

Priprava ekstrakata komine grožđa primjenom eutekličnih otapala i ispitivanje njihove biološke aktivnosti

Piškulić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:677071>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Ana Piškulić

617/ MB

**PRIPRAVA EKSTRAKATA
KOMINE GROŽĐA
PRIMJENOM EUTEKTIČNIH
OTAPALA I ISPITIVANJE
NJIHOVE BIOLOŠKE
AKTIVNOSTI**

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 doc.dr.sc. Kristine Radošević.

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević, te izv.prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković na uloženom vremenu i trudu i nesebičnoj pomoći, te na svemu što su me naučile pri izradi ovog diplomskog rada.

Također želim zahvaliti ostalim članovima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pruženoj pomoći i savjetima pri odradi eksperimentalnog dijela rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIPRAVA EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA PRIMJENOM EUTEKTIČNIH OTAPALA I ISPITIVANJE NJIHOVE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Ana Piškulić 617/MB

Sažetak: U ovom radu su pripremljeni ekstrakti komine grožđa s osam različitih eutektičnih otapala i s etanolom, zakiseljenim etanolom i vodom te su analizirani njihovi sastavi s obzirom na ukupne polifenole, antocijane te je određen antioksidacijski kapacitet. Biološka aktivnost pripremljenih ekstrakta komine grožđa ispitana je *in vitro* na trima staničnim linijama (MCF-7, HeLa, HEK293T). Ekstrakti komine grožđa u DES-ovima imaju slabiji citotoksični učinak na normalnu humanu staničnu liniju HEK293T, nego na tumorske stanice, što upućuje na njihov mogući antitumorski učinak. Ekstrakti komine grožđa u kolin klorid:jabučna kiselina i kolin klorid:prolin:jabučna kiselina imaju najviše vrijednosti antioksidativnog kapaciteta i masenih udjela polifenolnih spojeva i antocijana što ukazuje na to da su najbolji kandidati za daljni razvoj i primjenu u *zelenoj* ekstrakciji.

Gljučne riječi: antioksidacijski kapacitet, antocijani, eutektična otapala, komina grožđa, polifenolni spojevi

Rad sadrži: 43 stranice, 13 slika, 1 tablicu, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i digitalnom (CD) obliku pohranjen u: Knjižnici Prehrambeno– biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić
2. Doc.dr.sc. Kristina Radošević
3. Izv.prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
4. Prof.dr.sc. Verica Dragović Uzelac (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

PREPARATION OF GRAPE POMACE EXTRACTS USING EUTECTIC SOLVENTS AND TESTING THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

Ana Piškulić 617/MB

Abstract: In this paper grape pomace extracts are prepared by eight different deep eutectic solvents and ethanol, acidified ethanol and water and their composition is analyzed considering the total polyphenols, anthocyanins and their antioxidant capacity is determined. The biological activity of the prepared extract of grape pomace is examined *in vitro* on three cell lines (MCF-7, HeLa, HEK293T). Extracts of grape pomace in DESs have weaker cytotoxic effect on normal human cell HEK293T, than on the tumor cells, which suggests their possible antitumor effect. Extracts of grape pomace in choline chlorid:malic acid and choline chlorid:proline:malic acid have the highest value of antioxidant capacity and the mass fraction of polyphenols and anthocyanins which indicates that they are the best candidates for further development and use in the *green* extraction.

Keywords: antioxidative capacity, anthocyanins, deep eutectic solvents, grape pomace, polyphenolic compounds

Thesis contains: 43 pages, 13 figures, 1 table, 50 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and digital version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Kristina Radošević, Assistant professor

Reviewers:

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

Thesis defended: 29 Septembre 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KOMINA GROŽĐA	2
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI	4
2.2.1. Svojstva i podjela polifenola	4
2.2.2. Flavonoidi	4
2.2.3. Antocijani	5
2.2.4. Polifenoli komine grožđa.....	6
2.3. EKSTRAKCIJA POLIFENOLA.....	7
2.3.1. Eutektična otapala.....	8
2.3.1.1. Svojstva eutektičnih otapala	9
2.3.1.2. Primjena eutektičnih otapala.....	10
2.4. ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI.....	12
2.4.1. Ispitivanje biološke aktivnosti na kulturama stanica	12
2.4.2. Ispitivanje biološke aktivnosti polifenolnih ekstrakata grožđa	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Uzorci komine grožđa.....	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Humane stanične linije	17
3.1.4. Otopine i puferi.....	19
3.1.5. Uređaji i oprema	20
3.2. METODE	20
3.2.1. Sinteza eutektičnog otapala	20
3.2.2. Priprema ekstrakata komine grožđa.....	21
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu (FC) reagensom.....	22
3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana	22
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.....	23
3.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata komine grožđa na MCF-7, HEK293T i HeLa staničnoj liniji	24
3.2.6.1. Određivanje broja stanica metodom tripanplavo	25

3.2.6.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom.....	26
3.3. OBRADA PODATAKA	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA FOLIN- CIOCALTEAU (FC) REAGENSOM.....	28
4.2. ODREĐIVANJE ANTOCIJANA	30
4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ORAC METODOM.....	32
4.4. ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA NA MCF-7, HEK293T I HELA STANIČNOJ LINIJI.....	35
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA.....	39

1. UVOD

Danas je sve veća potražnja za namirnicama koje su bogate biološki aktivnim spojevima zbog njihovog pozitivnog učinka na zdravlje ljudi. To je posljedično dovelo do sve većeg interesa za iskorištavanjem otpadnih tvari prehrambene industrije, koje su bogate bioaktivnim spojevima. Tijekom proizvodnje vina nastane velika količina krutog otpada te se danas sve više pokušava taj otpad iskoristiti u druge svrhe. Komina grožđa je nusproizvod proizvodnje vina te se sastoji od prešane kože, oštećenih stanica pulpe, sjemenka i stabljike. Obzirom na bogat sadržaj polifenolnih spojeva, komina grožđa ima mogućnost primjene u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji kao prirodan izvor antioksidansa (Teixeira i sur., 2014).

