

Priprema polifenolnih ekstrakata iz otpada vinske industrije u niskotemperaturnim eutektskim otapalima uz primjenu softvera COSMOtherm

Martić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:751196>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Nikolina Martić

1394/MB

**PRIPREMA POLIFENOLNIH
EKSTRAKATA IZ OTPADA
VINSKE INDUSTRIJE U
NISKOTEMPERATURNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA UZ
PRIMJENU SOFTVERA
*COSMOtherm***

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Veronike Gunjević.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina“ kao dio operativnog programa „Konkurentnost i kohezija 2014.- 2020., Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije KK.01.1.1.07.0007“, sufinanciranog od strane Europske Unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na pruženoj prilici za provedbu ovog diplomskog rada te vodstvu i uloženom trudu tijekom izrade.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na odličnoj radnoj atmosferi i savjetima, a posebno hvala dr. sc. Manueli Panić i dr. sc. Veroniki Gunjević na pomoći, vremenu, i razumijevanju tijekom zajedničkog rada.

Veliko hvala i mojim roditeljima na ustrajnoj podršci i motivaciji kroz cijeli život, a ne samo studiranje, te hvala ostatku obitelji, prijateljima, dečku i svima ostalima koji su bili uz mene i na neki način pridonijeli završetku ovog velikog poglavlja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Molekularna biotehnologija

PRIPREMA POLIFENOLNIH EKSTRAKATA IZ OTPADA VINSKE INDUSTRIJE U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA UZ PRIMJENU SOFTVERA COSMOtherm

Nikolina Martić, 1394/MB

Sažetak: Ekstrakti spremni za direktnu primjenu koji sadrže sekundarne biljne metabolite idealni su za primjenu u brojnim industrijama s obzirom na sve veće tendencije znanstvenika prema zelenoj ekstrakciji. Otapala pogodna za njihovu pripremu su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES), a kao polazni materijal moguće je iskoristiti otpad vinske industrije poput komine grožđa, bogate polifenolima. U ovom radu pripremljeni su ekstrakti komine bijelog grožđa u etanolu i NADES-ima odabranima pomoću softvera COSMOtherm. Ekstraktima je određen ukupni sadržaj polifenola Folin-Ciocalteu reagensom, ORAC vrijednosti te su identificirani i kvantificirani najzastupljeniji polifenolni spojevi. Najveći prinos ekstrakcije imao je NADES betain:glukoza te je njeгова bioaktivnost ispitana *in vitro* na Caco-2 staničnoj liniji pomoću MTS metode i DCFH-DA metode. COSMOtherm se dokazao kao pouzdan način predviđanja topljivosti spojeva u željenim otapalima te se betain:glukoza pokazao kao dostojna zamjena etanolu u postupku ekstrakcije iz biljnih materijala. Također je utvrđena prisutnost katehina, epikatehina, epigalokatehina te rutin trihidrata u komini grožđa. Optimalne koncentracije polifenola za antioksidativni i citotoksični učinak moraju još biti dalje istraživane i utvrđene kako bi polifenolni ekstrakti bili učinkoviti i sigurni za ljudsku primjenu.

Ključne riječi: niskotemperaturna eutektička otapala, polifenoli, COSMOtherm, komina grožđa

Rad sadrži: 53 stranice, 14 slika, 6 tablica, 78 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković*

Pomoć pri izradi: *Veronika Gunjević, dr.sc.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić
2. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo
4. Doc.dr.sc. Ana Tušek Jurinjak

Datum obrane: 27. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: *Molecular biotechnology*

Polyphenolic extracts preparation from wine industry waste in natural deep eutectic solvents using COSMO_{therm} software

Nikolina Martić, 1394/MB

Abstract: Ready-to-use extracts that contain secondary plant metabolites are ideal for use in many industries given the scientists' growing tendencies towards green extractions. Solvents suitable for their preparation are natural deep eutectic solvents (NADES), and as a starting material it is possible to use wine industry waste, such as grape pomace, rich in polyphenols. In this study, extracts of white grape pomace were prepared in ethanol and NADES selected by COSMO_{therm}. Extracts total polyphenols content was determined with Folin-Ciocalteu reagent, ORAC values were also determined and prevalent polyphenolic compounds were identified and quantified. Betaine:glucose provided the best extraction efficiency and its biological activity was evaluated *in vitro* on the Caco-2 cell line using the MTS and the DCFH-DA assay. COSMO_{therm} has proven to be reliable in predicting the solubility of compounds in given solvents, and betaine:glucose extract has proven to be a good alternative to ethanol in the extraction process. The presence of catechin, epicatechin, epigallocatechin and rutin trihydrate in grape pomace was also shown. Optimal concentrations of polyphenols in extracts for antioxidant and cytotoxic effects need to be further evaluated to be effective and safe for human consumption.

Keywords: natural deep eutectic solvents, polyphenols, COSMO_{therm}, grape pomace

Thesis contains: 53 pages, 14 figures, 6 tables, 78 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor

Technical support and assistance: PhD. *Veronika Gunjević*, Scientific Assistant

Reviewers:

1. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
2. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
3. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
4. PhD. *Ana Tušek Jurinjak*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 27 September 2021

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. ZELENA EKSTRAKCIJA..... | 3 |
| 2.1.1. Načela zelene ekstrakcije | 5 |
| 2.1.2. Niskotemperaturna eutektička otapala | 7 |
| 2.1.2.1. Svojstva eutektičkih otapala | 8 |
| 2.1.2.2. Toksičnost eutektičkih otapala | 9 |
| 2.1.2.3. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva | 9 |
| 2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA GROŽĐA..... | 11 |
| 2.2.1. Grožđe kao izvor polifenola | 11 |
| 2.2.2. Antitumorska aktivnost polifenola | 13 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 16 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 16 |
| 3.1.1. Komina | 16 |
| 3.1.2. Kemikalije | 16 |
| 3.1.3. Otopine i puferi..... | 17 |
| 3.1.4. Stanične linije | 18 |
| 3.1.5. Oprema | 18 |
| 3.2. METODE RADA | 19 |
| 3.2.1. Procjena topljivosti polifenola u eutektičnim otapalima pomoću programa COSMO _{therm} | 19 |
| 3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 20 |
| 3.2.3. Liofilizacija komine grožđa..... | 20 |
| 3.2.4. Priprema ekstrakata komine grožđa | 21 |
| 3.2.5. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom..... | 22 |
| 3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom..... | 23 |
| 3.2.7. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata na Caco-2 staničnoj liniji | 24 |
| 3.2.7.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom | 25 |
| 3.2.7.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću DCFH-DA metode..... | 27 |
| 3.2.8. Određivanje polifenola u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)..... | 29 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 31 |
| 4.1. ODABIR NADES-A | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIM POMOĆU NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA 34 | |
| 4.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA..... | 36 |
| 4.3.1. Antioksidacijski kapacitet polifenola | 36 |
| 4.3.2. <i>In vitro</i> aktivnost ekstrakata komine grožđa na Caco-2 staničnu liniju pomoću MTS metode | 37 |
| 4.3.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću DCFH-DA metode..... | 39 |
| 4.4. ODREĐIVANJE POLIFENOLA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) | 40 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 44 |
| 6. LITERATURA | 45 |

1. UVOD

Zadnjih godina nastoji se pridati što veća pažnja zaštiti okoliša te sigurnosti industrijskih procesa i proizvoda. Iz tog razloga industrija pristupa brojnim izazovima u smislu uspostave zelenijih i sigurnijih procesa uz ekonomski održivu proizvodnju. Kao potencijalno savršeno rješenje, za prehrambenu i farmaceutsku industriju koje se bave pripremom proizvoda koji sadrže sekundarne biljne metabolite, nalažu se ekstrakti spremni za direktnu primjenu. Njihova priprema ne zahtijeva korake izolacije biološki aktivnih spojeva što smanjuje potrebno vrijeme pripreme, ali i troškove procesa. Idealna otapala za njihovu pripremu su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES, eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*). Uočeno je da ta otapala povećavaju biološku aktivnost i stabilnost biološki aktivnih spojeva poput polifenola te ujedno zadovoljavaju principe zelene kemije. Dodatna prednost je to što posjeduju GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*) (Jurić i sur., 2021; Panić i sur., 2020; Mišan i sur., 2019; Panić i sur., 2019).

Prednosti NADES-a već su istražene i dokazane te potvrđuju kako su to obećavajuća otapala za ekstrakciju najvećeg udjela polifenola te da su sigurna za uporabu (Panić i sur., 2020; Lores i sur., 2017). NADES-i su mješavina donora vodikove veze (eng. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) koji mogu biti šećeri, polioli, aminokiseline, amidi, i akceptora vodikove veze (eng. *Hydrogen Bond Aceptor*, HBA) poput kolin klorida u definiranom stehiometrijskom omjeru. Još neke značajne prednosti NADES-a su to što su cijene usporedive su s konvencionalno korištenim otapalima. NADES-i su kemijski i termički stabilna, nehlapljiva, nezapaljiva, netoksična i biorazgradiva otapala. NADES-i su također i otapala po mjeri. Naime, moguće je kreirati otapala sa željenim fizikalno-kemijskim svojstvima za specifičnu namjenu (Martins i sur., 2019; Paiva i sur., 2018). Međutim, eksperimentalno tražiti optimalni NADES za ekstrakciju željenih spojeva je dugotrajan, skup i zahtjevan proces. Iz tog razloga, može se koristiti softver COSMO $_{therm}$. Trenutno se COSMO-RS (eng. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) smatra jednom od najtočnijih *ab initio* računalnih metoda dostupnih za rangiranje otapala (Klamt i sur., 1998). Iako inicijalno nije prilagođen za NADES, moguće je stvoriti vlastitu bazu podataka pomoću softvera TmoleX. Ulaz za TmoleX je molekularna struktura (2D, 3D ili SMILES), a nakon optimizacije može se stvoriti geometrijski i energetski optimalna molekula. Takva kombinacija ova dva softvera omogućuje računalno pretraživanje najboljih NADES-a za ekstrakciju polifenola.

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti, znani kao bitan dio ljudske prehrane zbog izuzetnih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava, te drugih bioloških aktivnosti poput antimutagenih, antikancerogenih ili protuupalnih. Brojne *in vitro*, *in vivo* i epidemiološke studije potvrdile su značajnu ulogu ovih spojeva u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Rasouli i sur., 2017; Petti i Scully, 2009; Pandey i Rizvi, 2009). Za ekstrakciju polifenola osim korištenja neprerađenog biljnog materijala, mogao bi se koristiti i otpad poljoprivredne i prehrambene industrije kao dio pristupa biorafinerije (Mirabella i sur., 2014). Recikliranje ovog otpada kao sirovine za izolaciju bioaktivnih komponenti može povećati ekonomičnost proizvodnje smanjenjem količine otpada te stvaranjem dodane vrijednosti. Komina grožđa jedan je od nusproizvoda koji je izuzetno bogat polifenolima. Štoviše, ovaj bi način valorizacije mogla donijeti dodanu vrijednost cjelokupnom procesu proizvodnje vina (Rasouli i sur., 2017; Jara-Palacios i sur., 2015; González-Centeno i sur., 2013). Proizvodnja vina bitan je sektor u Republici Hrvatskoj te je u vinskoj 2018. godini proizvedeno je otprilike 123,1 t grožđa, odnosno 984 730 hL vina (Državni zavod za statistiku, 2020). Otpad od proizvodnje vina čini 20-25% ukupne mase grožđa korištenog u proizvodnji. Prema podacima organizacija FAO/WHO to iznosi do 5-10 milijuna t na globalnoj razini, a na hrvatskoj razini preko 15 000 tona krutog otpada (Zacharof, 2017; Wadhwa i Bakshi, 2013; Voća i sur., 2010). Nepravilno odlaganje ovog otpada predstavlja rizik za okoliš koji može izazvati zagađenje tla i vode. S obzirom na navedeno te visoku vrijednost ovoga nusproizvoda, nastoji ga se kvalitativno iskoristiti kao sirovinu (Mirabella i sur., 2014). Većina otpada od proizvodnje vina sastoji se od komine grožđa, koja sadrži pokožice i sjemenke dobivene nakon prešanja te peteljke i sjemenke. To su vrlo bogati izvori polifenolnih spojeva. Također, ulje sjemenki grožđa sadrži polifenole te ima visok sadržaj esencijalnih masnih kiselina. Uglavnom su to linolna i oleinska kiselina, a od drugih antioksidansa sadrži tokoferole i β -karotene te fitosterole, dok se u pokožici grožđa uglavnom nalaze tartarati, odnosno vinska kiselina (Teixeira i sur., 2014).

U ovom radu COSMO $therm$ je korišten kao alat za odabir i dizajn optimalnih NADES-a za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa sorte Graševina s ciljem pripreme ekstrakta bogatog polifenolima spremnog za direktnu primjenu. Nakon odabira optimalnog NADES-a, pripremljeni su i analizirani ekstrakti komine te je određen ukupni sadržaj polifenola, antioksidativno djelovanje te je ekstraktima ispitana *in vitro* biološka aktivnost na staničnoj liniji humanog karcinoma crijeva (Caco-2). Također, pojedini polifenoli u ekstraktima identificirani su i kvantificirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Dobiveni rezultati uspoređeni su s ekstraktom pripremljenom u etanolu, konvencionalnom otapalu često korištenom u industriji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA EKSTRAKCIJA

S razvojem industrije, porastom ljudske populacije i većom potražnjom za produktima biotehnoške, kemijske, prehrambene i farmaceutske proizvodnje, raste i zagađenje okoliša, količina otpada te pretjerano iskorištavanje prirodnih resursa. Za proizvodnju malih količina visokovrijednih produkata koriste se značajni volumeni reagensa često štetnih za okoliš te se danas znanstvenici diljem svijeta nastoje prilagoditi boljim alternativnim opcijama. Kako bi se uspostavila održivost procesa mnoga znanstvena i industrijska područja se okreću principima zelene kemije. Zelena kemija je interdisciplinarno područje koje nastoji implementirati mnoge kemijske inovacije kako bi se postigli ekonomski ciljevi uz naglasak na očuvanju okoliša te se temelji na 12 principa navedenih u Tablici 1 (Anastas i Eghbali, 2010).

