



Heterogenizált antioxidánsok szinergikus hatása

OTDK dolgozat

Szerző: Varga Szilárd

II. évfolyam, Kémia BSc

Témavezető: Dr. Szilágyi István

Egyetemi docens, Szegedi Tudományegyetem Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék,
SZTE-MTA „Lendület” Biokolloidok Kutatócsoport

Lezárva: 2024. december hónap 13.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás.....	3
Tartalmi összefoglaló	4
1. Bevezetés, témaválasztás indoklása.....	5
2. Szabadgyökök és antioxidánsok.....	7
3. Réteges kettős hidroxidok.....	12
4. Célkitűzés.....	16
5. Kísérleti rész.....	17
5.1. Delaminált réteges kettős hidroxid (dLDH) előállítása	17
5.2. Elektroforetikus– és dinamikus fényszórásmérés.....	17
5.3. Antioxidánsok rögzülésének igazolása	18
5.4. Antioxidáns aktivitás meghatározása DPPH-teszttel.....	18
5.5. Rézredukáló antioxidáns kapacitás (CuPRAC-teszt).....	19
6. Eredmények értékelése	21
6.1. GA és NADH antioxidáns aktivitása	21
6.2. GA és NADH immobilizálása dLDH felületén	24
6.3. dLDH/GA/NADH kompozitok gyöksemlegesítő antioxidáns aktivitása	27
6.4. Az antioxidánsok és kompozitjaik antioxidáns aktivitása (CuPRAC-teszt)	31
7. Összefoglalás.....	34
Irodalomjegyzék.....	35

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Szerlauth Adélnak, Dr. Szilágyi Istvánnak és az MTA-SZTE „Lendület” Biokolloidok Kutatócsoport további munkatársainak a támogató közegért és a szakmai segítségért.

Köszönöm a Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj anyagi támogatását, melyben a kutatásaim során részesültem.

Tartalmi összefoglaló

Az antioxidánsokat ipari- és gyógyászati ágazatok is felhasználják kiemelkedő gyöksemlegesítő hatásuk miatt, azonban a molekulák érzékenysége a környezeti hatásokra ezt számos folyamatban akadályozza. A korábbi évtizedekben a nanotechnológia fejlődésével lehetőség nyílt különböző hordozó anyagok felhasználásával olyan nanokompozitokat készíteni, melyek megoldást jelenthetnek az alkalmazhatóságuk problémájára. Ilyenek a réteges kettős hidroxidok (LDH) is, melyek nagy fajlagos felületük, anioncserélő képességük és biokompatibilitásuk miatt ígéretes hordozónak bizonyulnak. Kutatásunk során vizsgáltuk két antioxidáns (galluszsav és nikotinamid-adenin-dinukleotid) gyöksemlegesítő képességét, majd olyan réteges kettős hidroxid nanokompozitokat állítottunk elő, melyek ezeket a molekulákat tartalmazták.

Először megvizsgáltuk az említett antioxidánsok gyöksemlegesítő hatását DPPH- és CuPRAC-tesztrel UV-Vis spektroszkópia segítségével, majd méréseket végeztünk, hogy megtaláljuk keveréküknek azt az arányát, ahol a legkedvezőbbek a köztük lévő kölcsönhatások, ezzel magasabb antioxidáns aktivitást eredményezve. Ezt követően Mg-Al-tartalmú LDH-t állítottunk elő, melyet ultrahangos kezeléssel delamináltunk. Ennek felületén adszorbeáltattuk az antioxidánsokat, valamint ezek keverékét. A kompozit előállítása során az antioxidánsok adszorpcióját elektroforetikus mobilitás-méréssel követtük, míg kolloidstabilitását dinamikus fényszórásmérésekkel vizsgáltuk. Az antioxidánsok rögzüléséről szűréssel majd a szűrlet UV-Vis spektroszkópiás vizsgálatával bizonyosodtunk meg. Az adszorpció bizonyítását követően aktivitásukat a korábban említett két tesztrel vizsgáltuk.

Az antioxidánsok között szinergikus kölcsönhatást tapasztaltunk. Felállítottunk egy modellt, mellyel a kölcsönhatás okát magyarázni kívántuk, majd mérést végeztünk ennek igazolására. Összességében kijelenthetjük, hogy feltérképeztük a galluszsav és a NADH antioxidáns aktivitását, sikeresen rögzítettük őket delaminált LDH-k felületén, mellyel egy antioxidáns aktivitással bíró nanokompozitot hoztunk létre. Ezáltal előállítottunk egy olyan stabil diszperiót, melyek az antioxidánsok optimális arányú keverékét tartalmazták heterogenizált formában, mely megkönnyítheti későbbi használatukat különböző ipari- vagy orvos-biológiai területeken.

1. Bevezetés, témaválasztás indoklása

A biológiai rendszerek működésének természetes velejárója a reaktív szabadgyökök keletkezése. Ezek olyan párosítatlan elektronnal rendelkező molekulák, melyek megnövekedett reaktivitásuk miatt veszélyt jelentenek fontos bioaktív molekulákra (pl. sejtmembránt alkotó lipidek, fehérjék, DNS). A szabadgyökök különböző hatásmechanizmusokon keresztül megbontják a rendszerek strukturális integritását: adduktot képezhetnek a biomolekulákkal, és hidrogénatomokat szakíthatnak le a molekulákról, ezzel ismét gyökös terméket eredményezve.^{1,2}

Bizonyos belső, vagyis endogén folyamatok (pl. sejtlegzés, bakteriális fertőzés okozta fagocitózis) hozzájárulnak a reaktív gyökök keletkezéséhez, ugyanakkor számos külső környezeti faktor is kedvezőtlenül befolyásolhatja mennyiségüket (UV-sugárzás, légszennyezés, élelmiszeradalékok és gyógyszerek metabolitjai). Az élő szervezetben megtalálhatók olyan vegyületek, amik ezeket semlegesítik. Összefoglaló néven antioxidánsoknak nevezzük őket, melyek közös jellemzője, hogy késleltetik, megelőzik, vagy megszüntetik az oxidatív stresszt.¹ A szervezet természetes védelmi rendszere mellett szükséges a változatos és egészséges táplálkozással külső forrásból is bevinni antioxidánsokat a szervezetünkbe.

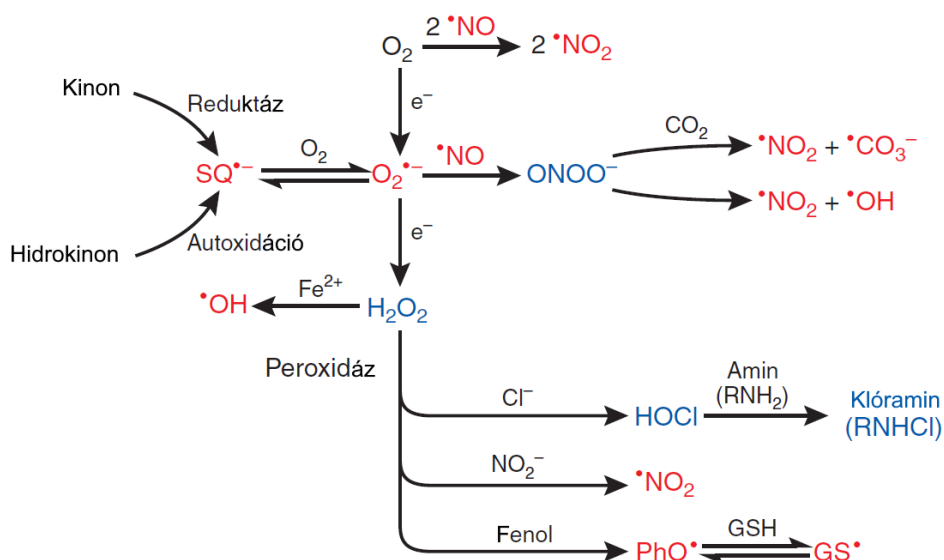
Egészséges sejtekben a gyökök és az antioxidánsok megfelelő egyensúlya biztosítja a káros sejt folyamatok megakadályozását, ennek felborulása káros következményekkel jár. Ha környezeti faktorok vagy sejtes működészavar a reaktív gyökök túlsúlyba kerülését eredményezi, az oxidatív stresszt eredményez, mely számos súlyos betegség előidézője lehet (pl. krónikus gyulladás, rákos megbetegedés).^{3,4} A legtöbb betegség során szintén megnövekszik a szabadgyökök mennyisége szervezetünkben – számos étrendkiegészítő vitamintablettában található antioxidánsok (C-, E-vitamin) ezek semlegesítésére. Mindemellett a kedvező gyöksemmlegesítő tulajdonságaikra nemcsak a gyógyászatban lenne szükség. Az antioxidánsok élelmiszeradalékként meghosszabbítják a termékek szavatosságát,⁵ polimerkémiai folyamatokban kontrollálják a gyökök mennyiségét,⁶ illetve kozmetikai készítményekben is rendre használják őket azok antimikrobiális, gyulladás- és öregedésgátló hatásuk miatt.⁷ Természetes eredetű antioxidáns molekulák használata kézenfekvő, ugyanakkor számos folyamat esetén problémába ütközhetünk a megvalósítás során azok korlátozott stabilitása miatt. Míg fiziológiás környezetben képesek kifejteni redukáló hatásukat, az ipari folyamatokban jelentkező magas hőmérsékletek, extrém pH-k hatására bomlásnak indulhatnak, emellett problémás a lipofil antioxidánsok vizes közegekben jelentkező rossz oldódása is.

Erre jelenthet megoldást, ha valamilyen szilárd hordozó felületén rögzítjük ezeket a molekulákat.^{8,9} Ismeretes az irodalomban több olyan nanoszerkezet is, melyek hatékonyan képesek adszorbeálni

antioxidánsokat és más kismolekulás szerves anyagokat. Noha ezek a molekulák nem lesznek jelen az oldatfázisban, a kolloid diszperzióban nagyobb koncentrációban tudjuk őket használni azok redukáló tulajdonságának drasztikus csökkenése nélkül. A keletkező nanokompozitok ellenállóbbá válhatnak a környezeti hatásokkal szemben (pl. megnövekedhet az antioxidánsok fotostabilitása),¹⁰ ráadásul különböző típusú molekulákat együttesen adszorbeálva multifunkciós nanorészecskék is előállíthatók, melyek az adott ipari folyamatban több különböző reakcióért is felelősek lehetnek. Az erre irányuló kutatás újfajta, antioxidáns-tartalmú nanokompozitok előállítását teszi lehetővé, kiterjedt potenciális felhasználási területekkel.

2. Szabadgyökök és antioxidánsok

Fiziológias környezetben rendszerint két típusát különböztetjük meg a reaktív szabadgyököknek: a reaktív nitrogén- és oxigén származékokat (ROS).¹ A sejtek bizonyos lebontó folyamatai gyökös redoxireakciókon keresztül zajlanak le (pl. kinonok flavoenzim-katalizált redukciója, vagy fenolok és aromás aminok redukciója hem-komplexeiken),^{11,12} és a keletkező intermedierek oxigénnel találkozáva szuperoxidgyököt hozhatnak létre (**1. ábra**). Ennek diszproporcióját a szuperoxid-dizmutáz enzim (SOD) katalizálja, mely során oxigén és hidrogén-peroxid fejlődik. Az utóbbi párosított elektronokkal rendelkező oxidálószer, roncsoló hatását lassan fejti ki, ugyanakkor más, a szervezetben megtalálható ionokkal és molekulákkal (pl. kloridion, nitrogén-monoxid vagy glutation (GSH)) további potens oxidálószerkeket képez, melyek magas reaktivitásuk következtében veszélyt jelentenek a sejtalkotókra. A ROS-ok káros hatását az is igazolja, hogy több kutatás is a reaktív gyökök DNS-re gyakorolt hatását okolja a sejtek degradációjáért és öregedéséért.¹



1. ábra – Szabadgyökök keletkezésének lehetséges módjai fiziológias környezetben.¹

Más sejtes folyamatok is hozzájárulnak a szabadgyökök keletkezéséhez: bizonyos enzimek hidrogén-peroxidot állítanak elő, mely fontos jelátviteli molekulaként funkcionál bizonyos redoxfolyamatokban. A megfelelő sejtes működéshez tehát szükség van a szabadgyökök megfelelő szinten tartására, hogy az általuk okozott oxidatív stressz ne jelentsen veszélyt fontos biomolekulákra.¹

Az antioxidánsokat számos módon csoportosíthatjuk, melyek közül az egyik az enzimatis és nem enzimatis osztályozás. Az evolúció során a sejtek kifinomult és összetett enzimatis védelmi rendszert fejlesztettek ki a szabadgyökök semlegesítése érdekében. A szuperoxidgyökből SOD hatására keletkező

hidrogén-peroxidot több párhuzamos reakcióban képesek semlegesíteni: a kataláz enzim vízzé és oxigénné diszproporcionálja, míg a glutation-peroxidáz enzim által katalizált GSH-oxidáció során vízzé alakul.²

A nem enzimatis antioxiidánsok közé számos vegyületcsalád tartozik. Jellemzőik, hogy az (1) reakcióban belőlük keletkező gyök már jóval kevésbé reaktív, ugyanis intramolekuláris kölcsönhatások, vagy az elektron delokalizációja révén csökken az aktivitásuk, illetve kémiai reakció révén olyan termékek keletkeznek belőlük, melyek jóval stabilabbak a ROS-oknál. Ilyen hatásmechanizmussal működnek többek közt a flavonoidok és a fenolsavak.²



Bizonyos vitaminok is kismolekulás antioxiidánsként funkcionálnak. A C-vitamin két lépésben ad le egy-egy elektront, így a képződő dehidro-aszkorbinsav már párosított elektronokkal rendelkező inert molekula lesz, míg az apoláris E-vitamin a sejtmembránban a lipid-peroxidáció láncreakcióját töri le úgy, hogy a peroxidgyökkel képezett addukt egy másik gyökkel egyesül (2) – hasonló adduktképzők a karotenoidok is.²

Endogén, vagyis a szervezet által termelt antioxiidánsok is fontos szerepet játszanak a szabadgyökök semlegesítésében: a húgysav a sejtplazmában található ROS-ok közel kétharmadának semlegesítéséért felelős, míg a GSH fenntartja azt a redukáló közeget, mellyel az enzimatis antioxiidánsok semlegesíteni tudják a gyököket.²

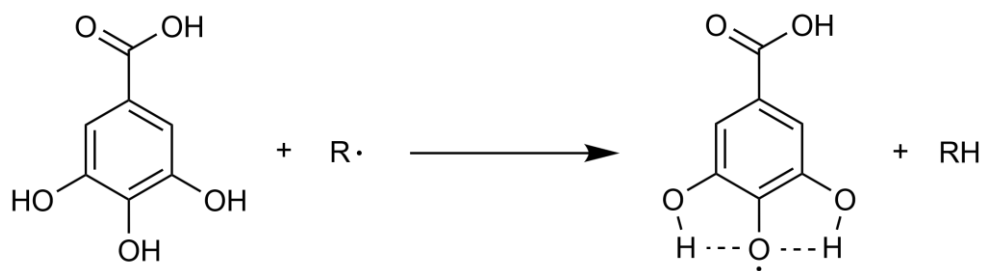
Fontos azonban azt is megjegyezni, hogy a legtöbb antioxiidáns önmagában nem lenne képes a reaktív gyökök minden fajtájának semlegesítésére. Más antioxiidánsok közreműködő hatása nélkül sok esetben nem tud kialakulni belőlük a kellően stabil gyök, ennek hatására az oxidatív stresszt csak késleltetni tudja, megszüntetni nem. A szervezetben jelen lévő antioxiidánsok sokszor egymás hatását felerősítve, a gyöksemlegesítő folyamatokat katalizálva működnek.^{2,39} A köztük fellépő hatás minőségét többféleképpen jellemezhetjük.