Kako bi se izolirali polifenolni spojevi iz komine koriste se različite metode ekstrakcije. Klasične metode ekstrakcije su vremenski dugotrajne, niske učinkovitosti i potencijalno su štetne za okoliš zbog korištenja velikih količina organskih otapala. Danas se konvencionalne metode zamjenjuju alternativnim načinima ekstrakcije, kao što su primjena mikrovalova i ultrazvuka, koje imaju nekoliko prednosti: smanjenje trajanja ekstrakcije i količine potrebnog otapala, veći prinosi i bolja kvaliteta ekstrakata (Esclapez i sur., 2011). Također, osim zamjene tradicionalnih načina ekstrakcije, danas se sve više primjenjuju alternativna, *zelena* otapala. Da bi se otapalo kvalificiralo kao *zeleni* medij, mora zadovoljiti različite zahtjeve kao što su dostupnost, netoksičnost, biorazgradivost, mogućnost recikliranja, nezapaljivost i niža cijena s obzirom na druga otapala. Početkom 21. stoljeća počela su se koristiti eutektična otapala, koja zbog svojih povoljnih i dobrih svojstava pronalaze sve češću primjenu u kemijskoj sintezi, biotransformacijama i ekstrakcijama (Tang i Row, 2013). Eutektične smjese su smjese dva ili više spoja koja mogu biti tekuća i kruta te u određenom omjeru mogu tvoriti tekućinu (Kudlak i sur., 2015).

Cilj ovog rada bio je ispitati *in vitro* biološku aktivnost osam ekstrakata komine grožđa, dobivenih ultrazvučnom ekstrakcijom s eutektičnim otapalima, na humanim tumorskim staničnim linijama (MCF-7 i HeLa) te na normalnoj humanoj staničnoj liniji (HEK293T). Također, u pripremljenim ekstraktima komine grožđa ukupni polifenoli i antocijani određeni su pomoću metoda UV/Vis spektrometrije, a antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa spektrofluorimetrijskom ORAC metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMINA GROŽĐA

Grožđe (*Vitis vinifera*) je plod vinove loze koji ima dugu povijest uzgoja i iskorištavanja te je jedna od najvažnijih komercijalnih voćnih kultura u svijetu. Ovo voće se mnogo konzumira i velika je potražnja za proizvodima od grožđa zbog njihovog pozitivnog učinka na zdravlje (Georgiev i sur., 2014). Obzirom da je danas sve veća potražnja za namirnicama koje su bogate biološki aktivnim spojevima i nutrijentima, prehrambena industrija se okrenula mogućnostima iskorištavanja nusproizvoda, koji često obiluju biološki aktivnim sastojcima.

Grožđe (slika 1) se godišnje proizvodi više od 42 milijuna tona. Samo u Europi svake godine iz vinarija nastaje 14,5 milijuna tona nusproizvoda grožđa. Otpadni materijali iz proizvodnje vina sadrže razne bioaktivne tvari, a veliki udio čine polifenoli. Nusproizvodi proizvodnje vina su interesantni kako tehnolozima u proizvodnji tako i znanstvenicima, jer predstavljaju jeftin i vrlo obećavajući izvor polifenola, antioksidansa koji se mogu primjeniti kao dodaci prehrani s pozitivnim učinkom na zdravlje ljudi (Xia i sur., 2010).



Slika 1. Grožđe sorte Plavac mali (Anonymous 1, 2016)

Otpad iz vinarije se sastoji od biorazgradivih tvari: stabljike, kože i sjemenke grožđa. Jedan od nusproizvoda koji nastane tijekom proizvodnje mošta (soka od grožđa) je komina

grožđa (slika 2) (Teixeira i sur., 2014). Sastoji se od prešane kože, oštećenih stanica pulpe, sjemenka i stabljika (Anonymous 2, 2016). Sjemenke čine oko 40 % komine dok pokožica i pulpa čine oko 60 %. Više od 80 % ubranog grožđa koristi se za proizvodnju vina, a od ukupne biomase grožđa nakon proizvodnje vina, 20-25 % čini komina u kojoj zaostaje više od 70 % ukupnih polifenola iz grožđa. Kod proizvodnje bijelih vina, komina se odvaja odmah nakon prešanja, a kod crvenih vina prolazi djelomičnu maceraciju i fermentaciju i zatim se odvaja. Komparativne studije komina grožđa bijelih i crvenih vina pokazale su da komina grožđa crvenih vina sadrži veću količinu polifenola, flavonoida, antocijana i da ima veći antioksidativni potencijal. Mnogi su načini korištenja komine grožđa: kao funkcionalna hrana (dijetalna vlakna i polifenoli), u kozmetičkoj industriji (ulja i antioksidansi), u farmaceutske i biomedicinske svrhe, u prehrambenoj industriji kao bisurfaktant, za konzerviranje hrane te za proizvodnju limunske kiseline, metanola, etanola i ksantana (Teixeira i sur., 2014). Korištenje prirodnih antioksidansa iz komine u mesu i mesnim proizvodima ima mnoge prednosti nad upotrebom sintetskih antioksidansa.

Jedan primjer proizvoda od organske komine grožđa je Bioflavia koji se koristi u Kanadi. Sastoji se od osušenog praha komine grožđa i prodaje se u bocama koje sadrže 300 grama komine. Bioflavia se može dodavati u sokove ili neke druge napitke, može se koristiti tijekom kuhanja te kao zamjena za kvasac u kruhu (Dwyer i sur., 2014).

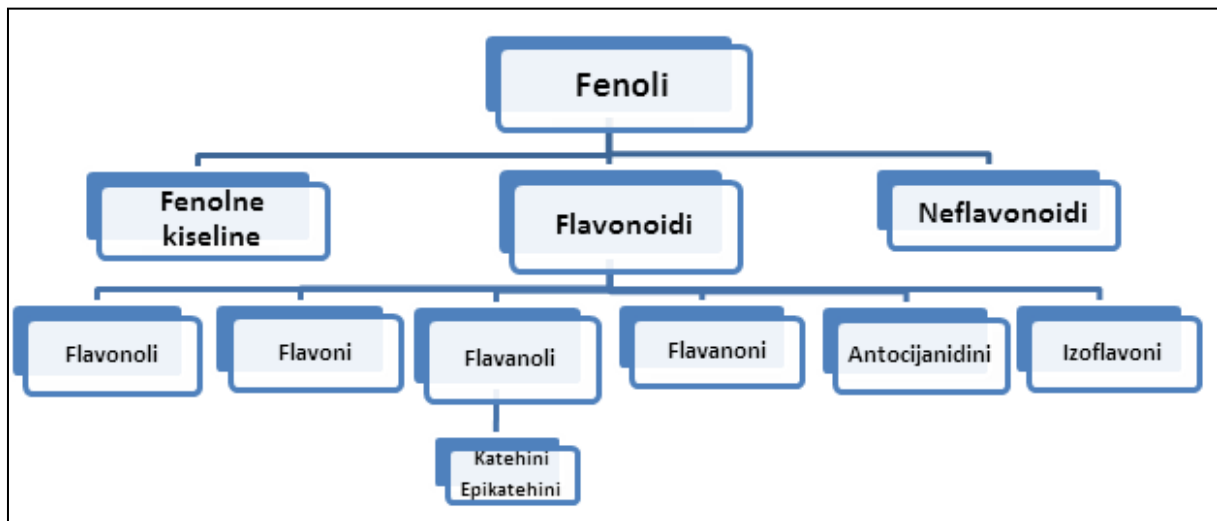


Slika 2. Komina grožđa (Anonymous 3, 2016)

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

2.2.1. Svojstva i podjela polifenola

Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji utječu na senzorska svojstva (boja, aroma i okus), utječu na otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima, indirektno utječu na rast biljke te štite osjetljive stanične dijelove od štetnog zračenja. Polifenoli uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture, od jednostavnih hidrosimetilnih kiselina i antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina čije je osnovno obilježje prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Jašić, 2010). Dijele se prema prirodi ugljikova kostura na fenolne kiseline, flavonoide i neflavonoidne fenole (slika 3). Najčešće imaju vezane razne šećerne skupine ili organske kiseline (Wahle i sur., 2010).

