

Priprema i biološka aktivnost ekstrakata nusproizvoda vinske industrije pripremljenih pomoću niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Dvorneković, Iva

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:159:053280>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2021.

Iva Dvorneković

**PRIPREMA I BIOLOŠKA
AKTIVNOST EKSTRAKATA
NUSPROIZVODA VINSKE
INDUSTRIJE PRIPRAVLJENIH
POMOĆU
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA**

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. Manuele Panić.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina“, KK.01.1.1.07.007. Projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Voditelj projekta: Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković



Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada i prenesenom znanju.

Veliko hvala dr.sc. Manueli Panić na uloženom vremenu i trudu, strpljivosti, susretljivosti i velikoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela i pisanja rada. Također hvala i dr.sc. Veroniki Gunjević na pomoći pri eksperimentalnom dijelu, ali i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na ugodnoj radnoj atmosferi i dobrom raspoloženju.

Hvala cijeloj mojoj obitelji, Juraju i prijateljima što su vjerovali u mene i bili podrška sve ove godine studiranja.

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: Biotehnologija
Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PRIPREMA I BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA NUSPROIZVODA VINSKE INDUSTRIJE PRIPRAVLJENIH POMOĆU NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

*Iva Dvorneković, univ. bacc. ing. biotechn.
0058208845*

Sažetak: Za zelenu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva posljednjih se godina često upotrebljavaju prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES), kao potencijalna zamjena konvencionalnim otapalima. Nakon proizvodnje vina zaostaju nusprodukti, pokožica i sjemenke grožđa, bogati polifenolima koji se mogu primijeniti u kozmetičkoj industriji. U ovom radu su pripremljeni ekstrakti pokožice i sjemenki grožđa u NADES-ima prethodno dizajniranima pomoću COSMOtherm programa i etanolu. Ukupan sadržaj polifenola u ekstraktima određen je Folin-Ciocalteu reagensom, određeni polifenoli identificirani su i kvantificirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, dok je antioksidacijski učinak ekstrakata određen ORAC metodom. Biološka aktivnost pripremljenih ekstrakata ispitana je *in vitro* na HaCaT staničnoj liniji MTS metodom, a antioksidacijski potencijal u stanicama DCFA-DA metodom. Najbolji učinak ekstrakcije postignut je eutektičkim otapalom betain : glukoza za pokožicu, a betain : etilen-glikolom za sjemenke. HPLC analizom određena je prisutnost epigalokatehina, katehina, epikatehina, rutin trihidrata i derivata flavan-3-ola u ekstraktima pokožice i sjemenka. NADES otapala, na temelju svih ispitanih parametara, mogu uspješno zamjeniti etanol kao konvencionalno otapalo u procesu ekstrakcije. S obzirom na uočenu proliferaciju HaCaT stanica, ispitani ekstrakti imaju potencijal primjene u kozmetičkoj industriji.

Ključne riječi: *prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, polifenoli, sjemenke i pokožica grožđa, COSMOtherm, kozmetička industrija*

Rad sadrži: 55 stranica, 16 slika, 6 tablica, 77 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: dr.sc. Manuela Panić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (presjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (mentor)
3. prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (član)
4. doc. dr. sc. Marina Tomašević (zamjenski član)

Datum obrane: 29. studenoga 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: Biotechnology
Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF WINE INDUSTRY BY-PRODUCTS EXTRACTS PREPARED USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Iva Dvorneković, univ. bacc. ing. biotechn.
0058208845

Abstract: In recent years, natural deep eutectic solvents (NADES) have often been used for extraction of biologically active compounds, as a potential replacement for conventional solvents. Grape skin and seeds are wine production by-products rich in polyphenols that can be used in cosmetic industry. In this study, grape skin and seeds extracts were prepared in NADES previously selected by COSMOtherm and ethanol. Extracts total polyphenols content was determined with Folin-Ciocalteu reagent and certain polyphenols were identified and quantified by high-performance liquid chromatography, while antioxidant effect by the ORAC method. Biological activity of prepared extracts was evaluated *in vitro* on the HaCaT Cell line using the MTS and antioxidant effect in cells using the DCFH-DA assays. Betaine : glucose provided the best extraction efficiency for grape skin, betaine : ethylene glycol for grape seeds. The presence of epigallocatechin, catechin, epicatechin, rutin trihydrate and derivatives flavan-3-ols in grape skin and seeds was also shown. Based on all tested parameters, NADES can successfully replace ethanol as conventional solvent in extraction processes. Given the observed proliferation of HaCaT cells, the tested extracts have the potential for application in the cosmetics industry.

Keywords: *natural deep eutectic solvents, polyphenols, grape skin and seeds, COSMOtherm, cosmetic industry*

Thesis contains: 55 pages, 16 figures, 6 tables, 77 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ivana, Radojčić Redovniković, PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Manuela, Panić, PhD.*

Reviewers:

1. Kristina Radošević, PhD, Associate professor
2. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor
3. Karin Kovačević Ganić, PhD, Full professor
4. Marina Tomašević, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: November 29th 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ZELENE EKSTRAKCIJE	3
2.1.1. Načela zelene ekstrakcije	4
2.2. ZELENA OTAPALA	7
2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala	8
2.2.1.1. Biorazgradivost i toksičnost eutektičkih otapala	10
2.2.1.2. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva	11
2.3. GROŽĐE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA	12
2.3.1. Grožđe kao izvor polifenola	12
2.3.2. Primjena polifenola u kozmetičkoj industriji	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Sjemenke i pokožica	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Otopine i puferi	18
3.1.4. Oprema	19
3.1.5. Stanične linije	20
3.2. METODE RADA	20
3.2.1. Procjena topljivosti polifenola u eutektičkim otapalima pomoću <i>COSMOtherm</i> programa	20
3.2.2. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES-a)	22
3.2.3. Priprema ekstrakata sjemenki i pokožice grožđa	22
3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom	23
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom	24
3.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata na HaCaT staničnoj liniji	25
3.2.6.1. Uzgoj HaCaT stanične linije i određivanje broja stanica	25
3.2.6.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom	27
3.2.6.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću DCFH-DA metode	28
3.2.7. Određivanje polifenola u sjemenkama i pokožici grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	29
3.3. OBRADA REZULTATA	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. ODABIR NADES-A	32
4.2. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA POKOŽICE I SJEMENKI GROŽĐA PRIPREMLJENIH POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA	35

4.3. ODREĐIVANJE POLIFENOLA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOLOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)	37
4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET POLIFENOLA MJEREN ORAC METODOM	39
4.5. BILOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA POKOŽICE I SJEMENKI GROŽĐA	41
4.5.1. <i>In vitro</i> učinak ekstrakata na HaCaT staničnu liniju	41
4.5.2. Zaštitni antioksidativan učinak ekstrakata u kulturi HaCaT stanica	42
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46

1. UVOD

Posljednjih desetljeća zagađenje okoliša postao je značajan problem u svijetu. Jedan od glavnih zagađivača je industrija, stoga su znanstvenici utemeljili 12 principa zelene kemije, posljedično 6 načela zelene ekstrakcije, kao smjernice kojima se nastoji maksimalno umanjiti njezin negativni utjecaj na okoliš. Glavni ciljevi zelenih koncepata su zadržati ekonomsku isplativost, a da proces proizvodnje i konačan proizvod bude siguran za konzumenta i radnika. Ekstrakcije biološki aktivnih spojeva po starim principima provodile su se petrokemijskim i hlapljivim organskim otapalima. Većina tih otapala je zapaljiva, toksična, hlapljiva i teško biorazgradiva. Zelene ekstrakcije su stoga postale optimalan i održiv način iskorištavanja sirovina (Panić i sur., 2019). Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) predstavljena su kao idealna zamjena za tradicionalna otapala. To su smjese akceptora vodikove veze (*Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) poput kolin klorida i donora vodikove veze (*Hydrogen Bond Donor*, HBD) kao što su šećeri, alkoholi ili aminokiseline u određenom omjeru. Prednosti NADES-a su netoksičnost, biodostupnost, fizikalno-kemijska svojstva (podesiva viskoznost, širok raspon polariteta, velika topljivost raznih spojeva) i njihova niska cijena (Aroso i sur., 2017; Radošević i sur., 2016).

Proizvodnja vina je važan poljoprivredni sektor kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj, gdje je 2018. godine proizvedeno otprilike 984 730 hL vina (Državni zavod za statistiku, 2020). Nakon proizvodnje vina nastaje otpad koji neispravnim odlaganjem može stvoriti ekološki problem. Principom biorafinerije otpad se može preraditi u proizvode koji se plasiraju na prehrambeno, kozmetičko i farmaceutsko tržište (Mirabella i sur., 2014). Pokožica i sjemenke grožđa dio su otpada proizvodnje vina i bogati su polifenolnim spojevima koji posjeduju svojstva koja pozitivno utječu na zdravlje, kao što su antioksidativno, antibakterijsko i antitumorsko djelovanje, zacjeljuju rane, pozitivno djeluju na imunološki sustav i imaju ulogu u prevenciji bolesti poput hiperglikemije, hiperlipidemije, kardiovaskularnih bolesti i tumora (Abbas i sur., 2016). U kozmetičkoj industriji i dermatologiji važnost polifenolih spojeva se uglavnom temelji na njihovom antioksidacijskom potencijalu. Proizvodi s polifenolnim ekstraktima koriste se za prevenciju starenja, zaštitu kože od sunčevog zračenja, uklanjanje hiperpigmentacijskih nepravilnosti ili zaštitu kozmetičkih formulacija kako bi im se produljio rok trajanja.

Cilj ovog rada je bio pripremiti ekstrakte sjemenki i pokožice grožđa bogate polifenolima za kozmetičku industriju. Za dizajniranje idealnog NADES-a korišten je COSMO θ term

program. Nakon odabira otapala provedena je ekstrakcija pokožice i sjemenki primjenom ultrazvuka. Dobivenim ekstraktima je određen ukupan udio polifenola Folin-Ciocalteu reagensom, antioksidacijski učinak ORAC metodom te DCFH-DA metodom na stanicama. Nadalje, ispitana je biološka aktivnost pripremljenih ekstrakata *in vitro* na staničnoj liniji humanih keratinocita (HaCaT). Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti su identificirani i kvantificirani određeni polifenoli. Svi rezultati su uspoređeni s ekstraktom pripremljenim konvencionalnim otapalom etanolom kako bi se usporedila primjena NADES-a u ekstrakcijama biološki aktivnih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnih sirovina složen je proces koji se sastoji od brojnih koraka: odabir biljne vrste, procjena toksičnosti, priprema biljnog uzorka i elementarne analize, biološka testiranja, izolacija aktivnih spojeva, *in vivo* analize te komercijalizacija (Azmir i sur., 2013). U zadnjih nekoliko desetljeća pitanje očuvanja okoliša sve više zabrinjava svijet. Suvremeno društvo svjesno je odgovornosti koju ima prema okolišu zbog ljudskih aktivnosti, stoga je još 1998. definiran koncept zelene kemije sa 12 principa, prikazan na slici 1, kao smjernica za smanjenje onečišćenja tijekom kemijskih procesa (Aramenta i sur., 2019). Ekstrakcije prirodnih proizvoda, na primjer u proizvodnji parfema, smatrale su se čistim postupkom u usporedbi s kemijskom industrijom, ali novija istraživanja pokazuju da i takve ekstrakcije imaju značajan utjecaj na okoliš. Ukupan utjecaj na okoliš nije lako procijeniti, ali se zna da se 50 % energije od ukupnog industrijskog procesa potroši samo na ekstrakciju. Unatoč velikoj potrošnji energije i velikoj količini otapala, iskorištenje je često vrlo niskog postotka. Danas ne postoji proizvodni proces u kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj ili kemijskoj industriji koji ne koristi ekstrakcije kao što su maceracija, prešanje, hidrodestilacija, perkolacija ili Soxhlet ekstrakcija. S obzirom na okoliš, nove tehnologije ekstrakcije se fokusiraju na postupke koji smanjuju upotrebu otapala, pritom zadržavajući visoku kvalitetu ekstrakata i isplativost proizvodnje. Jedna od važnih grana zelene kemije je zelena ekstrakcija koja se definira kao dizajniranje ekstrakcijskog procesa koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurati siguran i visoko kvalitetan proizvod - ekstrakt. Kako bi se postigla optimalna potrošnja sirovina, otapala i energije, osmišljena su tri glavna rješenja za dizajniranje i vođenje laboratorijskih i industrijskih procesa: poboljšanje i optimizacija postojećih procesa, inovacije u procesima i postupcima te inovacije u otkrivanju novih otapala. Na temelju koncepta zelene kemije znanstvenici su uspostavili 6 načela zelenih ekstrakcija koji su detaljnije opisani u nastavku (Chemat i sur., 2012).



Slika 1. Prikaz 12 principa zelene kemije (prema De Marco i sur., 2019)

2.1.1. Načela zelene ekstrakcije

Pronalazak novih izvora biljnih materijala i upotreba obnovljivih izvora biljnih materijala

Povećana potražnja za prirodnim proizvodima i njihovim ekstraktima dovela je do prekomjerne eksploatacije prirodnih biljnih resursa. Tijekom povijesti iz tog je razloga došlo do izumiranja pojedinih biljnih vrsta, stoga je za buduće generacije nužno očuvati bioraznolikost. Kako bi se smanjio utjecaj industrijskih procesa na okoliš i kako bi se proizveli proizvodi koji zadovoljavaju temelje zelene ekstrakcije, uzgoj biljaka mora se provesti prema određenim smjernicama: uklopiti sirovinu u ekosustav tako da zadovoljava socijalne, ekološke i ekonomske potrebe, za uzgoj biljaka koristiti protokole koji će povećati prinos, proizvoditi sorte koje sadrže ciljane molekule ili odabrati sorte pogodne za regiju i klimu u kojima se uzgajaju, tretirati biljke tehnologijama koje omogućuju učinkovitu proizvodnju i zaštitu usjeva i koje su ujedno sigurne za okoliš i radnike, a pritom otporne na štetnike i patogene. Zadnje važne smjernice su: izbjegavati kulture koje uzrokuju zagađenje, prijeti bioraznolikosti i natječu se s lokalnom vegetacijom te bolje upravljati potrošnjom i količinom vode koja se koristi, pesticidima i gnojivima. Primjena prvog principa pokazala se uspješnom kod proizvodnje antitumorskog lijeka paklitaksela, izoliranog iz drveta *Taxus brevifolia* (Nutt.), koji se danas proizvodi polusintezom iz odgovarajućeg prekursora. Za očuvanje bioraznolikosti razvijena je nova metoda - „plant milking“, u kojoj se biljke uzgajaju u staklenicima u tekućem mediju, a ciljane molekule se izlučuju kroz korijen u medij bez da se oštećuje biljni materijal (Chemat i sur., 2019a, Chemat i sur., 2012).

Upotreba alternativnih otapala, uglavnom vode i otapala iz prirodnih izvora

U procesu ekstrakcije i separacije koriste se velike količine organskih otapala. Iako su prednosti organskih otapala povećana selektivnost odvajanja, povećana učinkovitost odvajanja te bolja topivost i/ili stabilnost spojeva (Porras i Kenndler, 2005), njihova zamjena zelenijim alternativama je nužna jer su zapaljiva, hlapljiva, toksična i često odgovorna za zagađenje okoliša i efekt staklenika (Chemat i sur., 2012). Stoga, zelene tehnologije usmjerene su na razvoj ekološki prihvatljivih otapala koja bi mogla zadovoljiti tehnološke i ekonomske zahtjeve. Smjernice za odabir otapala koje zadovoljava zelene ekstrakcije su: koristiti 100 % prirodno, obnovljivo otapalo prirodnog porijekla, poznavati potencijalne rizike, koristiti otapalo prikladno za industrijsko postrojenje, s visokom stopom recikliranja i smanjenom potrošnjom energije i izbjegavati otapalo koje može ugroziti zdravlje radnika i potrošača. Alternativna otapala poput agrootapala, voda, CO₂, ionske kapljevine, dio su zelenih otapala koja su se pokazala uspješnima za proces ekstrakcije te svako od navedenih i danas koristimo u industriji, ovisno o tome u kojemu se željeni produkt najbolje ekstrahira (Chemat i sur., 2019a).