Tablica 1. Principi zelene kemije (Anastas i Eghbali, 2010).

| Princip | Objašnjenje |
|---|---|
| 1. Prevencija | Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao. |
| 2. Ekonomija atoma | Kemijske sinteze bi trebale biti osmišljene tako da se ulazna sirovina maksimalno iskoristi u konačnom proizvodu. |
| 3. Manje štetne kemijske sinteze | Kada je to moguće, osmisliti procese sinteze koje ne koriste i ne proizvode tvari s (potencijalnim) toksičnim učinkom na zdravlje čovjeka i okoliš. |
| 4. Sigurnije kemikalije | Kemijske produkte potrebno je osmisliti tako da im se održi djelotvornost, a smanji toksičnost. |
| 5. Sigurnija otapala i pomoćne tvari | Uporabu pomoćnih tvari poput otapala i tvari za separaciju zaobići ukoliko je moguće, a ukoliko nije koristiti bezopasne tvari. |

| | |
|---|---|
| 6. Energetska učinkovitost | Energetske zahtjeve treba minimizirati i kad god je moguće provoditi reakcija na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku |
| 7. Obnovljivi izvori | Treba koristiti obnovljive sirovine kad je to tehnički i ekonomski isplativo. |
| 8. Izbjegavati nepotrebne derivatizacije | Nepotrebna proširenja procesa poput zaštite funkcionalnih skupina i privremenih modifikacija fizikalno-kemijskih procesa potrebno je zaobići. |
| 9. Katalitički reagensi | Što selektivniji katalitički reagensi prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama. |
| 10. Razgradivost | Kemijske produkte bi se nakon procesa trebali moći razgraditi na tvari neškodljive za okoliš, a ne nakupljati. |
| 11. Pravovremena analiza zagađenja | Treba razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog ili proizvodnog procesa kako bi se spriječilo nastajanje opasnih tvari. |
| 12. Prevencija nesreća | Za procese je potrebno koristiti tvari s najmanjom mogućnosti izazivanja nesreće, uključujući štetna isparavanja, eksplozije, zapaljenje. |

U većini proizvodnih postupaka korak ekstrakcije je nezaobilazan i veoma bitan. Za svaku vrstu polaznog materijala bitno je optimizirati uvjete ekstrakcije kako bi se osigurala najveća uspješnost ekstrakcije, a sam način i metoda ekstrakcije proizlazi iz strukture i svojstava spoja kojega se nastoji izolirati. Cilj je svakako dobiti što veći prinos željenog produkta, smanjiti broj koraka te osigurati selektivnost pri ekstrakciji. Kao posebno zanimljivo područje kemije proučavaju se stoga zelene ekstrakcije. One se temelje na otkriću i dizajnu ekstrakcijskih procesa koji koriste alternativna otapala i/ili obnovljive izvore, a uz to daju sigurne proizvode visoke kvalitete. Za uspješnu izvedbu zelenih ekstrakcija mogu se koristiti tri različita pristupa. Prvi pristup jest optimizacija, odnosno poboljšanje postojećih procesa, drugi pristup je

stvaranje inovacija u procesima, a treći korištenje novih alternativnih otapala (Chemat i sur., 2012).

2.1.1. Načela zelene ekstrakcije

Unatrag nekoliko desetljeća, interes za provođenjem zelenih ekstrakcija je porastao te su se inovativne alternative počele primjenjivati u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Takvu promjenu inicirali su postavljeni principi zelene kemije te principi zelenog inženjerstva. Zeleno inženjerstvo nastoji osigurati održivost procesa kroz znanost i tehnologiju te daje smjernice kako dizajnirati nove materijale, produkte i cijele procese u svrhu očuvanja ljudskog zdravlja i okoliša (Anastas i Zimmerman, 2003). Iz obje skupine principa osmišljeno je i šest principa zelene ekstrakcije (Chemat i sur., 2019). Šest principa zelene ekstrakcije služe kao smjernice, a ne striktna pravila za primjenu. Njihovom primjenom skraćuje se vrijeme potrebno za ekstrakciju na minute, a ne sate, osigurava se visoka ponovljivost, smanjuje se upotreba reagensa, dobivaju se produkti visoke čistoće te je potrošnja energije manja u odnosu na konvencionalne ekstrakcijske metode (Chemat i sur., 2020).

Prvi princip, odnosno načelo, ukazuje na potrebu za pronalaskom novih izvora biljnih materijala te korištenjem obnovljivih izvora biljnih materijala. Kroz povijest je došlo do nestanka brojnih biljnih vrsta zbog pretjerane eksploatacije biljnih materijala te je danas posebna pažnja usmjerena na održavanje biološke raznolikosti te sprječavanju izumiranja rijetkih biljnih vrsta. Stoga je poželjno koristiti potpuno obnovljive biljne izvore dobivene primjerice intenzivnom kultivacijom ili *in vitro* uzgojem (Chemat i sur., 2012).

Drugo načelo usmjerava na uporabu alternativnih otapala. To se odnosi uglavnom na vodu te otapala iz prirodnih izvora. Jedna od bitnijih prednosti korištenja takvih otapala jest sigurnost radnika koji rade s njima. Veliki dio klasičnih otapala koja su do sada bila i još uvijek su u uporabi su lako zapaljiva, hlapljiva te često toksična, kancerogena, mutagena te postoji mogućnost apsorpcije putem kože ili respiratornog sustava. Navedena svojstva također doprinose zagađenju okoliša i efektu stakleničkih plinova. Iz tog razloga iznimno je bitno primjenjivati alternativna otapala. Lako ih je dobiti iz prirodnih izvora, učinkovita su, biorazgradiva, netoksična i nezapaljiva. Također, takva otapala često nisu reaktivna s opremom koja se koristi te imaju nisku cijenu. Kao zeleno otapalo idealno bilo bi koristiti vodu, a druga odlična otapala su i superkritični fluidi, otapala na bazi organskih soli i otapala iz prirodnih izvora (Chemat i sur., 2012). Također, bitno je spomenuti kako je smanjenje upotrebe štetnih otapala jedan od prioriteta Europske Unije za razdoblje od 2010. do 2050. godine (Chemat i sur., 2019).

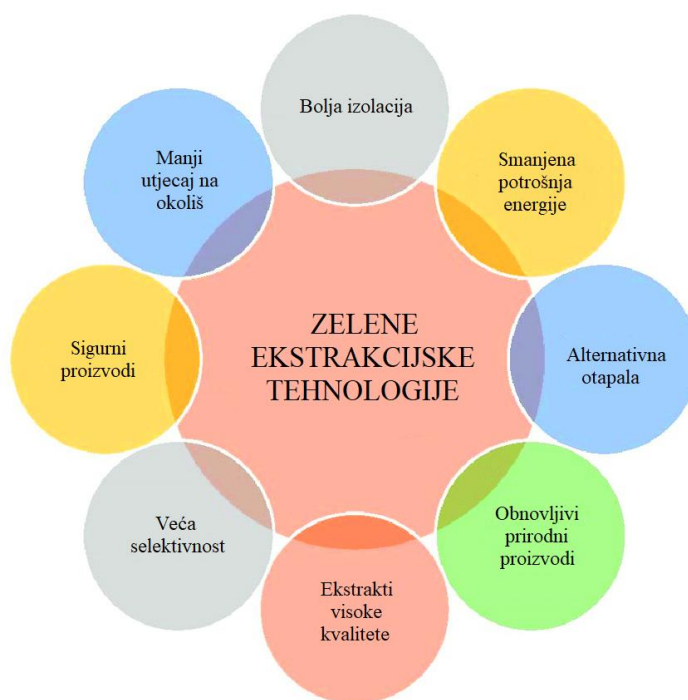
Treće načelo govori kako bi bilo poželjno smanjiti potrošnju energije ponovnom uporabom te primjenom inovativnih tehnologija. Visoka potrošnja energije pridonosi smanjenoj isplativosti procesa, višim troškovima proizvodnje te negativno utječe na okoliš (Chemat i sur., 2019). Postoji nekoliko načina za postizanje smanjivanje potrošnje energije, a to su: optimizacija postojećih procesa, ponovna uporaba energije oslobođene tijekom procesa ekstrakcije, te uporaba potpuno inovativnog izvora energije. Jedan jednostavan primjer jest iskorištavanje topline oslobođene tijekom kondenzacije para (Chemat i sur., 2012).

Iduće, četvrto načelo sugerira proizvodnju nusprodukata umjesto otpada kako bi se stimulirala bio- i agro- industrija prerade. Koncept biorafinerije je sve više prisutan u industriji te predstavlja odličan način dobivanja puno različitih korisnih proizvoda iz nekog izvora. Za razliku od tog pristupa, uobičajeno je iz jednog izvora dobiti jedan željeni produkt uz generiranje velike količine otpada i neželjenih nusproizvoda. To, naravno dovodi do prekomjerne eksploatacije biljnih izvora i zagađenja okoliša pa se principe biorafinerije nastoji što više približiti industriji (Chemat i sur., 2012). Takvim napuštanjem linearnog načina proizvodnje, dobiva se široki spektar različitih proizvoda s dodanom vrijednosti te se ujedno osigurava održivost društva, ekonomije i okoliša (Chemat i sur., 2019).

Peto načelo ukazuje kako bi trebalo smanjiti broj koraka i operacija pomoću sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa. Na taj način se ujedno i smanjuje cijena proizvodnog procesa i bolje je iskorištenje energije. Kako bi se to postiglo različite industrije često nastoje integrirati svoje pogone, uvesti čišće i sigurnije tehnologije te štediti sirovine i resurse. Primjenom navedenoga, takve industrije osiguravaju konkurentnost na tržištu i ujedno udovoljavaju principima zelene proizvodnje (Chemat i sur., 2012).

Zadnje šesto načelo usmjerava na dobivanje biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez kontaminanata. S obzirom na to da su ekstrakti zapravo smjesa bioaktivnih tvari i drugih komponenti koje mogu utjecati na topljivost i apsorpciju, potrebno je zakonski regulirati sastav za određenu primjenu. Iako su ekstrakti prirodnog podrijetla, to nije dovoljno kako bi se moglo reći da su potpuno sigurni za ljudsku primjenu. Naime, ekstrakti moraju potjecati iz specifičnih sirovina, imati određena kemijsko-fizikalna svojstva te moraju biti skadištena na odgovarajući način. Također, u njima ne smije biti pesticida, mikotoksina ili teških metala. Na taj se način može uspješno procijeniti utjecaj na okoliš i minimizirati štetan učinak na isti (Chemat i sur., 2012).

Prednosti uključivanja načela zelene ekstrakcije u procese proizvodnje sažeto su prikazani na Slici 1.



Slika 1. Prednosti primjene načela zelene ekstrakcije u industriji (Putnik i sur., 2018).

2.1.2. Niskotemperaturna eutektička otapala

Kao zamjenu najčešće korištenim organskim otapalima, znanstvena zajednica počela je istraživati alternativna otapala koja bi mogla imati bolji učinak na okoliš uz zadržavanje ili poboljšanje ekonomičnosti procesa. S obzirom na to da su otapala u svakodnevnoj upotrebi u većini industrijskih procesa, izazov je sintetizirati ona koja su ekološki prihvatljiva. Kao područje interesa predložile su se ionske kapljevine koje imaju široko područje primjene te je njihova svojstva moguće prilagođavati potrebama (Smith i Ryder, 2014). To su organske soli sastavljene od kationa koji mogu biti različito supstituirane organske molekule s pozitivno nabijenim dušikovim, sumporovim ili fosforovim atomom te manjih anorganskog kationa. Zbog razlike u strukturi i veličini iona, veze između njih su slabe te su ionske kapljevine u tekućem stanju pri temperaturama ispod 100 °C. Prednosti korištenja ionskih kapljevina se to što su izrazito polarne, stabilne i netoksične (Kainfar i Mafi, 2020). No najveća zapreka u njihovom korištenju jest cijena i kompleksnost sinteze, stoga su se daljnja istraživanja usmjerila na četvrtu generaciju ionskih kapljevina, točnije niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES). DES-ovi također imaju sposobnost prilagodbe svojstava, netoksični su i biorazgradivi, a lako ih je sintetizirati iz jeftinih i dostupnih komponenata (Hansen i sur., 2020).

2.1.2.1. Svojstva eutektičkih otapala

Eutektička otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (eng. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) (najčešće kvaterne amonijeve soli) i donora vodika (eng. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) (amini, šećeri, alkoholi, karboksilne kiseline) koji se međusobno vežu vodikovim vezama. DES-ovi imaju svojstvo eutektičnosti tj. njihovo talište je sniženo u odnosu na tališta svake zasebne komponente. To svojstvo je posljedica lokalizacije naboja, a ovisi o udjelu nenabijenog donora vodika (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). DES-ovi su također vrlo viskozni pri sobnoj temperaturi, te im je viskoznost veća od 0,1 Pas. Uzrok tome je pokretljivost slobodnih grupa zbog čvrstih vodikovih veza između komponenti otapala, elektrostatskih i van der Waalsovih interakcija između iona te malih praznina u strukturi. Zbog toga većina DES-ova ima i malu provodljivost ($> 2 \text{ mS cm}^{-1}$) pri sobnoj temperaturi (Zhang i sur., 2012). Visoka viskoznost može otežavati ekstrakciju kruto-tekuće pa je ponekad potrebno dodati određeni udio vode kako bi se poboljšao prijenos mase (Dai i sur., 2013a).

DES-ovi se mogu podijeliti u 4 tipa, ovisno o tome koje komponente služe za sintezu DES-a. Tip I DES čine kvaterna amonijeva sol i metalna sol, tip II kvaterna amonijeva sol i hidrat metalnog klorida, tip III kvaterna amonijeva sol i HDB, a tip IV hidrat metalnog klorida i HBD. Relativno nova skupina je i tip V kojega čine neionski HBD-i i HBA-i (Hansen i sur., 2020).

DES-ove je vrlo lako pripremiti, a metoda sinteze je često stvar osobne preferencije i dostupne opreme. Najčešće se sinteza provodi miješanjem komponenti DES-a uz povišenu temperaturu dok se ne dobije homogena tekućina. Nisu potrebni dodatni koraci niti reagensi jer ne dolazi do kemijske reakcije nego isključivo miješanja komponenti (Hansen i sur., 2020). S obzirom na to, nema nastanka otpada ni nusproizvoda. E-faktor, omjer proizvedenog otpada i dobivenog produkta te mjera zelenosti reakcije, u tom slučaju iznosi 0 (Paiva i sur., 2014).

Kada se DES-ovi dobivaju iz primarnih metabolita poput aminokiselina, organskih kiselina, alkohola ili šećera, onda se govori o prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim smjesama (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Njihova prednost u odnosu na ionske kapljevine i DES-ove leži u još manjoj toksičnosti, većoj održivosti i boljem utjecaju na okoliš (Kalhor i Ghandi, 2019). Također, cijena pripreme je niska, moguće ih je reciklirati te su komponente za sintezu lako dostupne.

2.1.2.2. Toksičnost eutektičkih otapala

Iako se eutektička otapala smatraju netoksičnima, postoji malo studija koja eksplicitno to potvrđuju. Sama pretpostavka o netoksičnosti polazi od toga da su DES-ovi „zelena otapala“ te da potječu od prirodno dostupnih tvari, no svakako je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se to jednoznačno dokazalo. Potreba za time proizlazi i iz sve veće primjene DES-ova te je potrebno njihov učinak staviti pod regulatorne okvire (Macário i sur., 2019).

Rana istraživanja citotoksičnosti DES-ova baziranih na kolin kloridu ispitana su na bakterijskim sojevima te je utvrđeno kako nemaju izrazit toksični učinak, no citotoksičnost DES-a je bila veća u odnosu na pojedine komponente samog otapala (Hayyan i sur., 2013a). S druge strane DES-ovi temeljeni na derivatima fosfora pokazali su se kao toksični za bakterije i larve račića te su također pokazali veću citotoksičnost u odnosu na pojedine komponente (Hayyan i sur., 2013b). Iz toga se dalo zaključiti kako komponente DES-ova djeluju sinergistički, a to je posljedica vezanja pojedinih komponenti i stupanja u interakcije.

