

Biološka aktivnost ekstrakta komine grožđa pripremljenog primjenom eutektičkog otapala

Hrestak, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:380211>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Dora Hrestak

6664/BT

**BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTA KOMINE GROŽĐA
PRIPRAVLJENOG PRIMJENOM EUTEKTIČKOG OTAPALA**

ZAVRŠNI RAD

MENTOR: Doc. dr. sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Kristine Radošević. Rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta 9550.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević na beskrajnom razumijevanju,
uloženom trudu i vremenu, te pomoći pri izradi ovog rada.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

**BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTA KOMINE GROŽĐA PRIPRAVLJENOG
PRIMJENOM EUTEKTIČKOG OTAPALA**

Dora Hrestak, 6664/BT

Sažetak: Brojna epidemiološka ispitivanja ukazuju na potencijalne pozitivne učinke kemijskih spojeva iz komine gožđa na ljudsko zdravlje. Posljednjih godina za njihovu ekstrakciju, kao alternativa konvencionalnim, predlažu se zelena eutektična otapala. U ovom radu ekstrakti komine gožđa pripremljeni su uz pomoć zakiseljenog etanola (GPETOH) te kolin-klorid:citratne kiseline (GPChCit). Nadalje, pripremljenim ekstraktima ispitana je biološka aktivnost na dvijema staničnim linijama (HeLa i HepG2), spektrofotometrijskom metodom određen je udio ukupnih polifenolnih spojeva, a ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet ekstrakata. Ekstrakt komine gožđa pripremljen uz pomoć eutektičnog otapala imao je veći antioksidacijski kapacitet i sadržaj polifenola od onog ekstrahiranog zakiseljenim etanolom. Ispitivanjem antiproliferativnog djelovanja *in vitro* na stanicama uočeno je inhibitorno djelovanje oba ekstrakta, koje je izraženije na HeLa stanice. Nije zapažena značajna razlika u djelovanju GPETOH i GPChCit ekstrakta na rast HeLa i HepG2 stanica.

Ključne riječi: *antioksidacijski kapacitet, eutektična otapala, in vitro biološka aktivnost, komina grožđa, polifenolni spojevi*

Rad sadrži: 26 stranica, 5 slika, 2 tablice, 22 literaturna navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Doc.dr.sc. Kristina Radošević*

Pomoć pri izradi: *Mag.ing.bioproc. Manuela Panić*

Datum obrane: 19.9.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final Work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate study Biotechnology
Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF GRAPE POMACE EXTRACT PREPARED BY USING DEEP EUTECTIC SOLVENT

Dora Hrestak, 6664/BT

Abstract: Numerous epidemiological studies indicate that chemical compounds isolated from grape pomace have potential positive effects on human health. Lately, as an alternative method for their extraction, green deep eutectic solvents have been proposed. In this study, grape pomace extracts were prepared using acidified ethanol (GPEtOH) and choline-chloride: citric acid (GPChCit). Furthermore, the biological activity of the extracts was tested on two cell lines (HeLa and HepG2), total polyphenols were analyzed spectrophotometrically and the antioxidant capacity was determined by the ORAC method. The grape pomace extract prepared by eutectic solvent have higher antioxidative capacity and higher amount of polyphenols than the one extracted by acidified ethanol. Investigation of antiproliferative activity *in vitro* on the cell lines showed the inhibitory effect for the both extracts, which was more pronounced in HeLa cells. There was no significant difference in the effect of GPEtOH and GPChCit extract on HeLa and HepG2 cell growth.

Keywords: *antioxidative capacity, deep eutectic solvents, in vitro biological activity, grape pomace, polyphenolic compounds*

Thesis contains: 26 pages, 5 figures, 2 tables, 22 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *PhD. Kristina Radošević*, Assistant professor

Technical support and assistance: *M.Sc. Manuela Panić*

Defence date: 19.9.2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Eutektična otapala	2
2.1.1. Tipovi eutektičnih otapala	2
2.1.2. Svojstva i toksičnost eutektičnih otapala	4
2.1.3. Primjena eutektičnih otapala.....	6
2.2. Biološka aktivnost polifenolnih spojeva iz biljaka.....	7
2.2.1. Grožđe kao izvor biološki aktivnih tvari	7
2.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanja biološke aktivnosti prirodnih spojeva primjenom kultura stanica	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Kemikalije.....	10
3.1.2. Komina grožđa	10
3.1.3. Eutektično otapalo	11
3.1.4. Humane tumorske stanične linije	11
3.1.6. Uređaji i oprema	13
3.2. METODE	13
3.2.1. Priprema ekstrakta komine grožđa	13
3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu (FC) reagensom	14
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.....	14
3.2.4. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti pripremljenih ekstrakata na HepG2 i HeLa staničnim linijama	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Sadržaj polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa	19
4.2. Antiproliferacijsko djelovanje ekstrakata komine grožđa.....	20
4.3. Izgled HeLa stanica tretiranih ekstraktima komine grožđa	22
5. ZAKLJUČCI	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

Razvoj tehnologija i znanosti je unazad nekoliko desetljeća usmjeren na smanjenje zagađenja i očuvanje okoliša te iskorištavanje nusprodukata i otpada iz raznih industrija. U tom smislu intenzivno se unapređuju i razvijaju postojeće metode i tehnologije primjenom novih ideja i materijala. Primjer takvog iskoraka u znanosti je sinteza i upotreba eutektičnih otapala kao zamjena za konvencionalna organska otapala.

Eutektična otapala (*eng.* Deep Eutectic Solvents, DES) podvrsta su ionskih kapljevina, organskih soli koje su pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju i ističu se brojnim prednostima poput niske hlapljivosti, nezapaljivosti i stabilnosti. DES-ovi su smjese nabijenog akceptora vodika i nenabijenog donora vodika koje također prelaze u tekuće stanje na sobnoj temperaturi zbog svojeg specifičnog kemijskog sastava. Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, mogućnost upotrebe je široka, od biotehnoške i prehrambene industrije, medicine, farmacije te u mnogim drugim područjima. Istaknut je velik potencijal njihove upotrebe kao otapala za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala, čemu značajno pridonosi činjenica da se fizikalno-kemijska svojstva DES-a mogu modificirati ovisno o namjeni te da mogu ekstrahirati polarne i nepolarne spojeve.

U ovom radu primjenom eutektičkog otapala pripremljen je ekstrakt komine grožđa, nusproizvoda prehrambene industrije. Grožđe je biljka bogata vitaminima, mineralima te fitokemikalijama među kojima se najviše istražuju polifenoli. U ekstraktu komine grožđa pripremljenom pomoću eutektičkog otapala određen je maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva i njihov antioksidacijski kapacitet te je ispitana antiproliferacijska aktivnost ekstrakata na humanim tumorskim staničnim linijama (HepG2 i HeLa). Dobiveni rezultati su uspoređeni s ekstraktom komine grožđa pripremljenom primjenom organskog otapala etanola, koji se uobičajeno koristi za ekstrakciju polifenolnih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Eutektična otapala

U današnje vrijeme za potrebe provođenja kemijskih reakcija najčešće se koriste organska otapala. Organska otapala su kapljevine koje zbog svoje kemijske strukture omogućavaju međusobni kontakt reaktanata te se koriste za razne kemijsko-tehnološke operacije i separacijske tehnike poput ekstrakcije ili separacije. Međutim, unatoč prednostima organskih otapala (poput boljeg iskorištenja reakcije i niske točke vrelišta) zbog njihovih brojnih nedostataka te potencijalnog unaprijeđenja kemijske tehnologije razmatraju se i istražuju alternative koje će omogućiti razvoj zelenih tehnologija sa svrhom optimiranja kemijskih procesa kako bi njihov štetni utjecaj na živa bića i okoliš bio minimalan.

