 50 |
| 3.4. Desulfatacija glukozinolata .....  | 51 |
| 3.5. Određivanje prinosa eteričnih ulja i ekstrakata.....                                       | 52 |
| 3.6. UHPLC-MS/MS .....  | 53 |

|  |    |
|--|----|
| 3.7. Plinska kromatografija-masena spektrometrija .....  | 54 |
| 3.8. Probava .....   | 56 |
| 3.8.1. Prikupljanje ljudskih probavnih sokova.....   | 56 |
| 3.8.2. Određivanje enzimske aktivnosti ljudskih probavnih sokova.....                                      | 56 |
| 3.8.3. Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) - ljudski i komercijalni enzimi ..... | 57 |
| 3.8.4. <i>In vitro</i> metoda probave s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima .....                  | 59 |
| 3.9. Hipoglikemijska aktivnost glukozinolata .....   | 62 |
| 3.9.1. Inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze.....  | 62 |
| 3.9.2. Inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze .....   | 62 |
| 3.10. Antiproliferativna aktivnost.....  | 63 |
| 3.10.1. Postupak uzgoja i nasađivanja stanica za MTT metodu .....  | 63 |
| 3.10.2. Antiproliferativna aktivnost MTT metodom.....  | 63 |
| 3.10.3. Antiproliferativna aktivnost MTS metodom .....   | 64 |
| 3.11. Proapoptotska aktivnost.....   | 65 |
| 3.12. AFM mikroskopija.....  | 67 |
| 3.13. Antibakterijska aktivnost.....   | 67 |
| 3.13.1. Sojevi bakterija i uvjeti rasta .....  | 67 |
| 3.13.2. Antibakterijska aktivnost visokog dragoljuba .....   | 68 |
| 3.13.3. Kinetika rasta bakterija .....   | 68 |
| 3.13.4. Antiadhezijski test.....   | 69 |
| 3.14. Statistička analiza.....   | 69 |
| 3.15. DODATAK.....   | 71 |
| 3.15.1. Optička i skenirajuća elektronska mikroskopija.....  | 71 |
| 3.15.2. Ekstrakcija masti i ulja.....  | 71 |
| 3.15.2.1. Soxhlet ekstrakcija .....  | 71 |
| 3.15.2.2. Ekstrakcija superkritičnim CO <sub>2</sub> fluidom (SCO <sub>2</sub> ) .....                     | 71 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.15.3. Sastav masnih kiselina .....   | 72  |
| 4. REZULTATI.....  | 74  |
| 4.1. HPLC-MS analiza glukozinolata u analiziranim uzorcima.....  | 75  |
| 4.2. GC-MS analiza eteričnih ulja i ekstrakata različitih vrsta gorušice i visokog dragoljuba .....                              | 80  |
| 4.3. Stabilnost (biodostupnost) glukozinolata i izotiocijanata u ispitivanim uzorcima .....                                      | 86  |
| 4.4. Hipoglikemijska aktivnost analiziranih uzoraka glukozinolata.....   | 92  |
| 4.5. Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata ispitivanih uzoraka.....   | 93  |
| 4.6. Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba .....   | 99  |
| 4.7. Antiproliferativni mehanizam eteričnog ulja visokog dragoljuba sniman optičkom i AFM mikroskopijom.....                     | 101 |
| 4.8. Antibakterijska aktivnost spojeva prisutnih u visokom dragoljubu.....   | 106 |
| 4.8.1. Učinak hlapljivih spojeva prisutnih u sjemenu visokog dragoljuba na prijanjanje bakterija na polistirensku površinu ..... | 112 |
| 4.9. DODATAK.....  | 115 |
| 4.9.1. Površina sjemena smeđe i crne gorušice optičkom i SEM mikroskopijom.....  | 115 |
| 4.9.2. Sastav masnih kiselina i prinos ulja u analiziranim uzorcima .....  | 117 |
| 5. RASPRAVA .....  | 120 |
| 5.1. Kemijska analiza.....   | 121 |
| 5.1.1. HPLC-DAD-MS/MS glukozinolata u hidroetanolnim ekstraktima .....   | 121 |
| 5.1.2. GC-MS analiza razgradnih produkata glukozinolata u eteričnim uljima i ekstraktima gorušica i visokog dragoljuba .....     | 123 |
| 5.2. <i>In vitro</i> probava.....  | 126 |
| 5.2.1. <i>In vitro</i> probava glukozinolata .....   | 126 |
| 5.2.2. <i>In vitro</i> probava izotiocijanata.....   | 129 |
| 5.3. Hipoglikemijska aktivnost glukozinolata u gorušicama i visokom dragoljubu .....   | 132 |
| 5.4. Antiproliferativna aktivnost.....   | 133 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.4.1. Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata smeđe i crne gorušice MTT metodom .....                            | 133 |
| 5.4.2. Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta dragoljuba, te čistih spojeva BITC-a i BCN-a MTT i MTS metodom..... | 134 |
| 5.5. Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba .....   | 138 |
| 5.6. Antiproliferativni mehanizam eteričnog ulja visokog dragoljuba .....  | 139 |
| 5.7. Antibakterijska aktivnost spojeva prisutnih u visokom dragoljubu.....   | 141 |
| 5.8. DODATAK.....  | 144 |
| 5.8.1. Površinska morfologija sjemena gorušice snimana optičkom i SEM mikroskopijom .....  | 144 |
| 5.8.2. Prinos ulja i sastav masnih kiselina iz sjemenki gorušica i dragoljuba nakon dviju tehnika ekstrakcije.....                 | 144 |
| 6. ZAKLJUČCI .....   | 148 |
| 7. LITERATURA.....   | 151 |
| 8. PRILOG .....  | 175 |
| ŽIVOTOPIS .....  | 177 |
| POPIS ZNANSTVENIH RADOVA.....  | 179 |

# **1. UVOD**

Znanstvena istraživanja posljednjih godina usredotočena su na različite biološke aktivnosti biljaka koje pripadaju redu Brassicales zbog visoke prisutnosti glukozinolata i njihovih razgradnih produkata. Karakteristika svih glukozinolata je kemijska stabilnost i biološka neaktivnost koja je prisutna sve dok ne nastupi kemijska, mehanička ili termička obrada biljke. Mehaničkom obradom biljke, branjem, ali i žvakanjem dolazi do ostvarivanja kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata zbog čega nastaju brojni biološki aktivni spojevi poput izotiocijanata, nitrila, epitionitrila i drugih. Općenito je poznato da su izotiocijanati, najpoznatiji razgradni produkti glukozinolata, biološki najaktivniji, ali u prisutnosti epitijspecifičnog proteina mogu nastati gore spomenuti epitionitrili i nitrili. S obzirom na njihovu veliku zastupljenost u biljnim vrstama, često su predmet istraživanja u svrhu ispitivanja njihovog biološkog značaja. Biološke aktivnosti koje im se pripisuju su antikancerogena, antimikrobna, antifungalna i protuupalna aktivnost. Bioiskoristivost pojedinih bioaktivnih komponenti koje se nalaze u hrani nije uvijek poznata. Da bi bioaktivna komponenta bila bioiskoristiva, prvo mora biti oslobođena (biodostupna) iz matriksa hrane te modificirana u gastrointestinalnom sustavu. Prije zaključka o mogućim učincima na zdravlje čovjeka, prvo se mora provjeriti kako proces probave utječe na stabilnost bioaktivnih komponenti, odnosno na njihovu biodostupnost i bioiskoristivost. Za ispitivanje gastrointestinalne stabilnosti glukozinolata i njihovih razgradnih produkata najčešće se koristi dvofazni *in vitro* model probave. Iako *in vivo* modeli daju najpreciznije rezultate, *in vitro* modeli probave su jeftiniji, brži i pristupačniji. Većina *in vitro* modela koristi komercijalne enzime, ali s ljudskim probavnim enzimima očekuju se relevantniji rezultati.

U cilju očuvanja stabilnosti i većeg prinosa hlapljivih spojeva, ali i prinosa masnih kiselina, tehnike ekstrakcije imaju važnu ulogu. Među ekološkim tehnologijama, odnosno zelenim tehnologijama koje koriste manje količine organskih otapala ili koriste ekološki prihvatljiva otapala sa smanjenom potrošnjom energije i skraćenim vremenom za ekstrakciju biljnih vrsta su i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ekstrakcija superkritičnim fluidima.

Biljke reda Brassicales, osim što su izvrstan izvor biološki aktivnih komponenti, također su obilan izvor ulja. Usjevi uljarica iz reda Brassicales jedan su od najvažnijih izvora jestivih biljnih ulja u svijetu. Također, posljednjih desetljeća Brassica uljarice također su privukle pažnju zbog njihovih drugih potencijala, ne samo kao izvor jestivih ulja, već i kao izvor biogoriva i industrijska sirovina. Ove biljke su od interesa za upotrebu u kozmetici, u medicinske svrhe, u industriji za maziva te za ljepljive i biorazgradive plastične proizvode.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Red Brassicales

Red Brassicales, unatoč tome što se njegovo ime odnosi na kupusnjače (Brassicaceae) koje prvenstveno dominiraju sjevernom hemisferom, rasprostranjen je na svim kontinentima osim Antarktike (Lysak, 2018). Brassicales je morfološki raznolik red od 4700 vrsta i 400 rodova raspoređenih u 17 porodica, osim porodice Koeberlinaceae, čija je zajednička karakteristika prisutnost gorušičinih ulja ili glukozinolata (GSL-a) (Cardinal-McTeague i sur., 2016; Lysak, 2018). Raznolikost i važnost porodice Brassicaceae, najveće porodice reda Brassicales koja se sastoji od 3997 vrsta u 341 rodu, zasjenjuje preostalih šesnaest porodica (Lysak, 2018).

### 2.1.1. Porodica Brassicaceae

Porodica Brassicaceae (obitelj kupusnjača) sadrži više od 350 rodova i 3500 vrsta, od kojih se neke koriste kao hrana, začini i izvori biljnog ulja i zauzimaju velik udio u prehrani ljudi zbog visoke hranjive vrijednosti i fitokemikalija poput fenola, vitamina, vlakana, šećera, GSL-a (izotiocijanati), polifenola, masti i karotenoida (Fernandez-Leon i sur., 2017; Jahangir i sur., 2009; Nawaz i sur., 2018; Cuomo i sur., 2015). Biljke poput brokule, kelja, cvjetače, kupusa i gorušice spadaju u dominantne prehrambene usjeve u svijetu i glavni su izvor GSL-a u svakodnevnoj ljudskoj prehrani (Herr i Buchler, 2010). Sadržaj GSL-a u biljkama ovisi o njihovoj vrsti, uzgoju, klimi te agronomskoj praksi. Karakteristika svih GSL-a je kemijska stabilnost i biološka neaktivnost koja je prisutna sve dok ne nastupi kemijska, mehanička ili termička obrada biljke. Mehaničkom obradom biljke, branjem, ali i žvakanjem dolazi do ostvarivanja kontakta između enzima mirozinaze i GSL-a. Njihova interakcija uz prisustvo vode rezultira hidrolizom GSL-a prilikom čega se oslobađaju brojni biološki aktivni spojevi poput nitrila, izotiocijanata (ITC-a), cijanida te oksazolidintiona (Barba i sur., 2016). Biljke iz porodice Brassicaceae mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, a u nekim slučajevima, polugrmovi i grmovi uglavnom rašireni u izvantropskim područjima sjeverne Zemljine polutke pa dosežu do hladnih arktičkih područja, a u planinama do gornje granice vegetacije. Cvjetovi biljaka kupusnjača su pravilni i dvospolni, slobodnih latica, a građeni su na osnovi broja četiri: sastoje se od 4 lapa, 4 latice, 4 duža, unutarnja prašnika i 2 kraća, vanjska prašnika (slika 1). Također, cvjetovi mogu biti dvostruki (čашka i vjenčić) ili jednostavni te skupljeni u cvatove ili pojedinačni. Kod ovih biljaka, plodnica je jednogradna ili dvogradna, a plodovi su najčešće komuške različitog oblika (Zekić, 2012).





**Slika 1.** Biljke kupusnjače: 1. cvijet, 2. plod komuška, 3. plod komuščica. (Hrvatska enciklopedija, 2022).

#### 2.1.1.1. Gorušice

Gorušice se nalaze među najstarijim zabilježenim začinima što se vidi u sanskrtskim zapisima koji datiraju oko 3000. godine prije Krista te su jedne od prvih pripitomljenih usjeva. Izvorno je to bio začin poznat kao senf, a riječ je potekla od latinske riječi *mustum*, što znači mošt. Mošt, sok od grožđa ili drugog voća pomiješan sa sjemenkama gorušice da bi se formirao *must ardens* („vrući ili gorući mošt“), bio je rimski specijalitet. Ljubav Rimljana prema gorušicama prenijela se cijelom Europom gdje su postale popularne za začinjavanje mesa i ribe (Thomas i sur., 2004). Danas je u svijetu dostupno bezbroj sorti gorušica, od kojih svaka odražava lokalnu, regionalnu i nacionalnu kuhinju. Osim tradicionalne uporabe sjemena u medicini i u prehrani, ove se biljke također koriste kao sirovina za prehrambene proizvode i stočnu hranu te u kemijskoj i kozmetičkoj industriji. No, danas također postoji sve veći interes za njihove fitosanitarne funkcije u odnosu na neke bolesti, štetočine i korov (Swarcewicz i sur., 2013). Biljke gorušice pripadaju porodici Brassicaceae, a suho sjeme je glavni dio biljke koji se koristi u preradi hrane (senf). Uobičajene vrste gorušice su žuta ili bijela (*Sinapis alba* L.), smeđa (*Brassica juncea* L.) i crna gorušica (*Brassica nigra* L.). Gorušice imaju bogat kemijski sastav i njezino brašno sjemena se naširoko koristi u preradi hrane. Gorušice se koriste i zbog svog začinskog okusa koji je proizveden zahvaljujući hidrolizi glukozinolata enzimima mirozinaze. Sjeme gorušice se najčešće koristi kao začin, međutim, njezin povoljni kemijski sastav i relativno niska cijena nude široke mogućnosti za upotrebu kao aditivi u ljudskoj hrani

i hrani za životinje (Okunade i sur., 2015). GSL-i (tioglukozidi) u gorušicama su pseudo-tioglukozidi koji sadrže dušik i sumpor. Enzimi mirozinaze su glukohidrolaze. GSL-i i enzimi mirozinaze prisutni su zajedno u odvojenim odjeljcima biljaka. Nakon oštećenja biljnog tkiva GSL-i se hidroliziraju te stvaraju različite spojeve od kojih su neki biološki aktivni (ITC-i, indoli). Ovi spojevi su od neizmjernog interesa za preradu hrane (okus, aroma i druga svojstva) i zbog benefita na ljudsko zdravlje (antikancerogena i antimikrobna svojstva) (Okunade i sur., 2015).

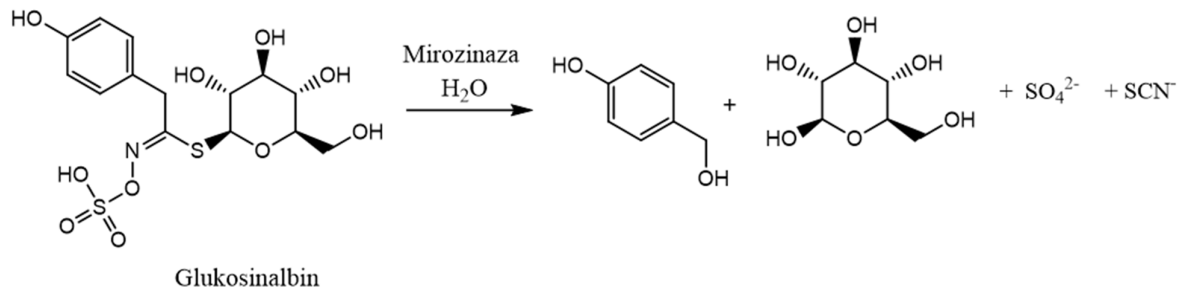
#### 2.1.1.1.1. Bijela gorušica (*Sinapis alba* L.)

Danas se najčešće uzgajaju tri komercijalne vrste gorušice. To su žuta ili bijela gorušica (*Sinapis alba* L.) (slika 2), crna gorušica (*Brassica nigra* L.) i smeđa ili orijentalna gorušica (*Brassica juncea* L.). Gorušica je bila jedna od najranije udomaćenih usjeva i proširena je u Aziju, Sjevernu Afriku i Europu tijekom tisuća godina (Ekanayake i sur., 2016).



**Slika 2.** Sjeme bijele gorušice (Acharya, 2014).

Glavni GSL pronađen u bijeloj gorušici je glukosinalbin (Herzallah i Holley, 2012) ili 4-hidroksibenzil-GSL koji se hidrolizira u nestabilni ITC koji se neenzimski pretvara u  $\text{SCN}^-$ , fitotoksični spoj (slika 3) (Popova i Morra, 2014).



**Slika 3.** Hidroliza glukosinalbina enzimom mirozinazom (vlastiti prikaz).

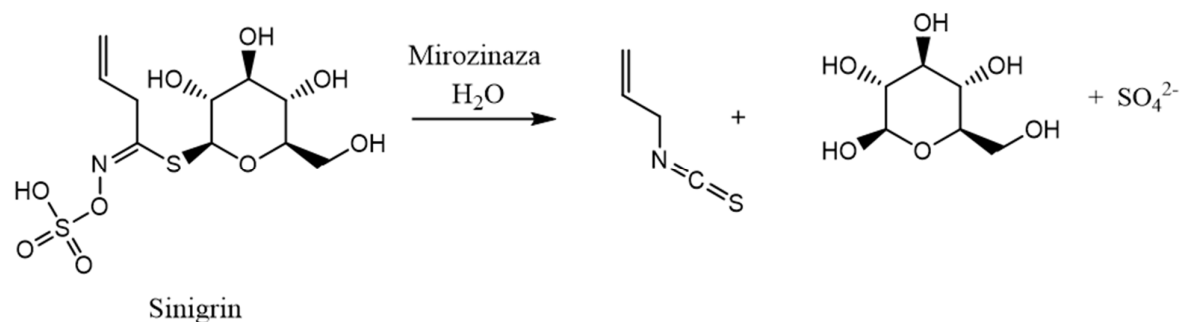
#### 2.1.1.1.2. Smeđa (*Brassica juncea* L.) i crna gorušica (*Brassica nigra* L.)

Smeđa i crna gorušica, biljke koje pripadaju porodici Brassicaceae, sadrže GSL-e koji se u dodiru s enzimom mirozinazom raspadaju u ITC-e koji senfu daju okus (Herzallah i Holley, 2012) (slika 4a i 4b). Uz to, senf se koristi u različitim tradicionalnim lijekovima za poticanje apetita, kao laksativ, ekspektorans, kao antiseptik za razne gastrointestinalne, respiratorne i kožne bolesti (Abdul-Fadl i sur., 2011.). Smeđa gorušica od davnina se koristila za uklanjanje karijesnog izljeva, ublažavanje bolova i utrnulosti zglobova, ublažavanje kašlja i smanjenje otekline, dok se crna gorušica koristila u liječenju reume, neuralgije, alopecije, epilepsije, ugriza zmije, zubobolje, karcinoma i tumora grla (Al-Snafi, 2015). Glavni GSL u smeđoj gorušici, sinigrin (prop-2-enil-glukozinolat) prikazan na slici 5, a koji je također prisutan u crnoj gorušici, hidrolizira se dajući hlapljivi i biološki aktivni spoj prop-2-enil-ITC (alil izotiocijanat) (Popova et Morra, 2014; Mazumder i sur., 2016).



**Slika 4.** Sjeme smeđe ili orijentalne gorušice (*Brassica juncea* L.) (a) , sjeme crne gorušice (*Brassica nigra* L.) (b). (Farmashop, 2022; Biogreen, 2022)

GSL koji je najviše zastupljen u crnoj gorušici je glukonapin (but-3-enil-glukozinolat) čiji razgradni produkti but-3-enil-ITC i 4,5-epitiopentanonitril pokazuju različite biološke aktivnosti (Vrca i sur., 2021a). GSL-i u smeđoj gorušici raspoređeni su u takozvanim S-stanicama, u neposrednoj blizini ili u kontaktu s mirozinskim stanicama (Kissen i sur., 2009; Koroleva i sur., 2000). Sinigrin (prop-2-enil-GSL) jedini je GSL koji je imunohistokemijski identificiran u zamecima smeđe gorušice (Andreasson i sur., 2001).



**Slika 5.** Hidroliza sinigrina enzimom mirozinazom (vlastiti prikaz).

Površinska morfologija sjemena gorušice izvana nalikuje loptici za golf i posjeduje polupravan niz grebena koji dijele omotač sjemena gorušice dajući mrežu koja podsjeća na uzorak pčelinjih saća (Holley i sur., 1983).

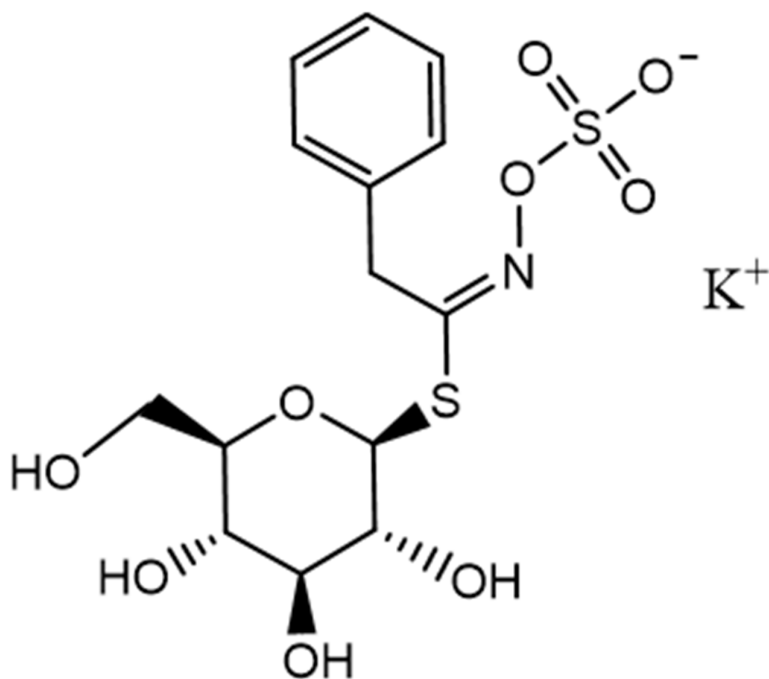
### 2.1.2. Porodica Tropaeolaceae

Porodica Tropaeolaceae pripada također redu Brassicales, a sastoji se od 92 vrste jednog roda – *Tropaeolum*. Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je biljka koja pripada porodici Tropaeolaceae (dragoljupke), a poznata je po svojim ukrasnim i ljekovitim svojstvima (Garzon and Wrolstad, 2009; Vrca i sur., 2021b).

#### 2.1.2.1. Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.)

Dragoljub je ukrasna, jednogodišnja, brzorastuća, grmovita ili razgranata (oko 30 cm visoka) te visoka ili penjajuća (može narasti do 90 cm) biljka (Niizu i Rodriguez-Amaya, 2005). Vrste biljke dragoljub razlikuju se prema strukturi, veličini i boji cvijeta (Jakubczyk i sur., 2018). Ova biljka poznata je po svojim ukrasnim svojstvima, njeni listovi i cvjetovi su jestivi te se koriste u salatama, gdje daju paprikast okus zbog prisutnosti GSL-a. Cvjetovi su obično žute, crvene ili narančaste boje koja je i najčešća (Garzon i Wrolstad, 2009). Njegova terapijska svojstva su zabilježena u brojnim radovima. Biljka se koristi u andskoj biljnoj medicini kao dezinficijens, za zacjeljivanje rana, antibiotik, kao ekspektorans za ublažavanje stanja na prsima i zbog svojih antiaskorbutskih svojstava (Garzon i Wrolstad, 2009). U Europi se uzgaja od sedamnaestog stoljeća zbog upotrebe u narodnoj medicini i kao ukrasna biljka. Fitokemijska ispitivanja biljke dragoljub izvijestila su o prisutnosti sumporovih spojeva (glukozinolat glukotropeolin), flavonoida (kvercetin i kempferol), antocijana (delfinidin, cijanidin i pelargonidin), karotenoida (lutein, zeaksantin, beta karoten), fenolnih kiselina (klorogenska kiselina), kukurbitacina i vitamina C (Bazytko i sur., 2013). Biljka dragoljub spominje se u udžbenicima iz farmakognozije i fitoterapije kao lijek za liječenje gornjih dišnih putova (tonzilitis, bronhitis) i bolesti mokraćnog sustava (Bazytko i sur., 2013). Štoviše, koristi se izvana u dermatologiji i kozmetologiji za liječenje bolesti kože, noktiju i kose (perut sa svrbežom i ljuštenjem), za liječenje opekline od sunca, površne opekline i pelenski osip (Bazytko i sur., 2013). Nadalje, dragoljub zbog visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva koji su vrijedne komponente u prehrani smatra se izuzetno važnom sirovinom. Dragoljub se, kao što je već spomenuto, koristi i u kuhinji. Marinirani u octu, nerazvijeni cvjetni pupoljci koriste se u jelima kao zamjena za kapare, dok se sjeckani nezreli plodovi mogu dodati u umak od tartara umjesto hrena. Cvjetovi dragoljuba dodaju se u juhe, meso, jela od tjestenine i namaze. U Kanadi skuta sa cvijetom dragoljuba je vrlo popularna. Štoviše, lišće, stabljika i cvjetovi dragoljuba koriste se za pripremu biljnog octa (Bazytko i sur., 2013).

Zbog zastupljenosti spojeva iz skupine GSL-a u biološkom smislu se smatra vrijednom biljkom jer njihovi razgradni produkti (ITC-i) imaju širok spektar bioloških aktivnosti poput antikancerogene, antimikrobne i protuupalne aktivnosti (Wu i sur., 2009; Romeo i sur., 2018; Wagner i sur., 2011). Antimikrobna aktivnost biljke dragoljub može se pripisati benzil-ITC-u koji je glavni razgradni produkt GSL-a glukotropeolina (slika 6) (Bazytko i sur., 2013).



**Slika 6.** Glukozinolat glukotropeolin (vlastiti prikaz).

Različiti dijelovi biljke dragoljub (slika 7) koriste se i zbog svojih antidijabetičkih svojstava i svojstava protiv pretilosti (Jurca i sur., 2018).



**Slika 7.** Sjeme biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) (Šalić, 2010).

## 2.2. Glukozinolati

Glukozinolati (GSL-i) su specijalizirani biljni metaboliti koji se nalaze u biljkama iz porodice Brassicaceae i Tropaeolaceae, spadaju u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. fitokemikalija, kemijski su stabilni i biološki neaktivni sve dok su fizički odvojeni od enzima mirozinaze u biljkama (Blažević i sur., 2020a; Stelter i sur., 2014; Vrca i sur., 2021b). Ukoliko dođe do oštećenja strukture tkiva koje može biti uzrokovano na različite načine (branje, mehanička obrada, pomoću štetočina, sjeckanje, žvakanje...), nastupit će razgradnja GSL-a jer je došlo do kontakta s enzimom mirozinazom. GSL-i se mogu razgraditi enzimski, termički ili kemijski, djelovanjem kiseline ili baze. Hidrolizom GSL-a nastaju brojni spojevi poput ITC-a, tiocijanata, cijanida, oksazolidintiona i nitrila koji pokazuju biološku aktivnost poput antikancerogene, antimikrobne, antifungalne i protuupalne (Barba i sur., 2016; Stelter i sur., 2014). Dobivanje razgradnih produkata hidrolizom GSL-a ovisi o fiziološkim uvjetima kao što je pH i prisutnost određenih kofaktora (Kumar i sur., 2015). Pri neutralnom pH stvarat će se ITC-i, a pri kiselom pH nitrili će postati poželjni produkti (Eschliman i Bossmann, 2019). Različiti dijelovi iste biljke također predstavljaju kvantitativne i kvalitativne razlike u sadržaju GSL-a s drugim čimbenicima kao što su starost biljke i uvjeti rasta okoliša koji utječu na sami

profil GSL-a. Prva zapažanja o jedinstvenim svojstvima GSL-a i ITC-a zabilježeni su početkom 17. stoljeća kao rezultati studija o kemijskom podrijetlu oštrog okusa sjemenki gorušice. GSL-i poznati kao sinigrin (prop-2-enil) i sinalbin (4-hidroksibenzil) izolirani su početkom 30-tih godina 19. stoljeća iz crnih i bijelih sjemenki gorušice. Prva struktura GSL-a predložena je od strane Gadamera 1897., a 1956. godine Ettlinger i Lundeen predložili su ispravnu strukturu GSL-a i opisali su prvu kemijsku sintezu GSL-a (Cartea i Velasco, 2008). Ovisno o prekursoru aglukonskog lanca, GSL-i su klasificirani na alifatske, aromatske i indolne (Ishida i sur., 2014). Blažević i sur. (2020b) su u sveobuhvatnom, kritičkom pregledu strukturne raznolikosti glukozinolata utvrdili da je do sredine 2018. g. samo 88 struktura od 137 pronađenih u biljkama, potvrđeno modernim spektroskopskim tehnikama (MS, NMR). Montaut i sur. (2020) su izvijestili da su pronašli glukozinolat 4'-O- $\beta$ -D-apiofuranozilglukomatronalin, izoliran iz biljaka *Hesperis laciniata* All. i *Hesperis matronalis* L. (Brassicaceae).

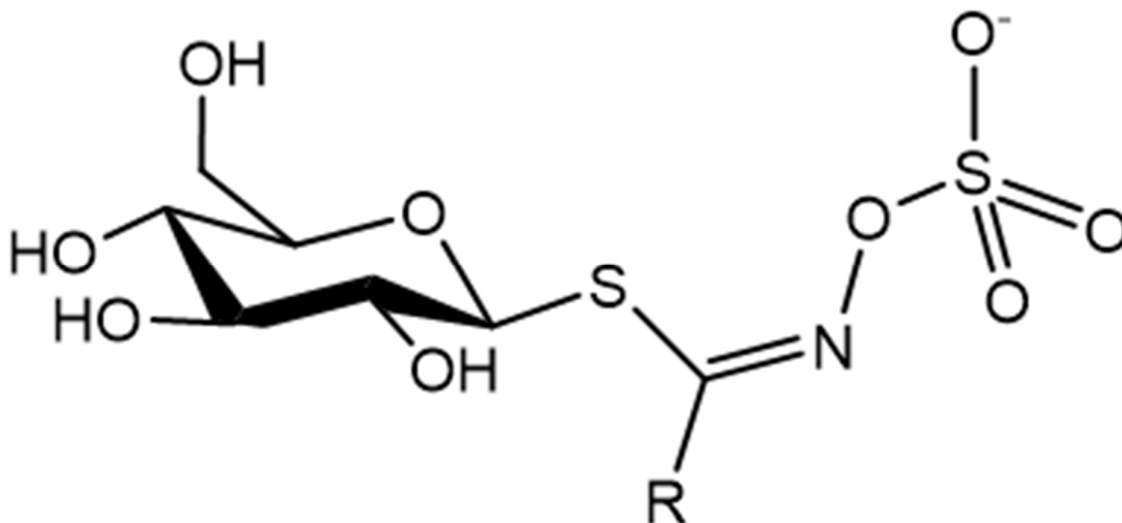
### 2.2.1. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata

GSL-i su organski anioni topljivi u vodi koji u svojoj strukturi imaju prepoznatljive zajedničke skupine, ali i skupinu prema kojoj su individualizirani (slika 8). GSL-i su  $\beta$ -tioglukozidni-N-hidroksisulfati (poznati još i kao Z-N-hidroksiminosulfatni esteri ili S-glukopiranozil tiohidroksimati) s varijabilnim bočnim lancem.

Kemijski su stabilni, biološki neaktivni, hidrofilni i nehlapljivi spojevi koji se pohranjuju u biljnim vakuolama, a sastoje se od:

- ❖  $\beta$ -D-glukopiranske jedinice,
- ❖ O-sulfonirane anomerne Z-tiohidroksimatske funkcijske skupine i
- ❖ varijabilnog aglukonskog bočnog lanca (Halkier i Gershenzon, 2006).





**Slika 8.** Opća struktura glukozinolata gdje je R varijabilni dio lanca iz aminokiseline (vlastiti prikaz).

Većina GSL-a sadrži ravni ili razgranati ugljikovodični lanac, a često su u strukturi prisutne i dvostruke veze, hidroksilne i karbonilne skupine te kovalentno vezani sumpor. Čak jedna trećina GSL-a u svojoj strukturi sadrži atom sumpora u raznim oksidacijskim stanjima. Također određeni dio benzilnih GSL-a u strukturi posjeduju šećere ramnozu i arabinozu koje su glikozidnom vezom povezane s aromatskim prstenom. (Blažević i sur., 2012; Blažević i sur, 2020b).

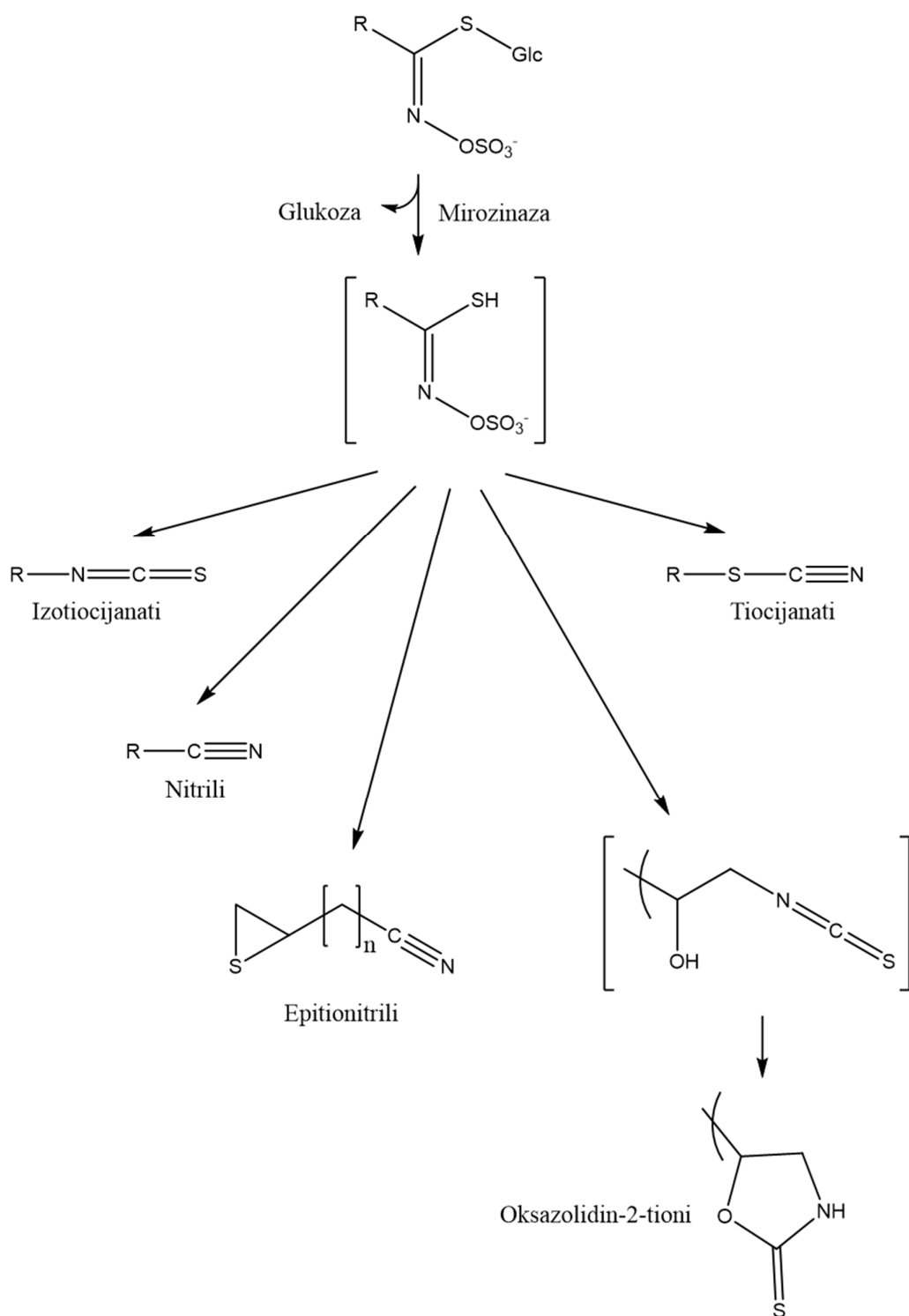
Pri imenovanju GSL-a koriste se trivijalna imena, ali i polusistematska nomenklatura koju su uveli Ettlinger i Dateo 1961. godine. Trivijalna nomenklatura se zasniva na dodavanju prefiksa „gluko“ i sufiksa „in“ latinskom imenu biljke iz koje je pojedini GSL prvi put izoliran. Ime dobiveno primjenom polusistematske nomenklature se sastoji od sufiksa „glukozinolat“ i prefiksa koji odgovara nomenklaturi bočnog lanca (R) (Blažević, 2009; Blažević i sur, 2020b). Mogu se klasificirati prema njihovom biosintetskom prekursoru aminokiselini i strukturi u bočnom lancu. Ovisno o prekursoru aglukonskog lanca, GSL-i su klasificirani na alifatske, aromatske i indolne. Spojevi dobiveni iz aminokiselina alanin (Ala), leucin (Leu), izoleucin (Ile), valin (Val) ili metionin (Met) nazvani su alifatskim GSL-ima, oni izvedeni iz fenilalanina (Phe) i tirozina (Tyr) nazivaju se aromatskim GSL-ima, a oni dobiveni iz triptofana (Trp) nazivaju se indolnim GSL-ima. Aglukonski lanci većine GSL-a potječu od tih aminokiselina,

pri čemu metionin prolazi kroz osobito širok raspon transformacija (Halkier i Gershenzon, 2009; Ishida i sur., 2014; Blažević i sur, 2020b).

### **2.2.2. Razgradni produkti glukozinolata**

Kada nastupi oštećivanje biljke štetočinama, žetvom, preradom hrane ili žvakanjem u ustima, tada GSL-i dolaze u kontakt s enzimom mirozinazom. Mirozinaza je skupina enzima lokalizirana u mirozinskim stanicama (floemi), koje su opažene u vegetativnim organima kulture usjeva Brassicaceae (Halkier i Gershenzon, 2006).

GSL-i se akumuliraju u S-stanicama koje su susjedne stanicama floema gdje se nalazi mirozinaza. Zapravo, prostorno odvajanje mirozinaze od GSL-a je osnova sustava GSL-mirozinaza. To dovodi do brze hidrolize glikozidne veze, oslobađajući glukozu i nestabilni međuprodukt - aglukon, čijim spontanom pregrađivanjem dolazi do nastanka raznih produkata razgradnje (Johnson, 2002a; Johnson, 2002b). Ovisno o strukturi bočnog lanca i prisutnosti dodatnih proteina i kofaktora, pregrađivanjem aglukona nastaju ITC-i, oksazolidin-2-tioni, nitrili, epitionitrili i tiocijanati, indoli (slika 9) (Barba i sur., 2016).



**Slika 9.** Hidroliza glukozinolata i njegovi razgradni produkti (vlastiti prikaz).

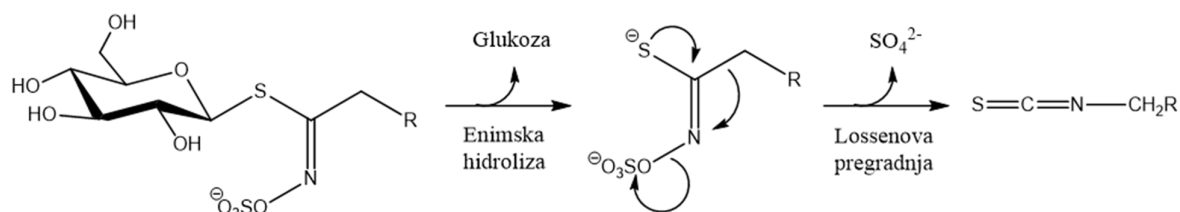
### 2.2.2.1. Izotiocijanati

Izotiocijanati (ITC-i) su prirodno prisutne organske komponente koje pripadaju visoko reaktivnim organo-sumpornim sintonima, s općom strukturom  $R-N=C=S$  (slika 10). To su hlapljivi spojevi, jakog okusa i arome koji nastaju pri neutralnom pH kada nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji. Količina ITC-a koja će nastati razgradnjom GSL-a ovisi ponajprije o načinu pripreme, ali i postupanju s biljkom (Kala i sur., 2018).

ITC-i prisutni u povrću odgovorni su za oštar okus biljke i aktivni su u njenom obrambenom sustavu, a potječu iz već spomenutih GSL-a.

Oni posjeduju snažno antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno, neuroprotektivno i kardioprotektivno djelovanje. ITC-i se smatraju netoksičnim i nisu zabilježeni ozbiljni štetni učinci kod ljudi, a u osnovi su esteri izotiocijanske kiseline (H-NCS) (Kala i sur., 2018).

ITC-i, skupina ljutih i gorkih spojeva koji se još nazivaju i "gorušičina ulja", vjerojatno su najznačajnije i najviše istraživane komponente (Johnson, 2002b).



**Slika 10.** Shema hidrolitičke razgradnje glukozinolata i dobivanje izotiocijanata (vlastiti prikaz).

### 2.2.2.2. Nitrili i epitiontrili

Za nastanak nitrila ( $R-C\equiv N$ ) kao razgradnih produkata GSL-a potreban je gubitak sumpora iz molekule. Kada je epitiospecifični protein (ESP) prisutan u biljnom materijalu, sadržaj ITC-a smanjen je u korist alternativnih razgradnih produkata GSL-a poput nitrila i epitiontrila (Vrca i sur., 2021a). Poznato je da se aktivnost ESP-a značajno smanjuje na temperaturi od 50 °C ili više (Mathuseski i sur., 2004).

### **2.3. Biološka dostupnost i bioraspoloživost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata**

Što se tiče hrane biljnog podrijetla, intenzivirano je uključivanje biljaka koje pripadaju porodici kupusnjača u prehranu, jer one sadrže hranjive tvari i spojeve koji utječu na očuvanje zdravstvene ravnoteže organizma poput vitamina i minerala, te bioaktivnih fitokemikalija (npr. GSL-i) (Abellán i sur., 2021). Njihova je zastupljenost u namirnici povezana s prevencijom upalnih procesa i razvoja karcinoma (Abellán i sur., 2021). Ovaj sastav povezan je s prevencijom nekoliko nezaraznih bolesti, kao što su upalni i tumorski procesi, s aktivnošću uklanjanja slobodnih radikala i prevencije različitih patoloških metaboličkih procesa (Abellán i sur., 2021). Brojne znanstvene studije su nastojale objasniti apsorpciju i metabolizam GSL-a kao i njihovih razgradnih produkata. Razumijevanje puteva apsorpcije GSL-a i njihovih razgradnih produkata u ljudskom organizmu je od velike važnosti, zbog bioloških svojstava koja pokazuju njihovi razgradni produkti, posebno ITC-i. Općenito, svaki GSL može istovremeno osigurati različite strukture aglukona, odnosno razgradnih produkata. Koja će se struktura aglukona točno oblikovati ovisi o uvjetima okoline i strukturi bočnog lanca GSL-a (Halkier i Gershenzon, 2006). Bioaktivnost ITC-a i indola ovisi o stupnju njihove bioraspoloživosti, koja je uvjetovana biodostupnošću GSL-a i njihovih produkata razgradnje u crijevnom traktu. Učinkovitost ovog procesa ovisi i o fizikalnim značajkama matrice hrane te o kemijskim karakteristikama ciljanih bioaktivnih spojeva (Abellán i sur., 2021).

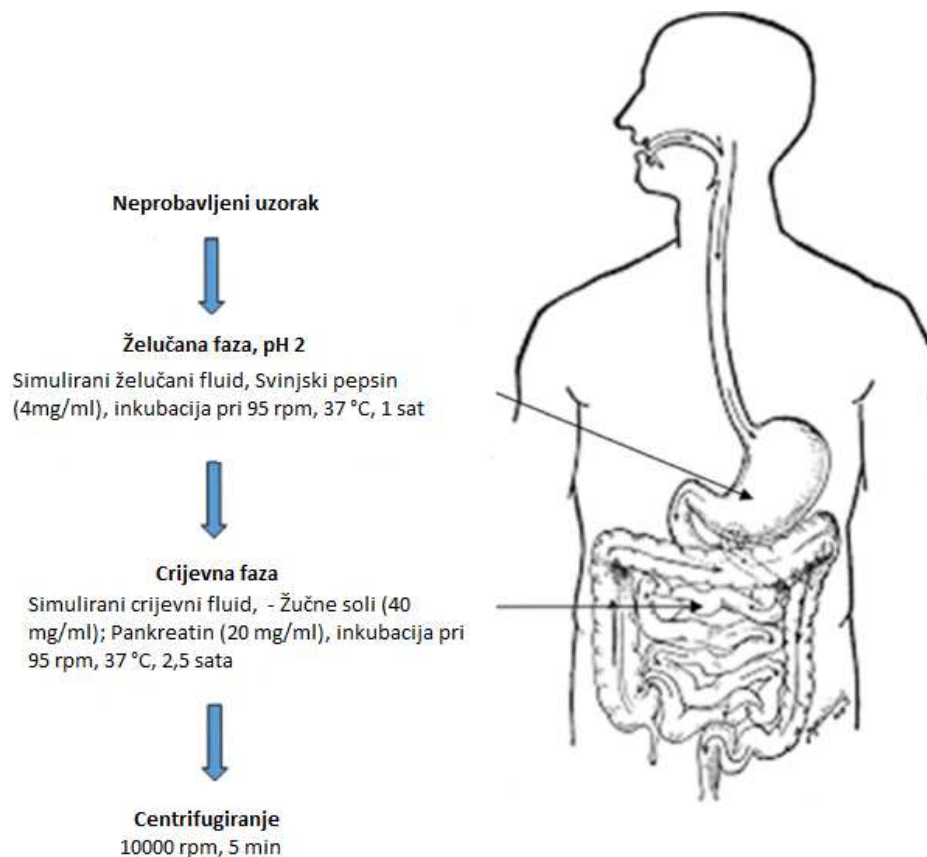
Biodostupnost se može definirati kao količina ili frakcija koja se oslobađa u probavnom traktu iz nekog prehrambenog proizvoda u gastrointestinalni trakt i time postaje dostupna za apsorpciju, dok bioraspoloživost uključuje također korištenje hranjivih tvari i stoga se može definirati kao dio unesenog hranjivog spoja koji dostiže sistemsku cirkulaciju i koristi se (Fernandez-Leon i sur., 2016). Podaci o bioraspoloživosti GSL-a i njihovih razgradnih produkata, odnosno njihovo oslobađanje iz biljnog matriksa, brzina apsorpcije, raspodjela u tkivima, metabolizam te izlučivanje u ljudskom organizmu su i dalje oskudni (Prieto i sur., 2019; Blažević i sur., 2020a). Apsorpcija GSL-a i njegovih produkata razgradnje u crijevu sluznicu i druga sistemska tkiva bitno ovise o vremenu i mjestu djelovanja enzima mirozinaze tijekom konzumiranja i probave kupusnjača (Barba i sur., 2016). Studije su pokazale da je koncentracija intaktnih GSL-a smanjena tijekom gastrointestinalne probave (Michaelsen i sur., 1994; Blažević i sur., 2020a). Nerazgrađeni GSL-i mogu se djelomice apsorbirati u samom želucu, a preostali GSL-i prolaze dalje kroz gastrointestinalni trakt kako bi došli do tankog crijeva gdje ih mogu hidrolizirati bakterijski enzimi nalik biljnim mirozinazama, a raspadni

produkti mogu biti apsorbirani. Preostali nehidrolizirani GSL-i prolaze u debelo crijevo i tu se hidroliziraju od strane bakterijske mirozinaze i molekule nastale generiranim raspadom se apsorbiraju ili izlučuju iz organizma (Barba i sur., 2016). Istraživanja pokazuju da konzumiranje svježih kupusnjača dovodi do poboljšane bioraspoloživosti ITC-a što doprinosi i većoj biološkoj aktivnosti unutar samog organizma (Barba i sur., 2016). Prema Abellán i sur. (2021) produkti razgradnje alifatskih GSL-a pokazali su najveću biodostupnost nakon *in vitro* gastrointestinalne probave, veću od skupine indolnih GSL-a.

### 2.3.1. *In vitro* probava

Stabilnost i biodostupnost pojedinih bioaktivnih komponenti koje se nalaze u hrani nisu uvijek poznate. Da bi bioaktivna komponenta bila biodostupna, prvo mora biti oslobođena iz matriksa hrane u gastrointestinalnom sustavu. Prije zaključka o mogućim učincima na zdravlje čovjeka, najprije se mora provjeriti kako proces probave utječe na stabilnost bioaktivnih komponenti, odnosno na njihovu biodostupnost. Biodostupnost se može ispitati postupcima *in vitro* probave koji se obično sastoji od dvije faze, oponašanje želučane i crijevne faze probave. Nekoliko faktora, uključujući karakteristike uzorka, enzimsku aktivnost, sastav iona i vrijeme probave imaju značajan utjecaj na rezultate metoda *in vitro* probave (Hur i sur., 2001). Ekstrakt zečjeg želuca (RGE) u kombinaciji s ekstraktom svinjske gušterače (PPE) može biti izvrsna zamjena za ljudske lipaze želuca i gušterače (Capolino i sur., 2011). Treba naglasiti da INFOGEST metoda pokazuje dobru korelaciju sa *in vivo* metodom probave u završnoj fazi svake faze probave (Brodkorb i sur., 2019). *In vitro* metoda s komercijalnim ili ljudskim probavnim sokovima temelji se na simulaciji želučane faze probave zakiseljavanjem uzorka do vrijednosti pH 2, što je približno jednako vrijednosti u želucu odrasle osobe. Također, simulacija probave u crijevima izvodi se neutralizacijom uzorka na približno pH 7, što je najbliže pH vrijednosti u crijevima odrasle osobe (slika 11) (Blažević i sur., 2020a). Razlike u profilu proteina i peptida dokazane su kada su komercijalni enzimi uspoređeni s ljudskim probavnim enzimima u simulaciji *in vitro* probavnih modela. Ove su studije pokazale da su ljudski probavni enzimi složeniji jer sadrže različite enzime, žučne soli i inhibitore enzima koji sudjeluju u procesu probave hrane. Pojedinačne varijacije koje su uočene kod ljudskih probavnih enzima uključuju razlike u enzimskoj aktivnosti i volumenu gastrointestinalnih sokova. Želučani pH varira ovisno o dobi i periodu hranjenja zbog čega ove varijacije također čine simulaciju *in vitro* probave izazovnom (Furlund i sur., 2012). Za *in vitro* probavu s

ljudskim probavnim sokovima, želučani i crijevni probavni sokovi se uzimaju od zdravih donora prilikom endoskopskog zahvata čija je anamneza unaprijed poznata. Uzorci se centrifugiraju da bi se uklonio mukus i ostaci stanica (Ulleberg i sur., 2011). Aspirati se zatim skupljaju i stavljaju u zamrzivač u alikvotima. Prije daljnje analize svi uzorci želučanih sokova te svi uzorci crijevnih sokova se pomiješaju u svrhu izbjegavanja interindividualnih razlika u enzimskoj aktivnosti (Almaas i sur., 2006).



**Slika 11.** Prikaz dvofaznog *in vitro* modela probave (Fawole i Opara, 2016).

### 2.3.1.1. *In vitro* probava glukozinolata i izotiocijanata

U cilju određivanja stupnja stabilnosti i biodostupnosti GSL-a i ITC-a nakon određene probavne faze, statičke *in vitro* metode probave najjednostavnije su metode za simulaciju metode probave *in vivo*. Unatoč očitim nedostacima, one također imaju svoje prednosti poput niske cijene, jednostavnosti, ponovljivosti i jednostavne simulacije svake faze probave

(Brodkorb i sur., 2019). Prema Fernandez-Leon i sur. (2017) *in vitro* probava uzrokuje redukciju GSL-a u biljkama iz porodice Brassicaceae. Vallejo i sur. (2004) su dokazali da su alifatski GSL-i više stabilni od indolnih GSL-a, samo 27% gubitka kod gastrične faze dok je kod indolnih GSL-a bio zabilježen gubitak od 73%. Također, manja stabilnost GSL-a kod pH 7 u crijevima vodi k razgradnji u ITC-e koji su ciljani biološki aktivni spojevi. Mikroflora u ljudskom crijevu može hidrolizirati GSL-e u bioaktivne spojeve, ali iskorištenje je mnogo niže u odnosu na ono koje je dobiveno iz biljnih mirozinaza (Okunade i sur., 2015). Prema dostupnoj znanstvenoj literaturi, nema podataka o gastrointestinalnoj stabilnosti glukotropeolina i njegovog razgradnog produkta benzil-ITC-a. Općenito, malo se zna o stabilnosti ITC-a tijekom procesa probave (Oliviero i sur., 2018). Postoje istraživanja koja su pratila *in vitro* probavu glukotropeolina uz prisustvo tri vrste bakterija iz roda Bifidobacterium (*B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. longum*) koje su uključene u degradaciju ovog spoja u debelom crijevu (treća faza probave) u kojem se nalaze bakterije iz roda Bifidobacterium kao dio crijevne mikroflore (Cheng i sur., 2004). Metoda probave *in vitro* s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima značajno utječu na sadržaj ITC-a nakon probave (Vrca i sur., 2021b).

#### **2.4. Biološka aktivnost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata**

Prethodno je spomenuto da su GSL-i kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi. Produkti GSL-a pokazuju određene biološke aktivnosti od kojih su najzastupljeniji ITC-i. Neke od bioloških aktivnosti koje im se pripisuju su antiproliferativna, antimikrobna i antifungalna aktivnost, a prikazane su u tablici 1 (Barba i sur., 2016).



**Tablica 1.** Neke biološke aktivnosti razgradnih produkata GSL-a (Barba i sur., 2016).

| <b>Biološka aktivnost</b>    | <b>Razgradni produkti glukozinolata</b> |
|------------------------------|---|
| Fungicidalna aktivnost       | Metil-ITC                               |
|                              | Etil-ITC                                |
|                              | Alil-ITC                                |
|                              | Prop-2-enil-ITC                         |
|                              | But-3-enil-ITC                          |
|                              | Pent-4-enil-ITC                         |
|                              | 3-Metilsulfinilpropil-ITC               |
|                              | Benzil-ITC                              |
|                              | Feniletil-ITC                           |
|                              | Indol-3-ilacetonitril                   |
| 5-Viniloksazolidin-2-tion    |   |
| Baktericidna aktivnost       | Metil-ITC                               |
|                              | Alil-ITC                                |
|                              | 4-Metilsulfinilbutil-ITC                |
|                              | Benzil-ITC                              |
|                              | Fenil-ITC                               |
|                              | 2-Feniletil-ITC                         |
|                              | 4-Hidroksibenzil-ITC                    |
| Antiproliferativna aktivnost | Alil-ITC                                |
|                              | 4-Metilsulfinilbutil-ITC                |
|                              | 7-Metilsulfinilheptil-ITC               |
|                              | Fenil-ITC                               |
|                              | Fenilmetil-ITC                          |
|                              | Feniletil-ITC                           |
|                              | Fenilbutil-ITC                          |
|                              | Benzil-ITC                              |
|                              | Indol-3-karbinol                        |
|                              | Indol-3-etil ITC-i                      |

### 2.4.1. Hipoglikemijska aktivnost

Pretilost je definirana kao porast tjelesne težine uzrokovan pretjeranim nakupljanjem adipocita, a obično prati druga stanja, poput dijabetesa povezanog s inzulinskom rezistencijom, hipertenzijom i dislipoproteinemijom (Kim i sur., 2017). Dijabetes (Diabetes mellitus) je kronični i glavni endokrini poremećaj uzrokovan naslijeđenim i/ili stečenim nedostatkom u proizvodnji inzulina od strane gušterače, ili neučinkovitošću proizvedenog inzulina (Thirumalai i sur., 2001). Enzim  $\alpha$ -amilaza jedan je od ključnih enzima koji sudjeluju u razgradnji škroba na apsorbirajuće molekule glukoze. Inhibicija ovih enzima pomaže u smanjenju postprandijalne glikemije smanjenjem brzine apsorpcije glukoze i stoga može biti važna strategija u liječenju hiperglikemije povezane s dijabetesom tipa 2 (Khatiwada i sur., 2018). Enzimi  $\alpha$ -glukozidaze su enzimi u probavnom traktu koji hidroliziraju ugljikohidrate u glukozu. Jedna strategija koja je bila razvijena za liječenje dijabetesa tipa 2 je inhibicija aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze koristeći sintetske lijekove. Međutim, ovi inhibitori su obično povezani s gastrointestinalnim nuspojavama. Stoga, razvoj inhibitora iz prirodnih proizvoda nudi alternativnu mogućnost za kontrolu hiperglikemije (Assefa i sur., 2018). Inhibitori koji su trenutno u kliničkoj upotrebi, poput akarboze, miglitola i vogliboze inhibiraju širok raspon glikozidaza poput  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze (Ponnusamy i sur., 2011). Zbog svoje nespecifičnosti u ciljanju različitih glikozidaza, ova hipoglikemijska sredstva imaju svoja ograničenja i poznato je da izazivaju ozbiljne nuspojave poput nadutosti i dijareje (Ponnusamy i sur., 2011). Stoga je ispitivanje sigurnijih, specifičnijih i učinkovitijih hipoglikemijskih sredstava i dalje važno područje istraživanja. Prirodni ekstrakti iz lako dostupnih tradicionalnih ljekovitih biljaka koje nude veliki potencijal za otkriće novih antidijabetičkih lijekova su jedan od glavnih ciljeva istraživanja (Ponnusamy i sur., 2011). Primjerice, sulforafan je fitokemikalija koja sadrži tipičnu skupinu izotiocijanata (NCS skupina) u povrću kupusnjača kao što su klice brokule (Basha i sur., 2017). Basha i sur. (2017) su dokazali mogućnost antidijabetičkog djelovanja sulforafana iz ekstrakta brokule. Prema studiji koju su proveli Thirumalai i sur. (2001), smeđa gorušica pokazuje pozitivne efekte kod dijabetesa kod miševa te se hipoglikemija i povećanje inzulina može povezati s vodenim ekstraktima sjemenki smeđe gorušice. Anand i sur. (2007) su dokazali da vodeni ekstrakt crne gorušice značajno smanjuje porast glukoze u krvi u vremenu manje od jednog sata.