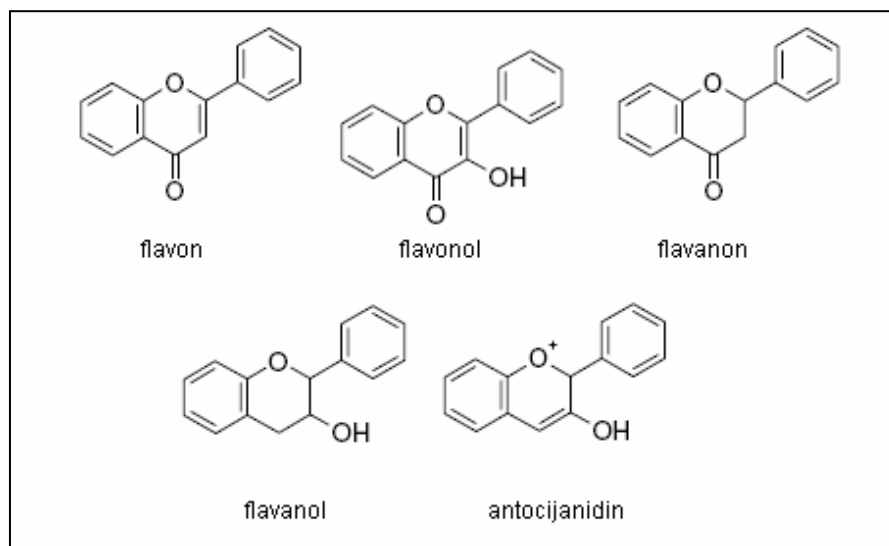


Slika 3. Podjela polifenolnih spojeva (Wahle i sur., 2010)

2.2.2. Flavonoidi

Dosad je identificirano više od 4000 flavanoida. Flavonoidi se definiraju kao biljni sekundarni metaboliti nastali kondenzacijom cimetine kiseline s tri malonil-CoA (Jašić, 2010). Flavonoidi su spojevi koji imaju istu osnovnu strukturu koju tvori difenilpropanski kostur (C6-C3-C6), dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom koji sadrži kisik, a razlikuju se u rasporedu hidroksil-, metoksi- i glikozidnih skupina te u vezi između A i B prstenova (Covell i sur., 2007). Podijeljeni su u 5 podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoni,

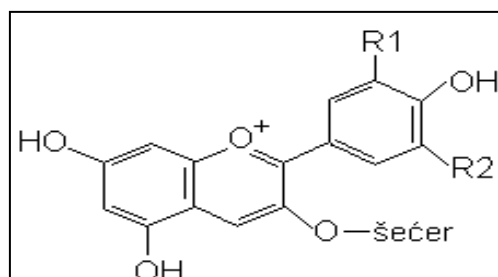
flavanoli i antocijanidini (slika 4). Obojeni flavonoidi odgovorni su za boju u mnogim vrstama voća i povrća, ali brojni bezbojni flavonoidi također su prisutni u prirodi. Male razlike u kemijskoj strukturi mijenjaju UV spektar flavonoida, zbog čega se lako razlikuju i kvantificiraju specifični spojevi u uzorku. Flavonoidi štite biljke od UV zračenja, kukaca i sisavaca biljojeda. Osim toga, oni pokazuju antimikrobno i antioksidativno djelovanje i povoljno djeluju kod raznih oboljenja u ljudi (Georgiev i sur., 2014).



Slika 4. Strukturne formule flavonoida (Anonymous 4, 2013)

2.2.3. Antocijani

Antocijani (slika 5) pripadaju skupini flavonoida. Oni su biljni pigmenti topivi u vodi koji cvijeću, voću i povrću daju plavu, purpurnu i crvenu boju. Antocijani su glikozidi antocijanidina s karakterističnom kemijskom strukturom flavonoida C6-C3-C6. Postoji šest osnovnih antocijanidina: cijanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin i malvidin, a vezanjem šećera na ove osnovne antocijanidine nastaju molekule antocijana (Jašić, 2010).



Slika 5. Osnovna struktura antocijana (Jašić, 2010)

Značajni su zbog njihove antioksidativne aktivnosti, koja igra ključnu ulogu u prevenciji neuroloških i kardiovaskularnih bolesti, tumorskih oboljenja i dijabetesa. Postoji nekoliko studija u kojima se navodi učinkovitost antocijana u tretmanu i prevenciji tumorskih oboljenja. Zbog ogromnog potencijala antocijana, kao prirodnih i neškodljivih pigmenata, sve je veći broj znanstvenih istraživanja sa ciljem poboljšanja izolacije, pročišćavanja i identifikacija antocijana, razvoja analitičkih metoda za njihovu detekciju, te uporabe u hrani i farmaceutskim proizvodima. Usprkos njihovom velikom potencijalu primjene u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, upotreba antocijana i dalje je ograničena zbog njihove relativne nestabilnosti i niskom udjelu prilikom ekstrakcije iz biljnog materijala (Ovando i sur., 2009).

2.2.4. Polifenoli komine grožđa

Polifenoli su najvažnije fitokemikalije koje se nalaze u grožđu koje sudjeluju u važnim biološkim procesima i važni su za zdravlje ljudi (Georgiev i sur., 2014). U nusproizvodima proizvodnje vina najčešće se nalaze polifenolni spojevi koji sadrže antocijanine, flavanole, flavonole, stilbene i fenolne kiseline (proantocijanidini, elaginska kiselina, mircetin, kvercetin, kaempferol i resveratrol). Na kemijski sastav grožđa općenito, pa tako i komine, utječu brojni čimbenici, kao npr. zrelost, vrsta, područje u kojem raste te uvjeti rasta (Georgiev i sur., 2014).