Ionske kapljevine su prve istraživane kao moguća alternativa organskim otapalima. To su organske soli, pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, koje se ističu mnogobrojnim pozitivnim fizikalno-kemijskim karakteristikama kao što su niska hlapljivost, nezapaljivost te izrazita stabilnost, dok su im gustoća i viskoznost u pravilu veći od gustoće i viskoznosti vode. Zbog njihove niske hlapljivosti i točke vrelišta lako se recikliraju nakon upotrebe pa su stoga prihvatljivije za okoliš od organskih otapala. Međutim, zbog svoje toksičnosti, slabe biorazgradivosti i visoke cijene sinteze ionske kapljevine nakon desetljeća istraživanja pokazalo se da nisu najbolja alternativa organskim otapalima. Sa ciljem nadilaženja nepovoljnih svojstava ionskih kapljevine istražuje se nova vrsta ekološki prihvatljivih otapala – eutektična otapala (*eng.* Deep Eutectic Solvents, DES).

2.1.1. Tipovi eutektičnih otapala

Eutektična otapala su po kemijskoj strukturi smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika kao što su šećeri, alkoholi, amidi, amini i vitamini (Gorke i sur., 2010). Prema klasifikaciji koju su dali Abbott i suradnici (2007) postoje četiri različite vrste eutektičnih smjesa kako je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Vrste eutektičnih otapala (Abbott i sur., 2007)

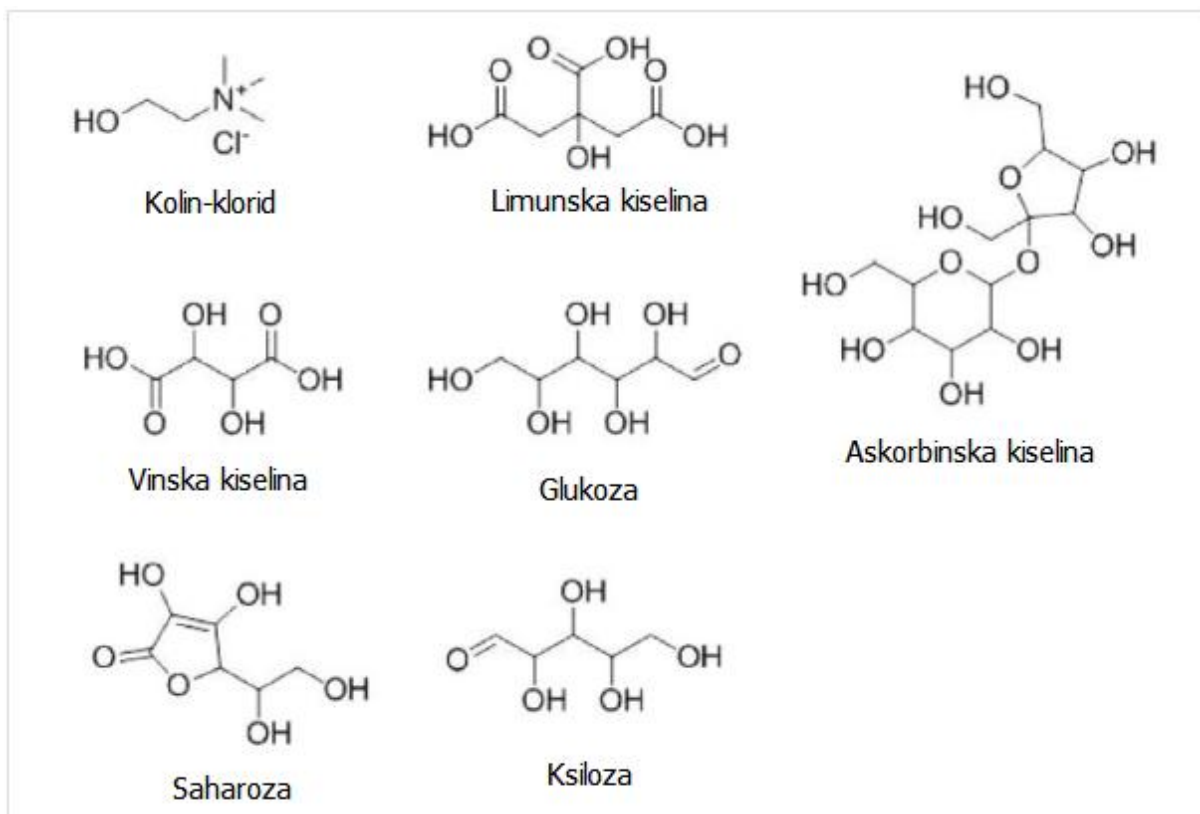
VRSTA EUTEKTIČNE SMJESE	SASTAV	PRIMJER
Tip I	metalna sol + organska sol	ZnCl ₂ + kolin klorid
Tip II	hidrat metalne soli + organska sol	CoCl ₂ ×6H ₂ O + kolin

		klorid
Tip III	organska sol + donor vodikove veze	kolin-klorid + urea
Tip IV	metalni klorid + donor vodikove veze	ZnCl ₂ + urea ZnCl ₂ + etilen glikol ZnCl ₂ + acetamid

Najčešće su DES-ovi bazirani na kolin kloridu (ChCl) te odgovarajućim donorima vodika poput uree, limunske i sukcijske kiseline ili glicerola.

Kolin klorid je netoksična kvaterna amonijeva sol koja se može ekstrahirati iz biomase ili vrlo ekonomično sintetizirati iz fosilnih izvora. To je biorazgradiv spoj dostupan po niskoj cijeni. ChCl formira DES u kombinaciji s donorima vodika (npr. urea, obnovljive karboksilne kiseline kao npr. oksalna, limunska ili sukcijska kiselina, te aminokiseline, obnovljivi polioli kao npr. glicerol, ugljikohidrati, itd.). DES-ove sintetizirane iz kolin klorida karakterizira inertnost s vodom i jednostavna priprema koja rješava probleme pročišćavanja otapala nakon sinteze te uklanjanja nastalog otpada.

Kad su spojevi od kojih se DES sastoji primarni metaboliti kao što su: aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili derivati kolina (Slika 1.), takva otapala zovemo prirodnim eutekničnim otapalima (*eng.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). Njihova sinteza temelji se na lako dostupnim nenabijenim prirodnim spojevima većinom niskih cijena. NADES-ovi imaju izrazito dobru topivost uslijed mogućnosti da prime ili otpuste elektrone te tako formiraju vodikove veze. Također, karakterizira ih niska toksičnost, jednostavni postupci pripreme te odlične fizikalno-kemijske osobine poput tekućeg stanja na sobnoj temperaturi, prilagodljiva viskoznost, širok raspon polarnosti i visoki stupanj topljivosti za različite komponente. Osim navedenih brojnih prednosti, u prilog njihovoj primjeni ide i činjenica da je kombiniranjem različitih ishodnih komponenata i varijacijom njihovih molarnih omjera moguće pripremiti mnogobrojne kombinacije NADES-a i dizajnirati ih za ciljanu namjenu.



Slika 1. Kemijske strukture različitih tvari koje mogu biti sastavne komponente prirodnih eutektičnih otapala (Paiva i sur., 2014).