Smanjenje potrošnje energije ponovnom upotrebom energije i primjenom inovativnih tehnologija

Najveća briga svih sektora industrije je potrošnja energije. Ona može biti povezana s ekološkim problemima, povećanim troškovima proizvodnje te posljedično - smanjenjem profitabilnosti. Trenutni izazov svake industrije je razumjeti energetske potrebe procesa kako bi mogli umanjiti unos energije i reciklirati ju. Postoje 4 načina kako smanjiti potrošnju energije: optimizirati postojeći proces, obnoviti energiju oslobođenu tijekom ekstrakcije, inovativnim tehnologijama unaprijediti trenutne procese ili osmisliti potpuno novi proces. Uz ove smjernice još se preporuča optimizirati upotrebu vode (recikliranje, skupljanje kišnice), otapala i cijelog procesa od sirovine do konačnog produkta. Primjer uspješne optimizacije procesa je ekstrakcija 10-deacetilbakatina III iz tise vrućom vodom pod pritiskom. Prototip eko-isparivača omogućio je recikliranje 55 % energije prilikom parne destilacije lavande. Inovativne metode koje pomažu tradicionalnim procesima ekstrakcije, posebice ekstrakciji iz biljnih materijala, su mikrovalovi i ultrazvuk. Tvrtka Arkopharma uspješno ekstrahira biološki aktivne spojeve pomoću ultrazvuka iz više od 100 biljaka i plasira ih na tržište kao proizvode za ljepotu, poboljšanje zdravlja i aromaterapiju (Chemat i sur., 2019a, Chemat i sur., 2012).

Proizvodnja nusprodukata umjesto otpada

Tijekom procesa ekstrakcije, osim željenog proizvoda, nastaju otpad, nusprodukti i koprodukti. Otpad je materijal koji se ne može ponovo iskoristiti te se uklanja spaljivanjem ili odlaganjem u centru za otpad. Nusprodukt je zaostali proizvod koji se pojavljuje tijekom procesa ekstrakcije. On se može direktno koristiti ili biti sirovina za proizvodnju drugog proizvoda. Jedan od primjera nusprodukata su komina i stabljike grožđa. Koprodukt je namjeran i neizbježan materijal koji nastaje tijekom proizvodnog procesa u isto vrijeme kad i glavni proizvod. Povećan rast cirkularne ekonomije kreće se prema održivim procesima oslanjajući se na nove tehnologije. Umjesto linearnog obrasca proizvodnje, resursi se koriste, recikliraju i obnavljaju, što dodaje vrijednost procesu. Koncept biorafinerije definira se kao održiva prerada biomase u proizvode koji se mogu plasirati na tržište. Biorafinerija je industrijsko postrojenje ili mreža postrojenja koja preoblikuju biomasu u svoje sastavnice, a istovremeno proizvodi energiju, biogoriva, kemikalije i materijale. Ovaj koncept postaje široko prihvaćen s obzirom na to da je količina svjetskih resursa u stalnom padu. Smjernice za bolje upravljanje otpadom i nusproduktima ekstrakcije su: provesti dodatnu ekstrakciju kako bi se proizveli vrijedni proizvodi, koristiti zaostalu sirovinu kao hranu za stoku, pretvoriti biomasu u energiju. Zbog svog bogatog kemijskog sastava nusprodukti vinske industrije pokazali su se dobrima za biorafineriju (Chemat i sur., 2019a, Chemat i sur., 2012).

Smanjenje broja operacija i provođenje sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa

S obzirom na to da proces ekstrakcije troši mnogo energije, kako bi postao zeleniji potrebno je skratiti vrijeme ekstrakcije, smanjiti broj operacija, potrošnju energije, utjecaj na okoliš i ekonomske troškove, a pritom povećati prinos, kvalitetu i čistoću ekstrakta. Jedan od primjera uspješnog smanjenja broja koraka je ekstrakcija pomoću superkričnog CO₂. Na taj način se koristi čisto otapalo, a CO₂ se nakon ekstrakcije odvaja od ekstrakta i reciklira, čime se dobije ekstrakt bez otapala i otapalo koje možemo ponovno koristiti (Chemat i sur., 2012).

Usmjerenje k proizvodnji biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez onečistila

Ekstrakti su često mješavine biološki aktivnih spojeva i drugih supstanci koje utječu na njihovu topljivost i apsorpciju. Sastav ekstrakta također utječe na biodostupnost alkaloida, polifenola, flavonoida i terpena. Kako bi zadovoljio sve regulacije i potrebe na tržištu, ekstrakt mora doseći brojne kriterije koji osiguravaju da nije štetan za okoliš i čovjeka. Ekstrakti se zato moraju dobiti iz točno identificiranih sirovina, moraju imati određena fizikalno-kemijska svojstva te se moraju pravilno pohraniti. Također, važno je geografsko

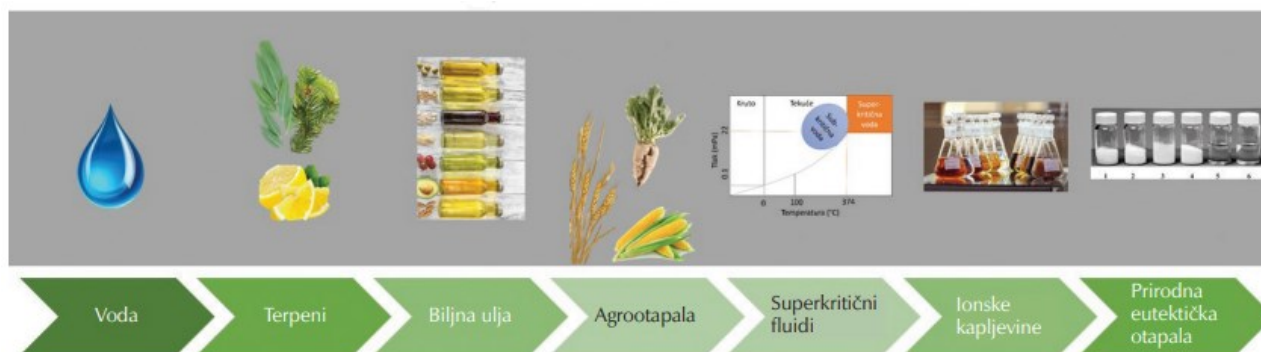
porijeklo i okolišni uvjeti u kojima je sirovina dobivena i činjenica da ekstrakt ne smije sadržavati mikotoksine, teške metale, onečišćujuće tvari ili ostatke pesticida (Chemat i sur., 2012).

2.2. ZELENA OTAPALA

U industrijskim procesima koristi se velika količina hlapljivih i zapaljivih organskih otapala za reakcijske smjese, ali i za procese separacije. Procijenjeno je da organska otapala čine 60 % svih industrijskih i 30 % svjetske emisije hlapljivih organskih spojeva. Prema već spomenutima načelima zelene kemije i zelene ekstrakcije nužno je organska otapala zamijeniti sigurnijim otapalima. Europska agencija za okoliš ima cilj do 2050. godine smanjiti upotrebu štetnih otapala u industriji, smanjiti emisiju stakleničkih plinova i potrošnju vode te poboljšati kvalitetu zraka (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Prema principima zelene kemije alternativna otapala trebaju se temeljiti na sigurnosti radnika (netoksičnost, nekancerogenost, nemutagenost, apsorpcija putem kože i respiratornog sustava), sigurnosti procesa (nezapaljivost, neeksplozivnost, nehlapljivost), sigurnosti okoliša (ekotoksičnost, postojanost, kontaminacija podzemnih voda, uništavanje ozonskog omotača) i održivosti procesa (sposobnost recikliranja i mogućnost višekratne upotrebe). Stoga bi zeleno otapalo trebalo biti kemijski i fizički stabilno, male hlapljivosti, lako za uporabu te jednostavno za recikliranje s mogućnošću ponovne upotrebe (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Slika 2 prikazuje otapala koja zadovoljavaju principe zelene ekstrakcije i smatraju se ekološki prihvatljivim zelenim otapalima. Idealno bi bilo imati proces bez otapala, ali to je gotovo nemoguće jer su otapala potrebna za otapanje krutih sirovina, odgovorna su za prijenos mase i topline, utječu na viskoznost te na korake separacije i pročišćavanja konačnog proizvoda (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Nove metode ekstrakcije koriste sigurna i netoksična otapala kao što su voda, CO₂, agrootapala te otapala koja se temelje na organskim solima, ionske kapljevine i eutektička otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

Ionske kapljevine su grupa otapala nastala spajanjem organskog kationa i organskog ili anorganskog aniona čija je temperatura tališta ispod 100 °C. Najčešći kationi koji se koriste u pripremi ionskih kapljevine su tetraalkilamonijev, tetraalkilfosfonijev i trialkilsulfonijev kation, dok su anioni: glikolat, heksafluorofosfat, tetrafluoroborat i kloridni anion. Prednosti ovih otapala su nezapaljivost, toplinska stabilnost, nizak tlak pare te sintetička svestranost. Međutim, slaba biorazgradivost i biokompatibilnost su narušile njihov zeleni aspekt. Kako bi

se izbjegli ti nedostaci, kao njihova zamjena su predstavljena eutektička otapala (Chemat i sur., 2019b).



Slika 2. Primjeri zelenih otapala (Radojčić Redovniković, 2020)

2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

Eutektička otapala (engl. Deep Eutectic Solvents, DES) su smjese akceptora vodika (npr. kvarternih amonijevih soli) i donora vodika (npr. amini, šećeri, alkoholi) u određenom molarnom omjeru (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Takva pripravljena smjesa ima nižu točku tališta u odnosu na talište svake od njezinih komponenata zasebno. Na primjer, smjesa kolin klorida i uree u omjeru 1 : 2 ima talište na 12 °C, dok je točka tališta kolin klorida 302 °C, a uree 133 °C (Zhang i sur., 2012). Generalna formula po kojoj se mogu opisati DES-ovi glasi:



Cat⁺ može biti bilo koji amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation, dok X predstavlja Lewisovu bazu, uglavnom halidne anione. Kompleksne anionske vrste mogu nastati između X⁻ i Lewisove ili Brønstedove kiseline koje označavaju Y (z se odnosi na broj Y molekula koje su u interakciji s anionom) (Smith i sur., 2014).

DES-ovi se po kemijskom sastavu mogu klasificirati u 4 skupine kao što je prikazano u tablici 1. Većina DES-ova koji su pripremljeni spada u prvu skupinu u koju spadaju kvarterne amonijeve soli i metalni kloridi, drugu skupinu čine kvarterne amonijeve soli i hidrati metalnih klorida, treću skupinu kvarterne amonijeve soli i donor vodika (uglavnom organske molekule kao što su amidi, karboksilne kiseline ili poliololi), a u četvrtu spadaju hidrati metalnih klorida i donori vodika (Smith i sur., 2014). Proučavajući timol – mentol sustav,

Abranches i sur. (2019) su predložili novu, petu skupinu, koju predstavljaju neionski DES-ovi. Uz pomoć COSMO-RS programa pokazali su da se i fenolni spojevi mogu koristiti za pripremu DES-ova. Najvažniji kriterij za formiranje takvog DES-a je da fenolni spoj nema centar za jako vezanje vodika niti jake aktivirajuće skupine u aromatskom prstenu. Druga komponenta u smjesi mora samo biti akceptor vodika. Prednost fenolnih DES-ova je što mogu povećati topljivost drugih fenolnih ili aromatskih spojeva formiranjem π - interakcija između otapala i otopljene tvari (Abranches i sur., 2019).

Ukoliko su DES-ovi pripremljeni od primarnih metabolita kao što su organske kiseline, aminokiseline, šećeri ili urea, tada se nazivaju prirodnim eutektičkim otapalima (engl. Natural Deep Eutectic Solvent, NADES). Prirodni proizvodi su idealan izvor za pripremu DES-ova zbog svoje kemijske raznolikosti i biorazgradivih svojstava (Dai i sur., 2013).

Tablica 1. Klasifikacija DES-ova (Smith i sur., 2014)

Skupina	Generalna formula	Objašnjenje kratica
I	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x \cdot y\text{H}_2\text{O}$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zRZ}$	Z = CONH ₂ , COOH, OH
IV	$\text{MCl}_x + \text{RZ} = \text{MCl}_{x-1}^+ \cdot \text{RZ} + \text{MCl}_{x+1}^-$	M = Al, Zn; Z = CONH ₂ , OH

DES-ove je jednostavno pripremiti, a metoda po kojoj će se pripremiti ovisi o osobnim preferencijama, dostupnosti opreme i sposobnosti da se smanji udio vode. Najčešći način pripreme uključuje zagrijavanje i miješanje sastavnica DES-a pri atmosferskom tlaku dok ne nastane homogena tekućina. Nije potrebno dodatno otapalo i ne odvija se reakcija u tradicionalnom smislu. Iskorištenje sinteze DES-a je 100% te ukoliko je priprema dobra, ne nastaju nusprodoti, te koraci pročišćavanja nisu potrebni, što potvrđuje da su ekonomski isplativa zamjena organskim otapalima i ionskim kapljevinama. Druge metode pripreme DES-ova uključuju sintezu u rotacionom vakuum uparivaču, mljevenje i liofilizaciju. U rotacionom vakuum uparivaču, sastavne komponente DES-a se otape u vodi, nakon čega višak vode ispari u vakuumu na 323 K. Konačna smjesa se drži u eksikatoru sa silika-gelom dok ne postigne konstantnu težinu. U metodi mljevenja dvije komponente se dodaju u mužar i melju dok ne nastane prozirna, homogena tekućina (Hansen i sur, 2020). U metodi liofilizacije otopina kolin klorida i uree u omjeru 1 : 2 s 5 % vode priprema se tako da se pomiješaju vodene otopine uree i kolin klorida. Takva otopina je liofilizirana s 77 K na 253 K dok ne nastane proziran, viskozni DES (Gutiérrez i sur., 2009).

Viskoznost otopina, gustoća i električna provodljivost i pH važna su fizikalno-kemijska svojstva DES-ova za industrijske procese. Gustoća DES-ova je za 20 % veća od gustoće vode (Craveiro i sur., 2016). Pri atmosferskom tlaku većina DES-ova su jako viskozne otopine, pogotovo oni čiji je donor vodika određeni šećer (npr. kolin klorid : glukoza, u omjeru 1 : 1, pri 323.15 K ima viskoznost 34 400 mPa s) ili koji sadrže metalne spojeve (npr. kolin klorid : ZnCl₂, u omjeru 1 : 2, pri 298.15 K iznosi 85 000 mPa s). No, postoje i DES-ovi čija viskoznost je manja od 500 mPa s, a oni sadrže etilen-glikol, fenol ili levulinsku kiselinu (García i sur., 2015). Na sobnoj temperaturi električna provodljivost DES-ova varira između 0.1 i 7 Ms cm⁻¹, ovisno o tipu sintetiziranog DES-a (Bagh i sur., 2013). Utjecaj na viskoznost imaju voda i temperatura. Dodatkom vode i povišenjem temperature viskoznost opada zbog slabljenja Van der Waalsovih sila i vodikovih veza što molekulama daje dovoljno kinetičke energije da prevladaju međumolekulske sile i počnu se slobodnije kretati. Iz istog razloga raste električna vodljivost te se smanjuje gustoća DES-ova (Zhao i sur., 2015).