#### 2.4.2. Antikancerogena aktivnost

Mnoga znanstvena istraživanja pokazala su da konzumiranje tri do pet obroka koji sadrže biljke iz porodice Brassicaceae tjedno može smanjiti rizik od raka mokraćnog mjehura, tankog crijeva, debelog crijeva, pluća, jetre, jednjaka, želuca, raka dojke i prostate zbog prisutnih hlapljivih spojeva kao što su ITC-i i njihovi metaboliti (Cuomo i sur., 2015; Guine i sur., 2016; Xie i sur., 2019). Proizvodi razgradnje GSL-a mogu pokazivati svoja antitumorska svojstva kroz nekoliko različitih mehanizama koji uključuju trenutnu detoksikaciju karcinogena, poput prevencije stvaranja karcinogenih induciranih DNA-adukata (Boscaro i sur., 2018). Prema dostupnoj literaturi ITC-i pokazuju obećavajuće kemopreventivne aktivnosti protiv raka mokraćnog mjehura i njegove remisije (Veeranki i sur., 2015). Štoviše, oralnim unosom ITC-i selektivno se dopremaju u mjehur izlučivanjem urina (Veeranki i sur., 2015). Benzil-ITC (BITC) pokazuje antikancerogenu aktivnost (Cho i sur., 2016), kao i alil-izotiocijanat (AITC), erucin (ECN), fenetil-izotiocijanat (PEITC) i sulforafan (SFN) (Veeranki i sur., 2015). Prema Bo i sur. (2016), AITC inducira stanične morfološke promjene i smanjuje održivost ljudske stanice raka dojke linija MCF-7 i MDA-MB-231. AITC, prisutan u hidrodestilatu ekstrakta biljke *Lepidium latifolium* L., pokazao je antiproliferativno djelovanje protiv stanične linije ljudskog glioblastoma LN229 i stanične linije humanog raka mokraćnog mjehura UM-UC-3 (Blažević i sur., 2019). AITC je također utjecao na proliferaciju stanica staničnih linija raka mokraćnog mjehura čovjeka (RT4 i T24) (Savio i sur., 2015). Prema studiji koju su proveli Cho i sur. (2016) BITC inhibira stanice raka prostate. BITC je također pokazao izvrsno antiproliferativno djelovanje protiv stanične linije humanog raka debelog crijeva HT-29 (Zhang i sur., 2003). Prema Xie i sur. (2017), BITC tretman rezultira supresijom rasta tumora, inhibicijom stanične proliferacije i povećanom apoptozom u tumorima dojke. BITC i 2-fenilet-il-ITC inhibiraju rast stanica u ljudskim stanicama raka dojke linije MCF-7 (Tseng i sur., 2004). Zbog njihove sposobnosti da selektivno uzrokuju zaustavljanje rasta i staničnu smrt u stanicama raka, prevencija raka s dijetalnim ITC-ima spremna je za klinička translacijska istraživanja (Singh i Singh, 2012). Budući da velik broj lijekova koji se trenutno koriste protiv raka potječe iz biljaka, očekuju se još intenzivnija istraživanja novih antitumorskih spojeva (Pintao i sur., 1995), posebno biljke dragoljub kojoj se pripisuju izražena antikancerogena svojstva (Garzon i Wrolstadt, 2009). Prijavljeno je da dragoljub posjeduje antikancerogeno djelovanje (Garzon i Wrolstadt, 2009; Pintao i sur., 1995), što se može objasniti prisutnošću gore spomenutog BITC-a – razgradnog produkta benzil-GSL-a (Vrca i sur., 2021; Cho i sur., 2016; Zhang i sur., 2003).

### 2.4.3. Proapoptotska aktivnost

Apoptoza je specifičan oblik stanične smrti potreban za razvoj organizma i održavanje stanične homeostaze (Žlender, 2003). S obzirom da se radi o aktivnom procesu koji iziskuje trošenje energije i aktivaciju gena potrebnih za sintezu proteina, apoptozu još nazivamo “programirana smrt stanice” (Žlender, 2003). Za proces apoptoze ili programirane stanične smrti karakteristične su različite morfološke promjene i energetske ovisni biokemijski mehanizmi. To je intrinzični program samoubojstva stanica koji osigurava pravilan razvoj održavanjem homeostaze tkiva i čuvanjem organizma oslobođanjem od oštećenih ili inficiranih stanica koje mogu ometati normalnu funkciju (Sinha i sur., 2014). Apoptoza igra značajnu ulogu u preživljavanju održavajući homeostazu u višestaničnim organizmima kao i u liječenju mnogih bolesti, budući da neispravan rad apoptotičkog puta može uzrokovati nekoliko ljudskih bolesti poput raka, neurodegenerativnih kao i nekoliko vrsta autoimunih poremećaja (Sinha i sur., 2014). Indukcija i izvođenje apoptoze zahtijevaju suradnju niza molekula poput signalnih molekula, receptora, enzima i proteina za reguliranje gena (Sinha i sur., 2014). Osim što razgradni produkti GSL-a pokazuju antiproliferativnu aktivnost (Cuomo i sur., 2015; Guine i sur., 2016; Xie i sur., 2019; Boscaro i sur., 2018), također pokazuju i proapoptotsku aktivnost (Barba i sur., 2016). Xie i sur. (2017) izvijestili su da liječenje BITC-om rezultira supresijom rasta tumora, inhibicijom stanične proliferacije i povećanom apoptozom u tumorima dojke.

### 2.4.4. Antimikrobna i antifungalna aktivnost

Znanstvena istraživanja biološke aktivnosti GSL-a i njihovih razgradnih produkata na mikroorganizme poput bakterija, kvasaca i plijesni potvrdila su neaktivnost glukozinolata te biološku aktivnost njihovih razgradnih produkata (Barba i sur., 2016). ITC-i, osim antikancerogene, pokazuju i antimikrobnu aktivnost. ITC-i su hlapljivi spojevi koji ukazuju na inhibitorni učinak na različite patogene mikroorganizme u niskim koncentracijama, što ih čini poželjnim antimikrobnim kandidatima (Dufour i sur., 2015). Brojna istraživanja su također pokazala da su ITC-i učinkoviti i protiv kukaca i štetočina (Barba i sur., 2016). Na samu antimikrobnu aktivnost mogu utjecati i struktura ITC-a, prisutnost određenih funkcionalnih skupina, molekulska masa ili duljina ugljikovodičnog lanca (Ko i sur., 2016). Postoje istraživanja da aromatični ITC-i, kao što je BITC, imaju veću antibakterijsku aktivnost u usporedbi s alifatskim protiv biljnih patogenih bakterija, patogena koji se prenose hranom i bakterija kvarenja, te *Staphylococcus aureus* otpornog na meticilin (Ko i sur., 2016). Dias i sur.

(2014) su dokazali da biljke koje sadrže u sebi BITC i 2-fenilet-il-izotiocijanat (PEITC) pokazuju snažnu antimikrobnu aktivnost protiv MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*). Također, Dias i sur. (2014) izvijestili su da je među svim testiranim ITC-ima protiv 15 izolata *S. aureus* otpornog na meticilin, BITC pokazuje najbolju učinkovitost. BITC i AITC pokazuju snažniju antimikrobnu aktivnost prema gram-negativnim (*Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*), nego gram-pozitivnim bakterijama (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*). AITC i PEITC djeluju protiv različitih patogenih mikroorganizama (*Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Salmonella*, *Serratia* i *Staphylococcus*) (Ko i sur., 2016). Antimikrobna aktivnost BITC-a je dokumentirana (Ko i sur., 2016; Jang i sur., 2010; Dias i sur., 2014). Naprotiv, istraživanja o antimikrobnom djelovanju eteričnog ulja i ekstrakta dragoljuba su oskudna. Bazylo i sur. (2013) izvijestili su da vodeni i hidroetanolni ekstrakti dobiveni iz dragoljuba sušenjem na zraku i smrzavanjem, nisu pokazali antimikrobno djelovanje protiv *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bordetella bronchiseptica*. Glavno objašnjenje vjerojatno je nizak sadržaj BITC-a u ekstraktima. Jedna od glavnih bioloških aktivnosti koju pokazuje dragoljub je upravo antimikrobna aktivnost zahvaljujući prisutnosti BITC-a, razgradnog produkta glukotropeolina (Bazylo i sur., 2013) koji inhibira rast gram-negativnih i gram-pozitivnih patogenih bakterija (Jurca i sur., 2018). Bakterijski mikroorganizmi mogu se zalijepiti za površinu i izgraditi bakterijski biofilm nastao iz bakterijskih stanica i okolnih ekstracelularnih polimernih tvari (Kaiser i sur., 2017). Bakterije u biofilmovima otpornije su na uobičajene antibakterijske spojeve i tvari od bakterija u planktonskom stanju (Kaiser i sur., 2017), zbog čega je važno identificirati nove prirodne spojeve s visokom antibakterijskom i biofilmskom učinkovitošću.

## 2.5. Udio ulja i sastav masnih kiselina u biljkama iz porodice Brassicaceae

Ulje iz sjemenki biljaka koje pripadaju porodici Brassicaceae poput uljane repice i gorušice su glavni izvori biljnog ulja u prehrambene svrhe na globalnoj razini (Wendlinger i sur., 2014). Sadržaj ulja u sjemenkama biljaka iz porodice Brassicaceae kreće se od 40,0 - 42,0%, a kod sjemenki gorušice 28,0 - 42,0% (Antova i sur., 2017). U prošlosti uljana repica je okarakterizirana kao biljka čije ulje sadrži erukinsku kiselinu zbog čega je takvo ulje bilo nepoželjno, međutim situacija se promijenila kada su novi sojevi uljane repice predstavljeni, uključujući kanolu iz Kanade. Ulje kanole karakterizira niska razina erukinske kiseline i nizak

sadržaj glukozinolata te se stoga smatra sigurnom za ljudsku konzumaciju (Wendlinger i sur., 2014).

Inače, ulja biljaka iz ove porodice sadrži veliki postotak erukinske kiseline koja se smatra nepoželjnom jer se kod životinja povezuje s lipidozom miokarda i srčanim lezijama, zbog čega se ulje koje ju sadrži smatra nepoželjnim u ljudskoj prehrani (Wendlinger i sur., 2014). Negativni efekti na ljudsko zdravlje nisu utvrđeni, već su provedene studije na životinjama (Nayak i sur., 2016). Europska unija je postavila maksimalnu granicu od 5% unosa erukinske kiseline od ukupnih masnih kiselina. Dok se mnogo pažnje posvetilo nepostojanju (redukciji) erukinske kiseline u ulju uljane repice, prisutnost ove neželjene masne kiseline u ostalim biljkama iz porodice Brassicaceae uvelike je zanemarena. Dapače, u Sjevernoj Indiji, gorušičino ulje se najčešće koristi u prehrani, kao ulje za salate i kuhanje (Wendlinger i sur., 2014). Međutim, nekoliko je studija pokazalo da ulje gorušice može sadržavati visoku razinu erukinske kiseline i potrošačima se savjetuje da je ne koriste kao prehrambeni proizvod. Iz tog razloga gorušičino ulje je predloženo za proizvodnju biodizela. Glavne kiseline u uljima gorušice su oleinska, linolna, linolenska i naravno, erukinska kiselina (Wendlinger i sur., 2014). Prema Abdul-Fadl i sur. (2011) udio erukinske kiseline nakon Soxhlet ekstrakcije u bijeloj gorušici iznosi 37,89%, a u smeđoj gorušici 23,90%. Ukupan sadržaj zasićenih kiselina u objema gorušicama je između 8,45-8,94%, a nezasićenih oko 90% (Fadl i sur., 2011). Prema Antova i sur. (2017) koji su ispitali lipidni sastav ulja dobiven Soxhlet ekstrakcijom različitih sorta bijelih gorušica erukinska, oleinska, linolna i gadoleinska kiselina također su bile glavne komponente u svim ispitivanim uljima. U svima njima prevladavala je erukinska kiselina čiji je udio iznosio od 28,0 do 53,2% (Antova i sur., 2017). Indija proizvodi gotovo 25 milijuna tona ulja iz sjemena od čega ulje iz sjemena gorušice čini 25% proizvodnje. Gorušičino ulje se može dobiti iz crne, smeđe i bijele gorušice. Gorkog i oštrog okusa je zbog prisutnosti AITC-a. Oksidativna stabilnost ulja gorušice je vrlo mala (Nayak i sur., 2016). Ulje dragoljuba, biljke koja pripada porodici Tropaeolaceae, a redu Brassicales kao i porodica Brassicaceae, ima visoki sadržaj mononezasićenih masnih kiselina (> 96%). Sadržaj erukinske kiseline dostiže 80% u nekim sortama biljke, dok je sadržaj eikozanske kiseline otprilike 15%. Oleinska kiselina, čiji je sadržaj ispod 2%, pokazuje suprotnu korelaciju u odnosu na erukinsku kiselinu. Prema Carlson i Kleiman (1993), sorte dragoljuba možemo podijeliti u tri skupine i to na temelju sadržaja oleinske kiseline (< 2%, 4-8% i 17,5%) ili erukinske kiseline (< 68%, 68-74% i > 76%) (Jakubczyk i sur., 2018).

### 2.5.1. Primjena ulja biljaka iz porodice Brassicaceae

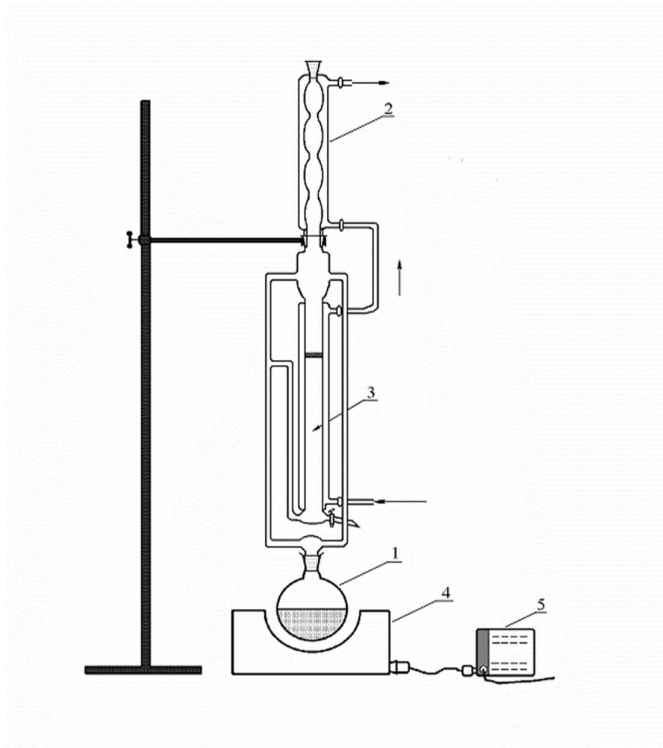
Iako jestiva ulja trenutno predstavljaju najveće tržište za Brassica uljarice, rasprostranjenost poljoprivrednih viškova u mnogim razvijenim zemljama usredotočila je pozornost na moguću industrijsku upotrebu ovih ulja. Korisnost i kvalitetne karakteristike ulja iz sjemenki određena je udjelom glavnih sastojaka masnih kiselina. Slijedom toga, jedan od najvažnijih ciljeva u uzgoju Brassica uljarica je genetička izmjena sjemenskog ulja maksimiziranjem udjela specifičnih masnih kiselina (Cartea i sur., 2019). Oleokemijska industrija zabranjuje ulja s visokom razinom erukinske, behenijske i arahidinske (eikozanoinska kiselina) masne kiseline. Ulje Brassica biljaka karakterizira upravo značajna količina erukinske kiseline (oko 50% ukupnih masnih kiselina), koja je inače odsutna u bilo kojem komercijalnom biljnom ulju (Cartea i sur., 2019). Erukinska kiselina (*cis*-13-dokozeinska kiselina, 22:1) ima 22 atoma ugljika s jednom dvostrukom vezom na položaju *cis*-13 ugljikovog lanca. Ulje s visokim udjelom erukinske kiseline ima antinutritivna svojstva, ali je pogodno za neke industrijske primjene, kao što su sredstva protiv blokiranja u polietilenskim filmovima, ljepljiva u tisku i antikorozivni materijali u industriji čeličnih limova (Cartea i sur., 2019). Posljednjih desetljeća Brassica uljarice također su privukle pažnju kao izvor biogoriva i industrijska sirovina o čemu je više napisano u nastavku ovog rada. Ove biljke su od interesa za upotrebu u kozmetici, u industriji za maziva te za ljepljive i biorazgradive plastične proizvode. Pronađena je i primjena erukinske kiseline u medicinske svrhe koja se daje u terapijskim dozama za liječenje adrenoleukodistrofije (X-ALD), genetskog poremećaja koji oštećuje živčani sustav i karakteriziran je nakupljanjem masnih kiselina jako dugog lanca (Cartea i sur., 2019). Terapiju u obliku nadoknade prehrani koja predstavlja mješavinu gliceril-trioleata i gliceril-trierukata u omjeru 4:1 koji se dobiju iz uljane repice i maslinovog ulja (Lorenzovo ulje) otkrio je Augusto Odone, čiji je sin Lorenzo bolovao od adrenoleukodistrofije. Lorenzovo ulje je uspješno zaustavilo progresiju bolesti te je Lorenzo doživio 30 godina u stadiju paraliziranosti.

## **2.6. Ekstrakcija**

U cilju očuvanja stabilnosti i većeg prinosa hlapljivih spojeva, ali i prinosa masnih kiselina tehnike ekstrakcije imaju važnu ulogu. Generalno, ekstrakcija je učinkovita i brza metoda razdvajanja i koncentriranja tvari iz homogenih smjesa na temelju njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju.

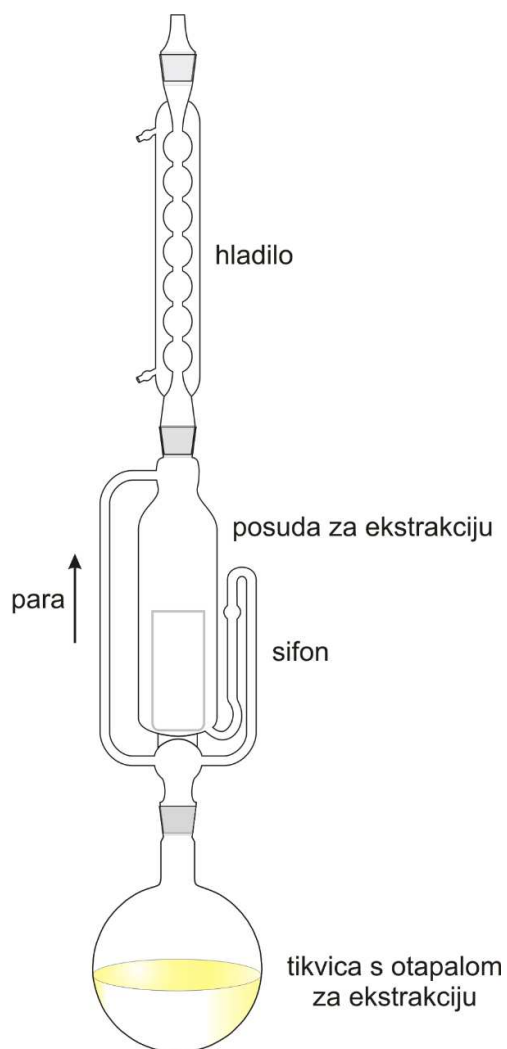
Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode poput destilacije (direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom ili destilacija vodom i parom), ekstrakcija otapalima (ekstrakcija otapalom/ima, maceracija, ekstrakcija s uljima), hladno prešanje, napredne tehnike (ekstrakcija superkritičnim fluidima, turbo-ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i mikrovalna ekstrakcija) (Blekić i sur., 2011). Unatoč velikoj potrošnji energije i velikoj količini otapala, iskorištenje je često naznačeno u decimalama. Na primjer, za jedan mililitar ekstrakta ruže koji teži manje od 1 gram nije potreban samo 1 kg svježih ruža kao sirovine, već i velika količina otapala (n-heksan, alkohol), energije (uglavnom iz fosilnih goriva) i vode kao sredstva za hlađenje. Danas ne možemo pronaći proces proizvodnje parfema, kozmetičku, farmaceutsku, prehrambenu, finu kemijsku industriju ili industriju biogoriva koja ne koristi ekstrakcijske procese kao što su maceracija, parna ili hidrodestilacija, prešanje, dekokcija, infuzija, perkolacija i Soxhlet ekstrakcija (Chemat i sur., 2012). Zanimljivo je da maceracija i hidrodestilacija još uvijek ostaju najčešće tehnike ekstrakcije prirodnih komponenti u trećem tisućljeću (slika 12) (Chemat i sur., 2019).





**Slika 12.** Modificirana aparatura po Clevengeru za hidrodestilaciju (1. tikvica s okruglim dnom; 2. povratno hladilo; 3. prostor za prihvatanje destilata; 4. kalota za zagrijavanje, 5. reostat) (Zekić, 2013).

Konvencionalne ekstrakcije su prilično zahtjevne, uzimaju mnogo vremena, koriste velike količine otapala i u konačnici mogu uzrokovati razgradnju neke ciljne molekule i djelomični gubitak isparljivih tvari. Soxhlet ekstrakcija, iako se smatra glavnom referentnom tehnikom za mjerenje performansi drugih tehnika, tradicionalno se koristi za ekstrakciju lipida (slika 13). Nadalje, ova metoda ekstrakcije nije samo neučinkovita i ima loš prinos bioaktivnih komponenti, nego je također skupa, ali i zbog odlaganja velike količine organskog otpada može ugroziti zaštitu okoliša. U posljednjih nekoliko godina, čini se da je od velike važnosti razvoj tehnika bez otapala na način da se moderniziraju konvencionalni procesi koji se danas temelje na ekstrakciji pomoću organskih otapala (Chemat i sur., 2019).



**Slika 13.** Soxhletov ekstraktor (Generalić, 2022).

### 2.6.1. Zelena ekstrakcija

Opća definicija zelene kemije je izum, dizajn i primjena kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju uporabu ili uklanjaju/proizvode opasne tvari.

U odnosu na zelenu ekstrakciju prirodnih komponenti, ova se definicija može izmijeniti na sljedeći način: „Zelena ekstrakcija se temelji na otkriću i dizajnu procesa ekstrakcije koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurati siguran i visokokvalitetni ekstrakt/proizvod“ (Chemat i sur., 2012).

„Šest načela zelene ekstrakcije prirodnih komponenti“ su:

**Načelo 1:** Inovacija izborom vrste i uporabom obnovljivih biljnih resursa.

**Načelo 2:** Uporaba alternativnih otapala i to uglavnom vode ili agro-otapala.

**Načelo 3:** Smanjenje potrošnje energije obnovom energije i korištenjem inovativne tehnologije.

**Načelo 4:** Proizvodnja koprodukata umjesto otpada koja uključuje bio- i poljoprivredno-rafinirajuću industriju.

**Načelo 5:** Smanjenje rada jedinice i davanje prednosti sigurnim, robusnim i kontroliranim procesima.

**Načelo 6:** Cilj je dobiti nenaturirani i biorazgradivi ekstrakt bez onečišćenja.

Načela su definirana i opisana ne kao pravila, već više kao inovativne smjernice koje su postavili znanstvenici, a uspješno ih primjenjuje industrija (Chemat i sur., 2012). Zelene metode ekstrakcije su naravno, ekološki prihvatljive metode ekstrakcije.

### 2.6.2. Ekološki prihvatljive metode ekstrakcije

Među ekološkim tehnologijama, odnosno zelenim tehnologijama koje koriste manje količine organskih otapala ili koriste ekološki prihvatljiva otapala, sa smanjenom potrošnjom energije i skraćenim vremenom za ekstrakciju biljnih vrsta su: **ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)**, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), **ekstrakcija superkritičnim fluidima**, ekstrakcija tekućinom pod tlakom, ekstrakcija vrućom vodom pod tlakom (PHWE) ili subkritičnom vodom, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem, micelarna ekstrakcija (Khaw i sur., 2017; Ameer i sur., 2017; Kusc i Eroglu, 2015; Chemat i sur., 2019).

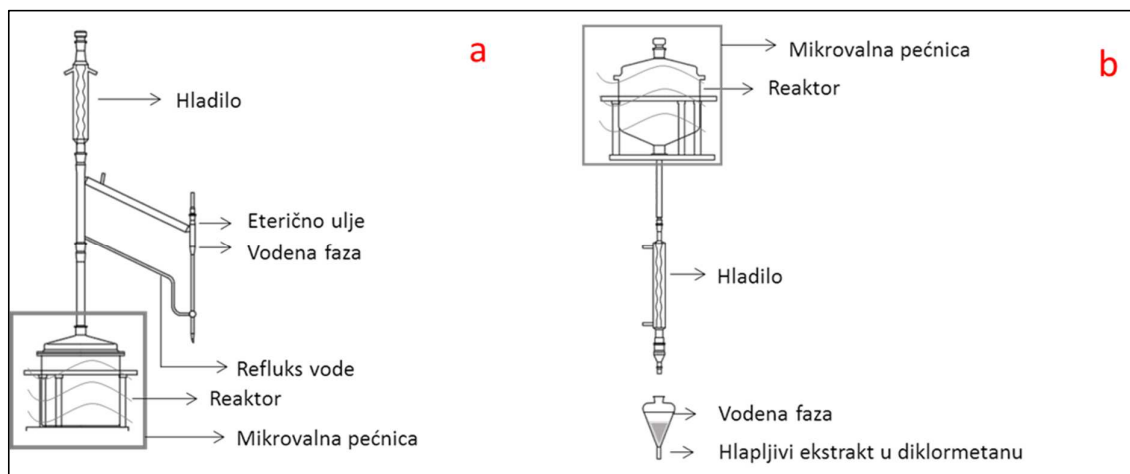
Glavne prednosti MAE su veliko smanjenje vremena ekstrakcije, veći prinos ulja i aktivnih sastojaka, poboljšana selektivnost, veća stabilnost i organoleptička kvaliteta ekstrakata (Cravotto i sur., 2011). MAE je jedna od tehnika ekstrakcije koja se koristi za uspješno provođenje ekstrakcije primarnih i sekundarnih metabolita bez dodatka otapala (eterična ulja, arome, jestiva ulja, antioksidansi i ostali organski spojevi) (Chemat i sur., 2019). Riječ je o inovativnoj tehnici koja omogućuje provođenje ekstrakcije na praktičan i učinkovit način smanjujući vrijeme ekstrakcije s nekoliko sati na nekoliko minuta jer ne dolazi do destilacije otapala, što je ograničavajući korak procesa ekstrakcije (Chemat i sur., 2019). Također, takva tehnika eliminira naknadno tretiranje otpadnih voda i obično troši samo dio energije koja se koristi u uobičajenim konvencionalnim metodama ekstrakcije s organskim otapalima (Chemat i sur., 2019).

Kada se govori o tehnikama ekstrakcije, poboljšanja se mogu postići primjenom nekonvencionalnih (modernih) tehnika poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) za dobivanje hlapljivih organskih spojeva i superkritične CO<sub>2</sub> ekstrakcije (SC-CO<sub>2</sub>) za ekstrakciju lipida.

### **2.6.2.1. Mikrovalna ekstrakcija**

Mikrovalna ekstrakcija se smatra izvrsnom alternativom za klasične ekstrakcije eteričnih ulja iz biljaka poput hidrodestilacije zbog kraćeg vremena ekstrahiranja, manje količine vode, što je energetski i ekonomski isplativije (Blekić i sur., 2011). Mikrovalna ekstrakcija predstavlja novu tehniku izolacije bioaktivnih spojeva iz prehrambenih proizvoda. Prednosti mikrovalne ekstrakcije su kraće vrijeme ekstrakcije s ili bez otapala. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima sastoji se od zagrijavanja otapala u kontaktu s uzorkom pomoću mikrovalne energije (Blekić i sur., 2011).

Postupak uključuje pucanje vodikovih veza, kao rezultat dipolske rotacije molekula uzrokovane mikrovalovima, i migraciju iona koji pospješuju prodor otapala u matricu, što omogućuje otapanje sastojaka koji se ekstrahiraju. Voda ima najveću dielektričnu konstantu i najčešće je otapalo. Međutim, faktor disipacije značajno je niži nego kod ostalih otapala. Dakle, brzina kojom voda apsorbira mikrovalnu energiju veća je od brzine kojom sustav može raspršiti toplinu. Ovi fenomeni objašnjavaju efekte „pregrijavanja“, koji nastaju kada je voda prisutna u matrici (Afoakwah i sur., 2012). Nekoliko je faktora koje treba uzeti u obzir pri korištenju metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Izbor otapala, vrijeme primjene mikrovalova, snaga mikrovalova, jedinstvenost uzorka, kontaktna površina uzorka i utjecaj temperature. Za ekstrakciju eteričnih ulja iz aromatičnih biljaka dizajnirana je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima bez otapala, gdje sadržaj vlage u biljnoj matrici služi za ekstrakciju, a ne koristi se otapalo (Afoakwah i sur., 2012). Ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima može se podijeliti na mikrovalnu destilaciju (MAD) i mikrovalnu hidrodifuziju i gravitaciju (MHG) koje su izvrsne alternative za konvencionalne tehnike ekstrakcije, a koje obično zahtijevaju veliki volumen otapala i dugo vrijeme ekstrakcije da se dobiju ekstrakti bogati hlapivim spojevima, uključujući razgradne produkte GSL-a (slika 14) (Vrca i sur., 2021a).



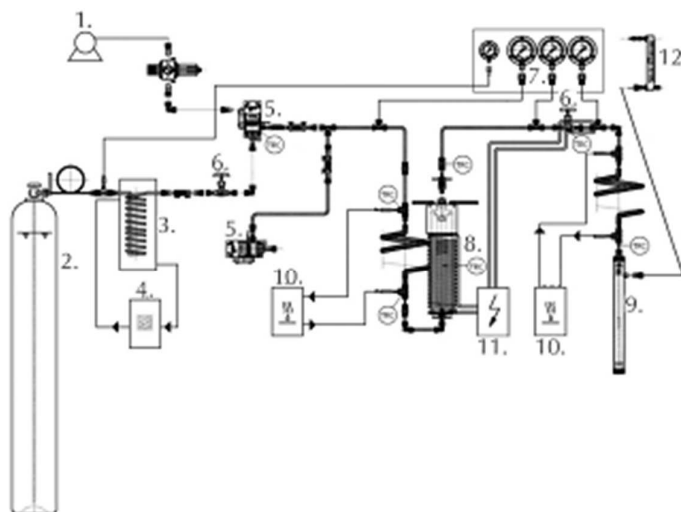
**Slika 14.** Mikrovalna destilacija (a), mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (b) (Vrca i sur., 2021b).

Nova tehnika mikrovalne ekstrakcije bez otapala naziva mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (MHG) koristi se za ekstrakciju eteričnih ulja, boja i antioksidansa. Originalno je to "naglavačke", mikrovalna ekstrakcija koja kombinira mikrovalno grijanje i gravitaciju pri atmosferskom tlaku. Na temelju relativno jednostavnog principa, ova metoda uključuje i stavljanje biljnog materijala u mikrovalni reaktor bez dodavanja otapala ili vode. Zagrijavanje *in situ* vode unutar biljnog materijala rastvara biljne stanice i dovodi do puknuća žlijezda i uljnih posuda. Grijanjem primjenom mikrovalova oslobađa se eterično ulje i *in situ* voda te se prenose iznutra u vanjsku stranu biljnog materijala, a gravitacijom padaju izvan mikrovalnog reaktora (Chemat i sur., 2012).

#### 2.6.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidom

Ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. *Supercritical fluid extraction*, SFE) postupak je odvajanja jedne komponente (ekstraktanta) od druge (matrica) koristeći superkritični fluid kao otapalo za ekstrakciju. Ekstrakcija je obično iz čvrstog uzorka, ali može biti i iz tekućine (Sapkale i sur., 2010). SFE se smatra izvrsnom alternativom za klasične ekstrakcije ulja (Soxhlet ekstrakcija) zbog kraćeg vremena ekstrakcije, nekorištenja organskog otapala već ekološki prihvatljivog otapala poput ugljikovog dioksida (Khaw i sur., 2017). Superkritični (SC) fluid se može definirati kao fluid koji postoji u fazi koja ima svojstva i tekućine i plina iznad karakteristične kritične temperature i tlaka. Kritični tlak ( $P_c$ ) smatra se minimalnom

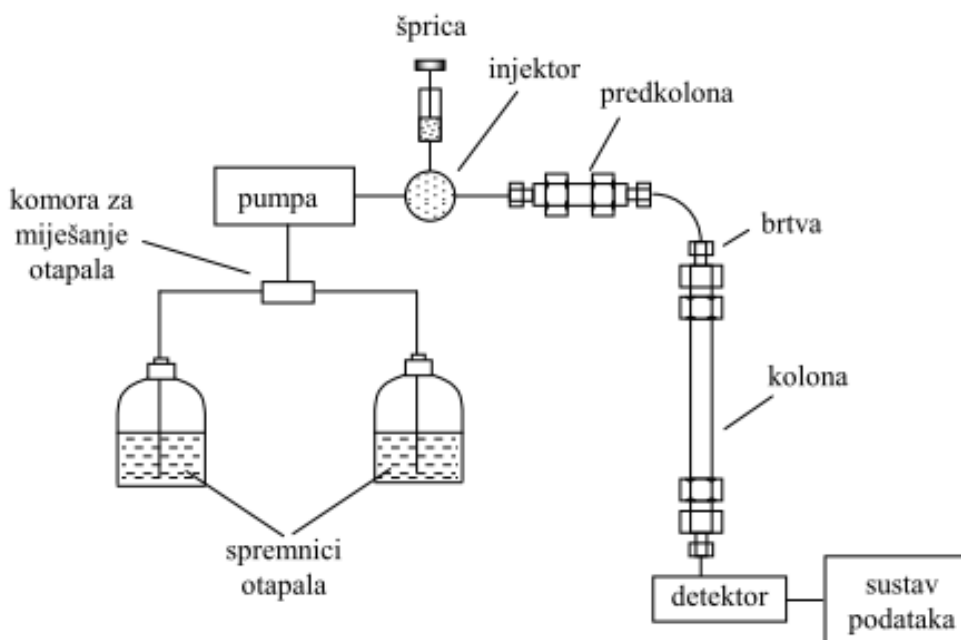
količinom tlaka potrebnim za ukapljivanje plina pri njegovoj jedinstvenoj kritičnoj temperaturi. Kritična temperatura ( $T_c$ ) plina je temperatura pri kojoj plin ne postaje tekuć sve do primjene dodatnog tlaka. Željeni uvjeti ekstrakcije održavaju se radom ventila za oslobađanje tlaka i regulatorom temperature koji su pričvršćeni na ekstrakcijsku posudu. Europska agencija za sigurnost hrane i Američka agencija za hranu i lijekove dodijelili su ugljikovu dioksidu ( $\text{CO}_2$ ) opće priznati status sigurnog fluida (GRAS).  $\text{CO}_2$  je najčešće korišteni superkritični fluid kao otapalo zbog njegovih osobina, osobito zbog njegove ekonomičnosti i GRAS statusa. (Ameer i sur., 2017). Ugljični dioksid ( $\text{CO}_2$ ) kao superfluid, u svom superkritičnom fluidnom stanju ( $\text{scCO}_2$ ) razlikuje se od ostalih superkritičnih fluida iz više razloga: lako je dostupan, može se ponovo upotrijebiti kao plin, ima nisku kritičnu temperaturu ( $T_c$ ) od  $31,1^\circ\text{C}$ , relativno nizak kritični tlak ( $P_c$ ) od 72,8 bara te veću snagu otapanja za razliku od drugih superkritičnih fluida (Khaw i sur., 2017). Prednosti ekstrakcije SFE- $\text{CO}_2$  u odnosu na ekstrakciju s petroleterom uključuje: nisku radnu temperaturu, nema degradacije većine termolabilnih spojeva, kraće vrijeme ekstrakcije, visoka selektivnost u ekstrakciji spojeva te nema ostataka otapala s negativnim učincima na kvalitetu ulja (Xiao i sur., 2007) (Slika 15).



**Slika 15.** Shema uređaja za ekstrakciju superkritičnim  $\text{CO}_2$  (1. Kompresor; 2.  $\text{CO}_2$  spremnik; 3. Izmjenjivač toplote od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sistem grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka) (Jokić, 2019).

## 2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija je analitička tehnika koja seupotrebljava za razdvajanje otopljenih tvari (Cindrić i sur., 2009). Tvari prisutne u otopini u različitim omjerima dolaze u kontakt s nepokretnom i tekućom pokretnom fazom zbog razlika u adsorpciji, ionskoj izmjeni, razdiobi među fazama ili veličini tvari koje se razdvajaju te imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni (Cindrić i sur., 2009). HPLC je visoko efikasna razdjelna kromatografija koja se većinom danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. Osnovni konstrukcijski dijelovi u HPLC kromatografu su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor (slika 16) (Luterotti, 2009).



**Slika 16.** Prikaz komponenti HPLC uređaja (Luterotti, 2009).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, - HPLC) je unaprijeđena verzija prethodno spomenute tekućinske kromatografije koja se općenito koristi u biokemiji i analitici za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih spojeva (Malviya i sur., 2010). Vrijeme zadržavanja analiziranih komponenti varira ovisno o interakcijama između stacionarne faze, analiziranih komponenti i korištenog(ih) otapala. Uzorak koji se analizira injektira se u malom volumenu u struju mobilne

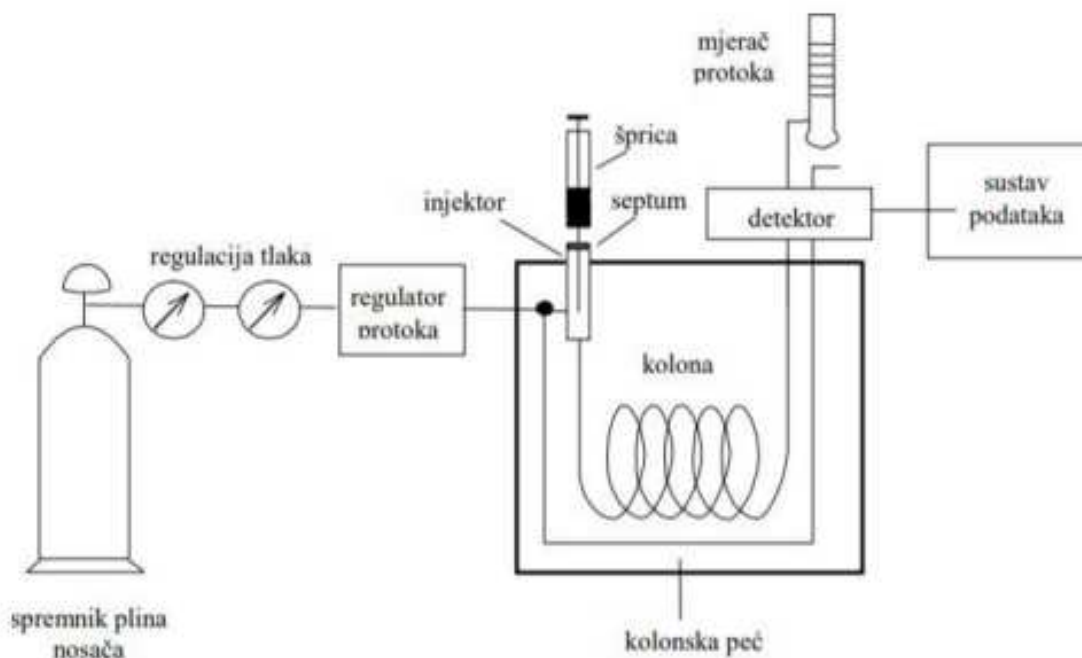
faze i zadržava se zbog specifičnih kemijskih ili fizikalnih interakcija sa stacionarnom fazom (Malviya i sur., 2010). Količina usporavanja ovisi o prirodi analita i sastavu stacionarne i mobilne faze. Vrijeme u kojem određeni analit eluira (izlazi s kraja kolone) naziva se retencijskim vremenom. Uobičajena otapala koja se koriste uključuju sve kombinacije vode ili organskih tekućina koje se miješaju (najčešći su metanol i acetonitril) (Malviya i sur., 2010).



## 2.8. Plinska kromatografija

Pod plinskom kromatografijom (engl. *Gas Chromatography*, GC), uobičajeno se podrazumijeva plinsko-tekućinska kromatografija (engl. *Gas Liquid Chromatography*, GLC) čiji temelj funkcioniranja jeste razdijeljenje tvari između pokretne plinovite i nepokretne tekuće faze. Tvari koje je potrebno odijeliti podvrgavaju se ponovljenim razdiobama između dvije faze. Jedna faza je nepokretna (stacionarna) koja može biti čvrsta tvar ili tekućina, dok je druga faza pokretna (mobilna) koja može biti tekućina, plin ili superkritični fluid. Uzorak je otopljen u pokretnoj fazi koja prelazi preko nepokretne (stacionarne) faze. Kromatografski postupci odjeljivanja se temelje na odnosu ravnotežnih koncentracija uspostavljenih u ove dvije faze (Luterotti, 2009). Na slici 17 su prikazane komponente uređaja za plinsku kromatografiju koji se sastoji od:

- injekcijskog bloka,
- kromatografske kolone,
- termostata,
- detektora i
- pisaača.



**Slika 17.** Prikaz komponenti uređaja za plinsku kromatografiju (Luterotti, 2009).

Kvalitativnu informaciju moguće je dobiti iz podataka zadržavanja, npr., iz prilagođenog volumena ili vremena zadržavanja analita, u odnosu na referentne standardne supstancije. Podaci zadržavanja jako ovise o eksperimentalnim uvjetima kao što su temperatura kolone, protok i tip plina nosača, pad tlaka u koloni, tip i količina nepokretne faze i dimenzijama kolone (Luterotti, 2009). Za pouzdanu identifikaciju supstanci kromatografsko odjeljivanje kombinira se sa spektrometrijskim detektorima, npr., GC sa spektrometrom masa, a HPLC vrlo često s UV/Vis-detektorom s diodnim nizom ("diode array") (Luterotti, 2009).

### 2.8.1. Plinska kromatografija – masena spektrometrija

Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS) je analitička metoda koja kombinira svojstva plinske kromatografije za odvajanje i analizu tvari te tehniku masene spektrometrije za identifikaciju različitih tvari unutar analiziranog uzorka na temelju mjerenja odnosa mase i naboja iona. GC metoda se koristi za razdvajanje hlapljivih i termički stabilnih komponenti u uzorku, dok GC-MS fragmentira analit i identificira na temelju svoje mase (Chauhan i sur., 2014). GC-MS sadrži dva glavna gradivna bloka: plinski kromatograf i maseni spektrometar.

GC-MS uređaj sastavljen je od tri glavne komponente:

- jedinice za ubrizgavanje uzorka koja zagrijava tekući uzorak i isparava ga,
- kolone koja se koristi za razdvajanje svakog spoja i
- detektora koji identificira spojeve i prikazuje njihove koncentracije kao električne signale (Žvorc i sur., 2021).

GC-MS metoda koristi se za odvajanje složenih smjesa, kvantificiranje analita, identifikaciju nepoznatih pikova i određivanje razina onečišćenja u tragovima. Kombinacija tih dviju tehnika povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost čime se omogućuje analitičkom kemičaru da istodobno može kvantitativno i kvalitativno identificirati složene smjese ili ekstrakte uzoraka koji sadrže veliki broj spojeva. GC-MS se smatra "zlatnim standardom" za forenzičku identifikaciju tvari jer se koristi za provođenje 100 % specifičnog testa, međutim visoke temperature (300 °C) koje se koriste u otvoru za ubrizgavanje GC-MS (i pećnici) mogu dovesti do toplinske razgradnje injektiranih molekula, što rezultira mjerenjem razgradnih produkata, umjesto stvarnih molekula od interesa (Žvorc i sur., 2021).

## 2.9. Protočna citometrija

Citometrija je jednostavna, kvantitativna i visokoinformativna metoda za određivanje apoptoze na razini pojedinačnih stanica, pri čemu je dovoljan relativno malen broj stanica u ispitivanom uzorku. Različite morfološke i biokemijske promjene u apoptozi stanice mogu se iskoristiti za citometrijsko određivanje, počevši od plazmolize stanice preko aktivacije kaspaza (cistein aspartil proteaze), gubitka mitohondrijskoga membranskog potencijala, aktivacije endogenih endonukleaza, pa do konačnog gubitka integriteta stanice i formiranja apoptotskih tijela.

Prednost protočne citometrije je mogućnost usklađivanja rezultata dobivenih pomoću prednjeg i bočnoga svjetlosnog snopa (zbog promjene promjera apoptotskih stanica i konformacije unutrašnjih staničnih struktura) s rezultatima analize staničnih markera, tj. specifičnih fluorescentnih protutijela za pojedine apoptotske molekule kao što su Fas, FasL, Bcl-2, p53, fosfatidil serin itd. (Žlender, 2006).

## 2.10. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskop atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*, AFM) je uređaj iznimno visoke rezolucije, koji se može koristiti za promatranje morfologije uzorka i kvantitativno mjerenje njegovih mehaničkih svojstava pri atomskoj rezoluciji (Deng i sur., 2018). AFM nadilazi granice razlučivosti mikroskopa koji koriste valne duljine svjetlosti i elektrona. Tehničke prednosti AFM-a glavni su razlozi njegove brze i široke primjene u biologiji i medicini poput mogućnosti nedestruktivnih mjerenja, uz dobru lateralnu rezoluciju pritom koristeći prirodno okruženje bioloških uzoraka (Cascione i sur., 2016; Deng i sur., 2018). Prvo, zbog gore spomenute iznimno visoke rezolucije AFM-a moguće je izvoditi izravno trodimenzionalno snimanje molekularnih, pa čak i atomskih struktura. Nadalje, priprema uzorka za AFM je jednostavna, oštećenje izvorne strukture je malo, a izvorni izgled uzorka se može odrediti objektivno i točno. Zatim, zbog činjenice da se uzorci mogu promatrati u fiziološkim uvjetima, dinamički procesi molekula, organela i drugih struktura u živim stanicama mogu se mjeriti u stvarnom vremenu pomoću AFM-a. I posljednje, AFM može mjeriti međumolekularne sile, naboj, pH i druge fizikalno-kemijske karakteristike materijala uzorka (Deng i sur., 2018).

AFM sustav sastoji se od sljedećih komponenti: probe, uređaja za detekciju pokreta probe, povratne petlje za praćenje kretanja probe, piezoelektričnog keramičkog uređaja za skeniranje

uzorka i računalno kontroliranog prikupljanja slike, prikaza i sustava obrade. AFM proučava površinsku strukturu i svojstva uzorka otkrivanjem vrlo slabih međuatomskih interakcija između površine uzorka i vrha probe (Deng i sur., 2018). Osnovni režimi rada AFM-a su kontaktni i oscilirajući režim. U kontaktnom režimu, proba AFM-a održava blagi kontakt s površinom uzorka i održava konstantnu silu. U oscilirajućem režimu, proba se tjera na osciliranje približno rezonantnom frekvencijom te povremeno dolazi u kontakt s uzorkom.

AFM primjena u biomedicinskim istraživanjima od izuzetne je važnosti jer može istaknuti značajne razlike u morfologiji stanične membrane između normalnih stanica i tumorskih stanica te može odrediti jesu li stanice maligne ili ne, u usporedbi s tumorskim stanicama iz istog izvora (Deng i sur., 2018). AFM mjerenje može rezultirati vizualiziranjem fine strukture pojedinačnih živih stanica. Na temelju AFM tehnike utiskivanja, stanična elastična svojstva mogu se kvantitativno mjeriti. Naime, ovom tehnikom se mogu izmjeriti i nanomehanička svojstva stanice poput Youngovog modula (Li i sur., 2018). Također, s praktične točke gledišta, spajanje optičke i AFM mikroskopije olakšalo je odabir bioloških uzoraka za istraživanje i pozicioniranje AFM probe na odabranom uzorku. Kombinacija fluorescentne mikroskopije s AFM-om uvela je važnu prednost za dekodiranje bioloških procesa u smislu mehaničkih i morfoloških varijacija molekula i označavanja staničnih komponenti (Cascione i sur., 2016). Nedavno je predloženo da proučavanje morfoloških i biofizičkih promjena u stanicama raka liječenim lijekovima protiv raka bi pomoglo u procjeni antikancerogenog djelovanja lijeka. Takav prijedlog je donešen zato što antimikrotubularni lijekovi utječu na oblik i fizička svojstva stanice, kao što su hrapavost i ukočenost, koji su povezani sa staničnim funkcijama prijanjanja, pokretljivošću, transformacijom i invazijom. Ove promjene u morfologiji i fizičkim svojstvima pojedinih stanica mogu se detektirati AFM mikroskopijom. Posebno je ova metoda prikladna za mjerenje promjene biofizičkih svojstava stanice (Kim i sur., 2012).

### **2.11. Skenirajuća elektronska mikroskopija**

Skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy* - SEM) predstavlja vrstu elektronske mikroskopije pomoću koje je moguće dobiti visoku rezolucijsku sliku površine ispitivanog uzorka. Uslijed načina na koji se formira slika, SEM snimke imaju karakteristični, skoro trodimenzionalni izgled i daju mogućnost proučavanja strukture površine samog uzorka. Glavna osobina ove mikroskopije je da se uzorak može promatrati direktno u reflektiranom snopu elektrona sa znatno boljom rezolucijom nego kod optičkog mikroskopa

(Perić i sur., 2015). SEM radi pri velikom povećanju do 300 000 puta pa čak i do 1 000 000 puta (u nekim modernim modelima) pri čemu stvara vrlo precizne slike širokog spektra materijala (Mohammed i Abdullah, 2018).

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- 1 M otopina HCl, BDH Prolabo, UK,
- Acetonitril, Honeywell, Riedel-de Haën, Göteborg – Švedska,
- Alil-izotiocijanat, Sigma–Aldrich, Merck KgaA, SAD,
- Amonijev karbonat, VWR Chemicals, BDH, SAD,
- Benzil-cijanid, Sigma–Aldrich, Merck KgaA, SAD,
- Benzil-izotiocijanat, Sigma–Aldrich, Merck KgaA, SAD,
- Dekstran (DEAE-sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Dinitrosalicilna kiselina (DNSA), Alfa Aesar, Massachusetts, SAD,
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Euroclone, Milano, Italija,
- Etanol, Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska,
- Fetalni goveđi serum (engl. Fetal bovine serum, FBS), Euroclone, Milano, Italija,
- Hemoglobin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Kalcijev klorid dihidrat, VWR Chemicals, BDH, SAD,
- Kalijev dihidrogen fosfat, VWR Chemicals, BDH, SAD,
- Kalijev klorid, Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska,
- Kazein, Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, SAD,
- Klorovodična kiselina, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska,
- Magnezijev klorid heksahidrat, VWR Chemicals, BDH, SAD,
- Natrijev acetat, Merck, Darmstadt, Njemačka,
- Natrijev hidrogen karbonat, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska,
- Natrijev karbonat bezvodni, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska,
- Natrijev sulfat bezvodni, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska,
- Pankreatin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika,
- Pšenični škrob, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- RGE (rabbit gastric extract), Lipolytech, Marseille, Francuska,
- Stanične linije raka ATCC (LGC Standards),
- Sulfataza, (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Trikloroetena kiselina, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska,

- Žučne soli, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD.

Aparatura:

- Analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, model EX224, OHAUS, SAD,
- Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju ETHOS X uređaj, model 196-001, Milestone, Italija,
- Centrifuga ThermoScientific mySpin 12, model 75004083, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD,
- Centrifuga, IKA mini G, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka,
- Električni mlinac za kavu, model SCG3050SS, Sencor Europe, Prag, Češka Republika,
- GC-FID plinski kromatograf (model 3900; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) s plameno-ionizacijskim detektorom (FID),
- GC-MS/MS, model 8890 GC opremljen s automatskim tekućinskim injektorom, model 7693A, a u sprezi s tandemskim spektrometrom masa (MS/MS) model 7000D GC/TQ, Varian Inc., Lake Forest, CA, SAD,
- Inkubator, Thermo-Shaker TS-100, Biosan, Riga, Latvija,
- Microplate photometer HiPo MPP-96, Biosan, Riga, Latvija,
- Optički mikroskop, ZEISS AXIO Imager.A2m, Njemačka,
- Protočni citometar, model BD Accuri C5, MA, SAD,
- Skenirajući elektronski mikroskop (JEOL JSM-5200, Japan),
- Sustav za Soxhlet ekstrakciju (Büchi B-811-LSV, Flawil, Švicarska),
- Tehnička vaga, model Kern 572, Kern & Sohn, Njemačka,
- Termostat za grijanje, Thermo Block TDB 120, Biosan, Riga, Latvija,
- UHPLC-DAD-MS/MS, Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom, Thermo Fischer Scientific, SAD,
- Ultrazvučna kupelj, model Elmasonic S, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka,
- Uparivač dušikom, model Dri-Block DB100/3, Techne, Njemačka,
- UV/VIS spektrometar, Lambda EZ 201, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD,
- Vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka,
- Vortex, model Dragon LAB MX-S, Peking, Kina.



### 3.2. Priprema biljnog materijala

#### 3.2.1. Biljni materijal

Sjeme različitih vrsta gorušica komercijalno je dostupno. Sjeme bijele i smeđe gorušice (*S. alba* i *B. juncea*) kupljeno je u Harissa Spice Store d.o.o. (Zagreb, Hrvatska), dok je crna gorušica (*B. nigra*) nabavljena online u Ekirana-Indian Groceries (Rotterdam, Nizozemska) (slika 18). Divlja gorušica je nabavljena u B i T World Seeds (Aigues-Vives, Francuska). Sjeme visokog i niskog dragoljuba (*T. majus* L. *altum* i *nanum*) također je komercijalno dostupno i za ovo istraživanje nabavljeno je u Marcon d.o.o. (Novi Marof, Hrvatska), a proizvodi ga *Hortus sementi*, (Longiano FC, Italija) (slika 19). Svi uzorci pribavljeni su u količini od 1 kg.



**Slika 18.** Sjeme bijele i smeđe gorušice (a), crne gorušice (b) i divlje gorušice (c) (vlastita fotografija).



**Slika 19.** Sjeme cijelog zrna (a) i mljevenog (b) zrna visokog dragoljuba (vlastita fotografija).

### 3.2.2. Priprema biljnog materijala za ekstrakciju glukozinolata

Sjeme različitih vrsta gorušica i dragoljuba posebno je samljeveno u mlincu za kavu, prosijano te je odvagano pri masi  $100 \pm 0,1$  mg biljnog materijala. Materijal je raspoređen u Eppendorf reakcijske tube. U svaku tubu dodan je 1 mL 70%-tnog etanola. Tube su zatvorene sigurnosnim kavicama, kratko vorteksirane (15 s) i prebačene u vodenu kupelj na temperaturu od  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  gdje su držane otprilike 5 min (slika 20a). Uzorci su potom prebačeni u ultrazvučnu kupelj tijekom perioda od 10 min, a nakon toga su stavljeni centrifugu na 2700 okr./min u trajanju od 10 min (slika 20b).



**Slika 20.** Uzorci u vrućoj vodenoj kupelji (a) i ultrazvučnoj kupelji (b) (vlastita fotografija).

### 3.2.3. Priprema biljnog materijala za ekstrakciju eteričnih ulja i ekstrakata

Uzorci za ekstrakciju eteričnih ulja i ekstrakata iz sjemenki gorušica i dragoljuba pripremljeni su u obliku praha pomoću Sencor mlinca za kavu te su zatim natopljeni u destiliranoj vodi pošto se radi o suhom biljnom materijalu prije različitih tehnika ekstrakcije (Clevenger hidrodestilacija, MAD i MHG). Biljni materijali su odvagani pri masi od 50-100 g.