Ha együttes redukáló hatásuk egyszerűen összege az egyes antioxiidánsok redukáló tulajdonságának, akkor a keverék additív a gyöksemlegesítő hatásra nézve, javuló hatás esetén szinergizmusról beszélünk (ekkor az antioxiidánsok közötti kedvező kölcsönhatások javítják a gyöksemlegesítő hatást), a keverék romló redukáló tulajdonsága esetén pedig antagonizmus lép fel. Az antioxiidánsok működési mechanizmusa sok esetben jól feltérképezett: tudjuk például, hogy a sejtekben a húgysavból képződő gyököt a C-vitamin redukálja, ezzel az előbbi ismét kifejtheti antioxiidáns hatását; az oxidálódott dehidro-aszkorbinsavat pedig a glutation-peroxidáz enzim redukálja a GSH oxidációja közben, ezzel regenerálva az aszkorbinsavat.² A bevett modell, amit az *in vitro* antioxiidáns-kísérletekhez társítanak más molekulákra a redukciós

potenciálok különbségével magyarázott. Szinergizmus esetén a nagyobb aktivitással bíró antioxidánsnak magasabb a redukciós potenciálja, míg a gyengébbnek alacsonyabb: ekkor az előbbiből képződő gyököt a gyengébb antioxidáns regenerálja, így ismét az erősebb antioxidáns fejt ki a redukáló hatást.³⁹

Az antioxidánsok együttes hatását kombinációs indexszel (CI) jellemezhetjük: ez az arányszám megadja a keverék gyöksemlegesítő hatását az egyes antioxidánsok önálló hatásához képest. Redukáló tulajdonságukat antioxidáns aktivitással vagy antioxidáns kapacitással jellemzik, ami a semlegesített gyökök mennyiségével hozható kapcsolatba.³⁹

A fenolsavak olyan antioxidánsok, melyekben az egymáshoz képest orto-helyzetben lévő fenolos hidroxilcsoportok felelnek a gyöksemlegesítő hatásért, a hidrogénatom leszakításakor keletkező oxigéngyök ugyanis ezen esetekben jóval stabilabb, mint a ROS-ok. A párosítatlan elektronnal rendelkező oxigén hidrogénkötéseket képes kialakítani a szomszédos OH-csoportokkal, emellett az elektron az aromás gyűrűbe történő delokalizáció miatt is stabilizálódik. A hatást erősíti, ha elektronszívó szubsztituens helyezkedik el a gyűrűn, lehetőleg a gyökös oxigénhez képest para-pozícióban, ezzel is csökkentve a gyűrű elektronsűrűségét. A fenolsavak egyik legegyszerűbb képviselője a 3,4,5-trihidroxibenzoésav, köznapin néven galluszsav (GA), mely kis mérete mellett rendelkezik a kedvező szerkezeti elemekkel a kitűnő antioxidáns aktivitás biztosításához (**2. ábra**). Antivirális és neuroprotektív hatásai mellett gyöksemlegesítő képessége is kiemelkedő: több teszt szerint a GA rendelkezik a legmagasabb antioxidáns aktivitással. Számos növényben megtalálható: a szőlő, különböző magvak és a tealevelek is nagy koncentrációban tartalmazzák.¹³



2. ábra – GA reakciója egy szabadgyökkel.

Korábban számos másik molekulával párosítva vizsgálták antioxidáns aktivitását, mely nagyban függött a reakciópartner szerkezetétől, az alkalmazott koncentrációarányoktól és a redukáló hatás kiértékelésére szolgáló tesztől. Sok esetben szinergikus kölcsönhatások is felléptek keverékeiben, így kiemelkedő redukáló hatásával együtt alkalmas vegyületként szolgál további kutatásokhoz.

Az **1. táblázat** GA más antioxidánsokkal képzett keverékeinek antioxidáns aktivitását összegzi a hozzájuk tartozó kölcsönhatás minősége és annak számszerű adatai mellett. Számos olyan teszt létezik, mellyel megállapítható a redukáló képesség, azonban a kapott eredmény nagyban függ az alkalmazott

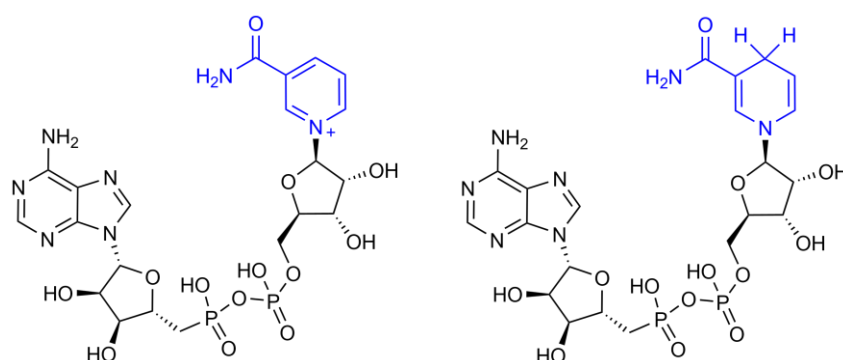
módszertől, valamint a körülményektől. A GA koffeinsavval képzett keveréke például különböző intermolekuláris kölcsönhatások kialakulására utal attól függően, hogy mi az alkalmazott kiértékelési módszer. Egy keverékben fellépő kölcsönhatásokról tehát akkor tudunk bizonyosat állítani, ha azt több különböző teszt is igazolja.

1. táblázat: GA és más antioxidánsok együttes antioxidáns aktivitása. A kiértékeléshez használt tesztek: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilgyök-semlegesítő antioxidáns aktivitás (DPPH); a plazma vas redukálóképességén alapuló antioxidáns kapacitás (FRAP), Briggs–Rauscher-reakció (BR), 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav-semlegesítő antioxidáns aktivitás (ABTS). ^aAz értékek az antioxidánsok elméleti additív hatásától mért százalékos eltérést mutatják. Pozitív érték esetén az eltérés kedvező, míg negatív esetén kedvezőtlen.

Másik antioxidáns	Hatás	Teszt	Keverék antioxidáns aktivitása ^a
protokatekuinsav	Szinergikus	DPPH	+41,7% ¹⁴
klorogénsav	Szinergikus	DPPH	+2,1% ¹⁴
vanilinsav	Antagonikus	DPPH	-8,3% ¹⁴
rezveratrol	Antagonikus	FRAP	-5,5% ¹⁵
	Antagonikus	DPPH	-8,1% ¹⁵ CI = 1,3
	Szinergikus	BR	+45,40% ¹⁵
rozmaringsav	Szinergikus	FRAP	+19,7% ¹⁶
kvercetin	Szinergikus	FRAP	+4,0% ¹⁶
rutin	Additív	FRAP	+1,6% ¹⁶
C-vitamin	Additív	Amperometria	~ 0% ¹⁷
trolox	Additív	Amperometria	~ 0% ¹⁷
húgysav	Additív	Amperometria	~ 0% ¹⁷

	Szinergikus	FRAP	+137,80% ¹⁶
koffeinsav	Additív	ABTS	~0% ¹⁸
	Antagonikus	ABTS	-10% ¹⁹

A nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) egy biológiai koenzim, mely a megfelelő sejtes működésért felelős, a lebontó anyagcserében kulcsfontosságú (**3. ábra**). A szervezetben többlépcsős folyamatban a NADH NAD-dá oxidálódik hidridion-transzferrel (3), miközben az elektronok a NADH-dehidrogenáztól három másik enzimen keresztül eljutnak a mitokondriális oxigénhez, vízzé redukálva azt. Az oxidált NAD más sejtes folyamatokban visszaalakul NADH-vá egyéb molekulák oxidációja közben (ilyen például az alkohol-dehidrogenáz által katalizált acetaldehid-képződés), ezzel fenntartva a (NADH/NAD) redoxirendszer megfelelő redukciós potenciálját.²⁰



3. ábra – A NAD (bal) és a NADH (jobb) szerkezeti képlete, aktív centrumuk kék színnel jelölve



Míthogy a NADH képes hidridion-transzferre, sejtes folyamatok mellett katalitikus hidrogénezési reakciókban is vizsgálták a benne rejlő lehetőségeket.²¹ Redukáló képessége folytán antioxidáns tulajdonsággal is rendelkezhet, azonban eddig kevés figyelem irányult rá.²² Az ismeretes az irodalomban, hogy a NADH rendelkezik direkt antioxidáns aktivitással, azonban kutatásainkat megelőzően hiányzott ennek átfogó vizsgálata.

3. Réteges kettős hidroxidok

A nanotechnológia korunk egyik legmeghatározóbb tudományterülete; a nanorészecskék felületi tulajdonságai, atomi szintű kölcsönhatásai révén új utakat nyitnak meg az anyagtudományban. Számos szerves és szervetlen alapegységekből felépülő nanoszerkezetet hoztak létre az elmúlt évtizedekben, melyek közös jellemzői a jól definiált, reprodukálható szerkezet és a kitűnő funkcionizálhatóság. A korunk húzóágazatának számító mikroelektronika mellett a modern orvostudomány is előszeretettel használja különbözően módosított származékaikat. Nagy fajlagos felületük miatt nem csak szerkezeti módosításuk jöhet számításba, hanem más részecskék felületen történő adszorpciója révén is előállíthatunk nanokompozitokat.⁸

A gyógyászatban a nanorészecskéknek fontos kritériumnak kell megfelelniük. A kompozitok akkor lesznek biokompatibilisek, ha a fiziológiás pH és egyéb ionok koncentrációja mellett is stabilak maradnak, emellett nem jelentenek veszélyt a sejtalkotókra és más biomolekulákra, velük szemben kémiaiag inerteek.³²

A réteges kettős hidroxidok (LDH) olyan nanostruktúrák, amelyeket összetételi és szerkezeti formálhatóságuk, olcsó és egyszerű előállításuk miatt előszeretettel használnak különböző ipari folyamatokban (pl. adszorbensként, katalizátorként), továbbá biokompatibilitásuk lehetővé teszi orvosi-biológiai felhasználásukat.^{23,42}

Szerkezetüket tekintve két- és háromértékű fémionokból állnak, amik pozitív többlettöltésű rétegeket alkotnak. A pozitív töltés az izomorf szubsztitúcióval beépült háromértékű fémionoknak köszönhető, melyeket a rétegek között elhelyezkedő hidratált anionok kompenzálnak. Általános összegképletük $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2][A_{x/m}^{m-} \cdot nH_2O]$, ahol M^{2+} és M^{3+} a fémionokat, A^{m-} az ellenionokat jelöli. Kétszeresen pozitív ionként Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} vagy Ca^{+2} -t használnak, mellette Al^{+3} , Fe^{+3} vagy Cr^{+3} kerül jellemzően a rétegekbe. A kiindulási szerkezetekben ellenionként rendszerint Cl^- , NO_3^- vagy CO_3^{2-} szerepel. A cinkalapú Zn–Ti, Zn–Fe, Zn–Al LDH-k mellett a Mg–Al a legelterjedtebb. Az utóbbi összetétele a brucitéval ($Mg(OH)_2$) analóg, azzal a különbséggel, hogy a Mg^{2+} ionok egy részének helyére Al^{3+} ionok épülnek be.

Előállításukra több módszer is ismert az irodalomban. A koprecipitációs módszer esetén a beépítendő anion oldatába csepegtetik a fémionoldatokat, majd lúg lassú hozzáadásával a megfelelő pH-értéknél kiválik az LDH, ahol a rétegek közé már az oldatban lévő anion épül be. Hasonló elven alapszik az urea hidrolízises módszer: ekkor a fémionok és az anion karbamidos oldatát hevítik, és a bomlástermékként képződő ammónium- és karbonátionok megteremtik az LDH képződéséhez szükséges bázikus pH-t. Elektrokémiai és szol-gél átalakuláson alapuló módszerek is ismeretesek előállításukra. A létrejött

szerkezetek funkcionálisására az ioncserés módszer széles körben alkalmazott: ilyenkor az LDH-t a kívánt aniont tartalmazó oldatban diszpergálják, és megvárják, míg az interlamelláris térben erősebben kötődő anionok lecserélik a gyengébben kötődőeket. Ez a lépés már lehetővé teszi nagyobb molekulák adszorpcióját is.²⁴

Az LDH-k készítésekor előnyös tulajdonságaik mellett limitáló tényezők is fellépnek. Az M^{2+}/M^{3+} arálynak – empirikus adatok alapján – 2:1 és 4:1 között kell lennie, ugyanis bármelyik kation túlzott feleslege meggátolja az együttes csapadékképzést; emellett fém-hidroxidok lévén pedig kompozitjaik pH-stabilitása korlátozott, 4-es pH alatt a közeg már kellően savas ahhoz, hogy szerkezetük sérüljön, vagy akár fel is oldódjanak.²³ További limitáció is felléphet, ha az LDH részecskéi túl nagy méretűek, ugyanis keletkezhetnek olyan zárt interlamelláris terek, amelyekbe nem lehet bejuttatni a kívánt aniont, vagy az interkaláció gátolja hatásának kifejtésében. Az utóbbira megoldást jelenthet az LDH-k szabályozott fragmentációja: néhány fém-hidroxid réteg együttes leválasztásával delaminált LDH-t (dLDH) kapunk, míg egyetlen fém-hidroxid réteg elkülönítésével exfoliált LDH-hoz juthatunk. Ezek fajlagos felülete többszöröse a normál LDH-knak, az interlamelláris térben való megkötődés mellett nagyobb szerepet kap a felületi adszorpció.

Az LDH-k delaminálása többféleképpen is megvalósítható. Hosszú szénláncú szerves molekulákkal módosított LDH-k nemvízes közegben képesek delaminációra kedvező határfelületi kölcsönhatások miatt, csakúgy, mint a tenzidoldatokba helyezett LDH-k. Ultrahangos kezeléssel is elérhető ez a hatás, ekkor a mechanikai hatások miatt fellazulnak a szerkezetek, és számos fragmentum kiszakad az oldatfázisba. Specifikus szerves oldószerek (pl. formamid) használatával szintén elérhető a delamináció.²⁵

Az LDH nanokompozitok számtalan ágazatban felhasználhatók. Adszorpciós képességüknek köszönhetően hozzájárulhatnak a környezeti terhelés csökkentéséhez: képesek megkötni a szennyvízben lévő toxikus fém-oxidokat (pl. szelén-, arzén- és króm-oxid), szerves szennyezőket (N,N-dimetilanilin, fenolszármazékok, organofoszfátok, polisztiirén-szulfonát polimer), a légkörből pedig a nitrozus gázokat és a szállóport. A réteges kettős hidroxidok katalizátorként is felhasználhatók: akár úgy, mint hordozók, vagy mint önmagukban vett heterogén katalizátorok különböző szerves kémiai reakciókban. A mezőgazdaságban használt növényvédő szerek feldúsulnak a talajban és a felszín alatti vizekben: az LDH-k hatásosnak bizonyultak ezek megkötésére, ráadásul, ha ezeket a szereket adszorbeálták az LDH-ra, majd így juttatták a talajba, akkor fokozatosan szabadult fel a nanokompozitból a szerves anyag. Ezzel elkerülhető a növényvédő szerek túlzott használata, ugyanis mindig a kellő mennyiség lesz jelen a növény környezetében. Ugyanezen alapon nyugszik az LDH nanokompozitok gyógyászati felhasználása is. Peptidek, antibiotikumok és egyéb gyógyszer-molekulák jól adszorbeálódnak felületükre, onnan egyenletes sebességgel szabadulnak fel – ezzel összhangban csökken a molekulák toxicitása. A vízben jól

diszpergálódó LDH-n apoláris molekulákat adszorbeálva a sejtek belsejébe is bejuttathatjuk őket, így azok ott is kifejthetik hatásukat.²³

Az LDH-k antioxidánsok megkötésére is alkalmasak: karnozin és GA, ellagsav, tannin, glutation és más molekuláris antioxidánsokat is adszorbeáltak LDH felületén, az antioxidáns aktivitás elvesztése nélkül.^{8,27,30} LDH-kompozitok, valamint egyéb hordozókon immobilizált GA antioxidáns aktivitását tartalmazza a **2. táblázat**. Csakúgy, mint az antioxidánsok keverékeinél, az eredmények ebben az esetben is nagyban függenek az alkalmazott tesztől, oldószertől és egyéb körülményektől.