2.2.1.1. Biorazgradivost i toksičnost eutektičkih otapala

Jedna od najvećih prednosti DES-ova je što se mogu sintetizirati od prirodnih materijala i mnogi ih organizmi mogu metabolizirati, što ih čini biokompatibilnima. U usporedbi s organskim otapalima i ionskim tekućinama, svojstvo biorazgradivosti DES-ova smanjuje nastanak potencijalno opasnih tvari za okoliš. Zato se i smatraju ekološki prihvatljivim i zelenim otapalima (Liu i sur., 2018). Radošević i sur. (2015) su među prvima testirali biorazgradivost DES-ova. Primjenom testa u zatvorenoj boci, određena je aerobna biorazgradivost 3 odabrana DES-a. Prema OECD 301 D smjernicama sva tri DES-a su lako biorazgradiva, a najbolji stupanj razgradivosti imao je kolin klorid : glicerol (ChCl : Gly), zatim kolin klorid : glukoza (ChCl : Glc) te konačno, kolin klorid : oksalna kiselina (ChCl : OxA). U drugom istraživanju ispitana je biorazgradivost kolin kloridnih i kolin acetatnih otapala i rezultati su pokazali da su samo 2 kolin kloridna otapala lako razgradiva. Uzroci loših rezultata za ostala otapala mogu biti reakcijski uvjeti, izvor mikroorganizama iz otpadnih voda ili molarni omjeri korištenih DES-ova (Wen i sur., 2015).

Toksičnost kolinijevih DES-ova na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama ispitali su Hayyan i sur. (2013a), a rezultati su pokazali da odabrani DES-ovi ne inhibiraju rast bakterija i stoga nisu toksični. Isti eksperiment proveden je koristeći iste donore vodika (glicerol, etilen-glikol i trieten-glikol), ali kao akceptor vodika su korišteni spojevi na bazi fosfonija. U ovom slučaju je došlo do inhibicije rasta bakterija što pokazuje da određeni DES-

ovi imaju antibakterijska svojstva. Na temelju toga može se zaključiti da akceptor vodika u sintetiziranom DES-u ima važnu ulogu u tome hoće li otapalo biti toksično ili ne (Hayyan i sur., 2013b). Kasnija istraživanja su pokazala da osim akceptora vodika na toksičnost DES-a utječe i donor vodika ukoliko je on određena kiselina (de Moraes i sur., 2015; Zhao i sur., 2015). Radošević i sur. (2018) su ispitali toksičnost kolin klorida (ChCl), betaina (B) i limunske kiseline (CA) kao HBA i razne HBD poput organskih kiselina, šećera, aminokiselina i amida na bakterijama (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*). Rezultati su pokazali da svi NADES-i osim ChCl : Xylol, ChCl : Sol i B : Glc inhibiraju rast bakterija i da najveću sposobnost inhibicije imaju NADES-i sa CA.

Citotoksičnost (NA)DES-a ispitana je na mnogim životinjskim, humanim i tumorskim staničnim linijama. Kolinjeva eutektička otapala s glukozom, glicerolom i oksalnom kiselinom kao donorom vodika testirana su na staničnoj liniji ribe (CCO) i staničnoj liniji humanog karcinoma dojke (MCF-7). Kolin klorid : oksalna kiselina je pokazao blagu toksičnost prema obje stanične linije, dok su ostala dva DES-a netoksična. Uzrok blage toksičnosti može biti pad pH vrijednosti medija zbog dodatka kiseline ili nastanak kristala kalcijevog oksalata uočenog promatranjem morfologije stanica pod mikroskopom (Radošević i sur., 2015). Macário i sur. (2019) ispitali su djelovanje 3 akceptora vodika (ChCl, [N₁₁₁₁]Cl i [N₄₄₄₄]Cl) i različitih donora vodika (etilen-glikol, urea, butanska kiselina, kapronska kiselina i propan-1-ol) na stanicama kože (keratinocitima HaCaT i tumorskim melanocitima MNT-1). ChCl i [N₁₁₁₁]Cl sintetizirani DES-ovi su pokazali dobru biokompatibilnost i netoksičnost prema obje stanične linije, dok su DES-ovi bazirani na [N₄₄₄₄]Cl bili toksični te je testiranjem svakog zasebnog spoja pokazano da je akceptor vodika zaslužan za takav rezultat. Uz navedeno, dokazano je i da spojevi poput ChCl, uree, etilen-glikola i svi DES-ovi sintetizirani s ChCl i [N₁₁₁₁]Cl potiču povećanje viabilnosti HaCaT stanica pa bi te molekule mogle biti ključne u daljnjim istraživanjima regeneracije kože.

2.2.1.2. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva

Biljni produkti su bogat izvor mikronutrijenata i biološki aktivnih spojeva koji se sastoje od fitokemikalija poput dijetalnih vlakana, karotenoida, vitamina i polifenola (Samtiya i sur., 2021). Cilj svake ekstrakcije je postići što veći prinos. Za uspješnu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva pomoću NADES-a potrebno je odabrati i fino podesiti fizikalno-kemijske karakteristike NADES-a, odabrati i optimizirati metodu ekstrakcije i ukoliko je potrebno

odvojiti ciljne molekule od otapala. Sposobnost ekstrakcije NADES-a varira zbog njihovih jedinstvenih svojstava pa je često potrebno isprobati razne kombinacije kako bi se pronašao prikladni NADES (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Fizikalno-kemijska svojstva NADES-a koja utječu na uspješnost ekstrakcije su polarnost, pH, viskoznost i dr. (Dai i sur., 2013).

Za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz pokožice grožđa Radošević i sur. (2016) su ispitali NADES-e različitih pH vrijednosti i polarnosti. Korišteni NADES-i su bili bazirani na kolin kloridu s organskih kiselinama, koji su polarniji i imaju nižu pH vrijednost te šećerima i polialkoholima, čija polarnost je bliža metanolu i pH vrijednost im je viša od 6. Rezultati su pokazali da NADES-i s organskim kiselinama dobro ekstrahiraju antocijane, dok je za druge fenolne spojeve bolje izabrati NADES sa šećerima. Učinkovitost ekstrakcije može se poboljšati optimizacijom udjela vode u NADES-u. Dodatkom vode smanjuje se viskoznost NADES-a, čime se postiže bolji prijenos mase i posljedično povećava učinkovitost ekstrakcije. Za ekstrakciju polifenolnih spojeva optimalan udio vode je 20 – 30 % (Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Uspješnost ekstrakcije katehina iz *Camellia sinensis* Li i sur. (2015) su ispitali kolin klorid : mliječnom kiselinom (ChCl : LA) u molarnim omjerima od 1 : 1 do 1 : 4. Uočen je porast ekstrahiranih katehina kod omjera 1 : 2 u odnosu na 1 : 1, dok je u ostalima uspješnost ekstrakcije manja u odnosu na 1 : 2. ChCl : LA u omjeru 1 : 4 ekstrahirao je 30 % manje katehina od otapala u omjeru 1 : 2.

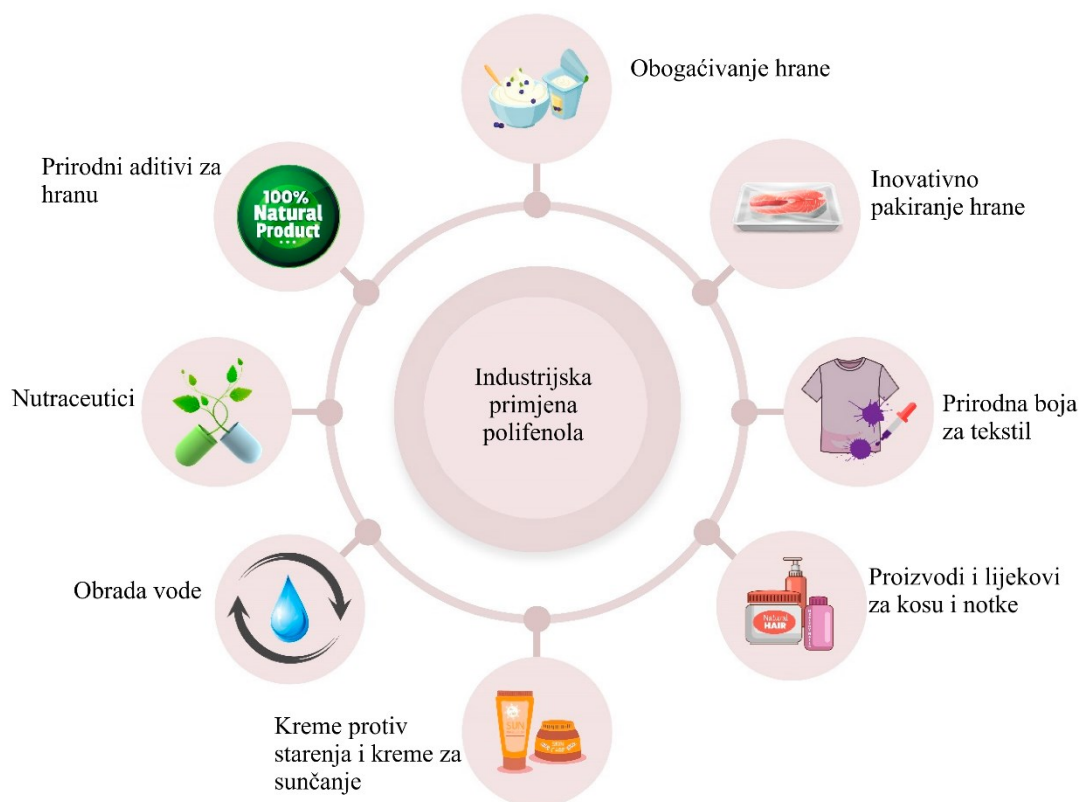
2.3. GROŽĐE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA

2.3.1. Grožđe kao izvor polifenola

Grožđe (*Vitis vinifera* L.) među najčešće je proizvedenim usjevima u svijetu. Približno 75 milijuna tona je godišnje proizvedeno, od toga 41 % u Europi, 29 % u Aziji i 21 % u Sjedinjenim Američkim Državama. Bere se u umjerenim područjima gdje je klima okarakterizirana toplim ljetom i blagom zimom. Otprilike 50 % ubranog grožđa se koristi za proizvodnju vina, jedna trećina se koristi za svježi sok dok se ostatak prerađuje kako bi se dobili prehrambeni proizvodi poput pekmeza, grožđica, octa i soka. Grožđe je voća iznimno bogato ugljikohidratima (17 g/100 g), ima puno kalorija (65 kcal/100 g) i relativno nizak glikemijski indeks. Osim što je izuzetan izvor mangana i kalija, grožđe je također izvor vitamina B6, C, tiamina i jedan je od najbogatijih izvora polifenola (Unusan, 2020).

Prehrambeni i poljoprivredni otpad je rastući problem, koji, ako se pravilno ne riješi, može imati negativan utjecaj na ekonomiju, okoliš i ljudsko zdravlje. S obzirom na to da se taj

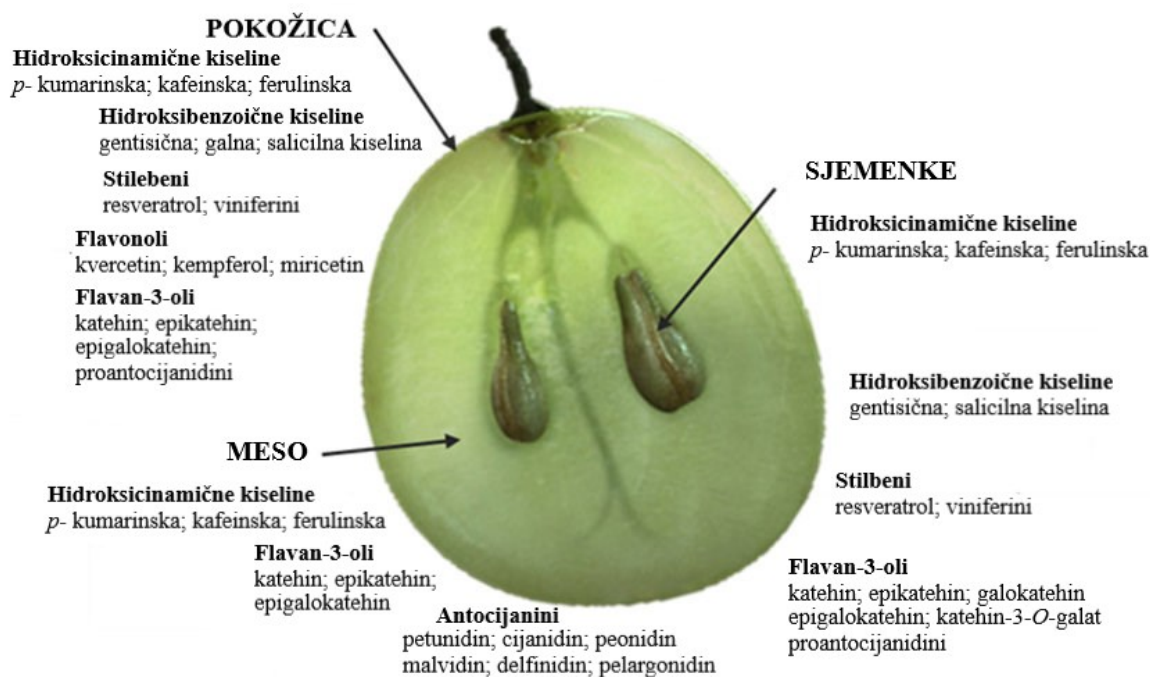
otpad ne može izbjeći, kako nalaže 4. načelo zelene ekstrakcije, konceptom biorafinerije se otpad može iskoristiti za dobivanje novih bioproizvoda. Proizvodnjom vina nastaju nusprodukti lako iskoristivi za nove industrije (Lucarini i sur., 2018). Najvažniji nusprodukt je komina, koja čini 20 % ukupne težine grožđa. Komina se sastoji od pokožice, sjemenke, zaostale pulpe i stabljike. Sjemenke čine do 50 % mase komine, a pokožica oko 10 %. Dodatnom obradom sjemenki i pokožice mogu se dobiti biološki aktivni spojevi, najčešće polifenoli, koji se mogu primijeniti u farmaceutskim, prehrambenim i kozmetičkim proizvodima kao što je prikazano na slici 3 (Bordiga i sur., 2019). Osim primjene u industriji, polifenoli se primjenjuju i u medicini jer štite organizam od kardiovaskularnih bolesti i hipertenzije, djeluju protuupalno, smanjuju rizik od dijabetesa i imaju antitumorsko djelovanje (Durazzo i sur., 2019).



Slika 3. Industrijska primjena polifenola (prema Câmara i sur., 2021)

Kao što je već spomenuto, polifenoli su najzastupljeniji biološki aktivni spojevi u grožđu. To su sekundarni biljni metaboliti koji obuhvaćaju preko 8000 fenolnih spojeva. Polifenoli posjeduju antioksidativna, antibakterijska i antitumorska svojstva koja pozitivno utječu na zdravlje, zacjeljuju rane i djeluju na imunološki sustav. Osim toga, oni su odgovorni i za

kiselost, boju, miris, okus i oksidativnu stabilnost grožđa (Khan i sur., 2019). Polifenoli su spojevi koji imaju više od jedne fenolne hidroksilne grupe vezane za jedan ili više benzenskih prstenova. Klasificiraju se prema broju fenolnih grupa koje sadrže i strukturnim elementima vezanim na prstenove. Prema tome se dijele na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane. Najbrojnija i najviše istraživana skupina su flavonoidi. S obzirom na molekularnu strukturu, flavonoidi se mogu podijeliti u sedam podskupina: flavone (apigenen, luteolin), flavanone (hesperidin, naringenin), flavonole (kampferol, kvercetin), izoflavone (genistein, glicitein), antocijanidine/antocijane (cijanidini, delfinidini), flavanole (katehini i procijanidini) te čalkone (Brenes i sur., 2016, Manach i sur., 2004). Slika 4 prikazuje raspodjelu polifenola ovisno o dijelu grožđa. Najzastupljenija skupina u grožđu su flavanoli. U pokožici i sjemenkama se nalaze katehin, epikatehin, epikatehin-3-galat i galokatehin. Na sadržaj polifenola u grožđu utječe vrsta i stupanj zrelosti grožđa, zemljopisni i klimatski uvjeti, tlo i postupci uzgoja (Unusan, 2020).