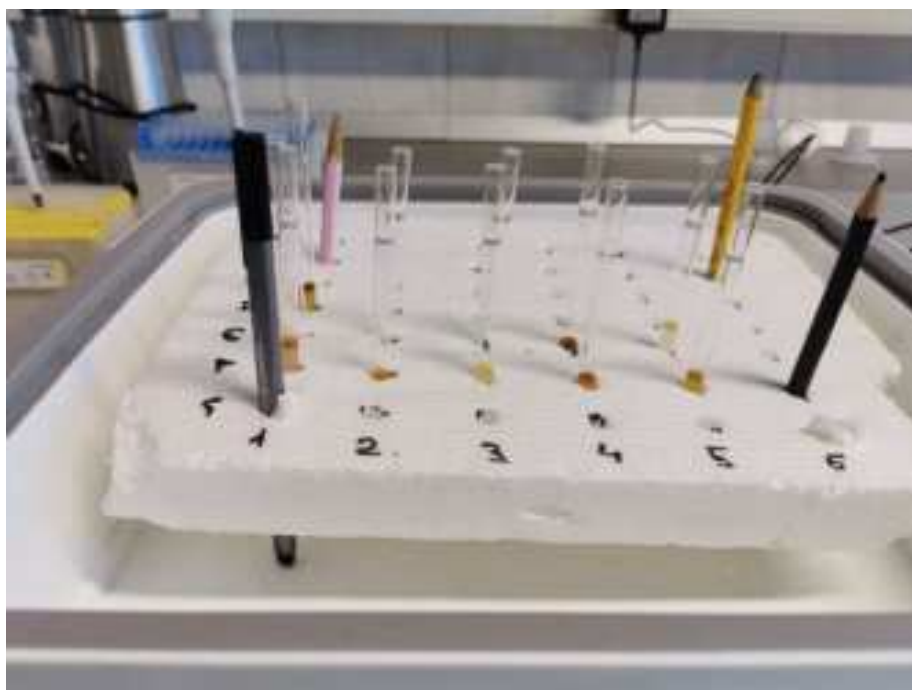
## 3.3. Metode ekstrakcije

### 3.3.1. Metoda ekstrakcije glukozinolata

100 mL otopine 70%-tnog etanola dobiveno je miješanjem 70 mL etanola i 30 mL ultračiste vode, dok je otopina natrijevog acetata (NaOAc, 20 mM, pH = 5,5) dobivena je otapanjem 0,8259 g NaOAc u 500 mL ultračiste vode nakon čega je pH podešavan dodatkom

klorovodične kiseline (25% HCl). Otopina dekstrana dobivena je otapanjem 10,0125 g dekstrana u 125 mL ultračiste vode, a otopina sulfataze pripravljena je otapanjem 5000 U sulfataze u 30 mL ultračiste vode uz dodatak 30 mL apsolutnog etanola i miješanjem na magnetskoj miješalici 10-15 min. Otopina je zatim raspodijeljena u dvije kivete, centrifugirana 20 min na 4500 okr./min. Supernatant je zatim prebačen u čistu čašu i pomiješan s 90 mL apsolutnog etanola. Dobivena otopina raspodijeljena je u dvije kivete i centrifugirana na 2500 okr./min u trajanju od 15 min. Supernatant je zatim odbačen, a talog otopljen u 25 mL ultračiste vode. Dobivena otopina stavljena je kratko na vorteks (15 s) i čuvana u Eppendorf tubama na temperaturi od -20 °C do daljnjih analiza.

U svrhu kolona za postupak ekstrakcije glukozinolata korištene su staklene Pasteur pipete napunjene samljevenim filter papirom u visini 1 cm. Kao kolone poslužile su staklene pipete napunjene mljevenim filter papirom u visini 1 cm. Mljeveni materijal zbijen je u svrhu sprječavanja istjecanja gela. U tako pripravljene pipete dodano je 0,5 mL dekstrana i 1 mL ultračiste vode (slika 21).



**Slika 21.** Kolone za ekstrakciju glukozinolata (vlastita fotografija).

### 3.3.2. Metode ekstrakcije eteričnih ulja i ekstrakata

#### 3.3.2.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva Clevenger hidrodestilacijom

Usitnjeni biljni materijal gorušice ili dragoljuba (50 g) stavljen je u tikvicu volumena od 2 L koja je zatim nadopunjena destiliranom vodom do pola. Na tikvicu su se postavili modificirani nastavci po Clevengeru koji su se nadopunili destiliranom vodom dok se voda nije počela prelijevati bočnom cijevi natrag u tikvicu, a nakon toga se dodao *trap* koji predstavlja smjesu otapala za skupljanje isparljivih spojeva u slučaju njihove male koncentracije (slika 22). Kao *trap* najčešće se pripremi smjesa pentana i dietil-etera u omjeru 3:1. Na nastavke su se postavila kuglasta hladila, a dvije aparature serijski su se spojile gumenim crijevima. Smjese su zagrijavane preko kalota u trajanju od 2,5 sata od početka destilacije (kad padne prva kap). Po završetku destilacije, *trap* se odvojio pipetom s vrha modificiranog nastavka po Clevengeru, a aparatura se dodatno isprala pentanom kako bi se pokupili zaostali hlapljivi spojevi. *Trap* s hlapljivim spojevima sušen je s malo bezvodnog natrijevog sulfata kako bi se pokupila eventualno zaostala voda. Na kraju se izvršila dekantacija u vijalice i uzorci su skladišteni na -20 °C do analize.



Slika 22. Clevenger hidrodestilacija (vlastita fotografija).

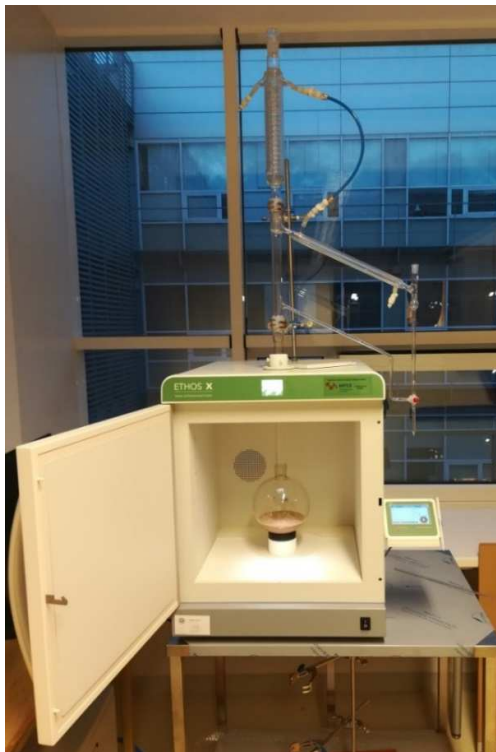
### 3.3.3.2. Mikrovalna ekstrakcija

Ekstrakcija koja koristi dielektrično zagrijavanje primjenom mikrovalova predstavlja modernu tehniku izolacije hlapljivih spojeva. Primjenom određene snage mikrovalova postiže se zagrijavanje prilikom čijeg izbora treba biti oprezan kako ne bi došlo do razgradnje termolabilnih komponenata. Cijeli sustav za brzu mikrovalnu ekstrakciju se sastoji od mikrovalne pećnice, nastavaka za dobivanje eteričnog ulja (primjenom destilacije) i ekstrakata (primjenom gravitacijske sile). Uređaj za hlađenje (*chiller*) konstantno sustav opskrbljuje vodom za hlađenje koja prolazi hladilom, uz podešenu temperaturu na 13 °C. U programskom sučelju uređaja potrebno je odabrati "*fragrance*" ili "*flavor*" te podesiti određenu snagu mikrovalova što ovisi o količini i karakteristikama korištenog biljnog materijala. Maksimalna primjenjiva snaga iznosi 1800 W. Temperatura koja se prosječno postiže je oko 98 °C. Osim snage, potrebno je podesiti i vrijeme trajanja procesa. Ukoliko je biljni materijal suh, potrebno ga je prethodno potopiti u destiliranoj vodi. Za razliku od hidrodestilacije, u reaktor se ne dodaje voda ako se radi o svježem biljnom materijalu. Hlapljivi spojevi su izolirani iz različitih sjemenki gorušice i dragoljuba ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima koristeći uređaj ETHOS X (Milestone, Italija) pri snazi od 500 W.

#### 3.3.3.2.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva destilacijom potpomognutom mikrovalovima (MAD)

Mikrovalovi oslobađaju eterično ulje koje isparava s vodom koja je prisutna u samim stanicama biljnog materijala. Voda u hladilu omogućava kondenzaciju nastalih para te se eterično ulje skuplja u postranoj cijevi ispunjenoj destiliranom vodom, dok se višak vode prelijeva dodatnim cijevima natrag u reaktor budući da se mora nadoknaditi izgubljena voda iz biljnog materijala. Kod biljnog materijala gdje je prinos eteričnog ulja izrazito mali te je granicu faza (vodene i uljne) teško uočiti, dodaje se pentan kako bi se omogućilo jednostavnije odijeljivanje eteričnog ulja. Priprema biljnog materijala za MAD podrazumijevala je vaganje određene količine sjemenki gorušica i dragoljuba (50-100 g) (slika 23). Izvagane sjemenke su se potom usitnile u električnom mlincu ili tučkom u tarioniku te kao takve su se prebacile u tikvicu za destilaciju volumena 2 L. U tikvicu se dodala destilirana voda u količini koja je bila potrebna da sav biljni materijal bude natopljen pošto se radilo o suhom biljnom materijalu. Naposljetku, nastala je pastozna smjesa, jer je biljni materijal upio svu destiliranu vodu. Početna temperatura destilacije bila je oko 94 °C, dok je maksimalna postignuta temperatura tijekom

cijelog procesa iznosila 99-100 °C. Osim snage, potrebno je bilo namjestiti vrijeme trajanja samog procesa, koje je u ovom slučaju iznosilo 30 min intenzivne destilacije uz dodatnih 5 min potrebnih za hlađenje. Eterično ulje se sušilo s bezvodnim natrijevim sulfatom i pohranilo u zamrzivač do daljnje analize.



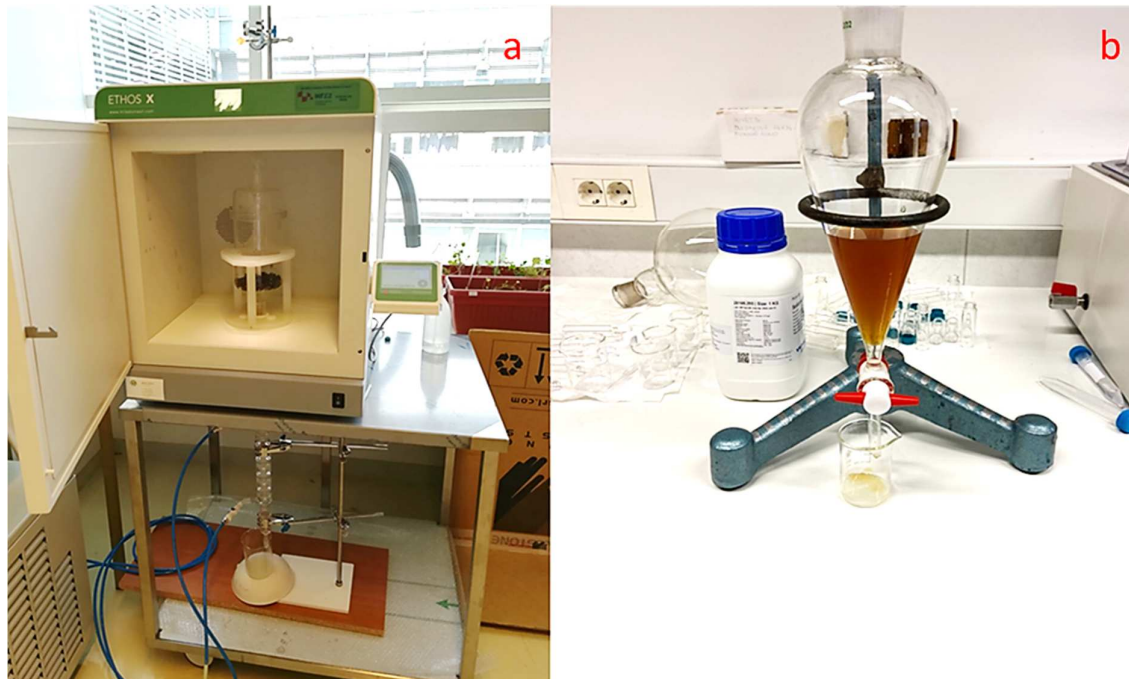
**Slika 23.** Mikrovalna destilacija (MAD) (vlastita fotografija).

#### **3.3.3.3.2. Ekstrakcija hlapljivih spojeva mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG)**

Kod mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije (MHG) izvedba aparature razlikuje se od one kod mikrovalne destilacije budući da se primjenjuje gravitacijska sila (slika 24a). Biljni materijal postavljen je u stakleni reaktor unutar mikrovalne pećnice. Stakleni reaktor za MHG ima otvor na dnu za razliku od prethodno opisane izvedbe gdje je otvor bio na vrhu reaktora. Na otvor se nadograđuje staklena cijev te hladilo. Ekstrakt se skuplja u čašu na dnu aparature nakon čega slijedi ekstrakcija aroma diklormetanom (ponekad je potrebno napraviti filtraciju prije same ekstrakcije) (slika 24b). Temperatura koja se postiže unutar samog uređaja je oko 98 °C, a vrijeme ekstrakcije je podešeno na 15 min uz dodatnih 5 min potrebnih za hlađenje sustava za ekstrakciju. Uzorak je spremljen u vijalice u zamrzivač na -20 °C do daljnje analize.

Prinos eteričnog ulja je izračunat prema jednadžbi:

$$\text{Prinos (\%)} = (\text{masa eteričnog ulja} / \text{masa biljnog materijala}) \times 100\% \quad (1)$$



**Slika 24.** Mikrovalna ekstrakcija hidrodifuzijom i gravitacijom (MHG) (a), ekstrakcija diklormetanom u lijevku (b) (vlastita fotografija).

### 3.4. Desulfatacija glukozinolata

Kod desulfatacije GSL-a, supernatanti se mikropipetom prebace u prethodno pripremljene kolone za ekstrakciju, a zatim se vrši ispiranje kolona. U svaku kolonu se dva puta doda po 1 mL 70%-tnog etanola kako bi se uklonile nepolarne molekule, a nakon toga se dodaje 1 mL ultračiste vode kako bi se isprao etanol. Potom je u svaku kolonu dodano dva puta po 1 mL NaOAc kako bi se postigli optimalni uvjeti za djelovanje sulfataze. Zatim se posuda za otpad zamijenila stalkom u kojem su se nalazile označene tube za ekstrakte i iznad njega je pozicioniran stalak s kolonama. U svaku kolonu je zatim dodano 20  $\mu$ L otopine sulfataze i 50  $\mu$ L NaOAc. Kolone su zatim prekrivene aluminijskom folijom i ostavljene preko noći. Idući dan u kolone je dodano dva puta po 0,75 mL ultračiste vode kako bi se eluirali desulfoGSL-i. Dobiveni su uzorci prebačeni u bočice i čuvani na temperaturi od -20 °C do HPLC-DAD (engl.

High-performance liquid chromatography) i UHPLC-MS/MS (engl. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS) analize.

### 3.5. Određivanje prinosa eteričnih ulja i ekstrakata

Nakon provedene GC-MS/MS analize, uslijedilo je uparavanje otapala u kojima su otopljena eterična ulja i ekstrakti gorušica i visokog dragoljuba. Kao otapala korištena su pentan, dietil-eter i diklormetan. Postupak uparavanja se provodio u struji dušika (slika 25). Eterična ulja i ekstrakti su se zagrijavali pri temperaturi približnoj od 50 °C, što je iznad temperature vrenja upotrijebljenih otapala. Zahvaljujući propuhivanju s inertnim dušikom ovaj proces uparavanja je ubrzan. Prednost korištenja otapala s niskim vrelištem je taj što se uzorak izlaže niskim temperaturama te se na taj način sprječava potencijalni gubitak prisutnih termolabilnih komponenti. Uzorci se čuvaju na temperaturi od -20 °C do daljnje analize.



**Slika 25.** Prikaz uređaja za uparavanje eteričnih ulja i ekstrakata inertnim dušikom (vlastita fotografija).



Konačna masa eteričnih ulja i ekstrakata izračuna se iz razlike mase vijalice nakon uparavanja i mase prazne vijalice:

$$m_3 = m_2 - m_1,$$

$m_1$  = masa prazne vijalice,

$m_2$  = masa vijalice nakon uparavanja u struji dušika,

$m_3$  = masa eteričnog ulja ili ekstrakta.

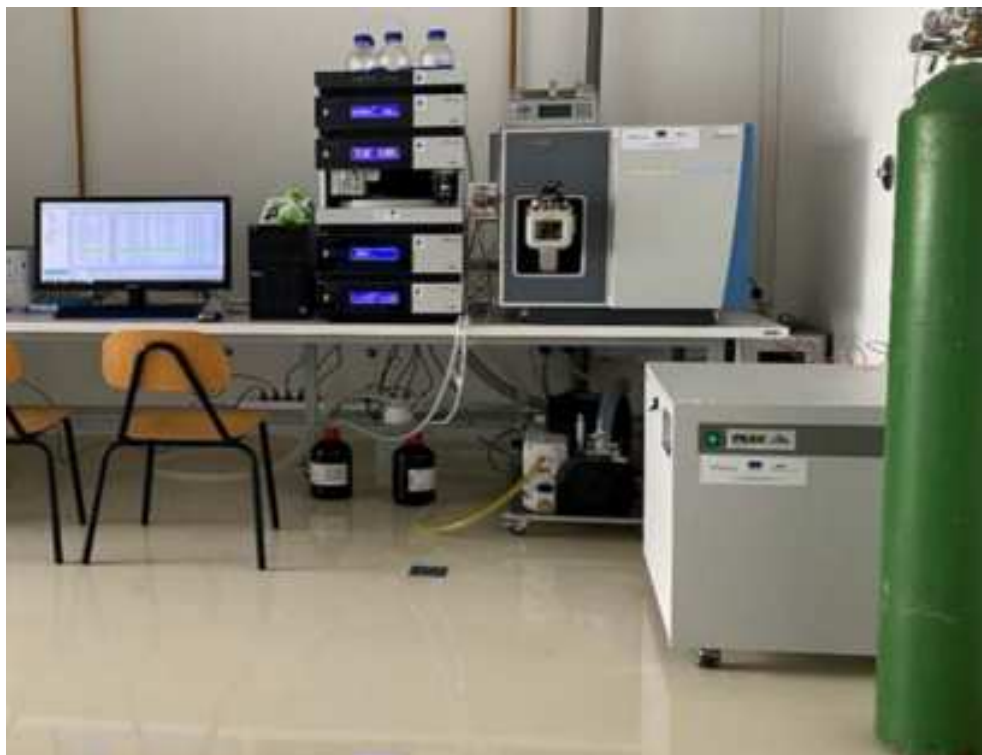
Konačni prinos eteričnog ulja ili ekstrakta određen je na sljedeći način:

$$\text{Prinos} = \frac{m_3}{m_{\text{biljni materijal}}} \times 100, \quad (2)$$

$m_{\text{biljni materijal}}$  = masa ukupne količine biljnog materijala (gorušice ili visoki dragoljub).

### 3.6. UHPLC-MS/MS

Analiza desulfatiranih GSL-a dobivenih ekstrakcijom iz uzoraka različitih vrsta gorušice i dragoljuba napravljena je pomoću UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom (Thermo Fisher Scientific, SAD) na koloni Hypersil GOLD 3,0 mm × 100 mm s promjerom čestica 3 μm (Thermo Fisher Scientific, SAD) (slika 26). Kao mobilna faza korišteni su ultračista voda (otapalo A) i 30% acetonitril (otapalo B). Namješten je protok od 0,5 mL/min kako slijedi: 0,14 min 96% A i 4% B; 7,84 min 14% A i 86% B; 8,96 min 14% A i 86% B; 9,52 min 5% A i 95% B; 13,16 min 5% A i 95% B; 13,44 min 96% A i 4% B; 15,68 min 96% A i 4% B. Volumen injektiranog uzorka je 5 μL te je temperatura kolone postavljena i održavana na temperaturi od 25 °C. Signali su snimani DAD detektorom na valnoj duljini od 227 nm, a maseni spektri su snimani u pozitivnom načinu pri temperaturi od 350 °C. Za kvantizaciju desulfoGSL-a korišten je desulfosinigrin kao eksterni standard, točnije baždarni pravac za raspon koncentracija od 13,56 do 542,50 μM. Za izračun svakog pojedinog desulfoGSL-a upotrijebljene su literaturne vrijednosti za faktore odziva.



**Slika 26.** UHPLC-DAD-MS/MS uređaj (vlastita fotografija).

### 3.7. Plinska kromatografija-masena spektrometrija

Koncentracija hlapljivih spojeva u svim ispitivanim uzorcima eteričnih ulja i ekstrakata određivana je spregnutom tehnikom plinska kromatografija tandemsku spektrometriju masa (GC-MS/MS). Korišteni instrument je plinski kromatograf model 8890 GC opremljen s automatskim tekućinskim injektorom model 7693A, a u sprezi s tandemskim spektrometrom masa (MS/MS) model 7000D GC/TQ (Agilent Inc., Santa Clara, CA, SAD). Za odjeljivanje se koristila nepolarna HP-5MS UI kolona (dimenzije: 30 m dužine, unutarnji promjer 0,25 mm i debljina sloja nepokretne faze 0,25  $\mu\text{m}$ , Agilent Inc., Santa Clara, CA, SAD) (slika 27).

Temperaturni program za kolonu HP-5MS UI postavljen je na način da je početna temperatura bila 60 °C, izotermno postavljena u trajanju od 3 min, nakon čega se zagrijavala do 246 °C brzinom 10 °C/min te je nakon toga postavljena izotermno u trajanju od 3 min. Ostali kromatografski uvjeti su kako slijedi: plin nositelj bio je helij; brzina protoka iznosila je 1 mL/min; injekcijski blok zagrijan je na 250 °C; volumen analiziranog uzorka bio je 1  $\mu\text{L}$ ; omjer raspodjele iznosio je 1:50. Tandemski spektrometar masa (MS/MS) je korišten u MRM načinu snimanja, a ostali uvjeti su bili kako slijedi: ionizacijski potencijal bio je 70 eV; temperatura

ionskog izvora bila je 230 °C; temperatura pomoćnog grijača iznosila je 280 °C; temperature prvog i drugog kvadropola (Q1 i Q2) bile su 150 °C, dok je protok dušika kroz kolizijsku ćeliju iznosio 1,5; odgoda snimanja radi otapala bila je 2,1 minutu.

Prilikom kvantitativnog određivanja praćeni su slijedeći karakteristični prijelazi (fragmenti) uz točno određene kolizijske energije u cilju dobivanja što višeg odziva:

|                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| 149 → 91 m/z @ 8 eV  | kvantifikacijski, |
| 149 → 65 m/z @ 40 eV | kvalifikacijski,  |
| 91 → 39 m/z @ 36 eV  | kvalifikacijski,  |
| 91 → 65 m/z @ 18 eV  | kvalifikacijski.  |



**Slika 27.** GC-MS/MS uređaj (vlastita fotografija).

### 3.8. Probava

#### 3.8.1. Prikupljanje ljudskih probavnih sokova

Ljudski probavni sokovi (želučani i crijevni) su aspirirani od zdravih donora čija je anamneza unaprijed poznata. Početna frakcija aspiriranog probavnog soka odbačena je, a preostali sadržaj sakupljen je u sterilnoj cijevi. Zatim je dobiveni uzorak centrifugiran u vremenu od 5 min pri brzini od 5000 okr/min zbog uklanjanja sluzi i ostataka stanica. Probavni sokovi iz želuca od svih donora su međusobno pomiješani u svrhu izbjegavanja velikih razlika u enzimskoj aktivnosti. Jednako tako se uradilo i s probavnim sokovima iz tankog crijeva. Tako pripremljeni uzorci probavnih sokova podijeljeni su u alikvote i pohranjeni su na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje analize. Dozvolu za prikupljanje probavnih sokova ljudi odobrili su: Etičko povjerenstvo Kliničko - bolničkog centra - Split i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Ur. Broj: 380-59-10106-20-111/105, klasa: 641-01/20-02/01.

#### 3.8.2. Određivanje enzimске aktivnosti ljudskih probavnih sokova

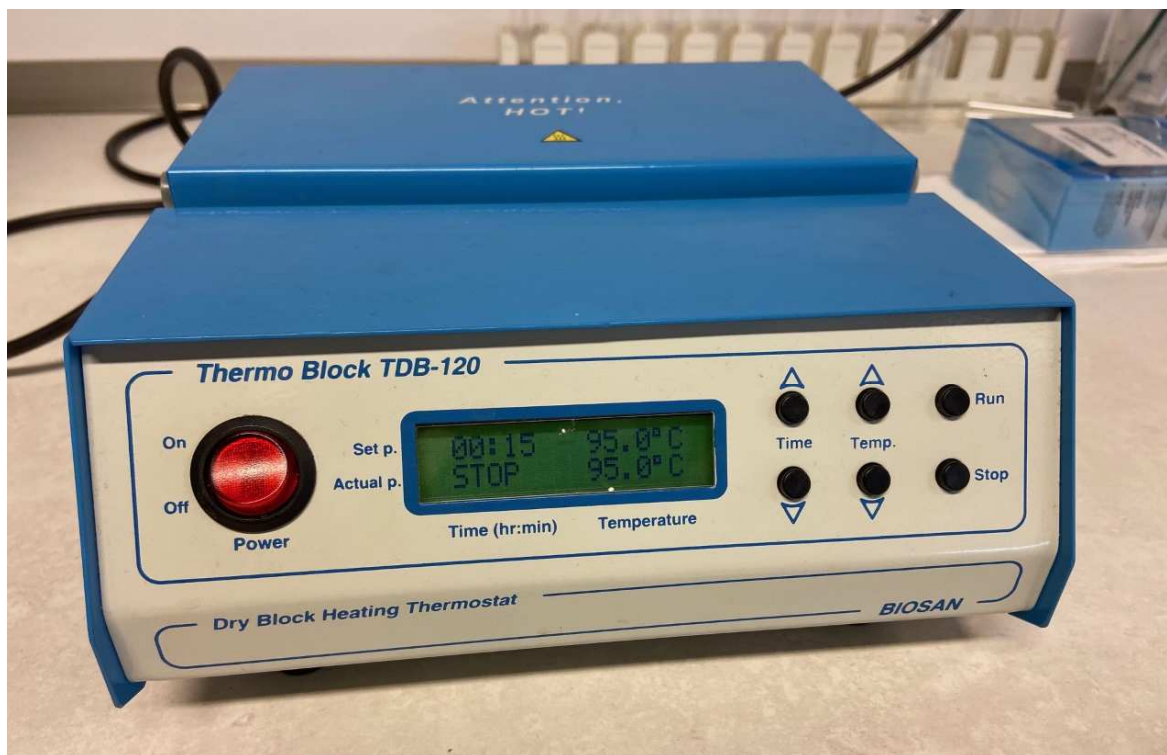
U svrhu određivanja enzimске aktivnosti želučanog ljudskog soka korištena je 2,5%-tna otopina ljudskog hemoglobina pripremljena u fosfatnom puferu (pH 7,6). Otopina hemoglobina zakiseljena je koncentriranom sumpornom kiselinom  $10\text{ }\mu\text{L}$  na  $1\text{ mL}$  hemoglobina. Za određivanje enzimске aktivnosti ljudskog crijevnog soka korištena je 1%-tna otopina kazeina. Korišten je volumen uzorka od  $20\text{ }\mu\text{L}$  na  $500\text{ }\mu\text{L}$  otopine enzima ( $500\text{ }\mu\text{L}$  otopine hemoglobina zakiseljene s koncentriranom sumpornom kiselinom za želučani sok i  $500\text{ }\mu\text{L}$  otopine kazeina za crijevni sok). Same enzimске otopine su prije dodavanja uzorka stavljene na kratku inkubaciju u trajanju od 10 min pri temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U Eppendorf tube zatim je stavljeno  $500\text{ }\mu\text{L}$  enzimске otopine i  $20\text{ }\mu\text{L}$  uzorka. Za uzorke slijepe probe enzimska otopina s uzorkom odmah je prebačena u tubu u kojoj se nalazio  $1\text{ mL}$  10%-tne trikloroetene kiseline kako bi se odmah zaustavila enzimska reakcija. Ostale tube stavljene su na inkubaciju u trajanju od 20 min na temperaturu od  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga uzorci su prebačeni u tube koje su sadržavale  $1\text{ mL}$  10%-tne trikloroetene kiseline u svrhu zaustavljanja enzimске reakcije probavljenih uzoraka. Uzorci su zatim kratko ostavljeni da se istalože te potom stavljene na centrifugu na 10 min i uz 5000 okr/min. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant i prebačen u čiste tube te zatim u kvarenu kivetu. Uzorcima je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 280 nm (Almaas i sur., 2011) (slika 28).



Slika 28. Spektrofotometar (vlastita fotografija).

### 3.8.3. Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) - ljudski i komercijalni enzimi

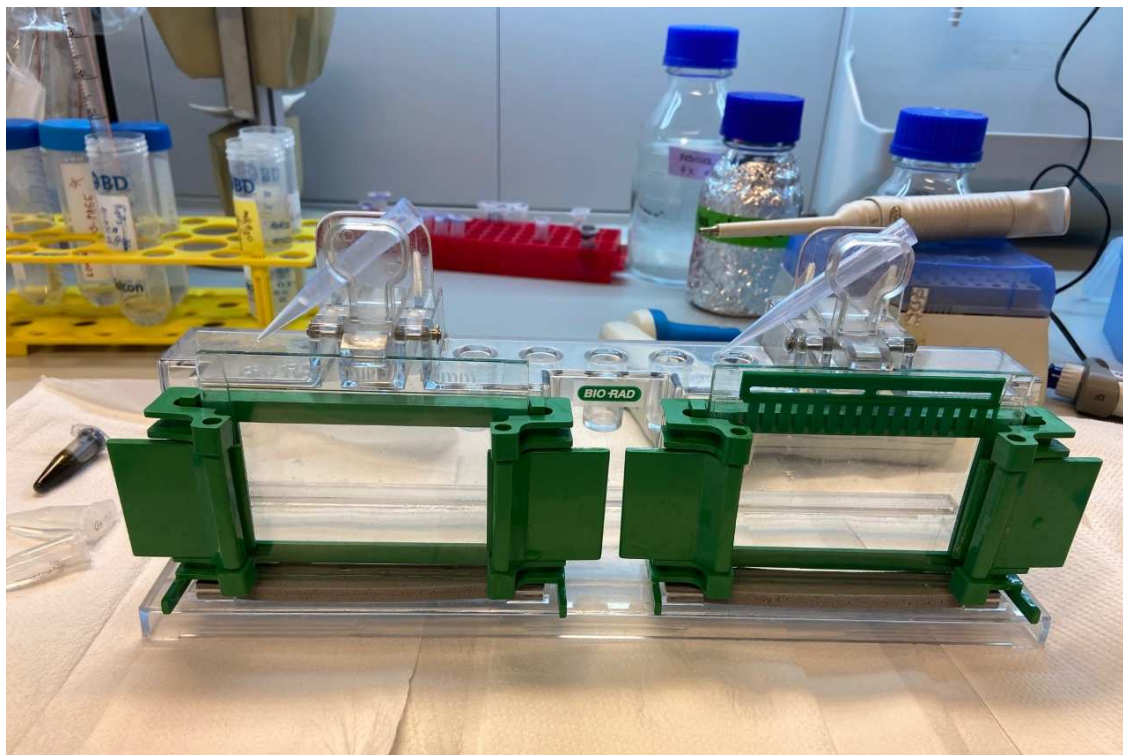
U svaku eppendorficu je dodano po 5 i 10  $\mu\text{L}$  uzorka. U eppendorficu gdje je 5  $\mu\text{L}$  uzorka dodan je 1  $\mu\text{L}$  boje (brom fenol plavo), a gdje je 10  $\mu\text{L}$  uzorka 2  $\mu\text{L}$  boje. Centrifugiranje se provodilo nakon stavljanja boje zbog boljeg miješanja (ako se stavlja prva) te ponovno nakon uzorka. Nakon toga su uzorci stavljeni 5 min na 95 °C da bi se enzimi denaturirali (slika 29). U prvu jažicu se dodao biomarker (5  $\mu\text{L}$ ), a u sljedeće jažice uzorci.



**Slika 29.** Termostat za grijanje (denaturacija enzima) (vlastita fotografija).

Gel za odjeljivanje (12 %) pripremljen je od: akrilamida (4,8 mL), donjeg pufera (2,5 mL), 10%-tnog natrijevog dodecil sulfata (SDS (120  $\mu$ L)), destilirane vode (4,7 mL), tetrametiletildiamina (TEMED (50  $\mu$ L)) i 10%-tnog amonijevog persulfata (APS (100  $\mu$ L)). Gel za sabijanje (4 %) pripremljen je od: akrilamida (800  $\mu$ L), gornjeg pufera (1,5 mL), SDS 10% (50  $\mu$ L), destilirane vode (3,7 mL), TEMED (25  $\mu$ L) i APS 10% (50  $\mu$ L). Prvo se stavlja pufer pa voda, zatim akrilamid i na kraju se dodaju ostali sastojci.

Prvo je napravljen gel za odjeljivanje te nakon što se polimerizirao, pripremio se gel za sabijanje. Kada se pripremio gel za odjeljivanje, stavljen je na pločicu (5-5,5 mL), a zatim je dodan izopropanol (1 mL). Nakon toga je stavljen gel za sabijanje (otprilike 10 min nakon) do vrha (otprilike 1,5-2 mL) i stavljeni su češljici (uži) (slika 30). Kada se polimerizirao gel za sabijanje, pločica se isprala destiliranom vodom. Pločica je stavljena 1 sat (60 min) na 100 V. Zatim je uronjena u boju preko noći u veliku Petrijevu zdjelicu. Nakon 24 sata pločica je stavljena u boju za odbojavanje.



**Slika 30.** Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu (vlastita fotografija).

#### **3.8.4. *In vitro* metoda probave s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima**

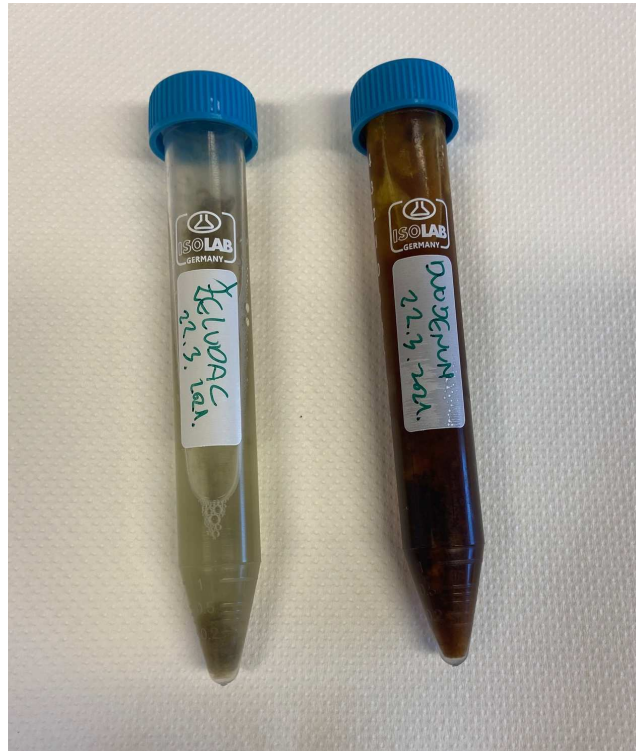
Dvofazni *in vitro* model probave podrazumijeva simuliranu probavu u želucu i u tankom crijevu s komercijalnim probavnim enzimima i s ljudskim probavnim enzimima prikupljenih od zdravih donora (slika 31). *In vitro* model probave GSL-a i ITC-a s komercijalnim enzimima rađen je prema metodi Brodkorb i sur. (2019) uz modifikacije, a *in vitro* model probave s ljudskim probavnim enzimima rađen je prema Blažević i sur. (2020a) uz modifikacije. Ukupni volumen neprobavljenih uzoraka i s probavnim sokovima (ljudskim i komercijalnim) postavljen je na 1,5 mL. Neprobavljeni uzorci nisu sadržavali probavne enzime niti su stavljeni na proces inkubacije, ali su nadopunjeni destiliranom vodom do volumena 1,5 mL. Dvofazni *in vitro* model probave podrazumijeva simuliranje probave želuca i tankog crijeva. Za određivanje biodostupnosti (stabilnosti) GSL-a, korišteni su ekstrakti bijele, smeđe i crne gorušice te visokog dragoljuba pripremljeni u 70%-tnom etanolu. U sve Eppendorf tube stavljeno je 650  $\mu$ L pojedinog ekstrakta. Prije dodatka želučanih enzima, pH uzoraka namješten je na 2 koristeći 1 M HCl. Uzorci s ljudskim želučanim sokom sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta uzorka, 182  $\mu$ L želučanog soka (13 U), 40  $\mu$ L HCl-a i razrijeđeni su destiliranom vodom do konačnog

volumena od 1,5 mL. Uzorci s ljudskim crijevnim sokom sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta uzorka, 442  $\mu$ L crijevnog soka (26 U) te su nadopunjeni destiliranom vodom do konačnog volumena 1,5 mL. Za *in vitro* metodu probave ITC-a s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima, eterično ulje dragoljuba i čisti spojevi BITC-a i AITC-a (Sigma-Aldrich, Merck KgaA, SAD) također su pripremljeni u 70%-tnom etanolu koncentracije 2 mg/mL. Uzorci s ljudskim želučanim sokom sastoje se od 750  $\mu$ L ekstrakta dragoljuba, 260  $\mu$ L želučanog soka (13 U) i nadopunjen je s destiliranom vodom do konačnog volumena. Uzorak s ljudskim crijevnim sokom sadrži 750  $\mu$ L ekstrakta dragoljuba, 650  $\mu$ L ljudskog crijevnog soka (26 U) te je ostatak do 1,5 mL dodana destilirana voda. Uzorci s komercijalnim želučanim enzimima sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta uzorka, 40  $\mu$ L HCl i 234  $\mu$ L SGF-a (simulirani želučani sok – engl. *Simulated gastric fluid*) u kojem je otopljen RGE-a (engl. *Rabbit gastric extract*, Lipolytech, Francuska) koji sadrži želučani pepsin i lipazu ne manje od 500 U/mg pepsina i 15 U/mg lipaze) i nadopunjeni destiliranom vodom do konačnog volumena 1,5 mL. Uzorci s komercijalnim crijevnim enzimima sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta i 338  $\mu$ L SIF-a (simulirani crijevni sok – engl. *Simulated intestinal fluid*) u kojem je otopljen pankreatin i žučne soli (Sigma-Aldrich, Merck KgaA, SAD). Ti su uzorci također nadopunjeni do konačnog volumena 1,5 mL. Uzorci koji sadrže želučane probavne enzime i pH 2 inkubirani su 30 min (ekstrakti gorušica i dragoljuba) i 60 min (eterično ulje dragoljuba i čisti spojevi AITC i BITC), a uzorci s crijevnim probavnim enzimima i pri pH 7 inkubirani su 120 min (slika 32). Nakon inkubacije uzorci su stavljani na led 5 min da bi se zaustavila enzimski reakcija. Uzorci su potom centrifugirani u vremenu od 5 min na sobnoj temperaturi pri broju okretaja od 10000 okr./min (ThermoScientific mySpin 12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) da bi se izdvojio supernatant (gornji dio) i pelet (donji dio) (slika 32). Nakon centrifugiranja ekstrakata gorušica i visokog dragoljuba, provedena je desulfatacija GSL-a.

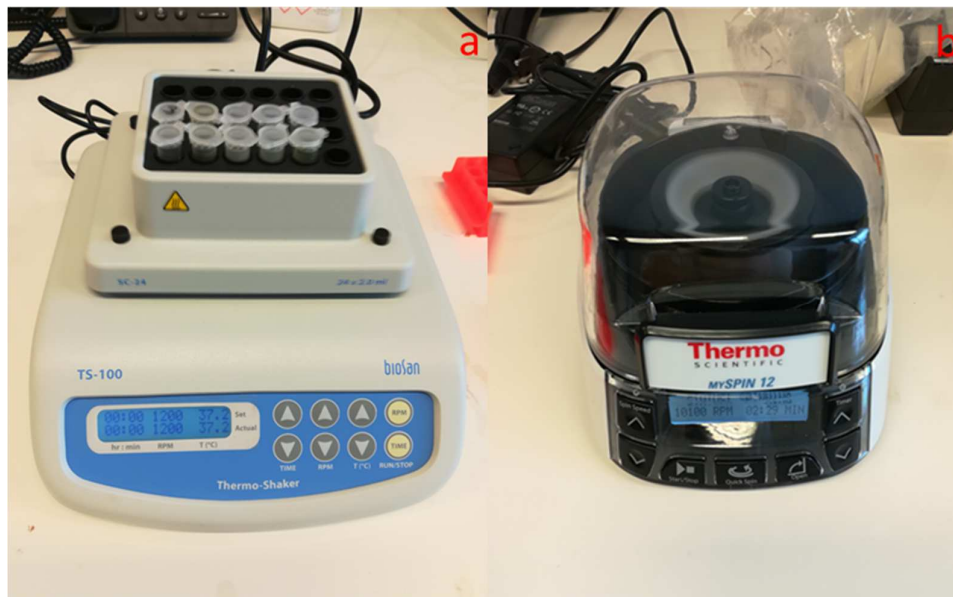
Nakon centrifugiranja eteričnog ulja visokog dragoljuba i čistih spojeva AITC i BITC, supernatant i pelet uzoraka ekstrahirani su smjesom pentana i dietil-etera u omjeru 3:1. Uzorci su rađeni u duplikatu te su spremljeni u bočice u zamrzivač na -20 °C do daljnje analize. Stabilnost (biodostupnost) ciljanog spoja izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Stabilnost (\%)} = (\text{koncentracija}_{\text{uzorka poslije probave}} / \text{koncentracija}_{\text{uzorka prije probave}}) \times 100\% \quad (3)$$





Slika 31. Ljudski želučani i crijevni sokovi (vlastita fotografija).



Slika 32. Simuliranje dvofaznog *in vitro* modela probave: stavljanje uzoraka na probavu u inkubator (a) i centrifugiranje uzoraka (b) (vlastita fotografija).

### 3.9. Hipoglikemijska aktivnost glukozinolata

#### 3.9.1. Inhibicija enzima $\alpha$ -glukozidaze

Za ispitivanje hipoglikemijske aktivnosti glukozinolata, čisti spojevi sinigrina, glukonapina i glukotropeolina te akarboze kao pozitivne kontrole pripremljeni su u ultračistoj vodi pri koncentraciji od 1mg/mL. Inhibitorna aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze određena je prema metodi Radunz i sur. (2021) s modifikacijama pomoću 96-mikrotitarske ploče. Ukratko, enzim  $\alpha$ -glukozidaza (0,1 U/mL) otopljen je u fosfatnom puferu (pH = 7,0). Supstrat 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (PNPG) 5 mM, također je otopljen u istom puferu (pH=7,0). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 100  $\mu$ L inkubirana je 30 min na temperaturi od 37 °C. Akarboza je korištena kao kontrola. Nakon inkubacije, dodano je 100  $\mu$ L 0,2M natrijevog karbonata (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) kako bi se zaustavila enzimska reakcija. Svi uzorci su izvedeni u triplikatu. ApSORBANCija je očitana pri valnoj duljini od 405 nm.

Postotak inhibicije određen je prema jednadžbi (1):

$$\text{Inhibicija (\%)} = ((A_o - A_{oc}) - (A_2 - A_1)) / (A_o - A_{oc}) \times 100\% \quad (4)$$

gdje je: A<sub>o</sub> = smjesa pufera, otapala, supstrata i enzima; A<sub>oc</sub> = smjesa pufera, otapala i supstrata; A<sub>2</sub> = reakcijska smjesa pufera, uzorka, supstrata i enzima; A<sub>1</sub> = mješavina pufera, uzorka i supstrata.

#### 3.9.2. Inhibicija enzima $\alpha$ -amilaze

Inhibitorna aktivnost enzima  $\alpha$ -amilaze određena je prema metodi Radunz i sur. (2021) i Telagari i sur. (2015) s modifikacijama pomoću 96-mikrotitarske ploče. Reakcijska smjesa koja sadrži 50  $\mu$ L fosfatnog pufera (pH = 7,0), 10  $\mu$ L  $\alpha$ -amilaze (1 U/mL) i 10  $\mu$ L uzorka prethodno je inkubirana na 37 °C tijekom 15 min. Zatim je dodano 30  $\mu$ L 1% topljivog škroba (pH 7,0) kao supstrat i inkubacija je dalje nastavljena na temperaturi od 37 °C kroz 15 min. U smjesu je potom dodano 100  $\mu$ L dinitrosalicilne kiseline (DNS) kao reagensa u boji i prebačena je na vodenu kupelj na temperaturu od 100 °C gdje je držana otprilike 10 min. ApSORBANCija dobivene smjese izmjerena je pri valnoj duljini od 540 nm. Akarboza u istoj koncentraciji kao i ispitivani uzorci korištena je kao standard. Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije, koji je izračunat primjenom prethodno navedene formule za određivanje inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze.

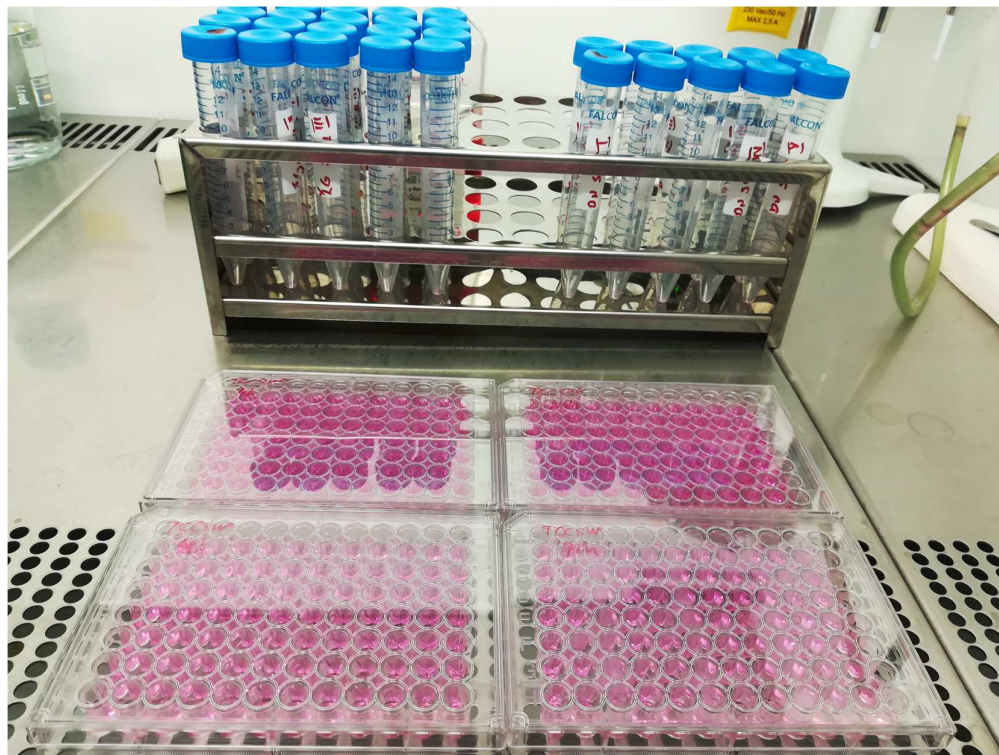
### 3.10. Antiproliferativna aktivnost

#### 3.10.1. Postupak uzgoja i nasađivanja stanica za MTT metodu

Nakon odmrzavanja stanične linije su uzgojene u Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mediju u vlažnom inkubatoru na temperaturi od 37 °C uz 5%-tnu koncentraciju CO<sub>2</sub> (Slika 26). DMEM medij sadrži FBS (goveđi serum), potrebne hranjive tvari kao što su aminokiseline i minerali, te antibiotike i fenol crveni indikator koji promjenom boje u žutu ukazuje da je medij potrebno promijeniti. Adherirane stanice, nakon uklanjanja DMEM-a, odvojene su od podloge enzimom tripsinom. Brojanje stanica odvija se tako da se 10 µL stanica pomiješa s 90 µL Trypan plave boje koja oboji mrtve stanice i omogućava brojenje živih stanica koje nisu obojane. Zatim se jednak broj stanica presađuje u 96 jažica u 3 replikata te se stanice ostave preko noći da se prihvate za podlogu. U sljedećem koraku stanice karcinoma tretiraju se prethodno pripremljenim uzorcima eteričnih ulja i ekstrakata gorušica i visokog dragoljuba u koncentracijama od 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom perioda od 4, 24, 48 i 72 sata. Šest jažica koje predstavljaju kontrolu ostavljene su u samom mediju te u njih nisu dodani uzorci.

#### 3.10.2. Antiproliferativna aktivnost MTT metodom

Vitalnost i stupanj proliferacije stanica određena je mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu (slika 33) na MDA-MB-231 i TCCSUP staničnim linijama. MDA-MB-231 je stanična linija adenokarcinoma dojke, a TCCSUP je stanična linija karcinoma prijelaznih stanica mokraćnog mjehura. Riječ je o epitelnim, adherentnim linijama koje se lako uzgajaju u kulturi. MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin-bromid) je prah žute boje koji se pripremi otapanjem u fosfatnom puferu (PBS). U metabolički aktivnim stanicama se reducira, dok ga metabolički neaktivne stanice ne vežu. Metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Odumrle stanice nemaju sposobnost pretvorbe MTT-a. Mehanizam pretvorbe MTT-a vjerojatno uključuje reakciju s NADH-om koji prenosi elektrone do MTT-a. Novonastali unutarstanični ljubičasti spoj se može mjeriti spektrofotometrijski, a da bi se mogla očitati apsorbancija potrebno ga je otopiti u otopini DMSO (dimetil sulfoksid). Sat vremena nakon što se doda MTT, supernatant se odsiše i doda se DMSO. Pločice su inkubirane na temperaturi od 37 °C uz treskanje tijekom 10 min. Apsorbancija je mjerena na valnoj ljudini od 570 nm.



Slika 33. Antiproliferativno djelovanje MTT metodom (vlastita fotografija).

### 3.10.3. Antiproliferativna aktivnost MTS metodom

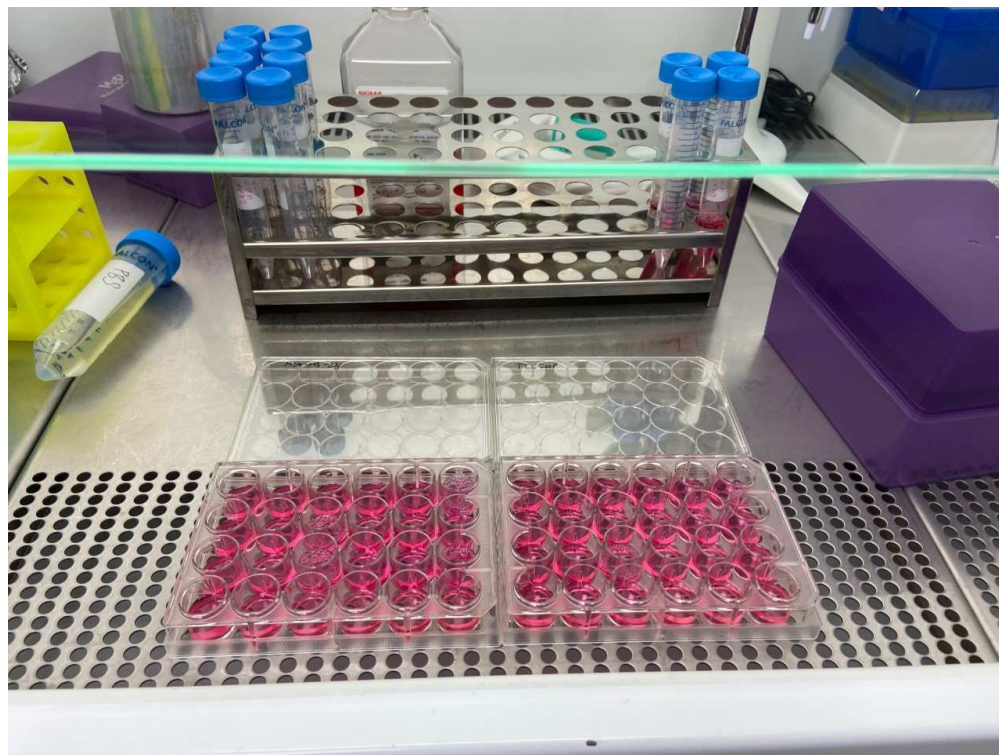
Antiproliferativno djelovanje eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba, kao i čisti spojevi BITC i BCN određeno je na tri stanične linije raka: stanična linija raka vrata maternice (HeLa), stanična linija raka debelog crijeva (HCT116) i stanična linija osteosarkoma (U2OS) MTS metodom. Stanične linije donacija su laboratorija prof. Janoša Terzića s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Antiproliferativna aktivnost određena je pomoću vodenog testa CellTiter 96® na bazi MTS-a (Promega, Wisconsin, SAD). Stanice su uzgajane u CO<sub>2</sub> inkubatoru na temperaturi od 37 °C i uz 5%-tnu koncentraciju CO<sub>2</sub> dok nisu dostigle 80% konfluentnosti. Postupak uzgoja proveden je jednako za sve stanične linije. Stanična linija HeLa prvi put je izolirana 1951. iz adenokarcinoma vrata maternice pacijentice Henriette Lacks te je prilagođena na *in vitro* uzgoj u laboratorijskim uvjetima. Ima sposobnost neograničeno se umnažati dok god ima dovoljno hranjivih tvari te primjerenih uvjeta uzgoja, a danas se koristi u brojnim laboratorijima za ispitivanja kontrole lijekova, za praćenje učinka različitih spojeva, a također je pogodna kao domaćin za ekspresiju različitih rekombinantnih proteina i cjepiva (Hendrick i sur., 2006). Stanična linija ljudskog osteosarkoma U2OS jedna je od prvih

generiranih staničnih linija i koristi se u raznim područjima biomedicinskih istraživanja. Ljudski osteosarkom je primarni maligni tumor kosti koji pogađa djecu i mlade (u dobi od 15 do 29 godina), ali i odrasle u kasnijoj životnoj dobi (dob > 60 godina). Stanice za uzgoj uzete su od ljudskog osteosarkoma 1964. iz umjereno diferenciranog sarkoma tibije od 15-godišnje djevojčice. To je jedna od prvih generiranih staničnih linija (Niforou i sur., 2018). HCT116 je ljudska stanična linija raka debelog crijeva koja se koristi u raznim biomedicinskim istraživanjima koje uključuju proliferaciju karcinoma debelog crijeva i odgovarajuće inhibitore. Riječ je o epitelnoj adherentnoj liniji koja se lako uzgaja u kulturi.

Stanice su prebrojane pomoću automatskog ručnog brojača stanica (Merck, New York, SAD), a  $0,5 \times 10^4$  stanica/jažici zasijano je u ploče s 96 jažica i tretirano serijski razrijeđenim ekstraktima. Stanice su potom uzgajane tijekom perioda od 48 sati, nakon čega je u svaku jažicu dodano 20  $\mu$ L MTS tetrazolij reagensa (Promega, Wisconsin, SAD). Nakon 3 sata inkubacije na temperaturi od 37 °C i uz 5%-tnu koncentraciju CO<sub>2</sub>, apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini od 490 nm pomoću čitača ploča s 96 jažica (Bio-Tek, EL808, Vermont, SAD).

### **3.11. Proapoptotska aktivnost**

Nakon odmrzavanja, stanične linije MDA-MB-231 i TCCSUP su uzgojene u vlažnom inkubatoru na temperaturi od 37 °C uz 5%-tnu koncentraciju CO<sub>2</sub> u DMEM mediju. U pločice s 24 jažice dodan je DMEM medij i pločice su ostavljene preko noći zbog prijanjanja stanica na podlogu. Stanice su potom tretirane tijekom perioda od 48 sati uzorcima eteričnih ulja i ekstraktom visokog dragoljuba dobivenih nakon MAD i MHG tehnika ekstrakcije (slika 34). Postotak apoptotskih stanica je izražen kao broj pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, čija je vrijednost postavljena kao 100% (BD Pharmingen Technical Data, 2022).



**Slika 34.** Ispitivanje proapoptotske aktivnost Aneksinom V-FITC (vlastita fotografija).

Aneksin V-FITC (Aviscera Bioscience, Santa Clara, SAD) je komplet za ispitivanje proapoptotske aktivnosti koji sadrži potrebne komponente za detekciju apoptoze stanica protočnom citometrijom. Aneksin V-FITC je fluorescentna proba koja se veže na fosfatidilserin u prisutnosti kalcija na početku apoptoze. Test se sastoji od vezanja Aneksina V-FITC na fosfatidilserin u membrani stanica na početak apoptoze i vezanje propidij jodida na staničnu DNK u stanicama gdje je membrana potpuno ugrožena. Nakon inkubacije stanica, Aneksin V-FITC se detektira kao zelena fluorescencija, a propidijev jodid kao crvena fluorescencija pomoću protočne citometrije (Aviscera Bioscience, 2022.)