2.1.2. Svojstva i toksičnost eutektičnih otapala

Eutektična otapala su nehlapljiva, nezapaljiva i stabilna poput ionskih kapljevine. Imaju gustoću i viskoznost veću od gustoće i viskoznosti vode te se često svrstavaju u ionske kapljevine četvrte generacije (Cvjetko Bubalo i sur., 2015) , što i nije u potpunosti točno budući da DES-ovi nisu sastavljeni od iona. Imaju mnoga svojstva koja ih čine pogodnijim alternativnim otapalima od ionskih kapljevine kao što su niska cijena, minimalna toksičnost i mogućnost biorazgradivosti (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

Eutektična otapala imaju nižu točku tališta od svojih pojedinih komponenti što se objašnjava redukcijom Coulombovih sila otapala pri velikim volumenima i asimetričnom distribucijom iona unutar atoma molekula. Većina eutektičnih otapala je u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi, a neka istraživanja pokazuju da donor vodika stupa u interakcije s anionskim grupama što rezultira porastom molekulske mase otapala i smanjenjem interakcija s kationskim grupama te posljedično i smanjenjem točke tališta. Klasičan primjer je smjesa

kolin klorida i uree. Kolin klorid tj. 2-hidroksimetil-trimetilamonijev klorid ima točku vrelišta $T_v = 302\text{ }^\circ\text{C}$, dok urea ima točku vrelišta $T_v = 133\text{ }^\circ\text{C}$. Kombinacija ovih dvaju spojeva u molarnom omjeru 1:2 rezultira smjesom koja je tekućina pri sobnoj temperaturi, a ima točku tališta $T_t = 12\text{ }^\circ\text{C}$. Točka tališta eutektičnog otapala koja se nalazi ispod 50° čini ga lakše upotrijebivim za različite namjene (Tang i sur., 2015).

Većina eutektičnih otapala ima relativno visoku viskoznost ($>100\text{cP}$) što je rezultat prisustva jakih vodikovih veza među komponentama od kojih se sastoje. Vodikove veze uzrokuju njihovu smanjenu pokretljivost. Porastu viskoznosti potpomažu još i veličina iona, manji prazni volumen unutar DES-a, te druge sile poput van der Waalsovih i elektrostatskih interakcija.

Netoksičnost eutektičnih otapala proizlazi iz činjenice da se sintetiziraju i sastoje od netoksičnih komponenti. Na temelju toga se pretpostavlja, i u mnogim publikacijama je navedeno, da su DES-ovi netoksična, ekološki prihvatljiva i biorazgradiva otapala (Abbott i sur., 2004; Hayyan i sur., 2012; Wu i sur., 2012.). Međutim, zbog činjenice da su se neki DES-ovi pokazali toksičnijim nego njihove ishodne komponente (Hayyan i sur., 2013a, 2013b) te očekivane primjene eutektičnih otapala u industriji, istraživanja toksičnosti DES-ova na raznim modelnim organizmima te procjena njihovog rizika za okoliš je neophodna.

Prva istraživanja koja se bave citotoksičnošću DES-ova rađena su na različitim bakterijskim sojevima, a eutektična otapala koja su korištena bila su bazirana na derivatima kolina i fosfora (Hayyan i sur., 2013a, 2013b). Rezultati istraživanja pokazali su kako derivati kolina nisu imali toksičnog efekta na bakterije, ali su zato bili letalni za staničnu kulturu larva račića. Za razliku od kolina, otapala koja su sadržavala fosfor jednako su se ispostavila toksičnima, kako za bakterije, tako i za kulturu larva račića. U oba slučaja eutektična otapala pokazala su jaču toksičnost od pojedinačnih sastojaka što se može objasniti promjenom svojstava pojedinih sastojaka nakon njihova vezanja u otapalu kao posljedica interakcije donora vodikove veze i organske soli. Bitno je naglasiti da rezultat sinergije ovisi o više varijabli kao što su: kation soli, vrsta aniona, molarni omjer i priroda donora vodikove veze.

Neka istraživanja pokazuju kako je delokalizacija elektrona do koje dolazi uslijed formacije DES-a zaslužna za njegovu toksičnost koja se u toj mjeri ne očituje kod pojedinačnih sastojaka otapala (Hayyan i sur., 2013a). Kao primjer može se uzeti delokalizirani kation kolina. Akumulacija pozitivnog naboja uzrokuje pojavu elektrostatskog

privlačenja na površini membrane stanice što posljedično oštećuje negativno nabijeni dvosloj. U konačnici to rezultira permeabilnošću membrane koja za posljedicu ima protok otapala u citoplazmu te poremećaj redoks-ravnotežu u stanici.

2.1.3. Primjena eutektičnih otapala

Zbog svojih iznimno pozitivnih karakteristika, niske cijene te mogućnosti kombiniranja različitih komponenti mogućnosti primjene eutektičkih otapala sve su veće te se očekuje njihova primjena u industrijskom mjerilu. Brojna znanstvena istraživanja ukazuju na njihovu mogućću uspješnu upotrebu u sintezi organskih spojeva i (bio)katalizi, proizvodnji polimera, elektrokemiji, nanomaterijalima, procesima separacije, analitici, biomedicini i ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Paiva i sur., 2014). Također su pogodna za ekstrakciju prirodnih spojeva iz biljaka, kako polarnih tako i nepolarnih, koji se mogu dalje koristiti kao farmaceutici, prirodna bojila, okusi, itd. (Young i sur., 2011). Iznimna stabilnost fenolnih komponenti u DES-ovima na bazi šećera potencijalno im omogućuje primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Dai, Verpoorte & Choi, 2014). Nadalje, studije su pokazale kako su bioaktivne komponente (npr. organske kiseline nastale iz šećera, šećerni alkoholi, alkanoli, aminokiseline, kolin klorid i betain) 10 do 100 puta bolje topljive u eutektičnim otapalima nego u vodi ili lipidima. Iz tog razloga DES-ovi bi mogli poslužiti za proizvodnju biljnih ekstrakata i njihovu direktnu primjenu u hrani, farmaciji, kozmetici i agrokemiji bez potrebe za skupim postupcima pročišćavanja.

Biološki aktivni spojevi (*eng.* Natural Bioactive Compounds, NBCs) mogu se pronaći u mnogim živim organizmima (npr. biljkama, mikroorganizmima, gljivama, algama), a dijele se u pet kategorija: poliketidi, izoprenoidi, alkaloidi, fenilpropanoidi i flavonoidi (Oksman-Caldentey i Inze, 2004). Za ekstrakciju NBSc iz biljnog materijala koriste se različite tehnike, koje možemo podijeliti na klasične i moderne metode. U tradicionalne metode ubrajaju se npr. ekstrakcija otapalom, sokslet ekstrakcija, maceracija i filtracija, dok u moderne metode spadaju npr. tekuća ekstrakcija pod pritiskom, subkritična tekuća ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*eng.* ultrasound-assisted extraction, UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*eng.* microwave-assisted extraction, MAE), te enzimski potpomognuta ekstrakcija (*eng.* enzyme-assisted extraction, EAE).

Tijekom svake ekstrakcije potrebno je pratiti brojne parametre. Glavni problem mogli predstavljati fizikalno-kemijske karakteristike korištenog otapala, jer o tome ovisi učinkovitosti ekstrakcije, te je to svakako neophodno optimirati tj odabrati najpogodnije otapalo. Osim toga, otapalo mora biti lako biorazgradivo, minimalno hlapljivo i toksično, nezapaljivo, nekorozivno, nevaskozno, termički i kemijski stabilno (pri visokim temperaturama), preferabilno niske točke tališta i male površinske napetosti. Također je poželjna mogućnost ponovne upotrebe, a važna je i ekonomičnost (lako dostupno otapalo niske cijene). Navedene specifikacije moraju biti zadovoljene i kada su u pitanju euteklična otapala, koja se sve više upotrebljavaju za ekstrakcije spojeva iz različitih sirovina, a prema istraživanjima mnogo obećavaju u tom području. Tako je npr. u radu Zhanga i suradnika (2014) pokazano da je za ekstrakciju astaksantina iz otpada škampa učinkovitije bilo euteklično otapalo nego etanol i to za čak 47,3 %.