U radu Benlebna i sur. (2018) ispitana je toksičnost NADES-a betain:glicerol (molarni omjer 1:2, +10 % H₂O) na 12 Wistar štakora starosti 6 tjedana primjenom 6 mL fenolnog NADES ekstrakta dnevno tijekom 14 dana. Rezultati su pokazali kako je kod 2 štakora došlo do smrti, a kod ostatka je došlo do povećane potrebe za vodom, gubitka tjelesne mase, hepatomegalije te plazma oksidativnog stresa uzrokovanog visokom koncentracijom lipida u krvi. Dakle, jasno je da je kratkotrajna oralna primjena ovog NADES-a uzrokovala toksičnost kod štakora unatoč sadržaju fenola koji imaju brojne korisne učinke na organizam.

Iako se DES-ovi sve više istražuju i primjenjuju, potrebno je vršiti još detaljnijih i obuhvatnijih toksikoloških studija kako bi se uočio utjecaj na ljude, životinje, ali i okoliš.

2.1.2.3. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva

Veliki broj istraživanja dokazao je uspješnu upotrebu eutektičkih otapala u sintezi organskih spojeva i biokatalizi, 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). Biljni materijali bogat su izvor biološki aktivnih spojeva koji imaju pozitivan učinak na živi organizam. Iz tog razloga mnoga znanstvena istraživanja usmjerena su na izolaciju takvih spojeva iz biljaka te njihovu primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i mnogim drugima. Kako bi se

ustavila održivost i održala ekonomičnost procesa, veliki broj istraživanja nastoji naći način iskorištavanja nusprodukata i otpada prehrambene industrije. Jedan primjer je otpad od prerade grožđa. Otprilike 25 % težine ukupnog prerađenog grožđa ostaje kao otpad (Dwyer i sur., 2014). Komina koja je nusprodukt prerade grožđa, bogata je biološki aktivnim spojevima koje je moguće izolirati i primjenjivati u širokom rasponu industrija. Također, stabilnost fenolnih spojeva u DES-ovima na bazi šećera je velika prednost primjene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Dai i sur., 2014).

Za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnih materijala postoji mnogo metoda. U tradicionalnoj uporabi su ekstrakcija otapalom ovisno o vrsti spoja, Soxhlet ekstrakcija, maceracija i filtracija. Neke od modernijih metoda su ekstrakcija pod pritiskom, subkritična ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te enzimski potpomognuta ekstrakcija. Svaka od ovih metoda nosi svoje prednosti te smanjuje količinu korištenih reagensa, smanjuje broj koraka i degradaciju uzorka (Sasidharan i sur., 2011). Za ekstrakciju polifenola, kao najistraživaniju skupinu biološki aktivnih spojeva u grožđu, najčešće se koristi ekstrakcija kruto-tekuće. Cvjetko Bubalo i sur. (2016) su usporedili dvije metode ekstrakcije, ekstrakciju mikrovalovima i ekstrakciju ultrazvukom, prilikom ekstrakcije antocijana i flavanola iz pokožice grožđa. Zaključeno je kako je ekstrakcija ultrazvukom dala veća iskorištenja navedenih spojeva u odnosu na ekstrakciju mikrovalovima te je pri izradi ovoga rada korištena upravo ta metoda (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

Eutektička otapala imaju veliki potencijal za ekstrakciju polifenolnih spojeva na što utječe stvaranje vodikovih veza između polifenolnih spojeva i molekula DES-a. Sama fizikalna svojstva DES-a, primjerice polarnost i viskoznost, imaju značajan utjecaj (Dai i sur., 2013a). Također, na udio ekstrahiranih polifenola utječe i udio vode u eutektičnom otapalu. Eutektička otapala s većim udjelom vode bolje ekstrahiraju polarne komponente, a otapala s manjim udjelom vode bolje ekstrahiraju manje polarne komponente (Dai i sur., 2013b). Kao optimalni udio vode u DES-u pokazao se 30 %-tni udio. U tom slučaju ostvarena je najučinkovitija ekstrakcija antocijana iz grožđa (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Dakle, kada se svi navedeni parametri optimiziraju moguće je postići velike prinose ekstrakcije polifenolnih spojeva u usporedbi s upotrebom konvencionalnih otapala kao što su voda i etanol (Dai i sur., 2013a)

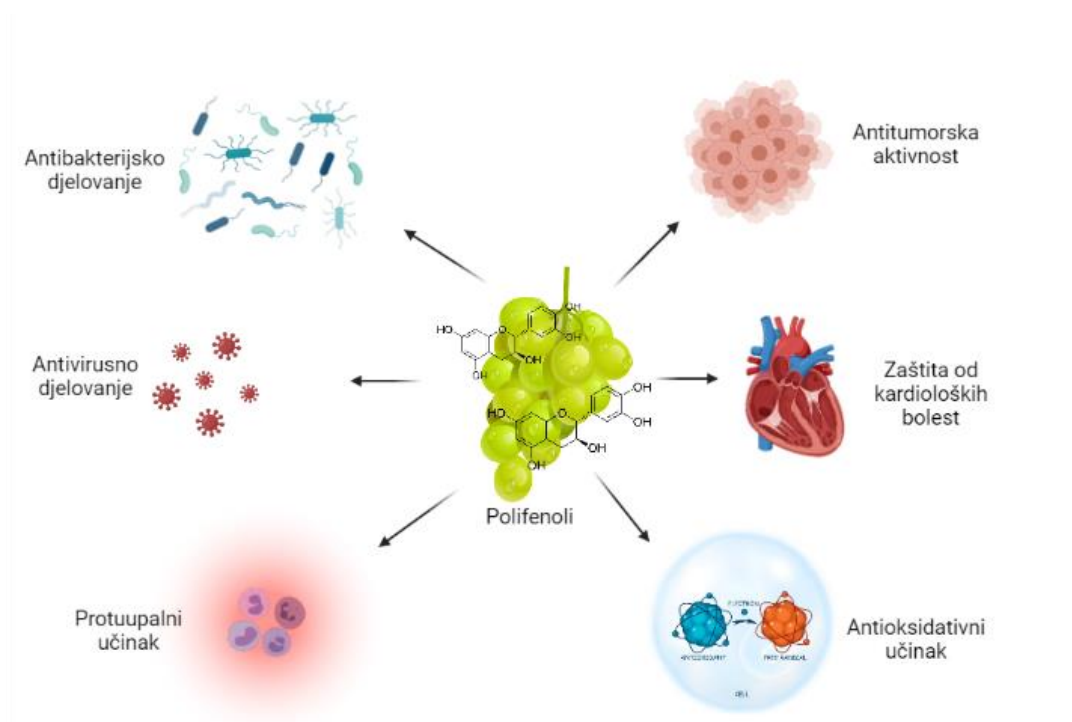
2.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA GROŽĐA

2.2.1. Grožđe kao izvor polifenola

Grožđe je biljka sa širokom primjenom u prehrambenoj industriji tj. u proizvodnji vina i sokova. To je biljka bogata fitonutrijentima, polifenolima, vitaminom C i vitaminima skupine B, osim B12 te kalijem, kalcijem, magnezijem, fosforom, manganom, natrijem, bakrom, cinkom i željezom. Ovi spojevi imaju brojne korisne učinke na organizam kao što su protuupalno djelovanje, antioksidativno djelovanje te antitumorski učinak (Tournour i sur., 2015).

Proizvodnja vina često generira velike količine otpada. Komina je nusproizvod pri proizvodnji koji se sastoji od prešane pokožice, sjemenki i peteljki te čini oko 25 % ukupnog obrađenog grožđa. Inače veće količine otpada u industriji predstavljaju problem zbrinjavanja, no kada je riječ o visokovrijednom otpadu bogatom biološki aktivnim spojevima, taj problem je lakše riješiti. Daljnom obradom komine moguće je izolirati te spojeve te ostvariti dodanu vrijednost procesa.

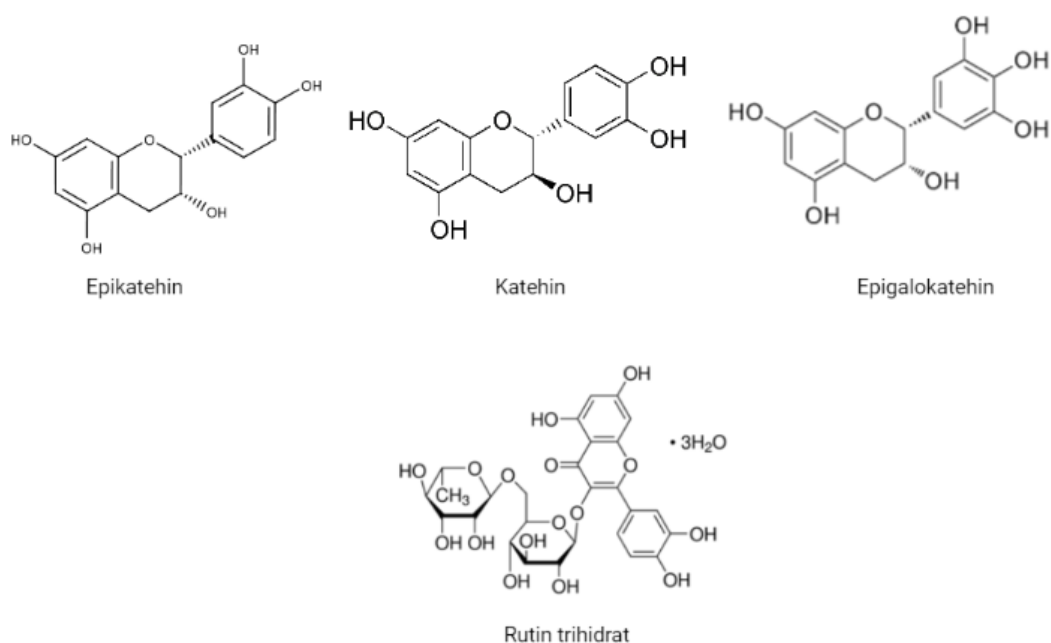
Najvažniji biološki aktivni spojevi koji se nalaze u grožđu su polifenoli. To su sekundarni metaboliti koji imaju aromatske prstenove s jednom ili više hidroksilnih skupina, a inače biljkama služe kao zaštita od ultraljubičastog zračenja i utjecaja patogena. U hrani oni često pridonose gorkom okusu, trpkosti te oksidativnoj stabilnosti (Pandey i Rizvi, 2009). To su spojevi s izrazitim antioksidativnim učinkom, čak i većim u odnosu na esencijalne vitamine, što značajno pridonosi prednostima konzumacije grožđa i njegovih proizvoda. Također, sadržaj polifenola bitan je parametar određivanja kvalitete vina. Uz ove prednosti, bitno je spomenuti i to da polifenoli imaju ulogu u zaštiti organizma od kardioloških bolesti, imaju protuupalno, antitumorsko, antivirusno i antibakterijsko djelovanje koje je povezano s njihovim antioksidativnim učinkom (Slika 2) (Oprica i sur., 2016).



Slika 2. Pozitivni učinci polifenola (vlastita slika, izrađeno pomoću programa BioRender.com).

Polifenoli se mogu klasificirati u skupine na više načina. Manach i sur. (2004) su polifenole podijelili u četiri skupine s obzirom na broj fenolnih prstenova koje sadrže i strukturne komponente koje ih povezuju, a to su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani. Najviše istraživana skupina su flavonoidi koji se dijele u nekoliko podrazreda: flavanoli, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, flavoni i antocijani (Brodowska, 2017). Sastav polifenola u grožđu ovisi o više čimbenika poput vrste, zrelosti grožđa i klimi te okolišnom utjecaju i uvjetima uzgoja. Flavan-3-oli imaju značajan utjecaj na trpkost i boju vina. Najzastupljeniji flavan-3-oli u grožđu su katehin, epikatehin, epigalokatehin te procijanidini, a općenito flavan-3-oli čine čak 46 % do 56 % ukupnih polifenola te su njihove strukture prikazane na Slici 3. Za usporedbu, u crnom vinu taj udio se kreće od 13 % do 30 % (Georgijev i sur., 2014). Njihov udio varira i ovisno o dijelu grožđa; u sjemenkama je udio katehina i epikatehina veći u odnosu na kominu i pokožicu, dok pokožica sadrži nešto veći udio epigalokatehina (González-Manzano i sur., 2004). Brojna istraživanja utvrdila su korisna svojstva katehina poput antioksidativnog djelovanja, protuupalnog učinka, UV zaštite, antimikrobne, antitumorske, antiviralne i antialergijske aktivnosti (Bae i sur., 2020). Ove prednosti daju uvid u široku potencijalnu primjenu katehina u medicini, kozmetičkoj industriji i mnogim drugim područjima.

Od flavonola u grožđu je prisutan i rutin trihidrat. On poput katehina ima brojne korisne učinke na zdravlje. Primjerice, rutin djeluje na centralni živčani sustav te sprječava neuroinflamaciju, konvulzije te ima potencijalnu primjenu kao terapija za Alzheimerovu bolest. Također, sprječava hipertenziju, djeluje kao antikoagulant i ima antitumorski učinak, ali djeluje i antifungalno, antiviralno i antibakterijski poput drugih flavonoida (Ganeshpurkar i Saluja, 2017). To su samo neke prednosti primjene rutin hidrata iz kojih je moguće zaključiti kako je to spoj s velikim potencijalom za korištenje u medicini, farmaciji te kozmetičkoj industriji. No, do tada potrebno je utvrditi sigurnost primjene ekstrakata koji sadrže polifenole poput katehina, njegovih derivata i rutin trihidrata za ljudsku primjenu.



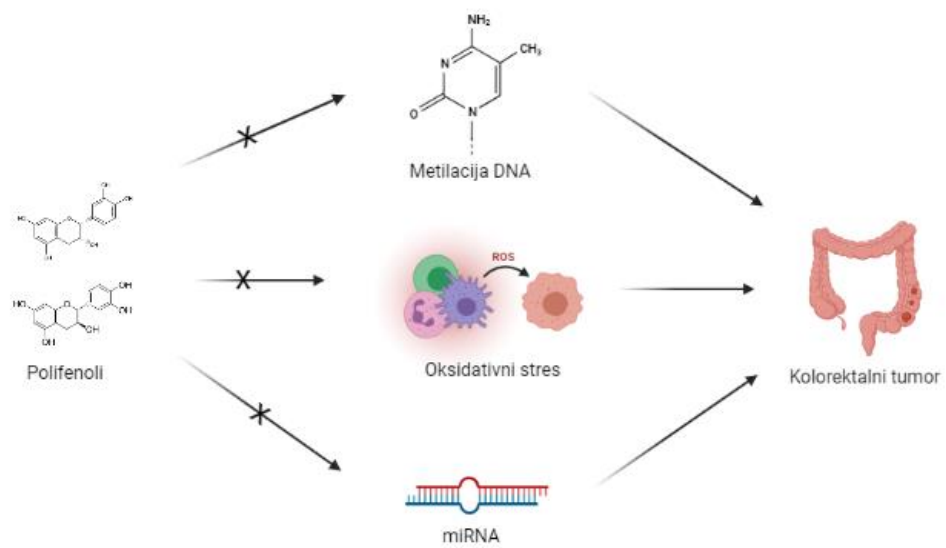
Slika 3. Strukturne formule polifenola prisutnih u bijelom grožđu koji su identificirani i kvantificirani u ovom radu (vlastita slika, izrađeno pomoću programa BioRender.com).