Sve komponente potrebne za ispitivanje proapoptotske aktivnosti moraju postići sobnu temperaturu prije same upotrebe. Pufer za vezivanje (1 mL) prvo se razrijedi sa 9 mL deionizirane vode. Zatim se zagriju svi reagensi na sobnu temperaturu prije početka analize. Apoptoza stanica potaknuta je prethodno opisanom metodom. Nakon toga se stanice prikupe centrifugiranjem i resuspendiraju se u razrijeđenom puferu za vezivanje pri koncentraciji od  $\sim 1 \times 10^6$  stanica/mL. Zatim se doda 500  $\mu$ L suspenzije apoptotičkih stanica u plastičnu 12 $\times$ 75 mm epruvetu. Potom se doda 5  $\mu$ L Aneksina V-FITC konjugata i 10  $\mu$ L otopine propidijevog

jodida za svaku staničnu suspenziju. Epruvete se inkubiraju pri sobnoj temperaturi točno 10 min i zaštite od svjetlosti. Stanice, koje su u ranoj fazi apoptoze obojit će se samo s Aneksinom V-FITC konjugatom. Žive stanice neće biti obojene niti otopinom propidijevog jodida ili Aneksin V-FITC konjugatom. Nekrotične stanice biti će obojene i otopinom propidijevog jodida i Aneksin V-FITC konjugatom.

### 3.12. AFM mikroskopija

IC<sub>50</sub> koncentracija (50% inhibicije rasta stanica) eteričnog ulja visokog dragoljuba određena je na TCCSUP staničnoj liniji putem prethodno opisane MTT metode. Za proučavanje antiproliferativnog mehanizma TCCSUP stanična linija tretirana je s eteričnim uljem visokog dragoljuba u subtoksičnoj koncentraciji od 10 µg/mL tijekom 24 sata (IC<sub>50</sub> = 29,63 µg/mL). TCCSUP stanična linija uzgajana je u DMEM mediju u vlažnom inkubatoru na 37 °C s 5% CO<sub>2</sub>. Isti broj stanica (2×10<sup>4</sup>) prebačen je u TPP 40 Petrijeve zdjelice (Techno Plastic Products AG, Švicarska) i ostavljene su preko noći da se adheriraju. U svrhu otkrivanja morfoloških promjena tretiranih stanica napravljena je mikroskopija atomskih sila (AFM) i optička mikroskopija koje su provedene korištenjem Nanowizard IV sustava (JPK/Bruker, Berlin, Njemačka) koji je postavljen na invertirani optički mikroskop IX73 (Olympus, Tokio, Japan). AFM mjerenje živih stanica provedeno je pri 37 °C u DMEM mediju pomoću qp-BioAC-CI CB3 probe (Nanosenzori, Švicarska) u QI™ modu s rezolucijom 128×128 piksela. Pritom je maksimalna sila bila do 200 pN, a brzina probe do 150 µm/s. Obrada i prikaz podataka napravljeni su pomoću programske podrške JPK Data Processing (JPK/Bruker, Berlin, Njemačka).

### 3.13. Antibakterijska aktivnost

#### 3.13.1. Sojevi bakterija i uvjeti rasta

Za antibakterijska ispitivanja korišteni su Gram pozitivni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i Gram negativna *Escherichia coli* ATCC 11229, pohranjeni u zbirci mikroorganizama Laboratorija za mikrobiologiju hrane na Odsjeku za prehrambene znanosti Biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani. Bakterije su pohranjene na temperaturi od - 80 °C u triptičnoj juhi od soje (Biolife, Milano, Italija) s 15% glicerola (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Revitalizirane su na Mueller-Hinton agaru (MHA) (BioMéroieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) i inkubirane aerobno tijekom perioda od 24 sata na temperaturi od 37 °C.

Standardizirana inokulacija s koncentracijom stanica od 5 log jedinica za stvaranje kolonija (CFU)/mL pripravljena je u MH bujonu (MHB) (Oxoid, Hampshire, UK) za antibakterijske testove.

### 3.13.2. Antibakterijska aktivnost visokog dragoljuba

Minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimal inhibitory concentration*, MIC) određene su metodom mikrodilucije. Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba te čisti spojevi (BITC i BCN) otopljeni su u apsolutnom etanolu (Merck, Darmstadt, Njemačka) i razrijeđeni prije upotrebe. U mikrotitarskoj pločici s 96 jažica rađena su dvostruka razrijeđenja eteričnog ulja, ekstrakta i čistih spojeva kako bi se postigle koncentracije od 2 mg/mL do 0,06 mg/mL s konačnim volumenom od 50  $\mu$ L. Isti volumen pripremljenog inokuluma (vidi odjeljak 3.13.1.) dodan je u svaku jažicu i pomiješan. Nakon inkubacije dodano je 10  $\mu$ L 2-*p*-jodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-tetrazolij klorida (INT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) kao pokazatelj metaboličke aktivnosti bakterija (Klančnik i sur., 2010). MIC je bila najniža koncentracija pri kojoj rast bakterija nije detektiran kao smanjenje INT u crveni formazan. Koncentracija etanola u testu nikada nije prelazila 1%, što nije imalo utjecaja na rast odabranih bakterija. Za određivanje minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC), 5  $\mu$ L kultura, sakupljenih iz svake jažice mikrotitarske pločice s 96 jažica, inokulirano je na MHA i inkubirano aerobno tijekom perioda od 24 sata na temperaturi od 37 °C. MBC određena je kao koncentracija u kojoj bakterije nisu rasle.

### 3.13.3. Kinetika rasta bakterija

Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba te čisti spojevi, BITC i BCN, dodani su u 5 mL medija za rast kako bi se dobile konačne koncentracije za *S. aureus* ATCC 25923 od 0,25 mg/mL do 0,031 mg/mL i za *E. coli* ATCC 11229 od 1 mg/mL do 0,125 mg/mL. Nadalje, BITC i BCN su zajedno testirani u omjeru 1:2 i 1:1 protiv *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 11229 u odnosu na rezultate dobivene za MIC. Kao pozitivna kontrola korištene su kulture (*S. aureus* ili *E. coli*) bez dodatka biljnih pripravaka. Za negativnu kontrolu korišten je MHB sa ili bez dodatka biljnih pripravaka u različitim koncentracijama koja se nakon mjerenja oduzima od dobivenih rezultata. Inokula je pripravljena kako je gore opisano (vidi odjeljak 3.13.1.). Volumen od 100  $\mu$ L pripremljenih kultura i negativnih kontrola, sa ili bez dodatka biljnih pripravaka, dodan je u mikrotitarske pločice s 96 jažica (Nunc 266 120 polistirenske ploče;



Nunc, Danska). Optička gustoća na valnoj duljini od 600 nm mjerena je pomoću Multiskan čitača (ThermoScientific Waltham, MA, USA) svakih 30 min tijekom perioda od 24 sata na temperaturi od 37 °C kako bi se dobile krivulje rasta.

#### 3.13.4. Antiadhezijski test

Adhezija *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 11229 analizirana je uz tretiranje sa eteričnim uljem i ekstraktom visokog dragoljuba te BITC i BCN. Inokule su pripravljene kako je gore opisano (vidi odjeljak 3.13.1.) i tretirane sa eteričnim uljem, ekstraktom, BITC i BCN u koncentracijama MIC, ½ MIC i ¼ MIC. Zatim su prebačeni (200 µL) na polistirenske mikrotitarske pločice s 96 jažica (Nunc 266 120 polistirenske ploče; Nunc, Danska) i inkubirane aerobno na temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata. Supernatanti s neadherentnim stanicama uklonjeni su iz svake jažice i isprani tri puta s PBS-om (Oxoid, Hampshire, UK). Zatim je dodano 200 µL PBS-a i uzorci su tretirani ultrazvukom tijekom 10 min (28 kHz, 300 W; IskraPlo, Šetnjernej, Slovenija). Adhezija stanica ispitivana je kao CFU/mL, kako je prethodno opisano (Šikić Pogačar i sur., 2016). Netretirana kultura označena je kao negativna kontrola.

#### 3.14. Statistička analiza

Eksperimentalni podaci za *in vitro* probavu s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima sjemena bijele, smeđe i crne gorušice obrađeni su pomoću programa Excel za određivanje srednje vrijednosti kao i standardne devijacije (SD). Svi pokusi izvedeni su u duplikatima, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± SD. Nespareni-T test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri *p*-vrijednosti <0,05.

Eksperimentalni podaci za *in vitro* probavu s ljudskim probavnim enzimima sjemena visokog dragoljuba obrađeni su pomoću programa Excel za određivanje srednje vrijednosti kao i SD. Svi pokusi izvedeni su u duplikatima, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD dvaju mjerenja.

Eksperimentalni podaci za *in vitro* probavu s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima AITC-a, eteričnog ulja visokog dragoljuba i čistog spoja BITC-a obrađeni su pomoću programa Excel za određivanje srednje vrijednosti kao i SD. Svi pokusi izvedeni su u duplikatima, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD dvaju mjerenja. Nespareni-T-

test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti  $<0,05$ .

Za antiproliferativnu aktivnost MTT testom, vrijednosti  $IC_{50}$  (50% koncentracije inhibicije rasta stanica) izračunate su iz tri nezavisna eksperimenta te je statistička analiza određena korištenjem programa za analizu podataka GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, SAD). Statistička značajnost određena je korištenjem T-testa za srednje vrijednosti. Razina statističke značajnosti postavljena je na p-vrijednost  $<0,05$ .

Za antiproliferativnu aktivnost MTS testom, mjerenja su provedena u četiri ponavljanja za svaku koncentraciju, a vrijednosti  $IC_{50}$  izračunate su iz tri neovisna eksperimenta korištenjem programa za analizu podataka GraFit 6 (Erithacus, East Grinstead, UK). Kontrola otapala je izmjerena i uključena u dobivene rezultate. Statističke analize provedene su dvosmjernom ANOVA metodom nakon čega je slijedio Sidakov test višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su kao \*\*\*\* p  $< 0,0001$ .

Za proapototsku analizu, rezultati su prikazani kao sredstva tri nezavisna eksperimenta sa SD vrijednostima. Nespareni-T test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Statistički značajne razlike označene su kao \* p  $< 0,05$  i \*\* p  $< 0,005$ .

Za antibakterijsku aktivnost, svi eksperimenti izvedeni su u tri ponavljanja kao tri ili više nezavisna eksperimenta. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, uz analizu pomoću programa Origin 2018 (OriginLab, Northampton, SAD). Statistička analiza provedena je u IBM SPSS Statistics 23 (Statsoft Inc., Tulsa, SAD). Za provjeru normalnosti distribucije podataka proveden je Kolmogorov-Smirnov test normalnosti, a statistička značajnost određena je korištenjem T-testa za srednje vrijednosti. Razina statističke značajnosti postavljena je na p-vrijednost  $<0,05$ .

Ekperimentalni podaci za određivanje hipoglikemijske aktivnosti obrađeni su pomoću programa Excel za određivanje srednje vrijednosti kao i SD. Svi pokusi izvedeni su u triplikovima, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triju mjerenja.

### 3.15. DODATAK

#### 3.15.1. Optička i skenirajuća elektronska mikroskopija

Optički mikroskop (ZEISS AXIO Imager.A2m, Njemačka) i skenirajući elektronski mikroskop (JEOL JSM-5200, Japan) korišteni su za ispitivanje površinske morfologije sjemena gorušice prije i nakon upotrebe Clevenger hidrodestilacije i MAD-a (uvjeti koji su opisani u 3.3.2.1. i 3.3.3.2.1.). U tu svrhu, netaknute sjemenke gorušice su korištene. Kod skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), povećanja su dobivena pri naponima ubrzanja od 15 kV i 25 kV kod slika dobivenih povratno raspršenim elektronima (engl. *Backscattered electron image* - BEI) i sekundarnim elektronima (engl. *Secondary electron image* - SEI).

#### 3.15.2. Ekstrakcija masti i ulja

##### 3.15.2.1. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija izvedena je na univerzalnom sustavu za ekstrakciju (Büchi B-811-LSV, Flawil, Švicarska). Otapalo isparava iz posude, pare se podižu do hladila, kondenziraju i kondenzirano otapalo prelijeva se preko cijevi za kondenzaciju u uzorak sadržan u ekstrakcijskoj čahuri. Tvari topljive u otapalu zadržavaju se i održavaju kontakt u uzorku sve dok razina otapala ne dosegne visinu na koju je postavljen optički senzor, kada se otvori stakleni ventil i otapalo s ekstrahiranom tvari pusti natrag u posudu s otapalom. Oko 100 g uzorka izvagano je u staklene epruvete, koje se zatim pričvrste na ekstrakcijsku komoru, a 150 mL dietil etera stavlja se u posude s otapalima i koristi se kao otapalo tijekom 6 sati. Za svaki uzorak izračunat je postotak sadržaja ulja. Uzorci su rađeni u dva primjerka. Dobiveni uzorci čuvani su na temperaturi od -20 °C do daljnje analize.

##### 3.15.2.2. Ekstrakcija superkritičnim CO<sub>2</sub> fluidom (SCO<sub>2</sub>)

Eksperiment je proveden u sustavu ekstrakcije nadkritične tekućine (SFE) koji je napravljen prema metodi Jokić i sur. (2015). Samljeveni uzorci svake sorte (100 g) stavljeni su u posudu za ekstrakciju. Ekstrakcije su izvedene pod tlakom od 300 bara i temperaturom od 40 °C. Korišten je način dinamičke ekstrakcije za SFE gdje je superkritični CO<sub>2</sub> kontinuirano prolazio kroz matricu uzorka. Masa biljnog materijala u ekstraktoru i vrijeme ekstrakcije održavani su konstantnim tijekom pokusa. Brzina protoka CO<sub>2</sub> izmjerena je Matheson FM-1050 (E800) mjeračem protoka. Svaki postupak ekstrakcije trajao je 120 min, jer duže vrijeme ekstrakcije nije značajno povećalo prinos ekstrakcije. Dobiveni ekstrakti u svakom

eksperimentu sakupljani su u separatoru prethodno izvagane staklene epruvete na 1,5 MPa i 25 °C. Dobiveni prinos ekstrakta određen je vaganjem na vagi s preciznošću od  $\pm 0,0001$  g. Prinos ekstrakcije izražen je kao % (g ekstrakta/100 g uzorka). Za svaki uzorak izračunat je postotak sadržaja ulja. Uzorci su rađeni u duplikatu. Dobiveni ekstrakti čuvaju se na -20 °C do daljnje analize.

### 3.15.3. Sastav masnih kiselina

Za određivanje sastava masnih kiselina ulja bijele, smeđe, crne i divlje gorušice te visokog i niskog dragoljuba, metilni esteri su pripremljeni transmetilacijom upotrebom 2 M KOH u metanolu i heptanu. Analiza metilnih estera masnih kiselina (engl. *Fatty acid methyl esters* - FAMES) provedena je plinskim kromatografom (model 3900; Varian Inc., Lake Forest, CA, USA) s plameno-ionizacijskim detektorom (FID) uporabom kapilarne kolone RTX 2560 (100 m 0,25 mm i.d.; debljina obloge 0,20  $\mu\text{m}$ ; Restek, Bellefonte, PA, SAD) (slika 35). Različite sjemenke gorušice i dragoljuba mase 0,1 g izvagane su u epruveti s navojem od 5 mL. Ulje se otopilo u 2 mL heptana, a zatim se dodalo 0,2 mL 2M metanolne otopine kalijevog hidroksida (KOH). Nakon toga, epruveta je zatvorena i mućkana 30 s. Otopina je zatim ostavljena da se odvoji gornji sloj, odnosno da se odvoji bistra otopina heptana koja sadrži metilne estere i koja je spremna za injektiranje u kromatograf. Otopina heptana (gornji sloj) (1  $\mu\text{L}$ ) ubrizgana je u kromatograf s omjerom razdvajanja od 1:100. Nositelj plina bio je helij, a brzina protoka u koloni 3 mL/min. Temperatura injektora bila je 225 °C, a detektora 240 °C. Odvajanje metil estera osigurano je pomoću programa grijanja pećnice. Početna temperatura je bila 140 °C, postavljena izotermno u trajanju od 5 min, podignuta na 240 °C brzinom od 4 °C/min i držana na 240 °C u trajanju od 20 min. FAME je izmjeren korištenjem FAME skupa standarda (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich), a rezultati identificiranih komponenti izraženi su kao postoci metil estera određenih masnih kiselina, određivanjem postotka predstavljenog površinom odgovarajućeg vrha u odnosu na zbroj površina svih vrhova. Analiza je provedena u duplikatu.



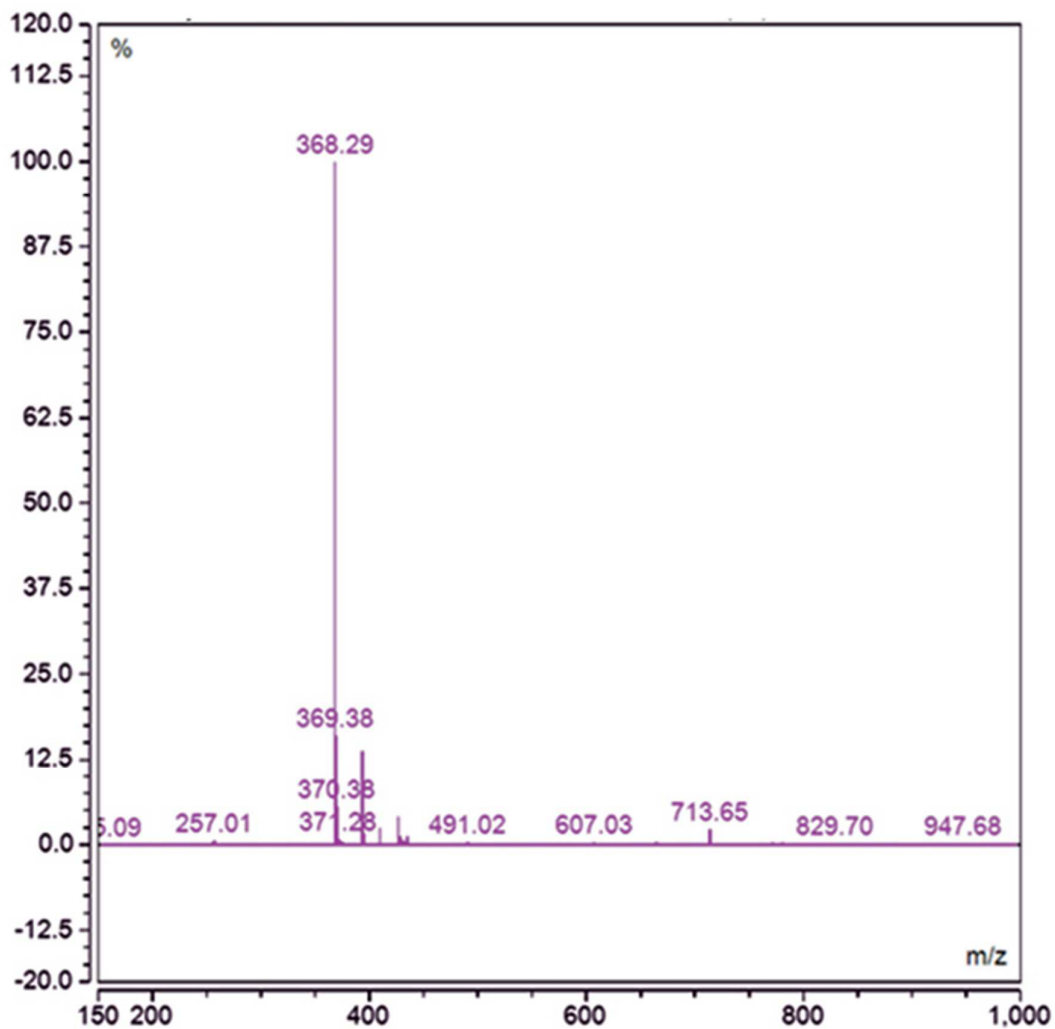
**Slika 35.** GC-FID uređaj (vlastita fotografija).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. HPLC-MS analiza glukozinolata u analiziranim uzorcima

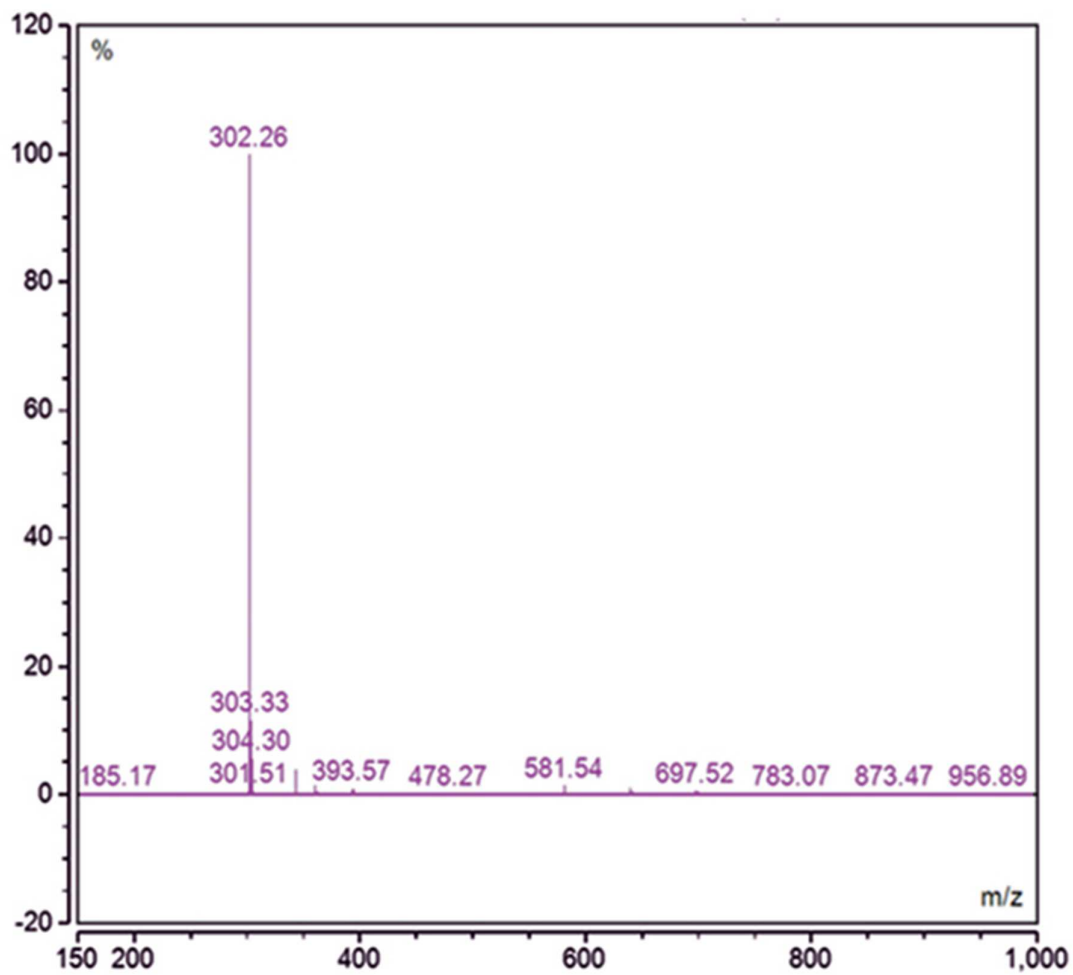
GSL-i prisutni u bijeloj, smeđoj i crnoj gorušici te visokom dragoljubu identificirani su UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom preko desulfo oblika (tablica 2, slike 36-40). GSL prisutan u niskom dragoljubu isti je kao u visokom dragoljubu stoga kromatogrami nisu prikazani.

#### Relativni intenzitet



**Slika 36.** MS spektar glukosinalbina u bijeloj gorušici. Masa  $m/z = 368$  odgovara natrijevom aduktu desulfo glukosinalbina.

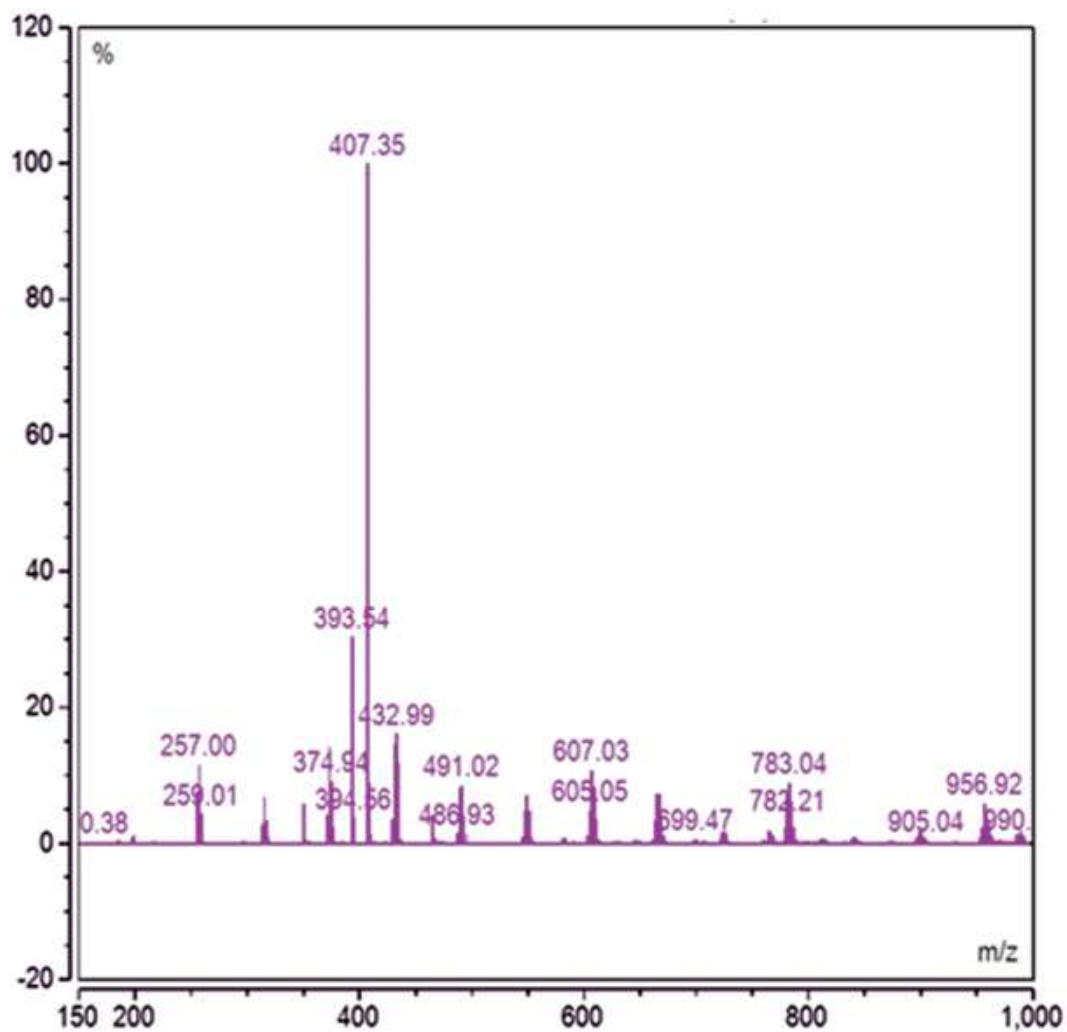
## Relativni intenzitet



**Slika 37.** MS spektar sinigrina u smeđoj gorušici. Masa  $m/z = 302$  odgovara natrijevom aduktu desulfosinigrina.

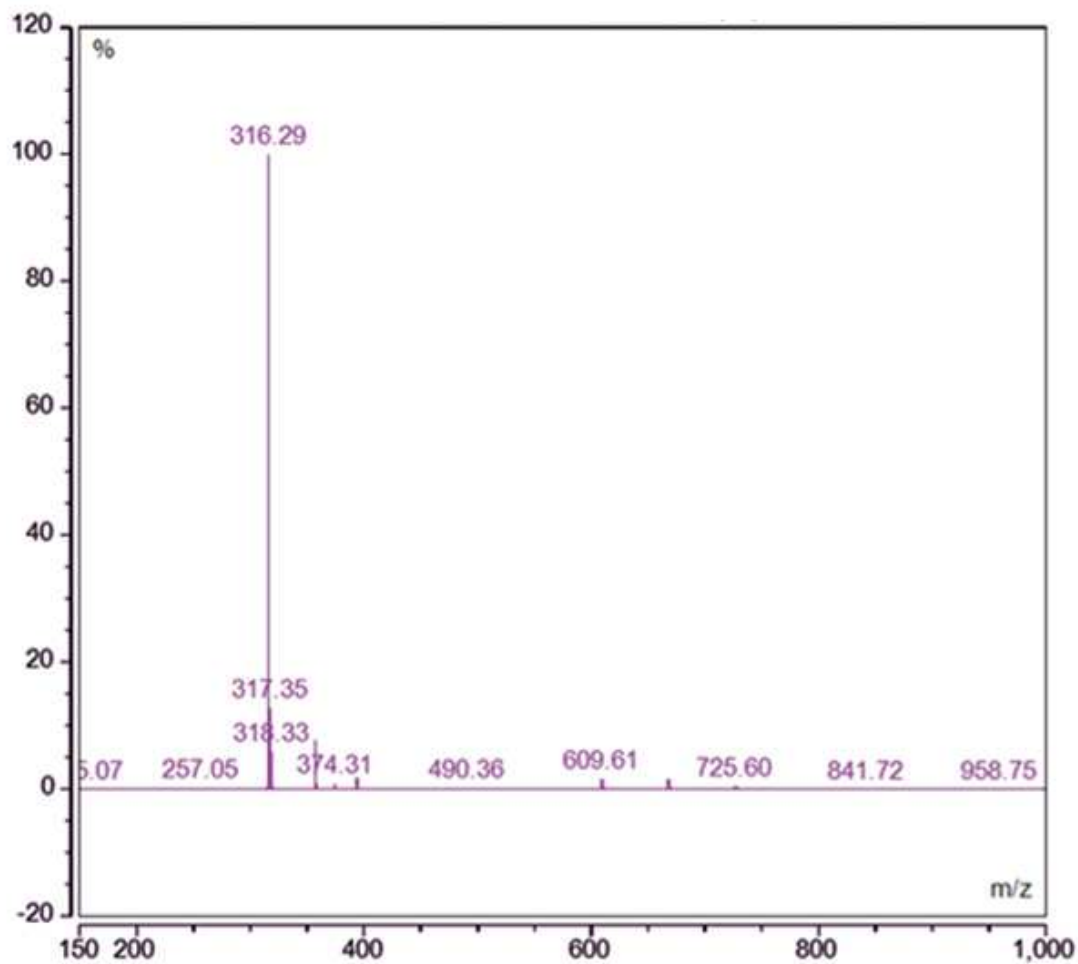


## Relativni intenzitet

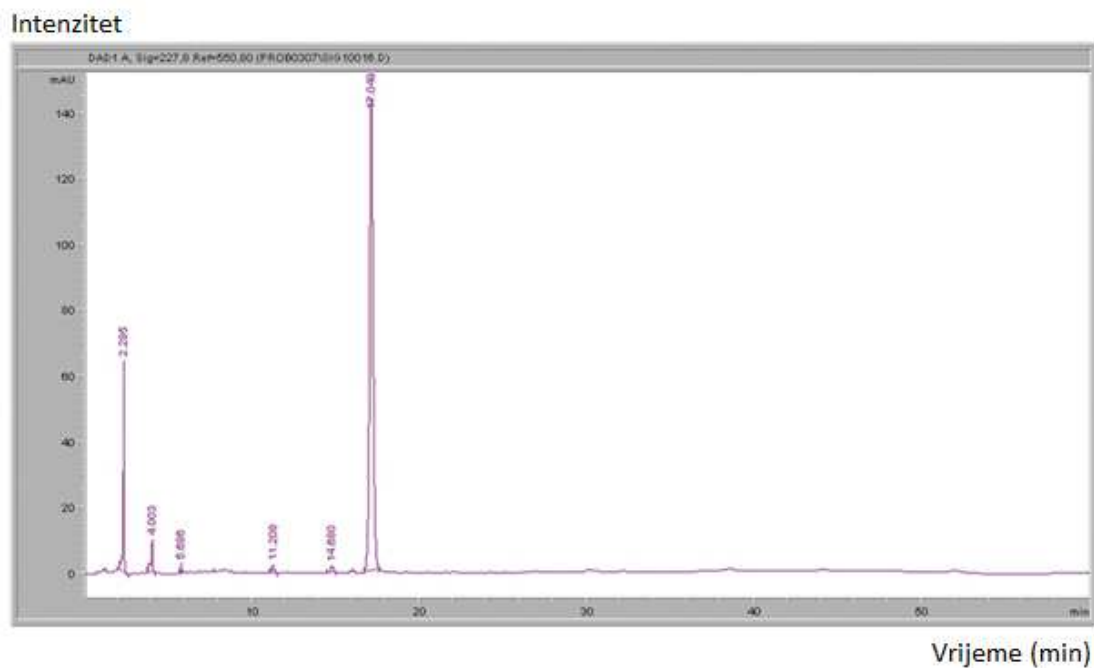


**Slika 38.** MS spektar 4-hidroksiglukobrasicina u smeđoj gorušici. Masa  $m/z = 407$  odgovara natrijevom aduktu desulfo-4-hidroksiglukobrasicina.

## Relativni intenzitet



**Slika 39.** MS spektar glukonapina u crnoj gorušici. Masa  $m/z = 316$  odgovara natrijevom aduktu desulfoglukonapina.



**Slika 40.** HPLC kromatogram sjemena visokog dragoljuba. Pik na 17 min je glukotropeolin.

**Tablica 2.** Sadržaj glukozinolata u različitim vrstama gorušica i visokom dragoljubu.

| Uzorci              | Glukosinalbin<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog<br>materijala) | Sinigrin<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog<br>materijala) | 4-Hidroksiglukobrasicin<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog materijala) | Glukonapin<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog<br>materijala) | Glukotropeolin<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog<br>materijala) |
|---------------------|---|--|--|--|--|
| Bijela<br>gorušica  | $151,20 \pm 1,69$   | /  | /  | /  | /  |
| Smeđa<br>gorušica   | /   | $52,46 \pm 1,56$                                     | $1,00 \pm 0,05$  | /  | /  |
| Crna<br>gorušica    | /   | $12,40 \pm 0,51$                                     | $1,60 \pm 0,08$  | $40,25 \pm 2,90$                                       | /  |
| Visoki<br>dragoljub | /   | /  | /  | /  | $16,86 \pm 0,01$   |

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2).

#### 4.2. GC-MS analiza eteričnih ulja i ekstrakata različitih vrsta gorušice i visokog dragoljuba

GC-MS/MS analiza eteričnih ulja i ekstrakata bijele i divlje gorušice nakon sve tri tehnike ekstrakcije (Clevenger hidrodestilacija, MAD i MHG) pokazala je da u njima nema hlapljivih spojeva GSL-a (podaci i kromatogrami nisu prikazani). Hlapljivi (razgradni) spojevi GSL-a dobiveni Clevenger hidrodestilacijom, MAD i MHG tehnikom ekstrakcije iz smeđe i crne gorušice te visokog dragoljuba identificirani su GC-MS/MS analizom (tablice 3 i 4, slike 41-49). Hlapljivi spojevi prisutni u niskom dragoljubu isti su kao u visokom dragoljubu (podaci i kromatogrami nisu prikazani).

**Tablica 3.** Hlapljivi spojevi u eteričnom ulju i ekstraktima iz sjemenki smeđe i crne gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije, MAD i MHG.

| Hlapljivi spojevi u sjemenkama gorušice | Smeđa gorušica             |            |            | Crna gorušica              |            |            |
|---|----------------------------|------------|------------|----------------------------|------------|------------|
|   | Clevenger hidrodestilacija | MAD        | MHG        | Clevenger hidrodestilacija | MAD        | MHG        |
| (% hlapljivih komponenti)               |                            |            |            |                            |            |            |
| AITC                                    | 95,94*                     | 91,07      | 99,01      | 15,39                      | 2,50       | 3,40       |
| But-3-enil-ITC                          | 1,02                       | /          | /          | 80,58                      | 4,76       | 5,80       |
| 3,4-Epitiobutanonitril                  | /                          | /          | /          | /                          | 7,51       | 25,97      |
| 4,5-Epitiopentanonitril                 | /                          | /          | /          | /                          | 50,70      | 59,93      |
| Benzenpropanonitril                     | /                          | /          | /          | /                          | 1,96       | /          |
| 2-Feniletil-ITC                         | /                          | 6,81       | /          | /                          | 3,85       | /          |
| Ukupan prinos hlapljivih spojeva (%)    | 96,96                      | 97,88      | 99,01      | 95,97                      | 71,28      | 95,1       |
| Ukupan prinos (mg/g)                    | 3,80 ± 0,9                 | 0,89 ± 0,2 | 2,15 ± 0,1 | 7,46 ± 1,5                 | 1,44 ± 0,1 | 2,38 ± 0,3 |

\*Vrca i sur., (2021a)

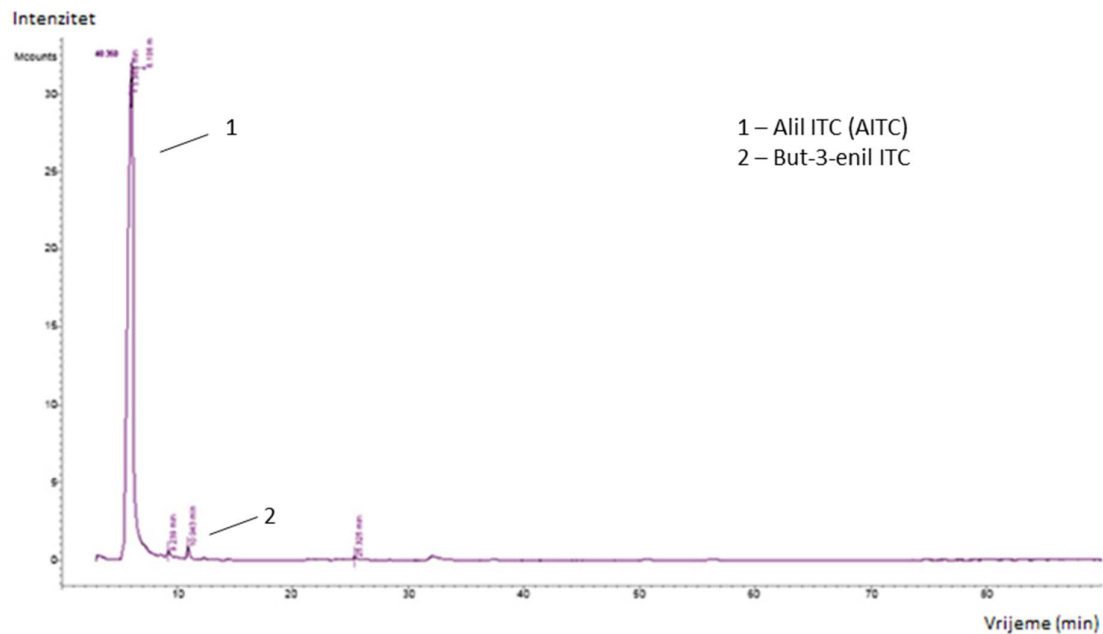
AITC alil-izotiocijanant

ITC izotiocijanant

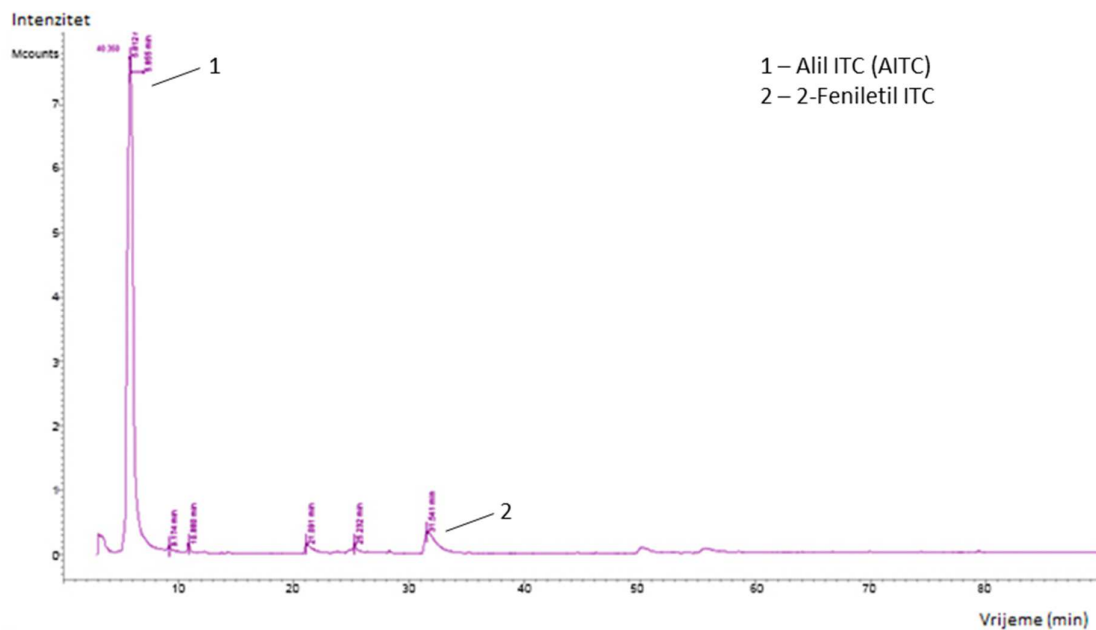
MAD destilacija potpomognuta mikrovalovima

MHG mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija

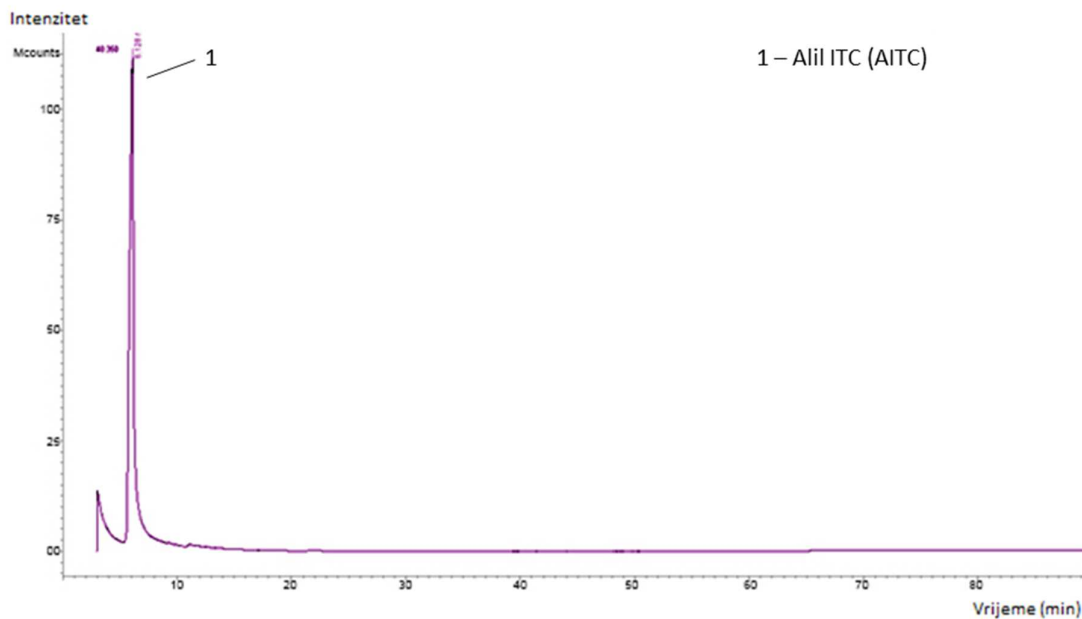
Vrijednosti prinosa ulja su srednja vrijednost ± SD (n=3).



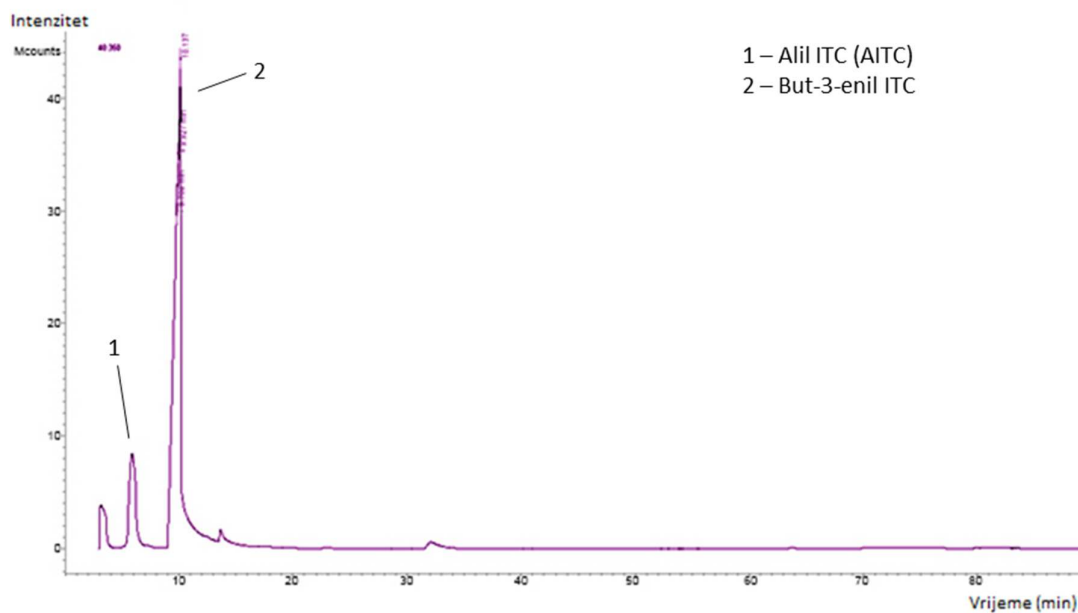
**Slika 41.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju smeđe gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije.



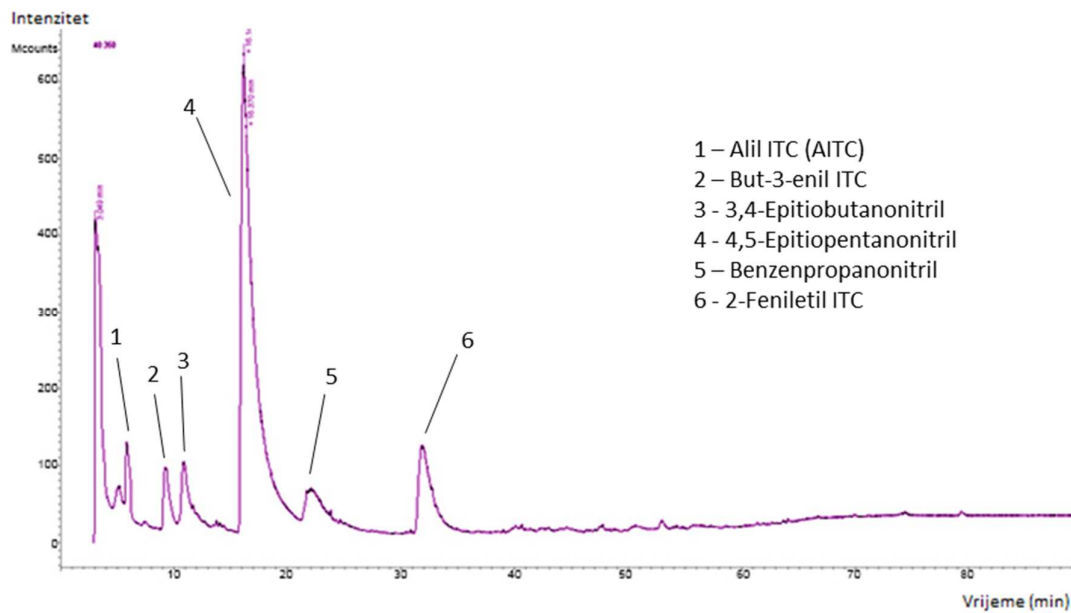
**Slika 42.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju smeđe gorušice nakon MAD tehnike.



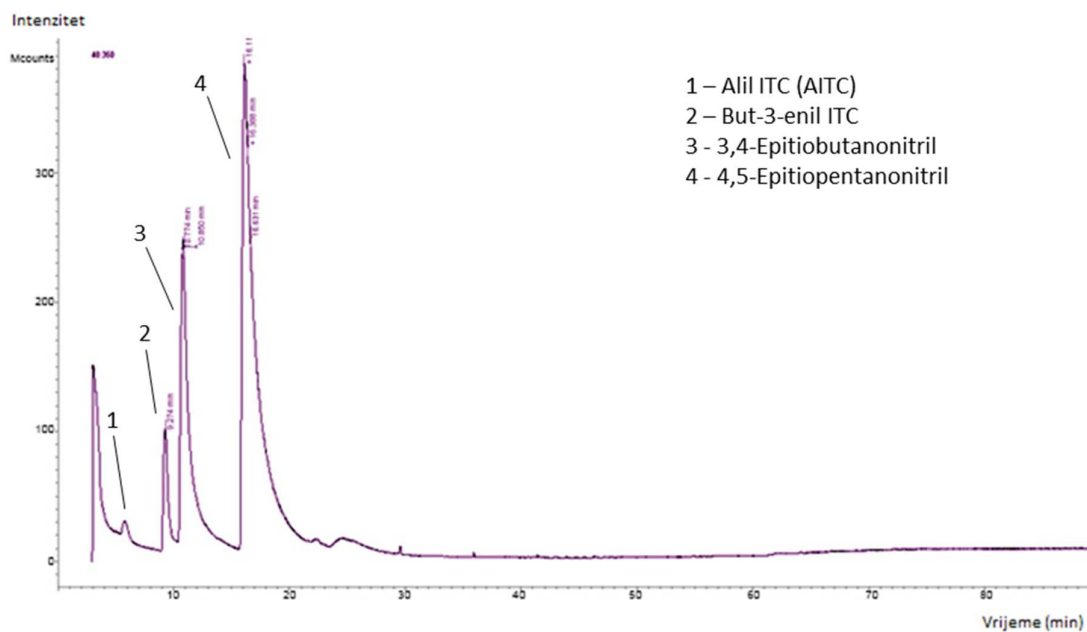
**Slika 43.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u ekstraktu smeđe gorušice nakon MHG tehnike.



**Slika 44.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju crne gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije.



**Slika 45.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju crne gorušice nakon MAD tehnike.



**Slika 46.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u ekstraktu crne gorušice nakon MHG tehnike.

**Tablica 4.** Hlapljivi spojevi u eteričnom ulju i ekstraktu iz sjemenki visokog dragoljuba poslije Clevenger hidrodestilacije, MAD and MHG.

| Hlapljivi spojevi u sjemenkama visokog dragoljuba                   | Clevenger hidrodestilacija (%) | MAD* (%)    | MHG* (%)   |
|---|--------------------------------|-------------|------------|
| Benzaldehid   | -                              | -           | 4,42       |
| BCN   | 3,52                           | 0,80        | 37,00      |
| BITC  | 95,40                          | 97,81       | 54,35      |
| Ukupan prinos hlapljivih spojeva u eteričnim uljima i ekstraktu (%) | 98,92                          | 98,61       | 95,77      |
| Ukupan prinos eteričnih ulja i ekstrakta (mg/g)                     | 78,4 ± 3,7                     | 31,25 ± 2,3 | 1,84 ± 0,2 |

\*Vrca i sur., (2022).

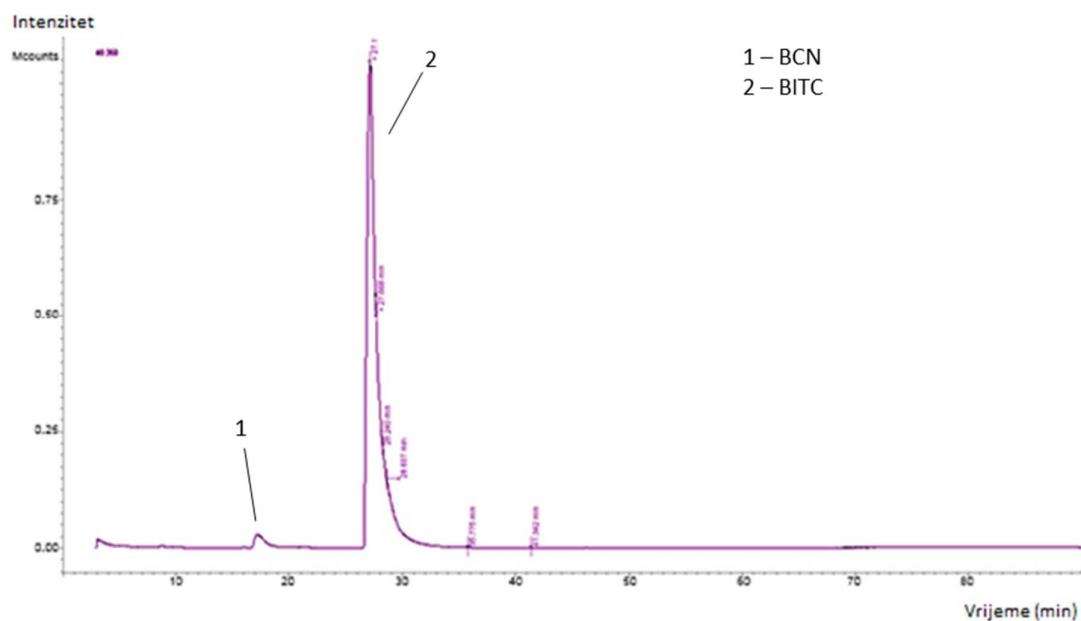
BCN Benzil-cijanid

BITC Benzil-izotiocijanat

MAD Destilacija potpomognuta mikrovalovima

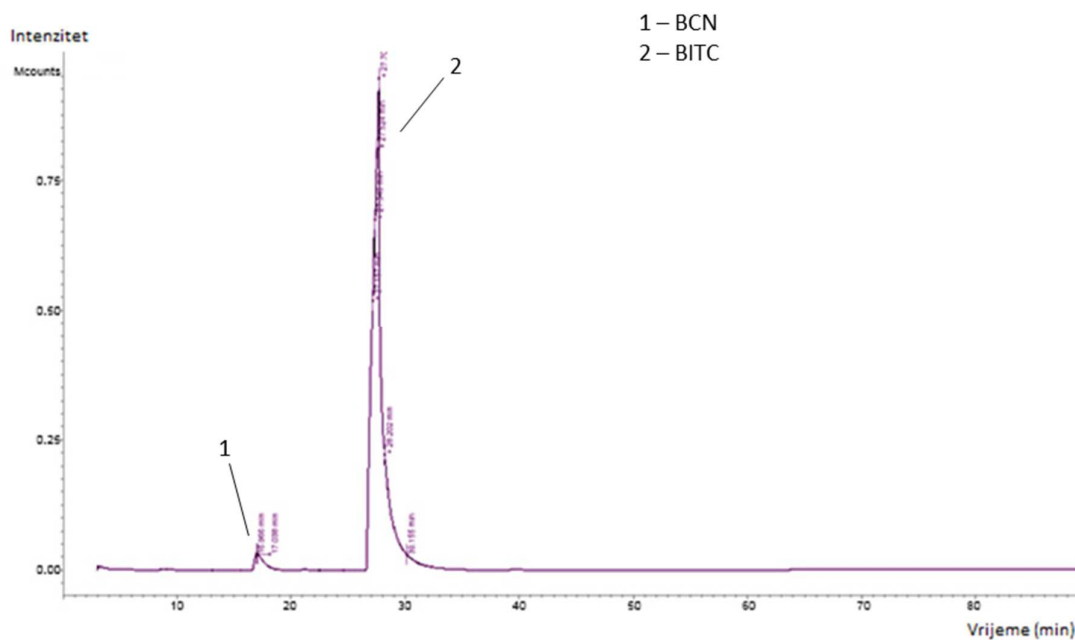
MHG Mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija

Vrijednosti prinosa ulja su srednja vrijednost ± SD (n=3).

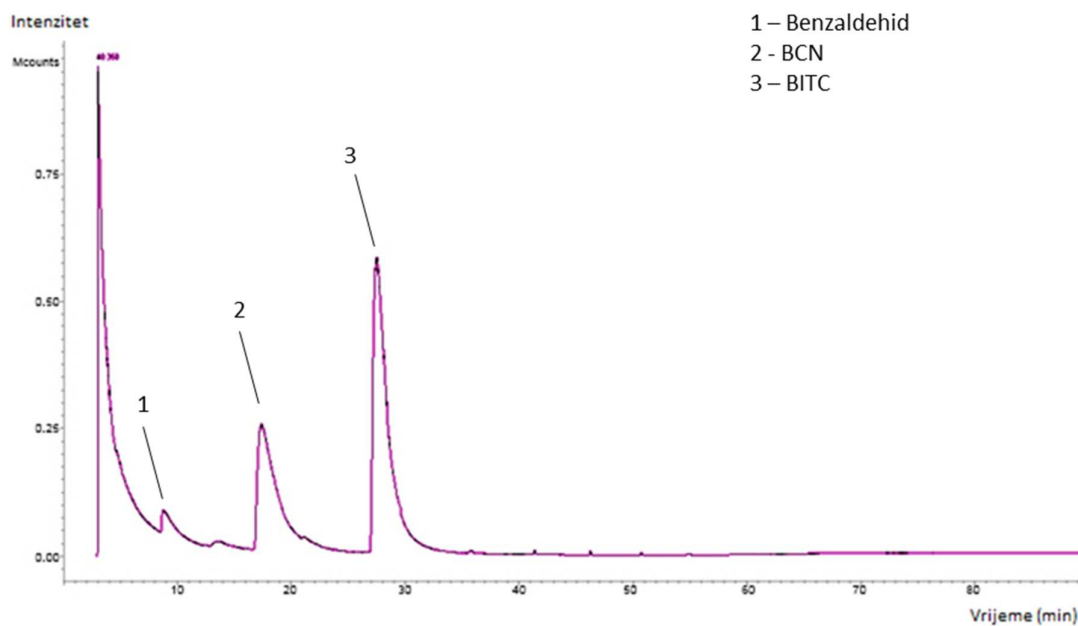


**Slika 47.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju sjemenki visokog dragoljuba nakon Clevenger hidrodestilacije.