2.2. Biološka aktivnost polifenolnih spojeva iz biljaka

2.2.1. Grožđe kao izvor biološki aktivnih tvari

Grožđe (*Vitis* spp.) biljka je koja se često koristi u prehrambenoj industriji te proizvodnji vina i sokova. Osim prehrambenih proizvoda ona je izvor mnogih vrijednih fitonutrijenata, polifenola, vitamina C i B skupine (osim B12), te mineralnih tvari poput kalija, kalcija, magnezija, fosfora, mangana, natrija, bakra, cinka i željeza. Komina grožđa, kao nusproizvod njegove prerade, sadrži visok udio biološki aktivnih tvari koje se mogu ekstrahirati i upotrebljavati u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Ferri i sur., 2016). Komina se sastoji od pokožice, sjemenke i peteljke, a čini 20-30% ukupne težine prerađenog grožđa. Njen kemijski sastav ovisi o sorti grožđa, stupnju zrelosti, stanju biljke te klimatskim uvjetima.

Polifenoli su najvažnije fitokemikalije koje možemo naći u grožđu, a njihovo antioksidacijsko djelovanje rezultira smanjenjem oksidativnog stresa. Oksidativni stres je stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih, slobodnih kisikovih čestica (O⁻), koje nazivamo „reaktivne kisikove vrste“ ili skraćeno ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*). Antioksidansi sprječavaju nastajanje tumora u početnoj fazi s obzirom da inaktiviraju slobodne radikale. Isto tako mogu aktivirati ili inhibirati enzime uključene u metabolizam ksenobiotika. Polifenoli također koriste kao zaštita biljke od UV zračenja i patogena, služe kao signalne molekule u procesu sazrijevanja, te privlače kukce oprašivače

na biljku i daju boju cvijeta. Uz to, polifenolni spojevi mogu djelovati i kao prooksidansi kada dolazi do povećanog nastanka slobodnih radikala u tumorskim stanicama koje zatim djeluju kao regulacijske molekule i u konačnici dovode do zastoja staničnog ciklusa i sprječavaju rast stanice tj. širenja tumora. U nekim istraživanjima zaključeno je kako je sposobnost metastaziranja 4T1 stanica tumora dojke inhibirana djelovanjem proantocijanidina iz sjemenki grožđa (Mantena i sur., 2006; Kaur i sur., 2009) te kako ekstrakti pokožice grožđa induciraju apoptozu humanih staničnih linija (LoVo, HT9 i SW480) (Kaur i sur., 2008).

2.2.2. *In vitro* ispitivanja biološke aktivnosti prirodnih spojeva primjenom kultura stanica

Kako bismo bili sigurni da neka tvar doista ima povoljan učinak na naš organizam i naše zdravlje potrebno je provesti niz epidemioloških istraživanja. Nakon takvih istraživanja nužno je povezati rezultate biološke aktivnosti s kvantitativnim i kvalitativnim analizama ekstrakata i/ili proizvoda kako bi se mogla povući paralela između učinka određene tvari i sastavom biološki aktivnih spojeva u uzorcima. Testiranja se provode na različitim organizmima (*in vivo*) ili u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*). Obzirom da je danas u upotrebi više od 100 000 kemikalija, a svake godine na tržište izlazi oko 1 000 novih, koje je prethodno potrebno podvrgnuti testovima toksičnosti kako bi se pokazalo da su u potpunosti sigurni za upotrebu, potiče se uporaba *in vitro* testova na kulturama stanica sa ciljem što manjeg broja *in vivo* testiranja na pokusnim laboratorijskim životinjama. Određivanje tzv. bazične citotoksičnosti primjenom kulture stanica temelji se na činjenici da kad se kemikalija unese u organizam dva su glavna koraka koja rezultiraju biološkim odgovorom, koji najčešće možemo na neki način mjeriti. Prvo se spoj mora transportirati do mjesta djelovanja, a zatim dolazi do interakcije spoja i ciljane stanice u organizmu. Znači, biološki odgovor se dešava na nivou stanice te ga stoga možemo pratiti *in vitro* na kulturama stanica.

Osim pitanja etičnosti rada na pokusnim životinjama, *in vitro* testovi na stanicama omogućavaju lakše razumijevanje staničnih procesa i njihovih pojedinih koraka. Četiri su glavna faktora koja potiču razvoj *in vitro* toksikologije (Kniewald i sur, 2005):

1. Potreba za jednostavnim, jeftinim i efikasnim načinom testiranja velikog broja kemikalija
2. Želja za smanjenjem testova na životinjama

3. Potreba za boljim razumijevanjem mehanizama kemijski inducirane toksičnosti sa svrhom optimiranja procjene rizika
4. Želja za upotrebom ljudskih staničnih linija kad god je to moguće

Kao alternativa *in vivo* ispitivanjima također se razvijaju kao nove metode i pristupi u toksikologiji poput različitih fizikalno-kemijskih tehnika, metaboličkog i kinetičkog modeliranja te QSAR-a (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationships*). QSAR je model koji povezuje biološke aktivnosti pojedinih komponenti s njihovim fizikalno-kemijskim ili strukturalnim karakteristikama.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- 2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Amberlite XAD-16 , Rohm and Haas, Francuska
- CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega Corporation, Madison, WI, SAD
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Deionizirana voda, PBF, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidrogenkarbonat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, NaCl, Kemika, Zagreb, RH
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Kristal ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH

Sve kemikalije upotrijebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a voda korištena za pripremu otopina bila je destilirana voda PBF-a.

3.1.2. Komina grožđa

U radu se koristila komina grožđa sorte Plavac mali (berba 2012). Komina grožđa se podvrgnula postupku liofilizacije. Liofilizirani uzorci su se samljali i takvi se koristili u ekstrakciji.

3.1.3. Eutektično otapalo

U radu je korišteno prirodno eutektično otapalo kolin klorid:limunska kiselina (ChCit) prethodno sintetizirano u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a prema prethodno opisanoj metodi (Radošević i sur., 2015).

3.1.4. Humane tumorske stanične linije

U ovom radu korištene su dvije humane tumorske stanične linije, HeLa i HepG2. Navedene stanične linije dobivene su iz *American Type Culture Collection* (ATCC). Prva humana stanična linija HeLa izolirana iz tumora vrata maternice. Nakon što je uspostavljena 1952. godine koristi se kao biološki model u mnogim znanstvenim istraživanjima. HepG2 je stanična linija humanog karcinoma jetre izolirana iz petnaestogodišnjeg pacijenta s uznapredovalim hepatocelularnim karcinomom.

Optimalna temperatura za uzgoj adherentnih HeLa i HepG2 stanica je 37 °C, dok optimalnu atmosferu čini 95 % zraka i 5 % CO₂. Uzgoj staničnih kultura provodi se u plastičnim T-bocama ravnih stijenci ili Petrijevkama za kulture stanica, a preporučeni medij za rast je *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS).