2. táblázat: LDH-alapú és GA-tartalmú kompozitok antioxidáns aktivitása DPPH- és rézredukáló hatáson alapuló tesztekkel meghatározva. ^aA százalékban megadott értékek az elbontott gyökök arányát adják meg, a koncentrációban megadottak a kompozitok EC₅₀ értékeit tüntetik fel.

Kompozit	Teszt	Antioxidáns aktivitás ^a
GA-LDH	DPPH	93% ²⁶
GA-LDH	DPPH	83,9% ²⁷
IONP@GA1	DPPH	2,7 mg/mL ²⁸
IONP@GA2	DPPH	2,2 mg/mL ²⁸
IONP@GA3	DPPH	1 mg/mL ²⁸
CG/PVA/AgNPs-0 ^a	DPPH, ABTS	~ 80% ²⁹
CG/PVA/AgNPs-1	DPPH, ABTS	
CG/PVA/AgNPs-2	DPPH, ABTS	
CG/PVA/AgNPs-3	DPPH, ABTS	
LDH/Tannin/a	DPPH	~ 0,2 µM ³⁰
LDH/Glutation/a	DPPH	~ 500 µM ³⁰
LDH/Glutation/c	DPPH	~ 600 µM ³⁰
Ellagsav/LDH	DPPH, CuPRAC	87,3 µM ³¹
Metanol-Ellagsav-LDH	DPPH, CuPRAC	41,9 µM ³¹
Etanol-Ellagsav-LDH	DPPH, CuPRAC	19,8 µM ³¹

Aceton-Ellagsav-LDH	DPPH, CuPRAC	21,7 μM^{31}
Acetonitril-Ellagsav-LDH	DPPH, CuPRAC	16,1 μM^{31}
N,N-dimetilformamid-Ellagsav-LDH	DPPH, CuPRAC	30,1 μM^{31}

Noha a GA kitűnő antioxidáns aktivitással rendelkezik *in vitro* kísérletekben, a sejtekben uralkodó körülmények ronthatják hatását. Savas pH-n a GA lassan oxidálódik kinolinszármazékká, ezzel drasztikusan romlik a gyöksemllegesítő hatása. Erre megoldást jelenthet, ha nanokompozitot állítunk elő a felhasználásával, ugyanis a szervesetlen vázszerkezet részben megvédi a környezeti hatásoktól.¹⁰

Korábban sikeresen készítettek GA tartalmú LDH-t, melynek részletes karakterizációját is elvégezték. Az immobilizáció megnövekedett fotostabilitást és gyakorlatilag változatlan antioxidáns aktivitást eredményezett. Vizsgálták ezen felül a GA deszorpcióját is, ahol késleltetett kioldódást tapasztaltak: ez a jelenség alkalmassá teszi a kompozitot biológiai felhasználásra, mivel az LDH kellően hosszú ideig képes megvédeni az antioxidánst a környezeti hatásoktól, a lassú kioldódás pedig hozzájárul a hosszan tartó hatás kifejtéséhez.¹⁰

A NADH-t mindeddig nem használták fel nanoszerkezetekben, így efféle alkalmazhatósága is ismeretlen volt.

4. Célkitűzés

Kutatásunk során célul tűztük ki antioxidáns aktivitással bíró dLDH kompozitok előállítását, majd ezek antioxidáns aktivitásának széles körű feltérképezését.

Ehhez elsőként két antioxidáns tesztel (DPPH- és CuPRAC-teszt) szeretnénk volna felmérni két molekula, a GA és a NADH aktivitását UV-Vis spektroszkópia segítségével. A NADH átfogó vizsgálata hiányos volt, így kiemelt fontosságúnak bizonyult reaktivitásának feltérképezése. Ezt követően meg akartuk vizsgálni különböző arányban vett keverékeik gyöksemllegesítő hatását is, hogy feltérképezzük egymásra kifejtett hatásukat, majd meghatározzuk azt az összetételt, melynél a legnagyobb javulás tapasztalható a külön-külön vett aktivitásokhoz képest.

A kutatócsoport korábbi eredményeire támaszkodva célunk volt Mg-Al dLDH diszperziók előállítása együttes lecsapás és ultrahangos kezelés segítségével. A keletkező részecskék felületén terveztük adszorbeálni az antioxidánsokat, először külön-külön, majd a megállapított megfelelő arány szerint együttesen. Elektroforetikus mobilitás-mérésekkel terveztük követni a nanorészecskék felületi töltését a mért zéta-potenciál révén, míg hidrodinamikai sugarukra, és ezáltal az aggregáció mértékére dinamikus fényszórásmérésekből szeretnénk volna következtetni. Az antioxidánsok megkötődésének igazolására UV-Vis méréseket terveztünk a szűrt dLDH részecskék felülúszóján.

Az antioxidánsok rögzítése után aktivitásukat a korábbiakhoz hasonló módon terveztük vizsgálni. A méréseket követően terveztük aktivitásuk összehasonlítását és a korábban definiált CI értékek megállapítását is.

Összefoglalva, célunk volt a GA és a NADH aktivitásának feltérképezése, heterogenizálása dLDH részecskéken, majd az immobilizálás hatásának vizsgálata különböző antioxidáns tesztek segítségével. Az antioxidánsok rögzítésével olyan hatékony kompozit előállítását terveztük megvalósítani, mely mind ipari mind orvos-biológiai folyamatokban hasznos lehet a szabadgyökök koncentrációjának csökkentésére.

5. Kísérleti rész

5.1. Delaminált réteges kettős hidroxid (dLDH) előállítása

A dLDH nanorészecskék előállításához magnézium-nitrát (0,0225 mol/L) és alumínium-nitrát (0,075 mol/L) vizes oldatát használtuk, melyhez 7 m/m%-os ammóniaoldatot csepegtettünk folyamatos kevertetés mellett inert nitrogénatmoszféra alatt, majd ezt követően további 5 percig kevertettük. A terméket 30 percig ultrahangos kádban kezeltük (45 kHz-es frekvencián, 50 W teljesítménnyel). A kapott diszperziót 10 percig centrifugáltuk 4200 rpm-es fordulatszámon, háromszor mostuk desztillált vízzel (4200 rpm, 10 perc), végül 5 perc centrifugálás után a felülúszóval dolgoztunk tovább.³³

5.2. Elektroforetikus– és dinamikus fényszórásmérés

Az elektroforetikus mobilitás és hidrodinamiai sugár méréséhez egy Anton Paar Litesizer 500 fényszórásmérő műszert használtunk. A műszer 685 nanométeres hullámhosszú, 40 mW teljesítményű lézernyalábot bocsát ki. A méréseket 25 C°-on végeztünk backscatter-módban (175°-os szórási szöggel). Az elektroforetikus mobilitás-mérésekhez Ω küvettákat (Anton Paar) használtunk, a hidrodinamikai sugár méréséhez pedig egyszer használatos műanyag küvettákat (VWR International). A fényszórásmérő módszerek relatív hibája 10%.

Az elektroforetikus mobilitás mérésekor a diszperziók 10 mg/L koncentrációban tartalmaztak dLDH részecskéket, valamint különböző koncentrációkban GA-t és NADH-t. A mintákat éjszakára állni hagytuk, hogy megvalósulhasson a molekulák teljes adszorpciója a mérést megelőzően. Az oldatok emellett NaCl-t tartalmaztak háttéreelektrolitként 1 mM-os koncentrációban. A zéta-potenciál (ζ) meghatározásához a Smoluchowski-egyenletet használtuk:

$$\mu = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (4)$$

ahol μ az elektroforetikus mobilitás, ε az oldószer relatív permittivitása, ε_0 a vákuum permittivitása, η pedig az oldószer dinamikus viszkozitása.³⁴

A hidrodinamikai sugár mérését közvetlenül a dLDH és az antioxidánsok összemérése után valósítottuk meg, ugyanis valós időben követtük a változását. A minták 10 mg/L koncentrációban tartalmaztak dLDH részecskéket változó antioxidáns koncentrációk mellett. Dinamikus fényszórásmérés esetén a részecskék diffúziós koefficiense (D) alapján állapítottuk meg a részecskék hidrodinamikai sugarát (R_h) az Einstein–Stokes-egyenlet segítségével:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (5)$$

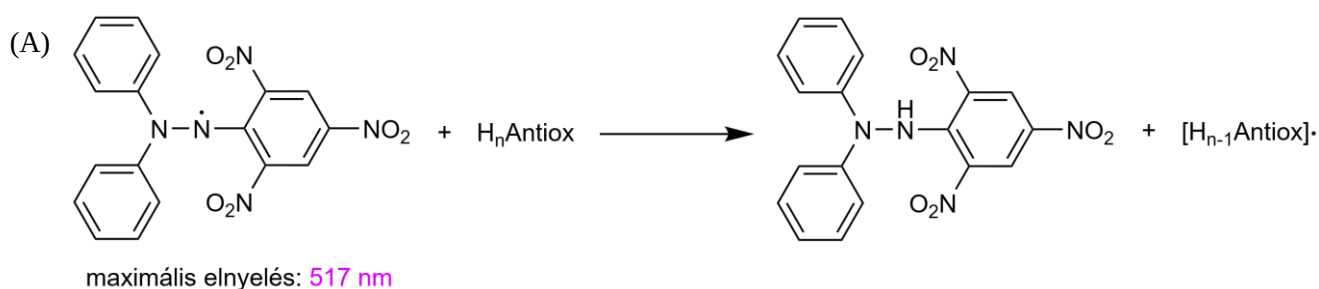
ahol k_B a Boltzmann-állandó, T pedig a termodinamikai hőmérséklet.³⁵

5.3. Antioxidánsok rögzülésének igazolása

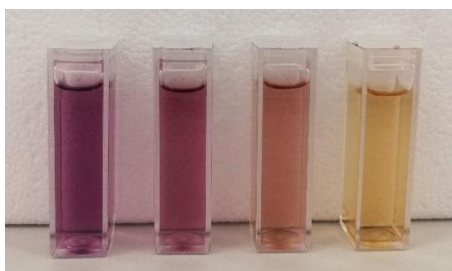
Az antioxidánsok dLDH felületén való rögzülésének igazolására UV-Vis méréseket végeztünk. Ehhez felvettük a GA/NADH keverékek, illetve a kompozitok UV-Vis spektrumát 0,4 és 1,5 arányok esetén, majd a kompozitok diszperzióját 100 nm pórusátmérőjű szűrővel leszűrtük és a felülúszó abszorbanciáját vizsgáltuk. A tesztekhez az antioxidáns tesztek során alkalmazott legmagasabb antioxidáns koncentrációk alkalmazásával végeztük.

5.4. Antioxidáns aktivitás meghatározása DPPH-teszttel

Az abszorbanciamérésekhez egy GENESYS 10S UV-Vis spektrofotométert használtunk. Az antioxidánsok gyöksemlegesítő hatásának megállapításához egy oldatban ideiglenesen eltartható nitrogéngyököt, a 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilt (DPPH) alkalmaztuk.³⁶ A DPPH szobahőmérsékleten szilárd anyag, etanolban mélylila színnel oldódik, fényelnyelési maximuma 517 nm-en mérhető. Fény hatására a gyök degradálódik, ezért az oldatokat a mérések előtt frissen készítettük. Reakciója során az antioxidánssal reakcióba lépve redukálódik (**4.A ábra**), a redukált forma oldatának színe citromsárga, így fényelnyelésének változása jól mérhető spektrofotométerrel (**4.B ábra**).



(B)



4. ábra – A: DPPH reakciója antioxidánssal. **B:** A DPPH-oldat színváltozása a reakcióelegyben lévő antioxidáns koncentrációjának növelésével.³⁷ (Az antioxidáns koncentráció az ábrán balról jobbra haladva nő.)

Az elegy 517 nm-en vizsgált abszorbanciája a reakció során csökken, a mért érték összefüggésbe hozható a reakció lejtésének mértékével. Az oldatban maradt DPPH mennyisége (DPPH%) megállapítható a reakció lejtését követően mért és a kezdeti abszorbancia hányadosaként:

$$\text{DPPH}\% = \left(\frac{A}{A_0} \right) 100 \quad (6)$$

ahol A a reakcióelegy abszorbanciája a reakció leteltét követően, A_0 pedig a kezdeti, antioxidáns nem tartalmazó DPPH-oldat abszorbanciája. Megadható az az antioxidáns-mennyiség is, mely az oldatban lévő gyökök felét semlegesíti, melyet EC_{50} -értéknek nevezünk.

A DPPH 46 mg/L koncentrációjú oldatát etanolban készítettük el. A szabad antioxidáns-oldatokkal kapcsolatos mérések során a DPPH-oldat 1 mL-éhez adtunk 1 mL-t az antioxidánsok vizes oldatából, melyben 0 és 40 μM között változtattuk az antioxidánsok koncentrációját. A dLDH kompozitból 850 mg/L-es diszperziót készítettünk, melyben az adszorbeált GA koncentrációja 25 μM volt, míg a NADH-é 62,5 μM a 0,4-es és 16,7 μM az 1,5-ös arány esetén. A kompozitok esetén a küvetába az 1 mL DPPH-oldathoz 360 μL 250 mM-os ecetsav-acetát puffert ($\text{pH} = 6$) adtunk, majd az antioxidánsok vizes oldatával kiegészítettük 2 mL-re.

Ahhoz, hogy kiértékelhessük az antioxidánsok által kifejtett együttes aktivitást, kiszámoltuk a DPPH-csökkenést ($\Delta\text{DPPH}\%$) a (7) egyenlet alapján:

$$\Delta\text{DPPH}(\%) = \text{DPPH}(\%)_{\text{Antiox}} - \text{DPPH}(\%)_{\text{Antiox mix}} \quad (7)$$

ahol a $\text{DPPH}(\%)_{\text{Antiox}}$ az adott antioxidáns aktivitása, $\text{DPPH}(\%)_{\text{Antiox mix}}$ pedig az antioxidánsok keverékének aktivitása (mindkét esetben azonos koncentrációjú antioxidáns véve).