Protoantocijani (tanini) i antocijani su najzastupljeniji polifenoli crnog grožđa. Protoantocijani su polimeri flavan-3-ola, a glavne podjedinice polimera u komini su: katehini, epikatehini, epikatehin galat i epigalokatehini. Antocijani se u grožđu *Vitis vinifera* nalaze najčešće kao monoglukozidi pet antocijanidina: delfinidina, cijanidaina, petunidina, peonidina i najčešćeg malvidina; te manjih udjela njihovih derivata: acetatnih, kafeinskih i p-kumariskih estera (García-Beneytez i sur., 2003). U grožđu se iz skupine flavonoida, osim već spomenutih flavan-3-ola i antocijana, mogu nalaziti i flavonoli. Identificirano je 6 aglikona flavonola (kvarcetin, kamferol, mircetin, isorhamnetin, siringetin i laricitin) te 2 aglikona dihidroflavonola (Zhu i sur., 2012). Posljednjih nekoliko godina protoantocijani i antocijani privlače veliku pažnju jer imaju važnu ulogu u senzorskim svojstvima i nutritivnim vrijednostima bobice grožđa i vina (Zhu i sur., 2012).

Veliki je napredak postignut u razvoju ekstrakcije, analize i ispitivanja biološke aktivnosti polifenolnih spojeva iz grožđa. Grožđe i njegovi polifenolni spojevi pokazuju

različite biološke aktivnosti: antioksidativnu, antitumornu, antiinflamatornu, antimikrobnu te zaštita kardiovaskularnog sustava i spriječavanje starenja. Zbog svega navedenog te visoke koncentracije polifenolnih spojeva u komini grožđa, ona može poslužiti kao potencijalni izvor nutritivno vrijednih spojeva i funkcionalne hrane (Georgiev i sur., 2014).

2.3. EKSTRAKCIJA POLIFENOLA

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima (Drmić i Režek Jambrak, 2010). S obzirom na polaznu fazu iz koje se vrši ekstrakcija proces se dijeli na:

- ekstrakciju kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) - prijenos tvari odvija se iz krute faze, a ako se provodi otapalom koje nije lako hlapljivo naziva se *izluživanje*
- ekstrakciju tekuće-tekuće - prijenos tvari odvija se iz tekuće faze

Najraširenija, konvencionalna tehnika koja se koristi za izdvajanje polifenola iz komine grožđa je ekstrakcija kruto-tekuće. Kao otapalo koristi se etanol, metanol ili aceton s vodom u različitim omjerima (Teixeira i sur., 2014). Upotreba velikih količina organskih otapala predstavlja zdravstvene i sigurnosne rizike za istraživače, te je ekološki nepovoljno. Konvencionalne tehnike zahtijevaju primjenu opasnih i biološki nerazgradivih organskih otapala te zbog dugotrajnog vremena ekstrakcije može doći do degradacije bioaktivnih spojeva. Temperatura ekstrakcije je obično visoka kako bi se ubrzalo vrijeme ekstrakcije što također doprinosi degradaciji spojeva (Xia i sur., 2010). Interes za izolaciju bioaktivnih spojeva doveo je do razvoja boljih i učinkovitijih metoda ekstrakcije kako bi se izolirala što veća količina bioaktivnih spojeva u što kraćem vremenu i po nižoj cijeni (Esclapez i sur., 2011) te se sve više konvencionalne metode zamjenjuju alternativnim načinima ekstrakcije koje su osjetljivije, selektivnije, brže te ekološki prihvatljivije (Xia i sur., 2010).

Alternative metode ekstrakcije polifenolnih spojeva iz biljaka uključuju mikrovalnu, ultrazvučnu, visokotlačnu ekstrakciju te ekstrakciju pomoću superkritičnog fluida. Nekoliko je prednosti alternativnih metoda: smanjenje vremena ekstrakcije i količine potrebnog otapala, veći prinosi bolja kvaliteta ekstrakata što se tiče polifenolnog sastava i biološke aktivnosti (Teixeira i sur., 2014).

Posljednja dva desetljeća ultrazvučna ekstrakcija se često koristi kao učinkovita metoda ekstrakcije u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Esclapez i sur., 2011). Djelovanjem ultrazvuka povećava se bioraspoloživost mikronutrijenata zadržavajući pritom njihova izvorna svojstva. Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacije na stanični materijal, točnije stanične stijenke, omogućava bolje prodiranje otapala u materijal te se povećava prijenos mase. Na taj način ubrzava se ekstrakcija te se postiže veća učinkovitost. Pokazalo se da je ekstrakcija funkcionalnih spojeva iz pokožice grožđa bila 30% uspješnija pomoću ultrazvučne ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim načinima (Georgiev i sur., 2014). Učinkovitost ekstrakcije ovisi o primijenjenoj frekvenciji, intenzitetu ultrazvuka, vremenu tretiranja i polarnosti medija (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Glavne prednosti ultrazvučne ekstrakcije su veća učinkovitost, ušteda energije, lako izvođenje u laboratoriju pomoću ultrazvučne kupelji te korištenje umjerenih temperatura što je pogodno za sastojke osjetljive na visoke temperature (Esclapez i sur., 2011).

Osim primjene alternativnih metoda ekstrakcije, danas se sve više organska, konvencionalna otapala zamjenjuju alternativnim, *zelenim* otapalima. Prema načelima *zelene* kemije, odabir prikladne zamjene za organska otapala temelji se na sigurnosti radnika (toksičnost, kancerogenost, mutagenost, apsorpcija putem kože i respiratornog sustava), sigurnosti procesa (zapaljivost, eksplozivnost, hlapljivost, potencijal stvaranja peroksida), sigurnosti okoliša (ekotoksičnost, postojanost, kontaminacija podzemnih voda, uništavanje ozonskog omotača) i održivosti procesa (sposobnost recikliranja i mogućnost višekratne uporabe) (Kudlak i sur., 2015). Stoga, prema smjernicama *zelene* kemije, idealno otapalo treba biti kemijski i fizički stabilno, male hlapljivosti, jednostavno za uporabu te jednostavno za recikliranje s mogućnošću ponovne uporabe. Kao nova *zelena* otapala podrazumijevaju se bio-otapala, ionske kapljevine, voda, superkritične tekućine, reakcijski sustavi bez prisustva otapala i eutektična otapala (Tang i Row, 2013).

2.3.1. Eutektična otapala

Jedna vrsta *zelenih*, alternativnih otapala su eutektična otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DESs). Općenito, eutektično otapalo je smjesa nekoliko komponenti, koja ima nižu točku taljenja od pojedinačnih sastavnih komponenta. Takvo otapalo se lako može dobiti miješanjem dviju ili više komponenti pod jednostavnim radnim uvjetima (Tang i Row, 2013). U većini slučajeva, eutektično otapalo dobiva se miješanjem kvaterne amonijeve soli s

metalnim solima ili donorom vodika koji ima sposobnost formiranja kompleksa s halogenidnim anionom kvaterne amonijeve soli (Kudlak i sur., 2015).