**Slika 48.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju sjemenki visokog dragoljuba nakon MAD tehnike.



**Slika 49.** GC-MS kromatogram hlapljivih spojeva u eteričnom ulju sjemenki visokog dragoljuba nakon MHG tehnike.

#### 4.3. Stabilnost (biodostupnost) glukozinolata i izotiocijanata u ispitivanim uzorcima

Za eksperimente *in vitro* metode probave korišteni su komercijalni i ljudski probavni sokovi. Prije same metode probave, određena je enzimska aktivnost komercijalnih i ljudskih probavnih sokova spektrofotometrijski.

Elektroforeza proteina u ljudskim i komercijalnim probavnim sokovima napravljena je u SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) radi identifikacije pojedinih probavnih enzima.

UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom analize dobivene su koncentracije GSL-a iz bijele, smeđe i crne gorušice te visokog dragoljuba prije i nakon što su uzorci biljnog materijala podvrgnuti simuliranom dvofaznom modelu probave koristeći ljudske i komercijalne probavne enzime. Tablice 5-11 prikazuju koncentraciju GSL-a izraženu u mikrogramima po gramu biljnog materijala i biodostupnost u neprobavljenom uzorku i u uzorcima nakon pojedinih faza probave.

**Tablica 5.** Sadržaj glukosinalbina u bijeloj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Uzorcij bijele gorušice                               | Sadržaj glukosinalbina<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog materijala) | Biodostupnost<br>glukosinalbina<br>(%) | p-vrijednost |
|---|---|--|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 151,20 $\pm$ 1,69   | 100,00                                 | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 142,55 $\pm$ 7,85   | 94,28 $\pm$ 5,19                       | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 101,4 $\pm$ 7,07  | 67,06 $\pm$ 4,68                       | p < 0,05     |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 134,65 $\pm$ 4,03   | 89,05 $\pm$ 2,67                       | p < 0,05     |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 128,95 $\pm$ 10,96  | 85,28 $\pm$ 7,25                       | ns           |

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 6.** Sadržaj sinigrina u smeđoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Uzorci smeđe gorušice                                 | Sadržaj sinigrina<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog materijala) | Biodostupnost<br>sinigrina (%) | p-vrijednost |
|---|--|--------------------------------|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 52,46 $\pm$ 1,56   | 100,00                         | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 34,01 $\pm$ 8,03   | 64,85 $\pm$ 15,31              | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 18,94 $\pm$ 4,16   | 36,10 $\pm$ 7,93               | p < 0,05     |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 49,17 $\pm$ 1,19   | 93,73 $\pm$ 2,27               | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 22,19 $\pm$ 1,16   | 42,31 $\pm$ 2,22               | p < 0,05     |

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 7.** Sadržaj 4-hidroksiglukobracicina u smeđoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Uzorci smeđe gorušice                                 | Sadržaj 4-<br>hidroksiglukobracicina<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog materijala) | Biodostupnost 4-<br>hidroksiglukobracicina<br>(%) | p-vrijednost |
|---|---|---|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 1,00 $\pm$ 0,05   | 100,00  | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 0,94 $\pm$ 0,08   | 93,82 $\pm$ 8,20                                  | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 0,42 $\pm$ 0,01   | 41,47 $\pm$ 0,97                                  | p < 0,05     |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 0,96 $\pm$ 0,03   | 95,92 $\pm$ 2,54                                  | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 0,35 $\pm$ 0,11   | 34,59 $\pm$ 11,09                                 | p < 0,05     |

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 8.** Sadržaj glukonapina u crnoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Uzorci crne gorušice                                  | Sadržaj glukonapina<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog materijala) | Biodostupnost<br>glukonapina (%) | p-vrijednost |
|---|--|----------------------------------|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 40,25 $\pm$ 2,90   | 100,00                           | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 33,39 $\pm$ 0,77   | 78,94 $\pm$ 0,64                 | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 12,05 $\pm$ 0,27   | 28,49 $\pm$ 1,81                 | p < 0,05     |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 40,15 $\pm$ 2,35   | 94,91 $\pm$ 5,56                 | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 27,28 $\pm$ 0,74   | 64,48 $\pm$ 1,74                 | p < 0,05     |

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 9.** Sadržaj sinigrina u crnoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Uzorci crne gorušice                                  | Sadržaj sinigrina<br>( $\mu\text{g/g}$ biljnog materijala) | Biodostupnost<br>sinigrina (%) | p-vrijednost |
|---|--|--------------------------------|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 12,40 $\pm$ 0,51   | 100,00                         | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 11,05 $\pm$ 0,10   | 89,11 $\pm$ 0,83               | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 2,93 $\pm$ 0,27  | 23,59 $\pm$ 2,20               | p < 0,05     |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 11,56 $\pm$ 0,70   | 93,21 $\pm$ 5,68               | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 5,10 $\pm$ 0,40  | 41,12 $\pm$ 3,26               | p < 0,05     |

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 10.** Sadržaj 4-hidroksiglukobracicina u crnoj gorušici prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Uzorci crne gorušice                                  | Sadržaj 4-hidroksiglukobracicina (µg/g biljnog materijala) | Biodostupnost 4-hidroksiglukobracicina (%) | p-vrijednost |
|---|--|--|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 1,60 ± 0,08  | 100,00                                     | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 1,58 ± 0,03  | 98,64 ± 1,99                               | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 0,24 ± 0,08  | 14,64 ± 4,79                               | p < 0,05     |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 1,28 ± 0,10  | 80,00 ± 6,19                               | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 0,24 ± 0,01  | 15,25 ± 0,76                               | p < 0,05     |

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 11.** Sadržaj glukotropeolina u visokom dragoljebu prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Uzorci visokog dragoljuba                        | Sadržaj glukotropeolina (µg/g biljnog materijala) | Biodostupnost glukotropeolina (%) |
|--|---|-----------------------------------|
| Neprobavljeni uzorak                             | 16,86 ± 0,01                                      | 100,00                            |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima | 15,97 ± 0,03                                      | 94,72 ± 0,89                      |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima | 13,75 ± 0,20                                      | 81,55 ± 1,87                      |

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=2).

Sadržaj ITC-a koji ostaje nakon probave i dostupan je za apsorpciju, izuzetno je važan zbog različitih bioloških aktivnosti koje im se pripisuju poput antikancerogene, antimikrobne antifungalne i protuupalne aktivnosti. Tablice 12-14 i Slike 56-58 prikazuju koncentraciju i stabilnost čistog spoja AITC-a, BITC-a iz eteričnog ulja visokog dragoljuba nakon MAD-a te čistog spoja BITC-a u uzorcima podvrgnutim *in vitro* želučanim i crijevnim fazama probave nakon GC-MS/MS analize.

**Tablica 12.** Koncentracija čistog spoja AITC-a prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Faze probave  | Koncentracija AITC-a (mg/mL) | Stabilnost AITC-a (%) | p-vrijednost |
|---|------------------------------|-----------------------|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 2,47 ± 0,03                  | 100,00                | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 2,13 ± 0,05                  | 85,14 ± 1,80          | p < 0,05     |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 1,37 ± 0,18                  | 54,87 ± 6,42          | p < 0,05     |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 2,16 ± 0,08                  | 86,27 ± 2,69          | p < 0,05     |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 0,76 ± 0,03                  | 30,20 ± 0,94          | p < 0,05     |

\*Vrca i sur., (2021a)

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 13.** Koncentracija BITC-a iz eteričnog ulja visokog dragoljuba prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Faze probave  | Koncentracija BITC-a (mg/ml) | Stabilnost BITC-a (%) | p-vrijednost |
|---|------------------------------|-----------------------|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 1,67 ± 0,18                  | 100,00                | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 1,62 ± 0,11                  | 97,57 ± 3,15          | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 1,19 ± 0,02                  | 71,17 ± 1,21          | ns           |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 1,22 ± 0,00                  | 73,47 ± 0,06          | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 0,91 ± 0,01                  | 54,90 ± 0,39          | p < 0,05     |

\*Vrca i sur., (2021b)

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

**Tablica 14.** Koncentracija čistog spoja BITC-a prije i poslije *in vitro* metode probave.

| Faze probave  | Koncentracija<br>BITC-a (mg/mL) | Stabilnost BITC-a<br>(%) | p-vrijednost |
|---|---------------------------------|--------------------------|--------------|
| Neprobavljeni uzorak                                  | 1,78 ± 0,34                     | 100,00                   | -            |
| Poslije želučane faze uz dodatak komercijalnih enzima | 1,41 ± 0,01                     | 79,23 ± 0,67             | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak komercijalnih enzima | 1,25 ± 0,09                     | 70,36 ± 5,15             | ns           |
| Poslije želučane faze uz dodatak ljudskih enzima      | 1,29 ± 0,02                     | 72,24 ± 0,87             | ns           |
| Poslije crijevne faze uz dodatak ljudskih enzima      | 1,15 ± 0,05                     | 64,70 ± 3,02             | ns           |

\*Vrca i sur., (2021b)

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=2). Nespareni-T-test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Podaci su prihvaćeni kao značajni pri p-vrijednosti <0,05. ns- not significant

#### 4.4. Hipoglikemijska aktivnost analiziranih uzoraka glukozinolata

Hipoglikemijska aktivnost čistih spojeva GSL-a glukonapina, sinigrina i glukotropeolina (inhibitorna aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze) određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 405 nm, odnosno 540 nm. Rezultati inhibitorne aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze GSL-a glukonapina, sinigrina i glukotropeolina te akarboze prikazani su u tablici 20. Nijedan od ispitivanih GSL-a nije pokazao inhibitornu aktivnost  $\alpha$ -amilaze (podaci nisu prikazani). Akarboza je korištena kao pozitivna kontrola. Svi uzorci su rađeni u triplikatu.

**Tablica 15.** Inhibitorna aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze GSL-a glukonapina, sinigrina i glukotropeolina.

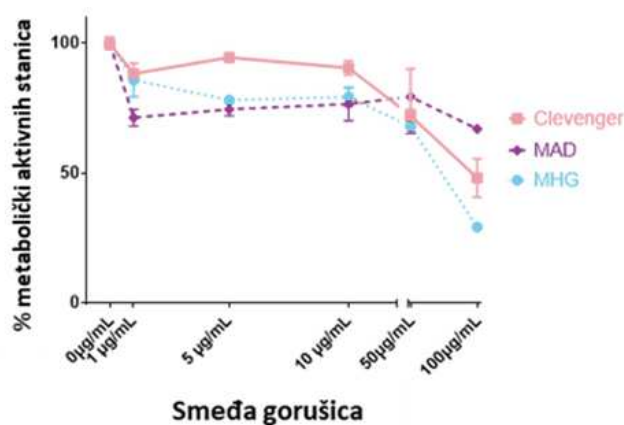
| Uzorci (c = 500 $\mu$ g/mL) | Inhibicija $\alpha$ -glukozidaze (%) |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Sinigrin                    | 0,00                                 |
| Glukonapin                  | 0,00                                 |
| Glukotropeolin              | 3,31 $\pm$ 0,1                       |
| Akarboza                    | 62,31 $\pm$ 1,5                      |

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD (n=3).

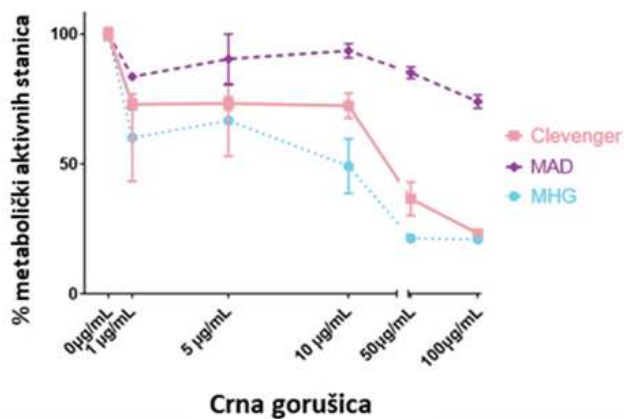


#### 4.5. Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata ispitivanih uzoraka

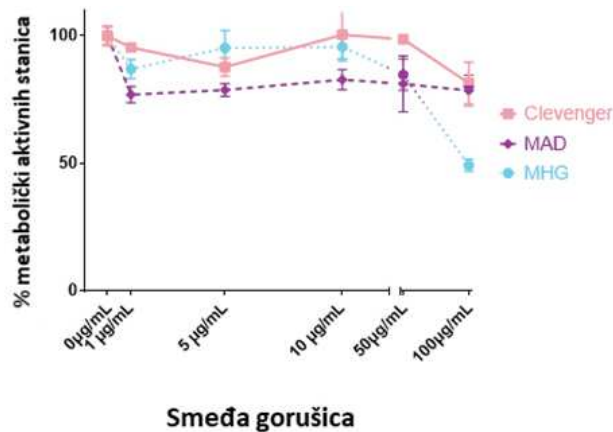
Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata smeđe i crne gorušice ispitana je na MDA-MB-231 i TCCSUP staničnim linijama raka mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu (slike 50-53). Stanice raka tretirane su na 4, 24, 48 i 72 sata, a rezultati su prikazani samo na 72 sata zbog slabog ili umjerenog antiproliferativnog učinka gorušica te su izraženi kao IC<sub>50</sub> vrijednosti (50% koncentracije inhibicije rasta stanica).



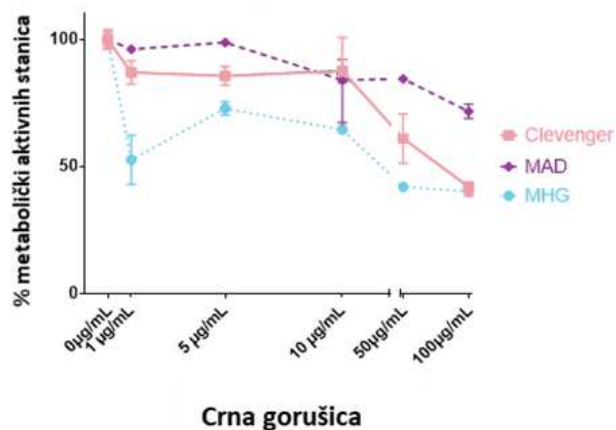
**Slika 50.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata smeđe gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 u koncentracijama od 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije (Vrca i sur., 2021a).



**Slika 51.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta crne gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 u koncentracijama od 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije (Vrca i sur., 2021a).

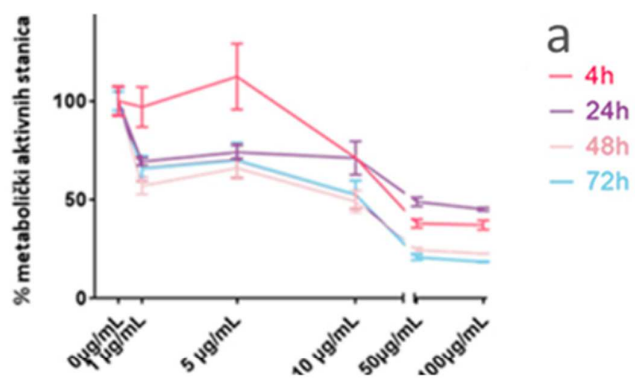


**Slika 52.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta smeđe gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP u koncentracijama 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije (Vrca i sur., 2021a).

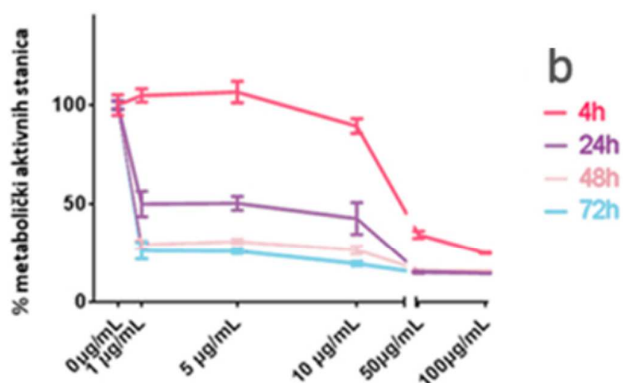


**Slika 53.** Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta crne gorušice nakon 72 sata na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP u koncentracijama 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL. Clevenger – eterično ulje nakon Clevenger hidrodestilacije; MAD – eterično ulje nakon mikrovalne destilacije; MHG - ekstrakt nakon mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije (Vrca i sur., 2021a).

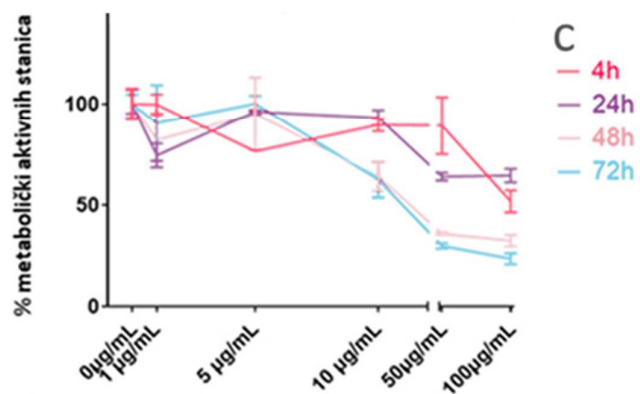
Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba dobivenih različitim tehnikama ekstrakcije (Clevenger hidrodestilacija, MAD i MHG) ispitana je također na 4, 24, 48 i 72 sata pri koncentracijama 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL na MDA-MB-231 i TCCSUP staničnim linijama raka MTT metodom (slike 54 i 55). Prikazani su rezultati na sva vremena te su izraženi kao  $IC_{50}$  vrijednosti (50% koncentracije inhibicije rasta stanica).



Eterično ulje visokog dragoljuba (Clevenger hidrodestilacija)

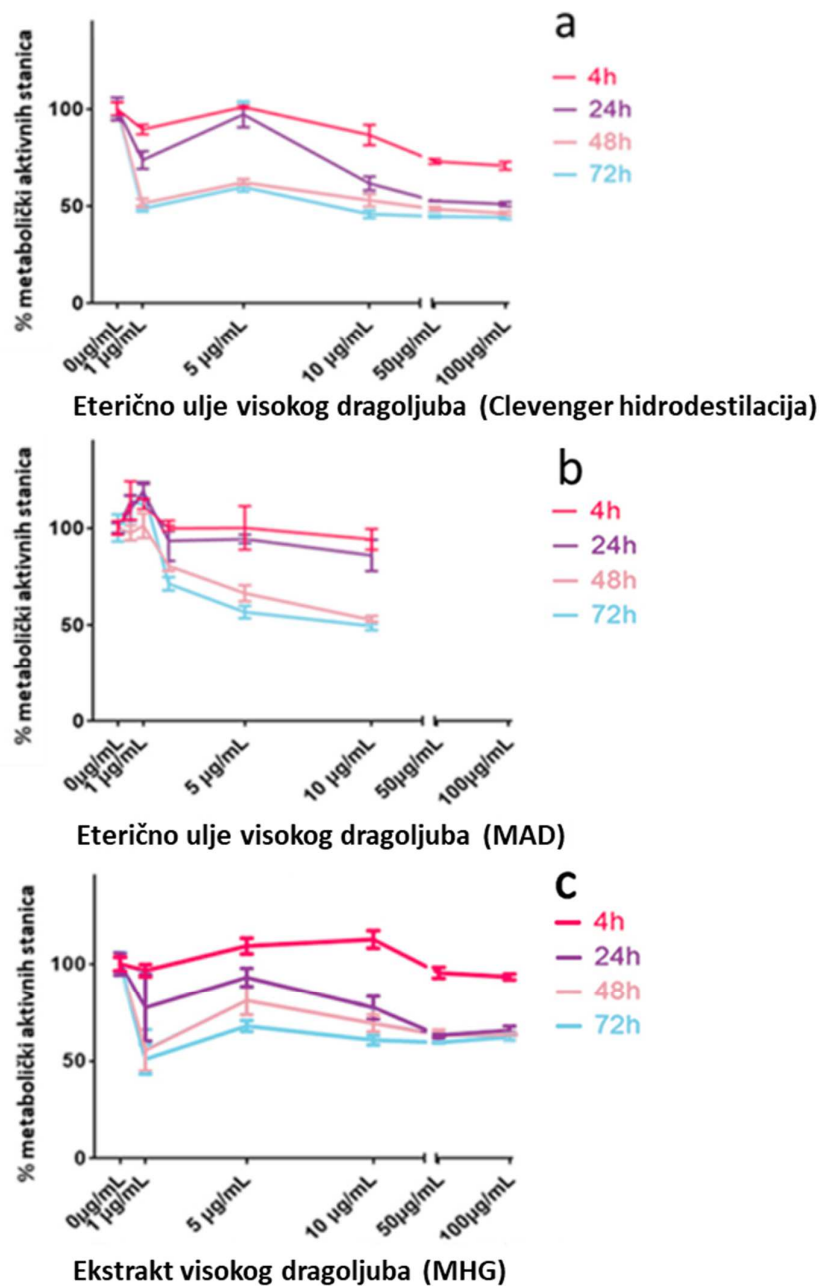


Eterično ulje visokog dragoljuba (MAD)



Ekstrakt visokog dragoljuba (MHG)

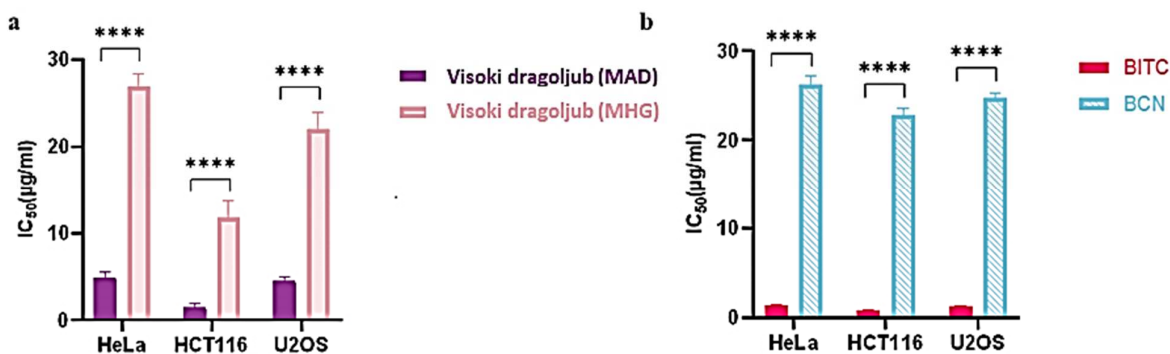
**Slika 54.** Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 nakon Clevenger hidrodestilacije (a), MAD (b) i MHG (c).



**Slika 55.** Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP nakon Clevenger hidrodestilacije (a), MAD (b) i MHG (c).

Zbog visoke antiproliferativne aktivnosti visokog dragoljuba na MDA-MB-231 i TCCSUP staničnim linijama dokazanih MTT metodom, dodatno je ispitana antiproliferativna

aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba dobivenih tehnikama ekstrakcije MAD i MHG, kao i čistih spojeva BITC-a i BCN-a zajedno na HeLa, HCT116 i U2OS staničnim linijama raka pomoću testa proliferacije stanica MTS (slika 56). Stanice raka tretirane su 48 sati, a rezultati su izraženi kao IC<sub>50</sub> vrijednosti (50% koncentracije inhibicije rasta stanica).



**Slika 56.** Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja visokog dragoljuba nakon MAD-a i ekstrakta visokog dragoljuba nakon MHG (a), te antiproliferativna aktivnost benzil-izotiocijanata (BITC) i benzil-cijanida (BCN) (b) na staničnoj liniji raka vrata maternice (HeLa), staničnoj liniji raka debelog crijeva (HCT116) i staničnoj liniji osteosarkoma (U2OS) određene testom stanične proliferacije na temelju MTS-a. Rezultati su prikazani kao sredstva tri nezavisna eksperimenta sa SD vrijednostima. Statističke analize provedene su dvosmjernom ANOVA metodom nakon čega je slijedio Sidakov test višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su kao  $p < 0,0001$  (Vrca i sur., 2022).

#### 4.6. Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba

U tablicama 16-19 prikazani su rezultati protočne citometrije analize indukcije apoptoze nakon tretmana eteričnim uljem i ekstraktom visokog dragoljuba na stanicama linije raka dojke MDA-MB-231 i raka mokraćnog mjehura TCCSUP.

**Tablica 16.** Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka dojke MDA-MB-231.

| Kasna apoptoza |      |                       |      |              | Rana + kasna apoptoza |      |                       |      |              |
|----------------|------|-----------------------|------|--------------|-----------------------|------|-----------------------|------|--------------|
| Kontrola (%)   |      | MAD eterično ulje (%) |      |              | Kontrola (%)          |      | MAD eterično ulje (%) |      |              |
| Sr. vr.        | ±SD  | Sr. vr.               | ±SD  | p-vrijednost | Sr. vr.               | ±SD  | Sr. vr.               | ±SD  | p-vrijednost |
| 1,52           | 0,10 | 2,88                  | 0,56 | p < 0,05     | 3,12                  | 1,25 | 6,06                  | 0,79 | p < 0,05     |

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=3). Nespareni-T test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Statistički značajne razlike označene su kao \* p < 0,05 i \*\* p < 0,005.

**Tablica 17.** Proapoptotska aktivnost ekstrakta visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka dojke MDA-MB-231.

| Kasna apoptoza |      |                  |      |              | Rana + kasna apoptoza |      |                  |      |              |
|----------------|------|------------------|------|--------------|-----------------------|------|------------------|------|--------------|
| Kontrola (%)   |      | MHG ekstrakt (%) |      |              | Kontrola (%)          |      | MHG ekstrakt (%) |      |              |
| Sr. vr.        | ±SD  | Sr. vr.          | ±SD  | p-vrijednost | Sr. vr.               | ±SD  | Sr. vr.          | ±SD  | p-vrijednost |
| 1,52           | 0,10 | 7,90             | 1,82 | p < 0,005    | 3,12                  | 1,25 | 14,21            | 3,12 | p < 0,005    |

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=3). Nespareni-T test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Statistički značajne razlike označene su kao \* p < 0,05 i \*\* p < 0,005.

**Tablica 18.** Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura TCCSUP.

| Kasna apoptoza |      |                       |      |              | Rana + kasna apoptoza |      |                       |      |              |
|----------------|------|-----------------------|------|--------------|-----------------------|------|-----------------------|------|--------------|
| Kontrola (%)   |      | MAD eterično ulje (%) |      |              | Kontrola (%)          |      | MAD eterično ulje (%) |      |              |
| Sr. vr.        | ±SD  | Sr. vr.               | ±SD  | p-vrijednost | Sr. vr.               | ±SD  | Sr. vr.               | ±SD  | p-vrijednost |
| 1,77           | 1,48 | 0,04                  | 0,03 | ns           | 18,14                 | 3,13 | 44,47                 | 6,98 | p < 0,005    |

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=3). Nespareni-T test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Statistički značajne razlike označene su kao \* p < 0,05 i \*\* p < 0,005.

**Tablica 19.** Proapoptotska aktivnost ekstrakta visokog dragoljuba na staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura TCCSUP.

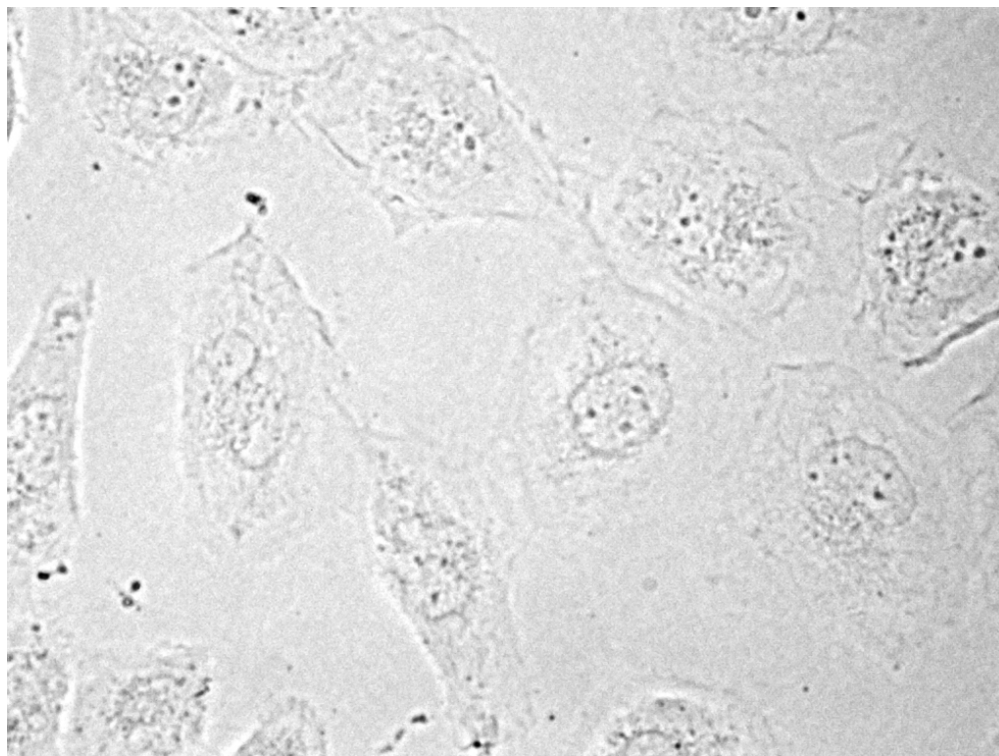
| Kasna apoptoza |      |                  |      |              | Rana + kasna apoptoza |      |                  |      |              |
|----------------|------|------------------|------|--------------|-----------------------|------|------------------|------|--------------|
| Kontrola (%)   |      | MHG ekstrakt (%) |      |              | Kontrola (%)          |      | MHG ekstrakt (%) |      |              |
| Sr. vr.        | ±SD  | Sr. vr.          | ±SD  | p-vrijednost | Sr. vr.               | ±SD  | Sr. vr.          | ±SD  | p-vrijednost |
| 1,77           | 1,48 | 0,26             | 0,01 | ns           | 18,14                 | 3,13 | 38,11            | 3,08 | p < 0,005    |

Vrijednosti su srednja vrijednost ± SD (n=3). Nespareni-T test korišten je za usporedbu svih skupina u odnosu na kontrolu pomoću programa GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, SAD). Statistički značajne razlike označene su kao \* p < 0,05 i \*\* p < 0,005.

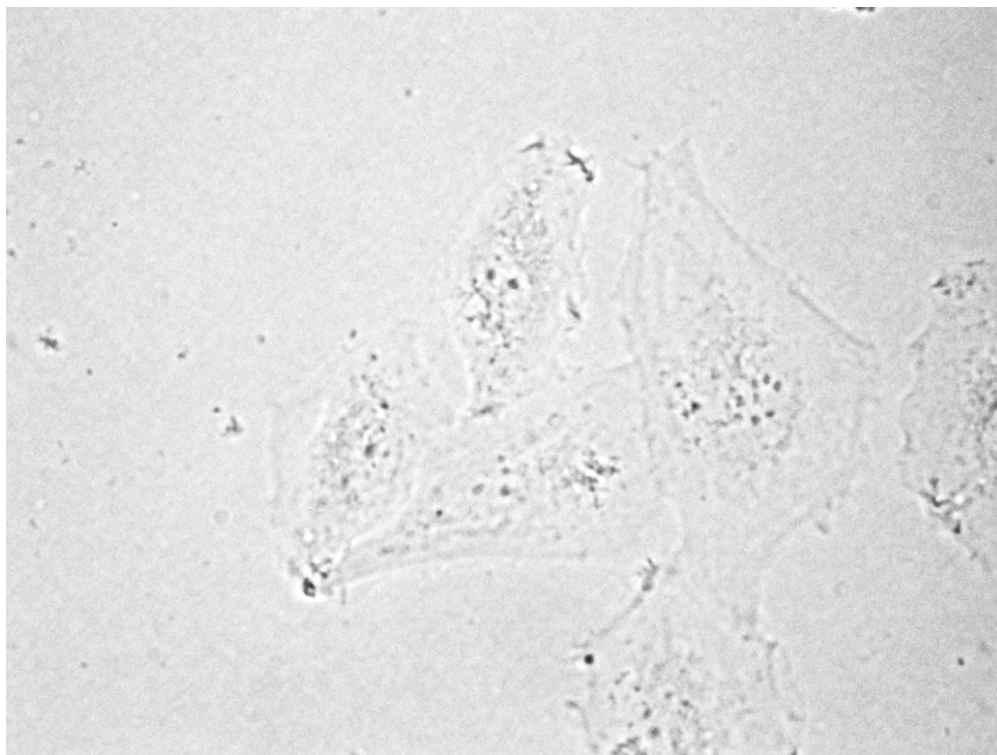


#### **4.7. Antiproliferativni mehanizam eteričnog ulja visokog dragoljuba sniman optičkom i AFM mikroskopijom**

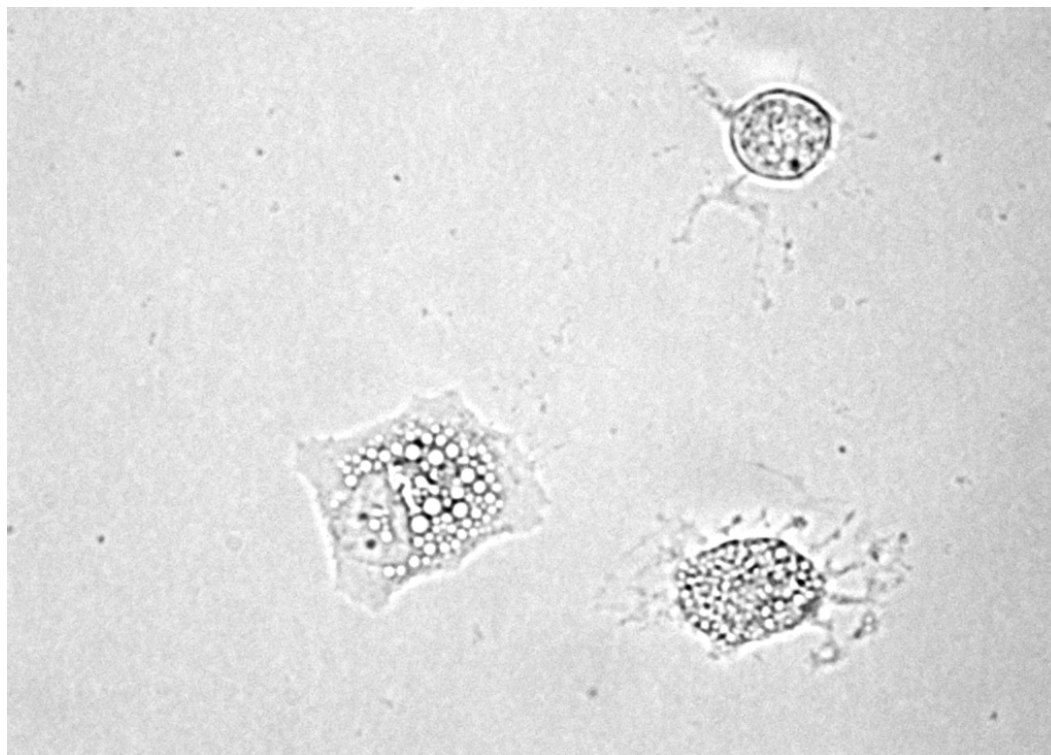
Na slikama 57-61 prikazani su rezultati netretiranih stanica i antiproliferativnog mehanizma eteričnog ulja visokog dragoljuba na stanicama linije raka mokraćnog mjehura TCCSUP dobiveni optičkom i AFM mikroskopijom.



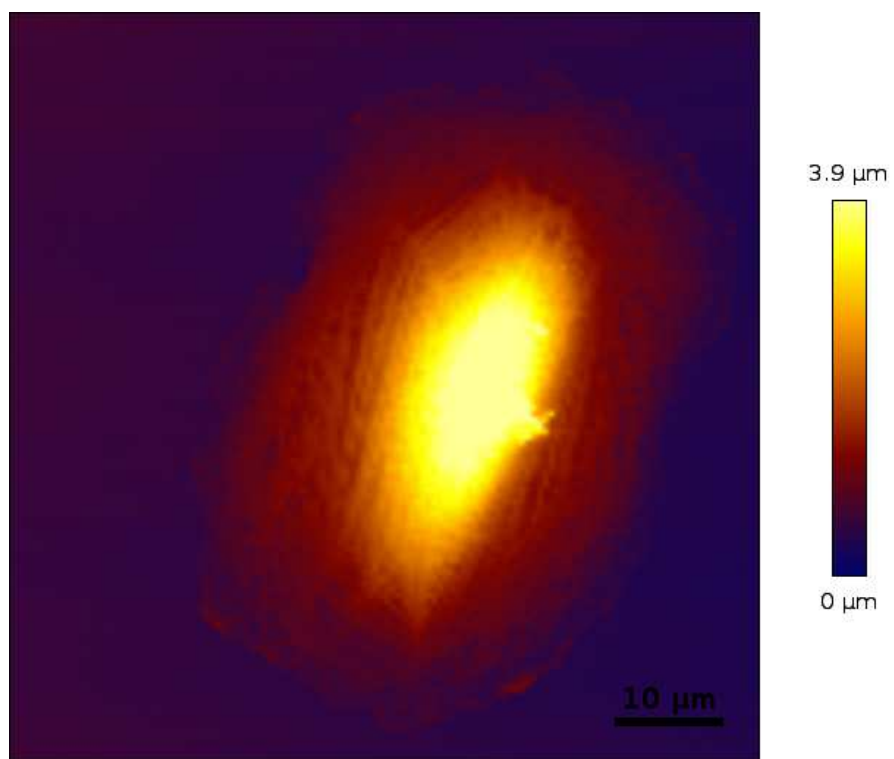
**Slika 57.** Netretirane TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura snimane optičkom mikroskopijom.



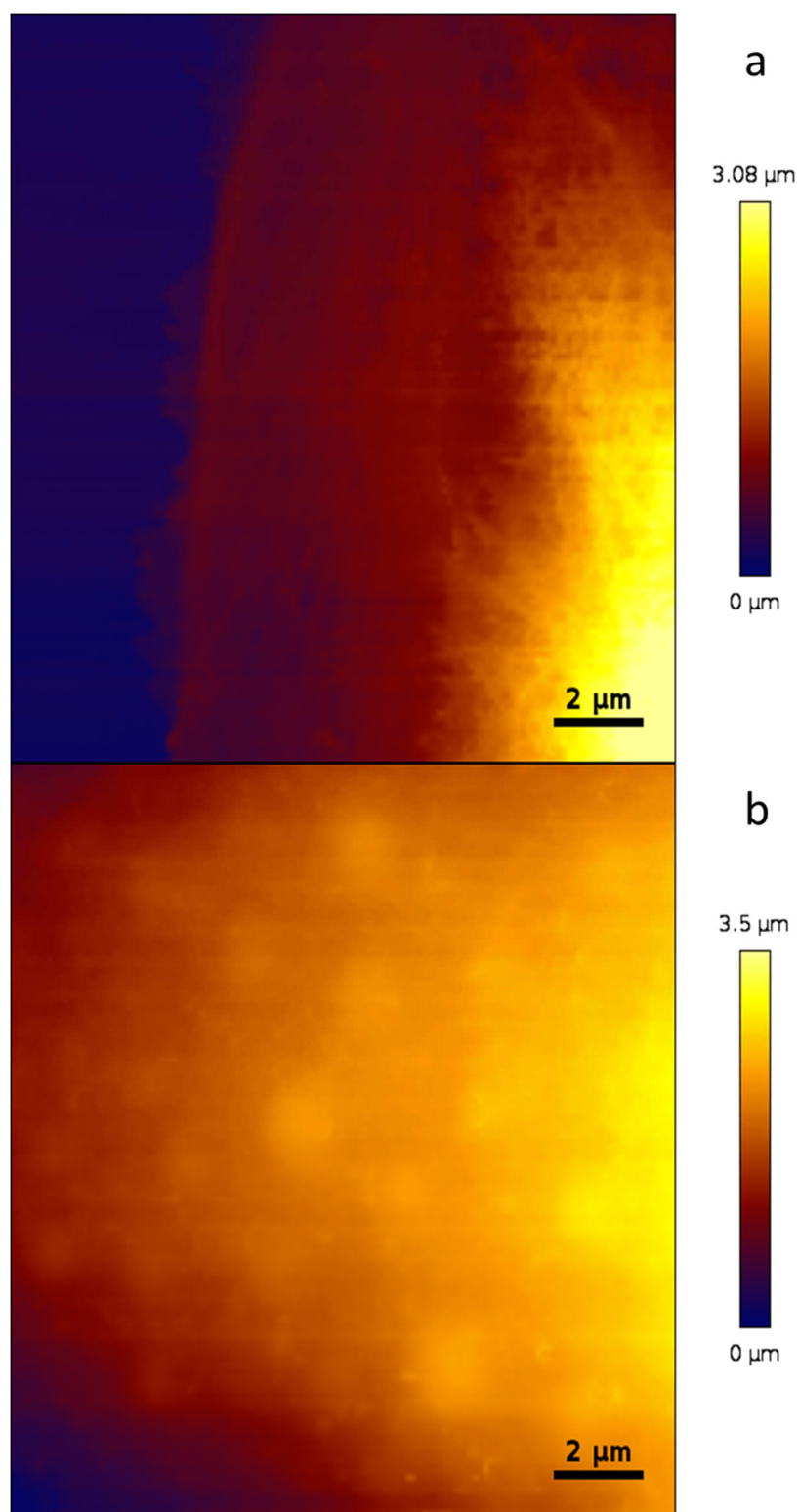
**Slika 58.** Tretirane TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura snimane optičkom mikroskopijom.



**Slika 59.** Tretirane TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura snimane optičkom mikroskopijom.



**Slika 60.** Netretirana cijela TCCSUP stanica raka mokraćnog mjehura mjerena AFM-om.



**Slika 61.** Netretirani (a) i tretirani (b) dio TCCSUP stanice raka mokraćnog mjehura mjereno AFM-om.

#### 4.8. Antibakterijska aktivnost spojeva prisutnih u visokom dragoljubu

Zbog visoke antiproliferativne aktivnosti MTT i MTS metodom i najvećeg prinosa eteričnog ulja i ekstrakta od svih ispitivanih uzoraka nakon različitih tehnika ekstrakcije, za procjenu antibakterijske aktivnosti eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba pripremljeni su i testirani na *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 11229. U ispitivanje su uključeni i čisti spojevi, BITC i BCN (tablica 20, slike 62-68).

**Tablica 20.** Minimalna inhibitorna i baktericidna koncentracija (mg/mL) BITC-a, BCN-a, eteričnog ulja visokog dragoljuba poslije MAD i ekstrakta visokog dragoljuba poslije MHG na *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 11229.

| Čiste komponente i biljni preparati | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |             | <i>E. coli</i> ATCC 11229 |             |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
|                                     | MIC (mg/mL)                 | MBC (mg/mL) | MIC (mg/mL)               | MBC (mg/mL) |
| BITC                                | 0,125                       | 0,25        | 0,5                       | 1           |
| BCN                                 | 0,125                       | 0,25        | 1                         | 2           |
| Eterično ulje poslije MAD           | 0,0625                      | 0,125       | 0,25                      | 0,5         |
| Ekstrakt poslije MHG                | 0,0625                      | 0,125       | 0,25                      | 0,5         |

\*Vrca i sur., (2022)

BITC Benzil-izotiocijanat

BCN Benzil-cijanid (2-fenilacetonitril)

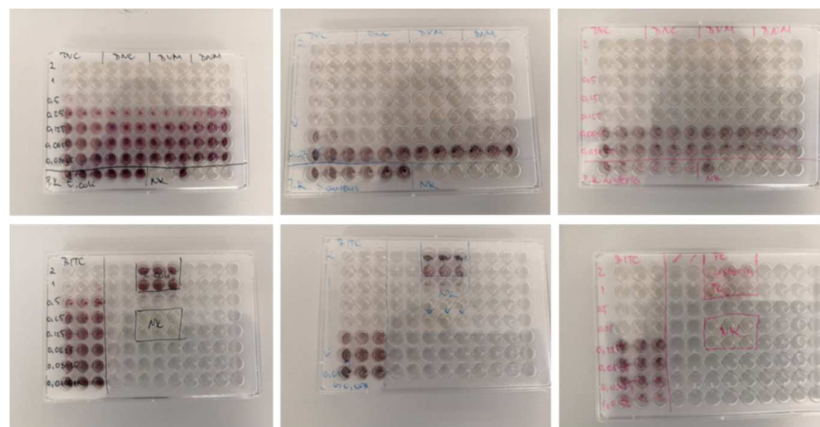
MAD Destilacija potpomognuta mikrovalovima

MHG Ekstrakcija potpomognuta mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom

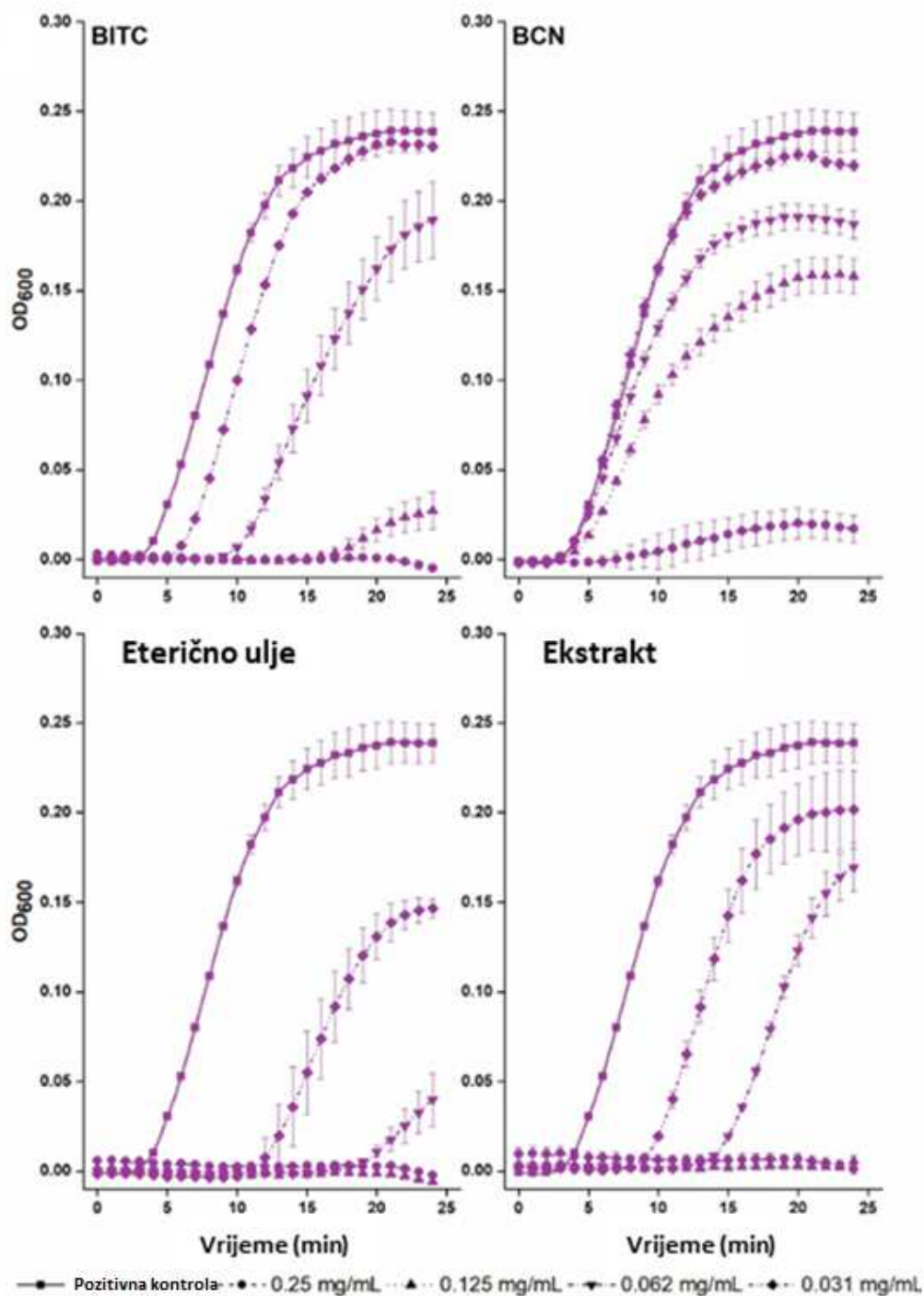
MIC Minimalna inhibitorna koncentracija

MBC Minimalna baktericidna koncentracija

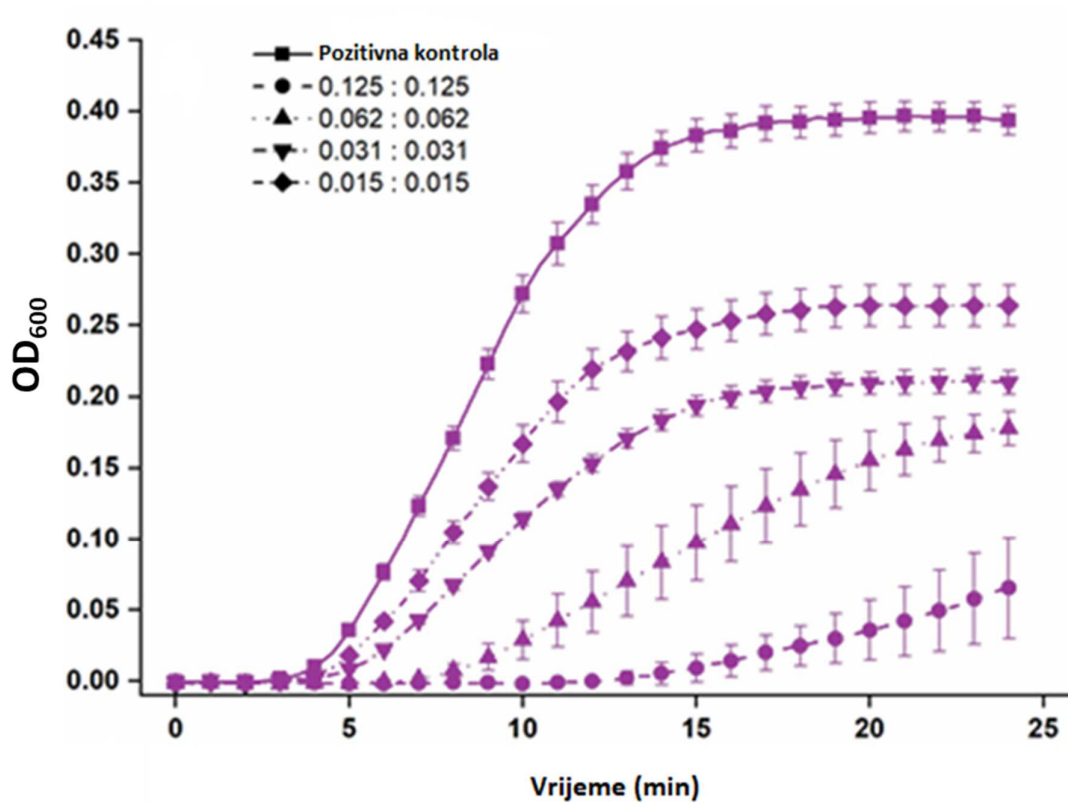
Eksperiment je raden u tri ponavljanja.



**Slika 62.** Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) eteričnog ulja visokog dragoljuba određene su metodom mikrodilucije.

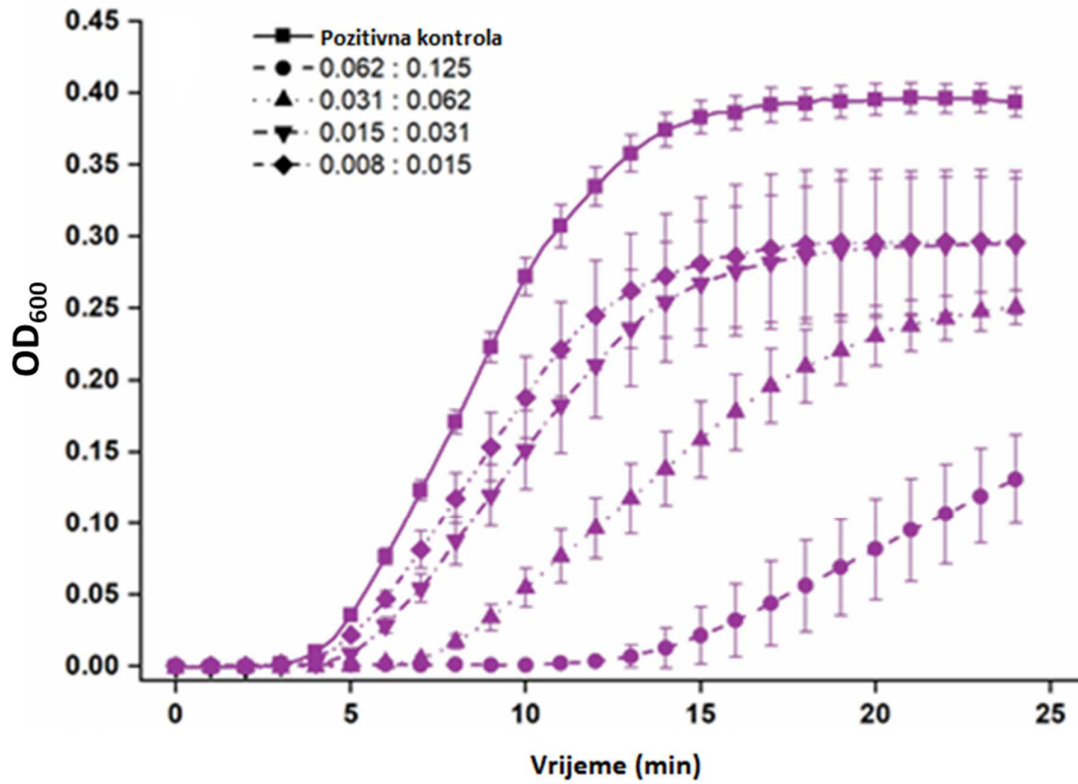


**Slika 63.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u različitim koncentracijama (mg/mL) na rast *S. aureus*. Kulture su aerobno inkubirane 24 sata na temperaturi od 37 °C. Od dobivenih rezultata oduzete su negativne kontrole. Prikazane su prosječne vrijednosti OD<sub>600</sub> ± SD (Vrca i sur., 2022).

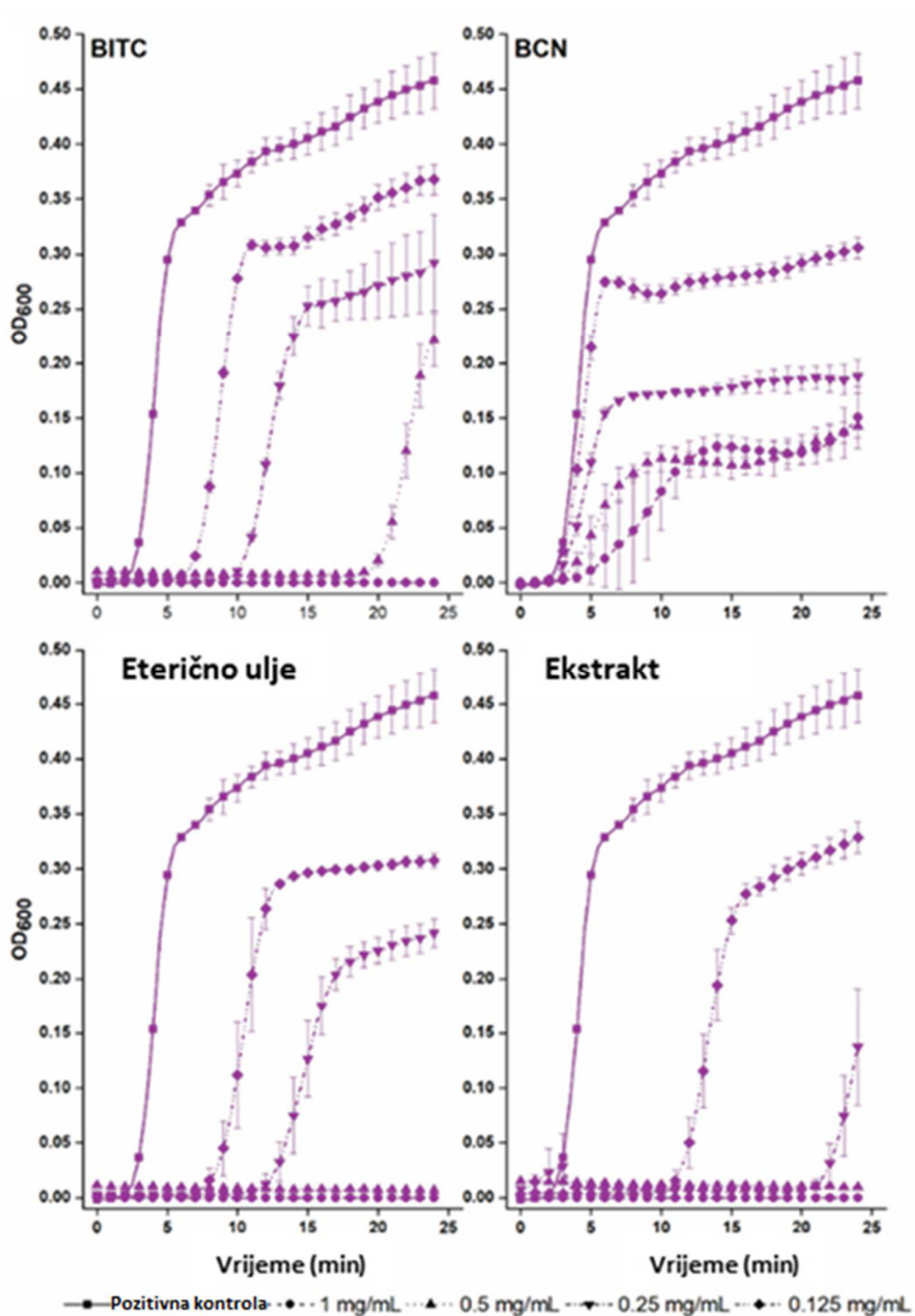


**Slika 64.** Učinci BITC-a i BCN-a u omjeru 1:1 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *S. aureus*. Kulture su aerobno inkubirane 24 sata na temperaturi od 37 °C. Od dobivenih rezultata oduzete su negativne kontrole. Prikazane su prosječne vrijednosti  $OD_{600} \pm SD$  (Vrca i sur., 2022).