Az antioxidánsok között fellépő kölcsönhatások értékelésére a kombinációs indexüket (CI) használtuk a (8) egyenlet alapján.

$$\text{CI} = \frac{\text{EC}_{50}(\text{első antioxidáns a keverékben})}{\text{EC}_{50}(\text{első antioxidáns egyedül})} + \frac{\text{EC}_{50}(\text{második antioxidáns a keverékben})}{\text{EC}_{50}(\text{második antioxidáns egyedül})} \quad (8)$$

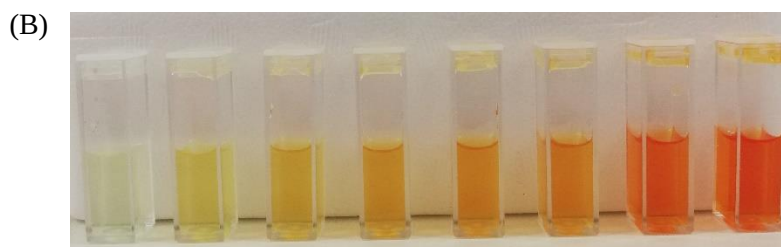
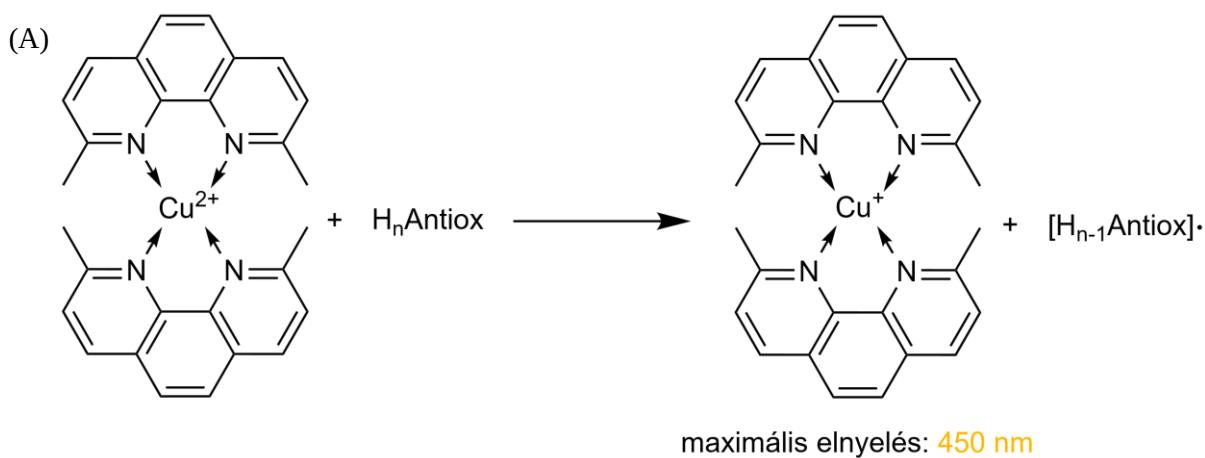
dLDH-t tartalmazó rendszerekben a CI-értékeket az EC_{25} értékek alapján számoltunk (az az antioxidáns koncentráció, mely a gyökök negyedét semlegesíti), mivel bizonyos kompozitok nem érték el az 50%-os aktivitást. Az antioxidánsok között fellépő hatás szinergikus, additív vagy antagonikus, ha számított kombinációs indexük rendre $\text{CI} < 1$, $\text{CI} = 1$ vagy $\text{CI} > 1$.

A DPPH-teszt relatív hibája 5%.

5.5. Rézredukáló antioxidáns kapacitás (CuPRAC-teszt)

A kompozitok aktivitásának igazolása végett az aktivitást CuPRAC teszttel is vizsgáltuk.³⁸ A reakció során az antioxidánsok a réz(II)-ionokat réz(I)-ionokká redukálják (5.A ábra). A rézionoknak önmagukban nincs jól mérhető abszorbanciája, neokuproinnal alkotott komplexük azonban színes, így jól használható redoxállapotuk vizsgálatára. Míg a kiindulási komplex (Cu(II)Nc_2) színe halványzöld, a vizsgált

hullámhosszon abszorbanciája alacsony, addig a redukció során képződő Cu(I)Nc₂ narancssárga színű, az oldat abszorbanciája jelentősen növekszik (**5.B ábra**)



5. ábra – A: Cu(II)Nc₂ komplex antioxidáns molekula hatására történő redukciója.

B: A Cu(II)Nc (halványzöld) komplex oldatának színváltozása növekvő antioxidáns koncentráció esetén.

(Az antioxidáns koncentrációja balról jobbra növekszik.)

A teszt elvégzéséhez CuCl₂ (0,01 M) és neocuproin (0,02 M) keverékét etanol-víz 4:1 arányú keverékében feloldottuk, majd az oldat 250 µL-ét az antioxidánsok oldatával és hozzáadott vízzel összesen 2050 µL-re egészítettük ki (a reakcióelegyben az antioxidánsok koncentrációja a 0-50 µM tartományban változott). A mért abszorbanciaértékeket az antioxidánsok koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, majd a pontokra egyenest illesztve azok meredekségét a trolox (mint referencia molekula) meredekségéhez viszonyítottuk. Így megkaptuk a trolox ekvivalens antioxidáns kapacitást (TEAC):

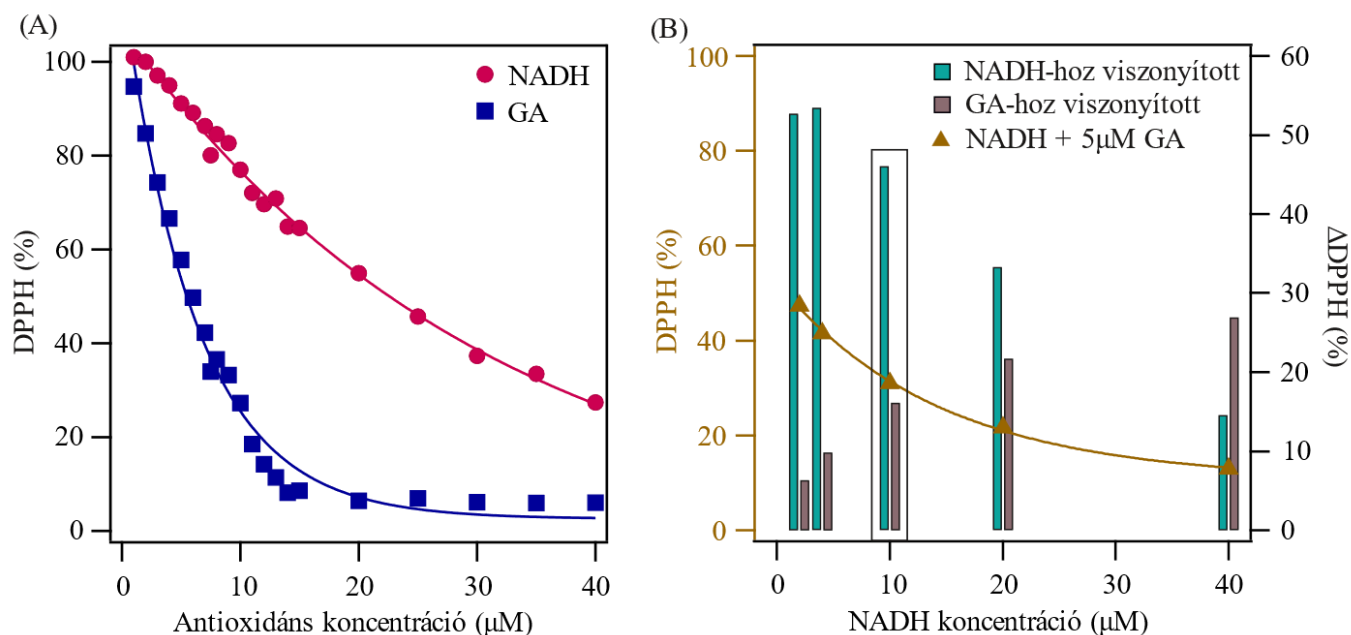
$$\text{TEAC} = \frac{\text{meredekség}_{\text{antioxidáns}}}{\text{meredekség}_{\text{trolox}}} \quad (9)$$

A CuPRAC-teszt relatív hibája 5%.

6. Eredmények értékelése

6.1. GA és NADH antioxidáns aktivitása

Elsőként a GA és a NADH antioxidáns aktivitását vizsgáltuk meg DPPH-tesztel. Az eredmények a **6.A ábrán** láthatók, ahol a kezdeti antioxidáns-koncentráció függvényében ábrázoltuk a megmaradt DPPH mennyiségét. Az antioxidáns koncentrációjának növelésével csökkent a DPPH mennyisége. Az illesztett függvények alapján kiszámoltuk az antioxidánsok EC_{50} értékeit: a GA esetén $6,0\ \mu\text{M}$, a NADH esetén $22,6\ \mu\text{M}$ volt, melyből nyilvánvalóvá vált, hogy a GA jóval erélyesebb redukálószer mint a NADH.

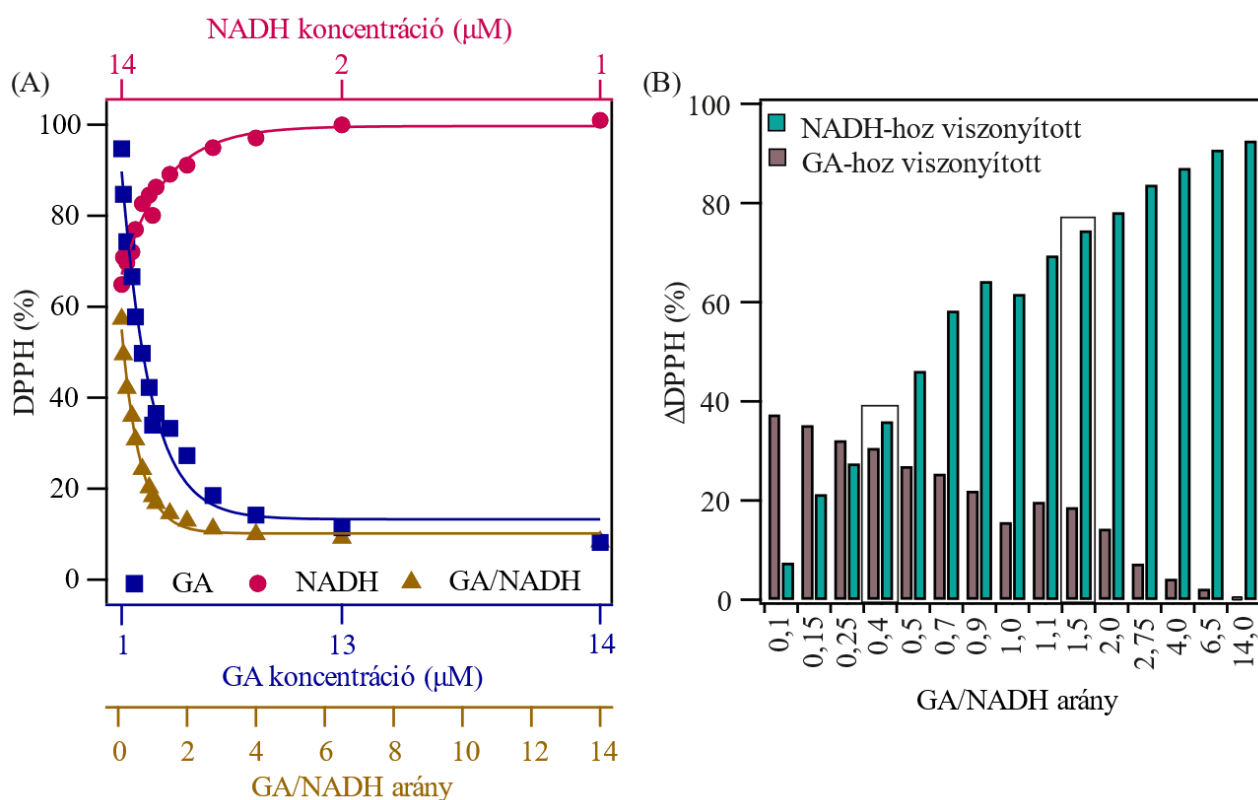


6. ábra – A: Az oldatban maradt DPPH mennyisége különböző antioxidáns koncentrációk mellett. **B:** Az oldatban maradt DPPH mennyisége változó NADH koncentrációi esetén (bal tengely), és $\Delta\text{DPPH}(\%)$ állandó GA ($5\ \mu\text{M}$) és változó NADH koncentráció esetén (jobb tengely, oszlopdiagramok).

Együttes aktivitásuk meghatározásához a GA koncentrációját állandó $5\ \mu\text{M}$ -os értéken tartva változtattuk a NADH koncentrációját. A **6.B ábrán** a NADH koncentrációjának függvényében ábrázoltuk a DPPH mennyiségének csökkenését (bal tengely). Minél több NADH-t adtunk hozzá, annál kevesebb gyökös DPPH maradt az oldatban. Ha a (7) egyenlet alapján kiszámoljuk, hogy az antioxidánsok milyen mértékben járulnak hozzá az együttes aktivitáshoz, a $\Delta\text{DPPH}(\%)$ -okat ábrázolva értelmezhetjük azt (**6.B ábra**, jobb tengely, oszlopdiagramok).

Noha a legmagasabb antioxidáns aktivitást 2 és $4\ \mu\text{M}$ -os NADH koncentráció mellett kaptuk (első két oszloppár, teljes antioxidáns koncentrációk 7 és $9\ \mu\text{M}$), a keverék GA-hoz viszonyított aktivitás-változása alacsony volt, $10\ \mu\text{M}$ NADH koncentráció mellett a NADH aktivitásához viszonyított DPPH-változás megközelítette az 50% -ot, valamint a GA-hoz viszonyított is meghaladta a 10% -ot (ekkor $15\ \mu\text{M}$ a teljes