Velik je broj spojeva koji se mogu koristiti za sintezu DES-ova. Razne vrste šećera i organskih kiselina mogu tvoriti homogenu tekućinu, kao što su jabučna kiselina, limunska kiselina s glukozom ili sorbitol i jabučna kiselina (Kudlak i sur., 2015). Jedna od najpopularnijih komponenti koja se koristi za formiranje DES-ova je kolin klorid koji je jeftin, biorazgradiv i netoksičan. Kolin klorid može tvoriti eutektično otapalo u smjesi s drugim sigurnim i nisko toksičnim komponentama kao što su urea, karboksilne kiseline ili polioli. Takva smjesa ima mnoge prednosti kao što su niska cijena, kemijska inertnost s vodom, jednostavna priprema i ekološki siguran profil. Kada su supstrati za pripremu DES-ova primarni metaboliti kao što su aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili derivati kolina tada govorimo o prirodnim eutektičnim otapalima (eng. *Natural deep eutectic solvents*, NADES). NADES-ovi u potpunosti zadovoljavaju načela zelene kemije (Paiva i sur., 2014).

2.3.1.1. Svojstva eutektičnih otapala

DES-ovi imaju slična fizikalno-kemijska svojstva kao i tradicionalno korištene ionske kapljevine, ali su puno jeftiniji i sigurniji za okoliš, najčešće imaju nisku toksičnost te se mogu brzo i jednostavno sintetizirati s biorazgradivim kemikalijama niskih cijena (Smith i sur., 2012). Važna fizikalna svojstva su gustoća, viskoznost i polarnost. Gustoća svih ispitanih prirodnih eutektičnih otapala je veća od vode. Viskoznost je jedna od najvažnijih karakteristika DES-ova, ovisi o udjelu vode i temperaturi, a budući da je najčešće visoka, to predstavlja njihov nedostatak i poteškoću pri primjeni. Sljedeće važno svojstvo je polarnost budući da utječe na kapacitet otapanja. Eutektična otapala koja se temelje na organskim kiselinama su najpolarnija (44,81 kcal mol⁻¹), slijede ona temeljena na aminokiselinama i šećerima koji imaju polarnost sličnoj vodi (48,21 kcal mol⁻¹). Dodatkom vode može se utjecati na polarnost šećernih i polialkohol baziranih eutektičnih otopina (Dai i sur., 2013a).

Biorazgradivost i biokompatibilnost DES-ova ovise o svojstvima tvari od kojih se sastoji otapalo (Kudlak i sur., 2015). Hayyan i sur. (2013a; 2013b) ispitivali su toksičnost DES-a (baziranih na kolin kloridu i fosfonijevom kationu) na dvije Gram-pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*), dvije Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) te na staničnoj kulturi larva račića *Artemia salina* - organizama koji se koriste za ispitivanje citotoksičnosti, prisutnosti mikotoksina, pesticida i teških metala.

Pokazano je da DES-ovi bazirani na kolin kloridu nemaju citotoksični utjecaj na baterijske kulture, dok su DES-ovi temeljeni na fosfonijevom anionu pokazali blagu antibakterijsku aktivnost. Citotoksični učinak se pokazao na staničnoj kulturi larva račića te je citotoksičnost DES-ova bila mnogo veća nego ona za svaku komponentu zasebno, što ukazuje na mogući sinergistički učinak tih tvari u DES-u. Razlog tomu može biti sama kemijska priroda DES-a (nastala kao posljedica interakcije donora vodikove veze i organske soli), ali i loš prijenos kisika u kulturi stanica u hranjivoj podlozi zbog povećane viskoznosti DES-a (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). Suprotno ovom istraživanju, Radošević i sur. (2016a) pokazali su da je DES kolin klorid:jabučna kiselina imao manji inhibitorski učinak na rast stanične linije ovarija kanalskog soma (CCO) u odnosu na samu jabučnu kiselinu. Pokazalo se da priroda donora vodikovih veza utječe na toksičnost samog DES-a. Paiva i sur. (2014) zaključili su da DES-ovi s limunskom i vinskom kiselinom imaju štetan utjecaj na preživljenje stanica. Međutim, iako DES-ovi s organskim kiselinama imaju veći toksičan učinak od DES-ova sa šećerima, ne treba zanemariti njihovu moguću primjenu, jer kisela svojstva poboljšavaju ekstrakciju nekih spojeva kao što su antocijani. Također, prema najnovijem istraživanju Hayyana i sur. (2015) može se očekivati i primjena DES-a kao potencijalnog antitumorskog agensa, ukoliko se sintetizira iz određenih kemikalija koje mogu ciljano djelovati na određeni tip stanica, poput tumorskih stanica.

Iz navedenih razloga, nužna su daljnja istraživanja toksikološkog profila DES-ova u višim organizmima, kao i bolje razumijevanje mehanizama interakcija, kako bi se bolje razumjele mogućnosti njihove primjene te potvrdila sigurnost njihove uporabe.

2.3.1.2. Primjena eutektnih otapala

Eutektna otapala su posljednjih godina zaokupila pažnju velikog broja znanstvenika kao potencijalna nova vrsta *zelenog* otapala prikladnog za kemijske/enzimske katalize, elektro-kemijske procese, ekstrakcije ili pretvorbu biomase. DES-ovi se koriste za biološku katalizu, organske sinteze, rastapanje, podmazivanje, za proizvodnju i pročišćavanje biodizela te u mnogim drugim područjima (Paiva i sur., 2014). Pokazalo se da ova otapala imaju veliku sposobnost otapanja CO₂ što omogućuje njihovu primjenu u pročišćavanju plinova, kao katalizatori te za fiksaciju CO₂ (Tang i Row, 2013).

DES-ovi koji se sastoje od glicerola mogu poslužiti kao alternativa za biokatalitičku proizvodnju biodizela. Pokazano je da smjesa kolin klorida i glicerola zadržava visoku

biokatalitičku aktivnost i da se može koristiti u enzimskoj transesterifikaciji triglicerida s etanolom što doprinosi većem iskorištenju reakcije (Paiva i sur., 2014).

Zbog svoje prilagodljivosti, netoksičnosti i biorazgradljivosti, eutektična otapala su pronašla svoju primjenu u području biomedicine. S obzirom da mogu otapati lijekove i time povećavaju njihovu topljivost i apsorpciju, u kombinaciji s ibuprofenom, biorazgradljivim prirodnim polimerima i superkritičnim CO₂, mogu se koristiti u proizvodnji lijekova, tkivnom inženjerstvu i drugim biomedicinskim postupcima (Smith i sur., 2012).