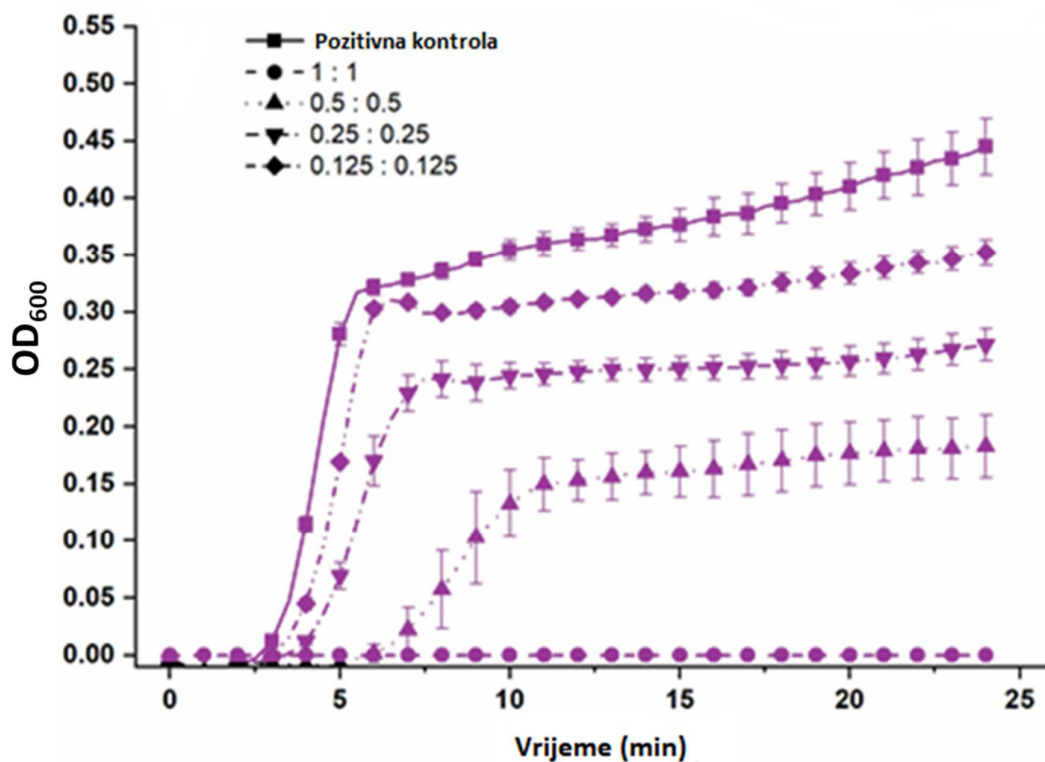




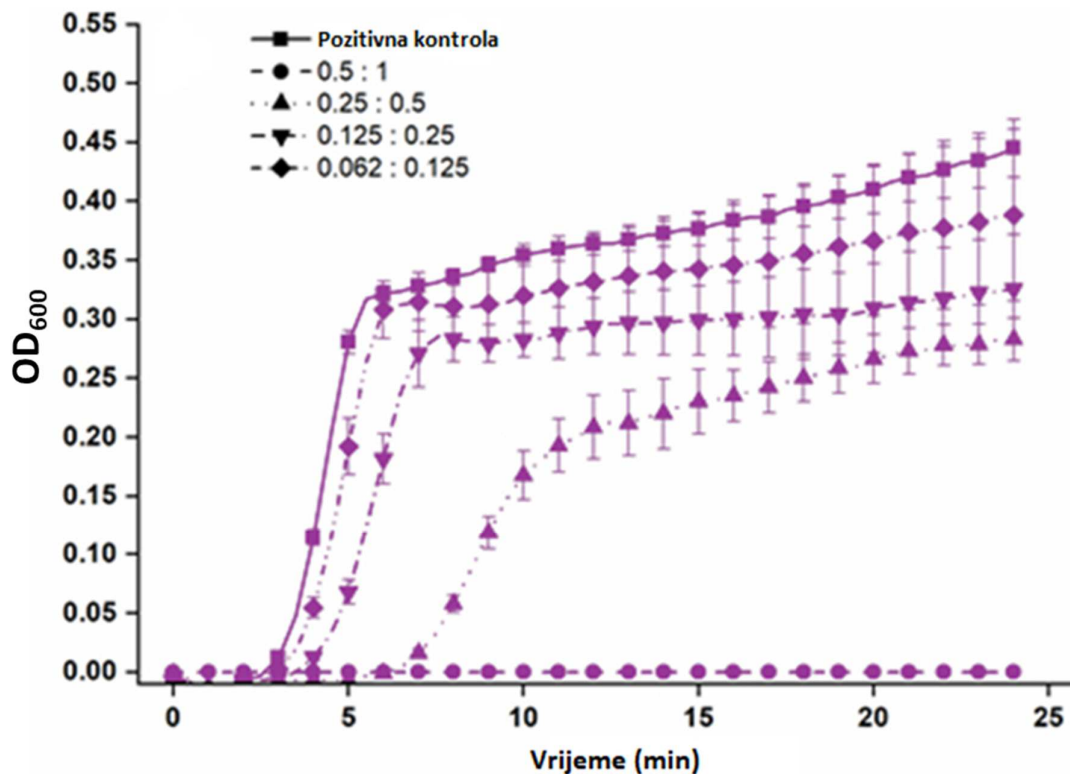
**Slika 65.** Učinci BITC-a i BCN-a u omjeru 1:2 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *S. aureus*. Kulture su aerobno inkubirane 24 sata na temperaturi od 37 °C. Od dobivenih rezultata oduzete su negativne kontrole. Prikazane su prosječne vrijednosti OD<sub>600</sub> ± SD (Vrca i sur., 2022).



**Slika 66.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u različitim koncentracijama (mg/mL) na rast *E. coli*. Kulture su aerobno inkubirane 24 sata na temperaturi od 37 °C. Od dobivenih rezultata oduzete su negativne kontrole. Prikazane su prosječne vrijednosti  $OD_{600} \pm SD$  (Vrca i sur., 2022).



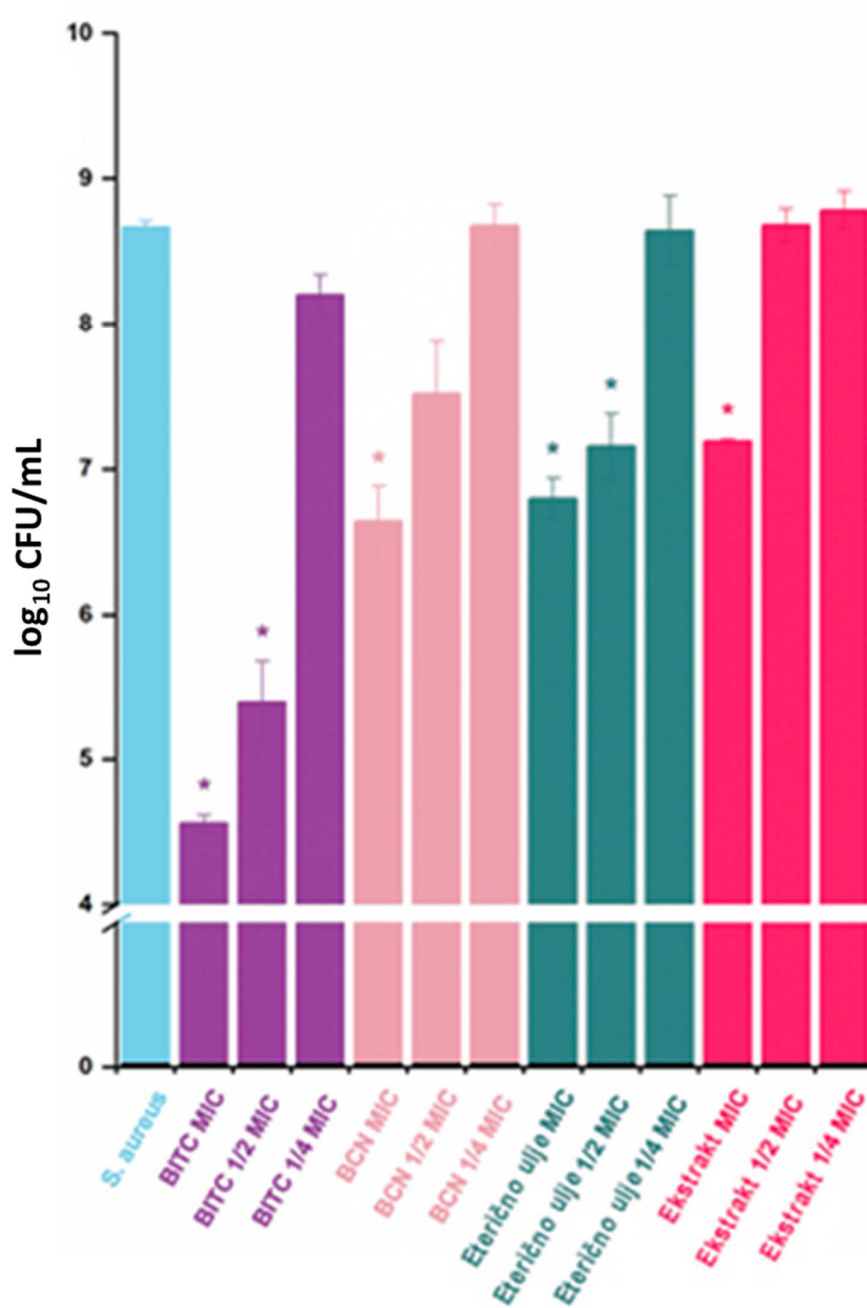
**Slika 67.** Učinci BITC-a i BCN-a u različitim omjerima 1:1 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *E. coli*. Kulture su aerobno inkubirane 24 sata na temperaturi od 37 °C. Od dobivenih rezultata oduzete su negativne kontrole. Prikazane su prosječne vrijednosti OD<sub>600</sub> ± SD (Vrca i sur., 2022).



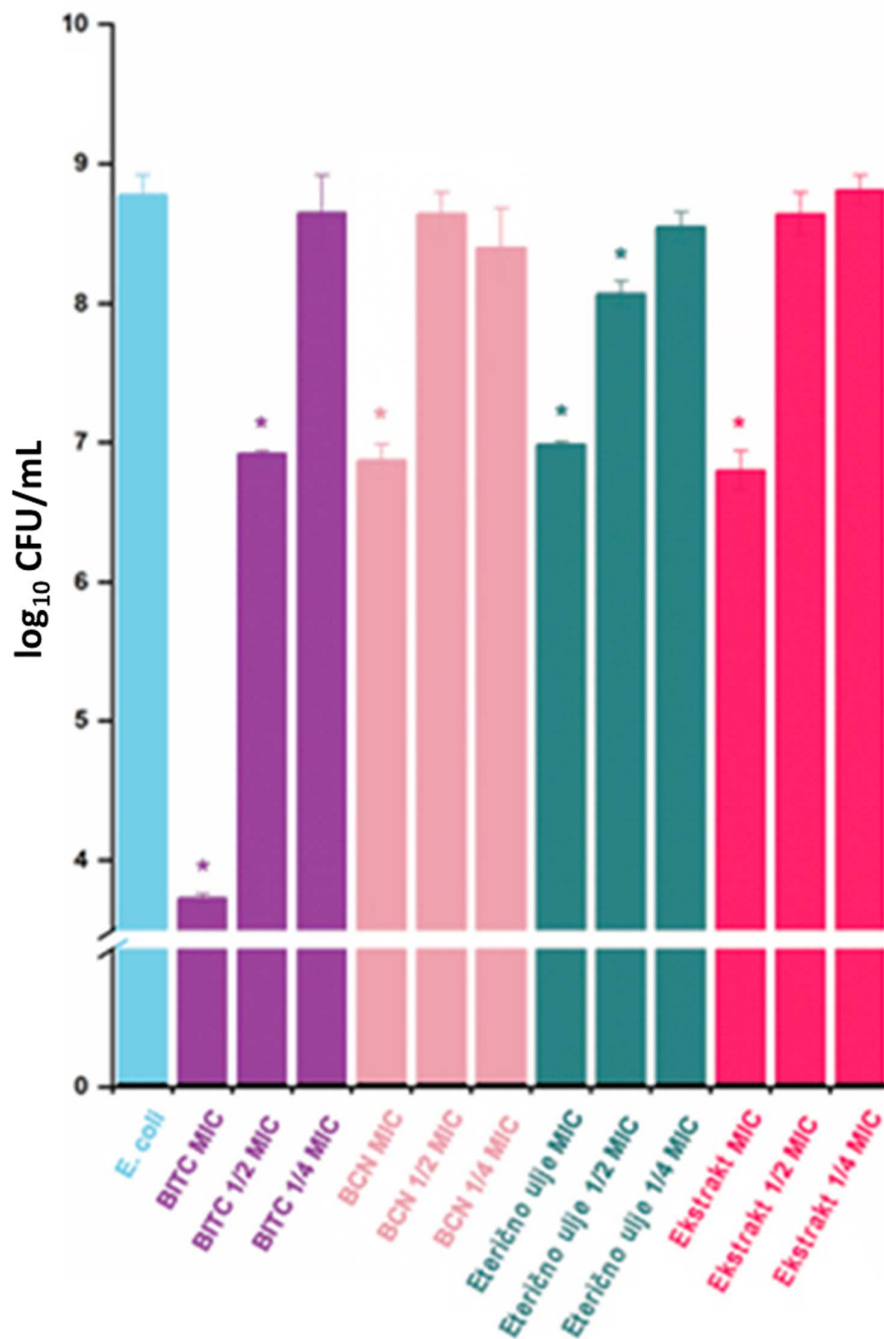
**Slika 68.** Učinci BITC-a i BCN-a u različitim omjerima 1:2 mg/mL određeni s obzirom na vrijednosti MIC na rast *E. coli*. Kulture su aerobno inkubirane 24 sata na temperaturi od 37 °C. Od dobivenih rezultata oduzete su negativne kontrole. Prikazane su prosječne vrijednosti OD<sub>600</sub> ± SD (Vrca i sur., 2022).

#### 4.8.1. Učinak hlapljivih spojeva prisutnih u sjemenu visokog dragoljuba na prijanjanje bakterija na polistirensku površinu

Biljni pripravci dobiveni iz sjemena visokog dragoljuba, odnosno eterično ulje i ekstrakt, te čisti spojevi BITC i BCN ispitani su na djelovanje protiv prijanjanja *S. aureus* i *E. coli* na polistirensku površinu. Ispitane su koncentracije MIC, ½ MIC i ¼ MIC (slike 69 i 70).



**Slika 69.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u koncentraciji MIC, ½ MIC i ¼ MIC na prijanjanje na polistirensku površinu *S. aureus*. Spojene stanice suspendirane su ultrazvukom, a njihove koncentracije određene su brojanjem ploča. Podaci su prosječne vrijednosti log<sub>10</sub> CFU/mL ± SD. p < 0,05 u odnosu na kontrolu (Vrca i sur., 2022).

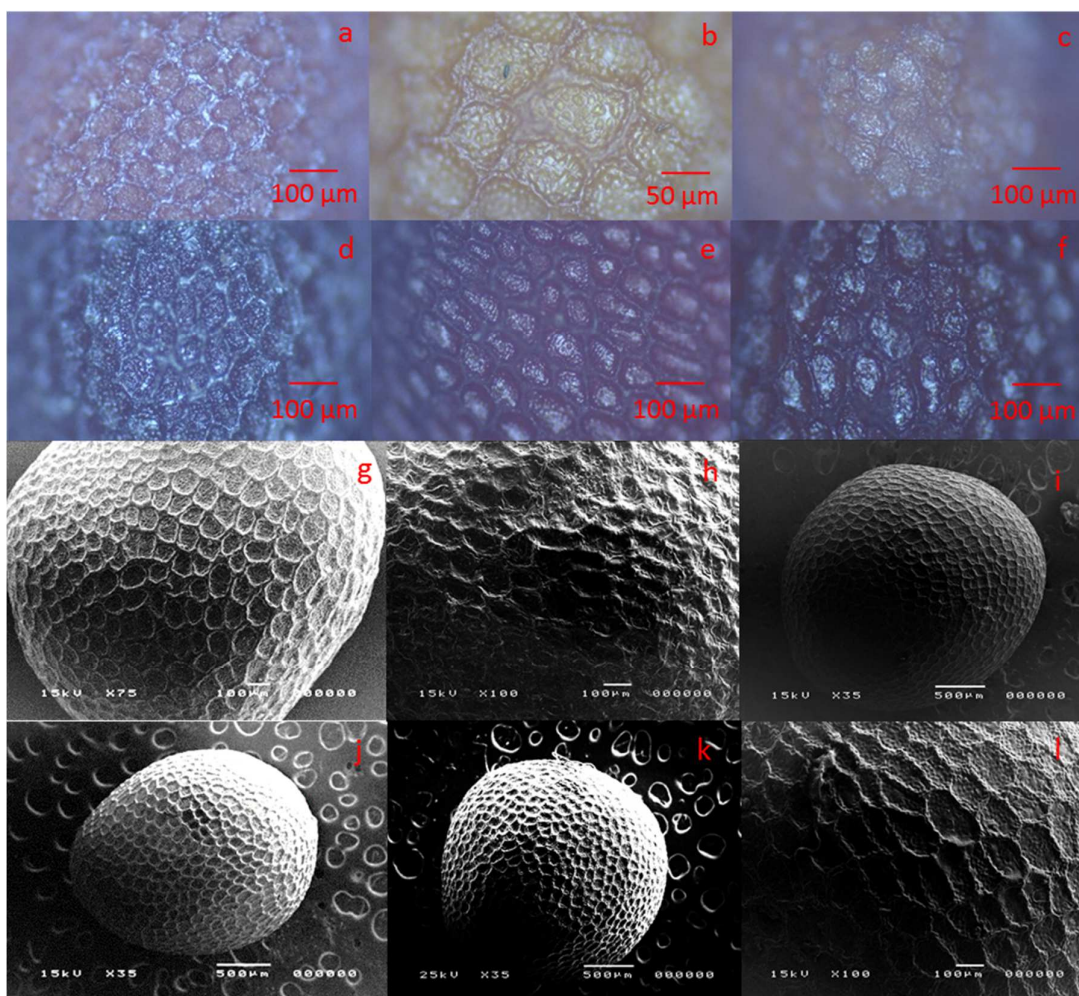


**Slika 70.** Učinci čistih spojeva (BITC i BCN), eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba u koncentraciji MIC, ½ MIC i ¼ MIC na prijanjanje na polistirensku površinu *E. coli*. Spojene stanice suspendirane su ultrazvukom, a njihove koncentracije određene su brojanjem ploča. Podaci su prosječne vrijednosti log<sub>10</sub> CFU/mL ± SD. p < 0,05 u odnosu na kontrolu (Vrca i sur., 2022).

## 4.9. DODATAK

### 4.9.1. Površina sjemena smeđe i crne gorušice optičkom i SEM mikroskopijom

Površina sjemena bijele, smeđe, crne i divlje gorušice skenirana je pomoću optičke i SEM mikroskopije. Površina sjemena bijele i divlje gorušice nema jasno definirane grebene, stoga se nisu mogle odrediti njihove duljine (slike nisu prikazane). Površina sjemena smeđe i crne gorušice ima jasno definirane grebene prije i poslije različitih tehnika izolacije (Clevenger hidrodestilacija i MAD) stoga su rezultati prikazani na slici 71 i tablici 21.



**Slika 71.** Optičke i SEM slike tretiranih i netretiranih uzoraka smeđe gorušice (a,g-netretirane, b,h-nakon Clevenger hidrodestilacije, c,i-nakon MAD-a) i crne gorušice (d,j-netretirane, e,k - nakon Clevenger hidrodestilacije, f,l-nakon MAD-a) pri različitim povećanjima (Vrca i sur., 2021a).

**Tablica 21.** Duljina grebena sjemenki smeđe i crne gorušice prije i nakon različitih tehnika ekstrakcije.

| <b>Netretirani i tretirani uzorci nakon različitih tehnika ekstrakcije</b> | <b>Dužina grebeni sjemenki smeđe gorušice (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | <b>Dužina grebeni sjemenki crne gorušice (<math>\mu\text{m}</math>)</b> |
|--|--|---|
| Netretirani uzorci   | 103,02* $\pm$ 17,32 <sup>a</sup>   | 78,83 $\pm$ 16,29 <sup>a</sup>  |
| Uzorci nakon Clevenger hidrodestilacije                                    | 106,05 $\pm$ 17,69 <sup>a</sup>  | 92,40 $\pm$ 12,31 <sup>a</sup>  |
| Uzorci nakon MAD   | 108,17 $\pm$ 18,63 <sup>a</sup>  | 120,55 $\pm$ 23,91 <sup>b</sup>   |

\*Vrca i sur., (2021a)

MAD Destilacija potpomognuta mikrovalovima

Vrijednosti su srednja vrijednost  $\pm$  SD najmanje deset određivanja. Srednje vrijednosti s različitim slovima (a,b) unutar svakog stupca statistički su značajne ( $p \leq 0,05$ ).



**4.9.2. Sastav masnih kiselina i prinos ulja u analiziranim uzorcima**

Analiziran je sastav masnih kiselina u četiri vrste gorušice (bijela, smeđa, crna i divlja gorušica) nakon Soxhlet i SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, kao i u sjemenkama visokog i niskog dragoljuba nakon Soxhlet ekstrakcije koristeći GC-FID tehniku. Zbog iznimno niskog prinosa ulja nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, sastav masnih kiselina u sjemenkama visoki i niski dragoljub nije se mogao odrediti GC-FID-om (podaci nisu prikazani). Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 22 i 23.

**Tablica 22.** Sastav masnih kiselina i prinos ulja u gorušicama i dragoljubu nakon Soxhlet ekstrakcije.

| Sastav masnih kiselina                        | Srednja vrijednost (%) nakon Soxhlet ekstrakcije |                |               |                 |                  |                 |
|---|--|----------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|
|   | Bijela gorušica                                  | Smeđa gorušica | Crna gorušica | Divlja gorušica | Visoki dragoljub | Niski dragoljub |
| Miristinska (C14:0)                           | 0,02 ± 0,03*                                     | 0,08 ± 0,00    | 0,03 ± 0,04   | 0,09 ± 0,01     | 0,05 ± 0,02      | 0,05 ± 0,00     |
| Miristoleinska(C14:1)                         | /  | /              | /             | /               | /                | 0,79 ± 1,12     |
| Pentadekanska (C15:0)                         | /  | /              | /             | /               | 0,04 ± 0,01      | 0,80 ± 1,10     |
| <i>cis</i> -10-Pentadekanska (C15:1)          | /  | /              | /             | /               | /                | 0,03 ± 0,05     |
| Palmitinska (C16:0)                           | 2,78 ± 0,14                                      | 3,61 ± 0,06    | 2,27 ± 0,01   | 3,66 ± 0,03     | 1,49 ± 0,21      | 0,68 ± 0,93     |
| Palmitoleinska (C16:1)                        | 0,15 ± 0,00                                      | 0,19 ± 0,01    | 0,17 ± 0,00   | 0,16 ± 0,00     | 0,05 ± 0,02      | 0,04 ± 0,01     |
| Heptadekanska (C17:0)                         | /  | 0,02 ± 0,02    | /             | /               | /                | 0,01 ± 0,01     |
| <i>cis</i> -10-Heptadekanska (C17:1)          | /  | /              | 0,01 ± 0,02   | /               | 0,01 ± 0,02      | 0,04 ± 0,00     |
| Stearinska (C18:0)                            | 1,00 ± 0,00                                      | 1,43 ± 0,02    | 1,01 ± 0,01   | 0,98 ± 0,04     | 0,21 ± 0,02      | 0,46 ± 0,02     |
| Oleinska (C18:1n9c)                           | 21,57 ± 0,57                                     | 20,67 ± 0,04   | 9,03 ± 0,15   | 11,18 ± 0,02    | 5,98 ± 0,51      | 10,30 ± 0,59    |
| Linolna (C18:2n6c)                            | 9,07 ± 0,12                                      | 23,85 ± 0,02   | 15,53 ± 0,43  | 15,34 ± 0,01    | 1,86 ± 0,16      | 6,60 ± 0,44     |
| Arahidinska (C20:0)                           | 0,69 ± 0,03                                      | 1,01 ± 0,02    | 0,92 ± 0,05   | 0,51 ± 0,02     | 0,21 ± 0,00      | 0,42 ± 0,00     |
| $\gamma$ -Linolna (C18:3n6)                   | /  | 0,06 ± 0,01    | 0,03 ± 0,04   | 0,10 ± 0,02     | /                | /               |
| <i>cis</i> -11-Eikozenoinska (C20:1)          | 10,22 ± 0,14                                     | 11,77 ± 0,05   | 5,30 ± 0,06   | 15,78 ± 0,02    | 21,58 ± 0,46     | 20,61 ± 0,07    |
| Linolenska+Heneikozeinska (C18:3n3 + C21:0)   | 9,24 ± 0,39                                      | 10,91 ± 0,05   | 10,23 ± 0,43  | 15,48 ± 0,04    | 1,78 ± 0,18      | 3,57 ± 0,24     |
| <i>cis</i> -11,14-Eikosadienska (C20:2)       | 0,36 ± 0,02                                      | 1,07 ± 0,01    | 0,85 ± 0,01   | 1,73 ± 0,04     | 0,25 ± 0,01      | 0,43 ± 0,01     |
| Behenijska (C22:0)                            | 0,68 ± 0,04                                      | 0,60 ± 0,00    | 1,35 ± 0,01   | 0,75 ± 0,02     | 0,51 ± 0,02      | 0,56 ± 0,02     |
| <i>cis</i> -11,14,17-Eikosatrienska (C20:3n3) | /  | /              | /             | /               | 0,05 ± 0,00      | 0,04 ± 0,00     |
| Erukinska (C22:1n9)                           | 40,91 ± 0,85                                     | 23,01 ± 0,02   | 48,28 ± 0,94  | 31,61 ± 0,11    | 64,65 ± 1,50     | 53,76 ± 1,40    |
| Trikozanoinska (C23:0)                        | 0,03 ± 0,04                                      | 0,13 ± 0,00    | 0,13 ± 0,02   | 0,37 ± 0,00     | 0,09 ± 0,01      | 0,10 ± 0,00     |
| <i>cis</i> -13,16-Dokosadienoinska (C22:2)    | 0,29 ± 0,03                                      | /              | 1,76 ± 0,03   | /               | 0,14 ± 0,00      | 0,23 ± 0,00     |
| Lignocerinska (C24:0)                         | 0,32 ± 0,02                                      | 0,36 ± 0,01    | 0,82 ± 0,04   | /               | 0,12 ± 0,01      | 0,21 ± 0,00     |
| Nervonska (C24:1)                             | 2,67 ± 0,01                                      | 1,24 ± 0,01    | 2,27 ± 0,01   | /               | 0,92 ± 0,05      | 1,07 ± 0,02     |
| Sadržaj ulja u sjemenu (%)                    | 24,89 ± 0,02                                     | 30,78 ± 0,57   | 37,46 ± 0,04  | 31,04 ± 0,50    | 7,95 ± 0,25      | 8,44 ± 0,11     |

\*Vrijednosti su srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) dvaju ponavljanja (n=2).

**Tablica 23.** Sastav masnih kiselina i prinos ulja u gorušicama nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije.

| Sastav masnih kiselina                          | Srednja vrijednost (%) nakon SC-CO <sub>2</sub> ekstrakcije |                |               |                 |
|---|---|----------------|---------------|-----------------|
|   | Bijela gorušica   | Smeda gorušica | Crna gorušica | Divlja gorušica |
| Miristinska (C14:0)                             | 0,14 <sup>*</sup> ± 0,00                                    | 0,08 ± 0,02    | 0,16 ± 0,00   | 0,06 ± 0,08     |
| Pentadekanska (C15:0)                           | 0,03 ± 0,04   | /              | 0,01 ± 0,02   | /               |
| Palmitinska (C16:0)                             | 4,95 ± 0,03   | 3,89 ± 0,17    | 4,44 ± 0,06   | 5,07 ± 0,16     |
| Palmitoleinska (C16:1)                          | 0,30 ± 0,00   | 0,23 ± 0,01    | 0,34 ± 0,00   | 0,10 ± 0,14     |
| Heptadekanska (C17:0)                           | 0,03 ± 0,00   | 0,02 ± 0,03    | 0,04 ± 0,00   | /               |
| <i>cis</i> -10-Heptadekanska (C17:1)            | 0,04 ± 0,00   | /              | 0,05 ± 0,04   | /               |
| Stearinska (C18:0)                              | 1,32 ± 0,00   | 1,44 ± 0,02    | 1,72 ± 0,01   | 1,21 ± 0,04     |
| Elaidinska (C18:1n9t)                           | /   | /              | 0,05 ± 0,00   | /               |
| Oleinska (C18:1n9c)                             | 25,96 ± 0,15  | 20,67 ± 0,77   | 12,82 ± 0,01  | 12,17 ± 0,01    |
| Linolna (C18:2n6c)                              | 12,82 ± 0,01  | 23,94 ± 0,70   | 17,90 ± 0,10  | 15,81 ± 0,18    |
| Arahidinska (C20:0)                             | 0,67 ± 0,00   | 0,91 ± 0,04    | 1,16 ± 0,01   | 0,57 ± 0,04     |
| γ-Linolenska (C18:3n6)                          | 0,05 ± 0,00   | 0,05 ± 0,01    | 0,02 ± 0,04   | /               |
| <i>cis</i> -11-Eikozenoinska (C20:1)            | 9,76 ± 0,03   | 12,14 ± 0,30   | 6,33 ± 0,04   | 16,19 ± 0,16    |
| Linolenska+ Heneikozeinska<br>(C18:3n3 + C21:0) | 12,52 ± 0,01  | 12,15 ± 0,49   | 11,04 ± 0,04  | 15,70 ± 0,46    |
| <i>cis</i> -11,14-Eikosadienska<br>(C20:2)      | 0,39 ± 0,05   | 1,09 ± 0,03    | 0,95 ± 0,03   | 1,86 ± 0,07     |
| Behenijska (C22:0)                              | 0,47 ± 0,01   | 0,49 ± 0,06    | 1,22 ± 0,01   | 0,65 ± 0,08     |
| <i>cis</i> -8,11,14-Eikosatrienska<br>(C20:3n6) | /   | /              | 0,03 ± 0,01   | /               |
| Erukinska (C22:1n9)                             | 28,79 ± 0,22  | 21,21 ± 1,51   | 38,22 ± 0,29  | 28,62 ± 0,04    |
| Trikozanoinska (C23:0)                          | 0,11 ± 0,01   | 0,17 ± 0,00    | 0,15 ± 0,01   | 0,51 ± 0,08     |
| <i>cis</i> -13,16- Dokosadienoinska<br>(C22:2)  | 0,34 ± 0,01   | 0,44 ± 0,02    | 1,33 ± 0,01   | 0,27 ± 0,02     |
| Lignocerinska (C24:0)                           | 0,18 ± 0,01   | 0,23 ± 0,05    | 0,46 ± 0,01   | 0,71 ± 0,48     |
| Nervonska (C24:1)                               | 1,12 ± 0,02   | 0,86 ± 0,10    | 1,15 ± 0,01   | 0,52 ± 0,74     |
| Sadržaj ulja u sjemenu (%)                      | 11,12 ± 0,12  | 9,66 ± 0,14    | 6,53 ± 0,12   | 7,64 ± 0,15     |

\*Vrijednosti su srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) dvaju ponavljanja (n=2).

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Kemijska analiza

### 5.1.1. HPLC-DAD-MS/MS glukozinolata u hidroetanolnim ekstraktima

U tablici 2 prikazan je sadržaj GSL-a u hidroetanolnim ekstraktima bijele, smeđe i crne gorušice te visokog dragoljuba.

Na slikama 36-40 prikazani su MS spektri identificiranih glukozinolata preko odgovarajućeg desulfo-oblika. Analiza je pokazala da je glavni i jedini GSL prisutan u hidroetanolnom ekstraktu bijele gorušice glukosinalbin ( $151,20 \pm 1,69 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala), dok je u smeđoj gorušici glavni spoj sinigrin ( $52,46 \pm 1,56 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala) i u manjoj koncentraciji 4-hidroksiglukobrasicin ( $1,00 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala). U crnoj gorušici glavni GSL-i su glukonapin ( $40,25 \pm 2,90 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala), sinigrin ( $12,40 \pm 0,51 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala) i 4-hidroksiglukobrasicin ( $1,60 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala). Glukotropeolin je glavni i jedini GSL prisutan u visokom dragoljubu ( $16,86 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala).

Nastanak razgradnih produkata u biljkama gorušice uvelike ovisi o aktivnosti mirozinaze, srodnih bakterijskih enzima ili daljnje kemijske transformacije prije konzumacije (Lietzow, 2021). Rezultati dobiveni u okviru ovog doktorskog rada su u skladu s navodima Popove i sur. (2016), tj. bijela gorušica sadrži glukosinalbin, ali ne i sinigrin, a smeđa gorušica sadrži sinigrin, ali ne i glukosinalbin. Glukosinalbin je prekursor aktivne komponente, *p*-hidroksibenzil-ITC-a (*p*-HBITC) u eteričnom ulju bijele gorušice (Ekanayake i sur., 2016; Lietzow, 2021).

Najvažnija komponenta smeđe gorušice je sinigrin koji hidrolizom djelovanjem enzima mirozinaze daje hlapljivi AITC (Lietzow, 2021; Vrca i sur., 2021a). Prema Popova i sur. (2016), rasponi pronađenih sadržaja bili su za sinigrin od 64 do 189  $\mu\text{mol/g}$  suhog biljnog materijala i za glukosinalbin od 126 do 201  $\mu\text{mol/g}$  suhog biljnog materijala u smeđoj i bijeloj gorušici. Sadržaj sinigrina u ovom istraživanju bila je nešto niža ( $52,46 \pm 1,56 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala) od one koju navodi Popova i sur. (2016), dok se koncentracija glukosinalbina ( $151,20 \pm 1,69 \mu\text{g/g}$  biljnog materijala) nalazila unutar granica koje ista autorica prikazuje u svom radu. Lietzow (2021) je izvijestila da je glavni GSL prisutan u crnoj gorušici sinigrin, što nije u skladu s dobivenim rezultatima u ovom istraživanju gdje je glukonapin glavni GSL, a sinigrin prisutan kao manja komponenta. Vrca i sur. (2021a) su dokazali da je glavna komponenta u eteričnom ulju crne gorušice but-3-enil-ITC čiji je prekursor glukonapin. Lykkesfeldt i Møller (1993) su izvijestili da je glukotropeolin (benzil-GSL) jedini GSL u biljci dragoljub što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

Kleinwaechter i sur. (2008) izvijestili su da se značajne količine glukotropeolina nalaze u lišću dragoljuba. Prema navodima Lykkesfeldt i Møller (1993) i Kleinwaechter i sur. (2008) koncentracija glukotropeolina je svakako veća u lišću, nego u sjemenu dragoljuba. Prema ovom istraživanju, glavni GSL-i su glukosinalbin, sinigrin, glukonapin i glukotropeolin u bijeloj, smeđoj i crnoj gorušici te visokom dragoljubu, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima (Lietzow, 2021; Popova i sur., 2016; Vrca i sur., 2021a; Vrca i sur., 2021b; Lykkesfeldt i Møller, 1993; Kleinwaechter i sur., 2008).

### 5.1.2. GC-MS analiza razgradnih produkata glukozinolata u eteričnim uljima i ekstraktima gorušica i visokog dragoljuba

GC-MS/MS analiza eteričnih ulja i ekstrakata bijele i divlje gorušice nakon sve tri tehnike ekstrakcije (Clevenger hidrodestilacija, MAD i MHG) pokazala je da u njima nema hlapljivih spojeva GSL-a (podaci i kromatogrami nisu prikazani). Hlapljivi (razgradni) spojevi GSL-a dobiveni Clevenger hidrodestilacijom, MAD i MHG tehnikom ekstrakcije iz smeđe i crne gorušice, identificirani su GC-MS/MS analizom (tablica 3, slike 41-46). Analiza je pokazala da je glavni hlapljivi spoj u eteričnim uljima i ekstraktu smeđe gorušice AITC (91-99%) (slike 41-43). Dodatno kao manje zastupljene komponente u hidrodestilatu je identificiran but-3-enil-ITC, dok je MAD sadržavao 2-feniletil-ITC. Hlapljivi spojevi iz crne gorušice potječu od istih GSL-a koji su prisutni i u smeđoj gorušici, pri čemu glavni razgradni produkti potječu od razgradnje but-3-enil-GSL-a. Glavne komponente nakon Clevenger hidrodestilacije, MAD i MHG bile su but-3-enil-ITC (80,58%) i 4,5-epitiopentanonitril (50,70%, odnosno 59,93%) (tablica 3, slike 44-46). Nakon Clevenger hidrodestilacije uz but-3-enil-ITC, prisutan je i AITC kao manje zastupljena komponenta (15,39%) u eteričnom ulju crne gorušice (slika 44). Nakon MAD i MHG tehnika ekstrakcije, u eteričnom ulju i ekstraktu crne gorušice prisutni su još 3,4-epitiobutanonitril, but-3-enil-ITC i AITC (slike 45 i 46). Benzenpropanonitril i 2-feniletil-ITC identificirani su u eteričnom ulju crne gorušice nakon MAD tehnika ekstrakcije (tablica 3). Nastanak epitionitrila u eteričnom ulju i ekstraktu crne gorušice nakon MAD i MHG tehnika ekstrakcije može se objasniti prisutnošću epitiospecifičnog proteina (ESP). Nadalje, sjeme crne gorušice za mikrovalnu ekstrakciju namakano je duži vremenski period pri sobnoj temperaturi zbog čega je omogućena aktivnost ESP-a. Nakon Clevenger hidrodestilacije ne dolazi do nastanka epitionitrila u eteričnom ulju crne gorušice upravo zbog neposrednog namakanja prije same hidrodestilacije. Kod Clevenger hidrodestilacije u kratkom vremenu se postiže visoka temperatura (~100 °C kod Clevenger hidrodestilacije) koja onemogućava aktivnost ESP-a upravo zbog njegove temperaturne osjetljivosti. ESP je potreban za razgradnju GSL-a u epitionitrile i nitrile, ali ne i u ITC-e (Eisenschmidt-Bönn i sur., 2019).

Nedostatak željenih razgradnih produkata GSL-a (ITC-a) u hlapljivim izolatima bijele gorušice može se objasniti da glukosinalbin, koji je karakterističan za sjemenke bijele gorušice, hidrolizom prvenstveno daje *p*-hidroksibenzil-ITC, spoj koji je nestabilan zbog reakcije s vodom i može se dalje razgraditi na razne spojeve što ovisi o pH, ionima metala i proteinima (Paunović i sur., 2012; Bones i Rossiter, 2006). Divlja gorušica, koja je u dalekom srodstvu s bijelom gorušicom, isto sadrži glukosinalbin (Agerbirk i sur., 2008) što također može biti

objašnjenje zašto nema razgradnih produkata GSL-a (ITC-a) u hlapljivim izolatima divlje gorušice.

Yu i sur. (2003) primijenili su različite uvjete za dobivanje eteričnog ulja smeđe gorušice koji su uključivali namakanje u puferu pH 4,5 uz dodatak askorbinske kiseline, ekstrakciju na temperaturi od 70 °C tijekom 2 sata i naknadnu destilaciju vodenom parom. Eterično ulje dobiveno pri ovim uvjetima sadržavalo je manji postotak AITC-a nego u ovom istraživanju zbog njegove nestabilnosti i stvaranja drugih hlapljivih spojeva (npr. sulfida). Singh i sur. (2017) proveli su istraživanje gdje su dobili niži postotak AITC-a u odnosu na ovo istraživanje i veći sadržaj but-3-enil-ITC-a u eteričnom ulju smeđe gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije tijekom 6 sati.

Kao što je prethodno spomenuto, glavni hlapljivi spojevi crne gorušice dobiveni su razgradnjom but-3-enil-GSL-a. Glavne komponente nakon Clevenger hidrodestilacije, MAD-a, MHG-a bile su but-3-enil-ITC i 4,5-epitiopentanonitril. Namakanje u vodi prije mikrovalne izolacije omogućilo je stvaranje epitionitrila kod crne gorušice. Kada je ESP prisutan u biljnom materijalu, sadržaj ITC-a se smanjuje u korist alternativnih produkata razgradnje, nitrila i epitionitrila (Eisenschmidt-Bönn i sur., 2019), što je u skladu s dobivenim rezultatima nakon mikrovalne izolacije u ovom istraživanju. Suprotno rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, Mejia-Garibay i sur. (2015) izvijestili su o AITC-u kao glavnoj komponenti u eteričnom ulju crne gorušice koja potječe od alil-GSL-a. Također, rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su da produkti razgradnje GSL-a nastali toplinskom razgradnjom tijekom hidrodestilacije nakon 2,5 sata daju veći prinos nego u slučaju MAD-a i MHG-a gdje su produkti razgradnje GSL-a proizvedeni enzimatskom razgradnjom (30 min) nakon čega je uslijedila termička razgradnja (u trajanju od 30, odnosno 15 min) (tablica 3).

Hlapljivi spojevi iz sjemenki biljke visoki dragoljub također su izolirani Clevenger hidrodestilacijom, MAD i MHG tehnikom ekstrakcije (tablica 4, slike 47-49). Glavni hlapljivi spoj prisutan u eteričnim uljima i ekstraktu visokog dragoljuba je BITC nakon sve tri tehnike ekstrakcije. BCN je prisutan kao manja komponenta nakon Clevenger hidrodestilacije i MAD tehnike (3,52%) (slika 47 i 48), dok je nakon MHG tehnike prisutan u znatno većem postotku (37,00%) (tablica 4, slika 49). GC-MS/MS analiza pokazala je da je nakon MHG tehnike u ekstraktu visokog dragoljuba prisutan i benzaldehid u manjoj koncentraciji (slika 49, tablica 4). Bloem i sur. (2008) izvijestili su da je benzil-GSL jedini GSL prisutan u biljci dragoljub, a nakon konzumacije BITC je njegov razgradni produkt koji je identificiran u urinu prasadi. U dragoljubu, BITC je glavna komponenta (82,5%) dobivena procesom hidrodestilacije



(Benyelles i sur., 2015), što je slično rezultatima ovog istraživanja. BITC je pronađena kao glavna komponenta u eteričnom ulju visokog dragoljuba (97,81%), a BCN (2-fenilacetonitril) je spoj prisutan u malom postotku (0,80%) nakon 30 min tretmana i primjene snage mikrovalovima od 500 W pomoću MAD-a (Vrca i sur., 2021b). Ovi hlapljivi spojevi također su prisutni i u ekstraktu visokog dragoljuba nakon MHG ekstrakcije, ali u različitim koncentracijama. Veća količina BCN-a u ekstraktu nakon MHG i Clevenger hidrodestilacije (37,00%, odnosno 3,52%) može se objasniti gore spomenutom prisutnošću ESP-a. Interakcija ESP-a s enzimom mirozinazom, kao što je već spomenuto, preusmjerava reakciju prema proizvodnji epitionitrila ili nitrila ovisno o strukturi GSL-a (Kissen i sur., 2008). Duže namakanje sjemena visokog dragoljuba u vodi prije MHG omogućilo je stvaranje BCN-a, što objašnjava njegov visok postotak u ekstraktu sjemenki visokog dragoljuba. Poznato je da se aktivnost ESP-a značajno smanjuje na temperaturi od 50 °C ili višoj (Mathuseski i sur., 2004). Bazylko i sur. (2013) također su izvijestili o prisutnosti BITC-a u dragoljubu u različitim količinama ( $7,4 \pm 2,2$  –  $277,6 \pm 57,0$  µg/g), ali je pripravak ekstrakata bio drukčiji (vodeni i hidroetanolni ekstrakti). Prema Wielanek i sur. (2004), nakon *in vitro* hidrolize benzil-GSL-a u dlakavom korijenu dragoljuba, produkti razgradnje bili su BITC, BCN i benzil-tiocijanat (BTC). Hlapljivi spojevi identificirani u eteričnim uljima i ekstraktu dragoljuba u ovom provedenom istraživanju od velike su važnosti upravo zbog svoje izuzetne biološke aktivnosti (Dias i sur., 2014; Dufour i sur., 2015; Garzon i Wrolstadt, 2009; Pintao i sur., 1995). Prema Blažević i sur. (2020b), prinos eteričnog ulja dobivenog iz biljaka koje sadrže GSL-e primjenom MAD-a je manji od prinosa dobivenog konvencionalnim tehnikama ekstrakcije (Clevenger hidrodestilacija), a što je u skladu i rezultatima ovog istraživanja (tablica 4). Unatoč nižem prinosu hlapljivih izolata, moderne tehnike ekstrakcije poput MAD-a nude i druge prednosti poput kraćeg vremena ekstrakcije, manje potrošnje energije i smanjene opasnosti za okoliš (manje izbacivanja CO<sub>2</sub> u atmosferu) (Moradi i sur., 2018; Mohamadi i sur., 2013).

## 5.2. *In vitro* probava

Faktori koji utječu na metodu *in vitro* probave su: enzimska aktivnost, sastav iona i vrijeme probave (Furlund i sur., 2012; Vrca i sur., 2021a; Vrca i sur, 2021b). U svrhu što preciznijeg izvođenja metode *in vitro* probave, potrebno je odrediti enzimsku aktivnost ljudskih probavnih sokova te uraditi usporedbu s aktivnošću komercijalnih probavnih enzima. Korištena metoda (Almaas i sur., 2011) detaljno je opisana u poglavlju 3.8.2. Tijekom eksperimentalnog rada *in vitro* metode probave s ljudskim i komercijalnim probavnim enzimima korišten je volumen želučanog soka koji je odgovarao enzimatskoj aktivnosti od 13 U za *in vitro* probavu. U radu je korišten volumen crijevnog soka koji je odgovarao enzimatskoj aktivnosti od 26 U za *in vitro* probavu.

### 5.2.1. *In vitro* probava glukozinolata

Koncentracija GSL-a te njihova identifikacija prije i nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu određena je UHPLC/MS-MS tehnikom analize. Stabilnost GSL-a određena je omjerom između njihove koncentracije prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu. GSL-i iz sjemena bijele, smeđe i crne gorušice podvrgnuti su dvofaznom *in vitro* modelu probave pomoću komercijalnih i ljudskih probavnih enzima. Glukotropeolin prisutan u sjemenu visokog dragoljuba podvrgnut je *in vitro* modelu probave pomoću ljudskih probavnih enzima.

Glukosinalbin, glavni GSL prisutan u bijeloj gorušici pokazuje visoku biodostupnost (stabilnost) nakon obje želučane faze (> 85%) (tablica 5). *In vitro* želučana probava s ljudskim probavnim enzimima pokazuje statističku značajnost u odnosu na neprobavljeni uzorak ( $p < 0,05$ ) (tablica 5). Kod *in vitro* crijevne faze s komercijalnim enzimima njegova stabilnost je smanjena gotovo za trećinu i pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak ( $p < 0,05$ ), a nakon *in vitro* crijevne faze s ljudskim probavnim enzimima pokazuje gotovo jednaku stabilnost kao i nakon želučanih faza (tablica 5).

Sinigrin (alil-GSL) je glavni GSL prisutan u sjemenu smeđe gorušice. Hidroksiglukobrasicin je također prisutan u smeđoj gorušici kao manje zastupljena komponenta. Koncentracija i biodostupnost (stabilnost) sinigrina i 4-hidroksiglukobrasicina u neprobavljenom uzorku i u uzorcima podvrgnutim želučanim i crijevnim fazama probave prikazane su u tablicama 6 i 7. Alifatski GSL sinigrin, prisutan u smeđoj gorušici, gotovo je jednako stabilan u *in vitro* želučanoj fazi s ljudskim probavnim enzimima kao i u

neprobavljenom uzorku (> 90%). Njegova biodostupnost nakon *in vitro* želučane faze s komercijalnim enzimima je značajno manja u odnosu na *in vitro* želučanu fazu s ljudskim probavnim enzimima, ali i dalje sinigrin pokazuje veću stabilnost kod želučanih faza u odnosu na crijevne faze s obje vrste enzima (tablica 6). Obje crijevne faze kod probave sinigrina pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak ( $p < 0,05$ ). GSL 4-hidroksiglukobrasicin u smeđoj gorušici prisutan je kao manja komponenta koja pokazuje gotovo potpunu stabilnost kod obje želučane faze u odnosu na neprobavljeni uzorak te značajnu razgradnju kod obje crijevne faze (< 50%) (tablica 7) sa statistički značajnom razlikom od  $p < 0,05$  nakon *in vitro* crijevne faze s komercijalnim probavnim enzimima i  $p < 0,05$  i nakon *in vitro* crijevne faze s ljudskim probavnim enzimima.

Glukonapin je glavni GSL prisutan u sjemenkama crne gorušice. Sinigrin i 4-hidroksiglukobrasicin su GSL-i također prisutni u crnoj gorušici, ali u manjim koncentracijama. Koncentracija i biodostupnost glukonapina, sinigrina i 4-hidroksiglukobrasicina u neprobavljenom uzorku i u uzorcima podvrgnutim želučanim i crijevnim fazama probave prikazane su u tablicama 8-10.

GSL-i prisutni u crnoj gorušici pokazuju veću stabilnost kod *in vitro* želučanih faza u odnosu na crijevne faze kod simuliranog dvofaznog modela probave (tablice 8-10). Glukonapin je najmanje stabilan nakon *in vitro* crijevne faze s komercijalnim enzimima gdje je njegova biodostupnost manja od trećine u odnosu na neprobavljeni uzorak (tablica 8). Obje crijevne faze kod probave glukonapina pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak ( $p < 0,05$  nakon *in vitro* crijevne faze s komercijalnim probavnim enzimima i  $p < 0,05$  i nakon *in vitro* crijevne faze s ljudskim probavnim enzimima).

Sinigrin također pokazuje visoku stabilnost kod želučanih faza i značajnu razgradnju nakon crijevnih faza (< 25% nakon *in vitro* crijevne faze s komercijalnim enzimima i < 50 % nakon *in vitro* crijevne faze s ljudskim probavnim enzimima). Obje crijevne faze kod probave sinigrina prisutnog u crnoj gorušici pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak ( $p < 0,05$ ). GSL 4-hidroksiglukobrasicin pokazuje skoro potpuno razgradnju u crijevnim fazama u odnosu na želučane faze i neprobavljeni uzorak sa statistički značajnom razlikom od  $p < 0,05$  (tablica 10).

Glukotropeolin je glavni i jedini GSL prisutan u sjemenkama visokog dragoljuba. Koncentracija i biodostupnost glukotropeolina u neprobavljenom uzorku i u uzorcima podvrgnutim *in vitro* želučanoj i crijevnoj fazi probave s ljudskim probavnim enzimima prikazane su u tablici 11.

Glukotropeolin prisutan u sjemenu visokog dragoljuba pokazuje veću stabilnost kod *in vitro* želučane faze u odnosu na crijevnu fazu kod simuliranog dvofaznog modela probave isto kao i GSL-i prisutni u različitim vrstama gorušica. Glukotropeolin, isto kao i glukosinalbin, je aromatski GSL te se iz dobivenih rezultata može zaključiti da su aromatski GSL-i najstabilniji nakon obje faze probave s ljudskim probavnim enzimima i to u iznosu > 80%.

Stabilnost i biodostupnost pojedinih bioaktivnih komponenti koje se nalaze u hrani nisu uvijek poznate, stoga ih je poželjno ispitati postupcima *in vitro* probave koristeći komercijalne i ljudske probavne enzime koji se obično sastoji od dvije faze, oponašanje želučane i crijevne faze probave (Vrca i sur., 2021a; Vrca i sur., 2021b). Hidroliza GSL-a odvija se i u gornjem probavnom traktu, dok se apsorpcija produkata hidrolize događa u crijevnom traktu (Kuljarachanan i sur., 2021). Djelovanje želučane kiseline u želučanoj fazi podupire stvaranje produkata razgradnje na bazi nitrila, koji inače imaju manje pozitivne zdravstvene učinke od poželjnih ITC-a (Hanschen i sur., 2017; Kuljarachanan i sur., 2021). Ipak, budući da se većina povrća *Brassica* obično kuha prije konzumacije, dolazi do inaktivacije endogene mirozinaze. U tom slučaju, intaktni GSL-i, koji su prilično stabilni na toplini i pri kiselim uvjetima, kreću se kroz probavni trakt i ulaze u debelo crijevo, a koje potom hidroliziraju crijevne bakterije (Kuljarachanan i sur., 2021). Uz pH od 1,0-3,0 tijekom procesa probave, želudac djeluje kao barijera protiv infekcija i trovanja hranom. Kako bi se istražili utjecaji u ovoj fazi, ekstrakti GSL-a su podvrgnuti pH 2 upotrebom komercijalnih i ljudskih želučanih sokova. U ovim dvofaznim *in vitro* modelima probave s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima, trajanje želučane faze je postavljeno na 30 min, što oponaša vrlo kratko vrijeme prolaska tekućine u želucu. Prethodne studije koje su se bavile utjecajem kiselosti na GSL-e pokazale su da nizak pH ima mali utjecaj, odnosno da se u nekim slučajevima uopće ne uočavaju produkti razgradnje (Vaughn i Berhow, 2005; Blažević i sur., 2014), s čime se generalno slažu i rezultati dobiveni u ovom istraživanju. Prema Blažević i sur. (2020), glavni GSL glukorafenin iz *Mathiole incana* L. pokazuje visoku biodostupnost nakon *in vitro* želučane faze s ljudskim probavnim enzimima (90-93%), što je u skladu s dobivenim rezultatima ovog istraživanja. Vallejo i sur. (2004) izvijestili su da probavna faza koja uključuje pepsin ima značajan učinak na stabilnost GSL-a brokule, što je suprotno od dobivenih rezultata gdje je većina GSL-a pokazala visoku ili potpunu stabilnost (biodostupnost). Jedno od objašnjenja zašto je došlo do veće razgradnje GSL-a u njihovoj želučanoj fazi je trajanje same faze koja je iznosila 2 sata te potencijalna razgradnja GSL-a u nitrile pri kiselim uvjetima. Za aktiviranje, odnosno potpuni proces transformacije GSL-a, kako su izvijestili Frandsen i sur. (2019), čini

se da su potrebni dodatni uvjeti kao što je prisutnost iona željeza. Duodenum, gdje pH naglo raste na 6,5-7,5, djeluje kao pH “komora za hlađenje” probavnog procesa. U ovom provedenom istraživanju, za simulaciju *in vitro* i *ex vivo* procesa probave, korišteni su crijevni komercijalni i ljudski sokovi pH~7,0, a trajanje je postavljeno na 120 min, oponašajući produljeno vrijeme crijevne faze koje je potrebno zbog potpunije apsorpcije. U crijevnim fazama, svi GSL-i su pokazali veći stupanj razgradnje u odnosu na želučane faze. Prema istraživanju Fernandez-Leon i sur. (2017), promatrajući pojedinačno intaktne GSL-e u brokuli „Parthenon“ i savojskom kupusu „Dama“, indolni GSL-i su pokazali najveću stabilnost. Razgradnju GSL-a ljudskom probavnom mikroflorom prethodno je istraživalo nekoliko autora (Elfoul i sur., 2001; Krul i sur., 2002; Cheng i sur., 2004). GSL se može hidrolizirati dijelom zbog nenedaturirane mirozinaze koja ostaje u biljci koja se konzumira, a produkti razgradnje mogu se apsorbirati. Međutim, čak i ako se enzimi mirozinaze inaktiviraju kuhanjem biljnog materijala, pretvorba GSL-a u ITC-e i dalje može biti posredovana bakterijskom mikroflorom unutar debelog crijeva (Dinkova-Kostova i Kostov, 2012).