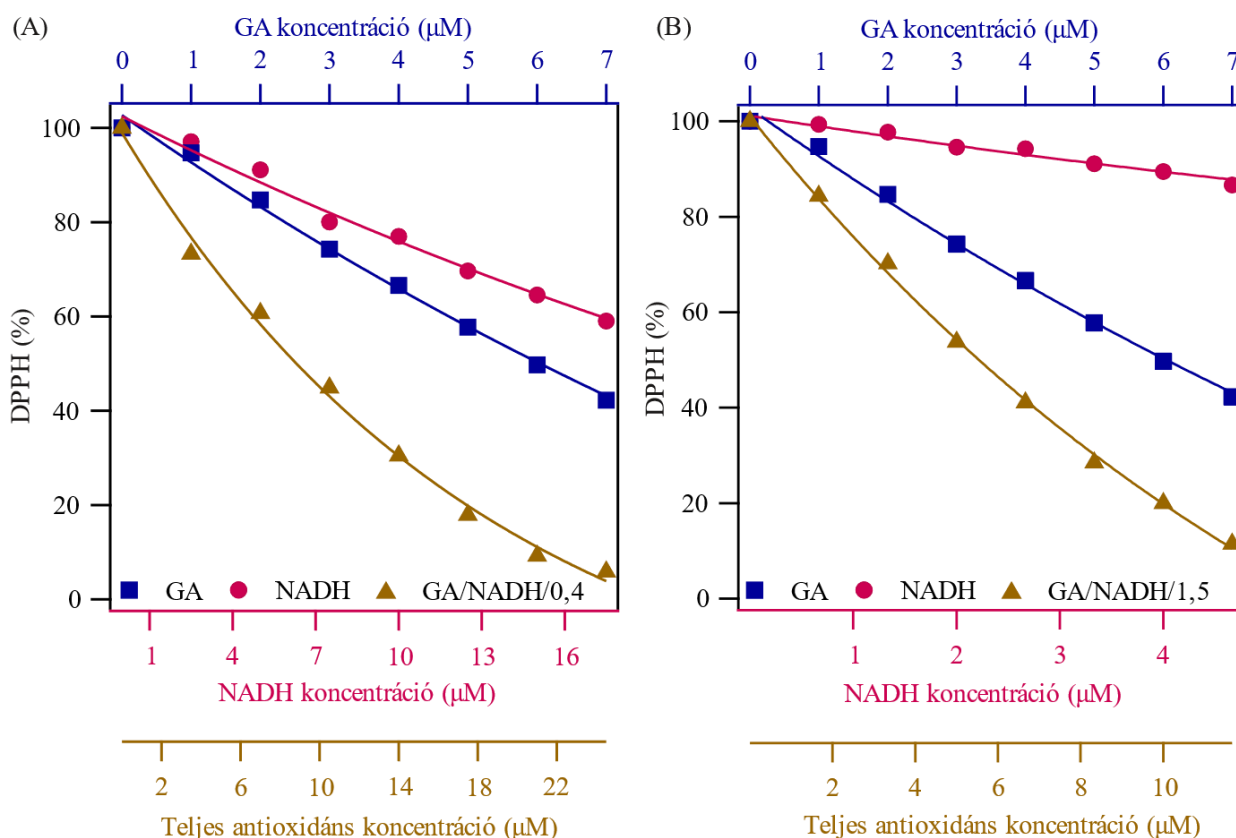
antioxidáns koncentráció), így a megfelelő arány meghatározásához a továbbiakban 15 μM -os összkoncentrációjú antioxidáns-oldatokat alkalmaztunk. A **7.A ábrán** 15 μM -os összkoncentrációban vett antioxidánsok saját, valamint a különböző arányú keverékük összetételének függvényében ábrázoltuk a megmaradt DPPH mennyiségét. A keverék minden koncentrációarányban jobb aktivitást produkált, mint az azonos koncentrációjú, de önmagukban vett antioxidánsok, mely ígéretes eredménynek bizonyult. A 0,4-es arányú GA-NADH keverék (GA/NADH/0,4) esetén a $\Delta\text{DPPH}(\%)$ mindkét antioxidánsra jóformán azonosnak adódott (**7.B ábra**), további vizsgálatokra alkalmasnak találtuk. Ahhoz, hogy egy többségében GA-t tartalmazó keveréket is megvizsgáljunk, az 1,5-es GA-NADH arányt (GA/NADH/1,5) is felhasználtuk későbbi méréseinkhez: itt a NADH-hoz viszonyított $\Delta\text{DPPH}(\%)$ jelentősen nőtt, míg a GA-é ~20% volt.



7. ábra – A: Az antioxidánsok aktivitásai, valamint 15 μM -os keveréknél mért antioxidáns aktivitás különböző GA-NADH arányok esetén. **B:** Az antioxidánsok hozzájárulása az együttes aktivitáshoz különböző arányú keverékeikben.

Megvizsgáltuk a GA/NADH/0,4 és a GA/NADH/1,5 gyöksemlégesítő hatását (**8. ábra**), majd kiszámítottuk a keverékek EC_{50} értékeit. A 0,4-es arány esetén ez 8,8 μM -nak adódott, mely jelentősen eltér az antioxidánsok saját értékeitől. 0,4-es arány esetén az oldat 4,3 μM GA-t és 10,7 μM NADH-t tartalmazott, mely azt jelentette, hogy mindkettő a saját EC_{50} értékénél alacsonyabb koncentrációban

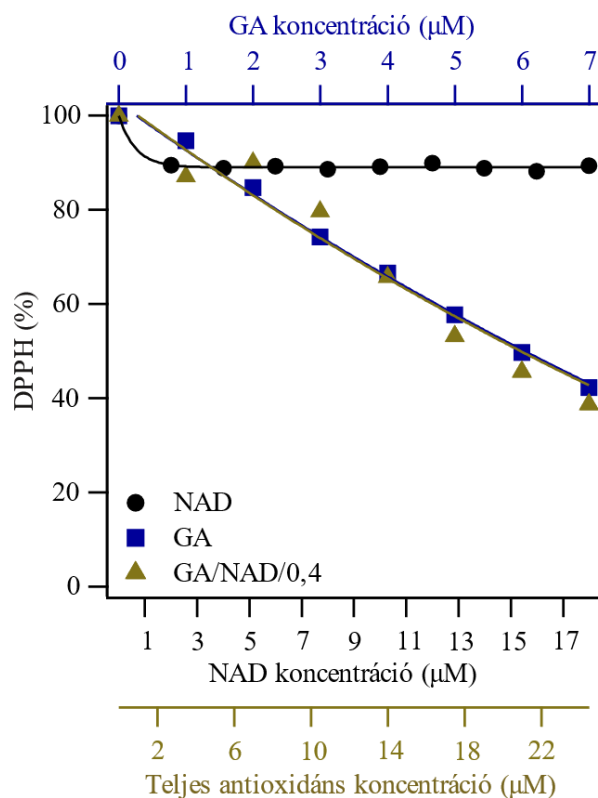
($EC_{50,GA} = 6,0 \mu M$, $EC_{50,NADH} = 22,6 \mu M$) volt jelen a keverékben. Az 1,5-ös antioxidáns arány esetén az EC_{50} érték $5,5 \mu M$ volt, mely alapján látható, hogy a keverék a tiszta GA-nál is jobb redukáló hatást váltott ki. A CI-értékek a fenti arányokra rendre 0,70 és 0,65 voltak, melyek szinergizmusra utaltak, tehát az antioxidánsok mindkét arány esetén képesek voltak növelni egymás aktivitását.



8. ábra – GA és NADH 0,4 arányú (A) és 1,5 arányú (B) keverékének antioxidáns aktivitása.

Ha követjük az irodalomban bevett modellt a szinergikus hatás megmagyarázására, akkor esetünkben a GA-ból képződő gyököt az alacsonyabb redoxpotenciálú NADH regenerálja, ezzel ismét felszabadítva egy aktív antioxidánst.³⁹ Amennyiben helyes a modell, akkor a NADH oxidált formája (NAD) nem tud szinergikus hatást kifejteni.

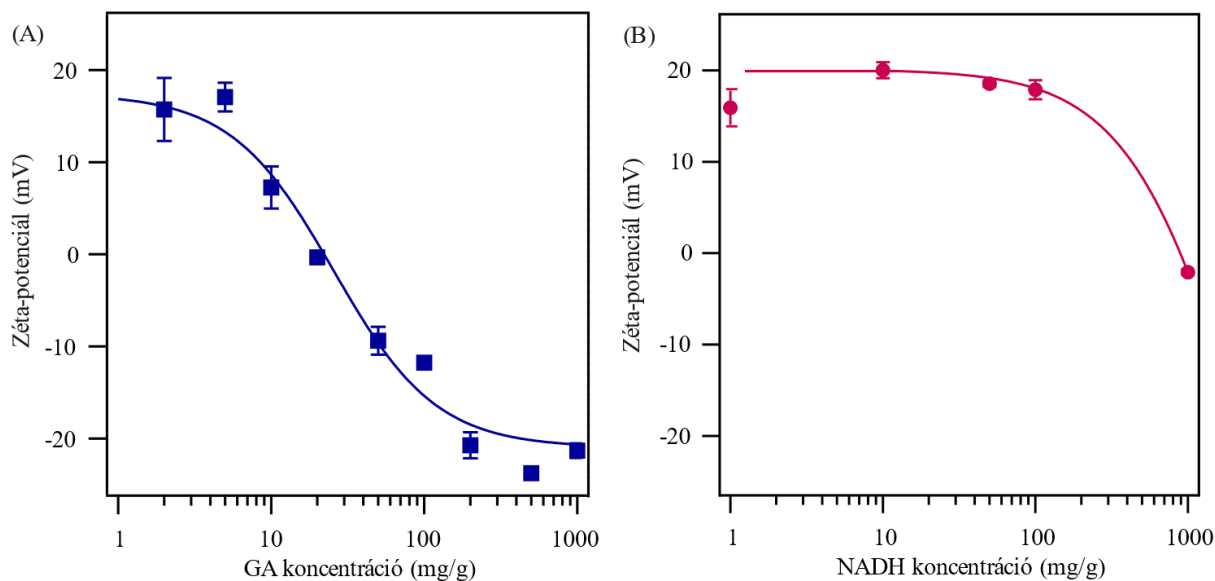
A NAD a piridingyűrűs eltérésén kívül strukturálisan azonos redukált formájával. A NAD a kísérleteinkben nem rendelkezett antioxidáns aktivitással, valamint a GA-ra nem gyakorolt hatást (**9. ábra**). A GA-NAD 0,4-es arányú keverék EC_{50} értéke $20,9 \mu M$ volt, amiben $6,0 \mu M$ GA és $14,9 \mu M$ NAD volt jelen. Mivel a GA EC_{50} értéke szintén $6 \mu M$, ezért arra következtethetünk, hogy az aktivitásért a keverékben is csak a GA volt felelős, a NAD jelenléte nem befolyásolta azt. A szinergizmus létrejöttéhez tehát szükség van a redukált forma jelenlétére, mely részt tud venni az elektrontranszferben.



9. ábra – GA, NAD, valamint keverékük gyöksemlegesítő hatása.

6.2. GA és NADH immobilizálása dLDH felületén

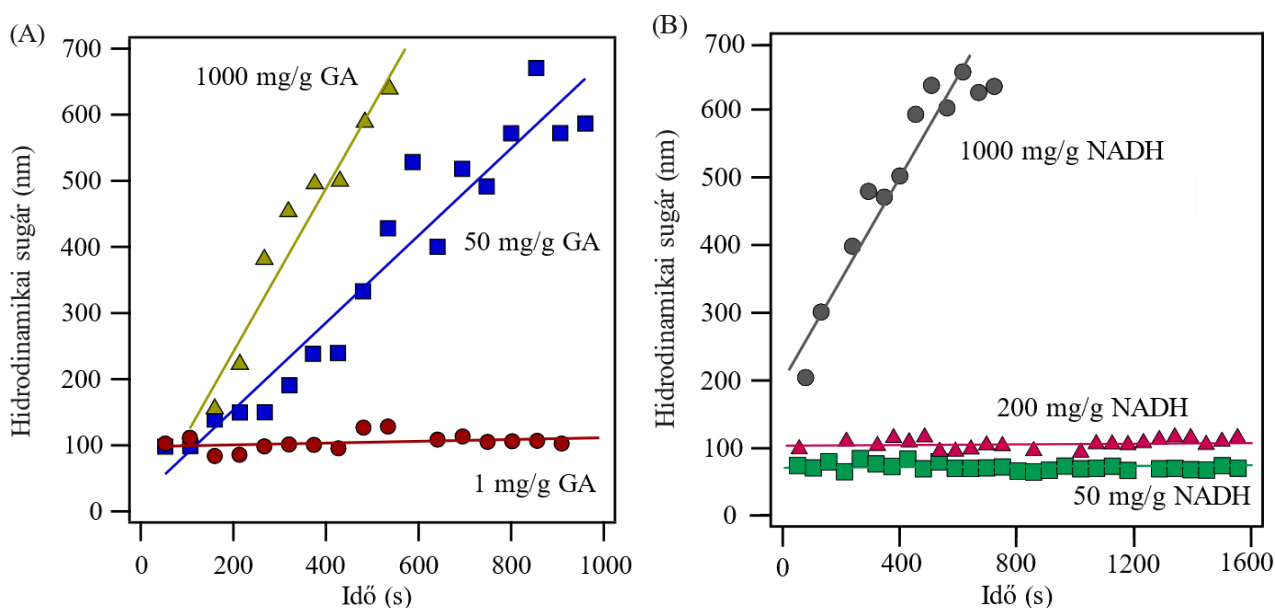
Az antioxidánsok rögzítését dLDH felületén elektroforetikus fényszórásméréssel követtük. A kompozit előállításához első lépésben a GA molekulákat rögzítettük dLDH nanorészecskék felületén. Alacsony GA dózisoknál a részecskék töltése nem változott számottevően (10.A ábra), 10 és 50 mg/g-os koncentrációk között azonban a zéta-potenciál jelentősen csökkent, elérte a 0 mV-ot. Ennél a koncentrációnál (20 mg/g) az adszorbeálódott GA molekulák leárnyékolták a dLDH részecskék pozitív töltését, elértük az izoelektromos pontot. A dózis további növelésével a zéta-potenciál előjele megváltozott, a nanorészecskék negatív töltésűek lettek, az adszorpció telítési plató 200 mg/g GA dózisonál kezdődött. A NADH adszorpciója kisebb mértékben befolyásolta a részecskék töltését (10.B ábra). Alacsony koncentrációknál nem volt tapasztalható a dLDH zéta-potenciáljának szignifikáns változása, a nanorészecskék töltésének semlegesítődése is jelentősen nagyobb (~1000 mg/g) koncentrációk esetén következett be. Az adszorpcióban megfigyelhető jelentős különbség oka a GA-ban megtalálható karboxilcsoportnak köszönhető, mely jelentős affinitást mutat a dLDH felületéhez.⁴⁰



10. ábra – A dLDH részecskék zéta-potenciálja az alkalmazott GA- (A) és NADH-dózis (B) függvényében.

A részecskék zéta-potenciálja jó összefüggést mutat a kolloid rendszer stabilitásával. Nagy abszolút értékben vett potenciálértékek esetén a nanorészecskék között elektrosztatikus taszítás lép fel a bennük felhalmozott töltések következtében. Az izoelektromos pont közelében a taszítás mértéke lecsökken, és már nem tudják kompenzálni a vonzó kölcsönhatásokat, mely a kolloid részecskék aggregációjához vezet.

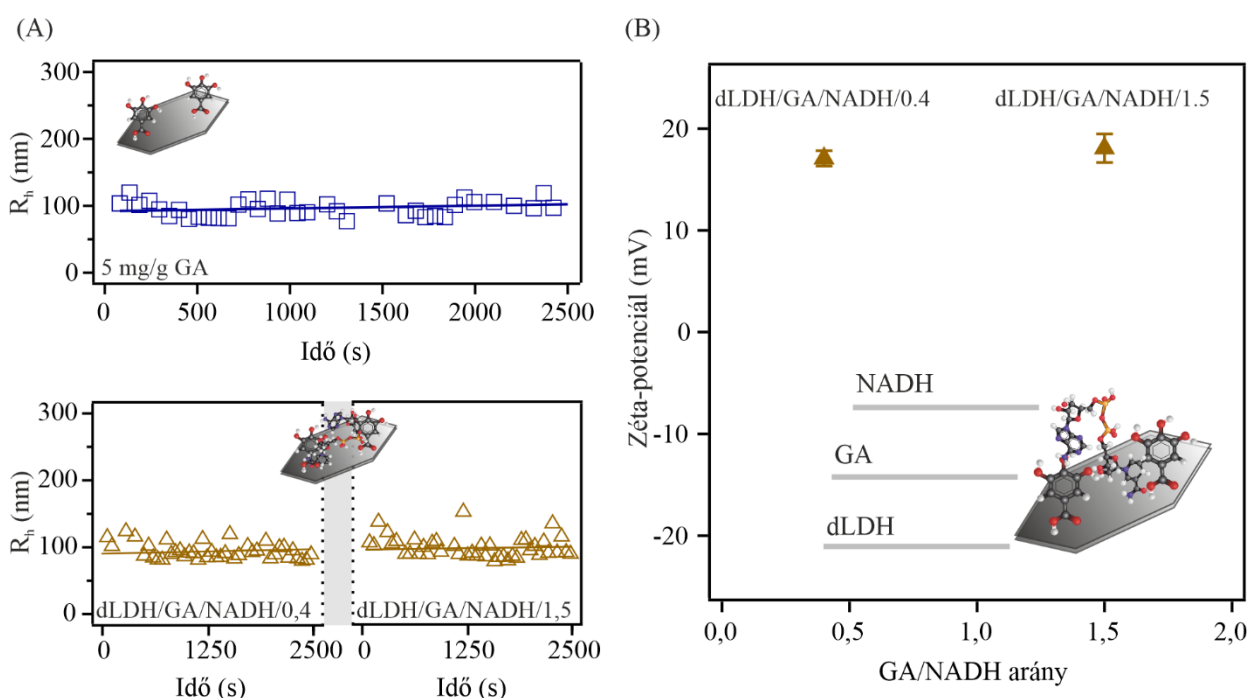
Alacsony GA koncentrációknál a nanorészecskék töltése nem változott, a diszperzió stabil volt, a hidrodinamikai sugár nem változott időben (11.A ábra).