Nedavno, DES-ovi su se počeli koristiti za izolaciju polifenolnih spojeva iz različitih supstrata (Bi i sur., 2013), upravo zbog svojih dobrih fizikalno-kemijskih svojstva kao otapala (Dai i sur., 2014). Eutektična otapala su učinkovita u ekstrakciji polifenolnih spojeva zbog uspostavljanja vodikovih veza između molekula eutektičnih otapala i samih polifenolnih spojeva. Općenito, funkcionalne grupe koje su zadužene za vodikove interakcije su hidroksilne, karboksilne i amino od kojih se sve nalaze u eutektičnim otapalima, dok polifenolni spojevi sadrže samo hidroksilne grupe (Dai i sur., 2013b).

Nekoliko studija je pokazalo kako je ekstrakcija biološki aktivnih spojeva 10-100 puta učinkovitija u eutektičnim otapalima nego u vodi ili lipidima (Dai i sur., 2013b; Bi i sur., 2013). Za ekstrakciju polifenolnih spojeva u specifičnim ultrazvučnim uvjetima koristili su se 90 % glicerol-bazirani NADES-ovi. Rezultati pokazuju da glicerol:kolin klorid i glicerol:natrijev acetat pokazuju veću učinkovitost ekstrakcije polifenolnih spojeva s obzirom na 60 % vodenu otopinu etanola, te da dobiveni ekstrakti pokazuju znatnu antioksidativnu aktivnost (Mouratoglou i sur., 2016). U istraživanju Cvjetko-Bubalo i sur. (2016) ekstrakcija pomoću DES-ova (s različitim udjelima vode) bila je učinkovitija u odnosu na ekstrakciju s vodom i 70 % metanolom. Najučinkovitijim se pokazao DES kolin klorid:oksalna kiselina s udjelom vode od 25 %. Rezultati istraživanja su pokazali da najveću učinkovitost ekstrakcije antocijana ima DES kolin klorid:oksalna kiselina, a dalje slijede kolin klorid:jabučna kiselina>kolin klorid:jabučna kiselina:prolin>kolin klorid:glicerol>kolin klorid:sorboza. Antocijani su polarne molekule i bolje se otapaju u polarnijim otapalima. DES-ovi koji se sastoje od organskih kiselina su najpolarniji stoga pokazuju najveću učinkovitost ekstrakcije antocijana, dok DES-ovi sa šećerima i polialkoholima su manje polarni i pokazuju manju učinkovitost (Dai i sur., 2013b). Osim polarnosti, na ekstrakciju antocijana utječe i pH vrijednost s obzirom da stabilnost i struktura antocijana ovisi o pH. U području pH=1 prisutni su u obliku crvenog flavilium kationa, a u pH području od 2 do 4 u obliku plavog kinoidalna. U pH području od 5 do 6 kao karbinola pseduobaza i bezbojni halkon, a ako je pH iznad 7

antocijani se razgrađuju (Ovando i sur., 2009). Upravo zbog tog svojstva, kiseli DES-ovi kolin klorid:oksalna kiselina i kolin klorid:jabučna kiselina ekstrahirali su najveću količinu antocijana. Količina ekstrahiranih antocijana opada s opadanjem kiselosti otapala (Dai i sur., 2014). Kako bi se prirodna eutektična otapala našla u široj primjeni za ekstrakciju prirodnih spojeva iz biljnog materijala, potrebno je provesti još mnoga istraživanja uvjeta ekstrakcije, odabira komponenata eutektičnih otapala, metoda sinteze otapala, načina provedbe ekstrakcije te ispitivanja kako navedeni parametri utječu na učinkovitost procesa ekstrakcije (Dai i sur., 2013a).

2.4. ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

2.4.1. Ispitivanje biološke aktivnosti na kulturama stanica

Biološka aktivnost je svako djelovanje koje neka tvar/ekstrakt pokaže u nekom biološkom sustavu, od razine molekule do populacije. Ispitivanja biološke aktivnosti neke novo sintetizirane kemikalije ili izolirane tvari iz prirodnih izvora mogu se provoditi *in vivo* i *in vitro*. Danas se kad god je moguće *in vivo* metode ispitivanja zamjenjuju *in vitro* metodama, prvenstveno zbog što manjeg broja korištenih pokusnih životinja te zbog brojnih drugih prednosti.

In vitro testovi su razvijeni kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva, kulturama organa, itd. (Kniewald i sur., 2005). Pri tome se određuje učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za osnovne stanične funkcije kao što su rast i preživljavanje, što je zajedničko svim stanicama u organizmu. Kod provođenja *in vitro* testova primjenom staničnih linija najčešće se određuje tzv. bazalna citotoksičnost, a razvoj tih testova potaknut je iz znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. Prednosti uporabe *in vitro* testova su niža cijena u odnosu na *in vivo* testove, visok stupanj standardizacije, reproducibilnost i brzina izvođenja pri čemu nastaje manja količina toksičnog otpada te svakako dobrobit eksperimentalnih životinja. Nedostaci primjene takvih testova su nepotpuna ili u potpunosti odsutna metabolička aktivacija ispitivane tvari u staničnim sustavima, budući da te stanice ipak imaju izmijenjena svojstva u odnosu na ishodne *in vivo* stanice, te mogućnost reagiranja ispitivane tvari sa sastojcima medija za uzgoj. Osnovni cilj ispitivanja *in vitro* je osmisлити eksperiment koji će se moći jednostavno izvoditi, a da pri tome daje reprezentativne rezultate. Rezultati dobiveni primjenom različitih staničnih

linija mogu znatno varirati što ovisi o: metaboličkoj aktivnosti stanica, sastavu medija za uzgoj, temperaturi inkubacije, vremenu izlaganja i drugim faktorima. Potrebno je voditi računa o tome s kojom staničnom linijom se radi i na koji način ispitivana tvar može doći u kontakt s njome. Unatoč navedenom, dokazana je podudarnost 80 % rezultata istraživanja različitih *in vitro* testova s *in vivo* testovima (Fent, 2007).