Fokus ovog provedenog istraživanja bio je procijeniti biodostupnost (stabilnost) GSL-a u želucu i tankom crijevu nakon simuliranog modela probave koji se temelji na komercijalnim i ljudskim probavnim sokovima. Korišteni su ljudski probavni sokovi jer sadrže složenu mješavinu enzima prisutnih u više izoforma, inhibitora enzima i žučnih soli koje su ključne za proces probave, za razliku od široko korištenih komercijalnih probavnih enzima (lipaza, pankreatin, pepsin, ekstrakt žuči) (Eriksen i sur.; 2010, Furlund i sur., 2012). Također su korišteni i komercijalni probavni sokovi (želučani ekstrakt kunića, pankreatin, žučne soli) zbog usporedbe dviju metoda. Iz dobivenih rezultata, može se zaključiti, da na biodostupnost GSL-a, osim različitih enzima (ljudskih i komercijalnih), utječe i njihova struktura te koncentracija u samom biljnom materijalu.

### 5.2.2. *In vitro* probava izotiocijanata

ITC-i, najpoznatiji i najviše istraživani razgradni produkti GSL-a, pokazuju povoljne učinke na ljudsko zdravlje, stoga je njihova stabilnost (biodostupnost) nakon probave osobito važna i zanimljiva. Sadržaj ITC-a prije i nakon provedene *in vitro* probave u želucu i u tankom crijevu određen je GC-MS/MS analizom i prikazan u tablicama 12-14.

Stabilnost ITC-a određena je omjerom između njihove koncentracije prije i nakon *in vitro* probave u želucu i tankom crijevu.

Rezultati analize pokazali su da su čisti spojevi AITC i BITC, te BITC iz eteričnog ulja sjemena visokog dragoljuba stabilniji nakon *in vitro* želučanih faza probave isto kao i njihovi prekursori, GSL-i (tablice 12-14). Stabilnost AITC-a nakon *in vitro* želučane faze s komercijalnim enzimima iznosi 85,14%, a nakon *in vitro* želučane faze probave s ljudskim probavnim sokovima 86,27%. Obje želučane faze pokazuju statističku značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak AITC-a ( $p < 0,05$ ). Nakon *in vitro* crijevne faze s komercijalnim enzimima, stabilnost AITC-a bila je dvostruko manja u odnosu na neprobavljeni uzorak (100,00%). Nakon *in vitro* crijevne faze s ljudskim probavnim enzimima, stabilnost AITC-a bila je skoro trostruko manja u odnosu na *in vitro* želučanu fazu s ljudskim probavnim enzimima (tablica 12). Također, crijevne faze pokazuju statističku značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak AITC-a ( $p < 0,05$  nakon *in vitro* crijevne faze s komercijalnim enzimima i  $p < 0,05$  nakon *in vitro* crijevne faze s ljudskim probavnim enzimima).

Nakon *in vitro* želučane faze s komercijalnim probavnim enzimima stabilnost BITC-a u eteričnom ulju dragoljuba iznosi 97,57%, a s ljudskim probavnim enzimima iznosi 73,47% u odnosu na neprobavljeni uzorak. S druge strane, BITC iz eteričnog ulja podvrgnut crijevnoj fazi probave je manje stabilan jer se njegova koncentracija smanjila za gotovo trećinu svoje vrijednosti u odnosu na neprobavljeni uzorak nakon *in vitro* metode probave s komercijalnim enzimima (71,17%) te gotovo polovinu u odnosu na neprobavljeni uzorak nakon *in vitro* metode probave s ljudskim probavnim enzimima te iznosi 54,90%. Uzorak nakon *in vitro* metode probave s ljudskim probavnim enzimima pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak ( $p < 0,05$ ). BITC iz eteričnog ulja stabilniji je u želučanoj nego u crijevnoj fazi probave, a samim time je i njegova biodostupnost u želucu znatno veća nakon *in vitro* metode probave, dok je u crijevnoj fazi nakon primjene obiju metoda došlo do značajnije razgradnje. Koncentracija čistog spoja BITC-a nakon *in vitro* želučane faze s komercijalnim enzimima manja je nego kod eteričnog ulja dragoljuba te iznosi 79,23%, a nakon korištenja ljudskih crijevnih probavnih enzima 72,24%. Koncentracija čistog spoja BITC-a nakon *in vitro* crijevne faze s komercijalnim enzimima iznosi 70,36% iz čega se može zaključiti da je čisti spoj BITC manje stabilan kod obje faze *in vitro* metode probave u odnosu na neprobavljeni uzorak, a nakon *in vitro* crijevne faze s ljudskim probavnim enzimima dolazi do njegove blaže razgradnje u odnosu na želučanu fazu i njegova biodostupnost iznosi 64,70%. Svi probavljeni uzorci ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na neprobavljeni uzorak. BITC iz eteričnog ulja i čisti spoj sveukupno su stabilniji u odnosu na čisti spoj AITC. Jedan od mogućih razloga zašto je BITC stabilniji u odnosu na AITC leži u njegovoj strukturi. Naime, BITC spada

u aromatske ITC-e, a AITC u alifatske ITC-e, zbog čega se iz dobivenih rezultata, može zaključiti da su alifatski ITC-i manje stabilni, isto kao i njihovi prekursori GSL-i.

Brojni su razlozi zbog kojih može doći do promjene koncentracije, odnosno stabilnosti ciljanih spojeva pa tako i biodostupnosti nakon različitih metoda probave poput razlike između sastava komercijalnih i ljudskih probavnih enzima. Ljudski probavni sokovi sastoje se od enzima različitih izoforma koji se mogu razlikovati s obzirom na specifičnost i aktivnost od pročišćenih životinjskih enzima koji se koriste za oponašanje *in vitro* metode probave. Ljudski probavni sokovi sadrže enzime i kofaktore u fiziološkoj kombinaciji i zbog toga mogu imati prednost u odnosu na umjetne otopine sastavljene od pročišćenih komercijalnih enzima. Također se može pretpostaviti da je jedan od razloga različite stabilnosti između eteričnog ulja dragoljuba i čistog spoja BITC-a taj što se u eteričnom ulju dragoljuba, osim BITC-a, nalaze i drugi spojevi koji u primijenjenim uvjetima mogu doprinijeti uočenim razlikama, a što bi trebalo dodatno istražiti. Nadalje, prema dostupnoj literaturi nema istraživanja koja kompariraju *in vitro* model probave s komercijalnim i ljudskim probavnim enzimima budući da se prema gore navedenim karakteristikama probavnih ljudskih i komercijalnih sokova mogu očekivati određene razlike u dobivenim rezultatima.

Prema dostupnoj znanstvenoj literaturi, nema podataka o gastrointestinalnoj stabilnosti AITC-a i BITC-a, odnosno općenito je malo poznato o gastrointestinalnoj stabilnosti razgradnih produkata GSL-a. Prema Puangkamu i sur. (2017), *in vitro* metoda probave pokazala je značajan učinak na 2-fenetil-ITC, tj. njegova stabilnost je smanjena za polovicu, što je u skladu i s rezultatima u ovom istraživanju da *in vitro* probava značajno utječe na njihovu stabilnost. Rodriguez-Hernandez i sur. (2013) također su dokazali da se količina ITC-a smanjuje nakon *in vitro* metode probave. Prema istraživanju, a u okviru ovog doktorskog rada, BITC je stabilniji nakon želučanih faza nego nakon crijevnih faza *in vitro* metodom probave korištenjem komercijalnih i ljudskih probavnih enzima (Vrca i sur., 2021b). Prema Kawakishiju i sur. (1987), proteolitička probavljivost proteinsko-AITC adukta ispitana je na goveđem serumu albumin-AITC adukt pomoću tripsina, kimotripsina i pepsina. Probavljivost s tripsinom i kimotripsinom bila je značajno smanjena, dok s pepsinom ne, što je također u skladu s dobivenim rezultatima ovog istraživanja. U jednoj objavljenoj studiji na ljudima, bioraspoloživost AITC-a bila je 1,3 puta veća kada se brokula uzimala zajedno s mesom (Rungapmestry i sur., 2007).

Dobiveni rezultati jasno su pokazali i razlike u stopi stabilnosti AITC-a, BITC-a u čistom obliku i inkorporiranom u eteričnom ulju visokog dragoljuba, kao i između *in vitro*

metoda probave koristeći različite probavne enzime. Enzimsku složenost ljudskih probavnih sokova razlikuje se u odnosu na komercijalne probavne enzime. Kod ljudi su detektirane sljedeće komponente želučanih sokova: pepsin, tripsin, gastriksin, žuč, mali peptidi i fragmenti proteina (Foltz i sur., 2015). Duodenalni sok sadrži pankreasne i crijevne enzime kao što su proteolitički enzimi, crijevne lipaze, enterokinaze, tripsinogen, kimtripsinogen i amilaza (Hur i sur., 2011). Slabija gastrointestinalna stabilnost čistog BITC-a u usporedbi sa stabilnošću BITC-a unutar eteričnog ulja visokog dragoljuba mogla bi biti povezana s zaštitnim učinkom matriksa pod gastrointestinalnim uvjetima. Također se može pretpostaviti da je jedan od razloga različite stope stabilnosti BITC-a prisutnog u eteričnom ulju sjemenki visokog dragoljuba i čistog spoja, da eterično ulje iz sjemenki visokog dragoljuba, osim BITC-a, sadrži i druge spojeve poput BCN-a koji može doprinijeti uočenim razlikama u primijenjenim uvjetima, što, naravno, treba dodatno istražiti. Činjenica je da se općenito malo zna o stabilnosti ITC-a i drugih razgradnih produkata GSL-a (Oliviero i sur., 2018).

### 5.3. Hipoglikemijska aktivnost glukozinolata u gorušicama i visokom dragoljubu

U tablici 15 prikazana je hipoglikemijska aktivnost (inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze) čistih spojeva GSL-a sinigrina, glukonapina i glukotropeolina te akarboze kao kontrole. Sinigrin i glukonapin ne pokazuju inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze (podaci nisu prikazani), izuzev glukotropeolina koji pokazuje nisku stopu inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze od  $3,31 \pm 0,1\%$ . Akarboza, koja se uzima kao kontrola, pokazala je hipoglikemijsku aktivnost (inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze) od  $62,31 \pm 1,5\%$ .

Ispitivanje hipoglikemijske aktivnosti komponenti hrane važno je zbog poveznice sa šećernom bolešću. Drugi naziv za šećernu bolest (dijabetes) je globalna epidemija jer broj oboljelih osoba u svijetu rapidno se povećava. Jedan od najznačajnijih razloga je promjena načina života koju obilježava veći unos visokokalorične hrane i smanjena tjelesna aktivnost. Svjetske procjene govore da 537 milijuna osoba u dobi od 20 do 79 godina živi sa šećernom bolešću. Prema podacima CroDiab Registra osoba sa šećernom bolešću, u Hrvatskoj je u 2021. bilo 327 785 osoba sa šećernom bolesti, a broj oboljelih povećava se iz godine u godinu. Šećerna bolest je treći vodeći uzrok smrti sa udjelom od 8,2% u 2020. godini (Diabetesatlas, 2022.). Inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze pomaže u smanjenju postprandijalne glikemije smanjenjem brzine apsorpcije glukoze i stoga može biti važna strategija u liječenju hiperglikemije povezane s dijabetesom tipa 2. Zbog svoje nespecifičnosti u ciljanju različitih



glikozidaza, hipoglikemijska sredstva poput akarboze, miglitola i vogliboze imaju svoja ograničenja i poznato je da izazivaju ozbiljne nuspojave (Ponnusamy i sur., 2011). Stoga je ispitivanje sigurnijih, specifičnijih i učinkovitijih hipoglikemijskih sredstava i dalje važno područje istraživanja. Dobiveni rezultati u skladu s do sada poznatim studijama prema kojima GSL-i nisu biološki aktivni spojevi (Barba i sur., 2016; Al-Gendy i sur., 2016) te se iz provedenog istraživanja može zaključiti da nemaju hipoglikemijsku aktivnost.

#### **5.4. Antiproliferativna aktivnost**

##### **5.4.1. Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata smeđe i crne gorušice MTT metodom**

Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata smeđe i crne gorušice ispitana je na MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke i TCCSUP staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu nakon 72 h i pri koncentracijama od 1, 5, 10, 50 i 100  $\mu\text{g/mL}$  (slike 50-53).

Najbolja antiproliferativna aktivnost smeđe gorušice na MDA-MB-231 staničnu liniju raka dojke dobivena je za MHG ekstrakt koji ima  $\text{IC}_{50}$  vrijednost od 57,6  $\mu\text{g/mL}$ , zatim Clevenger hidrodestilacijski ekstrakt s  $\text{IC}_{50}$  vrijednošću od 105,4  $\mu\text{g/mL}$  dok je MAD ekstrakt pokazao 33,0% pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g/mL}$  (slika 50). Crna gorušica pokazala je još bolju antiproliferativnu aktivnost na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 gdje je MHG ekstrakt također pokazao najbolju aktivnost s  $\text{IC}_{50}$  vrijednošću od 9,1  $\mu\text{g/mL}$ , a zatim Clevenger hidrodestilacijski ekstrakt s  $\text{IC}_{50}$  vrijednošću od 23,3  $\mu\text{g/mL}$  i MAD ekstrakt koji je pokazao 25,9% pri 100  $\mu\text{g/mL}$  (slika 51). Hlapljivi izolati smeđe gorušice pokazali su slabu aktivnost protiv TCCSUP stanične linije raka mokraćnog mjehura s 49,3%, 19,0% i 16,6% pri 100  $\mu\text{g/mL}$  za MHG, MAD i Clevenger hidrodestilacijski ekstrakt, redom (slika 52). MHG ekstrakt crne gorušice pokazao je najbolju antiproliferativnu aktivnost na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP s vrijednošću  $\text{IC}_{50}$  od 27,21  $\mu\text{g/mL}$ , nakon čega slijedi ekstrakt Clevenger hidrodestilacije s vrijednošću  $\text{IC}_{50}$  od 71,3  $\mu\text{g/mL}$  i MAD ekstrakt koji pokazuje 29,4% pri 10  $\mu\text{g/mL}$  (slika 53).

Budući da je karcinom značajan javnozdravstveni problem te drugi vodeći uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila u Republici Hrvatskoj (HZJZ, 2018), antiproliferativna aktivnost razgradnih produkata GSL-a i drugih prirodnih bioaktivnih spojeva vrlo se intenzivno istražuje. Mnoga znanstvena istraživanja pokazala su da konzumiranje biljaka iz reda Brassicales može

smanjiti rizik od raka mokraćnog mjehura, tankog crijeva, debelog crijeva, pluća, jetre, jednjaka, želuca, raka dojke i prostate zbog prisutnih hlapljivih spojeva kao što su ITC-i i njihovi metaboliti (Drozdowska i sur., 2020; Veeranki i sur., 2015), stoga je važno ispitati njihovu antiproliferativnu aktivnost. Bassan i sur. (2018) izvijestili su da se konzumiranjem Brassica povrća smanjuje rizik od raka dojke, što uključuje i gorušice. Općenito, dobiveni rezultati sugeriraju umjereni antiproliferativni učinak razgradnih produkata GSL-a iz gorušica (tj. ITC-a, epitionitrila) na staničnoj liniji raka dojke MDA-MB-231. Prema Bo i sur. (2016) AITC inducira stanične morfološke promjene i inducira apoptozu u staničnoj liniji raka dojke MDA-MB-231 putem GADD153 mehanizma. Conde-Rioll i sur. (2018) identificirali su 3,4-epitiobutanonitril kao glavni aktivni spoj iz biljke *L. latifolium* koji ubija veliki broj stanica iz ljudskih staničnih linija raka, uključujući staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231, s čime se slažu rezultati dobiveni u ovom istraživanju da epitionitrili prisutni u MHG ekstraktu crne gorušice imaju umjerenu antiproliferativnu aktivnost. Naprotiv, Sayeed i sur. (2018) nisu izvijestili o inhibicijskom učinku AITC-a na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231. *In vitro* i *in vivo* modeli pokazuju da izloženost ITC-ima ima izvrstan potencijal protiv karcinogeneze raka mokraćnog mjehura (Bassan i sur., 2018). Prema Blažević i sur. (2019) AITC je pokazao antiproliferativno djelovanje na ljudski mjehur i glioblastom stanične linije raka (UM-UC-3 i LN229) nakon 72 sata s vrijednostima IC<sub>50</sub> od 28,2, odnosno 77,2 µg/mL, dok uzorci sa AITC-om u ovom istraživanju pokazuju slabiji antiproliferativni učinak na MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke i TCCSUP staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura. Prema Savio i sur. (2015) AITC također utječe na morfološke promjene i inhibira staničnu proliferaciju stanične linije ljudskog mokraćnog mjehura (RT4 i T24).

#### **5.4.2. Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakta dragoljuba, te čistih spojeva BITC-a i BCN-a MTT i MTS metodom**

Antiproliferativna aktivnost eteričnih ulja i ekstrakata visokog dragoljuba ispitana je zajedno na MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke i TCCSUP staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura mjerenjem staničnog metabolizma koristeći MTT metodu nakon 4, 24, 48 i 72 h pri koncentracijama od 1, 5, 10, 50 i 100 µg/mL (slike 54 i 55).

Eterično ulje visokog dragoljuba nakon Clevenger hidrodestilacije pokazalo je visoku antiproliferativnu učinkovitost na staničnu liniju MDA-MB-231 nakon 4, 24, 48 i 72 sata (46,51 µg/mL, 44,11 µg/mL, 9,123 µg/mL i 10,57 µg/mL) (slika 54a). Eterično ulje visokog

dragoljuba nakon MAD tehnike pokazalo je nabolji antiproliferativni učinak na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 nakon 4, 24, 48 i 72 sata (40,38  $\mu\text{g/mL}$ , 4,209  $\mu\text{g/mL}$ , 0,7981  $\mu\text{g/mL}$  i 0,5758  $\mu\text{g/mL}$ ) (slika 54b). Ekstrakt visokog dragoljuba nakon MHG tehnike pokazao je slabiji antiproliferativni učinak na staničnu liniju raka dojke MDA-MB-231 u odnosu na eterična ulja dragoljuba što se može pripisati smanjenom udjelu BITC-a te većoj prisutnosti BCN-a koji ne pokazuje visoku biološku aktivnost. Antiproliferativna aktivnost MHG ekstrakta dragoljuba nakon 4, 24, 48 i 72 sata iznosila je 153,8  $\mu\text{g/mL}$ , 131,9  $\mu\text{g/mL}$ , 29,79  $\mu\text{g/mL}$ , odnosno 25,17  $\mu\text{g/mL}$  (slika 54c). Na TCCSUP staničnu liniju raka mokraćnog mjehura, antiproliferativni učinak eteričnog ulja nakon Clevenger hidroddestilacije bio je 185,9  $\mu\text{g/mL}$ , 58,38  $\mu\text{g/mL}$ , 21,27  $\mu\text{g/mL}$  i 11,4  $\mu\text{g/mL}$  nakon 4, 24, 48 i 72 sata (55a), a nakon MAD tehnike pokazalo je najbolji antiproliferativni učinak (58,61  $\mu\text{g/mL}$ , 29,63  $\mu\text{g/mL}$ , 7,519  $\mu\text{g/mL}$  i 1,782  $\mu\text{g/mL}$  nakon 4, 24, 48 i 72 sata) (55b). Ekstrakt visokog dragoljuba nakon MHG na staničnu liniju raka mokraćnog mjehura TCCSUP pokazao je najlošiji antiproliferativni učinak (1,118,1  $\mu\text{g/mL}$ , 95,59  $\mu\text{g/mL}$  i 71,43  $\mu\text{g/mL}$  na 4, 24, 48 i 72 sata) (slika 55c).

Antiproliferativna aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba dobivenih tehnikama ekstrakcije MAD i MHG, kao i čistih spojeva BITC-a i BCN-a ispitana je zajedno na HeLa, HCT116 i U2OS staničnim linijama raka pomoću proliferacije stanica MTS metodom nakon 48 sati (slika 56). Eterično ulje visokog dragoljuba (MAD) pokazalo je bolji učinak na sve tri stanične linije raka: HeLa, HCT116 i U2OS ( $\text{IC}_{50}$  4,91  $\mu\text{g/mL}$ , 1,49  $\mu\text{g/mL}$ , odnosno 4,53  $\mu\text{g/mL}$ ) u usporedbi s MHG ekstraktom visokog dragoljuba ( $\text{IC}_{50}$  26,93  $\mu\text{g/mL}$ , 11,79  $\mu\text{g/mL}$  i 22,09  $\mu\text{g/mL}$ ). BITC je pokazao mnogo veći inhibitorni učinak na sve ispitivane stanice ( $\text{IC}_{50}$  1,39  $\mu\text{g/mL}$ , 0,85  $\mu\text{g/mL}$  i 1,27  $\mu\text{g/mL}$ ) za razliku od BCN-a ( $\text{IC}_{50}$  26,29  $\mu\text{g/mL}$ , 22,82  $\mu\text{g/mL}$  i 22,82  $\mu\text{g/mL}$ ).

Prema dostupnoj literaturi BITC pokazuje antitumorska svojstva kod različitih vrsta karcinoma (Xie i sur., 2019), što je u skladu s dobivenim rezultatima na pet staničnih linija u ovom istraživanju (MDA-MB-231, TCCSUP, HeLa, HCT116 i U2OS). Pri koncentracijama BITC  $>10 \mu\text{M}$  (1,49  $\mu\text{g/mL}$ ), stopa preživljavanja 4T1-Luc stanica karcinoma dojke miša bila je  $<50\%$  korištenjem MTT testa (Xie i sur., 2019). To je u skladu i s dobivenim rezultatima za eterično ulje visokog dragoljuba koje sadrži BITC  $>95\%$  nakon MAD tehnike na staničnu liniju MDA-MB-231 nakon 48 i 72 sata (0,7981  $\mu\text{g/mL}$  i 0,5758  $\mu\text{g/mL}$ ) i na TCCSUP staničnu liniju nakon 72 sata (1,782  $\mu\text{g/mL}$ ). Prethodne studije na *in vitro* kulturi stanica otkrile su da BITC pokazuje antikancerogene učinke izazivanjem apoptoze i zaustavljanjem G2/M staničnog ciklusa u različitim stanicama raka uključujući rak dojke, rak pluća, rak gušterače i stanice

leukemije u koncentracijama između 2 do 100  $\mu\text{mol/L}$  (0,30  $\mu\text{g/mL}$ -14,92  $\mu\text{g/mL}$ ) (Cho i sur., 2016), što je u skladu s rezultatima u ovom doktorskom radu na staničnoj liniji raka vrata maternice (HeLa), staničnoj liniji humanog raka debelog crijeva (HCT116) i staničnoj liniji humanog osteosarkoma (U2OS) gdje je  $\text{IC}_{50}$  bio  $< 2 \mu\text{g/mL}$  za čisti spoj BITC, a  $\text{IC}_{50}$  je bio  $< 5 \mu\text{g/mL}$  za eterično ulje dragoljuba. Rezultati MTT testa pokazali su da BITC (5-20  $\mu\text{mol/L}$ ) (0,75  $\mu\text{g/mL}$ -2,98  $\mu\text{g/mL}$ ) smanjuje broj održivih TRAMP-C2 stanica raka prostate i DU145 ljudskih stanica raka prostate (5-10  $\mu\text{mol/L}$ ) (0,75  $\mu\text{g/mL}$ -1,49  $\mu\text{g/mL}$ ) na način ovisan o koncentraciji (Cho i sur., 2016). Prema Veeranki i sur. (2015), BITC inhibira osteosarkom što je u skladu s gore dobivenim rezultatima u ovom istraživanju na staničnu liniju humanog osteosarkoma (U2OS). Da ITC-i pokazuju visoko antiproliferativno djelovanje, Huong i sur. (2011) također su dokazali na staničnoj liniji raka vrata maternice (HEp-2 i KB) pomoću MTS testa. Dobiveni rezultati pokazali su značajno smanjenje vitalnosti stanica 2-fenilet-il-ITC-om (PEITC), što ga čini snažnim inhibitorom rasta stanica raka vrata maternice (Huong i sur., 2011), kao i BITC. BITC je pokazao izvrsnu antiproliferativnu aktivnost protiv stanične linije humanog raka debelog crijeva HT-29: nakon 3 sata izlaganja BITC-u i 69 sati bez BITC-a,  $\text{IC}_{50}$  je bio  $5,4 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$  ( $0,81 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ ) i nakon izlaganja 72 sata BITC-u,  $\text{IC}_{50}$  je bio  $5,1 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$  ( $0,76 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ ) (Zhang i sur., 2003). Nastruzzi i sur. (2000) izvijestili su da je ITC iz benzil-GSL-a najaktivniji spoj od svih testiranih razgradnih produkata iz različitih GSL-a protiv ljudske K562 eritroleukemijske stanične linije, proizvodeći 50%-tnu inhibiciju rasta stanica u koncentracijama od 1-6  $\mu\text{M}$  (0,15 – 0,90  $\mu\text{g/mL}$ ) raspon. Nitril iz benzil GSL-a pokazao je nižu antiproliferativnu aktivnost protiv ljudske K562 eritroleukemijske stanične linije u usporedbi s BITC-om (Nastruzzi i sur., 2000.), što je u skladu s dobivenim rezultatima u ovom provedenom istraživanju gdje je  $\text{IC}_{50} < 27 \mu\text{g/mL}$  za BCN. S tim se također slažu dobiveni rezultati na svih pet staničnih linija testiranim ekstraktom dragoljuba nakon MHG tehnike koji je u velikom postotku sadržavao BCN uz BITC smanjujući time njegovu biološku aktivnost. Nastruzzi i sur. (1996) izvijestili su da produkti razgradnje iz glukorafenina pokazuju antiproliferativno djelovanje protiv nekoliko drugih tumorskih stanica, tj. FL (mišje eritroleukemijske stanice), Jurkat (ljudske T-limfoidne stanice), HeLa (stanice humanog karcinoma cerviksa), H9 (ljudske T-limfoidne stanice) i H3-T1-1 stanice (dobivene transfekcijom HeLa s LTR-HIV-1-CAT plazmid). Prema kriterijima korištenim za kategorizaciju aktivnosti na ispitivane stanične linije temeljene na vrijednostima  $\text{IC}_{50}$  (Al-Gendy i sur., 2016), rezultati dobiveni u ovom istraživanju sugeriraju visoko aktivno antiproliferativno djelovanje eteričnog ulja dragoljuba i čistog spoja BITC na sve testirane

stanične linije raka. Ekstrakt dragoljuba također je pokazao visoko aktivno antiproliferativno djelovanje na staničnoj liniji raka HCT116. Ekstrakt dragoljuba pokazao je umjereno aktivno antiproliferativno djelovanje na drugim ispitivanim staničnim linijama raka (HeLa i U2OS). BCN je pokazao umjereno aktivno antiproliferativno djelovanje na ispitivanim staničnim linijama raka HeLa, HCT116 i U2OS. Rezultati prikazani u ovom istraživanju pokazuju da je produkt razgradnje benzil GSL-a, BITC, visoko biološki aktivan. Zahvaljujući svemu navedenom, BITC se potencijalno može koristiti u svrhu daljnjih detaljnijih istraživanja na području preventivnih terapeutika za različite vrste karcinoma.

### 5.5. Proapoptotska aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba

Citometrija je jednostavna, kvantitativna i visokoinformativna metoda za određivanje apoptoze na razini pojedinačnih stanica, pri čemu je dovoljan relativno malen broj stanica u ispitivanom uzorku (poglavlje 2.9.). U tablicama 16-19 prikazani su rezultati protočne citometrije analize indukcije apoptoze nakon tretmana eteričnim uljem (MAD) i MHG ekstraktom visokog dragoljuba na staničnim linijama raka dojke MDA-MB-231 i raka mokraćnog mjehura TCCSUP.

Rezultati prikazuju stanice koje nisu ušle u apoptozu (PI-/aneksin V-), stanice u kasnoj apoptozi (PI+/aneksin V+) te ukupno stanice u ranoj i kasnoj apoptozi (aneksin V+) (tablice 16-19). Učinak je mjereno protočnom citometrijom nakon 48 sati inkubacije. Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba su ispitani pri IC<sub>50</sub> koncentracijama nakon 48 sati dobivenih nakon MTT metode. Kod MDA-MB-231 stanične linije raka dojke najveći je porast postotka stanica u ranoj+kasnoj fazi apoptoze bio nakon tretmana ekstraktom visokog dragoljuba u odnosu na netretirane stanice (tablica 17). Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba na stanicama raka MDA-MB-231 u fazama kasne apoptoze (a) i rana + kasna apoptoza (b) pokazuje statističku značajnost od  $p < 0,05$  i  $p < 0,005$  u odnosu na kontrolu.

Kod TCCSUP stanične linije raka mokraćnog mjehura najveći je porast postotka stanica u ranoj+kasnoj apoptozi bio nakon tretmana eteričnim uljem visokog dragoljuba u odnosu na kontrolu (tablica 18). Ekstrakt dragoljuba je značajnije povećao postotak stanica u kasnoj apoptozi nego eterično ulje kod MDA-MB-231 stanične linije raka dojke (tablice 18 i 19), dok su testirani uzorci pokazali relativno sličan učinak na postotak stanica u kasnoj apoptozi kod TCCSUP stanične linije (tablice 18 i 19). Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba na stanicama raka TCCSUP kasna apoptoza (a) ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok kod rana + kasna apoptoza (b) pokazuju statistički značajnu razliku ( $p < 0,005$ ).

Brojne prethodne studije izvijestile su o djelovanju ITC-a kao inhibitorima mitoze i stimulatorima apoptoze u ljudskim tumorskim stanicama (Barba i sur., 2016). Prema Xie i sur. (2017), liječenje BITC-om rezultira supresijom rasta tumora, inhibicijom stanične proliferacije i povećanom apoptozom u tumorima dojke. Prethodne studije na *in vitro* kulturi stanica otkrile su da BITC pokazuje antikancerogene učinke izazivanjem apoptoze i zaustavljanjem G2/M staničnog ciklusa u različitim stanicama raka uključujući rak dojke, rak pluća, rak gušterače i stanice leukemije u koncentracijama između 2 do 100  $\mu\text{mol/L}$  (0,30  $\mu\text{g/mL}$ -14,92  $\mu\text{g/mL}$ ) (Cho i sur., 2016). Prema istraživanju Ma i sur. (2019) stanice oralnog karcinoma skvamoznih stanica SCC9 tretirane BITC-om pri koncentracijama 5 i 25  $\mu\text{M}$  (0,746  $\mu\text{g/mL}$  i 3,73  $\mu\text{g/mL}$ ) tijekom

24 i 48 sata, imale su značajno povećanu staničnu apoptozu na način ovisan o dozi i vremenu, što sugerira da BITC inhibira vitalnost stanica inducirajući staničnu apoptozu. Takvi dobiveni rezultati u skladu su s ovim istraživanjem.

### 5.6. Antiproliferativni mehanizam eteričnog ulja visokog dragoljuba

Na slikama 57-61 prikazane su netretirane i tretirane stanice TCCSUP stanične linije raka mokraćnog mjehura eteričnim uljem visokog dragoljuba subtoksičnom koncentracijom od 10  $\mu\text{g/mL}$  nakon 24 sata. Netretirane stanice imale su izduženi oblik s jezgrom u središtu, što je potvrđeno optičkom i AFM mikroskopijom (slike 57, 60 i 61a). Stanice su bile potpuno zalijepljene za posudicu za kulturu stanica i formirale su kolonije (slika 57). Zbog izrazitih morfoloških promjena i oštećenja na TCCSUP stanicama raka mokraćnog mjehura koje su tretirane s  $\text{IC}_{50}$  koncentracijom od 29,63  $\mu\text{g/mL}$ , stanice nisu bile prikladne za mjerenje. Stoga su stanice tretirane subtoksičnom koncentracijom od 10  $\mu\text{g/mL}$  tijekom 24 sata. Optička mikroskopija tretiranih stanica izloženih eteričnom ulju visokog dragoljuba u subtoksičnoj koncentraciji od 10  $\mu\text{g/mL}$  tijekom 24 sata pokazala je da se kod nekih stanica ne mogu uočiti nikakve morfološke promjene, dok su na nekim stanicama uočene relevantne morfološke promjene kao što su mjehurići na membrani, skupljanje stanice, gubitak formiranja kolonija, a neke su stanice poprimile sferni oblik (slike 58 i 59). AFM analiza tretiranih stanica ukazuje također na promjene stanične površine/formiranje mjehurića na membrani kao dio antiproliferativnog mehanizma (slika 61b). Te formacije membranskih mjehurića nisu uočene kod netretiranih stanicama (slike 57, 60 i 61a).

Gomez i sur. (2016) istražili su utjecaj eteričnog ulja *Decatropis bicolor* na MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke s  $\text{IC}_{50}$  koncentracijom na različita vremena (3, 6, 12 i 24 sata). Eterično ulje pokazalo je relevantne morfološke promjene nakon 3 sata inkubacije, uključujući smanjenje veličine stanica, mjehuriće membrane, skupljanje stanica i gubitak formiranja kolonija (Gomez i sur., 2016) s čime se slažu i rezultati prikazani u ovom istraživanju. Ove promjene su se povećavale s vremenom, a nakon 6, 12 i 24 sata inkubacije, stanice su izgledale zaobljene i apoptotska tijela su bila prisutna. Slične karakteristike uočene su kod stanica raka dojke izloženim paklitakselu (Gomez i sur., 2016). Ove morfološke karakteristike upućuju na indukciju apoptoze eteričnog ulja *Decatropis bicolor* (Gomez i sur., 2016). Spomenute promjene uočene su i na TCCSUP stanicama nakon tretmana eteričnim uljem visokog dragoljuba u ovom istraživanju. Prema Kim i sur. (2012), netretirane Ishikawa stanice (stanice

raka endometrije) pokazale su konvencionalni stanični oblik s izraženim granicama i centralno smještenim jezgrama, s čime se slažu i dobiveni rezultati ovog istraživanja. Tamo nije bilo tipičnih morfoloških promjena nakon 6 sati tretmana. No, s druge strane, kada su Ishikawa stanice bile izložene paklitakselu dulje od 24 sata, očite apoptotske promjene, kao npr. agregacije, mikronuklearne stanice i plutajuće stanice su opažene (Kim i sur., 2012). Zanimljivo je da su stanične membrane bile ozbiljno oštećene (Kim i sur., 2012). Proliferativne i apoptotske analize sugeriraju da liječenje paklitakselom potiče apoptotsku smrt stanica i smanjuje proliferaciju Ishikawa i HeLa stanica (Kim i sur., 2012), što je u skladu s dobivenim rezultatima na TCCSUP stanicama raka mokraćnog mjehura tretiranim eteričnim uljem visokog dragoljuba. Apoptoza je proces definiran jedinstvenim morfološkim i biomehaničkim karakteristikama uključujući skupljanje stanica i nuklearnu kondenzaciju. Iako su postojale druge karakteristike koje se pripisuju apoptotskom procesu, gubitak volumena ili skupljanje stanice jedina je karakteristika programirane stanične smrti koja se opaža u stanicama raka endometrije (Kim i sur., 2012), što je također u skladu s dobivenim rezultatima na TCCSUP staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura tretiranoj eteričnim uljem visokog dragoljuba. Cisplatin, koji je jedan od primarnih lijekova koji se koristi u liječenju karcinoma cerviksa, endometrije i jajnika, izaziva dva različita načina stanične smrti, nekrozu i apoptozu. Nekrozu karakterizira citosolno oticanje i rani gubitak integriteta plazma-membrane, dok apoptoza uključuje skupljanje stanica i fragmentaciju DNA (Kim i sur., 2012).



### 5.7. Antibakterijska aktivnost spojeva prisutnih u visokom dragoljubu

Antibakterijska aktivnost eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba te čistih spojeva BITC i BCN na *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 11229 prikazana je u tablici 20 i na slikama 62-68. *S. aureus* je bio izložen hlapljivim izolatima tijekom 24 sata u koncentracijama od 0,25 mg/mL do 0,031 mg/mL. Kao što se može vidjeti na slici 63, BITC i BCN u koncentraciji od 0,25 mg/mL potpuno su inhibirali rast *S. aureus*, dok je učinak eteričnog ulja (MAD) i ekstrakta (MHG) bio još izraženiji. Eterično ulje i ekstrakt su inhibirali rast *S. aureus* u koncentraciji od 0,125 mg/mL. Ovaj jači antibakterijski učinak može biti posljedica sinergije čistih spojeva BITC-a i BCN-a koji su sastavni dio ovih izolata. Da bi se potvrdila ova hipoteza, BITC i BCN zajedno su testirani u različitim omjerima protiv *S. aureus*. Kada je omjer BITC-a i BCN-a bio 1:1, učinak je bio jači u usporedbi s omjerom 1:2 (slike 64 i 65). Kada je koncentracija BITC-a i BCN-a odgovarala njihovim MIC-evima, njihov je učinak bio baktericidan, kao što su i učinci eteričnog ulja i ekstrakta visokog dragoljuba. Kada je koncentracija BITC-a u kombinaciji bila dvostruko niža, nije bilo baktericidnog učinka, ali je uočen inhibicijski učinak. Čak i pri nižim koncentracijama u obje kombinacije uočeni su inhibicijski učinci. Ovi rezultati pokazuju da je BITC glavni spoj koji diktira antibakterijska svojstva. To se može primijetiti i promatranjem krivulja rasta *S. aureus* tijekom izlaganja eteričnom ulju visokog dragoljuba, gdje je čak niža koncentracija inhibirala rast *S. aureus*. U usporedbi s eteričnim uljem, inhibicijski učinak ekstrakta visokog dragoljuba na rast *S. aureus* bio je slabiji, što se može objasniti nižim udjelom BITC-a u ekstraktu. Da bi se postigao isti učinak pripravaka visokog dragoljuba na rast *E. coli*, kao što je uočeno u *S. aureus*, morale su se koristiti veće koncentracije (u rasponu od 1 mg/mL do 0,125 mg/mL) (slika 66). BITC je imao baktericidni učinak na rast *E. coli* u koncentraciji od 1 mg/mL, dok BCN nije imao baktericidni učinak u ovoj koncentraciji (slika 66). Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba imali su dvostruko nižu baktericidnu koncentraciju u odnosu na BITC, što opet ukazuje da je kombinacija ta dva čista spoja važna za antibakterijska svojstva. Čak su i niže koncentracije hlapljivih izolata imale inhibitorne učinke (slika 66).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su svi pripravci imali antibakterijsko djelovanje protiv *S. aureus* i *E. coli* (tablica 20). *S. aureus* je bio osjetljiviji na pripravke i čiste spojeve u odnosu na *E. coli* (tablica 20). Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba imali su isti učinak protiv *S. aureus* s MIC 0,0625 mg/mL i MBC 0,125 mg/mL, dok je učinak BITC i BCN bio dvostruko slabiji (tablica 20). Eterično ulje i ekstrakt visokog dragoljuba bili su učinkoviti i protiv *E. coli*, s MIC 0,25 mg/mL i MBC 0,5 mg/mL. BITC je imao MIC 0,5 mg/mL protiv *E. coli*, dok je

MBC bio 1 mg/mL. BCN je imao dvostruko slabiji učinak na *E. coli* u odnosu na BITC (Tablica 20, slika 66). Slično kao i za *S. aureus*, kombinacije BITC-a i BCN-a u omjerima 1:1 i 1:2, pokazale su da je BITC glavni spoj koji izaziva veći antibakterijski učinak visokog dragoljuba. U kombinaciji koja je odgovarala MIC-evima, BITC i BCN su imali baktericidni učinak (slike 80 i 81). Kada je koncentracija BITC u kombinaciji bila dvostruko niža u odnosu na BCN, inhibitorni učinak je bio slabiji (slike 67 i 68).

Hlapljivi izolati dobiveni iz sjemena visokog dragoljuba, odnosno eterično ulje i ekstrakt, te čisti spojevi BITC i BCN također su ispitani na djelovanje protiv prijanjanja *S. aureus* i *E. coli* na polistirensku površinu. Ispitane su koncentracije MIC,  $\frac{1}{2}$  MIC i  $\frac{1}{4}$  MIC. Kao što se može vidjeti na slikama 69 i 70, svi pripravci u koncentraciji MIC značajno su smanjili adheziju *S. aureus* i *E. coli* na površinu polistirena ( $p < 0,05$ ). BITC i eterično ulje značajno su smanjili adheziju *S. aureus* i *E. coli* na polistirensku površinu ( $p < 0,05$ ) čak i u koncentraciji  $\frac{1}{2}$  MIC. Najniža koncentracija nije imala antiadhezijski učinak. Slični rezultati dobiveni za BITC i eterično ulje mogu se objasniti kemijskim sastavom eteričnog ulja, koji se uglavnom sastoji od BITC-a. BITC je imao najizraženiji antiadhezijski učinak protiv *S. aureus* i *E. coli*. BITC je smanjio adheziju *S. aureus* u koncentraciji MIC i  $\frac{1}{2}$  MIC za 99,99% i 99,9%, što je odgovaralo smanjenju od 4 odnosno 3 log<sub>10</sub> CFU/mL. Slično je uočeno i kod *E. coli*, gdje je BITC u koncentraciji MIC smanjio adheziju za 99,99%, što je odgovaralo smanjenju od 4 log<sub>10</sub> CFU/mL.

ITC-i, osim antiproliferativne, pokazuju i antimikrobnu aktivnost. Znanstvena istraživanja pokazala su da su GSL-i biološki neaktivni na mikroorganizme poput bakterija, kvasaca i plijesni, za razliku od njihovih razgradnih produkata (Barba i sur., 2016). ITC-i su hlapljivi spojevi koji pokazuju inhibitorni učinak na različite patogene mikroorganizme u niskim koncentracijama, što ih čini poželjnim antimikrobnim kandidatima (Dias i sur., 2014), s čime se slažu dobiveni rezultati ovog istraživanja. ITC-i se smatraju najzanimljivijim spojevima koji se dobivaju razgradnjom GSL-a i poznati su kao učinkoviti inhibitori rasta Gram-negativnih i Gram-pozitivnih patogenih bakterija (Kaiser i sur., 2017). Među svim testiranim ITC-ima (AITC, BITC, PEITC) protiv 15 izolata *S. aureus* otpornih na meticilin, BITC je bio najučinkovitiji s MIC-om koji se kretao od 2,9 do 110  $\mu\text{g/mL}$  sa stopom antibakterijske aktivnosti do 87% (Dias i sur., 2014). Veća učinkovitost BITC-a protiv 15 izolata *S. aureus* otpornih na meticilin u usporedbi s nekim drugim ITC-ima (PEITC i AITC) može se pripisati aromatskom prstenu i kratkom ugljikovom lancu (Dias i sur., 2014). Prema Ko i sur. (2016), MIC i MBC od BITC-a bili su četiri puta veći od naših dobivenih rezultata

(MIC =  $0,500 \pm 0,000$  mg/mL, a MBC > 1000 mg/mL). Kaiser i sur. (2017) izvijestili su da je srednji MIC za BITC za sve testirane izolate *Pseudomonas aeruginosa*  $2145 \pm 249$  µg/mL. Li i sur. (2020) izvijestili su da je MIC pročišćenog BITC-a dobivenog iz sjemenki papaje protiv *E. coli* i *S. aureus* bio 1 µL/mL, odnosno 0,5 µL/mL. Polifenoli i polisaharidi se posljednjih godina koriste kao prirodne bakteriostatske tvari, a njihove MIC vrijednosti su puno veće od onih u BITC-u (Li i sur., 2020). Posljedično, produkti razgradnje benzil-GSL-a (osobito BITC) obećavaju kao alternativna antibakterijska sredstva što je od iznimne važnosti za prehrambene i medicinske svrhe.

Nadalje, poznato je da su Gram-negativne bakterije otpornije na tretmane u odnosu na Gram-pozitivne bakterije zbog vanjske membrane (Breijyeh i sur., 2020). Brojne studije su pokazale da je manja vjerojatnost da se otpornost na bolest javlja na kombinaciju spojeva nego na jednu aktivnu komponentu (Caesar i Cech, 2019), što potvrđuju i podaci u ovom istraživanju dobiveni na *S. aureus* i *E. coli*. Čak i niže koncentracije hlapljivih izolata imale su inhibitorne učinke. Također, važno je koristiti niske koncentracije biljnih pripravaka kako bi se utjecalo ne samo na rast bakterija, već i na svojstva važna za fenotipove bakterija kao što su stvaranje biofilma, virulencija, prepoznavanje kvoruma, patogenost (Diaz-Nunez i sur., 2021). Štoviše, korištenje tako niskih koncentracija može smanjiti rizik od razvoja rezistencije bakterija (Ramić i sur., 2021.).

ITC-i su poželjni spojevi i zbog svoje sposobnosti sprječavanja tvorbe biofilma, kao i dobre učinkovitosti na utvrđenim biofilmovima (Kaiser i sur., 2017). Kaiser i sur. (2017) izvijestili su da čak i niske koncentracije ITC-a mogu inhibirati stvaranje biofilma i poremetiti održivost biofilma, što je u skladu s dobivenim rezultatima. BITC je imao najizraženiji antiadhezijski učinak protiv *S. aureus* i *E. coli*. Svi ostali pripravci u koncentraciji MIC smanjili su adheziju obiju bakterija za više od 90%, što je više od 1 log<sub>10</sub> CFU/mL. To zadovoljava preporuke koje je predložila Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, 2018).

Prema dobivenim rezultatima, BITC je obećavajući prirodni spoj s jakim djelovanjem protiv prijanjanja *S. aureus* i *E. coli* na površinu polistirena.

## 5.8. DODATAK

### 5.8.1. Površinska morfologija sjemena gorušice snimana optičkom i SEM mikroskopijom

Kako bi se odredio utjecaj tehnika ekstrakcije na površinsku morfologiju sjemena smeđe i crne gorušice, površinska morfologija ispitana je optičkom i SEM mikroskopijom te prikazana na slici 71 i u tablici 21. Grebeni na površini sjemena smeđe i crne gorušice su jasno vidljivi i pravilno oblikovani i duljine grebena mogu se izračunati prije i nakon različitih tehnika ekstrakcije pomoću optičke mikroskopije (tablica 21, slika 71). Morfologija površine sjemena skenirana optičkom i SEM mikroskopijom pokazala je da ispitani uzorci imaju kompaktnu mikrostrukturu grebena po cijeloj površini uzorka, a njihova površinska morfologija izvana izgleda kao koža citrusa (slika 71-g, 71-j). Grebeni sjemena smeđe gorušice se ne razlikuje značajno ( $p > 0,05$ ) nakon različitih tehnika ekstrakcije u odnosu na netretirani uzorak. Grebeni sjemenki crne gorušice se statistički razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) nakon MAD-a u odnosu na netretirani uzorak, dok se nakon Clevenger hidrodestilacije statistički značajno ne razlikuju. Grebeni sjemenki gorušice su veći nakon MAD nego nakon Clevenger hidrodestilacije za obje vrste sjemenki gorušice. Površinska morfologija sjemena gorušice izvana nalikuje loptici za golf i posjeduje poluravan niz grebena koji dijele omotač sjemena gorušice dajući mrežu koja podsjeća na uzorak pčelinjih saća (Holley i sur., 1983), što je u skladu s dobivenim rezultatima ovog istraživanja. Osim navedenog istraživanja od Holley i sur (1983) koji je istraživao morfologiju sjemenki smeđe gorušice, nema dostupnih podataka o istraživanjima utjecaja tehnika ekstrakcije na površinsku morfologiju sjemena gorušice.

### 5.8.2. Prinos ulja i sastav masnih kiselina iz sjemenki gorušica i dragoljuba nakon dviju tehnika ekstrakcije

Prinosi ulja i sastav masnih kiselina u analiziranim uzorcima dobiveni GC-FID tehnikom prikazani su u tablicama 22 i 23. Prinosi ulja dobiveni iz različitih sjemenki gorušice korištenjem Soxhlet ekstrakcije bili su značajno veći u odnosu na prinose ulja nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije (tablice 22 i 23). Prinos ulja crne gorušice nakon Soxhlet ekstrakcije bio je najveći u usporedbi s prinosima ostalih sjemenki gorušice (tablica 23). Zanimljivo je da su uzorci gorušice koji su dali najveći prinos nakon Soxhlet ekstrakcije, dali najmanji prinos nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije (tablice 22 i 23). Prinosi ulja visokog i niskog dragoljuba najniži su od svih analiziranih uzoraka nakon Soxhlet ekstrakcije (tablica 22).

Također, analiziran je sastav masnih kiselina u četiri vrste gorušice (bijela, smeđa, crna i divlja gorušica) nakon Soxhlet i SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije, kao i u sjemenkama visokog i niskog dragoljuba nakon Soxhlet ekstrakcije koristeći GC-FID tehniku. Zbog iznimno niskog prinosa ulja nakon ekstrakcije SC-CO<sub>2</sub>, sastav masnih kiselina u sjemenkama visokog i niskog dragoljuba nije se odredio GC-FID-om (podaci nisu prikazani). Kao što se može vidjeti u tablici 22, glavne nezasićene masne kiseline u sjemenkama bijele, smeđe, crne i divlje gorušice bile su: oleinska (C18:1), linolna (C18:2), *cis*-11-eikozeinska (C20:1) i erukinska kiselina (C22:1) nakon Soxhlet ekstrakcije, ali u različitim količinama. U bijeloj i smeđoj gorušici ima dvostruko više oleinske kiseline nego u sjemenkama crne i divlje gorušice. Sadržaj linolne kiseline značajno je veći u smeđoj, nego u bijeloj gorušici, dok je u jednakom postotku prisutna u sjemenkama crne i divlje gorušice (tablica 22). U sjemenkama crne gorušice sadržaj *cis*-11-eikozenoinske kiseline je dvostruko manji u odnosu na njezin sadržaj u sjemenkama bijele i smeđe gorušice, a tri puta manji nego u sjemenkama divlje gorušice nakon Soxhlet ekstrakcije. Erukinska kiselina je najviše prisutna u sjemenkama crne gorušice, a najmanje u sjemenkama smeđe gorušice. Glavne zasićene masne kiseline prisutne u svim sjemenkama gorušice su: palmitinska, stearinska i behenijska kiselina nakon Soxhlet ekstrakcije. Linolenska + heneikozeinska (C18:3n3 + C21:0), polinezasićena i zasićena masna kiselina također su bile prisutne nakon Soxhlet i SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije (tablice 22 i 23). Sastav masnih kiselina pokazao je velike varijacije između različitih vrsta gorušice i sjemenki dragoljuba. Oleinska i linolna kiselina, kao i linolenska + heneikozeinska kiselina, prisutne su u sjemenkama visokog dragoljuba u manjem postotku nego u gorušicama. Sjeme visokog dragoljuba ima značajno veći postotak *cis*-11-eikozenoinske i erukinske kiseline (u sadržaju od > 50%) u odnosu na različite sjemenke gorušice, posebno sjeme visokog dragoljuba (tablica 22). Ono što je zanimljivo, ekstrakcija SC-CO<sub>2</sub> smanjuje sadržaj erukinske kiseline u ulju gorušica (do 12,12% u sjemenkama bijele gorušice).

Stamenković i sur. (2018) izvijestili su da je najbolji prinos ulja iz sjemenki bijele gorušice postignut Soxhlet ekstrakcijom u usporedbi s drugim primijenjenim tehnikama ekstrakcije. Sadržaj ulja u sjemenkama bijele gorušice različitog podrijetla varirao je između 19,5% - 43,5% nakon Soxhlet ekstrakcije koristeći kao otapalo petroleter ili *n*-heksan (Stamenković i sur., 2018). Sharafi i sur. (2015) izvijestili su da se sadržaj ulja u sjemenkama smeđe gorušice kretao od 20 do 31%, što je u skladu s dobivenim sadržajem ulja u sjemenkama smeđe gorušice nakon Soxhlet ekstrakcije (Tablica 22). Prema Aloh i sur. (2015) Soxhlet ekstrakcija sjemenki smeđe gorušice tijekom 6 sati korištenjem dietil-etera kao otapala dala je

postotak prinosa od 22,93%, što je nešto manje od dobivenog u usporedbi s rezultatima u ovom provedenom istraživanju. Vjerojatni razlog manjeg prinosa u odnosu na dobiveni rezultat u ovom istraživanju nakon Soxhlet ekstrakcije je izbor organskog otapala. Prema Verma i sur. (2019) sadržaj ulja je veći kada se kao otapalo koristi petroleter u usporedbi s n-heksanom. Dobiveni udio ulja iz gorušica sličan je prijavljenom sadržaju ulja u divljoj gorušici (Al-dobouni i sur., 2016; Jham i sur., 2009). Općenito, dobiveni rezultati su u skladu s prethodno dobivenim rezultatima za *Brassica* vrste (Sharafi i sur., 2015; Verma i sur., 2019; Aloh i sur., 2015; Stamenković i sur., 2018). Seal i sur. (2018) izvijestili su o tri puta većem prinosu ulja u sjemenkama bijele gorušice nakon SC-CO<sub>2</sub> ekstrakcije. Potencijalni odgovor leži u primjeni drukčijih parametara ekstrakcije od naših kao što su tlak i temperatura ( $p = 413,69$  bara i  $t = 80$  °C) od kojih temperatura ima najveći utjecaj. Obje vrste sjemenki dragoljuba dale su najmanji prinos ulja nakon Soxhlet ekstrakcije u usporedbi sa sjemenkama gorušice (tablica 22). Prema Carlson i Kleiman (1993) sadržaj ulja se kretao od *ca.* 6 do 11% u sjemenkama dragoljuba, što je u skladu s dobivenim rezultatima.

Analiza sastava masnih kiselina vrlo je važna za nutritivne podatke i pomaže razumjeti dostupnost različitih masnih kiselina u jestivim uljima i prehrambenim proizvodima te onim uljima koji se mogu koristiti u industrijske svrhe. Sedam glavnih masnih kiselina ekstrahiranih iz pripadnika roda *Brassica* su: palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2), linolenska (C18:3), eikozenoinska (C22:0) i erukinska (C22:1) kiselina (Sharafi i sur., 2015), što je u skladu s dobivenim rezultatima u ovom istraživanju. Dobiveni rezultati su također usporedni s rezultatima Ensminger i sur. (1986) da ulje sjemenki smeđe gorušice sadrži palmitinsku, oleinsku, erukinsku, linolnu, linolensku i eikozenoinsku kiselinu. Lipidni sastav ulja dobivenih Soxhlet ekstrakcijom različitih sorti bijele gorušice pokazao je da su erukinska, oleinska, linolna i gadoleinska kiselina glavne komponente u svim ispitivanim uljima. U svima je prevladavala erukinska kiselina koja se kretala od 28,0 do 53,2% (Antova i sur., 2017). Prema Abdul-Fadlu i sur. (2011) udio erukinske kiseline nakon Soxhlet ekstrakcije u bijeloj gorušici iznosio je 37,89%, a u smeđoj gorušici 23,90%, što je gotovo isti postotak erukinske kiseline kao u ovdje prikazanim rezultatima. Prema Lazzeri i sur. (2013.), erukinska kiselina je glavna masna kiselina u 11 vrsta porodice Brassicaceae, s vrijednostima između 28 - 56% nakon ekstrakcije, što je također u skladu s dobivenim rezultatima (23,01 - 48,28% pokazuje visoku varijabilnost do 25,27% nakon Soxhleta ekstrakcije i 21,21 - 38,22% pokazujući varijabilnost do 17,01% nakon ekstrakcije SC-CO<sub>2</sub>). Ulje dragoljuba ima visok udio mononezasićenih masnih kiselina (> 96%) (Jakubczyk i sur., 2018). Sadržaj erukinske kiseline

u nekim biljnim sortama doseže 80%, dok je sadržaj eikozenoinske kiseline oko 15%. Oleinska kiselina, čiji je sadržaj ispod 2%, pokazuje inverznu korelaciju s erukinskom kiselinom (Jakubczyk i sur., 2018). Sorte dragoljuba mogu se podijeliti u tri skupine na temelju sadržaja oleinske kiseline (<2%, 4-8% i 17,5%) ili erukinske kiseline (<68%, 68-74% i >76%) (Jakubczyk i sur., 2018). Sjemenke dragoljuba imale su najveći udio erukinske i *cis*-11-eikozenoinske kiseline među svim sjemenkama vrste *Brassica* (tablica 22). Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnim izvještajima o sastavu masnih kiselina vrsta *Brassica* (Sharafi i sur., 2015; Carlson i Kleiman 1993; Lazzeri i sur., 2013). Budući da oleinska kiselina igra važnu ulogu u povećanju nutritivne kvalitete ulja *Brassica* vrsta, a smeđa gorušica imala je najniži sadržaj erukinske kiseline i najveći sadržaj oleinske kiseline nakon bijele gorušice, dobiveni rezultati sugeriraju da veliki naponi koji su uloženi u smanjenje erukinske kiseline i povećanje oleinske kiseline u sjemenkama uljane repice, može biti jednako uspješno i primjenjivo sa sjemenkama smeđe gorušice. Ulje repice jedno je od najčešće konzumiranih biljnih ulja i jedna je od najvrednijih jestivih masti, uglavnom zbog visokog sadržaja (oko 90%) nezasićenih masnih kiselina s 18 ugljikovih atoma (Sagan i sur., 2019). Proizvodi se od sorti uljane repice s niskom razinom erukinske kiseline, a karakterizira ga prisutnost masnih kiselina koje su poželjne u prehrani ljudi i životinja te su prisutne u omjerima sličnim onima koje se nalaze u najvrjednijim uljima, poput maslinovog ulja (Sagan i sur., 2019). Osim toga, dobiveni rezultati sugeriraju da je crna gorušica izvrstan kandidat za proizvodnju erukinske kiseline i korištenje u industrijske svrhe zbog najvećeg sadržaja erukinske kiseline i prinosa ulja nakon Soxhlet ekstrakcije (tablica 22).