11. ábra – GA- (A) és NADH-tartalmú (B) dLDH kompozitok időfüggő aggregációja

Magasabb GA koncentrációk esetén a hidrodinamikai sugár gyorsan nőtt, a részecskék aggregálódtak. A NADH hidrodinamikai sugarát megmértük azt tapasztaltuk, hogy jelentősen nagyobb dózisoknál tapasztalható csak a nanorészecskék aggregációja (**11.B ábra**).

A további mérésekhez 5 mg/g GA dózist választottunk, ekkora dózis mellett a diszperzió stabil volt (**12.A ábra**). Az 5 mg/g GA koncentráció mellé a 0,4 és 1,5 arányoknak megfelelően adszorbeáltunk NADH-t, mert ezeknél az arányoknál tapasztaltunk kiemelkedő szinergizmust a szabad antioxidánsok esetén is. Ezek összetétele: 5 mg/g (0,29 μ M) GA és 48 mg/g (0,72 μ M) NADH a 0,4 arány esetén (dLDH/GA/NADH/0,4), míg az 1,5 esetében 5 mg/g (0,29 μ M) GA és 13 mg/g (0,19 μ M) NADH (dLDH/GA/NADH/1,5).

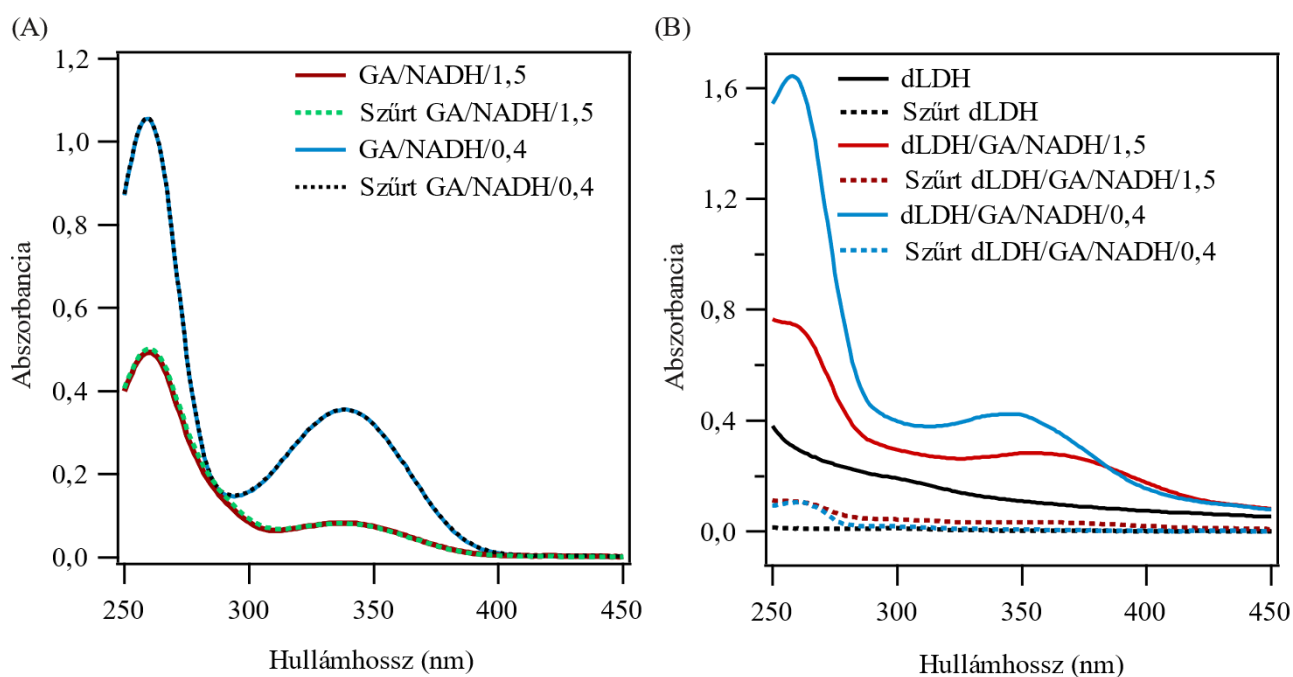


12. ábra – A: dLDH/GA, dLDH/GA/NADH/0,4 és dLDH/GA/NADH/1,5 kompozitok hidrodinamikai sugarának időfüggése. **B:** A mindkét antioxidánst tartalmazó kompozitok zéta-potenciálja.

Az antioxidánsok együttes adszorpciója nem befolyásolta a hidrodinamikai sugár (**12.A ábra**) és zéta-potenciál (**12.B ábra**) értékeit, tehát a diszperziók stabilak maradtak az antioxidánsok adszorpciója után is. A későbbi antioxidáns tesztekhez szükséges összehasonlítások miatt a GA-t és a NADH-t külön-külön is rögzítettük dLDH-k felületén, 5 mg/g, illetve 50 mg/g dózisban, a stabil diszperziók megtartása érdekében.

Az adszorpció további bizonyítására UV-Vis spektroszkópiás méréseket végeztünk a keverékek és a diszperziók szűrletén is. A szabad antioxidánsok 0,4 és 1,5 arányú keverékeinek, valamint szűrletüknek spektruma a **13.A ábrán** látható. A szűrés nem befolyásolta a keverékek UV-Vis spektrumát, vagyis a GA

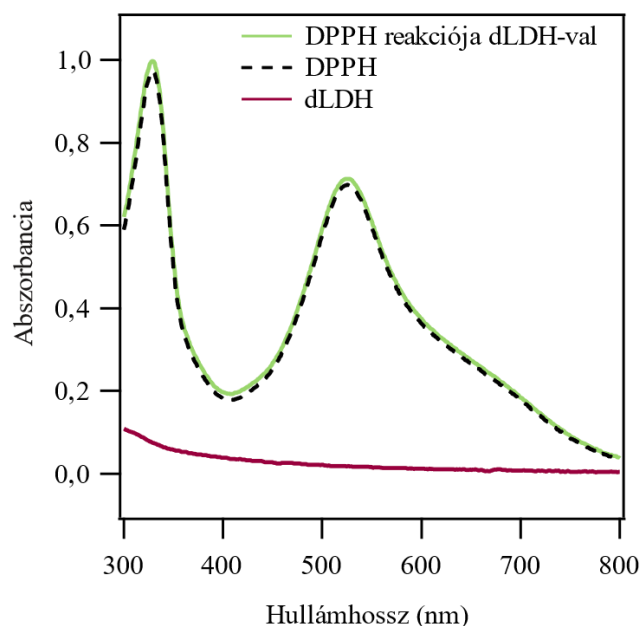
és a NADH is képes volt átjutni a szűrőn. A kompozitok UV-Vis spektrumai esetén megfigyelhető volt (13.B ábra), hogy szűrés nélkül ugyanúgy megjelentek az antioxidánsokra jellemző csúcsok a spektrumokon, mint a keverékek esetén, azonban szűrés után a szűrleteken végzett tesztek esetén más eredményeket kaptunk. Mivel a nanorészecskék nem képesek átjutni a szűrő pórusain, így a szűrletek nem tartalmaztak dLDH részecskéket, tehát sikeres adszorpció esetén antioxidánsokat sem. Mivel a szűrletek esetén minimális mértékben jelentek meg az antioxidánsokra jellemző elnyelési maximumok, így kijelenthetjük, hogy az adszorpció sikeres volt, a GA és a NADH rögzült a dLDH részecskék felületén, így nem voltak képesek átjutni a szűrőn.



13. ábra – GA és NADH keverékének, valamint a keverék szűrletének UV-Vis spektruma (A) és a dLDH diszperzió, a különböző arányú kompozitok, valamint szűrleteik UV-Vis spektruma (B).

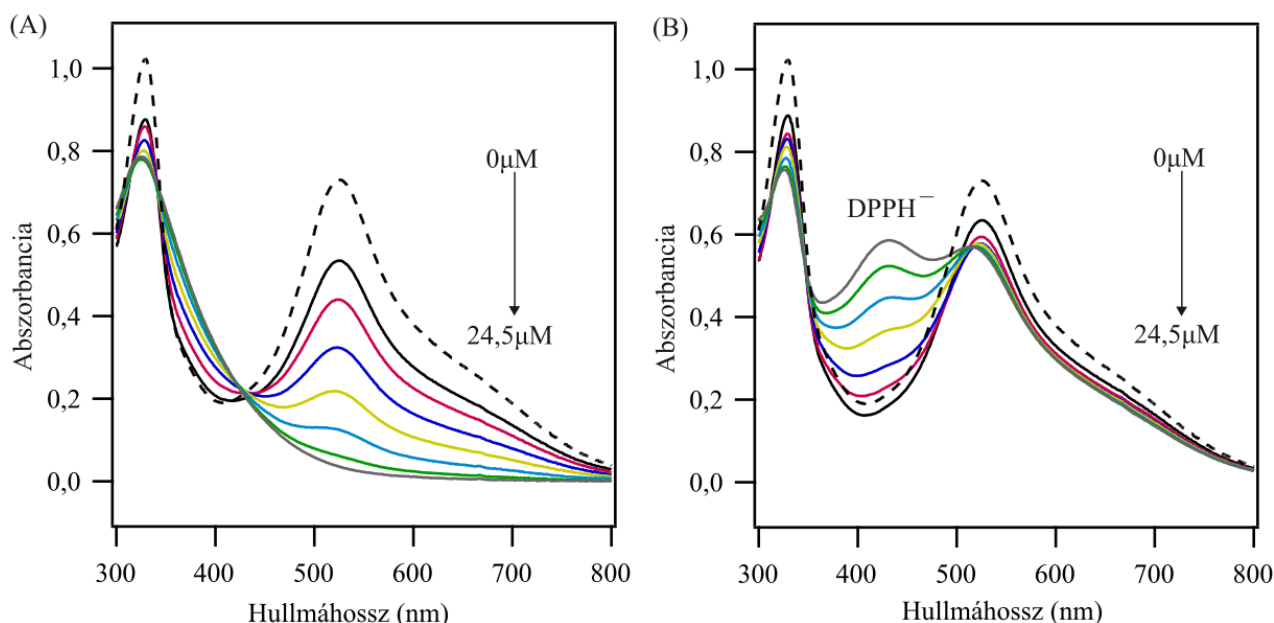
6.3. dLDH/GA/NADH kompozitok gyöksemlegesítő antioxidáns aktivitása

Kezdetben a korábban ismertetett módon, DPPH-teszt segítségével szeretnénk volna meggyőződni a kompozitok antioxidáns aktivitásáról. Ehhez előbb meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy a dLDH nem járul hozzá a gyök semlegesítéséhez, és saját abszorbanciája nem zavarja a kiértékelést. A 14. ábra jól szemlélteti, hogy egyik tényező sem áll fenn.



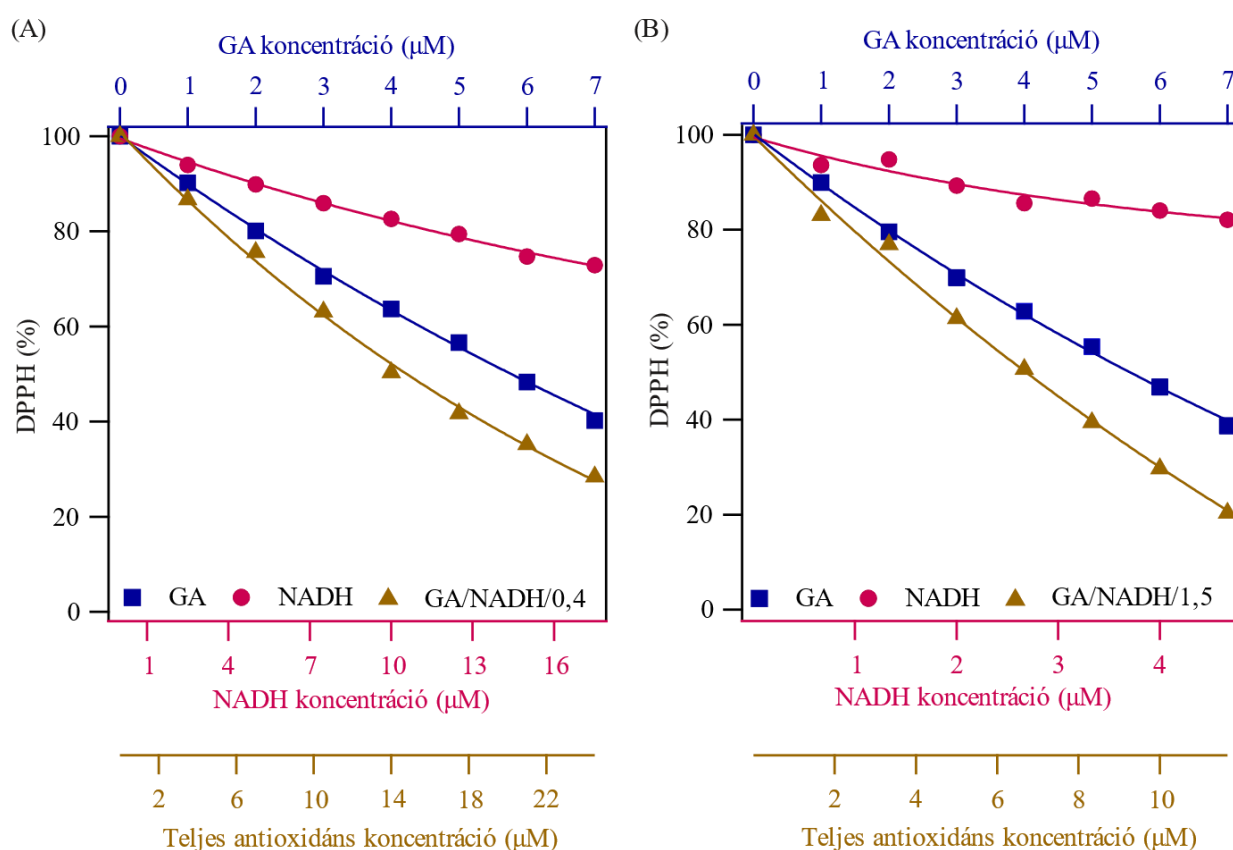
14. ábra – A dLDH fényelnyelése, valamint a DPPH-dLDH keverék abszorbanciája.