2.2.2. Antitumorska aktivnost polifenola

Brojne studije dokazale su da prehrana bogata voćem i povrćem smanjuje rizik od tumorskih oboljenja. U toj činjenici značajnu ulogu igraju polifenoli koji pomoću antioksidativnog i protuupalnog učinka reguliraju mehanizme koji sudjeluju u kancerogenezi. S obzirom na to da su tumori jedan od vodećih uzroka smrti danas, sve veći broj istraživanja nastoji pronaći nove načine prevencije i liječenja takvih oboljenja. Kao potencijalno rješenje nameću se polifenoli (Zhou i sur., 2016). Veliki broj radova ukazao je kako grožđe kao izvor

polifenola smanjuje rizik od raka dojke i crijeva, a ti antitumorski učinci dokazani su na *in vitro* i *in vivo* modelima. Mehanizam djelovanje polifenola kao antitumorskih agensa temelji se na njihovoj antioksidativnoj, protuupalnoj i antiproliferativnoj ulozi (Zhou i sur., 2012). Antioksidativno djelovanje bazira se na smanjenju oksidativnog stresa, odnosno pretjerane produkcije reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Prekomjerno stvaranje ROS-ova u konačnici dovodi do oštećenja DNA, proteina, lipida, pojave mutacija i smrti stanica. Polifenoli mogu utjecati na smanjenje oksidativnog stresa sprječavanjem nastanka slobodnih radikala pomoću inhibicije enzima koji su odgovorni za njihov nastanak, direktnim uklanjanjem ili aktivacijom drugih antioksidativnih mehanizama (Hussain i sur., 2016). Protuupalno djelovanje polifenola se manifestira kroz inhibiciju enzima ciklooksigenaze koja inače služi za katalizu nastanka proinflamatornih spojeva koji potiču rast tumorskih stanica (Zhou i sur., 2012).

Rak debelog crijeva, odnosno kolorektalni karcinom (CRC), treći je najčešći tip tumora te ima visoku stopu smrtnosti. To je multifaktorijalna bolest koja ovisi o vanjskim i unutrašnjim utjecajima. Jedan od najbitnijih utjecaja jest intestinalna mikrobiota čovjeka, a njezina neravnoteža često direktno utječe na razvoj i pojavu bolesti. Kao što je već spomenuto, polifenoli imaju antioksidativno svojstvo te njime pozitivno utječu na mikrobiotu, sprječavajući djelovanje slobodnih radikala (Briguglio i sur., 2020). Također, dokazano je kako polifenoli mogu inhibirati DNA metiltransferazu koja vrši metilaciju DNA koja je karakteristična za CRC i uz to aktivirati gene za utišavanje metilacije (Ding i sur., 2020). Novija istraživanja pokazala su da polifenoli imaju utjecaj na miRNA molekule. To su male molekule ncRNA koje sudjeluju u mnogim regulacijskim putevima, a njihova ekspresija je često prekomjerna ili nedovoljna kod pojave tumora. Sve je više dokaza kako polifenoli utječu na miRNA i njezine ciljane proteine te tako djeluju antitumorski (Ding i sur., 2020). Djelovanje polifenola na različite mehanizme nastanka tumora prikazano je na Slici 4.



Slika 4. Djelovanje polifenola na mehanizme nastanka kolorektalnog tumora (vlastita slika, izrađeno pomoću programa BioRender.com).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Komina

Pri izradi ovog rada korištena je komina hrvatske autohtone sorte grožđa *Vitis vinifera* cv. Graševina, dobivena od Kutjevo d.d.. Komina je liofilizirana tijekom dva dana, zatim mljevena i pohranjena na 25 °C u eksikatoru do pripreme ekstrakata.

3.1.2. Kemikalije

- 2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD
- 2',7'-Diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Acetonitril, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Antibiotik, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Betaine, 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda, PBF
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Etilen glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO by Life Technologies, Paisley, UK
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, RH
- Glukoza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Katehin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], Promega, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev karbonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Octena kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Rutin trihidrat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Saharoza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tripsin-EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Vodikov peroksid, Gram – mol, Zagreb, RH

3.1.3. Otopine i puferi

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

| | |
|---|-----------|
| Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode) | 48,75 mL |
| Dinatrijev hidrogenfosfat (2,8435 g do 100 mL destilirane vode) | 76,25 mL |
| Destilirana voda | do 250 mL |
- Otopina AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid)

| | |
|--------------------------|----------|
| AAPH | 0,414 g |
| Fosfatni pufer (0,075 M) | do 10 mL |
- Otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina)

| | |
|--------------------------|----------|
| Trolox | 6,26 mg |
| Fosfatni pufer (0,075 M) | do 50 mL |
- Otopina fluoresceina

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

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

Ishodna otopina 3: 25 µL ishodne otopine 2 u 25 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

- Folin-Ciocalteu reagens

| | |
|------------------|----------|
| FC reagens | 25 mL |
| Destilirana voda | do 50 mL |

- Otopina natrijevog karbonata

| | |
|--------------------------|----------|
| Na_2CO_3 | 7,5 g |
| Destilirana voda | do 50 mL |

3.1.4. Stanične linije

U ovom radu korištena je tumorska stanična linija Caco-2 humanog karcinoma crijeva dobivene iz American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. Caco-2 stanice su adherentne te se uzgoj vrši u Petrijevim zdjelicama za kulture stanica. Optimalni uvjeti održavanja Caco-2 stanične linije su 37 °C te atmosfera koju čini 95 % zraka i 5 % CO_2 . Za rast je korišten *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) s 20 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 1 % (v/v) antibiotika/antimikotika.

3.1.5. Oprema

- Analitička vaga, Sartorius, Entris, Njemačka
- 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
- HPLC, Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2 , Iskra PIO, Slovenija
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (epruvete, kivete, laboratorijske čaše, menzure, nastavci za pipete, odmjerne tikvice, pipete, sterilni filter, vialo)
- Liofilizator, Alpha 1-2 LD plus Christ, Osterode am Harz, Njemačka
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka

- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright – Line, Njemačka
- Petrijeve posude za uzgoj stanica, Thermo Fisher Scientific, Drive Rochester, NY, SAD
- Ploče s 96 jažica, Thermo Fisher Scientific, USA
- Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Palo Alto, CA, SAD
- UV – Vis spektrofotometar, GENESYS™10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Tamne ploče s 96 jažica, Thermo Fisher Scientific, USA
- Ultrazvučna kupelj, XUB Series Digital Ultrasonic Baths, BioSan, Latvija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Procjena topljivosti polifenola u eutektnim otapalima pomoću programa COSMO*therm*

Za primjenu COSMO-RS-a najprije je potrebno izraditi σ -profile. Oni podrazumijevaju različite proračune koji obuhvaćaju optimalnu geometriju molekula te volumnu i površinsku raspodjelu električnog naboja. To se postiže modelom COSMO i programa BIOVIA TmoleX19 version 2021 (Dassault Systemes, Paris, France). Zatim se pomoću programskog paketa COSMO*therm* version 20.0.0. (Dassault Systemes, Paris, France) dobivaju σ -potencijali komponenata ili njihovih smjesa i odgovarajući kemijski potencijali. Pomoću metoda fizikalne kemije i kemijsko-inženjerske termodinamike izračunavaju se zatim i izvedena svojstva poput koeficijenta aktivnosti, ravnotežnoga tlaka para, koeficijenta raspodjele, topljivosti ili čak čitavi fazni dijagrami.

U programski paket COSMO*therm* se najprije unose .cosmo datoteke molekula koje želimo ispitati te molekule otapala. Ukoliko te molekule već postoje u bazi podataka unose se naredbom *From Database*, a ukoliko ne postoje nego su dobivene pomoću programa TmoleX onda se unose naredbom *From File*. Nakon unosa odabire se kartica s nazivom *Properties* te zatim *Activity Coefficient*. Nakon toga se upiše temperatura pri kojoj se ispituje topljivost te sastav smjese, odnosno udio akceptora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), donora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) te ispitivane tvari. Zadnji korak je naredba *Add* te *Run Job local*. Kao rezultat proračuna dobije se logaritam koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$. On govori o topljivosti ispitivanog spoja u ispitivanom otapalu, a suma svih

udjela mora biti jednaka 1. Ovaj podatak nam direktno govori o topljivosti željene tvari; manji koeficijent aktivnosti tvari ukazuje na veću topljivost u odabranom otapalu te obrnuto.

3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

NADES su pripremljeni u tikvicama s okruglim dnom. Najprije je dodana izračunata masa komponenata otapala prema određenim omjerima (Tablica 2) te je dodan željeni udio vode. Tikvica sa smjesom je zatim stavljena na elektromagnetsku miješalicu te je pri 50 °C miješana kroz 2-6 sati u zatvorenom sustavu dok nije nastala homogena, prozirna, tekuća i viskozna smjesa. Pripremljena otapala su zatim dobro zatvorena i čuvana na sobnoj temperaturi do daljnjeg korištenja.

Tablica 2. Molarni omjeri korištenih NADES-a i udjeli vode.

| NADES | Kratica | Molarni omjer | Udio vode |
|-------------------------|----------------|----------------------|------------------|
| Betain:glukoza | B:Glc | 5:2 | 30 % |
| Betain:saharoza | B:Scu | 4:1 | 30 % |
| Betain:etilen glikol | B:EG | 1:3 | 30 % |
| Timol:dekanska kiselina | Ty:C10 | 1:1 | 0 % |
| Mentol:eukaliptol | Me:Eu | 1:1 | 0 % |

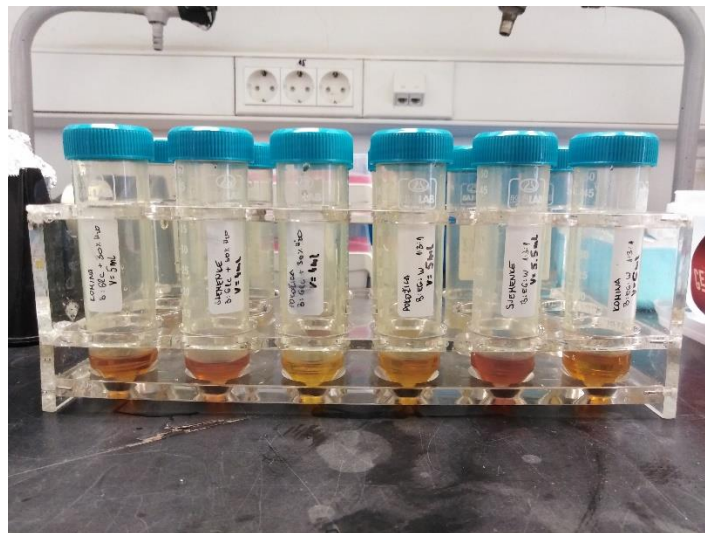
3.2.3. Liofilizacija komine grožđa

Liofilizacija (eng. *freeze-drying*) je postupak uklanjanja vode sublimacijom leda iz smrznutog materijala. Sami postupak se sastoji od nekoliko faza, zamrzavanja, primarnog i sekundarnog sušenja. Zamrzavanje se provodi kako bi se formirali kristali leda. Primarno sušenje podrazumijeva sublimaciju kristalića leda pod utjecajem vakuuma pri niskoj temperaturi, a sekundarno sušenje obuhvaća proces desorpcije preostalog udjela vode u materijalu (Kunal i sur., 2015).

Nakon zamrzavanja komine grožđa na $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 sata, uzorci su podvrgnuti postupku liofilizacije. Komina je stavljena na plitice za liofilizaciju, priključena je sonda za mjerenje temperature uzoraka te je proveden postupak zamrzavanja, zagrijavanja (eng. *warm-up*), primarnog i sekundarnog sušenja tijekom 48 sati. Po završetku liofilizacije, uzorci su mljeveni te pohranjeni u eksikatoru do idućeg korištenja.

3.2.4. Priprema ekstrakata komine grožđa

Za pripremu ekstrakata koristila se liofilizirana komina grožđa, te je najprije usitnjena sjeckalicom. Zatim je odvagano 0,5 g komine za svaki ekstrakt te je dodano 10 mL prethodno navedenih NADES-a. Uz to, odvagano je također 0,5 g komine te dodano 10 mL 70 %-tnog etanola kao klasičnog otapala za usporedbu. Ekstrakcija je provođena na 60°C tijekom 50 minuta u ultrazvučnoj kupelji kako bi prijelaz polifenola iz komine u otapalo bio brži i ekstrakcija uspješnija. Zatim je provedena filtracija preko filter papira u Falcon epruvete (Slika 5) preko noći te su ekstrakti čuvani na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do iduće upotrebe.



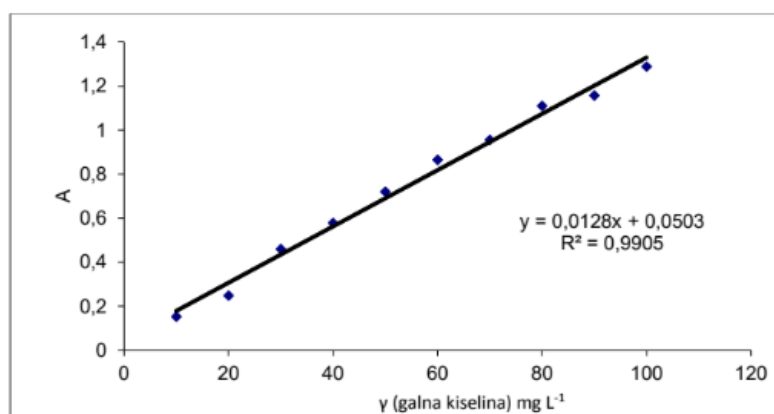
Slika 5. Ekstrakti nakon filtracije (vlastita fotografija).

3.2.5. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom

Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu (FC) reagensom je standardna metoda koja se zasniva na prijenosu elektrona, odnosno redukciji smjese fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline uz oksidaciju fenola. Pri tome dolazi do nastanka plavo obojenog volframovog oksida i molibdenovog oksida (Ainsworth i Gillespie, 2007). Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom uzorku.

Pripremljene ekstrakte bilo je potrebno 50 puta razrijediti destiliranom vodom, osim uzorka koline otopljene u 70 %-tnom etanolu te TyC10 i MeEu. EtOH je razrijeđen 75 puta, a TyC10 i MeEu nije bilo potrebno razrijediti. 0,25 mL razrijeđenog uzorka otpipetirano je u epruvetu te je dodano 1,25 mL FC reagensa prethodno razrijeđenog 10 puta. Reakcija se odvijala 5 minuta na sobnoj temperaturi te se po isteku vremena dodalo 1 mL Na₂CO₃. Epruveta s otopinom je zatim stavljena u vodenu kupelj gdje je termostatorirana 5 min na 50 °C. Nakon završetka 5 minuta reakcija je zaustavljena vađenjem iz vodene kupelji i hlađenjem. Nakon toga slijedilo je mjerenje apsorbancije na UV/Vis spektrofotometru pri $\lambda=760$ nm (Ainsworth i Gillespie, 2007). Sva mjerenja provedena su u tri paralele.