## **6. ZAKLJUČCI**



Na osnovu provedenih eksperimenata te prikazanih i interpretiranih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci ovog doktorskog istraživanja:

- Različiti uvjeti pripreme uzorka i tehnike izolacije bioaktivnih spojeva (Clevenger hidrodestilacija, MAD, MHG) kvalitativno i kvantitativno utječu na razgradne produkte glukozinolata te posljedično na stupanj biološke aktivnosti dobivenih hlapljivih izolata.
- Prinosi eteričnih ulja, odnosno ekstrakata iz različitih sjemenki gorušice i visokog dragoljuba bili su veći nakon konvencionalne metode izolacije (Clevenger hidrodestilacija) u odnosu na moderne metode izolacije (MAD, MHG).
- MAD metoda izolacije značajnije utječe na površinsku morfologiju sjemena gorušice u odnosu na Clevenger hidrodestilaciju.
- UHPLC-DAD-MS/MS analizom identificirani su sljedeći glavni spojevi iz skupine glukozinolata u ispitanim uzorcima sjemenki: glukosinalbin u bijeloj gorušici, sinigrin u smeđoj gorušici, glukonapin u crnoj gorušici te glukotropeolin u visokom dragoljubu.
- GC-MS/MS analizom identificirani su sljedeći hlapljivi glavni spojevi: alil izotiocijanat (AITC) u sjemenkama smeđe gorušice nakon svih tehnika izolacije; but-3-enil-izotiocijanat i AITC u sjemenkama crne gorušice nakon Clevenger hidrodestilacije, te 4,5-epitiopentanonitril i 3,4-epitiobutanonitril nakon MAD i MHG ekstrakcije; benzil-izotiocijanat (BITC) u sjemenkama visokog dragoljuba.
- Gastrointestinalna stabilnost glukozinolata i izotiocijanata (u smjesi spojeva i pojedinačno) veća je nakon želučane faze u odnosu na crijevnu fazu nakon obje metode simuliranog modela probave.
- Aromatski glukozinolati (glukosinalbin i glukotropeolin) iz bijele gorušice i visokog dragoljuba pokazuju visoku stabilnost nakon *in vitro* metode probave s ljudskim probavnim enzimima.
- Generalno, glavni glukozinolati u gorušicama pokazuju veću stabilnost nakon *in vitro* metode probave s ljudskim probavnim enzimima u odnosu na *in vitro* metodu probave s komercijalnim probavnim enzimima.
- MHG ekstrakt smeđe i crne gorušice pokazao je umjeren stupanj antiproliferativne aktivnosti na staničnu liniju karcinoma dojke (MDA-MB-231).
- MHG ekstrakt crne gorušice pokazao je bolju antiproliferativnu aktivnost na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura (TCCSUP) u odnosu na eterična ulja nakon Clevenger hidrodestilacije i MAD destilacije.

- Hlapljivi izolati smeđe gorušice pokazali su slabu antiproliferativnu aktivnost na staničnu liniju karcinoma mokraćnog mjehura (TCCSUP).
- Eterično ulje (MAD) visokog dragoljuba pokazalo je visok stupanj antiproliferativne aktivnosti na sve testirane stanične linije (MDA-MB-231, TCCSUP, HeLa, HCT116 i U2OS), a koji se pripisuje prisutnosti benzil-izotiocijanata.
- Eterično ulje (MAD) i ekstrakt (MHG) visokog dragoljuba pokazali su proapoptotsku aktivnost na MDA-MB-231 staničnoj liniji raka dojke i TCCSUP staničnoj liniji raka mokraćnog mjehura.
- Optička i AFM analiza tretiranih stanica TCCSUP stanične linije raka mokraćnog mjehura potvrdila je visok stupanj antiproliferativnog mehanizma eteričnog ulja visokog dragoljuba (tvorba mjehurića na membrani, skupljanje stanica).
- Glukozinolati sinigrin, glukonapin i glukotropeolin ne pokazuju hipoglikemijsku aktivnost (inhibicija  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze).
- Čisti spoj benzil-izotiocijanat i eterično ulje visokog dragoljuba pokazali su snažno antimikrobno i antiadhezijsko djelovanje na bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*.
- Prinos ulja sjemenki gorušica bio je veći nakon Soxhlet ekstrakcije u odnosu na SC-CO<sub>2</sub> ekstrakciju.
- Crna gorušica pokazala je najveći prinos ulja u sjemenkama u odnosu na druge vrste gorušice.
- Prinos ulja sjemenki visokog i niskog dragoljuba niži je od prinosa ulja sjemenki gorušica nakon Soxhlet ekstrakcije.
- Glavne masne kiseline u sjemenkama gorušice bile su: erukinska i oleinska kiselina nakon obje tehnike ekstrakcije.
- Ulja sjemenki visokog i niskog dragoljuba sadrži veću koncentraciju erukinske kiseline u odnosu na ulje sjemenki gorušica.

## **7. LITERATURA**

- Abdul-Fadl, M. M., El-Badry, N., Ammar, M. S. (2011) Nutritional and Chemical Evaluation for Two Different Varieties of Mustard Seeds. *World App. Sci. J.* **15**, 1225-1233.
- Abellán, Á., Domínguez-Perles, R., García-Viguera, C., Moreno D. A. (2021) Evidence on the bioaccessibility of glucosinolates and breakdown products of cruciferous sprouts by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11046. <https://doi.org/10.3390/ijms222011046>
- Acharya, S. (2014) <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2014/09/bijelagorusica-10.jpg> Pristupljeno 14. 1. 2022.
- Afoakwa, A.N., Owusu, J., Adomako, C., Teye E. (2012) Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global Journal of Biological Sciences and Biotechnology*, **1**, 132-140.
- Agerbirk, N., Warwick, S.I., Hansen, P.R., Olsen, C.E. (2008) *Sinapis* phylogeny and evolution of glucosinolates and specific nitrile degrading enzymes. *Phytochem.* **69**, 2937-2949. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.08.014>
- Ailane, L., Bennadja, S., Ounaissia, K., Ati, S., Aouadi, G. (2019) Anatomical study of garden Nasturtium (*Tropaeolum Majus* L.) growing under the climatic conditions of annaba (Eastern Algeria). *IJIAAR.* **3**, 256-266. <https://doi.org/10.29329/ijjaar.2019.194.11>
- Al-dobouni, I. A., Fadhil, A. B., Saeed, I. K. (2016) Optimized alkali-catalyzed transesterification of wild mustard (*Brassica juncea* L.) seed oil. Energy sources, part A: recovery, utilization, and environmental effects. **38**, 2319-2325. <https://doi.org/10.1080/15567036.2014.1002952>
- Al-Gendy, A.A., Nematallah, K.A., Zaghloul, S.S., Ayoub, N.A. (2016) Glucosinolates profile, volatile constituents, antimicrobial, and cytotoxic activities of *Lobularia libyca*. *Pharm. Biol.* **54**, 3257-3263. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1223146>
- Almaas, H., Cases, A.L., Devold, T.G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., Aadnoey, T., Vegarud, G.E. (2006) *In vitro* digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *Int. Dairy J.* **16**, 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.029>

- Aloh, G. S., Obeagu, Ifeanyi, E., Emeka, O. C., Okpara, Ezechukwu, K., Chioma, O., Uzoma, O. G. (2015) Extraction and partial characterization of mustard seed (*Brassica spp.*) oil. *World J. Pharm. Res.* **4**, 177-195.
- Al-Snafi A.E. (2015) The pharmacological importance of *Brassica nigra* and *Brassica rapa* grown in Iraq. *J. Pharm. Biol.* **5**, 240–253.
- Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.-H. (2017) Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 295-315.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- Anand, P., Murali, K.Y., Tandon, V., Chandra, R., Murthy P.S. (2007) Preliminary studies on antihyperglycemic effect of aqueous extract of *Brassica nigra* (L.) Koch in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol.* **45**, 696-701.
- Andreasson, E., Jorgensen, L. B, Hoglund, A-S., Rask, L., Meijer, J. (2001) Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiol.* **127**, 1750-1763.  
<https://doi.org/10.1104/pp.010334>
- Antova, G.A., Angelova–Romova, M.I., Petkova, Zh.Y., Teneva, O.T., Marcheva, M.P. (2017) Lipid composition of mustard seed oils (*Sinapis alba* L.). *Bulg. Chem. Commun.* **49**, 55 –60.
- Assefa, A.D., Jeong, Y.J., Kim, D.J., Jeon, Y.A., Lee, J.R., Ko, H.C., Baek, H.J., Sung, J.S. (2018) Assessing phenolic content and antioxidant potential diversity in *Allium* plants using multivariate data analysis. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **59**, 759–773.  
<https://doi.org/10.1007/s13580-018-0081-4>
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelfa, A., Zhu, Z., Koubaa, M. (2016) „Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: Impact of processing“, *Front. Nutr.* **3**, 1-12.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00024>
- Basha, S. C., Babu, K. R., Madhu, M., Gopinath, C. (2017) *In vitro* antidiabetic activity of sulforaphane. *PTB Reports*, **3**, 47-49.  
[doi:10.5530/PTB.2017.3.9](https://doi.org/10.5530/PTB.2017.3.9)

- Bassan, P., Bhushan, S., Kaur, T., Arora, R., Arora, S., Vig, A.P. (2018) Extraction, profiling and bioactivity analysis of volatile glucosinolates present in oil extract of *Brassica juncea* var. *raya*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **24**, 399–409.  
<https://doi.org/10.1007/s12298-018-0509-4>
- Bazyłko, A., Granica, S., Filippek, A., Piwowarski, J., Stefanska, J., Osinska, E., Kiss, A. (2013) Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. *Ind. Crops Prod.* **50**, 88-94.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.003>
- BD Pharmingen Technical Data Sheet <https://www.bdj.co.jp> > pdf, Pristupljeno 22.02.2022.
- Benyelles, B., Allali, H., Fekih, N., Touaibia, M., Muselli, A., Djabou, N., El Amine Dib, M., Tabti B., Costa, J. (2015) Chemical composition of the volatile components of *Tropaeolum majus* L. (Garden Nasturtium) from North Western Algeria. *PCBS J.* **9**, 92-97.
- Blažević, I. Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae / doktorska disertacija. Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Rollin, P. Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential. s.l. : Springer International Publishing Switzerland, 2012.
- Blažević, I., Maleš, T., Ruščić, M., (2014) Glucosinolates of *Lunaria annua*: Thermal, enzymatic, and chemical degradation. *Chem. Nat. Compd.* **49**, 1154–1157.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-014-0847-6>
- Blažević, I., Đulović, A., Maravić, A., Čikeš Čulić, V., Montaut, S., Rollin, P. (2019) Antimicrobial and cytotoxic activities of *Lepidium latifolium* L.; hydrodistillate, extract and its major sulfur volatile allyl isothiocyanate. *Chem. Biodivers.* **16**, 1–11.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201800661>
- Blažević, I., Đulović, A., Burčul, F., Popović, M., Montaut, S., Bilušić, T., Vrca, I., Markić, J., Ljubenković, I., Ruščić, M., Rollin, P. (2020a) Stability and bioaccessibility during *ex vivo* digestion of glucoraphenin and glucoraphasatin from *Matthiola incana* L. *J. Food Compos. Anal.* **90**, 103483, 1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103483>

- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C.E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N. (2020b) Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, **169**, 112100.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 32-47.
- Bloem, E., Berk, A., Haneklaus, S., Selmar, D., Schnug, E. (2008) Influence of *Tropaeolum majus* supplements on growth and antimicrobial capacity of glucotropaeolin in piglets. *Agriculture and Forestry Research*, **3**, 203-210.
- Bo, P., Lien, J. C., Chen, Y. Y., Yu, F. S., Lu, H. F., Yu, C. S., Chou, Y.C., Yu, C. C., Chung, J. G. (2016) Allyl isothiocyanate induces cell toxicity by multiple pathways in human breast cancer cells. *Am. J. Chin. Med.* **44**, 415–437.  
<https://doi.org/10.1142/S0192415X16500245>
- Bones, A.M., Rossiter, J.T. (2006) The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochem.* **67**, 1053–1067.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.024>
- Boscaro, V., Boffa, L., Binello, A., Amisano, G., Fornasero, S., Cravotto, G., Gallicchio, M. (2018) Antiproliferative, proapoptotic, antioxidant and antimicrobial effects of *Sinapis nigra* L. and *Sinapis alba* L. extracts. *Molecules*, **23**, 3004.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23113004>
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020) Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, **25**, 1340.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assuncao, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carriere, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Recio, I. (2019) INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc.* **14**, 991-1014.  
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

- Caesar, L.K., Cech, N.B. (2019) Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat. Prod. Rep.* **36**, 869-888.  
<https://doi.org/10.1039/C9NP00011A>
- Capolino, P., Guerin, C., Paume, J., Giallo, J., Ballester, J.M., Cavalier, J.F., Carriere, F. (2011) *In vitro* gastrointestinal lipolysis: replacement of human digestive lipases by a combination of rabbit gastric and porcine pancreatic extracts. *Food Dig.* **2**, 43–51.  
<https://doi.org/10.1007/s13228-011-0014-5>
- Cardinal-McTeague, W.M., Sytsma, K.J., Hall, J.C. (2016) Biogeography and diversification of Brassicales: A 103 million year tale. *Mol. Phylogenet. Evol.* **99**, 204–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.021>
- Carlson, K.D., Kleiman, R. (1993) Chemical survey and erucic acid content of commercial varieties of nasturtium, *Tropaeolum majus* L. *JAOCs*, **70**, 1145-1148.  
<http://doi.org/10.1007/BF02632157>
- Cartea, E., De Haro-Bailón, A., Padilla, G., Obregón-Cano, S., Rio-Celestino del, M., Ordás, A. (2019) Seed Oil Quality of Brassica napus and Brassica rapa Germplasm from Northwestern Spain. *Foods*, **8**, 292.  
<https://doi.org/10.3390/foods8080292>
- Cartea, M.E., Velasco, P. (2008) Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem. Rev.* **7**, 213–229.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11101-007-9072-2>
- Cascione, M., de Matteis, V., Rinaldi, R., Leporatti, S. (2016) Atomic force microscopy combined with optical microscopy for cells investigation. *Microsc. Res. Tech.* **80**, 109–123.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.22696>
- Chauhan, A., Goyal, M.K., Chauhan, P. (2014) GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **5**, 1-6.  
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9872.1000222>
- Chemat, F., Cravotto, G., Vian, M. (2012) Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8615-8627.  
<https://doi.org/10.3390/ijms13078615>



- Chemat, F., Vian, M.A., Ravi, H.K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., Fabiano Tixier, A.-S. (2019) Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, **24**, 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Cheng, D.L., Hashimoto, K., Uda, Y., (2004) *In vitro* digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of Bifidobacterium and identification of the digestive products. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.09.008>
- Cho, H.J., Lim, D.Y., Kwon, G.T., Kim, J.H., Huang, Z., Song, H., Oh, Y.S., Kang, Y.H., Lee, K.W., Dong, Z., Park, J.H.Y. (2016) Benzyl isothiocyanate inhibits prostate cancer development in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model, which is associated with the induction of cell cycle G1 arrest. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 264. <https://doi.org/10.3390/ijms17020264>
- Cindrić, M., Marković, A., Horvatić, A. (2009) Sprengute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora*, **3**, 218-232.
- Conde-Rioll, M., Gajate, C., Fernandez, J.J., Villa-Pulgarin, J.A., Napolitano, J.G., Norte, M., Mollinedo, F. (2018) Antitumor activity of *Lepidium latifolium* and identification of the epithionitrile 1-cyano-2,3-epithiopropene as its major active component. *Mol. Carcinog.* **57**, 347–360. <https://doi.org/10.1002/mc.22759>
- Cravotto, G., Binello, A., Orio, L. (2011) Green extraction techniques for high-quality natural products. *Agro Food Ind. Hi Tec.* **22**, 57-59.
- Cuomo, V., Luciano, F.B., Meca, G., Ritieni A., Manes, J. (2015) Bioaccessibility of glucoraphanin from broccoli using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. *CyTA-J. Food*, **13**, 361-365. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.984337>
- Deng, X., Xiong, F., Li, X., Xiang, B., Li, Z., Wu, X., Guo, C., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Zeng, Z. (2018). Application of atomic force microscopy in cancer research. *J. Nanobiotechnol.* **16**, 102. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0428-0>

- Dias, C., Aires, A., Saavedra, M.J. (2014) Antimicrobial activity of isothiocyanates from cruciferous plants against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J Mol. Sci.* **15**, 19552-19561.  
<https://doi.org/10.3390/ijms151119552>
- Díaz-Núñez, J.L., García-Contreras, R., Castillo-Juárez, I. (2021) The new antibacterial properties of the plants: Quo vadis studies of anti-virulence phytochemicals?. *Front. Microbiol.* **12**, 667126.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.667126>
- Dinh, T.N., Parat, M.-O., Ong, Y.S., Khaw, K.Y. (2021) Anticancer activities of dietary benzyl isothiocyanate: A comprehensive review. *Pharmacol. Res.* **169**, 105666.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105666>
- Dinkova-Kostova, A.T., Kostov, R.V. (2012) Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol. Med.* **18**, 337–347  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.003>
- Drozdowska, M., Leszczyńska, T., Koronowicz, A., Piasna-Słupecka, E., Domagała D., Kusznierevic, B. (2020) Young shoots of red cabbage are a better source of selected nutrients and glucosinolates in comparison to the vegetable at full maturity. *Eur. Food Res. Technol.* **246**, 2505–2515.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-020-03593-x>
- Dufour, V., Stahl, M., Baysse, C. (2015) The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology*, **161**, 229–243.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.082362-0>
- EFSA/ECDC. 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* **276**:5926.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Eisenschmidt-Bönn, D., Schneegans, N., Backenköhler, A., Wittstock, U., Brandt, W. (2019) Structural diversification during glucosinolate breakdown: mechanisms of thiocyanate, epithionitrile and simple nitrile formation. *Plant J.* **99**, 329–343.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.14327>
- Ekanayake, A., Strife, R.J., Zehentbauer, G.N., David, J.R.D. Chapter 98 - Yellow or White Mustard (*Sinapis alba* L.) Oils. In: Preedy V., editor. *Essential Oils in Food*

- Preservation, Flavor and Safety. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2016. pp. 857–863. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00098-5>
- Elfoul, L., Rabot, S., Khelifa, N., Quinsac, A., Duguay, A., Rimbault, A. (2001) Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 99–103.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00093-3)
  - Ensminger, A.H., Esminger, M.E., Kondale J.E., Robson, J.R.K. (1986) “Food for Health: A Nutrition Encyclopedia,” Pegus Press, Inc., California.
  - Eriksen, E.K., Holm, H., Jensen, E., Aaboe, R., Devold, T.G., Jacobsen, M., Vegarud, G.E. (2010) Different digestion of caprine whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes. *British J. Nutr.* **104**, 374–381.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114510000577>
  - Eschliman, K., Bossmann, S.H. (2019) Synthesis of isothiocyanates: An update. *Synthesis*, **51**, 1746–1752.  
doi: 10.1055/s-0037-1612303
  - Fay, M.F., Christenhusz, M.J.M. (2010) Brassicales – an order of plants characterised by shared chemistry. *Curtis’s Bot. Mag.* **27**, 165–196.  
<https://doi.org/10.1111/j.1467-8748.2010.01695.x>
  - Fawole, O. A., Opara, U. L. (2016) Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to *in vitro* digestion. *BMC Complement. Altern. Med.* 16:358. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1343-2>
  - Fernandez Leon, A.M., Fernandez Leon, M.F., Gonzalez-Gomez, D., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J. (2017) Quantification and bioaccessibility of intact glucosinolates in broccoli „Parthenon“ and Savoy cabbage „Dama“. *J. Food Compos. Anal.* **61**, 40-46.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.010>
  - Foltz, E., Azad, S., Everett, M.L., Holzknicht, Z.E., Sanders, N.L., Thompson, J.W., Dubois, L.G., Parker, W., Keshavjee, S., Palmer, S.M., Davis, R.D., Lin, S.S. (2015): An assessment of human gastric fluid composition as a function of PPI usage. *Physiol Rep.* **3**, 1-13.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.12269>

- Frandsen, H.B., Sørensen, J.C., Jensen, S.K., Markedal, K.E., Joehnke, M.S., Maribo, H., Sørensen, S., Sørensen, H., (2019) Non-enzymatic transformations of dietary 2-hydroxyalkenyl and aromatic glucosinolates in the stomach of monogastrics. *Food Chem.* **291**, 77-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.136>
- Fredotović, Ž., Soldo, B., Šprung, M., Marijanović, Z., Jerković, I., Puizina, J. (2020) Comparison of organosulfur and amino acid composition between triploid onion *Allium cornutum* clementi ex visiani, 1842, and common onion *Allium cepa* L., and evidences for antiproliferative activity of their extracts. *Plants*, **9**, 98.  
<https://doi.org/10.3390/plants9010098>
- Furlund, C.B., Kristoffersen, A.B., Devold, T.G., Vegarud, G.E., Jonassen, C.M. (2012) Bovine lactoferrin digested with human gastrointestinal enzymes inhibits replication of human echovirus 5 in cell culture. *Nutr. Res.* **32**, 503–513.  
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.06.006>
- Garzon, G.A., Wrolstad, R.E. (2009) Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chem.* **114**, 44-49.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.013>
- Generalić, Eni. "Soxhlet extractor." Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary. 29 June 2022. KTF-Split. 29 Sep. 2022. <https://glossary.periodni.com>  
Pristupljeno: 17.1.2022.
- Gomez, C.C.E., Carreno, A.A., Ishiwara, D.G.P., Martínez, E.S.M., López, J.M., Hernandez, N.P., Gómez García, M.C. (2016) *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk essential oil induces apoptosis of the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 266.  
<https://doi.org/10.1186/s12906-016-1136-7>
- Guiné, R., Lima, M.J., Barroca, M.J. (2016) Role and health benefits of different functional food components. *Millenium - Journal of Education, Technologies, and Health*, **37**. Retrieved from <https://revistas.rcaap.pt/millenium/article/view/8268>
- Halkier, B.A., Gershenzon, J. (2006) Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 303-333.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>

- Hanschen, F.S., Klopsch, R., Oliviero, T., Schreiner, M., Verkerk, R., Dekker, M. (2017) Optimizing isothiocyanate formation during enzymatic glucosinolate breakdown by adjusting pH value, temperature and dilution in Brassica vegetables and *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **7**, 40807.  
<https://doi.org/10.1038/srep40807>
- Hendrick, V., Ribeiro de Sousa, D., dosSantosPedregal, A.D.S, Bassens, C., Rigaux, P., Sato, K., Kotarsky, K., Werenne J. (2006) Expression of recombinant protein in CHO and HeLa cells and its follow-up using EGF reporter gene. U: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ijima, S. iNishijima K.I, ured.), Springer, Nizozemska, 55-59.
- Herr, I., Buchler, M.W. (2010) Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat Rev.* **36**, 377–383.  
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.01.002>
- Herzallah, S., Holley, R. (2012) Determination of sinigrin, sinalbin, allyl- and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. *LWT Food Sci. Technol.* **47**, 293–299.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.022>
- Holley, R.A., Phipps-Todd, B.E., Yiu, S.H. (1983) Infection of oriental mustard by *Nematospora*: A fluorescence infection of oriental mustard by *Nematospora*: A fluorescence and scanning electron microscope study and scanning electron microscope study, *Food Struct.* **2**, 143-151.
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 14. 1. 2022. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34206>>.
- <http://www.aviscerabioscience.net/Annexin-V-Apoptosis-Assay-p/sk00482-06.htm>, Pristupljeno 22.02.2022.
- <https://i.pinimg.com/originals/e7/7a/8a/e77a8a300c808241ba5eb5387f3faec3.jpg>, Pristupljeno 29.05.2020.
- <https://farmashop.hr/wp-content/uploads/2017/12/smeda-gorusica.jpg>. Pristupljeno 14. 1. 2022.
- [https://cdn.biogreen.net/4726724/i\\_semi\\_di\\_senape\\_nella\\_preparazione\\_di\\_salse\\_e\\_condimenti\\_gustosi\\_3.jpg.webp](https://cdn.biogreen.net/4726724/i_semi_di_senape_nella_preparazione_di_salse_e_condimenti_gustosi_3.jpg.webp). Pristupljeno 14. 1. 2022.

- <https://diabetesatlas.org/>, Pristupljeno 24.05.2022.
- [https://nuve.com.tr/uploads/product/image/1700x557/ec16032.jpg?\\_=107b4bc616c9d41d890a293acc606c40](https://nuve.com.tr/uploads/product/image/1700x557/ec16032.jpg?_=107b4bc616c9d41d890a293acc606c40) Pristupljeno: 09.2.2022.
- Huong, L.D., Shim, J.-H., Choi, K.-H., Shin, J.-A., Choi, E.-S., Kim, H.-S., Lee, S.-J., Kim, S.-J., Cho, N.-P., Cho, S.-D. (2011) Effect of  $\beta$ -Phenylethyl isothiocyanate from cruciferous vegetables on growth inhibition and apoptosis of cervical cancer cells through the induction of death receptors 4 and 5. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 8124-8131. <https://doi.org/10.1021/jf2006358>
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., McClements, D.J. (2011) *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem.* **125**, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>
- HZJZ (Hrvatski zavod za javno zdravstvo) (2018) Stanovništvo i vitalni događaji. U: *Hrvatski zdravstveno statistički ljetopis za 2017. godinu*, Stevanović, R., Capak, K (ur.) Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Zagreb, Hrvatska, str. 9-17.
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y. (2014) „Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables“, *Breed. Sci.* **64**, 48–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>
- Jahangir, M., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R (2009) Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **8**, 31–43. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00065.x>
- Jakubczyk, K., Janda, K., Watychowicz, K., Lukasiak, J., Wolska, J. (2018) Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, **69**, 119-126.
- Jang, M., Hong, E., Kim, G.-H. (2010) Evaluation of antibacterial activity of 3-butenyl, 4-pentenyl, 2-phenylethyl, benzyl isothiocyanate in *Brassica* vegetables. *J. Food Sci.* **75**, 412-416. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01725.x>
- Jham, G. N., Moser, B. R., Shah, S. N., Holser, R. A., Dhingra, O. D., Vaughn, S. F., Berhow, M. A., Winkler-Moser, J. K., Isbell, T. A., Holloway, R. K., Walter, E. L., Natalino, R., Anderson, J. C., Stelly, D. M. (2009) Wild Brazilian mustard (*Brassica*

- juncea* L.) seed oil methyl esters as biodiesel fuel. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **86**, 917–926.  
<https://doi.org/10.1007/s11746-009-1431-2>
- Johnson, I.T. (2002a) Glucosinolates: Bioavailability and importance to health. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **72**, 26–31.  
<https://doi.org/10.1024/0300-9831.72.1.26>
  - Johnson, I.T. (2002b) Glucosinolates in the human diet. Bioavailability and implications for health. *Phytochem. Rev.* **1**, 183–188.  
<https://doi.org/10.1023/A:1022507300374>
  - Jokić, S. (2019) Od industrijskog otpada do vrijednih bioaktivnih komponenti. OSVRTI, *Kem. Ind.* **68**, 350–354.
  - Jokić, S., Horvat G., Aladić K. (2015) Design of SFE system using a holistic approach - problems and challenges, in: J., Lindy, (Ed.), *Supercritical Fluid Extraction: Technology, Applications and Limitations*, Nova Science Publishers Inc., New York, 95-122.
  - Jurca, T., Baldea, I., Filip, G.A., Olteanu, D., Clichici, S., Pallag, A., Vicas, L., Marian, E., Micle, O., Muresan, M. (2018) The effect of *Tropaeolum majus* L. on bacterial infections and *in vitro* efficacy on apoptosis and DNA lesions in hyperosmotic stress. *J. Physiol. Pharmacol.* **69**, 391-401.  
<https://doi.org/10.26402/jpp.2018.3.06>
  - Kala, C., Ali, S.S., Ahmad, N., Gilani, S.J., Khan, N.A. (2018) Isothiocyanates: A Review. *Res. J. Pharmacogn.* **5**, 71-89.  
doi: 10.22127/rjp.2018.58511
  - Kaiser, S.J., Mutters, N.T., Blessing, B., Günther, F. (2017) Natural isothiocyanates express antimicrobial activity against developing and mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia*, **119**, 57-63.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.04.006>
  - Kawakishi, S., Kaneko, T. (1987) Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 85–88.  
<https://doi.org/10.1021/jf00073a020>
  - Khatiwada, B., Kunwar, S., Dhakal, A., Joshi, A., Miya A.R., Subedi, P. (2018) Total phenolic content, antioxidant activity, alpha-amylase inhibitory activity and

- antibacterial activity of radish seed and rapeseed. *European J. Biotechnol. Biosci.* **6**, 21-25.
- Khaw, K.Y., Parat, M.O., Shaw, P.N., Falconer J.R. (2017) Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules*, **22**, 1186.  
<https://doi.org/10.3390/molecules22071186>
  - Kim, G.-C., Kim, J.-S., Kim, G.-M., Choi, S.-Y. (2017) Anti-adipogenic effects of *Tropaeolum majus* (nasturtium) ethanol extract on 3T3-L1 cells. *Food Nutr. Res.* **61**, 1-8.  
<https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1339555>
  - Kim, K. S., Cho, C. H., Park, E. K., Jung, M.-H., Yoon, K.-S., Park, H.-K. (2012) AFM-Detected apoptotic changes in morphology and biophysical property caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa cells. *PLoS ONE*, **7**, e30066.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030066>
  - Kissen, R., Bones, A.M. (2009) Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **284**, 12057-12070.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807500200>
  - Kissen, R., Rossiter, J.T., Bones, A.M. (2009) The ‘Mustard oil bomb’: Not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochem. Rev.* **8**, 69–86.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-008-9109-1>
  - Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Smole Možina, S. (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. Microbiol. Methods*, **81**, 121-126.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
  - Kleinwächter, M., Schnug, E., Selmar D. (2008) The glucosinolate – myrosinase system in nasturtium (*Tropaeolum majus* L.): Variability of biochemical parameters and screening for clones feasible for pharmaceutical utilization. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11165–11170.  
<https://doi.org/10.1021/jf802053n>



- Ko, M.-O., Kim, M.-B., Lim S-B. (2016) Relationship between chemical structure and antimicrobial activities of isothiocyanates from cruciferous vegetables against oral pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 2036-2042.  
<https://doi.org/10.4014/jmb.1606.06008>
- Koroleva, O.A., Davies, A., Deeken, R., Thorpe, M.R., Tomos, A.D., Hedrich, R (2000) Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiol.* **124**, 599–608.  
<https://doi.org/10.1104/pp.124.2.599>
- Krul, C., Humblot, C., Philippe, C., Vermeulen, M., van Nuenen, M., Havenaar, R., Rabot, S. (2002) Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic *in vitro* large-intestinal model. *Carcinogenesis*, **23**, 1009–1016.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/23.6.1009>
- Kuljarachanan, T., Fu, N., Chiewchan, N., Devahastin, S., Chen, X. D. (2021) *In vitro* digestion using dynamic rat stomach-duodenum model as an alternative means to assess bioaccessibility of glucosinolates in dietary fiber powder from cabbage. *LWT*, **151**, 112243.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112243>
- Kumar, G., Tuli, H.S., Mittal, S., Shandilya JK, Tiwari A, Sandhu SS. (2015) Isothiocyanates: a class of bioactive metabolites with chemopreventive potential. *Tumor Biol.* **36**, 4005-4016. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3391-5>
- Kuscu, A., Eroglu, S. (2015) Applications of green extraction of phytochemicals from fruit and vegetables. ISITES Valencia-Spain, 2145-2151.
- Lazzeri, L., Malaguti, L., Bagatta, M., D'Avino, L., Ugolini, L., De Nicola, G., Casadei, N., Cinti, S., Matteo, R., & Iori, R. (2013) Characterization of the main glucosinolate content and fatty acid composition in non-food *Brassicaceae* seeds. *Acta hortic.* **1005**, 331-338.  
[doi:10.17660/ActaHortic.2013.1005.38](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1005.38)
- Li, P., Zhao, Y., Wang, C., & Zhu, H. (2020) Antibacterial activity and main action pathway of benzyl isothiocyanate extracted from papaya seeds. *J. Food Sci.* **86**, 169-176. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15539>

- Li, M., Xi, N., Wang, Y., Liu, L. (2019) Advances in atomic force microscopy for single-cell analysis. *Nano Res.* **12**, 703–718.  
<https://doi.org/10.1007/s12274-018-2260-0>
- Lietzow, J. (2021) Biologically active compounds in mustard seeds: A toxicological perspective. *Foods*, **10**, 2089.  
<https://doi.org/10.3390/foods10092089>
- Lykkesfeldt, J., Møller, B. L. (1993) Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus*. *Plant Physiol.* **102**, 609-613.  
<https://doi.org/10.1104/pp.102.2.609>
- Lysak, M.A. (2018) Brassicales: an update on chromosomal evolution and ancient polyploidy. *Plant Syst. Evol.* **304**, 757–762.  
<https://doi.org/10.1007/s00606-018-1507-2>
- Luterotti, S. Uvod u kemijsku analizu, 3. izdanje. Zagreb, Hrvatska: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2009.
- Ma, L., Chen, Y., Han, R., & Wang, S. (2019) Benzyl isothiocyanate inhibits invasion and induces apoptosis via reducing S100A4 expression and increases PUMA expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 52(4), e8409.  
<https://doi.org/10.1590/1414-431X20198409>
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P., Sharma, P.K. (2010) High performance liquid chromatography: a short review. *J. Glob. Pharma Technol.* **2**, 22-26.
- Matusheski, N.V., Juvik, J.A., Jeffery, E.H. (2004) Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochem.* **65**, 1273–1281. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.013>
- Mazumder, A., Dwivedi, A., Plessis du, J. (2016) Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules*, **21**, 416.  
<https://doi.org/10.3390/molecules21040416>
- Mejia-Garibay, B., Palou, E., Lopez-Malo, A. (2015) Composition, diffusion, and antifungal activity of black mustard (*Brassica nigra*) essential oil when applied by direct addition or vapor phase contact. *J. Food Prot.* **78**, 843–848.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-485>

- Michaelsen, S., Otte, J., Simonsen, L.-O., Sørensen, A. (1994) Absorption and degradation of individual intact glucosinolates in the digestive tract of rodents. *Acta. Agric. Scand. Sect. A. Animal. Sci.* **44**, 25–37.  
<https://doi.org/10.1080/09064709409410178>
- Mohamadi, M., Shamspur, T., Mostafavi, A. (2013) Comparison of microwave-assisted distillation and conventional hydrodistillation in the essential oil extraction of flowers *Rosa damascena* Mill. *J. Essent. Oil Res.* **25**, 55-61.  
<https://doi.org/10.1080/10412905.2012.751555>.
- Mohammed, A., Abdullah, A. (2019) Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics – HERVEX.
- Montaut, S., Read, S., Blažević, I., Nuzillard, J.M., Roje, M., Harakat, D., Rollin, P. (2020) Investigation of the glucosinolates in *Hesperis matronalis* L. and *Hesperis laciniata* All.: Unveiling 4'-O- $\beta$ -D-apiofuranosylglucomatronalin. *Carbohydr. Res.* 488, 107898.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107898>
- Moradi, S., Fazlali, A., Hamed, H. (2018) Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: comparison with traditional distillation. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **10**, 22–28.
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R., Palmieri, S. (1996) *In vitro* cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1014-1021.  
<https://doi.org/10.1021/jf9503523>
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R., Palmieri, S. (2000) *In vitro* antiproliferative activity of isothiocyanates and nitriles generated by myrosinase-mediated hydrolysis of glucosinolates from seeds of cruciferous vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3572-3575.  
<https://doi.org/10.1021/jf000191p>
- Nawaz, H., Shad, M. A., Muzaffar, S., 2018, 'Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of Brassica', in M. A. El-Esawi (ed.), *Brassica Germplasm - Characterization, Breeding and Utilization*, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.76120.

- Nayak, P.K., Dash, U., Rayaguru, K. (2016) Quality assessment of mustard oil in deep fat frying. *Asian J. Dairy Food Res.* **35**, 168-171.  
doi:10.18805/ajdfr.v0iof.9620
- Niforou, K.M., Anagnostopoulos, A.K., Vougas, K., Kittas, C., Gorgoulis, V.G., Tsangaris, G.T. (2008) The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. *Cancer Genomics Proteomics*, **5**, 63-78.
- Niizu, P.Y., Rodriguez-Amaya, D.B. (2005) Flowers and leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein. *J. Food Sci.* **70**, 605-609.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb08336.x>
- Okunade, O.A., Ghawi, S.K., Methven, L., Niranjana, K. (2015) Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. W.D.J. Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. *maire*) seeds. *Food Chem.* **7**, 485-490.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.054>
- Oliviero, T., Verkerk, R., Dekker, M. (2018) Isothiocyanates from Brassica vegetables – effects of processing, cooking, mastication, and digestion. *Mol. Nutr. Food Res.* **62**, 1-11.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201701069>
- Paunović, D., Šolević-Knudsen, T., Krivokapić, M., Zlatković, B., Antić, M. (2012) Sinalbin degradation products in mild yellow mustard paste. *Hemijska industrija*, **66**, 29-32.  
<https://doi.org/10.2298/HEMIND110627055P>
- Perić, R., Karastojković, Z., Kovačević, Z., Gusković, D. (2015) Skenirajuća elektronska mikroskopija legure zlata Au585Ag90Cu264Zn61 za proizvodnju nakita. *Zaštita materijala*, **56**, 373 – 377.
- Pintao, A.M., Pais, M.S.M., Coley, H., Kelland, L.R., Judson, I.R. (1995) *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of benzyl isothiocyanate: A natural product from *Tropaeolum majus*. *Planta Med.* **61**, 233-236.  
doi: 10.1055/s-2006-958062
- Ponnusamy, S., Ravindran, R., Zinjarde, S., Bhargava, S., Ravi Kumar, A. (2011) Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic

- amylase inhibitory effect *in vitro*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2011**, 515647.  
<https://doi.org/10.1155/2011/515647>
- Popova, I.E., Morra, M.J. (2014) Simultaneous quantification of sinigrin, sinalbin, and anionic glucosinolate hydrolysis products in *Brassica juncea* and *Sinapis alba* seed extracts using ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 10687 – 10693.  
<https://doi.org/10.1021/jf503755m>
  - Prieto, M.A., Jimenez López, C., Simal-Gandara, J. (2019) Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Adv. Food Nutr. Res.* **90**, 305–350.  
<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.008>
  - Puangkam, K., Muanghorm, W., Konsue, N. (2017) Stability of bioactive compounds and antioxidant activity of Thai cruciferous vegetables during *in vitro* digestion. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **5**, 100-108.  
<http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.2.06>
  - Radünz, M., Camargo, T.M. dos Santos Hackbart, H.C., Blank, J.P., Hoffmann, J.F., Stefanello, F.M., da Rosa Zavareze, E. (2021) Encapsulation of broccoli extract by electrospraying: Influence of *in vitro* simulated digestion on phenolic and glucosinolate contents, and on antioxidant and antihyperglycemic activities. *Food Chem.* **339**, 128075.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128075>
  - Ramić, D., Bucar, F., Kunej, U., Dogša, I., Klančnik, A., Smole Možina, S. (2021) Antibiofilm potential of *Lavandula* preparations against *Campylobacter jejuni*. *App. Environ. Microbiol.* **87**:e01099-21.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01099-21>
  - Rodriguez-Hernandez, M.C., Medina, S., Gil-Izquierdo, A., Martinez-Ballesta, C., Moreno, D.A. (2013) Broccoli isothiocyanate content and *in vitro* availability according to variety and origin. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* **32**, 251–264.  
<http://dx.doi.org/10.20450/mjce.2013.354>
  - Romeo, L., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., Mazzon, E. (2018) Isothiocyanates: An overview of their antimicrobial activity against human infections. *Molecules*, **23**, 624.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23030624>

- Rungapamestry, V., Duncan, A.J., Fuller, Z., Ratcliffe, B. (2007) Effect of meal composition and cooking duration on the fate of sulforaphane following consumption of broccoli by healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* **97**, 644–652.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114507381403>
- Sapkale, G.N., Patil, S.N., Surwase, U.S., Bhatbhage, P.K. (2010) Supercritical fluid extraction. *Int. J. Chem. Sci.* **8**, 729-743.
- Sagan, A., Blicharz-Kania, A., Szmigielski, M., Andrejko, D., Sobczak, P., Zawislak, K., Starek, A. (2019) Assessment of the properties of rapeseed oil enriched with oils characterized by high content of  $\alpha$ -linolenic acid. *Sustainability*, **11**, 5638.  
<https://doi.org/10.3390/su11205638>
- Savio, A. L. V., da Silva G. N., Salvadori, D. M. F. (2015) Inhibition of bladder cancer cell proliferation by allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutat. Res.* **771**, 29–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.11.004>
- Sayeed, M.A., Bracci, M., Ciarapica, V., Malavolta, M., Provinciali, M., Pieragostini, E., Gaetani, S., Monaco, F., Lucarini, G., Rapisarda, V., Di Primio, R., Santarelli, L. (2018) Allyl isothiocyanate exhibits no anticancer activity in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 145.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19010145>
- Seal, C. E., Kranner, I., Pritchard, H. W. (2008) Quantification of seed oil from species with varying oil content using supercritical fluid extraction. *Phytochem. Anal.* **19**, 493-498 .
- Sharafi, Y., Majidi, M. M., Goli, S. A. H., Rashidi, F. (2015) Oil content and fatty acids composition in Brassica species. *Int. J. Food Prop.* **18**, 2145-2154.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2014.968284>
- Singh, S., Das, S.S., Singh, G., Perroti, M., Schuff, C., Catalán, C.A.N. (2017) Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial potentials of essential oils and oleoresins obtained from seeds of *Brassica juncea* and *Sinapis alba*. *MOJ Food Process. Technol.* **4**, 113–120.  
<https://doi.org/10.15406/mojfpt.2017.04.00100>
- Singh, S.V., Singh, K. (2012) Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*, **33**, 1833–1842.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgs216>

- Sinha, A., Sharma, H.P., Jain, P., Amit, P. (2014) Apoptosis (programmed cell death) - a review. *World J. Pharm. Res.* **3**, 1854-1872.
- Stamenković, O. S., Djalović, I. G., Kostić, M. D., Mitrović, P. M., Veljković, V. B. (2018) Optimization and kinetic modeling of oil extraction from white mustard (*Sinapis alba* L.) seeds. *Ind. Crops Prod.* **121**, 132-141.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.001>
- Stelter, K., Bloem, E., Berk, A., Danicke, S. (2014) Metabolism of glucotropaeolin from *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium) and the bioavailability of benzyl-isothiocyanates in growing pigs. *Adv. Biol. Chem.* **4**, 180-190.  
doi: 10.4236/abc.2014.42022
- Swarczewicz, M., Adaszynska, M., Wrzesinska, E., Komorowska A. (2013) Chemical composition of macerated plant parts of white mustard *Sinapis alba*. *Chem. Nat. Compd.* **49**, 557-558.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-013-0671-4>
- Šalić, J. (2010) <https://staravrtlarica.blogspot.com/2011/05/dragoljub.html>,  
Pristupljeno 14. 1. 2022.
- Šikić Pogačar, M., Klančnik, A., Bucar, F., Langerholc, T., Smole Možina, S. (2016) Anti-adhesion activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extract, thyme post-distillation waste, and olive (*Olea europea* L.) leaf extract against *Campylobacter jejuni* on polystyrene and intestine epithelial cells. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 2723–2730.  
<https://doi:10.1002/jsfa.7391>
- Telagari, M., Hullatti, K. (2015) *In-vitro*  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. and *Celosia argentea* Linn. extracts and fractions. *Indian J. Pharmacol.* **47**, 425–429.  
doi: 10.4103/0253-7613.161270
- Thirumalai, T., Therasa S.V., Elumalai, E.K., David, E. (2011) Hypoglycemic effect of *Brassica juncea* (seeds) on streptozotocin induced diabetic male albino rat. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **1**, 323–325.  
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60052-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60052-X)
- Thomas, J., Kuruvilla K.M., Hrideek, T.K., Mustard, Herbs and Spices, Edition: first, Chapter: 12. Mustard, Publisher: Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH, England, 2004.

- Todorovska-Rašić, M., Radulović, N. (2020) Organic thiocyanates - glucosinolate enzymatic degradation products or artefacts of the isolation procedure? *FU Phys. Chem. Tech.* **18**, 77-87.  
<https://doi.org/10.2298/FUPCT2002077T>
- Tran, H.T.T., Márton, M.R., Herz, C., Maul, R., Baldermann, S., Schreiner, M. Lamy, E. (2016) Nasturtium (Indian cress, *Tropaeolum majus nanum*) dually blocks the COX and LOX pathway in primary human immune cells. *Phytomedicine*, **23**, 611–620.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.025>
- Tseng, E., Scott-Ramsay, E. A., Morris, M. E. (2004) Dietary organic isothiocyanates are cytotoxic in human breast cancer MCF-7 and mammary epithelial MCF-12A cell lines. *Exp. Biol. Med. (May-wood)*, **229**, 835–842.  
<https://doi.org/10.1177/153537020422900817>
- Ulleberg, E.K., Comi, I., Holm, H., Herud, E.B., Jacobsen, M., Vegarudet G.E. (2011) Human gastrointestinal juices intended for use in *in vitro* digestion models. *Food Dig.* **2**, 52–61.  
<https://doi.org/10.1007/s13228-011-0015-4>
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Perez-Vicente, A., Garcia-Viguera, C. (2004) *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates and vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 135-138.  
<https://doi.org/10.1021/jf0305128>
- Vaughn, S.F., Berhow, M.A., 2005. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Ind. Crops Prod.* **21**, 193–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.03.004>
- Veeranki, O.L., Bhattacharya, A., Tang, L., Marshall, J.R., Zhang, Y. (2015) Cruciferous vegetables, isothiocyanates, and prevention of bladder cancer. *Curr. Pharmacol. Rep.* **1**, 272–282.  
<https://doi.org/10.1007/s40495-015-0024-z>
- Verma, A., Sharma, A., Meghna, Rai PK (2019) Impact of soxhlet extraction method on oil yield and antioxidant potential of *Brassica juncea*. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **8**, 1134-1137.
- Vrca, I., Šćurla, J., Kević, N., Burčul, F., Čikeš Čulić, V., Bočina, I., Blažević, I., Bratanić, A., Bilušić, T. (2021a) Influence of isolation techniques on the mustard seed



- morphology, composition of glucosinolate breakdown products, their gastrointestinal stability and antiproliferative activity. *Eur. Food Res. Technol.* **248**, 567-576. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03903-x>
- Vrca, I., Burčul, F., Blažević, I., Bratanić, A., Bilušić, T. (2021b) Comparison of gastrointestinal stability of isothiocyanates from *Tropaeolum majus* L. *altum* using *in vitro* and *ex vivo* digestion methods. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **13**, 160-166. <https://doi.org/10.17508/CJFST.2021.13.2.04>
  - Vrca, I., Ramić, D., Fredotović, Ž., Smole Možina, S., Blažević, I., Bilušić, T. (2022) Chemical composition of essential oil and extract from *Tropaeolum majus* L. *altum* seeds, and their biological activity. *Food Technol. Biotechnol.* (under review)
  - Wagner, A.E., Boesch-Saadatmandi, C., Dose, J., Schulteiss, G., Rimbach, G. (2012) Antiinflammatory potential of allyl-isothiocyanate - role of Nrf2, NF-κB and microRNA-155. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 836-843. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01367.x>
  - Wendlinger, C., Hammann, S., Vetter, W. (2014) Various concentrations of erucic acid in mustard oil and mustard. *Food Chem.* **153**, 393-397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.073>
  - Whitcomb, D.C., Lowe, M.E. (2007) Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig. Dis. Sci.* **52**, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>
  - Wielanek, M., Urbanek, H., Majorowicz, H. (2004) Endogenous hydrolysis of glucotropaeolin to benzyl isothiocyanate in hairy root cultures *Tropaeolum majus* L. *Biotechnologia*, **1**, 210-224.
  - Wu, X., Zhou, Q. H., Xu, K. (2009) Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 501-512. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.50>
  - [www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2014/09/bijela-gorusica-10.jpg](http://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2014/09/bijela-gorusica-10.jpg) Pristupljeno 14. 1. 2022
  - Xiao, J.B., Chen, J.W., Xu, M. (2007) Supercritical fluid CO<sub>2</sub> extraction of essential oil from *Marchantia convoluta*: global yields and extract chemical composition. *Electron. J. Biotechnol.* **10**, 141-148. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582007000100013>

- Xie, B., Nagalingam, A., Kuppusamy, P., Muniraj, N., Langford, P. Györffy, B., Saxena, N.K., & Sharma D. (2017) Benzyl Isothiocyanate potentiates p53 signaling and antitumor effects against breast cancer through activation of p53-LKB1 and p73-LKB1 axes. *Sci. Rep.* **7**, 40070.  
<https://doi.org/10.1038/srep40070>
- Xie, B., Zhao, L., Guo, L., Liu, H., Fu, S., Fan, W., Lin, L., Chen, J., Wang, B., Fan, L., Wei, H. (2019) Benzyl isothiocyanate suppresses development and metastasis of murine mammary carcinoma by regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Mol. Med. Rep.* **20**, 1808-1818.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10390>
- Yu, J.C., Jiang, Z.-T., Li, R., Chan, S.M. (2003) Chemical composition of the essential oils of *Brassica juncea* (L) coss grown in different regions, Hebei, Shaanxi and Shandong of China. *J. Food Drug Anal.* **11**, 22–26.  
<https://doi.org/10.38212/2224-6614.2729>
- Zhang, Y., Tang, L., Gonzalez, V. (2003) Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 1045–1052.
- Zekić, M. Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae / doktorska disertacija. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
- Žlender, V. (2006) Detection of apoptosis. *Arh Hig Rada Toksikol.* **57**, 229–36.
- Žvorc, D., Purić-Hranjec, M., Varga, A., Pintarić, L. (2021) Instrumentizacija u analitici održivoga razvoja Plinska kromatografija - masena spektrometrija GC-MS, stručni rad. UDK: 543.05:543.42.

## **8. PRILOG**



Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet

## ETIČKO POVJERENSTVO

A Salata 3  
10000 Zagreb

T +385 1 45 66 777  
F +385 1 49 20 053

E mf@mef.hr  
W www.mef.unizg.hr

Ur. Broj: 380-59-10106-20-111/105  
Klasa: 641-01/20-02/01

Zagreb, 22.7.2020.

Ivana Vrca, mag.ing.cheming.  
Miroslava Krležje 26  
21 000 Split

### Mišljenje Etičkog povjerenstva

Etičko povjerenstvo MEDICINSKOG FAKULTETA u Zagrebu razmotrilo je načela etičnosti istraživanja u sklopu izrade doktorskog rada **Ivane Vrca**, **mag.ing.cheming.** pod naslovom:

**„Utjecaj klasičnih i suvremenih metoda ekstrakcije na gastrointestinalnu stabilnost i biološku aktivnost sumporovih spojeva iz porodice Brassicaceae“**

i zaključilo da je prikazano istraživanje etički prihvatljivo.

Prof. dr. sc. Zdravka Poljaković  
Predsjednica Etičkog povjerenstva



Dostavljeno: 1. Podnositeljici zahtjeva  
2. Arhiva Povjerenstva

## ŽIVOTOPIS

Ivana Vrca rođena je u Splitu 22.05.1989. gdje je završila osnovnu školu i Prirodoslovnu-matematičku gimnaziju (MIOC). Godine 2008. upisuje Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu na kojem je diplomirala 2013. godine na studiju Kemijskog inženjerstva, smjer Materijali. Tijekom preddiplomskog i diplomskog studija na Kemijskom-tehnološkom fakultetu dobila je Dekanovu i Rektorovu nagradu 2011. godine. Također je tijekom preddiplomskog i diplomskog studija bila dobitnica stipendija grada Splita, Sveučilišta u Splitu, Ine i Jutarnjeg lista za jedan od najboljih studentskih projekata. Po završetku studija radila je kao pripravnik na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije u periodu od 2015.-2016. godine. Godine 2016. završila je PPDMO (pedagoško-psihološko-didaktičko-metodičko obrazovanje) na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.

Diplomirala je 2019. godine na Ekonomskom fakultetu Sveučilišta u Splitu na studiju Poslovne ekonomije, smjer Računovodstvo i revizija. Godine 2019. godine zapošljava se kao doktorandica na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu na znanstveno-istraživačkom projektu pod nazivom „Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala“, HRZZ-IP-2016-06-1316 i upisuje poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam, područje Prehrambena tehnologija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom poslijediplomskog studija dobitnica je stipendije IUPAC-a 2019. godine, stipendija Hrvatskog mikroskopijskog društva 2019., 2021. i 2022. godine i Europskog mikroskopijskog društva 2019. i 2022. godine. Sveukupno je dosad sudjelovala na 18 konferencija. Uz brojna posterska priopćenja na domaćim i međunarodnim kongresima, prisustvovala je na kongresima 26HSKIKI, Hranom do zdravlja i MCM u Beogradu u 2019. godini i na Danima doktorata biotehničkog područja 2021. godine gdje je usmeno izlagala rezultate iz svog doktorskog istraživanja. Od 2019. godine redovito sudjeluje u Centru izvrsnosti iz prirodoslovlja Splitsko-dalmatinske županije, a od 2021. godine i na Festivalu znanosti. Od 2022. godine sudjeluje na Europskoj noći istraživača s radionicama: „Priroda i ja, prijatelja dva“ (Utjecaj kiselih kiša na hranu koju svakodnevno konzumiramo) i „Budućnost s obnovljivim izvorima energije“. Ivana Vrca je stručna suradnica i voditeljica edukativnih interaktivnih radionica za djecu s teškoćama pri učenju u Udruzi Dyxy, Županijske udruge za djecu i mlade s teškoćama čitanja, pisanja i učenja, a koja djeluje na području Splitsko-dalmatinske županije. Od 2015.-2018. godine vodila je Vježbe iz opće i anorganske kemije na Kemijsko-tehnološkom fakultetu Split, a od 2021.

godine seminarsku nastavu iz kolegija Mediteranska prehrana i Higijena i sanitacija na Kemijsko-tehnološkom fakultetu. Autorica je i koautorica više znanstvenih radova.

## POPIS ZNANSTVENIH RADOVA

## A1

- **Vrca, I.**, Soldo, B., Jokić, S., Bilušić, T. (2022) Fatty acids in oils from mustard seeds after Soxhlet and Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and *ex vivo* gastrointestinal stability of erucic acid. Food Technol. Biotechnol. (under review).
- **Vrca, I.**, Ramić, D., Fredotović, Ž., Smole Možina, S., Blažević, I., Bilušić, T. (2022) Chemical composition of essential oil and extract from *Tropaeolum majus* L. *altum* seeds, and their biological activity. Food Technol. Biotechnol. (article in press). <https://doi.org/10.17113/ftb.60.04.22.7667>
- Škugor Rončević, I., Skroza, D., **Vrca, I.**, Kondža, A., Vladislavić, N. (2022) Development and optimization of electrochemical method for determination of vitamin C. Chemosensors, 10, 7, 283-299. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10070283>
- **Vrca, I.**, Šćurla, J., Kević, N., Burčul, F., Čikeš Čulić, V., Bočina, I., *et al.* (2021) Influence of isolation techniques on the mustard seed morphology, composition of glucosinolate breakdown products, their gastrointestinal stability and antiproliferative activity. Eur. Food Res. Technol. 248, 2, 567-576. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03903-x>.
- Blažević, I., Đulović, A., Burčul, F., Popović, M., Montaut, S., Bilušić, T., **Vrca, I.**, Markić, J., Ljubenković, I., Ruščić, M., Rollin, P. (2020) Stability and bioaccessibility during *ex vivo* digestion of glucoraphenin and glucoraphasatin from *Matthiola incana* (L.) R. Br. J. Food Comp. Anal. 90, 103483, 7. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103483>.

## A2

- **Vrca I.**, Burčul, F., Blažević, I., Bratanić, A., Bilušić, T. (2021) Comparison of gastrointestinal stability of isothiocyanates from *Tropaeolum majus* L. *altum* using *in vitro* and *ex vivo* digestion methods. Croat. J. Food Sci. Technol., 13(2), doi: 10.17508/CJFST.2021.13.2.04.