Alternativni *in vitro* testovi u kulturama stanica imaju široku upotrebu, i mogu se između ostalog, koristiti za određivanja biološke aktivnosti potencijalno aktivnih tvari ili za ispitivanje citotoksičnosti, odnosno antitumorskog potencijala kako sintetskog lijeka u razvojnoj, predkliničkoj fazi tako i raznih biljnih ekstrakata i/ili spojeva izoliranih iz biljaka. Veliki broj različitih biljaka, uključujući voće i povrće, pokazuje antitumorsku aktivnost u *in vitro* istraživanjima te stoga predstavljaju potencijalni izvor farmakološki aktivnih spojeva koji se istražuju i usmjeruju ka razvoju novih antitumorskih lijekova. Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) 1990.g. predložio je primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje listu 60 humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih spojeva (malih sintetskih molekula ili prirodnih ekstrakata) u definiranim rasponima koncentracija. Cilj takvog pristupa je ustanoviti relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju i odabrati spojeve od interesa tj. one koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi za daljnja *in vivo* istraživanja. Također, primjenom *in vitro* testova moguće je pretpostaviti mehanizam djelovanja ispitivanog spoja (Covell i sur., 2007).

U *in vitro* testovima citotoksičnosti i/ili određivanja biološke aktivnosti spojeva najčešće se koriste razne stanične linije sisavaca, uključujući humane, te stanične linije riba. Dvije najveće kolekcije stanica, *American Type Culture Collection* (ATCC) i *The European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC), obuhvaćaju više od 3000 staničnih linija i izvor su staničnih linija za potrebe znanstvenih istraživanja. U ovom radu korištene su tri humane stanične linije, od kojih su dvije podrijetlom iz tumorskog tkiva MCF-7 i HeLa, a jedna iz normalnog, zdravog tkiva HEK293T.

Najčešće korištene *in vitro* metode za određivanje citotoksičnosti primjenom kultura stanica je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT) i neutral red (NR) test. MTT test se bazira na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan (Mosmann, 1983). NR test temelji se na nakupljanju boje neutral red u lizosomima živih stanica, a tvari koje uzrokuju oštećenja membrane inhibiraju nakupljanje ove boje (Borenfreund i Puerner, 1985). U primjeni su i

brojni drugi testovi kao što su: bojanje bojom kristal-ljubičasto, otpuštanje laktat dehidrogenaze (LDH), test proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a (Fent, 2001).

2.4.2. Ispitivanje biološke aktivnosti polifenolnih ekstrakata grožđa

Prirodni antioksidansi dodani u hranu mogu imati fiziološki utjecaj na ljudsko zdravlje te smanjiti rizik od raznih bolesti tako što smanjuju štetni učinak slobodnih radikala i umanjuju oksidativni stres. Oksidativni stres se javlja kada koncentracija reaktivnih spojeva prevlada sposobnost endogenih antioksidansa da ih uklone te je povezan s kroničnim degenerativnim bolestima uključujući kardiovaskularne bolesti, rak i neurodegenerativne bolesti (Georgiev i sur., 2014).

Nusproizvodi proizvodnje vina pomažu u sprječavanju oksidativnih reakcija, kardiovaskularnih bolesti te upalnih procesa. Na sadržaj i količinu bioaktivnih tvari utječu postupci proizvodnje vina kao i sama reciklacija nusproizvoda nakon proizvodnje vina (Teixeira i sur., 2014). Ekstrakti iz vina, soka grožđa te iz različitih dijelova grožđa su pokazali značajnu antioksidativnu aktivnost upravo zbog svog visokog sadržaja polifenola. Sok od grožđa, vino i komina imali su najvišu antioksidativnu aktivnost (Xia i sur., 2010). Ovim istraživanjima se pokazalo da komina sadrži značajne količine antioksidansa (antocijana, katehina, epikatehina, kvercetin i nekoliko fenolnih kiselina) te da se može koristiti kao izvor bioaktivnih spojeva za prevenciju oksidativnog stresa i upalnih stanja (Teixeira i sur., 2014).

Također, pokazalo se da polifenoli iz grožđa imaju mnoga korisna djelovanja koja uključuju antimikrobno, protuupalno, antioksidativno te antikancerogeno djelovanje. Nekoliko *in vivo* studija za sprječavanje oksidacije lipoproteina niske gustoće (eng. *Low Density Lipoprotein*, LDL) pokazalo je da polifenolni ekstrakti komine grožđa pozitivno utječu na smanjenje kolesterola te dovode do povećanja koncentracije lipoproteina visoke gustoće (eng. *High Density Lipoprotein*, HDL) kod eksperimentalnih štakora. Također se pokazalo da komina inhibira humanu endotelijsku NADPH oksidazu, enzim koji povećava proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta koji su odgovorni za nastanak oksidativnog stresa te tako smanjuje oksidativni stres.

Polifenolni ekstrakti iz komine pokazali su djelotvornu antimikrobnu aktivnost, učinkoviti su protiv nekih Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*,

Bacillus subtilis i *Bacillus coagulans*), te protiv Gram-negativnih bakterija, kao što su *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Također su pokazali antifungalno djelovanje protiv *Botrytis cinerea* (Teixeira i sur., 2014) i *Candida albicans* (Georgiev i sur., 2014).

Hudson i sur. (2007) pokazali su da je ekstrakt pokožice grožđa potaknuo apoptozu stanica tumora prostate. Antiproliferativno djelovanje polifenolnih spojeva pokazalo se kod različitih oblika raka uključujući rak dojke, jetre i debelog crijeva, ali molekularni mehanizmi djelovanja još nisu dovoljno istraženi. Stoga se očekuje da će se polifenoli iz grožđa koristiti za sprječavanje i liječenje ranije spomenutih bolesti (Xia i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci komine grožđa

U eksperimentalnom radu korišteni su uzorci komine grožđa sorte Plavac mali (berba 2015).

3.1.2. Kemikalije

0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD

6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
Betain, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Destilirana voda, PBF

Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Lonza, Verviers, Belgija

Etanol, Kemika, Zagreb, RH

FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, RH

Galna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Glicerol, Kemika, Zagreb, RH

Glukoza, Kemika, Zagreb, RH

Jabučna kiselina, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, RH

Kolin-klorid ($\geq 97\%$), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Limunska kiselina, Kemika, Zagreb, RH

MTS reagens, Promega Corporation, Madison, WI, SAD

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev hidrogensulfat, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb, RH

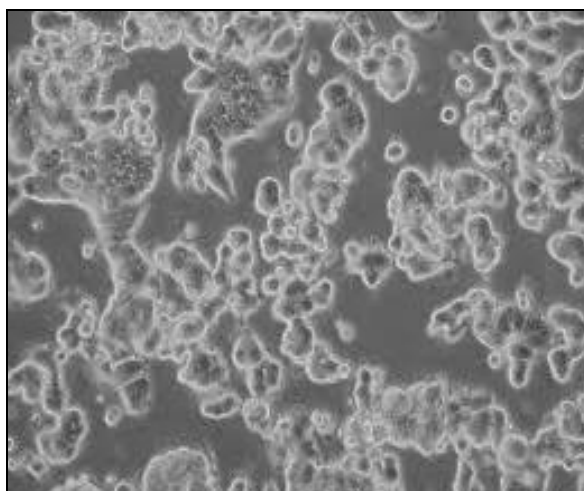
Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Prolin, Kemika, RH Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su tri humane stanične linije: MCF-7, HeLa i HEK293T.