3.1.5. Otopine i puferi

- 2% otopina HCl
- 37% HCl 27 mL
- Destilirana voda do 500 mL

- 96% etanol s 0,1% HCl

37% HCl	0,27 mL
96% etanol	do 100 mL

- 15% NaHSO₄

NaHSO ₄	15,0 g
Destilirana voda	do 100 mL

- Fosfatni pufer (0,2 M, pH=7)

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode)	39 mL
Dinatrijev hidrogenfosfat (5,687 g do 200 mL destilirane vode)	61 mL
Destilirana voda	do 200 mL

- Otopina AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid)

AAPH	0,207 mL
Fosfatni pufer (0,075 M)	do 5 mL

- Otopina fluoresceina

Ishodna otopina 1: otopiti 15 mg fluoresceina u 100 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Ishodna otopina 2: 100 µL ishodne otopine 1 nadopuniti s 10 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

Ishodna otopina 3: 50 µL ishodne otopine 2 nadopuniti s 50 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

- PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

- 0,4% otopina tripan plavo

Boja tripan plavo	0,04 g
PBS pufer	10 mL

- 0,2% otopina kristal ljubičasto
boja kristal ljubičasto 0,02 g
2% etanol do 10 mL

3.1.6. Uređaji i oprema

- Cary Eclipse Fluorescence Spektrofotometar, Varian, Mulgrave, Australija
- Centrifuga tip PLC-332, Tehnica Železnik, Slovenija
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-75 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laborijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichard Bright_line, Buffalo, NY, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Petrijeve posude za uzgoj stanica, Thermo Scientific BioLite, SAD
- Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Priprema ekstrakta komine grožđa

Za pripremu ekstrakata koristila se komina grožđa koja se usitnila sjeckalicom i zatim izvagala (~ 100 mg). Odvaganoj masi komine dodalo se 20 mL 70%-tog DES ChCit, odnosno zakiseljenog etanola. Postupak ekstrakcije provodi se u ultrazvučnoj kupelji na 60 °C 60 minuta. Izlužena komina se zatim odvojila iz ekstrakta vakuum-filtracijom uz upotrebu mikrofiltera (0,22 µm). Nakon završetka filtracije ekstrakt je čuvan na +4 °C do upotrebe.

3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu (FC) reagensom

Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se pri oksidaciji fenola reduciraju u molibdenov oksid i volframov oksid plave boje. Nastalo obojenje proporcionalno je udjelu polifenolnih spojeva.

Postupak određivanja

Pripremljene ekstrakte potrebno je 50 puta razrijediti destiliranom vodom. 0,25 mL razrijeđenog uzorka otpipetira se u posebnu epruvetu čemu se zatim dodaje 1,25 mL FC reagensa koji je prethodno razrijeđen 10 puta. Nakon 5 minuta odvijanja reakcije na sobnoj temperaturi dodaje se 1 mL Na_2CO_3 masene koncentracije 75 g L^{-1} . Epruveta s otopinom potom se prebacuje u vodenu kupelj gdje se termostatira 5 min na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Reakciju je potrebno brzo zaustaviti u vodenoj kupelji nakon čega se mjeri apsorbancija na UV/VIS-spektrofotometru pri $\lambda=760 \text{ nm}$ (Singleton i sur., 1999). Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) na g suhe tvari uzorka ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{ s.t.}$), a analize spektrofotometrije provedene su u tri paralele.

Izrada baždarnog dijagrama

Kao standard pripremi se otopina galne kiselina masene koncentracije 500 mg L^{-1} te njena razrjeđenja tako da dobivene koncentracije iznose 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 i 100 mg L^{-1} . Izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka nanesu se na ordinatu, a koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}) na apscisu koordinatnog sustava. Baždarni pravac crta se pomoću računala, a prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip ORAC metode temelji se na inhibiciji peroksil radikala ($\text{ROO}\cdot$) za koji se kao izvor koristi AAPH. Peroksil radikal oksidira fluorescein te stvara produkt bez fluorescencije (smanjenje intenziteta fluorescencije). Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala i oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije (Cao i sur., 1993).

3.2.3.1. Mjerenje ORAC vrijednosti

Mjerenje ORAC (eng. *Oxygen radical absorbance capacity*) vrijednosti provodilo se spektrofotometrijski kao što je opisano u Mazor Jolić i sur., 2011. Pri temperaturi od 37 °C uz $\lambda_{\text{eks}}=485$ nm i $\lambda_{\text{em}}=520$ nm. Za mjerenje fluorescencije koristen se uređaj Cary Eclipse Spectrofluorometer. Antocijani u etanolu razrijedili su se 600-800 puta. 375 μL uzorka dodalo se u 2250 μL fluoresceina i termostatiralo na 37 °C u vodenoj kupelji. Nakon 30 minuta dodalo se 375 μL otopine AAPH i mjerila promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu, sve do spuštanja vrijednosti na nulu. Na isti način pripremila se i slijepa proba, ali se za njeno mjerenje umjesto uzorka koristio fosfatni pufer (0,075 mol L⁻¹). Kao standard koristio se Trolox (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

3.2.3.2. Izračun ORAC-vrijednosti

ORAC-vrijednost računa se prema formulama:

$$\text{relativna ORAC-vrijednost} = \left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}} \right) \times k \times \alpha \times h \quad [1]$$

$$AUC = 0,5 + \left(\frac{R_2}{R_1} \right) + \left(\frac{R_3}{R_1} \right) + \dots + \left(\frac{R_n}{R_1} \right) \quad [2]$$

Gdje je:

- Relativna ORAC-vrijednost ($\mu\text{mol Trolox ekvivalenta g}^{-1}$ uzorka)
- AUC_U - antioksidacijski kapacitet uzorka
- AUC_{SP} - antioksidacijski kapacitet slijepa probe
- AUC_{TRX} - antioksidacijski kapacitet Troloxa
- k - faktor razrjeđenja
- α - molarna koncentracija Troloxa

$$h = \frac{V_{\text{uzorka}}}{m_{\text{komine}}} \quad [3]$$

3.2.4. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti pripremljenih ekstrakata na HepG2 i HeLa staničnim linijama

3.2.4.1. Uzgoj i nacjepljivanje stanica

Uzgoj je započeo odmrzavanjem ampula od 1 mL koje su sadržavale HeLa i HepG2 stanice u koncentraciji oko 1×10^7 stanica mL^{-1} , a čuvale su se na -70°C u mediju za smrzavanje. Odmrzavanje se vrši na način da se ampule urone u vodenu kupelj na 37°C nakon čega slijedi centrifugiranje u trajanju od 3 minute pri $1000 \text{ okretaja min}^{-1}$. Supernatant se pažljivo uklonio pipetom, a talog koji je sadržavao stanice se resuspendirao u mediju za uzgoj koji sadrži 10 % FBS-a. Stanice su se zatim prebacile u petrijevku koja se stavila u inkubator s reguliranom atmosferom (95 % zraka, 5 % CO_2 , temperatura 37°C). Uzgoj stanica u petrijevkama omogućava im održavanje biomase za potrebe postavljanja eksperimenata. Stanice su pasažirane svaka 3-4 dana kako bi se održale u eksponencijalnoj fazi rasta jer su tada najvitalnije, a njihov rast, opće stanje i morfologija pratili su se inverznim mikroskopom. Uz navedene parametre pratila se i boja medija čija promjena može ukazivati na pojavu kontaminacije ili prerastanje podloge za uzgoj. Kako bi se spriječila potencijalna kontaminacija potrebno je održavati aseptične uvjete rada prilikom rukovanja sa stanicama.