Ukupni polifenoli računaju se kao ekvivalenti galne kiseline. Izračunate su srednje vrijednosti tri mjerene paralele te su te vrijednosti apsorbancije uvrštene su u jednadžbu baždarnog pravca izrađenog za razrjeđenja galne kiseline kao standarda. Baždarni pravac ovisnosti koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}) o apsorbanciji prikazan je na slici 6.



Slika 6. Baždarni pravac ovisnosti koncentracije galne kiseline (mg L^{-1}) o apsorbanciji (Šango, 2017).

Pri izračunu vrijedi:

$$Y = ax + b \quad [1]$$

$$Y = 0,0128x + 0.0503, R^2 = 0,9905$$

Y – apsorbancija pri 760 nm,

x – koncentracije galne kiseline (mg mL^{-1})

Konačni rezultati su izraženi kao mg polifenola po g suhe tvari biomase.

3.2.6. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Određivanje ORAC (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*) vrijednosti podrazumijeva metodu koja se temelji na inhibiciji peroksil radikala. U metodi se koristi AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid) kao izvor peroksil radikala ($\text{ROO}\cdot$) i Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina) kao standard. Peroksil radikal oksidira fluorescein te dolazi do stvaranja produkta bez fluorescencije, odnosno dolazi do pada intenziteta fluorescencije. Prisutnošću antioksidansa poput polifenola, inhibira se djelovanje radikala i oksidacija fluoresceina, što rezultira sporijim padom fluorescencije (Cao i sur., 1993).

Uzorci komine u eutektičkim otapalima i etanolu razrijeđeni su 1600 puta. U epruvetu je dodano 2,250 mL fluoresceina i 0,375 mL uzorka te je otopina termostatirana u vodenoj kupelji na 37°C 30 minuta. Nakon toga dodano je 0,375 mL otopine AAPH te je mjerena promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu do spuštanja na nulu. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali se umjesto 0,375 uzorka koristio fosfatni pufer (0,075 M). Standard Trolox se također priprema na isti način; 0,375 Trolox-a ($500 \mu\text{M}$) umjesto uzorka. Mjerenje je izvedeno na spektrofлуорimetru pri temperaturi od 37°C uz $\lambda_{\text{eks.}} = 485 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em.}} = 520 \text{ nm}$.

Relativna ORAC vrijednost računa se prema idućim jednadžbama:

$$\text{relativna ORAC vrijednost} = \left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}} \right) * k * \alpha * h \quad [2]$$

$$AUC = 0,5 + \left(\frac{R_2}{R_1} \right) + \left(\frac{R_3}{R_1} \right) + \dots + \left(\frac{R_n}{R_1} \right) \quad [3]$$

Pri čemu je:

- AUC_U - antioksidacijski kapacitet uzorka
- AUC_{SP} - antioksidacijski kapacitet slijepe probe
- AUC_{TRX} - antioksidacijski kapacitet Troloxa
- k - faktor razrjeđenja
- a - molarna koncentracija Troloxa
- $h = \frac{V_{uzorka}}{m_{komine}}$

Rezultati su prikazani kao μmol Trolox ekvivalenta po gramu suhe tvari biomase za dvije paralele.

3.2.7. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata na Caco-2 staničnoj liniji

Caco-2 stanična linija prvi put je uspostavljena 1970.-ih godina izolacijom iz gastrointestinalnih tumora s ciljem proučavanja mehanizma nastanka tumora i praćenja citoterapije. Od uspostave ove linije veliki broj laboratorija ih koristi u svojim istraživanjima, a s obzirom na različite uvjete uzgoja stanice Caco-2 linije razvile su različita svojstva (Lea, 2015). Najveća prednost korištenja Caco-2 stanične linije jest to što su odličan model za proučavanje apsorpcijskih karakteristika ljudskih crijeva, odnosno model su za studije crijevne permeabilnosti. Pri tome, najbitnije značajke Caco-2 stanica su to što spontano ekspimiraju morfološke i funkcionalne karakteristike zrelih intestinalnih enterocita. Odnosne one diferenciraju u stanice tankog crijeva s uskim spojevima i mikrovilima, ekspimirajući enzime koji imaju ulogu u metaboliziranju lijekova. To je ujedno i karakteristika gastrointestinalnih stanica *in vivo*, zbog čega su Caco-2 stanice ujedno dobar model za proučavanje metabolizma lijekova (Osakwe, 2016).

3.2.7.1. Uzgoj Caco-2 stanične linije

Caco-2 stanice su uzgajane u Petrijevim posudama kako bi se održala kultura stanica te za potrebe postavljanja novih eksperimenata. Stanice su održavanje u eksponencijalnoj fazi

rasta. Inverznim mikroskopom pratilo se prihvaćanje stanica za podlogu te njihova morfologija. Također, mikroskopom je i praćen oblik stanica te eventualna pojava linija koje bi upućivale na rast plijesni i pojavu kontaminacije. Kako bi se to spriječilo potrebno je kontinuirano primjenjivati i pridržavati se pravila aseptične tehnike rada.

Za postavljanje eksperimenta, stanicama je najprije uklonjen medij, isprane su PBS puferom te su zatim tretirane s 1 mL tripsina kako bi se odvojile od površine Petrijevki. Tretirane stanice su zatim inkubirane 5-10 minuta na 37 °C te se djelotvornost tripsina provjeravala pod inverznim mikroskopom. Ukoliko je odvajanje od površine Petrijevki bilo uspješno, stanice su poprimile zaokruženi oblik. Stanicama se zatim dodao 1 mL medija za inaktivaciju tripsina te su resuspendirane.

Za određivanje broja stanica korištena je boja tripanplavo te su stanice zatim izbrojane u Neubauerovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Mrtve stanice se ne broje te se razlikuju od živih po tome što su plave boje. Njihova membrana je oštećena te ima veću permeabilnost što uzrokuje ulazak boje u stanice. Žive stanice ostaju nebojane zbog manje propusnosti membrane te se broje u sva 4 velika kvadrata komorice koja sadrže 16 manjih. Koncentracija stanica u mL suspenzije računa se prema jednadžbi:

$$\text{broj stanica mL}^{-1}\text{ suspenzije} = (N_1 + N_2 + N_3 + N_4) * 5000 \quad [4]$$

Pri čemu je:

N_1 – broj stanica u prvom velikom kvadratu

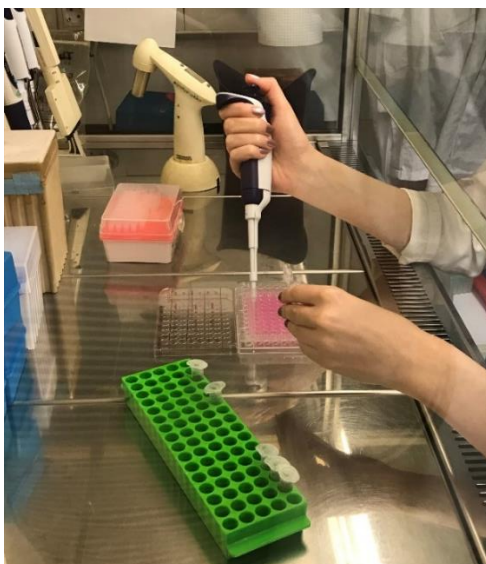
N_2 – broj stanica u drugom velikom kvadratu

N_3 – broj stanica u trećem velikom kvadratu

N_4 - broj stanica u četvrtom velikom kvadratu

3.2.7.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

Stanični testovi često se provode kako bi se utvrdilo imaju li promatrani spojevi učinak na staničnu proliferaciju i pokazuju li citotoksične učinke koji dovode do smrti stanica. Jedna od takvih metoda jest MTS metoda koja se temelji na korištenju MTS reagensa koji se sastoji



Slika 8. Tretiranje stanica ekstraktima (vlastita fotografija).

Nakon inkubiranja stanica koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} tretiranih ekstraktima tijekom 72 sata na 37°C , u sve jažice je dodano $10 \mu\text{L}$ MTS reagensa. Ploča s jažicama je zatim vraćena u inkubator na 37°C i inkubirana iduća 3-4 sata. Intenzitet obojenja nastalog produkta mjereno je spektrofotometrijski pomoću čitača ploča pri $\lambda=492 \text{ nm}$.

Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih, odnosno kontrolnih stanica, za koje se preživljenje smatra 100 % prema jednadžbi:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ uzorka}}{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ kontrole}} * 100 \quad [5]$$

3.2.7.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću DCFH-DA metode

DCFH-DA metoda je najčešće korištena metoda za određivanje intracelularnog H_2O_2 i oksidativnog stresa. Princip metode temelji se na ulasku DCFH-DA (2'7'-diklorodihidrofluorescein diacetat) u stanice pri čemu ga stanične esterase hidroliziraju te nastaje DCFH koji zaostaje u stanicama. U stanicama zatim dolazi do oksidacije DCFH u fluorescentni DCF te se njegov intenzitet mjeri na spektrofluorimetru (Slika 9) (Kalyanaraman i sur., 2012).



Slika 9. Shematski prikaz ulaska DCFH-DA u stanicu, njegove hidrolize i oksidacije (Yu i sur., 2021).

Crne ploče s 96 jažica nacijepljene su sa suspenzijom stanica koncentracije 1×10^5 stanica mL^{-1} . Stanice su inkubirane tijekom 24 sata kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon 24 sata od nacijepljivanja stanica na ploče s 96 jažica, stanice su tretirane ekstraktima komine BGlc te etanolnim ekstraktom za usporedbu. Ekstrakti su prije tretiranja stanica sterilno profiltrirani kroz $0,22 \mu\text{m}$ filtere. Korišteni ekstrakti dodani su u volumnom omjeru 1,5 % (v/v) za određivanje reaktivnih kisikovih vrsta DCFH-DA metodom. Eksperiment je izveden u dvije paralele. Stanice su zatim inkubirane 72 sata na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubiranja stanica tretiranih ekstraktima, u stanicama je potaknut oksidativni stres dodatkom vodikovog peroksida ($100 \mu\text{M}$). Stanice su zatim inkubirane 3 sata na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon isteka vremena stanicama je uklonjen medij, dva puta su isprane PBS puferom te je dodano $100 \mu\text{L}$ otopine DCFH-DA tako da koncentracija u jažicama iznosi $50 \mu\text{M}$. Negativnu kontrolu su činile stanice netretirane ekstraktima i vodikovim peroksidom, a pozitivnu kontrolu stanice tretirane samo vodikovim peroksidom u svrhu izazivanja oksidativnog stresa. Ostatak stanica tretiranih ekstraktima su podijeljene u dvije skupine: one koje su tretirane s vodikovim peroksidom i one koje nisu. Kontrole su izvedene u tri paralele, a stanice tretirane ekstraktima u dvije paralele. Stanice su zatim ponovno inkubirane na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 minuta nakon čega je na spektrofluorimetru s čitačem ploča mjerena fluorescencija pri $\lambda_{\text{ex}}=485\pm 10 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}}=530\pm 10 \text{ nm}$.

Rezultati su izraženi kao postotak omjera intenziteta fluorescencije stanica tretiranih ekstraktima u odnosu na kontrolne stanice, koje nisu predtretirane ekstraktima i u kojima nije

induciran oksidativni stres pomoću vodikovog peroksida te u odnosu na stanice koje su tretirane ekstraktima, ali ne vodikovim peroksidom.

Za izračun se koristila slijedeća jednadžba:

$$ROS \text{ generacija (\% od kontrole)} = \frac{\text{srednja vrijednost A uzorka}}{\text{srednja vrijednost A kontrole}} \quad [6]$$

3.2.8. Određivanje polifenola u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u ekstraktima komine grožđa provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-DAD detektorom. Kromatografska analiza provedena je na HPLC uređaju Agilent1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) uz module binarne pumpe (Bin Pump SL G1312B), degazera (G1379B), autosampler-a (HiP-ALS G1367B), termostata autosampler-a (FC/ALS Term G1330B), modula kolone (TCC SL G1316B) te uz detekciju na PDA detektoru (DAD SL G1315C). Polifenoli su razdvojeni na Poroshell 120 SB-C18 koloni dimenzija 4,6 x 150 mm, 4 µm. Injektirani volumen uzoraka bio je 15 µL. Mobilne faze bile su otapalo A (0,25 % octena kiselina) i otapalo B (acetonitril) pri temperaturi od 40 °C i protoku 1 mL min⁻¹. Uvjeti kromatografske analize prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti kromatografske analize polifenola u ekstraktima komine grožđa.

| HPLC uvjeti | | | | |
|--|---|------------------------|---------|------|
| Kolona | Poroshell 120 SB-C18 4,6 x 150 mm, 4 μ m | | | |
| Mobilna faza | Otapalo A | 0.25 % octena kiselina | | |
| | Otapalo B | Acetonitril | | |
| Volumen injektiranja (μL) | 15 | | | |
| Protok (mLmin^{-1}) | 1 | | | |
| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | 40 | | | |
| Vrijeme analize (min) | 25 | | | |
| Eluiranje | Gradijentno | Vrijeme (min) | Otapalo | |
| | | | A % | B % |
| | | 0,00 | 90,0 | 10,0 |
| | | 7,50 | 85,0 | 15,0 |
| | | 15,00 | 73,0 | 27,0 |
| | | 25,00 | 90,0 | 10,0 |

Identifikacija i kvantifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena spojeva i vanjskih standarda katehina, epikatehina, epigalokatehina i rutin trihidrata kao najzastupljenijih polifenola u grožđu. Dobivene vrijednosti izražene su u mg g^{-1} suhe tvari biomase.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sa sve većim okretanjem znanstvene zajednice i industrije principima zelene kemije i održivom načinu proizvodnje, u fokusu su već neko vrijeme DES-ovi kao zamjena do sada korištenim konvencionalnim otapalima. Kao netoksična, selektivna, jeftina alternativna otapala imaju široku potencijalnu primjenu ne samo u biotehnologiji, već i u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj te brojnim drugima.

DES-ovi korišteni pri izradi ovog rada su prirodni, netoksični i jeftini što su samo neke prednosti. Betain, kao komponenta 3 od 5 korištenih otapala, je jeftini prirodni resurs koji je biorazgradiv i netoksičan, a dobiva se iz šećerne repe (Li i sur., 2016). Betain je također prisutan u ljudskom organizmu u kojemu ima ulogu osmolita, odnosno štiti stanice od okolišnog stresa, te donora metilne skupine (Craig, 2004). Glukoza je najbitniji šećer u metabolizmu, dok je saharoza, disaharid koji se sastoji od fruktoze i glukoze, te ju koristimo u svakodnevnoj upotrebi.