Slika 4. Raspodjela polifenola u grožđu (prema Cosme i sur., 2018)

2.3.2. Primjena polifenola u kozmetičkoj industriji

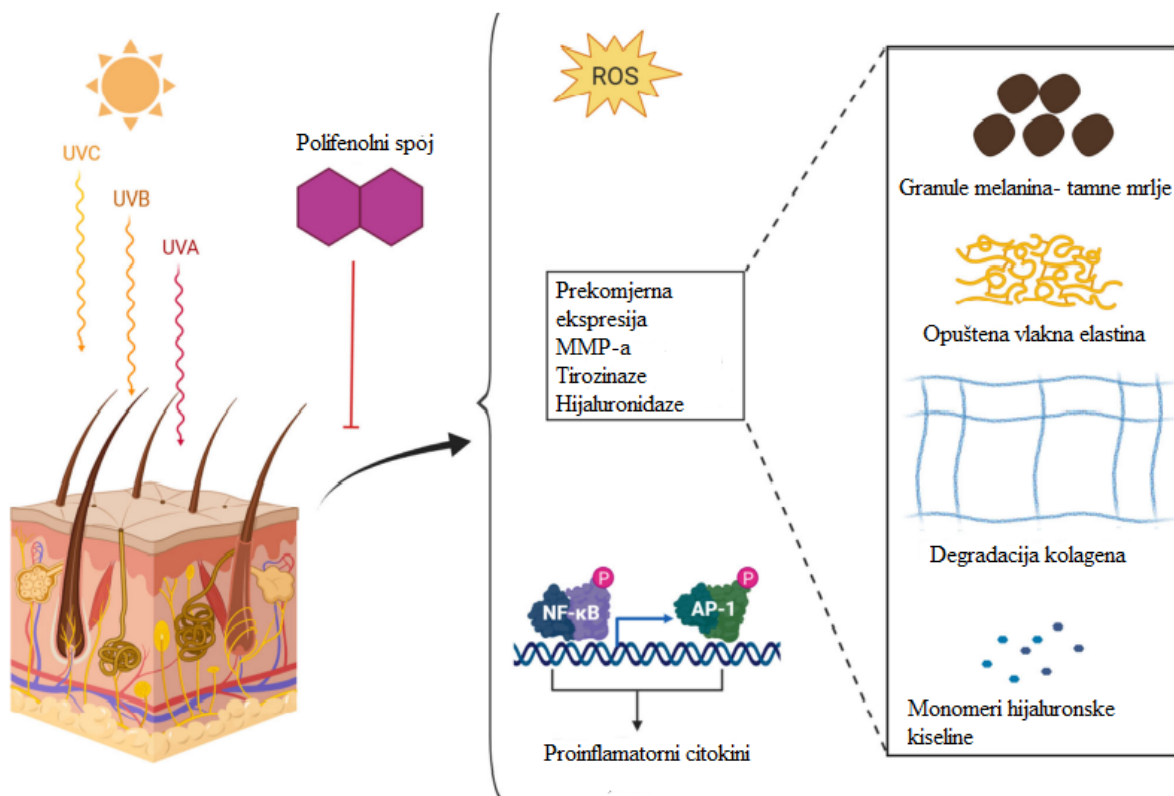
Važnost polifenolih spojeva u kozmetičkoj industriji i dermatologiji uglavnom se temelji na njihovom antioksidacijskom potencijalu. Primjena antioksidansa u kozmetici smanjuje

oksidativna oštećenja, čineći dobru alternativu u terapiji i prevenciji uranjenog starenja. Polifenoli također imaju fotozaštitno i protuupalno djelovanjem i time pomažu u liječenju osjetljive kože ili kože izložene suncu. Antioksidansi se dodaju u kozmetičke pripravke kako bi spriječili ili umanjili oksidativno propadanje aktivnih sastojka i uljnih sadržaja u formulaciji (de Lima Cherubim i sur., 2020).

Oksidativni stres je potaknut viškom kisikovih reaktivnih čestica (ROS). U normalnim uvjetima endogeni antioksidacijski sustav kože, koji se sastoji od enzimskih i neenzimskih antioksidansa, vrlo je učinkovit. No, kad se organizam izloži oksidativnom stresu, učinkovitost endogenog antioksidacijskog sustava je smanjena. Tada ROS-ovi potiču kaskadu reakcija koje rezultiraju prekomjernom ekspresijom određenih gena koji reguliraju metabolizam kolagena. Posljedično može doći do prekomjerne ekspresije metaloproteinaza (MMP), od kojih je jedna kolagenaza (Slika 5). Ekspresija se događa u epidermalnim keratinocitima i dermalnim fibroblastima, stoga su ti slojevi kože podložni oštećenjima koje može rezultirati preranim starenjem ili tumorom (Zillich i sur., 2015). Mohd Maidin i sur. (2018) dokazali su da polifenolni ekstrakti crvenog grožđa (u najvećoj mjeri kamferol, kvercetin i galna kiselina) inhibiraju aktivnost kolagenaze. Elastaza je još jedan enzim odgovoran za starenje kože jer smanjuje količinu elastina u koži. Inhibicija elastaze ovisi o Van der Waalsovima interakcijama i vodikovim vezama između enzima i inhibitora, stoga fenoli s većim brojem potencijalnih mjesta za interakciju, uključujući aromatske prstene za Van der Waalsove interakcije i hidroksilne skupine za vezanje vodika, imaju velike šanse inhibirati ovaj enzim (Matos i sur., 2019). Wittenauer i sur. (2015) su testirali inhibitorni efekt polifenola iz komine grožđa na kolagenazu i elastazu. Rezultati su pokazali da frakcije s galnom kiselinom, katehinom i procijanidinom inhibiraju aktivnost oba enzima te stoga imaju potencijal za kozmetičku primjenu. Uz starenje, u koži se pojavljuju poremećaji pigmentacije, što je privuklo pozornost kozmetičke industrije i dovelo do potrage za spojevima s potencijalom za borbu protiv hiperpigmentacije. Pigmentacijske promjene koje se javljaju rezultat su nakupljanja melanina pa je potrebno pronaći spojeve koji inhibiraju prekomjernu proizvodnju melanina. S obzirom na to da je enzim tirozinaza ključan u sintezi melanina (slika 5), za razvoj kozmetičkih proizvoda koji posvjetljuju kožu potrebno je pronaći molekule koje inhibiraju tirozinazu. Aromatskom strukturom polifenoli slični tirozinu, supstratu tirozinazi pa mogu djelovati kao kompetitivni inhibitori (Matos i sur., 2019). Katehini, kvercetin i kamferol su detektirani kao učinkoviti inhibitori tirozinaze (Mukherjee i sur., 2018). Emulzija s ekstraktom sjemenki grožđa je testirana *in vivo* kako bi se vidio utjecaj na koži. Mjereći udio melanina, sebuma i elastičnost, emulzija je pokazala pozitivan efekt na

izgled kože u usporedbi s placebo. Tijekom testiranja nisu zabilježeni slučajevi preosjetljivosti kože, stoga bi se krema na bazi grožđa mogla sigurno i učinkovito primjenjivati u poboljšanju raznih stanja kože (Sharif i sur., 2015).

Ultraljubičasto zračenje Sunca smatra se glavnim uzrokom fotostarenja ljudske kože. Polifenolni spojevi mogu apsorbirati ultraljubičasto zračenje zbog prisutnosti kromofora u svojoj strukturi. Na taj način sprječavaju prodiranje štetnog Sunčevog zračenja u kožu i smanjuju štetne učinke oksidativnog stresa nakon izlaganja Suncu. Flavonoidi i stilbeni imaju visoku UV apsorpciju s faktorom zaštite od Sunca (SPF) u rasponu od 7 do 29 (de Lima Cherubim i sur., 2020). Potapovich i sur. (2013) su dokazali da predtretman epidermalnih stanica keratinocita polifenolnim ekstraktima smanjuje nastajanje slobodnih radikala i posljedično sprječava oštećenje DNK. Protuupalni citokini inducirani UV-zračenjem, posredovani proteinskim kompleksom NF- κ B imaju ključnu ulogu u fotostarenju kože, stoga su to ciljne molekule za istraživanje (slika 5). UVA i UVB ozračene stanice keratinocita tretirane su derivatom katehina i mjerena je nuklearna translokacija NF- κ B i proupalnog citokina, interleukina-6 (IL-6). Rezultati su pokazali da derivat katehina inhibira translokaciju navedenih molekula pa se može zaključiti da odabrani polifenol inhibira proinflamatorni put induciran UVA i UVB zračenjem keratinocita. Na temelju toga, derivat katehina se može dodavati u kozmetičke proizvode kako bi se spriječilo fotostarenje kože (Xia i sur., 2005).



Slika 5. Posljedice UV-zračenja i ROS-a na stanice kože (prema Dias i sur., 2021)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sjemenke i pokožica

Pri izradi ovog rada korištena je pokožica hrvatske autohtone sorte grožđa *Vitis vinifera* cv. Graševina, dobivena od Kutjevo d.d. i njene sjemenke. Sjemenke i pokožica su liofilizirane tijekom dva dana, zatim mljevene i pohranjene 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'-Diklorofluorescin 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-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetrioksifenil)-2-(4sulfofenil)2H-tetraoilij], 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

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a voda korištena u sintezi eutektičkih otapala i pripravi otopina bila je destilirana voda PBF-a.

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. 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, Agilent1200 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, GENESYSTM10S, 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

3.1.5. Stanične linije

U ovom radu korištena je stanična linija HaCaT humanih keratinocita, dobivena iz Cell Lines Service GmbH (CLS), Eppelheim, Njemačka. HaCaT je transformirana aneuploidna stanična linija imortalnih keratinocita izoliranih iz kože odraslog čovjeka. Koristi se u raznim *in vitro* ispitivanjima jer dobro izražava karakteristike humanih keratinocita uz visoku sposobnost diferencijacije i proliferacije. HaCaT stanice su adherentne te se uzgoj vrši u Petrijevim zdjelicama za kulture stanica. Optimalni uvjeti održavanja HaCaT stanične linije su 37 °C i atmosfera koju čini 95 % zraka i 5 % CO₂. Za rast je korišten *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) s 5 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 1 % (v/v) antibiotika/antimikotika.

3.2 METODE RADA

3.2.1. Procjena topljivosti polifenola u eutektičkim otapalima pomoću COSMO_{therm} programa

Model COSMO-RS (*Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) primjenjuje se za računalno predviđanje eutektičke točke otapala i topljivosti komponenata u eutektičkom otapalu kao jedna od najtočnijih računskih metoda *ab initio*. Za primjenu COSMO-RS-a potrebno je 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 programom 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. Metodama 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} prvo je potrebno unijeti .cosmo datoteke molekula koje želimo ispitati i 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*, a zatim *Activity Coefficient*. Nakon toga se upiše temperatura pri kojoj se ispituje topljivost i sastav smjese, odnosno udio akceptora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), donora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) i ispitivane tvari.

Zadnji korak je naredba *Add* i *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 i obrnuto. Ispitana je topljivost katehina u 47 NADES-a prikazanim u tablici 2.

Tablica 2. Molarni omjeri NADES-a u kojima je testirana topljivost katehina pomoću COSMOtherm programa

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 : Xyl	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 : Sor	1 : 1	CA : Fru	1 : 1
ChCl : Sol	1 : 1	Me : Ty	3 : 2
ChCl : Glc	1 : 1	CA : Glc	1 : 1
ChCl : Gly	1 : 2	Me : C8	1 : 1
ChCh : Ma	1 : 1	Me : C10	1 : 1
ChCl : OxA	1 : 1	Ty : Cou	3 : 2
Fru : EG	1 : 2	Me : C18 : 2	1 : 1
Sor : EG	1 : 2	Ty : C8	1 : 3
Sol : EG	1 : 2	Ty : C10	1 : 1
Glc : EG	1 : 2		

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: etilen-glikol, 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.

3.2.2. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES-a)

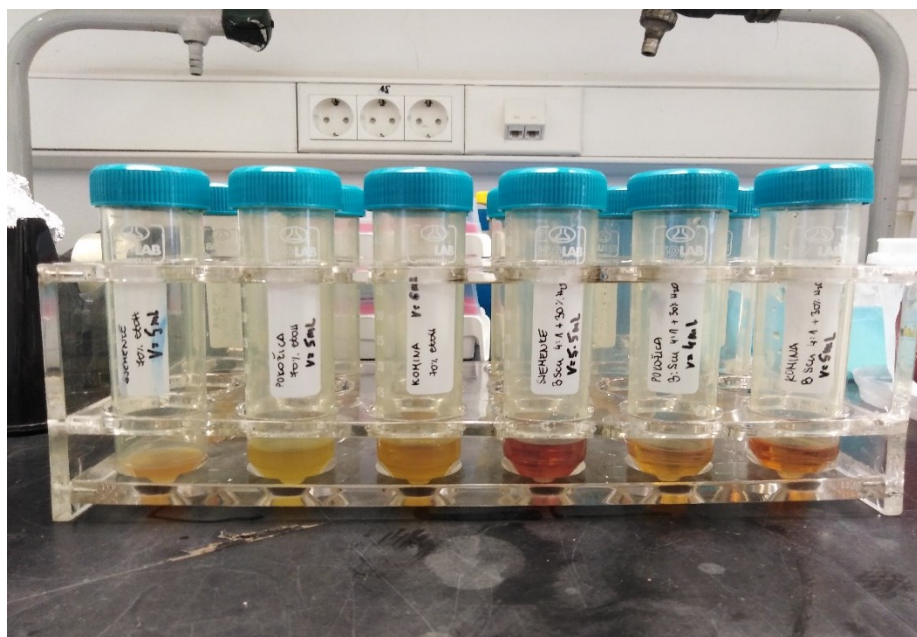
Eutektička otapala sintetizirana su u tikvicama s okruglim dnom. Prema određenim omjerima (tablica 3) izračunata je masa komponenata otapala i dodana u tikvice, a zatim je dodano 30 % vode. Tikvica sa smjesom je zatim stavljena na elektromagnetsku miješalicu te je pri temperaturi 50 °C miješana kroz 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 sljedećeg korištenja.

Tablica 3. Molarni omjeri korištenih NADES-a i udjeli vode

NADES	Kratica	Molarni omjer	Udio vode
Betain : etilen-glikol	B : EG	1 : 3	30 %
Betain : glukoza	B : Glc	5 : 2	30 %
Betain : saharoza	B : Scu	4 : 1	30 %

3.2.3. Priprema ekstrakata sjemenki i pokožice grožđa

Za pripremu ekstrakata korištene su liofilizirane sjemenke i pokožica grožđa koje su prvo usitnjene sjeckalicom i u mužaru. Zatim je odvagano 0,5 g sjemenki i 0,5 g pokožice za svaki ekstrakt i svakome je dodano 10 mL pripremljenih NADES-a. Za usporedbu je korišteno i klasično otapalo za ekstrakciju - 70 %-tni etanol. Također je odvagano 0,5 g sjemenki i 0,5 g pokožice kojima je dodano 10 mL 70 %-tnog etanola. Ekstrakcija je provedena tijekom 50 minuta pri temperaturi od 60 °C u ultrazvučnoj kupelji kako bi bila brža i uspješnija. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakti su preko noći filtrirani preko filter papira u Falcon epruvete, a potom čuvani na 4 °C do iduće upotrebe (Slika 6).