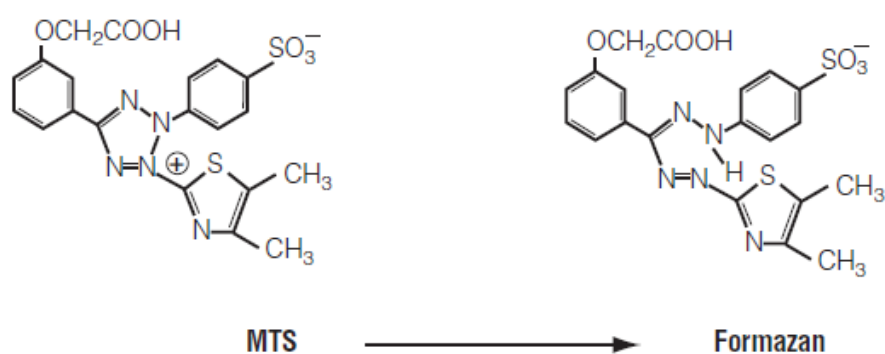
3.2.4.2. Određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo

Postupak određivanja broja stanica prihvaćenih za površinu petrijevke ili ploče s jažicama započinje uklanjanjem hranjivog medija te dodavanjem 1 mL prethodno zagrijane otopine tripsina. Petrijevka sa stanicama se zatim vratila u inkubator na 3-4 minute kako bi se stanice uslijed djelovanja tripsina odvojile od površine. Djelovanje tripsina provjerava se pod inverznim mikroskopom, a zaokruženost stanica ukazuje na činjenicu da su se odvojile od podloge. Odvojenim stanicama dodaje se 1 mL medija (DMEM + 10 % FBS) kako bi se tripsin inaktivirao, a stanice se resuspendiraju i koriste za određivanje broja stanica u uzorku. Alikvotu suspenzije od 20 μL dodaje se 20 μL boje tripan-plavo koja će obojati samo mrtve stanice čija membrana je oštećena. Žive stanice ostaju nebojane. Obojena suspenzija nanosi se na Neubaer-ovu komoricu za brojanje stanica. Komora je podijeljena na 4 velika kvadrata, od kojih svaki sadrži 16 manjih kvadratića. Stanice su se brojale u svim kvadratima, a koncentracija stanica po mL suspenzije računa se prema izrazu:

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{broj stanica u 4 velika kvadrata} \times 5000 \quad [4]$$

3.2.4.3. Određivanje biološke aktivnosti pripremljenih ekstrakata komete grožđa na HepG2 i HeLa staničnim linijama primjenom MTS metode

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi za određivanje broja živih stanica u citotoksičnim i proliferacijskim testovima. Reagens sadrži sol tetrazolija MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboksietoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] te PES (fenazin etosulfat) za povezivanje elektrona koji povećava kemijsku stabilnost reagensa i omogućava stabilizaciju otopine formirane s MTS-om. Metoda se bazira na redukciji tetrazolijeve soli uslijed čega nastaje formazan (Slika 2), produkt smeđe boje. Intenzitet obojenja formazana proporcionalan je broju živih stanica u uzorku, a određuje se mjerenjem apsorbancije pri $\lambda=490$ nm.



Slika 2. Redukcija tetrazolijeve soli u formazan

Stanične linije naciyepljene su u ploče s 96 jažica u početnoj koncentraciji od 5×10^4 stanica mL^{-1} . 24 sata nakon naciyepljivanja stanice su tretirane ekstraktima pripremljenim u eutektičnom otapalu (GPChCit) i etanolu (GPEtOH). Ekstrakti su prethodno filtrirani kroz filter (pore veličine 0,22 μm), a nakon toga razrijeđeni u mediju (u rasponu od 0,5 % v/v do 10 % v/v). 72h nakon tretmana stanica u svaku jažicu dodalo se 10 μL CellTiter[®] AQ_{ueous} One Solution reagensa, a ploče su zatim vraćene u inkubator na period od 4 sata. Apsorbancija stanica mjerila se na $\lambda=490\text{nm}$, a preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera izmjerene apsorbancije tretiranih stanica i netretiranih (kontrolnih) stanica, prema izrazu:

$$\text{Preživljenje (\%)} = \left[\frac{\text{srednja vrijednost } A_{490}(\text{uzorak})}{\text{srednja vrijednost } A_{490}(\text{kontrola})} \right] \times 100 \quad [5]$$

3.2.4.4. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Tijekom rada sa stanicama i postavljanja pojedinačnih eksperimenata potrebno je svakodnevno pratiti izgled i morfologiju stanica pod inverznim svjetlosnim mikroskopom kako bi se uočile njihove eventualne promjene. S obzirom na to da se radi o vizualnoj metodi praćenja promjena u izgledu stanica, da bi one bile lakše vidljive, stanice se oboje bojom kristal-ljubičasto. Stanice su naciijepljene u 2 mL suspenzije koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} u ploču sa 6 jažica. Stanice su tretirane pripremljenim ekstraktima GPChCit i GPEtOH kako je opisano u 3.2.4.3., s volumnim udjelima 2,5 % i 5 % (v/v) Nakon 72 sata medij za uzgoj se uklanja, a stanice se ispiru dodatkom 2 mL PBS pufera, te se dodaje 0,5 mL otopine boje kristal-ljubičasto. Ploča se vraća u inkubator na 20-30 min poslije čega se uklanja boja, a stanice se ispiru PBS puferom i slikaju uz pomoć Dyno-Eye kamere pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ekstrakcija spojeva jedan je od procesa koji se koristi u različitim granama industrije. Nužna je za njihovu karakterizaciju i kvantifikaciju, a vrši se uz pomoć različitih tipova otapala (ovisno o prirodi spojeva i parametrima procesa). U novije vrijeme interes znanstvenika, ali i procesnih (bio)tehnologa, se sve više usmjerava ka većoj ekonomičnosti procesa, jednostavnijem uklanjanju otpadnih sastojaka te smanjenju opasnosti po ljudsko zdravlje i onečišćenje okoliša. Alternativna eutektična otapala, kakvo je korišteno u ovom radu, imaju sposobnost doniranja i prihvaćanja elektrona i protona tj. stvaranja vodikovih veza što omogućava bolju učinkovitost ekstrakcije njihovom primjenom. S obzirom na to da se DES-ovi sastoje od jeftinih i jednostavnih prirodnih komponenti, smatra se da imaju povoljniji ekotoksikološki profil nego klasična organska otapala koja se još uvijek najčešće koriste za razne ekstrakcije. Također, DES-ovi imaju veliki potencijal u ekstrakciji prirodnih spojeva iz biljaka, budući da mogu ekstrahirati i polarne i nepolarne spojeve. Stoga se sve više istražuje mogućnost njihove primjene za ekstrakciju različitih spojeva, osobito polifenolnih, kako iz biljaka tako i iz raznih nusproizvoda prehrambene industrije.

U ovom radu provedena je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine grožđa u zakiseljenom etanolu i kolin-klorid:limunska kiselina. Ispitan je antioksidacijski kapacitet pripremljenih ekstrakata komine grožđa primjenom ORAC spektrofluometrijska metode, a ukupni polifenoli određeni su primjenom Folin-Ciocalteu reagensa, uz galnu kiselinu kao standard. Biološka aktivnost ekstrakata ispitivana je *in vitro* na humanim tumorskim staničnim linijama HeLa i HepG2 primjenom MTS kolorimetrijske metode.

Na temelju rezultata ovog istraživanja uspoređeni su ukupni polifenoli, ORAC vrijednost i inhibicija rasta stanica djelovanjem pripremljenih ekstrakata komine grožđa ovisno o upotrebljenom otapalu, zakiseljenom etanolu (GP_{EtOH}) odnosno kolin-klorid:citratna kiselina (GP_{ChCit}).