Tri odabrana otapala s visokom predviđenom topljivošću korišteno je za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz komine bijelog grožđa, uz dva otapala s manjom pretpostavljenom topljivošću. Također, korišten je i 70 %-tni etanol kao klasično otapalo za ekstrakciju kako bi se rezultati mogli usporediti. Ekstrakcija je provedena na 60 °C tijekom 50 minuta u ultrazvučnoj kupelji. U svih 6 ekstrakata (BGlc, BScu, BEG, EtOH, TyC10, MeEu) određen je ukupni sadržaj polifenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa te HPLC-a. Određen je i antioksidacijski kapacitet ekstrakata ORAC metodom te su ekstrakti s najvišim ukupnim udjelom polifenola korišteni za ispitivanje *in vitro* biološke aktivnosti na Caco-2 staničnoj liniji MTS metodom i DCFH-DA metodom.

4.1. ODABIR NADES-A

Za optimalan odabir NADES-a najprije je provedena procjena topljivosti katehina, kao najprisutnijeg polifenola u eutektnim otapalima pomoću programa *COSMOtherm*.

Model COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents) jedna je od najtočnijih računalnih metoda ab initio koja služi za predviđanje eutektničke točke i topljivosti željenih komponenata u eutektnim otapalima. Ovaj način predviđanja smanjuje potrebu za eksperimentalnim utvrđivanjem topljivosti te tako omogućuje uštedu vremena i kemikalija, a uz to omogućuje i ispitivanje velikog broja kombinacija komponenti eutektničkih otapala.

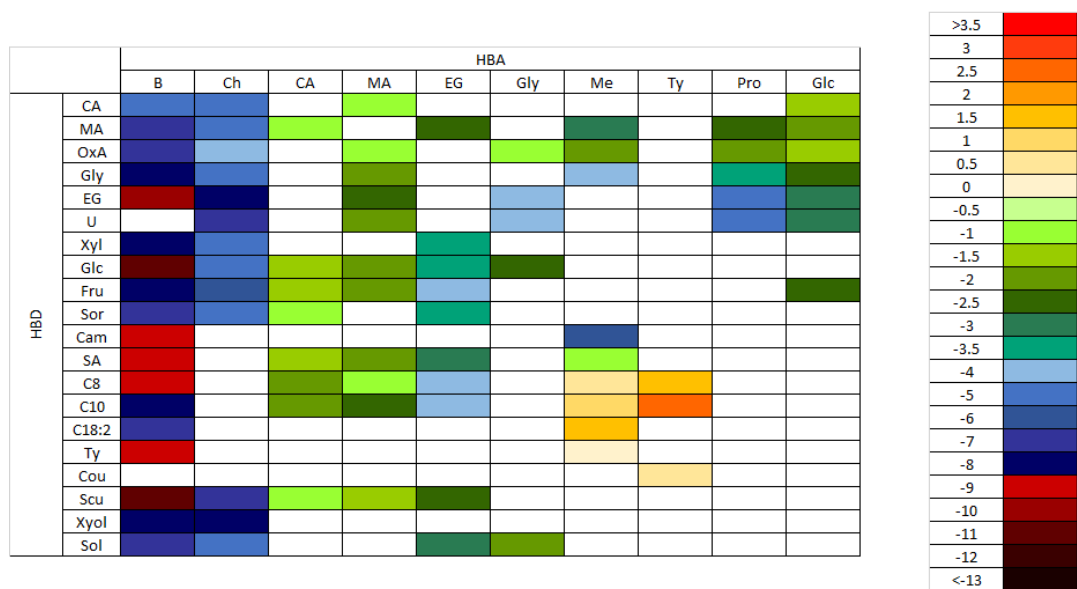
COSMO-RS je metoda uspostavljena kao način predviđanja termofizikalnih podataka za tekuće sustave te je postala često korištena alternativa metodama molekularne simulacije. Ovaj model koristi jedinstvenu kombinaciju kvantno-kemijskih metoda za otopljene tvari i otapala te primjenjuje statističku termodinamiku za utvrđivanje interakcija molekularnih površina. Na taj način COSMO-RS omogućuje učinkovit izračun mnogih svojstava koje druge metode ne mogu predvidjeti (Klamt i sur., 2010). COSMO-RS je tako postao vrlo popularan i široko primjenjiv, a posebno se koristi u kemijskom inženjerstvu za predviđanja u raznim sustavima poput tekuće-plinovito, tekuće-tekuće ili čvrsto-tekuće. Također, koristi se i za učinkovito pročišćavanje otapala i aditiva za optimizaciju kemijskih procesa. Iako je model razvijen i parametriziran na neutralnim spojevima, 2002. godine dokazano je da COSMO-RS može predvidjeti podatke za ionske tekućine, odnosno smjese aniona i kationa. Nakon toga su ionske tekućine postale vrlo bitno područje primjene COSMO-RS-a (Klamt, 2017).

Ovim programom izračunati su logaritmi koeficijenta aktivnosti ($\ln(\gamma)$) koji ukazuju na topljivost promatranih spojeva u određenim otapalima. Niži, odnosno manji, koeficijent aktivnosti govori o većoj topljivosti spoja. U Tablici 4 navedena su ispitana eutektična otapala i njihovi molarni omjeri, a na Slici 9 prikazani su rezultati topljivosti u istim otapalima.

Tablica 4. Molarni omjeri komponenti NADES-a s udjelom vode 30 % za koje je ispitana topljivost polifenola primjenom programa *COSMOtherm*.

| NADES | Molarni omjer | NADES | Molarni omjer |
|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| B:Glc | 5:2 | Xyl:EG | 1:2 |
| B:Scu | 4:1 | Me:Cam | 1:1 |
| B:EG | 1:3 | Suc:EG | 1:2 |
| B:Xyl | 1:1 | Suc:Glc:U | 1:1:2 |
| B:Ma | 1:1 | Gly:Sol | 2:1 |
| ChCl:EG | 1:2 | Gly:Glc | 2:1 |
| ChCl:Xyol | 5:2 | Glc:Fru | 1:1 |
| B:Gly | 1:2 | Me:SA | 4:1 |
| ChCl:U | 1:2 | Ma:Fru | 1:1 |
| ChCl:Xyl | 2:1 | Ma:Glc | 1:1 |

| | | | |
|----------|-----|----------|-----|
| ChCl:Suc | 2:1 | Ma:Suc | 2:1 |
| ChCl:Fru | 1:1 | Pro:Ma | 1:1 |
| ChCl:CA | 2:1 | CA:Sor | 2:3 |
| B:CA | 1:1 | CA:Suc | 1:1 |
| ChCl:Sol | 1:1 | CA:Fru | 1:1 |
| ChCl:Glc | 1:1 | Me:Ty | 3:2 |
| ChCl:Gly | 1:2 | CA:Glc | 1:1 |
| ChCh:Ma | 1:1 | Me:C8 | 1:1 |
| ChCl:OxA | 1:1 | Me:C10 | 1:1 |
| Fru:EG | 1:2 | Ty:Cou | 3:2 |
| Sor:EG | 1:2 | Me:C18:2 | 1:1 |
| Sol:EG | 1:2 | Ty:C8 | 1:3 |
| Glc:EG | 1:2 | Ty:C10 | 1:1 |



Slika 10. Prikaz vrijednosti $\ln(\gamma)$ za katehin u različitim NADES-ima s 30 % vode.

Popis kratica za komponente otapala navedene u Tablici 4 i na Slici 10:

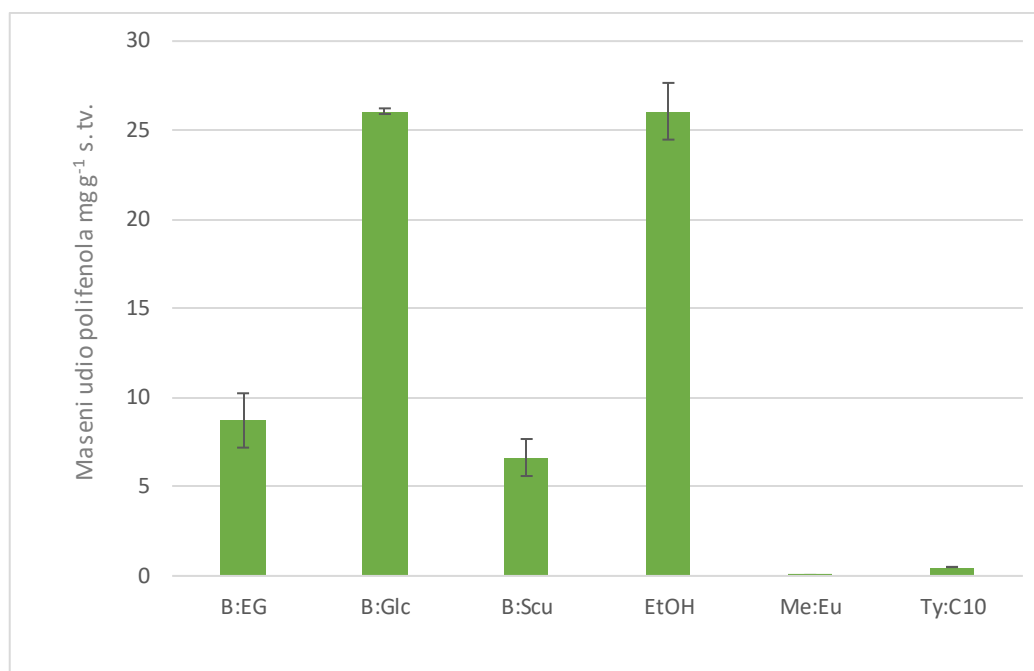
B: betain, C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, CA: limunska kiselina, Cam: kamfor, Ch: kolin klorid, Cou: kumarin, Me: mentol, EG: etilenglikol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, Ma: jabučna kiselina, OxA: oksalna kiselina, Pro: prolin, SA: salicilna kiselina, Scu: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, U: urea, Xyl: ksiloza, Xylol: ksilitol.

Nakon dobivenih rezultata predviđanja topljivosti u NADES-ima primjenom programa *COSMOtherm*, vidljivo je da su najviše vrijednosti $\ln(\gamma)$ za mentol ili timol kao akceptore vodikove veze i masne kiseline, timol ili kumarin kao donore vodikove veze, te da u njima katehin nije dobro topljiv. Najniže vrijednosti $\ln(\gamma)$ su dobivene za kombinaciju betaina s etilen glikolom, glukozom i saharozom uz 30 % vode. Za ekstrakcije je odabrano 5 NADES-a, tri otapala s dobrom predviđenom topljivošću katehina te dva s lošijom predviđenom topljivošću kako bi se utvrdila vjerodostojnost predviđanja. Odabrana su sljedeća otapala:

- Betain:glukoza (B:Glc),
- Betain:saharoza (B:Scu),
- Betain:etilen glikol (B:EG),
- Timol:dekanska kiselina (Ty:C10),
- Mentol:eukaliptol (Me:Eu)

4.2. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIM POMOĆU NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Ukupni polifenoli u ekstraktima komine grožđa određeni su pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Dobiveni rezultati izraženi su kao mg galne kiseline po gramu suhe tvari biomase, pri čemu je galna kiselina standard i prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Maseni udio polifenola u ekstraktima komine grožđa, *, **

*rezultati su srednja vrijednost \pm S.D (n=3), s. tv. = suha tvar

** BEG= ekstrakt pripremljen u otapalu betain:etilen glikol, BGlc= ekstrakt pripremljen u otapalu betain: glukoza, BScu= ekstrakt pripremljen u otapalu betain:saharoza, EtOH= ekstrakt pripremljen u (70 %, v/v) etanolu, MeEu= ekstrakt pripremljen u otapalu mentol:eukaliptol, TyC10=ekstrakt pripremljen u otapalu timol:dekańska kiselina

Na temelju prikazanih rezultata (Slika 11) možemo zaključiti kako je komina dobar izvor polifenola u bijelom grožđu, pri čemu se maseni udio polifenola kreće od 6 do 26 mg g⁻¹ suhe tvari. Vidljivo je kako različiti NADES-i imaju različitu uspješnost ekstrakcije, a uočeno je kako je najviše polifenola u komini ekstrahirano redom: BGlc>EtOH>BEG>BScu>TyC10>MeEu. Kao odlično otapalo pokazao se BGlc s najviše ekstrahiranih polifenola iz komini, a najmanje polifenola je ekstrahirano pomoću otapala kojima je predviđena najmanja topljivost TyC10 i MeEu.

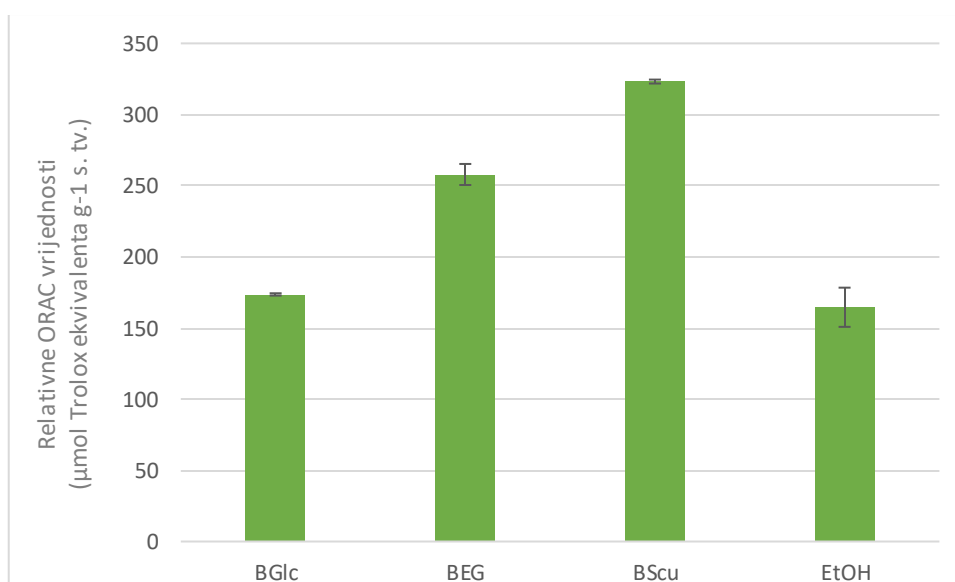
Za usporedbu, komina crnog grožđa uglavnom ima nešto viši udio ukupnih polifenola na što ukazuje i sama boja grožđa zbog sadržaja antocijana. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim navodima koji kažu kako je udio polifenola bijelog grožđa u komini nešto manji u odnosu na crno grožđe ili druge dijelove grožđa primjerice sjemenke ili pokožicu (Garcia-Jares i sur., 2015, Oprica i Grigore, 2016).

Zaključeno je kako se BGlc pokazao kao bolje otapalo u odnosu na EtOH u komini, što sugerira da bi eutektička otapala mogla zamijeniti EtOH kao klasično otapalo koje se koristi pri ekstrakcijama. Uočeno je i kako pH nema značajan utjecaj na uspješnost ekstrakcije i ukupni sadržaj polifenola. Naime, BEG i BGlc imaju slične pH vrijednosti (6,64 i 6,86), no udio polifenola im se značajno razlikuje. Također, vidljivo je kako je COSMO*therm* pouzdan za predviđanje topljivosti spojeva u željenim otapalima jer su niske dobivene vrijednosti $\ln(\gamma)$ potvrđene dobrom topljivošću i uspješnom ekstrakcijom polifenola, odnosno visoke vrijednosti $\ln(\gamma)$ slabom topljivošću i manje uspješnom ekstrakcijom polifenola iz komine bijelog grožđa.