Ezt követően a korábban említett módon megkezdjük a kompozitok tesztelését DPPH-teszttel. A kapott spektrum azonban jelentősen eltért a korábban tapasztaltaktól (**15. ábra**): az 517 nm-es csúcs csökkenése helyett 420 nm-en új csúcs jelent meg. Ez a bázikus közegben keletkező DPPH^- ionok jelenlétének következménye, mely a redukálódott DPPH-ből keletkezik deprotonálódással. Az *Alkalmazott módszerek* fejezetben említett módon a további kísérletekben acetátpuffer (pH = 6) segítségével kizártuk a DPPH^- képződését.⁴¹



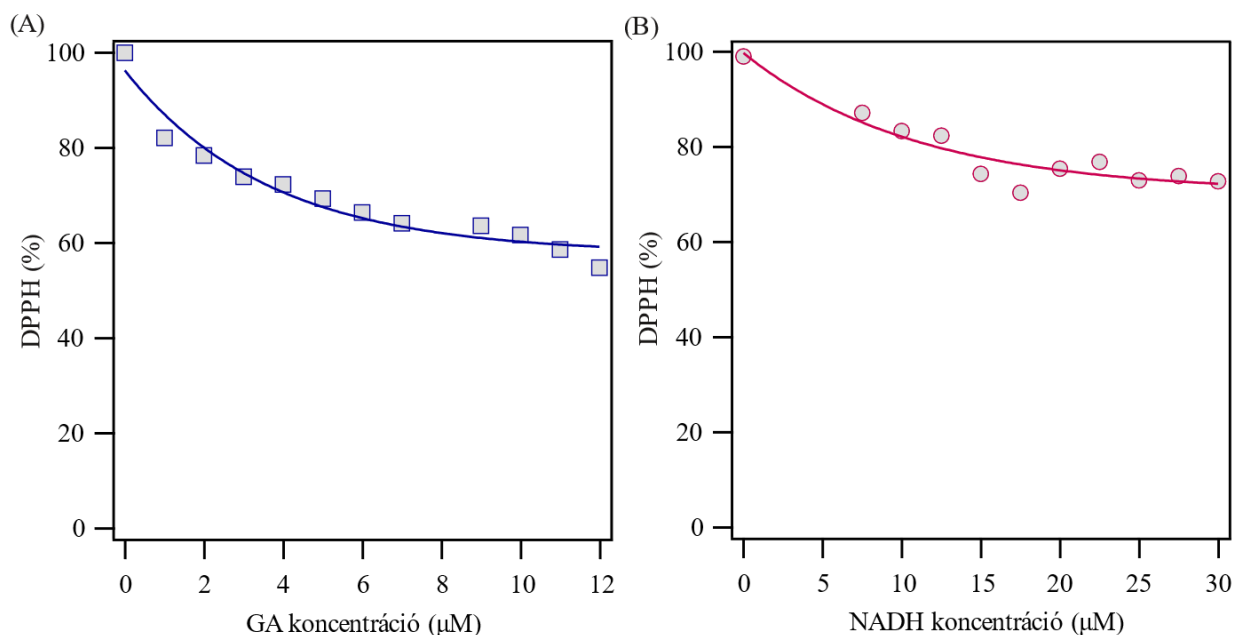
15. ábra – Az antioxidánsokon végzett mérések korábbi tendenciája (**A**), és a kompozitok antioxidáns aktivitásának vizsgálatakor megjelenő új csúcs (**B**).

A kompozitok aktivitásának vizsgálata előtt azonban azt is meg kellett vizsgálnunk, hogy ez a módosított pH hogyan befolyásolja az antioxidánsok aktivitását, így ismét elvégeztük a DPPH-teszteket acetátpuffer jelenlétében. A GA esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, a NADH esetén ugyanakkor számottevően emelkedett annak EC_{50} értéke, mely a keverékük aktivitását is kedvezőtlenül befolyásolta (**16. ábra**). A GA/NADH/1,5 kisebb mértékben romlott, mint a GA/NADH/0,4, vélhetőleg az alacsonyabb NADH koncentrációja miatt. A keverékek CI-értékei is megváltoztak, 0,4 arány esetén 0,92, míg az 1,5 arány esetén 0,75-re emelkedett. A CI-értékek változása a szinergikus hatás csökkenését jelezte, azonban továbbra is megfigyelhető hatása a rendszerekben.



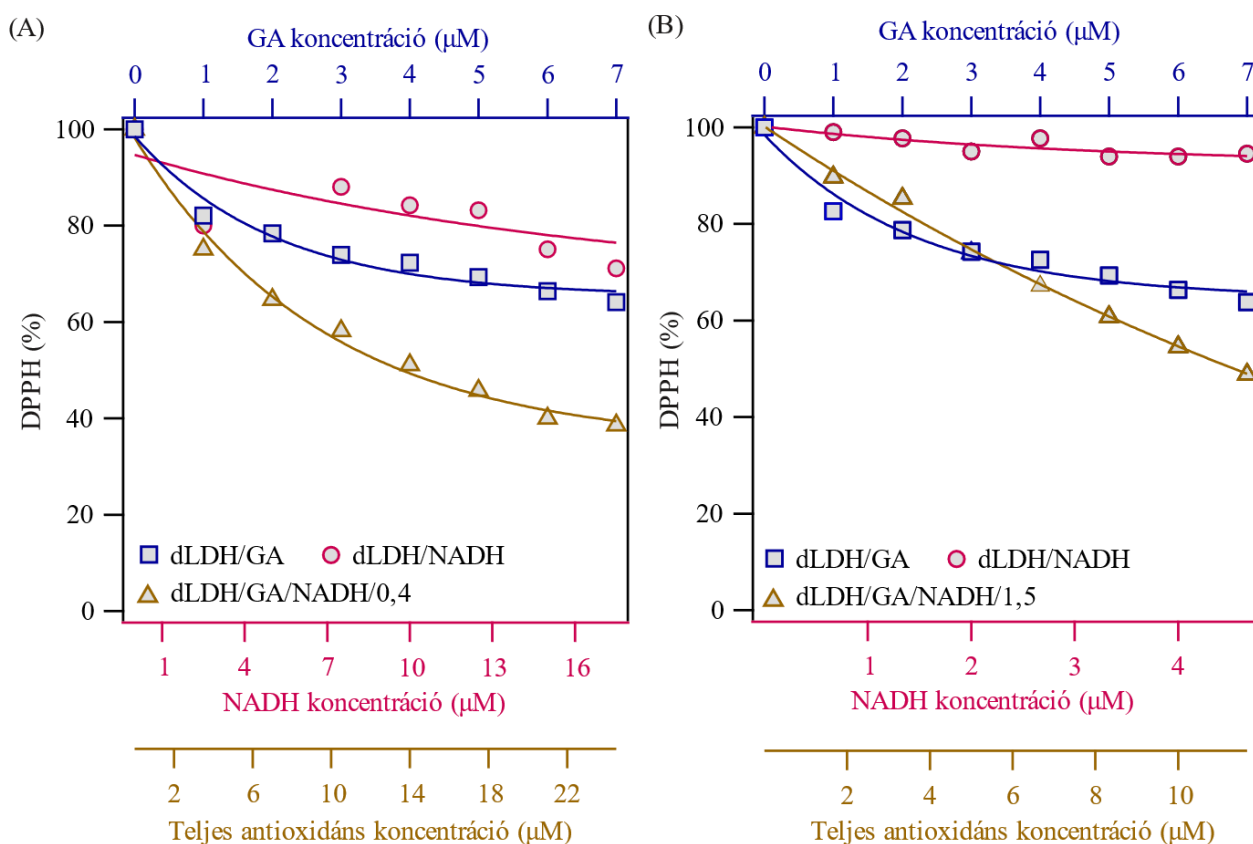
16. ábra – Az antioxidánsok, illetve 0,4 arányú (A) és 1,5 arányú (B) keverékük gyöksemlegesítő hatása 6-os pH-n.

A dLDH felületén külön-külön adszorbeált GA és NADH antioxidáns aktivitása 6-os pH-n jelentősen csökkent, olyan mértékben, hogy nagy koncentrációk esetén sem tudták semlegesíteni a szabadgyökök felét, így EC_{50} -értéket sem lehetett hozzájuk rendelni. A **17. ábra** széles koncentrációtartományban vett kompozit diszperziók aktivitását mutatja, melyen látható, hogy a gyöksemlegesítő hatás egy idő után állandósult, az oldatban maradt DPPH mennyisége nem csökkent tovább.



17. ábra – Immobilizált GA (A) és NADH (B) koncentrációfüggő gyöksemlegesítő hatása.

Ezzel ellentétben az együttesen adszorbeált antioxidánsok aktivitása jelentősen emelkedett individuális hatásukhoz képest (**18. ábra**); 13,4 és 11,4 μM-os EC_{50} -értéket eredményezve a 0,4 és 1,5 arányok esetében.



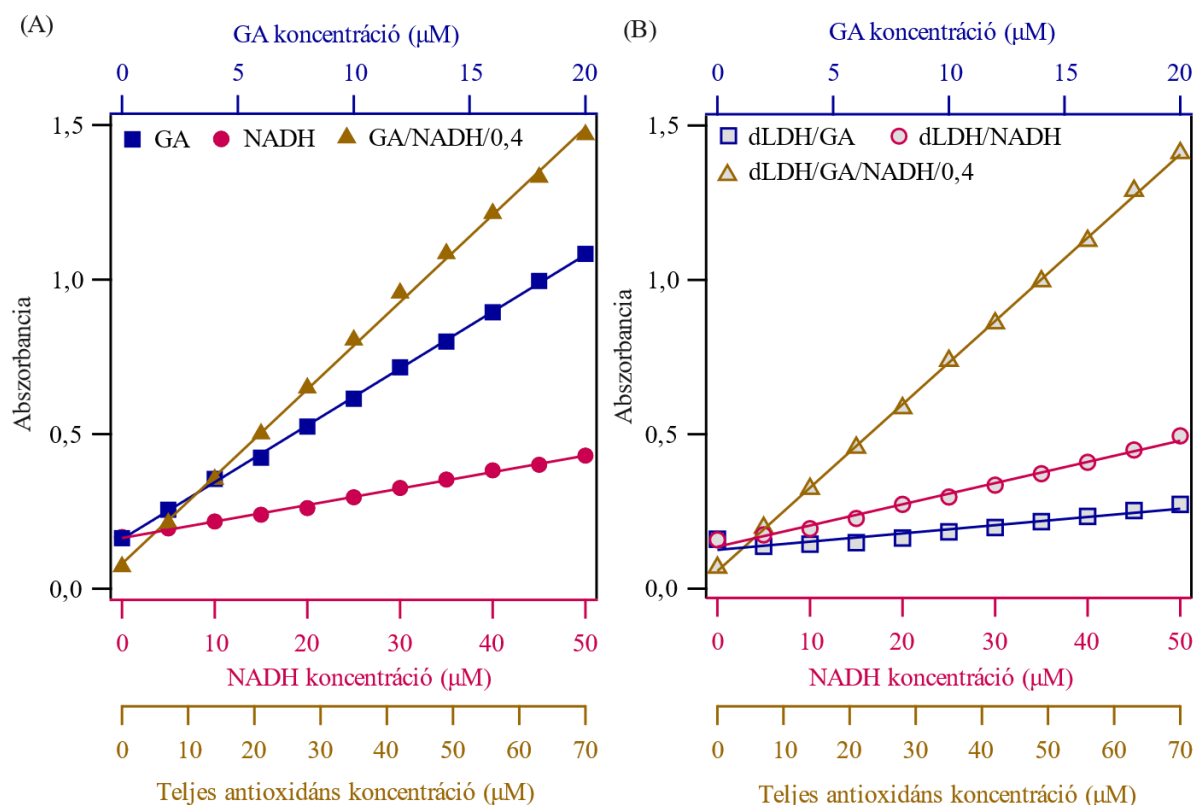
18. ábra – dLDH-n rögzített antioxidánsok és 0,4 arányú (A), illetve 1,5 arányú (B) keverékük gyöksemlegesítő hatása immobilizáció után (pH = 6).

Együttes immobilizálás hatására tehát számottevő antioxidáns aktivitást sikerül elérni, míg a külön-külön rögzített antioxidánsok aktivitása jelentősen lecsökkent. A 6-os pH-n mért antioxidáns keverékek aktivitásához képest kissé emelkedtek az EC_{50} -értékek de hatásuk még mindig szignifikáns maradt.

A CI-értékek meghatározásához az EC_{25} -értékeket használtuk, mivel a külön-külön adszorbeált antioxidánsok egyik esetben sem érték el az 50%-os hatást. A dLDH/GA/NADH/0,4 esetén a rendszer CI-értéke 0,74, tehát ebben az esetben is szinergizmus volt megfigyelhető az antioxidánsok között, míg 1,5-ös aránynál ettől eltérő eredményt tapasztaltunk. Ebben az esetben a CI 1-nél nagyobb értéket, 1,49-et eredményezett, mely a két molekula között fellépő antagonizmusra utal. Ugyanakkor meg kell említenünk, hogy magasabb koncentrációknál a dLDH/GA/NADH/1,5 rendszer képes volt semlegesíteni a gyökök több, mint felét, elérte az 50%-os hatást, melyre a külön-külön rögzített antioxidánsok nem voltak képesek. Ebből arra következtethetünk, hogy magasabb koncentrációk esetén, melyeknél a dLDH/GA/NADH/1,5 rendszer eléri az EC_{50} értéket, érvényesülhet a molekulák között fellépő szinergizmus.

6.4. Az antioxidánsok és kompozitjaik antioxidáns aktivitása (CuPRAC-teszt)

Az antioxidánsok teljeskörű vizsgálata érdekében a CuPRAC-tesztet is elvégeztük (19. ábra).

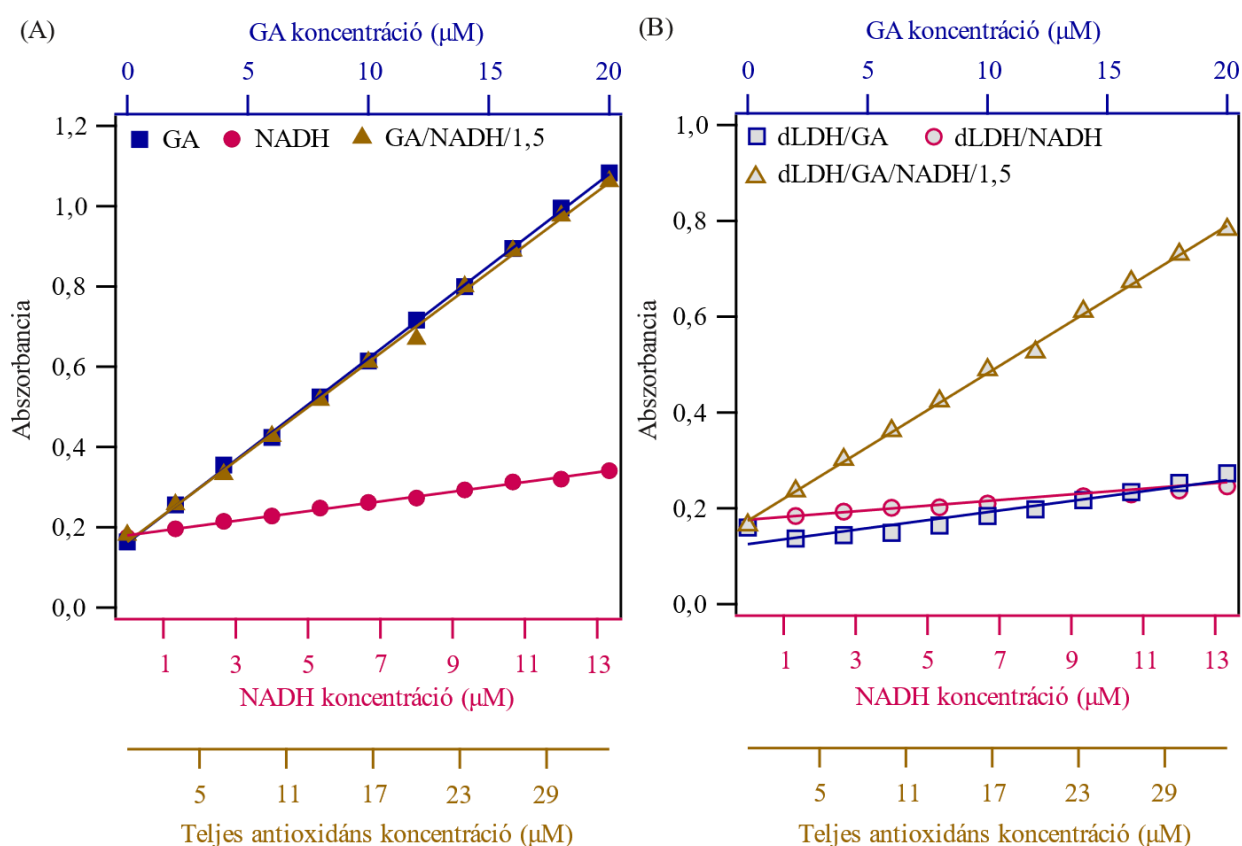


19. ábra – A: GA, NADH és ezek 0,4 arányú keverékeinek antioxidáns aktivitása 6-os pH-n.