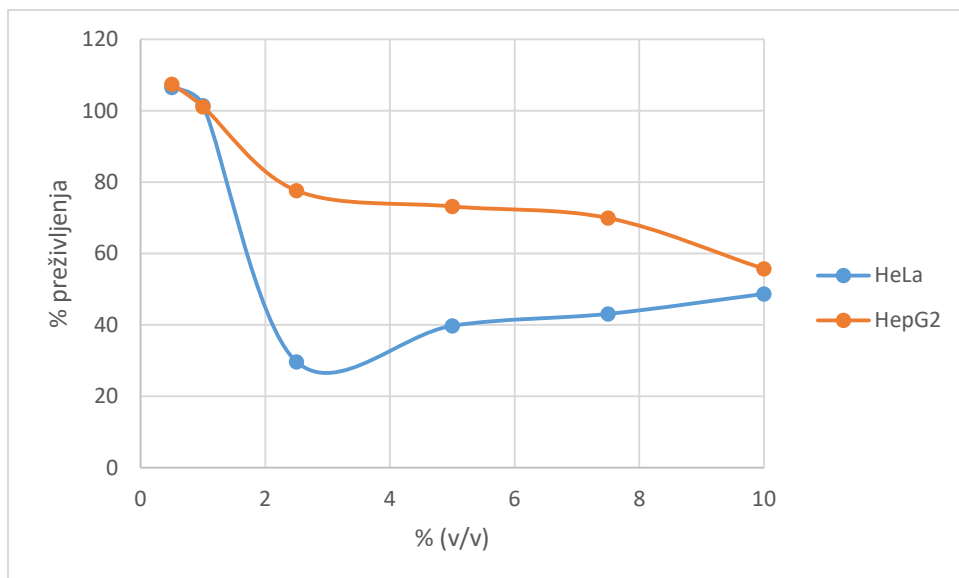
4.1. Sadržaj polifenola i antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa

Tablica 2. Maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva i relativne ORAC vrijednosti za analizirane ekstrakte komine grožđa. Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=2).

Ekstrakt	Maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva (mg g ⁻¹ s.t.)	Relativne ORAC vrijednosti (μmol Trolox ekvivalenta g ⁻¹)
GPETOH	59,934 ± 0,9114	1305,651 ± 36,00
GPChCit	102,927 ± 1,8245	2214,970 ± 15,07

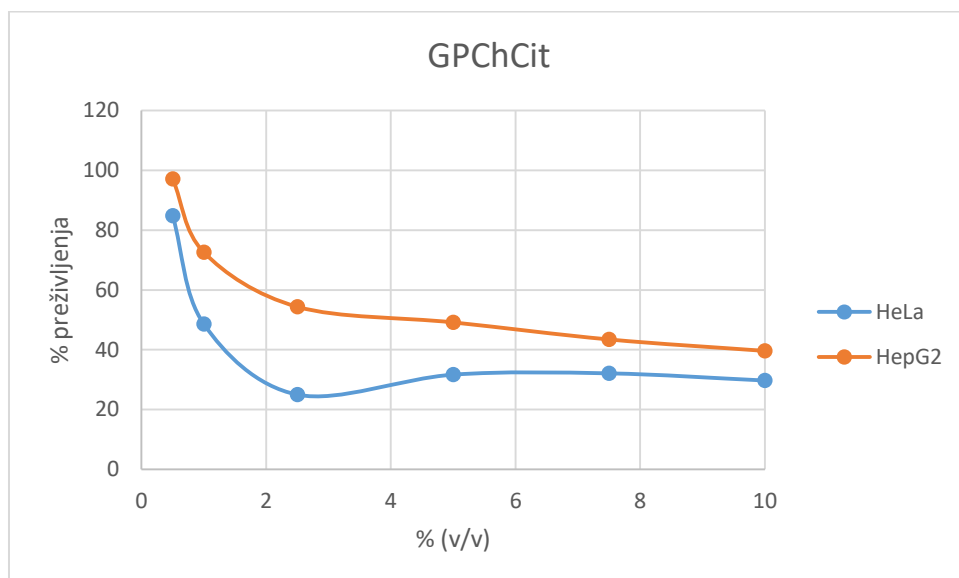
U Tablici 2 prikazani su rezultati mjerenja ukupnih polifenola ekstrahiranih iz komine grožđa primjenom organskog (etanol) i eutektičnog (kolin klorid:limunska kiselina) otapala. Sadržaj ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktu GPETOH manji je nego u GPChCit ekstraktu, što ukazuje na bolju učinkovitost ekstrakcije polifenolnih spojeva primjenom eutektičnog otapala. Do istog zaključka došlo se u radu Garcia Borrego i sur., (2017) gdje su kao otapala za ekstrakciju korišteni kolin-klorid:glicerol i kolin-klorid:ksilitol pri dvije različite temperature (25 °C i 40 °C). Rezultati eksperimenta pri obje temperature pokazali su kako su oba korištena eutektična otapala pogodnija za ekstrakciju u odnosu na konvencionalno organsko otapalo. Također, ekstrakt komine grožđa u kolin-klorid:citratnoj kiselini ima veću ORAC vrijednost nego ekstrakt pripremljen pomoću zakiseljenog etanola. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da je sadržaj ukupnih polifenola u korelaciji s izmjerenim antioksidacijskim kapacitetom tj. da polifenolni spojevi značajno pridonose antioksidacijskom potencijalu pripremljenih ekstrakata. Isto je pokazano i u radu Radošević i sur., (2016a) gdje je također utvrđeno da antioksidacijski kapacitet ekstrakta pokožice grožđa pozitivno korelira s udjelom ukupnih polifenola.

4.2. Antiproliferacijsko djelovanje ekstrakata komine grožđa



Slika 3. Utjecaj ekstrakta komine grožđa u zakiseljenom etanolu (GPEtOH) na HeLa i HepG2 stanice nakon 72-satnog tretmana.

Na temelju rezultata prikazanih na slici 3 uočljivo je kako ekstrakt komine grožđa dobiven ekstrakcijom u zakiseljenom etanolu ima blaži inhibitorski učinak na proliferaciju HepG2 stanične linije nego na HeLa stanice. Kod HeLa stanične linije vidljiv je najjači inhibitorski učinak pri volumnom udjelu GPEtOH od 2,5 % (v/v) gdje je preživljenje stanica oko 30 %.



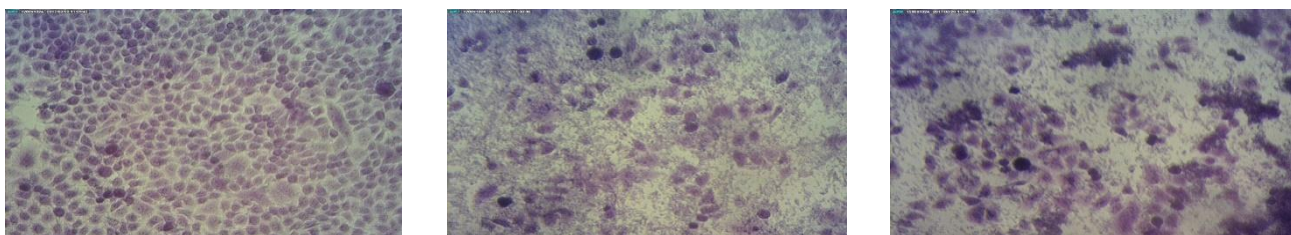
Slika 4. Utjecaj ekstrakta komine grožđa u eutektičnom otapalu kolin-klorid:limunska kiselina (GPChCit) na HeLa i HepG2 stanice nakon 72-satnog tretmana.