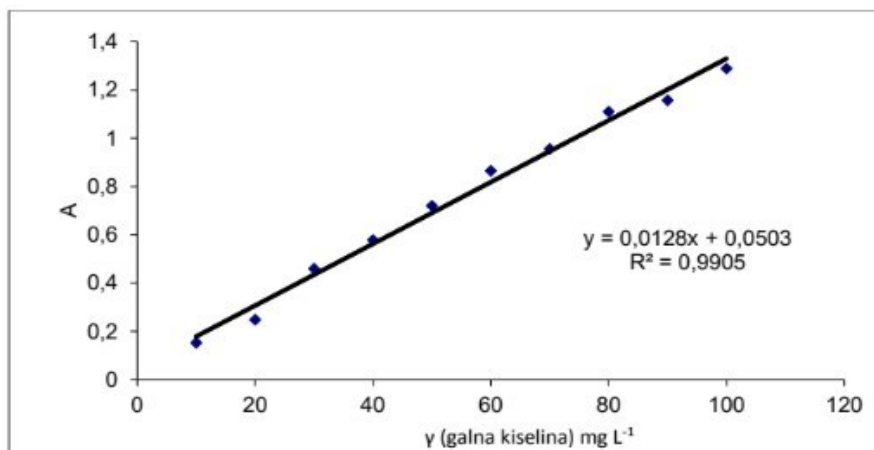
Slika 6. Ekstrakti nakon filtracije (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolfrahove i fosfomolibdenove kiseline koje pri oksidaciji fenola reduciraju u plavo obojeni volframov i molibdenov oksid. Nastalo obojenje je proporcionalno udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom ekstraktu.

Pripremljene ekstrakte bilo je potrebno razrijediti 50 puta destiliranom vodom, osim ekstrakta pokožice u 70 %-tnom etanolu koji je razrijeđen 25 puta. Otpipetirano je 0,25 mL razrijeđenog ekstrakta u epruvetu i dodano je 1,25 mL FC reagensa, prethodno razrijeđenog 10 puta. Reakcija se odvijala 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je dodan 1 mL Na_2CO_3 . Epruveta je zatim stavljena na termostatanje u vodenu kupelj 5 minuta na 50 °C. Reakcija je zaustavljena vađenjem epruvete iz vruće kupelji i stavljanjem u hladnu kupelj. Zatim je slijedilo mjerenje apsorbancije na UV/Vis spektrofotometru pri $\lambda=760$ nm (Ainsworth i Gillespie, 2007). Slijepa proba je pripremljena na isti način samo je umjesto uzorka dodana destilirana voda. Sva mjerenja su provedena u tri paralele.

Ukupni polifenoli izračunati su kao ekvivalenti galne kiseline. Izračunate su srednje vrijednosti tri mjerene paralele i te su vrijednosti apsorbancije uvrštene 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 7.



Slika 7. Baždarni pravac ovisnosti koncentracije galne kiseline o apsorbanciji (Šango, 2017)

Pri izračunu vrijedi:

$$Y = ax + b \quad [2]$$

$$Y = 0,0128x + 0,0503, R^2 = 0,9905$$

Y – apsorbancija pri 760 nm, x – koncentracije galne kiseline (mg mL⁻¹)

Konačni rezultati su izraženi kao miligram polifenola po gramu suhe tvari biomase.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Određivanje ORAC (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*) vrijednosti je metoda koja se temelji na inhibiciji peroksil radikala. Kao izvor peroksil radikala (ROO·) koristi se AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid)dihidroklorid), dok je standard Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina). Peroksid radikal oksidira fluorescein i dolazi do pada intenziteta fluorescencije ili njenog nestanka. Ukoliko je u uzorku prisutan antioksidans poput polifenola, inhibira se djelovanje radikala i oksidacija fluoresceina, što rezultira sporijim padom fluorescencije (Cao i sur., 1993).

Ekstrakti sjemenki u eutektičkom otapalu i etanolu razrijeđeni su 1600 puta, a ekstrakti pokožice 600 puta. U epruvetu je dodano 0,375 mL razrijeđenog uzorka i 2,250 mL fluoresceina i otopina je termostatirana u vodenoj kupelji 30 minuta pri 37 °C. Nakon toga je dodano 0,375 mL AAPH otopine i mjerena je promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu do spuštanja na nulu. Slijepa proba je pripremljena na isti način, ali je umjesto uzorka dodano 0,375 mL fosfatnog pufera (0,075 M). Standard Trolox se također priprema na isti

način; 0,375 Trolox-a (500 μ M) umjesto uzorka. Mjerenje je izvedeno na spektrofluorimetru pri temperaturi od 37 °C uz $\lambda_{\text{eks.}}=485$ nm i $\lambda_{\text{em.}}=520$ nm.

Relativna ORAC vrijednost računa se prema idućim jednadžbama:

$$\text{relativna ORAC vrijednost} = \left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}} \right) * k * a * h \quad [3]$$

$$AUC = 0,5 + \left(\frac{R_2}{R_1} \right) + \left(\frac{R_3}{R_1} \right) + \dots + \left(\frac{R_n}{R_1} \right) \quad [4]$$

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
- $h = \frac{V_{\text{uzorka}}}{m_{\text{sjemenki/pokožice}}}$

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

3.2.6. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata na HaCaT staničnoj liniji

3.2.6.1. Uzgoj HaCaT stanične linije i određivanje broja stanica

HaCaT stanice su uzgajane u Petrijevim posudama i održavane u eksponencijalnoj fazi rasta. Nakon tripsinizacije stanica u eksponencionalnoj fazi rasta stanice su izbrojane u komorici za brojanje te je izračunat volumen suspenzije stanica potreban za postavljanje pojedinačnog pokusa. Inverznim mikroskopom pratilo se prihvaćanje stanica za podlogu te njihova morfologija, kao i moguća pojava kontaminacije. Kako bi se spriječila kontaminacija u radu s kulturama stanica potrebno je primjenjivati i pridržavati se pravila aseptične tehnike rada.

Za postavljanje eksperimenta stanicama je najprije uklonjen medij, isprane su PBS puferom, a zatim su tretirane s 1 mL tripsina kako bi se odvojile od površine Petrijevih posuda. Tretirane stanice su zatim inkubirane 5 - 10 minuta na 37 °C, a djelotvornost tripsina provjeravala se pod inverznim mikroskopom. Ukoliko je odvajanje od površine posuda 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 tripan plavo, a stanice su zatim izbrojene u Neubauerovoj komorici (slika 8) pod svjetlosnim mikroskopom, gdje se mrtve stanice razlikuju od živih po tome što su plave boje. Stanice se broje se u sva 4 velika kvadrata komorice, od kojih je svaki sastavljen od 16 manjih kvadrata (slika 8).

Koncentracija stanica u mL suspenzije računa se prema jednadžbi:

$$\text{broj stanica mL}^{-1}\text{suspenzije} = (N_1 + N_2 + N_3 + N_4) * 5000 \quad [5]$$

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



Slika 8. Prikaz Neubauerove komorice (lijevo) i kvadrata za brojanje stanica (desno)
(Anonymous, 2021)

3.2.6.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

MTS je kolorimetrijska metoda koja se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima, za određivanje antitijela koja inhibiraju rast te za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva. Reagens koji se koristi sastoji se od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolij] i PES-a (fenazin etosulfat). PES služi kao komponenta za prijenos elektrona s NADH u citoplazmi na tetrazolijevu sol. Pri tom dolazi do redukcije tetrazolijeve soli u mediju i nastaje topljivi produkt formazan. Formazan je obojeni produkt, a njegov je intenzitet obojenja proporcionalan broju živih stanica u uzorku.

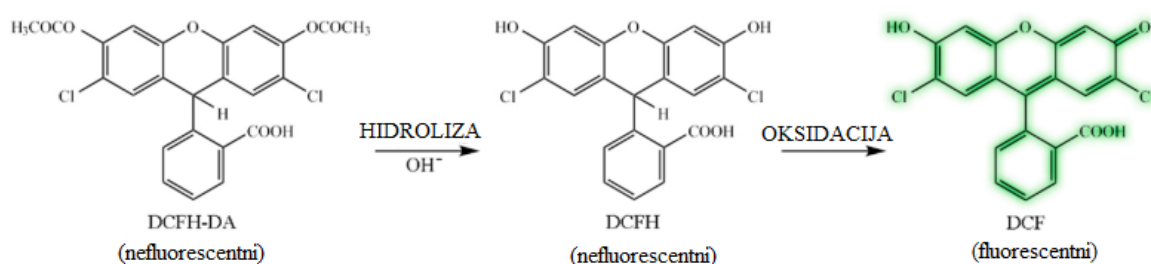
Ploče s 96 jažica naciepljene su sa 100 μL suspenzije stanica koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} te su inkubirane tijekom 24 sata kako bi se prihvatile za podlogu. Nakon 24 sata od naciepljivanja stanica na ploče, stanice su tretirane pripremljenim ekstraktima sjemenki i pokožica grožđa. Odabran je ekstrakt sjemenki BEG, pokožice BGlc i etanolni ekstrakti za usporedbu. Ekstrakti su prije tretiranja stanica sterilno profiltrirani kroz 0,22 μm filtere. Korišteni ekstrakti dodani su u volumnom omjeru 0,5 %, 1,5 %, 2,5 % i 5 % (v/v) sterilnog ekstrakta na 100 μL suspenzije stanica. Eksperiment je izveden u 4 paralele, a kontrolu su činile netretirane stanice. Stanice su zatim inkubirane 72 sata na 37 °C, nakon čega je u sve jažice dodano 10 μL 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:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ uzorka}}{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ kontrole}} * 100 \quad [6]$$

3.2.6.3. Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta pomoću DCFH-DA metode

Reaktivne kisikove vrste određivane su DCFH-DA metodom. Princip metode bazira se na ulasku diacetatne forme 2'7'-diklorodihidrofluoroscein diacetata (DCFH-DA) u stanicu gdje ga nespecifične esterase hidroliziraju dajući DCFH koji zaostaje u stanici (Gomes i sur., 2005). Nastali DCFH unutar stanice oksidiraju eventualno prisutni intracelularni oksidansi, pri čemu nastaje fluorescentni DCF čiji se intenzitet fluorescencije mjeri na spektrofotometru pri $\lambda_{ex}=485$ nm i $\lambda_{em}=530$ nm (slika 9).



Slika 9. Prikaz hidrolize i oksidacije DCFH-DA u fluorescentni spoj (prema Yu i sur., 2021)

Crne ploče s 96 jažica nacijepljene su suspenzijom stanica koncentracije 1×10^5 stanica mL^{-1} . Ploče sa stanicama inkubirane su tijekom 24 sata kako bi se stanice prihvatile za podlogu. Nakon 24 sata stanice su tretirane ekstraktima sjemenki BEG, pokožice 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 24 sata na 37°C . Nakon predtretmana stanica ekstraktima, u stanicama je potaknut oksidativni stres dodatkom vodikovog peroksida ($100 \mu\text{M}$). Stanice su zatim inkubirane 3 sata na 37°C . Po isteku navedenog vremena stanicama je uklonjen medij, dva puta su isprane PBS puferom i dodano im je $100 \mu\text{L}$ otopine DCFH-DA tako da koncentracija fluorescentnog supstrata 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. Ostatak stanica tretiranih ekstraktima podijeljen je u dvije skupine: one koje su tretirane 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 °C kroz 30 minuta, nakon čega je na spektrofluorimetru s čitačem ploča mjerena fluorescencija pri $\lambda_{\text{ex}}=485\pm 10$ nm i $\lambda_{\text{em}}=530\pm 10$ 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.

$$\% \text{ ROS (u odnosu na kontrolu)} = \frac{\text{srednja vrijednost A uzorka}}{\text{srednja vrijednost A kontrole}} \quad [7]$$

3.2.7. Određivanje polifenola u sjemenkama i pokožici grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u ekstraktima sjemenki i pokožice 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 4.

Tablica 4. Uvjeti kromatografske analize polifenola u ekstraktima pokožice i sjemenki 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		
Vrijeme analize(min)	25			
Temperatura (°C)	40			
Protok (mLmin⁻¹)	1			
Volumen injektiranja (μL)	15			
Eluiranje	Gradijentno	Vrijeme (min)	Otapalo	
			A %	B %
		0,00	90,00	10,00
		7,50	85,00	15,00
		15,00	73,00	27,00
		25,00	90,00	10,00

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.

3.3. OBRADA REZULTATA

Sva mjerenja provedena su u paralelama. Rezultati su prosječne vrijednosti dva ili više mjerenja, ovisno o pokusu, i izračunati su prema izrazu:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [8]$$

S pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [9]$$

Gdje je n ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačna vrijednost uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

S obzirom na sve veći problem zagađenja okoliša i negativnih posljedica koje ostavlja na prirodu i ljudsko zdravlje, okretanje zelenom načinu razmišljanja jedan je od načina kako umanjiti taj problem. Znanstvena zajednica već desecima godina aktivno pronalazi rješenja kojima zelene principe možemo uklopiti u industrijske procese. Za ekstrakcije je bilo ključno pronaći adekvatnu zamjenu za organska otapala, a (NA)DES-i su se, kao jeftina, netoksična i biorazgradiva otapala, nametnuli kao idealan izbor. Jedan od zagađivača okoliša je i otpad iz prehrambene industrije. Nakon proizvodnje vina zaostaju nusprodukti bogati biološki aktivnim spojevima. Iskorištenjem tih nusprodukata mogu se dobiti vrijedni ekstrakti koji mogu biti primijenjeni u prehrambenoj, farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji.

Betain je komponenta koja je korištena u sintezi sva tri DES-a u ovom radu. Prirodno je prisutan u ljudskom tijelu, nastaje reakcijom oksidacije kolina u bubrežima i jetri i glavna funkcija mu je osmoregulacija, ali ima ulogu i u imunološkom sustavu i boljoj toleranciji na stres (Attia i sur., 2019; Ueland, 2011). Glukoza je najvažniji ugljikohidrat u metabolizmu, a saharoza šećer, disaharid koji se hidrolizom cijepa na glukozu i fruktozu koji se dalje metaboliziraju.

Za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz sjemenki i pokožice grožđa sorte Graševina, izabrana su 3 otapala koja su računalnom analizom pokazala veliku topljivost odabranih komponenti. Za usporedbu je korišteno i konvencionalno otapalo, 70 %-tni etanol. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji tijekom 50 minuta pri temperaturi od 60 °C. U svih 8 ekstrakata (sjemenke: BGlc, BEG, BScu, EtOH i pokožica: BGlc, BEG, BScu, EtOH) je određen ukupan sadržaj polifenola Folin-Ciocalteu reagensom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-om). Antioksidacijski kapacitet za sve ekstrakte je određen ORAC metodom. Za *in vitro* ispitivanje biološke aktivnosti na HaCaT staničnoj liniji izabrani su ekstrakti s najvećim udjelom polifenola (sjemenke BEG, pokožica BGlc te za usporedbu etanolni ekstrakti). Antiproliferativna aktivnost pripremljenih ekstrakata na stanicama određena je MTS metodom, a njihov zaštitni učinak na djelovanje reaktivnih kisikovi vrsta DCFH-DA metodom.