4.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA

4.3.1. Antioksidacijski kapacitet polifenola

Antioksidacijski kapacitet polifenola u ekstraktima komine bijelog grožđa određen je ORAC metodom koja se temelji na mjerenju pada intenziteta fluorescencije. Antioksidansi poput polifenola inhibiraju djelovanje radikala i oksidaciju fluoresceina što se vidi kao sporiji pad fluorescencije (Cao i sur., 1993). Relativne ORAC vrijednosti su izračunate i prikazane kao srednja vrijednost dvije paralele na Slici 12.



Slika 12. Relativne ORAC vrijednosti za pripremljene ekstrakte komine.

*rezultati su srednja vrijednost \pm S.D (n=2), s. tv.=suha tvar

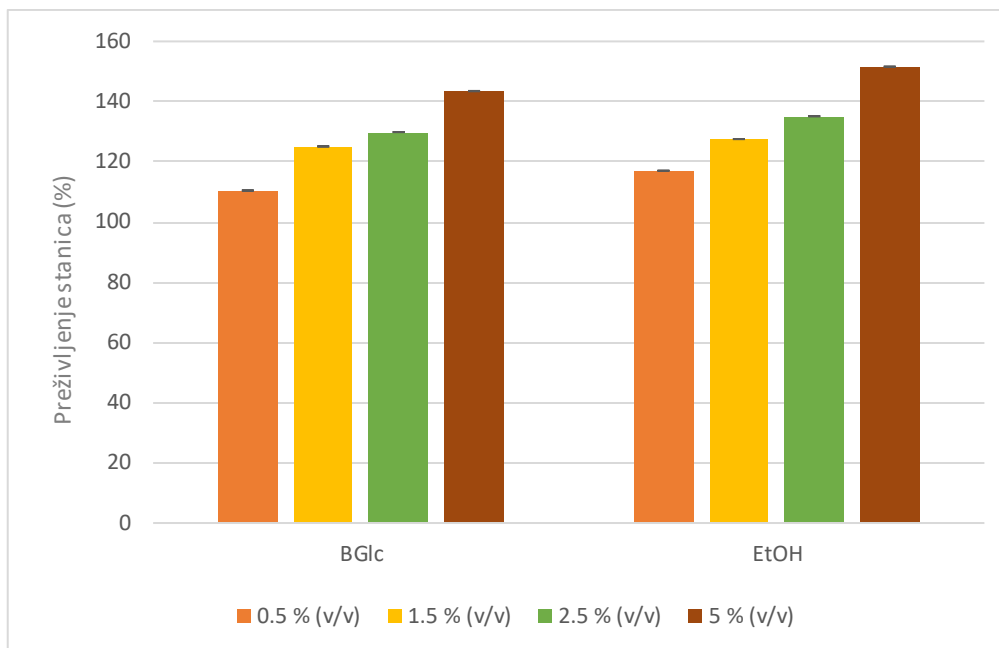
** BEG= ekstrakt pripremljen u otapalu betain:etilen glikol, BGlc= ekstrakt pripremljen u otapalu betain: glukoza, BScu= ekstrakt pripremljen u otapalu betain:saharoza, EtOH= ekstrakt pripremljen u (70 %, v/v) etanolu

Prema rezultatima prikazanima na Slici 12 može se zaključiti da se ORAC vrijednosti ispitanih ekstrakata kreću u velikom rasponu (od 164.58831 ± 13.77191 do 323.16656 ± 1.38461 $\mu\text{mol Troloxa}$ po gramu suhe tvari biomase). Najveća ORAC vrijednost izmjerena je za BScu ekstrakt komine. ORAC vrijednosti su se smanjivale redom: BScu>BEG>BGlc>EtOH.

Može se vidjeti kako su svi ekstrakti pokazali antioksidacijsko djelovanje jer svi sadrže polifenole, no ono nije nužno u korelaciji s prethodno utvrđenim udjelima polifenola u komini. Naime, ekstrakti koji su imali najveći udio polifenola (BGlc, EtOH) iskazali su manje ORAC vrijednosti u odnosu na BEG i BScu kojima je izmjeren manji udio polifenola. Razlog tomu leži u činjenici da DES-ovi sami imaju određenu antioksidacijsku aktivnost zbog toga što sadrže betain koji je antioksidacijski agens (Alirezai i sur., 2015). Iz tog razloga kao najbolji ekstrakt za *in vitro* ispitivanje aktivnosti ekstrakta na Caco-2 staničnoj liniji nije odabran BScu ekstrakt nego BGlc koji je pokazao najveći maseni udio polifenola.

4.3.2. *In vitro* aktivnost ekstrakata komine grožđa na Caco-2 staničnu liniju pomoću MTS metode

In vitro utjecaj ekstrakata komine grožđa na staničnu liniju Caco-2 određen je pomoću MTS metode nakon tretiranja stanične linije ekstraktima 0,5-5 % (v/v) tijekom 72 sata. Na Slici 13 prikazano je preživljenje stanica ovisno o volumenu ekstrakata kojima su tretirane.



Slika 13. Utjecaj ekstrakata komine na preživljenje Caco-2 stanične linije.

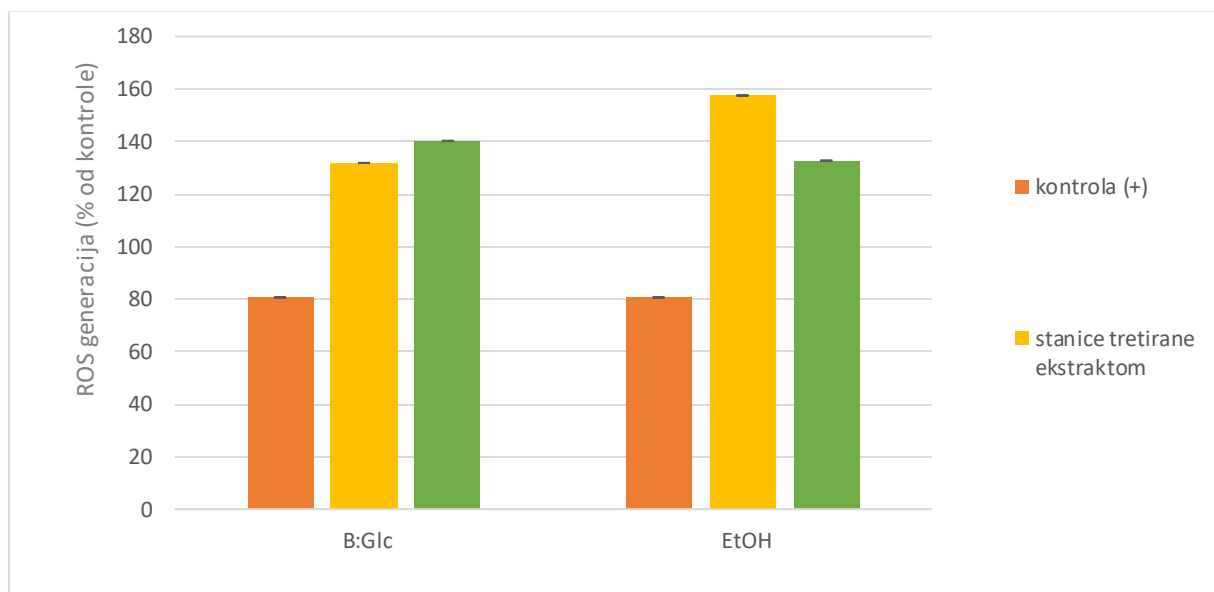
*rezultati su srednja vrijednost \pm S.D (n=4)

** BGluc= ekstrakt pripremljen u otapalu betain: glukoza, EtOH= ekstrakt pripremljen u (70 %, v/v) etanolu

Iz rezultata na Slici 13 vidljivo je da preživljenje stanica raste s porastom % (v/v) ekstrakta. Iz toga se može zaključiti kako nije došlo do inhibicije rasta Caco-2 stanične linije utjecajem polifenola. U radu Kosińska i Andlauer (2012) pokazano je također spektrofotometrijskom metodom kako nije zabilježena razlika u vijabilnosti za primijenjene koncentracije ekstrakta katehina. Kao razlog tome naveden je problem prolaska polifenola kao velikih hidrofilnih molekula kroz hidrofobni lipidni dvosloj membrane stanica. Kao rješenje studija je predložila korištenje ekstrakata s višim udjelom monomernih polifenola koji lakše ulaze u stanice. Uz navedeno, poznato je kako se samo 5-10 % prisutnih polifenola u stvarnosti apsorbira u stanice crijeva, tako da se dobiveni rezultati mogu objasniti pretpostavkom da koncentracije polifenola u ekstraktima nisu dovoljno značajne kako bi inhibirale rast tumorskih stanica (Correa i sur., 2019). Također, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdile optimalne koncentracije polifenola za inhibiciju rasta tumorskih stanica i citotoksični učinak.

4.3.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću DCFH-DA metode

Određivanje intracelularnog H_2O_2 i oksidativnog stresa provedeno je DCFH-DA metodom, odnosno mjerenjem intenziteta fluorescentnog DCF spektrofotometrijski pri $\lambda_{ex}=485\pm 10$ nm i $\lambda_{em}=530\pm 10$ nm. Dobiveni rezultati su prikazani na Slici 16 kao postotak omjera intenziteta fluorescencije stanica tretiranih ekstraktima u odnosu na kontrolne stanice, koje nisu predtretirane ekstraktima i vodikovim peroksidom te u odnosu na stanice koje su tretirane ekstraktima, ali ne vodikovim peroksidom. U stanicama koje stvaraju više unutarstaničnih ROS-ova očekuje se veći intenzitet fluorescencije. Dakle najveća fluorescencija očekuje u stanicama kojima je dodan samo H_2O_2 , odnosno pozitivnoj kontroli, a intenzitet fluorescencije bi trebao biti niži u stanicama predtretiranim ekstraktima koji posjeduju određeni antioksidacijski kapacitet.



Slika 14. Učinak tretmana ekstraktima na nastajanje unutarstaničnog ROS – a u Caco-2 stanicama pri tretmanu s H_2O_2 .

*rezultati su srednja vrijednost \pm S.D (n=2)

** B:Glc= ekstrakt pripremljen u otapalu betain: glukoza, EtOH= ekstrakt pripremljen u (70 %, v/v) etanolu

Iz prikazanih rezultata na Slici 14 može se zaključiti da je generacija ROS-ova kod stanica tretiranih ekstraktima komine i vodikovim peroksidom bila veća u odnosu na pozitivne kontrole te nije došlo do manifestacije antioksidativne aktivnosti polifenola. Razlog tome su prethodno izmjerene male ORAC vrijednosti te djelovanje otapala na same stanice. U radu

Mbous i sur. (2017) pokazano je kako NADES-i temeljeni na reducirajućim šećerima poput glukoze u tumorskim stanicama uzrokuju povećanje unutarstanične koncentracije ROS-ova. Naime, tumorske stanice imaju povećanu potrebu za glukozom kao izvorom energije za rast, proliferaciju i migraciju te glikoliza u takvim stanicama nije regulirana na način kao u normalnim stanicama. Pri većim koncentracijama glukoze dolazi do stvaranja krajnjih produkata glikozilacije (eng. *advanced glycation end products*, AGEs), odnosno glikoziliranih proteina koji se nakupljaju u stanicama i uzrokuju upale te stimuliraju proizvodnju ROS-ova i oksidativni stres (Mbous i sur., 2017). Ta studija objašnjava povećanu proizvodnju ROS-ova kod stanica tretiranih ekstraktom komine BGlc. S druge strane, za etanol je dokazano kako inducira oksidativni stres u stanicama. Metabolizam etanola objašnjen je u radu Das i Vasudevan (2007) te je vidljivo kako dolazi do produkcije ROS-ova. Tu činjenicu potvrđuje i studija Park i sur. (2012) gdje je pokazano da Caco-2 stanice tretirane etanolom imaju povećanu ekspresiju staničnih antioksidativnih proteina u svrhu obrane od oksidativnog stresa izazvanog etanolom. Dakle, za stanice tretirane etanolnim ekstraktom komine može se reći da iskazuje povećanu generaciju unutarstaničnih ROS-ova u odnosu na pozitivnu kontrolu zbog etanolom induciranog oksidativnog stresa te nedovoljnog udjela polifenola koji bi djelovali antioksidacijski.

4.4. ODREĐIVANJE POLIFENOLA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u ekstraktima komine grožđa provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti usporedbom retencijskog vremena spojeva i vanjskih standarda epigalokatehina, katehina, epikatehina i rutin trihidrata kao najzastupljenijih polifenola. Epigalokatehin, katehin i epikatehin su identificirani na 280 nm, a rutin trihidrat na 360 nm. Dobivene koncentracije izražene su u mg g⁻¹ suhe tvari biomase. Rezultati su prikazani u Tablici 5 i 6.