B: dLDH-n rögzített GA, NADH és ezek 0,4 arányú keverékeinek antioxidáns aktivitása 6-os pH-n.

A GA a CuPRAC-teszt eredményei alapján is erősebb antioxidánsnak bizonyult, mint a NADH. A CuPRAC-teszt esetén az antioxidánsok 0,4 arányú keveréke nem eredményezett szinergikus hatást, ugyanakkor még így is számottevő mértékben volt képes rézionok redukciójára. Immobilizálás hatására hasonló dolgot észleltünk, mint a DPPH-teszt esetén: a dLDH felületére külön-külön adszorbeált antioxidánsok aktivitása jócskán elmaradt a szabad formától, azonban együttes immobilizálás hatására a gyöksemlegesítő hatás ismét megközelítette a keverékben mérhető aktivitást (**19.B ábra**).

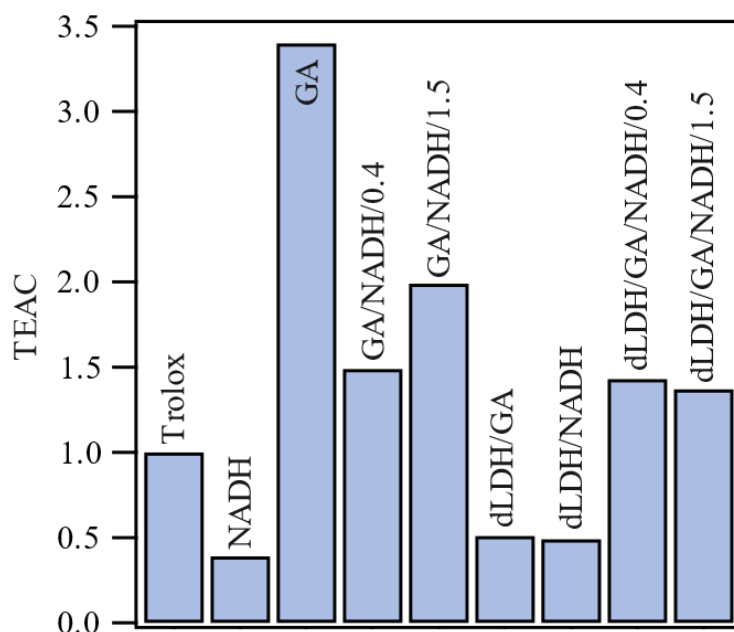
A tesztet elvégeztük az 1,5 arányú keverékre és kompozitra is, melynek eredményei a **20. ábrán** láthatók. Ebben az esetben is hasonló jelenséget tapasztaltunk, mint a 0,4 arányú keverék esetén. Oldatfázisban a keverék nem mutatott szinergizmust, míg a dLDH felületén rögzített antioxidánsok nagyobb aktivitással bírtak, mint a külön-külön rögzített formák.



20. ábra – A: GA, NADH és ezek 1,5 arányú keverékeinek antioxidáns aktivitása 6-os pH-n.

B: dLDH-n rögzített GA, NADH és ezek 1,5 arányú keverékeinek antioxidáns aktivitása 6-os pH-n.

Összehasonlítva a két arány esetén kapott értékeket (**21. ábra**) látható, hogy mindkét esetben alacsonyabb aktivitás volt mérhető, mint a szabad GA esetén, azonban fontos megjegyeznünk, hogy a heterogenizálás során az antioxidánsok együttes rögzítése jelentős aktivitás növekedést eredményezett a külön-külön rögzített antioxidánsokhoz képest.



21. ábra – A vizsgált antioxidánsok és kompozitjaik TEAC-értékei.

A DPPH-tesztel együtt ez bizonyítja, hogy a GA és a NADH együttes adszorpciója során az antioxidáns aktivitás megmarad, szemben külön-külön rögzített kompozitjaikkal (**3. táblázat**). A kompozitok számottevő antioxidáns aktivitás kifejtésére képesek, melyek további kutatási lehetőségeket rejtenek magukban.

3. táblázat – A vizsgált rendszerek EC₅₀- és TEAC-értékei. **N.A.:** nincs adat.

Minta	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (pH=6) (μM)	TEAC
GA	6,0	5,8	3,40
NADH	22,6	56,4	0,39
GA/NADH/0,4	8,8	14,8	1,49
GA/NADH/1,5	5.5	6,7	1,99
dLDH/GA	N.A.	N.A.	0,49
dLDH/NADH	N.A.	N.A.	0,51
dLDH/GA/NADH/0,4	N.A.	13,4	1,43
dLDH/GA/NADH/1,5	N.A.	11,4	1,37

7. Összefoglalás

Két természetes antioxidáns, a GA és a NADH redukáló hatásának széleskörű vizsgálatát végeztük el. A GA egy kiemelkedő antioxidáns aktivitással rendelkező fenolsav, a fontos biológiai kofaktor NADH antioxidáns aktivitása pedig korábban nem volt kellően feltérképezve, valamint nanokompozitjait sem vizsgálták. Megvizsgáltuk, és alátámasztottuk a NADH képességét a direkt antioxidáns aktivitás kifejtésére. Keverékük jobb hatást eredményezett, mint az egyes antioxidánsok aktivitásának összege, azaz szinergizmus lépett fel közöttük – ezt a számított CI-értékek is alátámasztották. A molekuláris antioxidánsokat külön-külön sikeresen adszorbeáltuk dLDH részecskék felületén, majd fényszóráson alapuló mérésekkel meghatároztuk optimális adszorbeálandó koncentrációjukat és arányukat. Két különböző arányt felhasználva immobilizáltuk az antioxidánsokat, melynek sikerességét UV-Vis mérésekkel is alátámasztottunk. A kompozitok aktivitását összehasonlítottuk az oldatfázisban lévő antioxidánsok és keverékük aktivitásával. Míg az individuálisan adszorbeált antioxidánsoknak jelentősen csökkent az aktivitása, addig az együttes adszorpció szignifikáns javulást eredményezett. A kölcsönhatások jellegét a DPPH-teszt mellett CuPRAC-teszttel is igazoltuk, mely során hasonló tendenciákat figyeltünk meg; a GA és a NADH között szinergizmus lépett fel. Az általunk előállított kompozit jobb aktivitással rendelkezett számos más GA tartamú kompozithoz képest.

A NADH-val kombinált GA kiemelkedő szinergikus gyöksemlegesítő hatása ígéretes és újszerű eredmény. Ezen antioxidánsok együttes adszorpciójával létrehozhatók olyan redukáló hatású nanokompozitok, melyek kolloid tulajdonságaik megőrzése mellett hatékonyak bizonyulnak a szabadgyökök semlegesítésében mind gyógyászati, mind ipari felhasználásokban.

Irodalomjegyzék

- [1] Winterbourn, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* **4**, 278–286 (2008).
- [2] Nimse, S. B. & Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv* **5**, 27986–28006 (2015).
- [3] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Interact* **160**, 1–40 (2006).
- [4] Forman, H. J. & Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 689–709 (2021).
- [5] Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M. & Alves, V. D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules* **24**, 4132 1–25 (2019).
- [6] Kirschweg, B., Tátraaljai, D., Földes, E. & Pukánszky, B. Natural antioxidants as stabilizers for polymers. *Polym Degrad Stabil* **145**, 25–40 (2017).
- [7] Couto, J. *et al.* *Fragaria vesca* L. Extract: A Promising Cosmetic Ingredient with Antioxidant Properties. *Antioxidants* **9**, 154 1–15 (2020).
- [8] Muráth, S., Szerlauth, A., Sebők, D. & Szilágyi, I. Layered Double Hydroxide Nanoparticles to Overcome the Hydrophobicity of Ellagic Acid: An Antioxidant Hybrid Material. *Antioxidants* **9**, 153 1–15 (2020).
- [9] Bertleff-Zieschang, N. *et al.* Biofunctional metal–phenolic films from dietary flavonoids. *Chem Commun* **53**, 1068–1071 (2017).
- [10] Ansy, K. M., Lee, J.-H., Piao, H., Choi, G. & Choy, J.-H. Stabilization of antioxidant gallate in layered double hydroxide by exfoliation and reassembling reaction. *Solid State Sci* **80**, 65–71 (2018).
- [11] O’Brien, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem-Biol Interact* **80**, 1–41 (1991).
- [12] O’Brien, P. J. Radical formation during the peroxidase catalyzed metabolism of carcinogens and xenobiotics: The reactivity of these radicals with GSH, DNA, and unsaturated lipid. *Free Radical Bio Med* **4**, 169–183 (1988).
- [13] Badhani, B., Sharma, N. & Kakkar, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv* **5**, 27540–27557 (2015).
- [14] Palafox-Carlos, H. *et al.* Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in ‘Ataulfo’ Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. *Molecules* **17**, 12657–12664 (2012).
- [15] Skroza, D., Generalić Mekinić, I., Svilović, S., Šimat, V. & Katalinić, V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *J Food Compos Anal* **38**, 13–18 (2015).
- [16] Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R. & Shekarchi, M. Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Res J Pharmacognosy* **1**, 35–40 (2014).
- [17] Sazhina, N. N. Determination of Antioxidant Activity of Various Bioantioxidants and Their Mixtures by the Amperometric Method. *Russ J Bioorg Chem* **43**, 771–775 (2017).
- [18] Olszowy, M., Dawidowicz, A. L. & Jóźwik-Dolęba, M. Are mutual interactions between antioxidants the only factors responsible for antagonistic antioxidant effect of their mixtures? Additive and antagonistic antioxidant effects in mixtures of gallic, ferulic and caffeic acids. *Eur Food Res Technol* **245**, 1473–1485 (2019).

- [19] Rúa, J., de Arriaga, D., García-Armesto, M. R., Busto, F. & del Valle, P. Binary combinations of natural phenolic compounds with gallic acid or with its alkyl esters: an approach to understand the antioxidant interactions. *Eur Food Res Technol* **243**, 1211–1217 (2017).
- [20] Lin, S.-J. & Guarente, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 241–246 (2003).
- [21] Banerjee, S. & Sadler, P. J. Transfer hydrogenation catalysis in cells. *RSC Chem. Biol.* **2**, 12–29 (2021).
- [22] Krisch, M., de Groot, H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J* **15**, 1493-1669 (2001).
- [23] Mishra, G., Dash, B. & Pandey, S. Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. *Appl Clay Sci* **153**, 172–186 (2018).
- [24] He, J., Wei, M., Li, B., Kang, Y., Evans, D.G., Duan, X. Preparation of Layered Double Hydroxides. In: Duan, X., Evans, D.G. (eds) Layered Double Hydroxides. Structure and Bonding, 119. Springer, Berlin, Heidelberg (2005).
- [25] Antonyraj, C. A., Koilraj, P. & Kannan, S. Synthesis of delaminated LDH: A facile two step approach. *Chem Commun* **46**, 1902–1904 (2010).
- [26] Ansy, K. M.; Lee, J. H.; Piao, H.; Choi, G.; Choy, J. H. Stabilization of antioxidant gallate in layered double hydroxide by exfoliation and reassembling reaction. *Solid State Sci* **80**, 65-71 (2018).
- [27] Kong, X. G.; Jin, L.; Wei, M.; Duan, X. Antioxidant drugs intercalated into layered double hydroxide: Structure and in vitro release. *Appl Clay Sci* **49**, 324-329 (2010).
- [28] Shah, S. T.; Yehye, W. A.; Saad, O.; Simarani, K.; Chowdhury, Z. Z.; Alhadi, A. A.; Al - Ani, L. A.; Surface functionalization of iron oxide nanoparticles with gallic acid as potential antioxidant and antimicrobial agents. *Nanomaterials* **7**, 306 1–17 (2017).
- [29] Skroza, D.; Mekinic, I. G.; Svilovic, S.; Simat, V.; Katalinic, V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *J Food Compos Anal* **38**, 13-18 (2015).
- [30] Zhao, Y.; Yang, L.; Xu, M.; Wang, H.; Gao, X.; Niu, B.; Li, W. Gallic acid functionalized chitosan immobilized nanosilver for modified chitosan/Poly (vinyl alcohol) composite film. *Int. J Biol Macromol* **222**, 2987-3000 (2022).
- [31] Szerlauth, A.; Kónya, Z. D.; Papp, G.; Kónya, Z.; Kukovecz, Á.; Szabados, M.; Varga, G.; Szilágyi, I. Molecular orientation rules the efficiency of immobilized antioxidants. *J Colloid Interface Sci* **632**, 260-270 (2023).
- [32] Yoshioka, Y., Higashisaka, K. & Tsutsumi, Y. Biocompatibility of Nanomaterials. in Nanomaterials in Pharmacology (eds. Lu, Z.-R. & Sakuma, S.) 185–199 (Springer New York, NY, 2016).
- [33] Szerlauth, A. *et al.* Self-assembly of delaminated layered double hydroxide nanosheets for the recovery of lamellar structure. *Colloid Interface Sci Commun* **46**, 100564 1–5 (2022).
- [34] Delgado, A. V., González-Caballero, F., Hunter, R. J., Koopal, L. K. & Lyklema, J. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* **77**, 1753–1805 (2005).
- [35] Hassan, P. A., Rana, S. & Verma, G. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. *Langmuir* **31**, 3–12 (2015).
- [36] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Tech* **28**, 25–30 (1995).
- [37] Szerlauth, A.: Antioxidáns hatással rendelkező stabil kompozit fejlesztése (2020) Szeged.

- [38] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, S. E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J Agric Food Chem* **52**, 7970–7981 (2004).
- [39] Olszowy-Tomczyk, M. Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. *Phytochem Rev* **19**, 63–103 (2020).
- [40] Xu, Z. P., Jin, Y., Liu, S., Hao, Z. P. & Lu, G. Q. (Max). Surface charging of layered double hydroxides during dynamic interactions of anions at the interfaces. *J Colloid Interf Sci* **326**, 522–529 (2008).
- [41] Zheng, L., Lin, L., Su, G., Zhao, Q. & Zhao, M. Pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. *Food Res Int* **76**, 359–365 (2015).
- [42] Pavlovic, M., Szerlauth, A., Muráth, S., Varga, G. & Szilagyi, I. Surface modification of two-dimensional layered double hydroxide nanoparticles with biopolymers for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev* **191**, 114590 1–20 (2022).