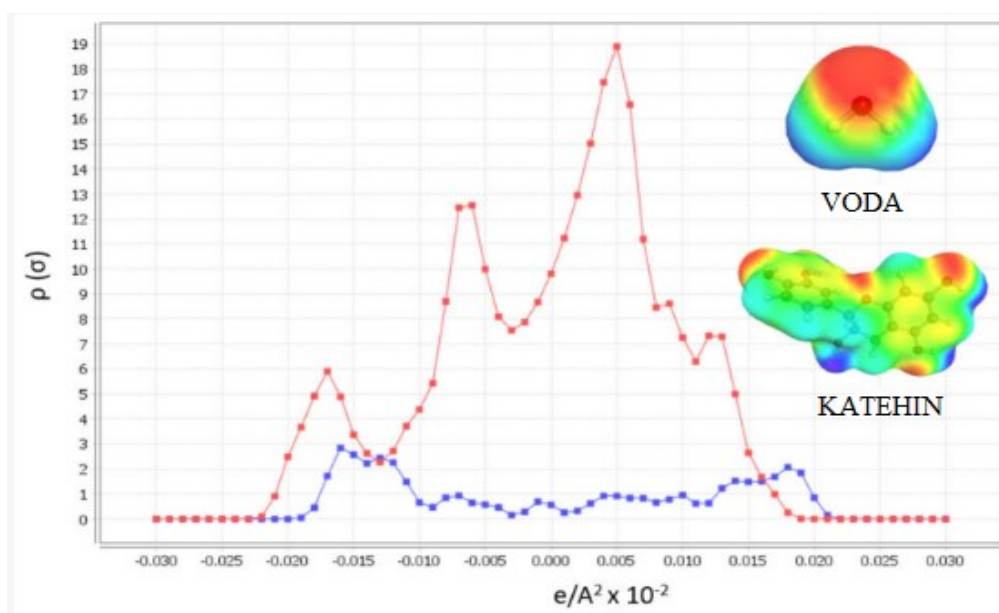
4.1. ODABIR NADES-A

Kako bi se smanjio broj pokušaja i pogrešaka pri traženju idealnog otapala za ekstrakciju polifenola, danas se u te svrhe koriste računalni programi. COSMO-RS smatra se jednom od

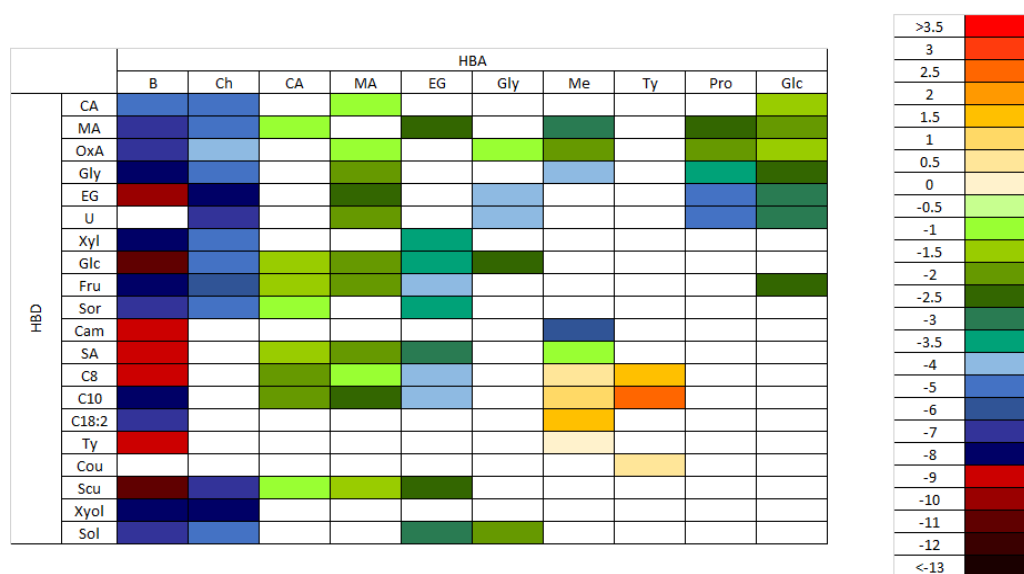
najtočniji *ab initio* metoda za svrstavanje otapala. Model koristi kvantno-kemijske metode za otopljene tvari i otapala te statističkom termodinamikom utvrđuje interakcije molekularnih površina. COSMO-RS se može primjenjivati za predviđanje termodinamičkih svojstava otapala, drugih fizikalno-kemijskih svojstva otapala i otopljenih tvari kao i za predviđanje topljivosti ključnih komponenti u NADES-u. S obzirom na to da može raditi s kompleksnim molekulama ne samo u vodi, nego u raznim otapalima, često se koristi i u farmaceutskoj industriji (Klamt, 2011).

Prva izlazna datoteka programa je σ -profil (slika 10), to je izračunata optimalna geometrija molekule uz odgovarajuću volumnu raspodjelu električnog naboja i njegovu površinsku raspodjelu. σ -profili komponenata se brzim i računski ne zahtjevnim statističko-termodinamičkim proračunima u okviru programskog paketa COSMO*therm* preračunavaju u tzv. σ -potencijale komponenata ili njihovih smjesa i odgovarajuće kemijske potencijale. Nakon toga se metodama fizikalne kemije i kemijsko-inženjerske termodinamike izračunavaju i izvedena svojstva, poput koeficijenta aktivnosti, ravnotežnoga tlaka para, koeficijenta raspodjele, topljivosti ili čak čitavi fazni dijagrami. Za potrebe našeg istraživanja izračunati su logaritmi koeficijena aktivnosti $\ln(\gamma)$.

Za odabir najboljeg otapala ispitana je topljivost katehina kao najzastupljenijeg polifenola u graševini s udjelom od 21,04 mg L⁻¹ (Abbas i sur., 2019) u 47 različitih DES-ova pomoću COSMO*therm* programa (tablica 2). Dobiveni logaritmi koeficijena aktivnosti $\ln(\gamma)$ su prikazani na slici 11. Manji koeficijent označuje bolju topljivost ispitanog spoja.



Slika 10. Prikaz σ -profila katehina (crveno) i vode (plavo)



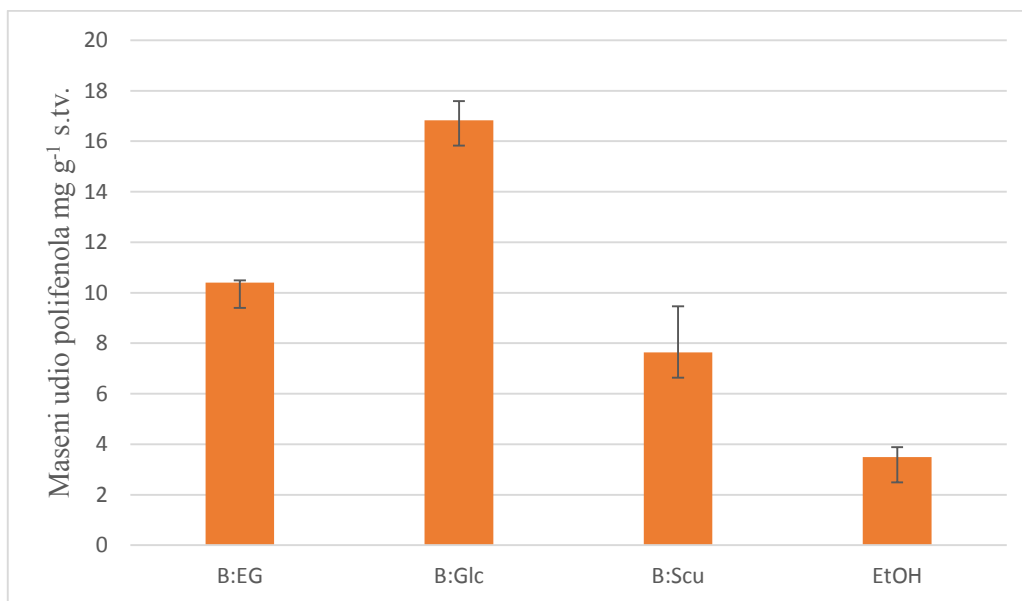
Slika 11. Prikaz $\ln(\gamma)$ vrijednosti katehina u ispitanim NADES-ima

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: etilen-glikol, 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.

Prvi podatak koji nam daje *software* je σ - profil katehina. On daje informacije o molekularnoj polarnosti određenog spoja pa je tako lakše može sintetizirati željeni DES. Prema slici 10 vidljivo je da pik oko $0 \text{ e}/\text{Å}^2 \times 10^{-2}$ pokazuje apolarnost katehina, dok vrhovi od 0.025 do 0.01 pokazuju da ovaj polifenol uključuje i polarna područja. Prema tim rezultatima za očekivati je da se katehin najbolje topi u polarnim DES-ovima. Drugi važan podatak dobiven *COSMOtherm* programom su izračunati logaritmi koeficijenta aktivnosti ($\ln(\gamma)$) prikazani na slici 11. Najviše $\ln(\gamma)$ vrijednosti su dobivene za timol i mentol kao akceptore vodikove veze te kumarin, dekansku i linolnu kiselinu kao donore vodikove veze. S obzirom na dobivene visoke $\ln(\gamma)$ vrijednosti, katehin nije dobro topljiv u tim DES-ovima pa oni nisu dobar izbor za ekstrakciju. Najniže $\ln(\gamma)$ vrijednosti su dobivene s betainom kao akceptorom vodikove veze i etilen-glikolom, glukozom i saharozom kao donorima vodikove veze. Prema tim rezultatima za ekstrakciju polifenola iz sjemenki i pokožice grožđa su izabrana sljedeća otapala: betain : etilen-glikol (BEG), betain : glukoza (BGlc) i betain : saharoza (BScu).

4.2. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA POKOŽICE I SJEMENKI GROŽĐA PRIPREMLJENIH POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA

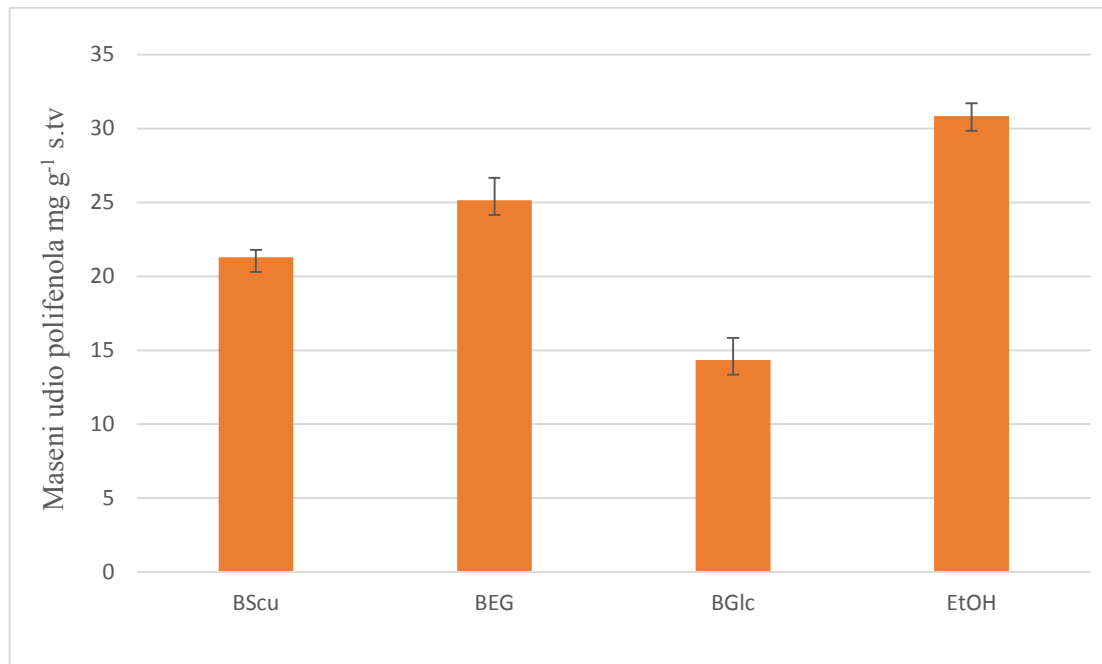
Kvantitativna metoda određivanja ukupnih polifenola u ekstraktima pokožice i sjemenki grožđa provedena je u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom. Rezultati mjerenja su izraženi kao mg galne kiseline po g s.tv. uzorka te su prikazani na slikama 12 i 13.



Slika 12. Maseni udio polifenola u ekstraktima pokožice 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 zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu



Slika 13. Maseni udio polifenola u ekstraktima sjemenki 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 zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu

Na temelju prikazanih rezultata (slike 12 i 13) možemo zaključiti kako je ekstrakcija odabranim NADES-ima uspješno provedena s obzirom na udio polifenola koji je ekstrahirano. Sjemenke su se pokazale kao najveći izvor polifenola u bijelom grožđu, pri čemu se maseni udio polifenola kreće od 14 do 30 mg g⁻¹ suhe tvari, dok se u pokožici taj udio kreće od 3 do 16 mg g⁻¹ suhe tvari. Najviše polifenola u sjemenkama je ekstrahirano redom: EtOH > BEG > BScu > BGlc, a u pokožici: BGlc > BEG > BScu > EtOH. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim navodima koji kažu kako se najveći udio polifenola bijelog grožđa nalazi u sjemenkama (60-70 %), a manje u pokožici (28-35 %) i komini (Dabetić i sur., 2020; Shi i sur., 2003). Yilmaz i sur. (2015) su uspoređivali ukupan udio polifenola u sjemenkama, pokožici i mesu raznih sorti crnog i bijelog grožđa. Rezultati su pokazali da crno grožđe u svim dijelovima ima veći udio polifenola od bijelog grožđa. BEG i BGlc imaju sličnu pH vrijednost (6,17 i 6,86), no udio ekstrahiranih polifenola im se značajno razlikuje. pH bi mogao imati utjecaja jedino kod ekstrakcije polifenola iz pokožice. Naime, antocijani su jedna od skupina flavonoida koja je odgovorna za boju grožđa, stoga su najzastupljeniji u pokožici. Također je poznato da se oni razgrađuju pri pH vrijednostima višim od 7 što je slučaj kod BScu otapala (7,85) pa je to mogući razlog manjeg udjela polifenola u tom ekstraktu. Otapalo

BGlc ekstrahiralo je više polifenola u pokožici od etanola, a u ekstraktima sjemenki nije velika razlika između etanola i BEG-a. Time se može potvrditi da eutektička otapala mogu zamijeniti klasična otapala u procesu ekstrakcije.

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

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

Tablica 5. Polifenoli određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) u ekstraktima pokožice (mg g⁻¹ suhe tvari pokožice)

Ekstrakti pokožice				
Polifenoli	BGlc	BScu	BEG	EtOH
Flavan-3-ol derivat 1	-	0,28356	-	-
Epigalokatehin	3,19214	0,46912	1,91268	1,01479
Flavan-3-ol derivat 2	1,55262	-	0,36871	-
Flavan-3-ol derivat 3	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 4	0,70818	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 5	-	0,14012	-	-
Flavan-3-ol derivat 6	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 7	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 8	-	-	-	-
Katehin	0,09204	0,09994	0,20304	0,13278
Flavan-3-ol derivat 9	-	-	-	-
Epikatehin	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 10	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 11	-	-	0,2333	-

Tablica 5. Polifenoli određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) u ekstraktima pokožice (mg g⁻¹ suhe tvari pokožice)- *nastavak*

Flavan-3-ol derivat 12	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 13	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 14	-	-	-	-
Rutin trihidrat	0,06714	0,08111	0,13087	0,09145

Iz rezultata u Tablici 5 može se zaključiti kako je pokožica siromašnija polifenolima u odnosu na sjemenke. Takvi rezultati su u skladu s literaturnim navodima jer se kroz istraživanja pokožica pokazala kao dio grožđa s najmanjim udjelom polifenola (Oprica i Grigore, 2016; Kammerer i sur., 2004). Vidljivo je da pokožica uglavnom sadrži katehin, epigalokatehin i rutin trihidrat, dok je udio ostalih flavan-3-ol derivata vrlo mali ili nisu prisutni. Epigalokatehin, katehin i rutin trihidrat ekstrahirani su pomoću sva 4 otapala. Odsutnost epikatehina u ekstraktu pokožice bijelog grožđa također je uočena u radu Dabetić i sur. (2020), dok je isti u sjemenkama detektiran. Kao najbolje otapalo pokazao se BGlc. BGlc se pokazao kao ekstrakt s najviše ukupnih polifenola u pokožici tako da su ovi rezultati u skladu s prethodnima.