Tablica 5. Polifenoli određeni na HPLC-u u ekstraktima kumine pripremljenima u NADES-ima s većom predviđenom topljivošću (mg g⁻¹ suhe tvari kumine).

| Polifenoli | Ekstrakti kumine | | | |
|------------------------|-------------------------|-------------|------------|-------------|
| | BGlc | BScu | BEG | EtOH |
| Flavan-3-ol derivat 1 | - | 0,35591 | - | - |
| Epigalokatehin | 2,09512 | 1,36369 | 0,69215 | 0,27893 |
| Flavan-3-ol derivat 2 | 0,68948 | 2,24297 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 3 | 0,43993 | - | 0,14375 | - |
| Flavan-3-ol derivat 4 | 0,43993 | - | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 5 | - | 0,24972 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 6 | - | - | 0,14375 | - |
| Flavan-3-ol derivat 7 | 0,17129 | - | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 8 | - | - | - | - |
| Katehin | 0,60062 | 0,75887 | 0,57025 | 0,81978 |
| Flavan-3-ol derivat 9 | - | - | - | - |
| Epikatehin | 0,51039 | 0,39283 | 0,41106 | 0,47140 |
| Flavan-3-ol derivat 10 | 0,22491 | 0,24704 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 11 | - | - | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 12 | 0,22491 | 0,24704 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 13 | - | - | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 14 | - | - | - | - |
| Rutin trihidrat | 0,12139 | 0,01660 | 0,23183 | 0,28066 |

Tablica 6. Polifenoli određeni na HPLC-u u ekstraktima komine u NADES-ima s manjom predviđenom topljivošću (mg g⁻¹ suhe tvari komine).

| Polifenoli | Ekstrakti komine | |
|------------------------|-------------------------|-------------|
| | TyC10 | MeEu |
| Flavan-3-ol derivat 1 | - | - |
| Epigalokatehin | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 2 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 3 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 4 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 5 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 6 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 7 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 8 | - | - |
| Katehin | - | 0,06784 |
| Flavan-3-ol derivat 9 | - | - |
| Epikatehin | - | 0,01584 |
| Flavan-3-ol derivat 10 | - | 0,01212 |
| Flavan-3-ol derivat 11 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 12 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 13 | - | - |
| Flavan-3-ol derivat 14 | - | - |
| Rutin trihidrat | - | - |

Iz rezultata prikazanih u Tablici 5 i 6 vidljivo je kako su u ekstraktima komine prisutni epigalokatehin, katehin, epikatehin, rutin te mnogi flavan-3-ol derivati. Ekstrakti TyC10 i MeEu koji su odabrani kao otapala s predviđenom niskom topljivošću polifenola potvrdili su to predviđanje jer je vidljivo kako ekstrakcija nije bila uspješna. U TyC10 ekstraktu nije

utvrđena prisutnost nijednog od navedenih polifenola, dok su udjeli katehina, epikatehina i flavan-3-ol derivata u MeEu ekstraktu vrlo niski. U ostalim ekstraktima, najzastupljeniji su epigalokatehin i katehin, što je u skladu s očekivanjima jer su to najdominantniji polifenoli u komini grožđa (Jara-Palacios i sur., 2016; González-Centeno i sur., 2013). Kao najbolje ekstrakcijsko otapalo pokazao se BGlc zbog viših udjela ekstrahiranih polifenola u odnosu na druga otapala te najvećem broju ekstrahiranih derivata flavan-3-ola. Takvi rezultati su u korelaciji s rezultatima mjerenja ukupnih polifenola: otapalo BGlc se pokazalo kao najuspješnije. U ovom radu ispitan je softver COSMO $therm$ kao metoda za predviđanje topljivosti polifenola iz komine grožđa bijelog vina u NADES-u, te se pokazao uspješnim na temelju rezultata dobivenih Folin-Ciocolateu metodom te ORAC metodom. *In vitro* biološka aktivnost nije dala jednoznačne rezultate te s obzirom na to da nema dovoljnog broja studija koje ispituju biološki aktivnost s korištenim DES-ovima, potrebna su daljna ispitivanja *in vitro*, *in vivo* te u konačnici na ljudima kako bi se utvrdilo djelovanje ekstrakata polifenola, ali i samih DES-ova. U konačnici, HPLC-om je potvrđena prisutnost flavonoida katehina, epikatehina, epigalokatehina i rutin trihidrata u komini bijelog grožđa.

Može se zaključiti kako korišteni NADES-i imaju potencijal primjene u ekstrakciji polifenola te predstavljaju dostojnu zamjenu u izolaciji biološki aktivnih spojeva iz biljnih materijala u odnosu na konvencionalno korištena otapala poput etanola. No, prije toga potrebno je provesti daljna istraživanja koja bi utvrdila sigurnost, regulatorne okvire i optimalne doze za ljudsku primjenu.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu proizlaze sljedeći zaključci:

1. COSMO $therm$ je pouzdan način za predviđanje topljivosti spojeva u željenim otapalima jer su niske dobivene vrijednosti $\ln(\gamma)$ potvrđene dobrom topljivošću i uspješnom ekstrakcijom, odnosno visoke vrijednosti $\ln(\gamma)$ slabom topljivošću i manje uspješnom ekstrakcijom.
2. Ekstrakcija polifenola iz komine hrvatske autohtone sorte grožđa Graševina uspješno je provedena pomoću eutektičnih otapala koja potencijalno mogu zamijeniti etanol kao konvencionalno otapalo. Kao najuspješnije otapalo za ekstrakciju pokazao se BGI s najviše ekstrahiranih polifenola.
3. Određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom utvrđeni su antioksidacijski kapaciteti ekstrakata komine. Najveći antioksidacijski kapacitet pokazao je BScu ekstrakt.
4. MTS metodom utvrđeno je preživljenje Caco-2 stanica tretiranih ekstraktima no nije uočen citotoksični učinak. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdile optimalne koncentracije polifenola za inhibiciju rasta tumorskih stanica.
5. DCFH-DA metodom određene su reaktivne kisikove vrste kod Caco-2 stanične linije tretirane ekstraktima. Zaključeno je kako nema dovoljnog udjela polifenola koji bi djelovali antioksidacijski te da treba ispitati prooksidacijski učinak samih NADES-a.
6. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti identificirani i kvantificirani su katehin, epikatehin, epigalokatehin i rutin trihidrat kao najčešći polifenoli u komini grožđu.

6. LITERATURA

Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M. (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2**(4), 875–877.

Alirezai, M., Khoshdel, Z., Dezfoulian, O., Rashidipour, M., Taghadosi, V. (2015) Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *J. Physiol. Sci.* **65**(3), 243–252.

Anastas, P. T., Zimmerman, J. B. (2003) Peer Reviewed: Design Through the 12 Principles of Green Engineering. *Environ. Sci. Technol.* **37**(5), 94A–101A.

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice, *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312.

Bae, J., Kim, N., Shin, Y., Kim, S., Kim, Y. (2020) Activity of catechins and their applications. *Biomed. dermatol.* **4**, 8.

Benlebna, M., Ruesgas-Ramón, M., Bonafos, B., Fouret, G., Casas, F., Coudray, C., ... Feillet-Coudray, C. (2018) Toxicity of Natural Deep Eutectic Solvent Betaine:Glycerol in Rats. *J. Agr. Food Chem.* **66**(24), 6205–6212.

Briguglio, G., Costa, C., Pollicino, M., Giambò, F., Catania, S., & Fenga, C. (2020) Polyphenols in cancer prevention: New insights (Review). *Int. J. Funct.l Nutr.* **1**, 9.

Brodowska, K. (2017) Natural Flavonoids: Classification, Potential Role, and Application of Flavonoid Analogues. *Eur. J. of Biol. Res.* **7**, 108-123.

Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**(3), 303–311.

Chemat, F., Abert Vian, M., Fabiano-Tixier, A., Nutrizio, M., Režek Jambrak, A., Munekata, P., Lorenzo, J., Barba, F., Binello, A., Cravotto, G. (2020) A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chem.* **22** (8), 2325-2353

Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., Cravotto, G. (2019) Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *Trends Anal. Chem.* **118**, 248–263.

Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(7), 8615–8627.

Chen, J., He, F., Liu, S., Zhou, T., Baloch, S., Jiang, C., Pei, X. (2019) Cytoprotective Effect of *Ligustrum robustum* Polyphenol Extract against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress via Nrf2 Signaling Pathway in Caco-2 Cells. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* **2019**, 1–8.

Corrêa, T. A. F., Rogero, M. M., Hassimotto, N. M. A., Lajolo, F. M. (2019) The Two-Way Polyphenols-Microbiota Interactions and Their Effects on Obesity and Related Metabolic Diseases. *Front. Nutr.* **6**.

Craig, S. A. (2004) Betaine in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**(3), 539–549.

Cvjetko Bubalo, M., Čurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić-Redovniković, I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutentic solvents. *Food Chem.* **200**, 159-166.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631-1639.

Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G. J., Verpoorte R., Choi Y. H. (2013a) Natural deep eutentic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* **766**, 61-68.

Dai, Y., Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013b) Natural Deep Eutentic Solvents as New Extraction Media for Phenolic Metabolite in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**,: 6272 – 6278.

Dai, Y., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2014) Natural deep eutentic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chem.* **159**, 116 – 121.

Das, S. K., Vasudevan, D. M. (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* **81**(3), 177–187.

Ding, S., Xu, S., Fang, J., Jiang, H. (2020) The Protective Effect of Polyphenols for Colorectal Cancer. *Front. immunol.* **11**, 1407.

Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske (2020). Bilanca vina za 2018. <https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2019/01-01-29_01_2019.htm>. Pristupljeno 04. kolovoza 2021.

Dwyer, K., Hosseinian, F., Rod, M. (2014) The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *J. Food Res.* **3**(2), 91.

Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm. J.* **25**(2), 149–164.

Garcia-Jares, C., Vazquez, A., Lamas, J. P., Pajaro, M., Alvarez-Casas, M., Lores, M. (2015) Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Antioxidants* **4**(4), 737–749.

Georgiev, V., Ananga, A., Tsoлова, V. (2014) Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients* **6**(1), 391–415.

González-Centeno, M. R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P.-L. (2013) Characterization of Polyphenols and Antioxidant Potential of White Grape Pomace Byproducts (*Vitis vinifera* L.). *J. Agr. Food Chem.* **61**(47), 11579–11587.

González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. (2004) Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* **513**(1), 283–289.

Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., ... Sangoro, J. R. (2020) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.* **121**(3), 1232–1285..

Hayyan, M., Hashim, M. A., Al-Saadi, M. A., Hayyan, A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S. (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**(2), 455–459.

- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S., Saheed, O. K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**(7), 2193–2195.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., Rahu, N. (2016) Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1-9.
- Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J. (2016) The Use of Grape Seed Byproducts Rich in Flavonoids to Improve the Antioxidant Potential of Red Wines. *Molecules* **21**(11), 1526.
- Jara-Palacios, M.J., Hernanz, D., Cifuentes-Gomez, T., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Spencer, J.P.E. (2015) Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem.* **183**, 78–82.
- Jurić, T., Mičić, N., Potkonjak, A., Milanov, D., Dodić, J., Trivunović, Z., Popović, B.M. (2021) The evaluation of phenolic content, in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Mentha piperita* extracts obtained by natural deep eutectic solvents. *Food Chem.* **362**, 130226.
- Kalhor, P., Ghandi, K. (2019) Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste. *Molecules* **24**(22), 4012.
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., 2nd, Ischiropoulos, H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radic.Biol. Med.* **52**(1), 1–6.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A. (2004) Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agr. Food Chem.* **52**(14), 4360–4367.
- Kianfar, E., Mafi, S. (2020) Ionic Liquids: Properties, Application, and Synthesis. *Fine Chem. Eng.* **2**, 22-31.
- Klamt, A. (2017) The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **8**, e1338.

- Klamt, A., Eckert, F., Arlt, W. (2010) COSMO-RS: An Alternative to Simulation for Calculating Thermodynamic Properties of Liquid Mixtures. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **1**(1), 101–122.
- Klamt, A., Jonas, V., Bürger, T., Lohrenz, J.C.W. (1998) Refinement and parametrization of COSMO-RS. *J. Phys. Chem. A.* **102**, 5074–5085.
- Kosińska, A., Andlauer, W. (2012) Cocoa polyphenols are absorbed in Caco-2 cell model of intestinal epithelium. *Food Chem.* **135**(3), 999–1005.
- Kunal, A.G., Mallinath, H., Deepak, B., Nirgude, P. (2015) Lyophilization/Freeze drying-A review. *World J. Pharm. Res.* **4**(8), 516-543.
- Lea T. (2015) Caco-2 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health*, 103-111.
- Li, N., Wang, Y., Xu, K., Huang, Y., Wen, Q., Ding, X. (2016) Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. *Talanta* **152**, 23–32.
- Lores, H., Romero, V., Costas, I., Bendicho, C., Lavilla, I. (2017) Natural deep eutectic solvents in combination with ultrasonic energy as a green approach for solubilisation of proteins: application to gluten determination by immunoassay. *Talanta* **162**, 453–459.
- Macário, I. P. E., Oliveira, H., Menezes, A. C., Ventura, S. P. M., Pereira, J. L., Gonçalves, A. M. M., ... Gonçalves, F. J. M. (2019) Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci. Rep.* **9**(1).
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy C, Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**(5), 727-47.
- Martins, M.A.R.; Pinho, S.P.; Coutinho, J.A.P. (2019) Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *J. Solution Chem.* **48**, 962–982.
- Mbous, Y., Hayyan, M., Wong, W. et al. (2017) Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci. Rep.*, **7**, 41257.
- Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. (2014) Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *J. Clean. Prod.* **65**, 28–41.

- Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2019) The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **0**, 1–29.
- Oprica, L., Vezeteu, G., Grigore, M. N. (2016) Differential Content of the Total Polyphenols and Flavonoids in Three Romanian White Grape Cultivars. *Iran. J. Public Health* **45**(6), 826–827.
- Osakwe, O. (2016) Preclinical In Vitro Studies: Development and Applicability. Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization, 1.izd., Academic Press, SAD, str. 129–148.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L. (2014) Natural deep eutectic solvents-solvents for 21st century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063-1071.
- Paiva, A., Matias, A.A., Duarte, A.R.C. (2018) How do we drive deep eutectic systems towards an industrial reality? *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **11**, 81–85.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270–278.
- Panić, M., Drakula, S., Cravotto, G., Verpoorte, R., Hruškar, M., Radojčić Redovniković, I., Radošević, K. (2020) Biological activity and sensory evaluation of cocoa by-products NADES extracts used in food fortification. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **66**, 102514.
- Panić, M., Radić Stojković, M., Kraljić, K., Škevin, D., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2019) Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chem.* **283**, 628-636.
- Park, S. C., Lim, J. Y., Jeon, Y. T., Keum, B., Seo, Y. S., Kim, Y. S., Lee, S. J., Lee, H. S., Chun, H. J., Um, S. H., Kim, C. D., Ryu, H. S., Sul, D., Oh, E. (2012) Ethanol-induced DNA damage and repair-related molecules in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Mol. Med. Rep.* **5**, 1027–1032.
- Petti, S., Scully, C. (2009) Polyphenols, oral health and disease: A review. *J. Dent.* **37**, 413–423.

Putnik, P., Lorenzo, J., Barba, F., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., ... Bursać Kovačević, D. (2018) Novel Food Processing and Extraction Technologies of High-Added Value Compounds from Plant Materials. *Foods* **7**(7), 106.

Rasouli, H., Farzaei, M.H., Khodarahmi, R. (2017) Polyphenols and their benefits: A review. *Int. J. Food Prop.* **20**, 1700–1741.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. U: Assay guidance manual (Markossian, S., ured.), Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Yoga Latha, L. (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **8**, 1–10.

Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082.

Šango, M. (2017) Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine grožđa primjenom prirodnih eutektičkih otapala (Završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A, Garcia-Viguera, C. (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638–15678.

Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., Cunha, L. M. (2015) Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Ind. Crops Prod.* **74**, 397–406.

Voća, N., Krička, T., Brlek Savić, T., Matin, A., Jurišić, V. (2010) Organic waste after wine and olive oil production as raw material for thermal energy generation, *Journal on Processing and Energy in Agriculture* **14**, 69-71

Wadhwa, M., Bakshi, S.P.M. (2013) Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products, <<http://www.fao.org/3/i3273e/i3273e00.htm>>. Pristupljeno 04. kolovoza 2021.

Yu, D., Zha, Y., Zhong, Z., Ruan, Y., Li, Z., Sun, L., Hou, S. (2021). Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation, *Sens. Actuators B Chem.* **339**, 129878.

Zacharof, M.P. (2017) Grape Winery Waste as Feedstock for Bioconversions: Applying the Biorefinery Concept. *Waste and Biomass Valorization* **8**, 1011–1025.

Zhang, Q., Oliveira Vigie,r K., Royer, S., Jerome, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108–7146.

Zhou, K., & Raffoul, J. J. (2012) Potential Anticancer Properties of Grape Antioxidants. *J. Oncol.* **2012**, 1–8.

Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., Li, H. B. (2016) Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients* **8**, 515.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis:



Nkolina Martić