Rezultati pokusa prikazani na slici 4 pokazuju kako ekstrakt komine grožđa pripravljen u eutektičnom otapalu kolin-klorid:limunskoj kiselini (GPChCit) također ima slabiji učinak na HepG2 nego na HeLa stanice. Inhibitorni učinak na HeLa staničnoj liniji najjači je pri tretmanu s 2,5 % (v/v) GPChCit.

Uspoređujući antiproliferacijski učinak pripravljenih ekstrakata na dvije stanične linije vidljive su razlike između stanica, odnosno HeLa stanice su se ovdje pokazale osjetljivijim na djelovanje ekstrakata komine grožđa nego HepG2 stanice, što se može pripisati razlici u podrijetlu staničnih linija. Što se tiče inhibitornog djelovanja ekstrakata na rast HepG2 i HeLa jače djelovanje ima GPChCit, što se može povezati s većim sadržajem ukupnih polifenola i jačim antioksidacijskim kapacitetom upravo tog ekstrakta. Takav rezultat je u skladu s prethodnim radom Radošević i sur. (2016) gdje su NADES-i na bazi kolin-klorida korišteni u ekstrakciji polifenola iz pokožice grožđa. Korišteno je pet NADES-a od kojih se onaj s jabučnom kiselinom (ChMa) pokazao najboljim obzirom na učinkovitost ekstrakcije te antioksidacijsko i antiproliferativno djelovanje.

4.3. Izgled HeLa stanica tretiranih ekstraktima komine grožđa

Uočeno antiproliferacijsko, odnosno, inhibitorno djelovanje na rast stanica u kulturi najčešće se očituje i vidljivim morfološkim promjenama stanica. Redovitim promatranjem izgleda stanica pomoću svjetlosnog inverznog mikroskopa tijekom 72-satnog tretmana pripravljenim ekstraktima uočene su promjene u izgledu stanica, a kako bi stanice bile bolje vidljive prethodno smo ih obojali otopinom kristal-ljubičasto te potom fotografirali (Slika 5.).



Slika 5. Izgled HeLa stanica tretiranih ekstraktom komine grožđa pripravljenim s eutektičkim otapalom ChCit. Stanice su tretirane tijekom 72 sata s 2,5 % GPChCit (v/v) (b) i 5 % (v/v) GPChCit (c), dok su na slici (a) prikazane kontrolne, netretirane HeLa stanice. Nakon tretmana stanice su obojane otopinom kristal-ljubičasto i slikane pod inverznim mikroskopom (povećanje 400x).

Slika 5a pokazuje kontrolne HeLa stanice koje nisu tretirane GPChCit, dok su na slikama 5b i 5c prikazane HeLa stanice tretirane ekstraktom GPChCit. Brojnost, gustoća

monosloja i morfologija HeLa stanica na slikama 5b i 5c znatno se razlikuje od kontrolnih stanica te možemo reći da je izgled stanica u skladu sa zapaženim citotoksičnim učinkom ekstrakta GPChCit.

U ovom radu su uspoređeni ekstrakti komine grožđa pripremljeni pomoću zakiseljenog etanola, kao klasičnog organskog otapala i kolin klorida:limunska kiselina, kao alternativnog zelenog eutektičnog otapala, pri čemu dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavku da NADES, nakon odabira i optimizacije, može biti dobra zamjena za organska otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka. Budući da je u literaturi još uvijek malo radova koja se bave ispitivanjem biološke aktivnosti tako pripremljenih ekstrakata potrebna su daljna ispitivanja na drugim staničnim linijama, a potom i *in vivo* testiranja koja bi u konačnici potvrdila mogu li se takvi ekstrakti koristiti kao sigurni dodaci prehrani bez skupih procesa pročišćavanja.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata nakon provedenog istraživanja proizlaze sljedeći zaključci:

1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine grožđa provedena se u ultrazvučnom-mikrovalnom reaktoru uz primjenu zakiseljenog etanola i eutektičnog otapala klorid:citratne kiseline.
2. Ekstrakt komine grožđa pripremljen u DES-u ChCit ima veći antioksidacijski kapacitet i veći maseni udio polifenolnih spojeva iz čega proizlazi da je ChCit bolje otapalo za ekstrakciju polifenola.
3. HeLa stanična linija osjetljivija je na djelovanje ekstrakata komine grožđa nego HepG2 stanice.
4. Zapažena je razlika u inhibitornom djelovanju dvaju različito pripremljenih ekstrakata komine grožđa na rast HeLa i HepG2 stanica. Jači antiproliferativni učinak na rast HepG2 i HeLa stanica ima ekstrakt GPChCit koji sadrži više polifenola i ima veći antioksidacijski potencijal.

6. LITERATURA

- Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9142-9147.
- Abbott, A. P., Capper, G., McKenzie, K. J., Ryder, K. S. (2007) Electrodeposition of zinc-tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride. *J. Electroanal. Chem.* **599**, 288-294.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631-1639.
- Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotox. Environ. Safe.* **99**, 1-12.
- Dai, Y., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2014) Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food. Chem.* **159**, 116-121.
- Ferri, M., Bin, S., Vallini, V., Fava, F., Michelini, E., Rora, A., Minnucci, G., Bucchi, G., Tassoni, A. (2016) Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *N. Biotechnol.* **33**, 338-344.
- Garcia Borrego, A., Rodriguez, J., Fernandez, B. (2017) Extraction of phenolic compounds from olive pomace by deep eutectic solvents (DESs). *Trends in Green Chem.* **3**, 61.
- Gorke, J., Srienc, F., Kazlauskas, R. J. (2010) Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **15**, 40-53.
- Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y. M., Hashim, M. A. (2012) Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochim. Acta.* **541**, 70-75.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193-2195.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Al-Saadi, M. A., Hayyan, A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E. (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455-459.
- Kaur M., Mandair, R., Agarwal, R., Agarwal, C. (2008) Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutr. Cancer.* **60**, 2-11.

- Kaur, S. Kenny, H. A., Jagadeeswaran, S., Zillhardt, M. R., Montag, A. G., Kistner, E., Yamada, S. D., Mitra, A. K., Lengyel, E. (2009) β_3 -integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *Am. J. Pathol.* **175**, 2184-2196.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.
- Mantena, S. K., Baliga, M. S., Katiyar, S. K. (2006) Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis.* **27**, 1682-1691.
- Oksman-Caldentey, K. M., Inzé, D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends. Plan. Sci.* **9**, 433-440.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., L. Reis, R., C. Duarte, A. R. (2014) Natural deep eutectic solvents-Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063-1071.
- Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46-53.
- Radošević, K., Čurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT – Food. Sci. Technol.* **73**, 45-51.
- Tang, B., Zhang, H., Row, K. H. (2015) Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J. Sep. Sci.* **38**, 1053- 1064.
- Wu, S. H., Caparanga, A. R., Leron, R. B., Li, M. H. (2012) Vapor pressure of aqueous choline chloride-based deep eutectic solvents (ethaline, glyceline, maline and reline) at 30–70 °C. *Thermochim. Acta.* **544**, 1–5.
- Zhang, C., Jia, Y., Jing, Y., Wang, H., Hong, K. (2014) Main chemical species and molecular structure of deep eutectic solvent studied by experiments with DFT calculation: a case of choline chloride and magnesium chloride hexahydrate. *J. Mol. Model.* **20**, 2374.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Dora Hrestak

ime i prezime studenta