Tablica 6. Polifenoli određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) u ekstraktima sjemenki (mg g⁻¹ suhe tvari sjemenki)

Ekstrakti sjemenki				
Polifenoli	BGlc	BScu	BEG	EtOH
Flavan-3-ol derivat 1	-	-	-	2,53450
Epigalokatehin	0,92775	-	-	0,84057
Flavan-3-ol derivat 2	1,37872	-	1,59225	3,46206
Flavan-3-ol derivat 3	0,64355	-	1,27287	-
Flavan-3-ol derivat 4	0,51034	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 5	-	0,77729	0,21148	-
Flavan-3-ol derivat 6	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 7	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 8	-	0,26721	-	-
Katehin	1,34083	2,68974	1,64764	0,66853

Tablica 6. Polifenoli određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) u ekstraktima sjemenki (mg g⁻¹ suhe tvari sjemenki)-*nastavak*

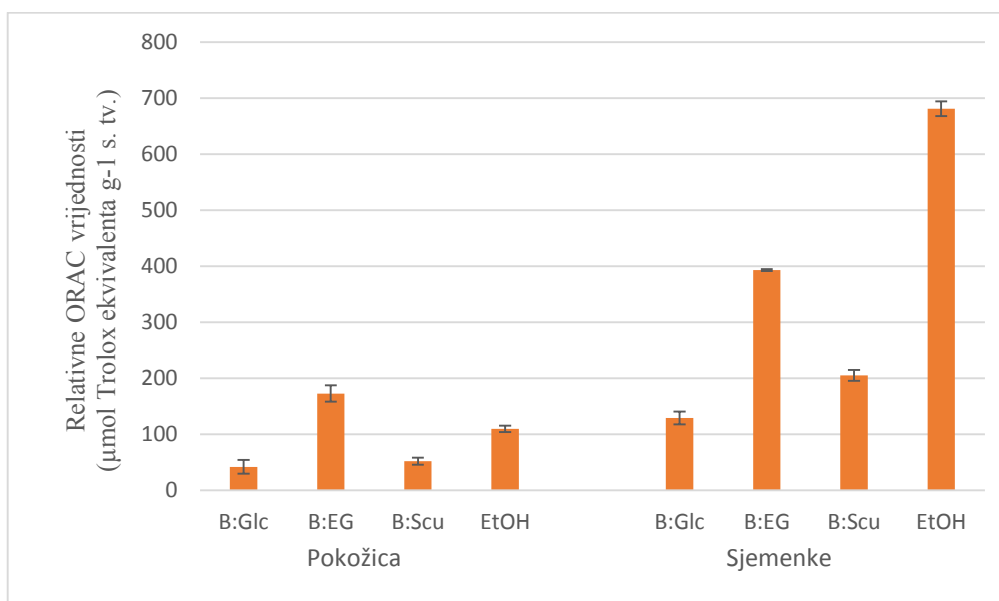
Flavan-3-ol derivat 9	0,16267	0,32087	-	-
Epikatehin	0,13872	0,32657	0,19181	0,09554
Flavan-3-ol derivat 10	-	-	-	-
Flavan-3-ol derivat 11	-	0,19439	-	-
Flavan-3-ol derivat 12	0,31964	0,72141	0,36320	-
Flavan-3-ol derivat 13	-	0,22223	-	-
Flavan-3-ol derivat 14	0,15538	0,36426	-	-
Rutin trihidrat	-	-	-	-

Rezultati prikazani u Tablici 6 prikazuju izračunate udjele polifenola u sjemenkama. Iz rezultata je vidljivo da su BGlc i BScu otapala s najvećom stopom uspješnosti ekstrakcije katehina, epikatehina i brojnih drugih derivata. Udjeli navedenih polifenola veći su u odnosu na udjele u pokožici, što je očekivano, jer su sjemenke najveći izvor polifenola u grožđu (Oprica i Grigore, 2016; Kammerer i sur., 2004). Rutin trihidrat nije detektiran u sjemenki, dok je u pokožici ekstrahirano pomoću sva 4 otapala. Udio epigalokatehina je vidljivo manji u odnosu na pokožicu što je utvrđeno i poznato; udio epigalokatehina inače je veći u pokožici u odnosu na sjemenke (González-Manzano i sur., 2004).

4.4. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET POLIFENOLA MJEREN ORAC METODOM

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta biološki aktivnih spojeva može se provesti nizom standardiziranih metoda koje se baziraju na različitim mehanizmima djelovanja antioksidansa, kao na primjer inhibiciji ili uklanjanju slobodnih radikala ili keliranju metalnih iona koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala. ORAC metoda koja je korištena u ovom radu odvija se pri temperaturi od 37 °C i u području fiziološkog pH te koristi peroksil radikal s redoks potencijalom i reakcijskim mehanizmom sličnom onome kakav se odvija u našem organizmu. Prednost ove metode je što se lako može prilagoditi kako bi detektirala hidrofobne i hidrofilne antioksidanse promjenom izvora radikala ili otapala (Schaich i sur., 2015). Relativne ORAC vrijednosti ekstrakta pokožice i sjemenke su

izračunate i izražene u ekvivalentima Troloxa, točnije, kao $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s. tv. i prikazani su na slici 14.



Slika 14. Relativne ORAC vrijednosti za ekstrakte sjemenki i pokožice, *, **

*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 zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu

Rezultati ORAC vrijednosti kreću se u širokom rasponu. Za ekstrakt pokožice (od 41,99461 do 172,875491 $\mu\text{mol Troloxa}$ po gramu suhe tvari), a ekstrakt sjemenki (od 129,35418 do 681,02951 $\mu\text{mol Troloxa}$ po gramu suhe tvari). Antioksidacijski kapaciteti prate trend ukupnih polifenola određenih Folin-Ciocalteu reagensom. Udio ukupnih polifenola u sjemenkama je znatno veći nego u pokožici, što je potvrđeno i ORAC vrijednostima. Najveća ORAC vrijednost je detektirana za ekstrakt sjemenki u 70 %-tnom etanolu, dok su se ostale vrijednosti smanjivale redom: $SEtOH > SBEG > SBScu > PBEG > SBGlc > PEtOH > PBScu > PBGlc$. (Pri tome su:, $PBGlC = BGlc$ ekstrakt pokožice, $PBScu = BScu$ ekstrakt pokožice, $PBEG = BEG$ ekstrakt pokožice, $PEtOH = EtOH$ ekstrakt pokožice, $SBGlC = BGlc$ ekstrakt sjemenki, $SBScu = BScu$ ekstrakt sjemenki, $SBEG = BEG$ ekstrakt sjemenki, $SEtOH = EtOH$ ekstrakt sjemenki).

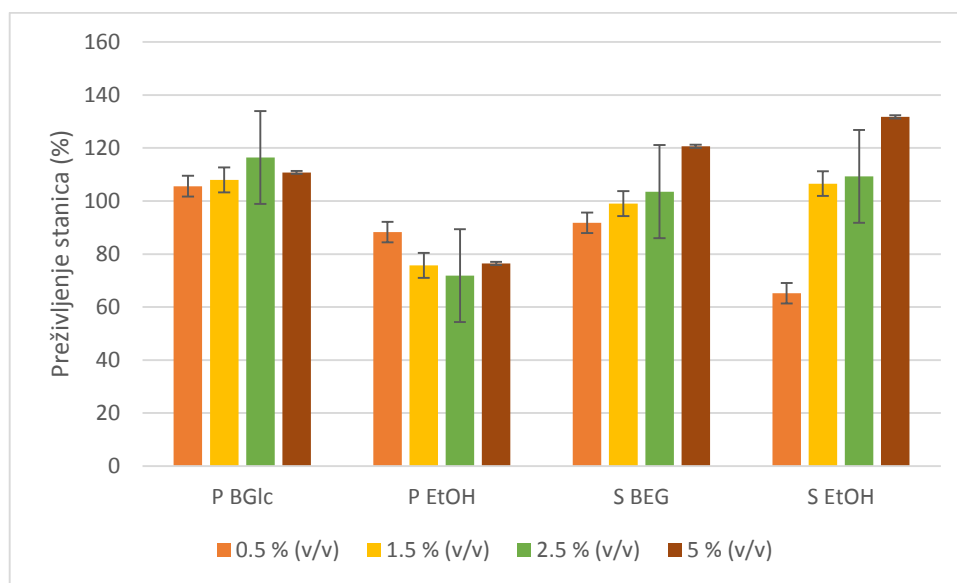
Iako su općenito omjeri ukupnih polifenola i ORAC vrijednosti u korelaciji, ako se promatra svaki DES zasebno, uočava se da ekstrakti pokožice u betain : glukozi i etanolu pokazuju suprotne rezultate - najveći udio polifenola pokazuje najmanju ORAC vrijednost.

Uzrok takvim rezultatima može biti taj da DES-ovi sami posjeduju antioksidacijsku aktivnost, točnije komponentu betain koji je antioksidacijski agens (Zhang i sur., 2016). Još jedan razlog ovakvih rezultata može biti i osjetljivost ORAC metode - mala promjena u temperaturi ili koncentraciji komponenti dodanih u reakciju može dovesti do smanjene točnosti rezultata (Schaich i sur., 2015). Stoga su za ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata *in vitro* na HaCaT staničnoj liniji izabrani ekstrakti najbogatiji polifenolima.

4.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA POKOŽICE I SJEMENKI GROŽĐA

4.5.1. *In vitro* učinak ekstrakata na HaCaT staničnu liniju

Antiproliferativna aktivnost ekstrakata pokožice i sjemenki grožđa mjerena je MTS metodom *in vitro* na adherentnoj humanoj staničnoj liniji keratinocita HaCaT. Stanice su tretirane različitim volumnim udjelima ekstrakta tijekom 72 sata. Rezultati prikazani na slici 15 su postoci preživljenja stanica u ovisnosti o dodanom volumenu.



Slika 15. Utjecaj ekstrakata pokožice i sjemenki na HaCaT staničnu liniju, *,**

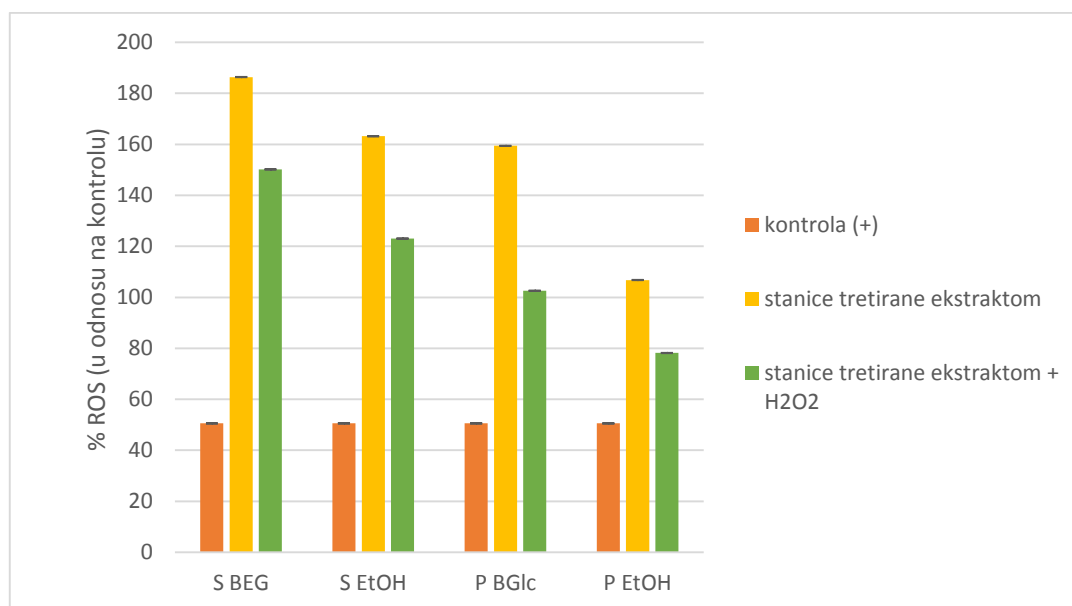
*rezultati su srednja vrijednost \pm S.D (n = 8)

**P BGlc= ekstrakt pokožice grožđa pripremljen u betain : glukozi, P EtOH= ekstrakt pokožice grožđa pripremljen u zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu, S BEG= ekstrakt sjemenki grožđa pripremljen u betain : etilen-glikolu, S EtOH= ekstrakt sjemenki grožđa pripremljen u zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu

Iz rezultata na slici 15 vidljivo je da preživljenje HaCaT stanica ovisi o primijenjenom volumnom udjelu ekstrakta. S porastom volumnog udjela ekstrakata pokožice i sjemenki grožđa pripremljenih s NADES-ima, raste i preživljenje stanica. Ekstrakt pokožice u betain : glukozi, ekstrakt sjemenki u betain : etilen-glikolu 2,5 i 5 % (v/v) te etanolni ekstrakt sjemenki 1,5, 2,5 i 5 % (v/v) uzrokuju proliferaciju HaCaT stanica. Kako se povećava % (v/v) ekstrakta tako se povećava i stimulacija rasta stanica. Obzirom na rezultate prikazane na slikama 12 i 13, može se zaključiti da zapaženi stimulacijski učinak na stanice proporcionalno ovisi o koncentraciji polifenola. Što je veći ukupni udio polifenola u ekstraktu to je bolja proliferacija stanica. Takvi rezultati s polifenolima su zapaženi i u prijašnjim istraživanjima (Lagha i Grenier, 2019; Hsu i sur., 2003). U radu Panić i sur. (2020) je primijećen pozitivan učinak na rast HaCaT stanica tretiranih polifenolnim ekstraktima na bazi DES-a, posebice s ekstraktima pripremljenim u betain : glukozi i kolin kloridnim DES-ovima. Također su uočene razlike u rastu stanica ovisno o tipu DES-a. Otapalo na bazi betaina ima jači efekt na proliferaciju stanica, nego ono na bazi kolin klorida. S obzirom na to da je došlo do proliferacije stanica keratinocita, rezultati ukazuju na mogućnost primjene ekstrakta pokožice i sjemenki grožđa pripremljenih primjenom NADES-a u kozmetičkoj industriji, za npr. obnovu i regeneraciju kože.

4.5.2. Zaštitni antioksidativan učinak ekstrakata u kulturi HaCaT stanica

Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta prisutnih zbog poticanja oksidativnog stresa dodatkom H_2O_2 provedeno je DCFH-DA metodom, odnosno mjerenjem intenziteta fluorescentnog DCF spektrofluorimetrijski pri $\lambda_{ex}=485\pm 10$ nm i $\lambda_{ex}=530\pm 10$ 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. U stanicama u kojima je prisutno više unutarstaničnih ROS-ova očekuje se veći intenzitet fluorescencije. Dakle, najveća se 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 16. Učinak predtretmana ekstraktima na nastajanje unutarstaničnih

ROS-ova u HaCaT stanicama prilikom dodatka H₂O₂, *, **

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

** S BEG= ekstrakt sjemenki pripremljen u betain : etilen-glikolu, S EtOH= ekstrakt sjemenki pripremljen u zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu, P BGlc= ekstrakt pokožice pripremljen u betain : glukozi i P EtOH= ekstrakt pokožice pripremljen u zakiseljenom (70 %, v/v) etanolu

Prikazani rezultati na slici 16 nisu u skladu s očekivanjima. U svim ekstraktima je vrijednost udjela ROS-ova viša od kontrole, što znači da je došlo do prooksidativnog učinka. Često kemijske metode određivanja antioksidansa, u našem slučaju ORAC metoda, nisu u korelaciji s rezultatima dobivenim mjerenjima u stanici. Kemijska ispitivanja ne uzimaju u obzir parametre kao što su bioraspoloživost, staničnu apsorpciju i metabolizam. Na primjer, dva spoja mogu pokazati podjednaku antioksidativnu aktivnost kemijskom metodom, dok primijenjeni u biološkom okruženju jedan može imati bolju aktivnost od drugog zbog svoje dostupnosti na mjestu djelovanja. Određeni polifenoli imaju strukturalna ograničenja i nisu u mogućnosti proći kroz staničnu membranu, stoga ne mogu niti pokazati svoj antioksidacijski potencijal (Matos i sur., 2019). Također je utvrđeno da se polifenolni antioksidansi ponašaju poput prooksidansa u uvjetima koji pogoduju njihovoj autooksidaciji, na primjer pri visokim pH vrijednostima s visokom koncentracijom prisutnih iona prijelaznih metala i molekula kisika. Manji polifenoli, koji se lako oksidiraju, imaju prooksidativnu aktivnost, dok polifenoli s velikom molekulskom masom kao što su tanini imaju slabu ili nikakvu prooksidativnu aktivnost (Cotoras i sur., 2014). Još jedan razlog povećanog broja ROS-a

može biti etanol za kojeg je dokazano da uzrokuje oksidativan stres. Albano (2006) je opisao mehanizam nastajanja oksidativnog stresa uzrokovanog etanolom.

5. ZAKLJUČCI

- 1) Program COSMO $therm$ pouzdan je za predviđanje topljivosti željenih spojeva u otapalima. Odabrana otapala s niskom vrijednosti $\ln(\gamma)$ uspješno su ekstrahirala polifenole iz pokožice i sjemenki grožđa.
- 2) Uspješno je provedena ekstrakcija polifenolnih spojeva iz sjemenki i pokožice grožđa hrvatske sorte Graševina prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Usporedbom učinkovitosti ekstrakcije provedene s etanolom potvrđeno je da niskotemperaturna prirodna eutektička otapala mogu zamijeniti konvencionalna otapala u procesima ekstrakcije. Najviše polifenola iz pokožice je ekstrahirano je BGlc otapalom, a kod sjemenki veliki potencijal ima BEG. HPLC-om je identificiran i kvantificiran polifenolni profil sastava: katehin, epikatehin, epigalokatehin, rutin trihidrat i flavan-3-ol derivati, u sjemenkama i pokožici grožđa. Epigalokatehin i katehin su detektirani i u pokožici i sjemenkama. Epikatehin je prisutan samo u sjemenkama, a rutin trihidrat samo u pokožici.
- 3) ORAC metodom je određen antioksidacijski kapaciteti ekstrakata pokožice i sjemenki grožđa. Ekstrakt pokožice pripremljen u BEG je pokazao najveći antioksidacijski kapacitet, dok je kod sjemenki to pokazao ekstrakt pripremljen s EtOH i BEG.
- 4) MTS metodom određeno je preživljenje i proliferacija HaCaT stanica tretiranih pripremljenim ekstraktima. Pozitivan učinak na proliferaciju keratinocita ukazuje na moguću primjenu ekstrakata pripremljenih u NADES-u u kozmetičkoj industriji.
- 5) Antioksidacijski kapacitet pripremljenih ekstrakata nije potvrđen primjenom HaCaT stanica i DCFH-DA metode. Nije uočen antioksidacijski učinak u staničnom okruženju te su potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo je li zapaženo prooksidativno djelovanje posljedica učinka samih polifenola ili NADES-a.

6. LITERATURA

Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, i sur. (2017) Natural polyphenols: An overview. *Int J Food Prop* **20**(8), 1689-1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>

Abranches DO, Martins MA, Silva LP, Schaeffer N, Pinho SP, Coutinho JA (2019) Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: The quest for type V DES. *Chem Comm* **55**(69), 10253-10256. <https://doi.org/10.1039/C9CC04846D>

Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* **2**(4), 875–877. doi: 10.1038/nprot.2007.102

Albano E, (2006) Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* **65**(3), 278-290. doi:10.1079/PNS2006496

Armenta S, Garrigues S, Esteve-Turrillas FA, de la Guardia M (2019) Green extraction techniques in green analytical chemistry. *Trac-Trend Anal Chem* **116**, 248-253. doi: 10.1016/j.trac.2019.03.016

Aroso IM, Paiva A, Reis RL, Duarte ARC (2017) Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine–Physicochemical properties. *J Mol Liq* **241**, 654-661. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.051>

Attia YA, El-Naggar AS, Abou-Shehema BM, Abdella AA (2019) Effect of supplementation with trimethylglycine (betaine) and/or vitamins on semen quality, fertility, antioxidant status, DNA repair and welfare of roosters exposed to chronic heat stress. *Animals* **9**(8), 547. <https://doi.org/10.3390/ani9080547>

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**(4), 426-436. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Bagh FG, Shahbaz K, Mjalli FS, AlNashef IM, Hashim MA (2013) Electrical conductivity of ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents: Measurements and artificial intelligence-based prediction. *Fluid Phase Equilib* **356**, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.07.012>

Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M (2019) Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity—a review. *Int J Food Sci Tech* **54**(4), 933-942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>

Brenes A, Viveros A, Chamorro S, Arija I (2016) Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Anim Feed Sci Tech* **211**, 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>

Câmara JS, Albuquerque BR, Aguiar J, Corrêa RC, Gonçalves JL, Granato D, i sur. (2021) Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study. *Foods* **10**(1), 37. <https://doi.org/10.3390/foods10010037>

Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* **14**(3), 303–311. doi: [10.1016/0891-5849\(93\)90027-r](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-r)

Chemat F, Vian MA, Cravotto G (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *Int J Mol Sci* **13**(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>

Chemat F, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Strube J, Uhlenbrock L, Gunjevic V, i sur. (2019a) Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trend Anal Chem* **118**, 248-263. doi: [10.1016/j.trac.2019.05.037](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037)

Chemat F, Abert Vian M, Ravi HK, Khadhraoui B, Hilali S, Perino S, i sur. (2019b) Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules* **24**(16), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>

Cosme F, Pinto T, Vilela A (2018) Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages* **4**(1), 22. <https://doi.org/10.3390/beverages4010022>

Cotoras M, Vivanco H, Melo R, Aguirre M, Silva E, Mendoza L (2014) In vitro and in vivo evaluation of the antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds obtained from grape (*Vitis vinifera*) pomace. *Molecules* **19**(12), 21154-21167. <https://doi.org/10.3390/molecules191221154>

Craveiro R, Aroso I, Flammia V, Carvalho T, Viciosa MT, Dionisio M, i sur. (2016) Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **215**, 534-540. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>

Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Redovniković IR, Jokić S (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process* **109**, 52-73. doi:10.1016/j.fbp.2018.03.001

Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green solvents for green technologies. *J Chem Technol Biotechnol* **90**(9), 1631–1639. doi:10.1002/jctb.4668

Dabetić N, Todorović V, Panić M, Radojčić Redovniković I, Šobajić S (2020) Impact of deep eutectic solvents on extraction of polyphenols from grape seeds and skin. *Appl Sci* **10**(14), 4830. doi: 10.3390/app10144830

Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61-68. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019

de Lima Cherubim DJ, Buzanello Martins CV, Oliveira Fariña L, da Silva de Lucca RA (2020) Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Dermatol* **19**(1), 33-37. doi: 10.1111/jocd.13093

De Marco BA, Rechelo BS, Tótolí EG, Kogawa AC, Salgado HRN (2019) Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi pharm J* **27**(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>

de Moraes P, Gonçalves F, Coutinho JA, Ventura SP (2015) Ecotoxicity of cholinium-based deep eutectic solvents. *ACS Sustain Chem Eng* **3**(12), 3398-3404. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01124>

Dias R, Oliveira H, Fernandes I, Simal-Gandara J, Perez-Gregorio R (2021) Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. *Cr Rev Food Sci* **61**(7), 1130-1151. doi: 10.1080/10408398.2020.1754162.

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 19. listopada 2021.

Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, i sur. (2019) Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytother Res* **33**(9), 2221-2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>

García G, Aparicio S, Ullah R, Atilhan M (2015) Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications. *Energ Fuel* **29**(4), 2616-2644. <https://doi.org/10.1021/ef5028873>

Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Bioph Meth* **65**, 45-80. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>

González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, 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. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.019>

Gutiérrez MC, Ferrer ML, Mateo CR, Monte F (2009) Freeze-drying of aqueous 2 solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of 3 self-assembled structures. *Langmuir* **25**, 5509–5515. <https://doi.org/10.1021/la900552b>

Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, i sur. (2020) Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chem Rev* **121**(3), 1232-1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>

Hayyan M, Hashim MA, Hayyan A, Al-Saadi MA, AlNashef IM, Mirghani M, i sur. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic?. *Chemosphere* **90**(7), 2193-2195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.004>

Hayyan M, Hashim MA, Al-Saadi MA, Hayyan A, AlNashef IM, Mirghani ME (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**(2), 455-459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.013>

Hsu S, Bollag WB, Lewis J, Huang Q, Singh B, Sharawy M, i sur. (2003) Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **306**(1), 29-34. doi: 10.1124/jpet.103.049734

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. <https://doi.org/10.1021/jf049613b>

Khan MK, Paniwnyk L, Hassan S (2019) Polyphenols as natural antioxidants: sources, extraction and applications in food, cosmetics and drugs. U: *Plant Based “Green Chemistry 2.0”*, (Li, Y., Chemat, F., ured.), Springer, Singapore, 197-235. doi: 10.1007/978-981-13-3810-6_8

Klamt A, (2011) The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wires Comput Mol Sci* **1**(5), 699-709. <https://doi.org/10.1002/wcms.56>

Lagha AB, Grenier D (2019) Tea polyphenols protect gingival keratinocytes against TNF- α -induced tight junction barrier dysfunction and attenuate the inflammatory response of monocytes/macrophages. *Cytokine* **115**, 64-75. doi:10.1016/j.cyto.2018.12.009

Li J, Han Z, Zou Y, Yu B (2015) Efficient extraction of major catechins in *Camellia sinensis* leaves using green choline chloride-based deep eutectic solvents. *RSC advances* **5**(114), 93937-93944. <https://doi.org/10.1039/C5RA15830C>

Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* **81**(3), 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>

Lucarini M, Durazzo A, Romani A, Campo M, Lombardi-Boccia G, Cecchini F (2018) Bio-based compounds from grape seeds: A biorefinery approach. *Molecules* **23**(8), 1888. <https://doi.org/10.3390/molecules23081888>

Macário IPE, Oliveira H, Menezes AC, Ventura SPM, Pereira JL, Gonçalves AMM, i sur. (2019) Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci Rep* **9**(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39910-y>

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

Matos MS, Romero-Díez R, Álvarez A, Bronze MR, Rodríguez-Rojo S, Mato R, i sur. (2019) Polyphenol-rich extracts obtained from winemaking waste streams as natural ingredients with cosmeceutical potential. *Antioxidants* **8**(9), 355. <https://doi.org/10.3390/antiox8090355>

Mirabella N, Castellani V, Sala S (2014) Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *J Clean Prod* **65**, 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>

Mohd Maidin N, Michael N, Oruna-Concha MJ, Jauregi P (2018) Polyphenols extracted from red grape pomace by a surfactant based method show enhanced collagenase and elastase

inhibitory activity. *J Chem Technol Biot* **93**(7), 1916-1924.
<https://doi.org/10.1002/jctb.5459>

Mukherjee PK, Biswas R, Sharma A, Banerjee S, Biswas S, Katiyar CK (2018) Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential. *J Herb Med* **14**, 1-16.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.09.002>

Oprica L, Vezeteu G, Grigore MN (2016) Differential Content of the Total Polyphenols and Flavonoids in Three Romanian White Grape Cultivars. *Iran J Public Health* **45**(6), 826–827.

Panić M, Drakula S, Cravotto G, Verpoorte R, Hruškar M, Redovniković IR, i sur. (2020) Biological activity and sensory evaluation of cocoa by-products NADES extracts used in food fortification. *Innov Food Sci Emerg Technol* **66**, 102514. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102514>

Panić M, Gunjević V, Cravotto G, Redovniković IR (2019) Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chem* **300**, 125185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>

Porras SP, Kenndler E (2005) Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussion, *Electrophoresis* **26**(17), 3203–3220.
<https://doi.org/10.1002/elps.200500311>

Potapovich AI, Kostyuk VA, Kostyuk TV, de Luca C, Korkina LG (2013) Effects of pre-and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflamm Res* **62**(8), 773-780. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0634-z>

Radojčić Redovniković I (2020) Zelena otapala. *Kem Ind* **69**, 670-671

Radošević K, Bubalo MC, Srček VG, Grgas D, Dragičević TL, Redovniković IR (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox Environ Safe* **112**, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>

Radošević K, Ćurko N, Srček VG, Bubalo MC, Tomašević M, Ganić K K, i sur. (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT* **73**, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>

Radošević K, Čanak I, Panić M, Markov K, Bubalo MC, Frece J, i sur. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ Sci Pollut R* **25**(14), 14188-14196. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>

Ruesgas-Ramón M, Figueroa-Espinoza MC, Durand E (2017) Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. *J Agr Food Chem* **65**(18), 3591-3601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>

Samtiya M, Aluko RE, Dhewa T, Moreno-Rojas JM (2021) Potential Health Benefits of Plant Food-Derived Bioactive Components: An Overview. *Foods* **10**(4), 839. <https://doi.org/10.3390/foods10040839>

Schaich KM, Tian X, Xie J (2015) Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J Funct Food* **14**, 111-125. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.043

Sharif A, Akhtar N, Khan MS, Mena A, Mena B, Khan BA, i sur. (2015) Formulation and evaluation on human skin of a water-in-oil emulsion containing Muscat hamburg black grape seed extract. *Int J Cosmetic Sci* **37**(2), 253-258. <https://doi.org/10.1111/ics.12184>

Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y (2003) Polyphenolics in grape seeds—biochemistry and functionality. *J Med Food* **6**(4), 291-299. <https://doi.org/10.1089/109662003772519831>

Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev* **114**(21), 11060-11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

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

Ueland PM (2011) Choline and betaine in health and disease. *J Inherit Metab Dis* **34**(1), 3-15. doi: 10.1007/s10545-010-9088-4

Unusan N (2020) Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *J Funct Food* **67**, 103861. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103861>

Wen Q, Chen JX, Tang YL, Wang J, Yang Z (2015) Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere* **132**, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.061>

Wittenauer J, Mäckle S, Sußmann D, Schweiggert-Weisz U, Carle R (2015) Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia* **101**, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.005>

Xia J, Song X, Bi Z, Chu W, Wan Y (2005) UV-induced NF- κ B activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. *Int J Mol Med* **16**(5), 943-950. <https://doi.org/10.3892/ijmm.16.5.943>

Yilmaz Y, Göksel Z, Erdoğan SS, Öztürk A, Atak A, Özer C (2015) Antioxidant activity and phenolic content of seed, skin and pulp parts of 22 grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars (4 common and 18 registered or candidate for registration). *J Food Process Pres* **39**(6), 1682-1691. doi:10.1111/jfpp.12399

Yu D, Zha Y, Zhong Z, Ruan Y, Li Z, Sun L, i sur. (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. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878>

Zhang M, Zhang H, Li H, Lai F, Li X, Tang Y i sur. (2016) Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability. *J Agric Food Chem* **64**(42), 7921-7930. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03592>

Zhang Q, Vigier KDO, Royer S, Jerome F (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev* **41**(21), 7108-7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>

Zhao BY, Xu P, Yang FX, Wu H, Zong MH, Lou WY (2015) Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain Chem Eng* **3**(11), 2746-2755. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619>

Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, Kerscher M (2015) Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmetic Sci* **37**(5), 455-464. <https://doi.org/10.1111/ics.12218>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja IVA DVORNEKOVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

I. Dvorneković

Vlastoručni potpis