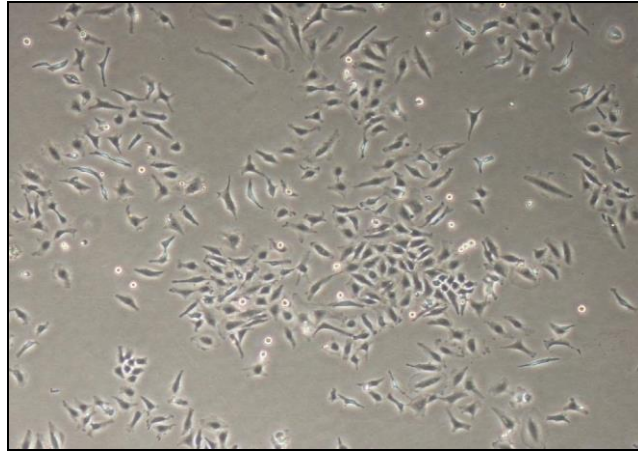
MCF-7 je stanična linija tumora dojke (slika 6) uspostavljena 1973. i naziv joj potječe od naziva instituta u Detroitu (eng. *Michigan Cancer Foundation-7*) gdje je stanična linija i uspostavljena. MCF-7 stanice su na listi NCI (NCI, 2016) i često se koristi u raznim istraživanjima spojeva za koje se pretpostavlja antitumorsko djelovanje (Anonymous 5, 2016).



Slika 6. MCF-7 stanična linija (Anonymous 5, 2016)

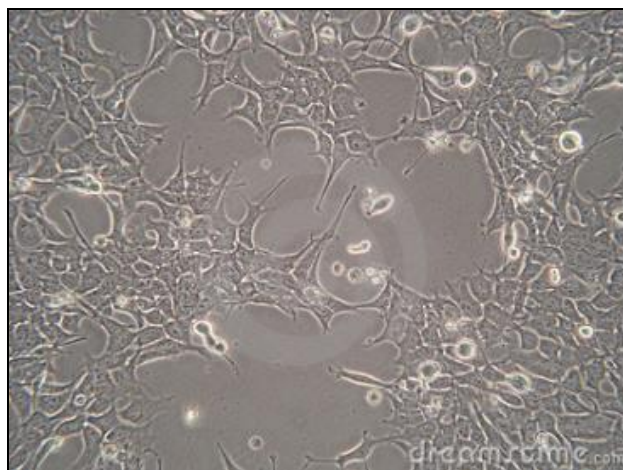
Prva humana stanična linija HeLa izolirana je i uspostavljena 1952.g., a potiče iz tumora grlića vrata maternice. To je najčešće korištena stanična linija u laboratorijima širom

svijeta, a istraživanja na HeLa stanicama (slika 7) doprinjela su mnogim otkrićima i znanjima vezanim za razumijevanje tumora, AIDS-a i mnogih drugih bolesti.



Slika 7. HeLa stanična linija (Anonymous 6, 2013)

HEK293T je stanična linija izolirana iz humanih embrionalnih stanica bubrega (slika 8). Staničnu liniju je 1970-ih kultivirao znanstvenik Alex Van der Eb u svojem laboratoriju na Sveučilištu u Leidenu u Nizozemskoj. Transformaciju je napravio Frank Graham kojem je to bilo 293. istraživanje te je po tome stanična linija imenovana. HEK293T stanična linija široko se primjenjuje zbog jednostavnosti rasta i transfekcije. Koristi se za mnoge transfekcijske eksperimente, posebno za razvoj adenovirusnih i retrovirusnih vektora (Anonymous 7, 2016).



Slika 8. HEK293T stanična linija (Anonymous 8, 2000)

Sve tri stanične linije su adherentnog tipa, a morfološki su epitelne stanice. Navedene stanice uzgajaju se u plastičnim T-bocama ravnih stijenci ili Petrijevim posudama kako bi se

održala biomasa stanica potrebna za potrebe postavljanja pojedinačnih pokusa, koji se najčešće provode u pločama s jažicama. Uzgoj stanica provodi se u inkubatoru. Optimalna temperatura za uzgoj ovih stanica je 37 °C i atmosfera koju čini 95 % zraka i 5 % CO₂. Medij koji je korišten za uzgoj i rast stanica je *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS). Stanice su uzgajane u Petrijevim posudama za stanične kulture i precijepljivane dva do tri puta tjedno.

3.1.4. Otopine i puferi

- PBS PUFER (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

- Puferi i otopine za određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom
 - Fosfatni pufer (0,2 M , pH=7)
 - Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode) 39 mL
 - Dinatrijev hidrogenfosfat (5,687 g do 200 mL destilirane vode) 61 mL
 - Destilirana voda do 200 mL

- Otopina fluoresceina
 - Ishodna otopina 1: otopiti 15 mg fluoresceina u 100 mL fosfatnog pufera (0,075 M)
 - Ishodna otopina 2: 100 µL ishodne otopine 1 nadopuniti sa 10 mL fosfatnog pufera (0,075 M)
 - Ishodna otopina 3: 50 µL ishodne otopine 2 nadopuniti sa 50 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

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

3.1.5. Uređaji i oprema

Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka

Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australia

Čitač ploča, Tecan Sunrise, Mannedorf, Švicarska

Hladnjak, Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka

Laboratorijska centrifuga, HC 240 Tehnica

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, lijevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)

Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke

Neubauer-ova komorica za brojanje stanica, Reichert Bright-Line, Buffalo, NY, SAD

Petrijeve posude za uzgoj kultura stanica, BioLite, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, SAD

Ploče s 96 jažica, BioLite, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, SAD

Sjeckalica, Rondo 500, Tefal, Francuska

UV-Vis spektrofotometar, GENESYSTM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

Ultrazvučna kupelj, Sonorex, Bandelin electronic, Njemačka

Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.2. METODE

3.2.1. Sinteza eutektnog otapala

Sve kemikalije za pripremu eutektnih otapala korištene su bez prethodnog pročišćavanja, a njihova odvaga se provodila na analitičkoj vagi. Za potrebe istraživanja pripravljeno je osam različitih DES-ova s udjelima vode od 30 % : betain:limunska kiselina,

betain:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza:glicerol te kolin klorid:limunska kiselina (tablica 1). Priprava se provodi u tikvici s okruglim dnom u kojoj se pomiješaju čvrste-čvrste ili čvrste-tekuće komponente eutektičnog otapala u molarnim omjerima kako je navedeno u tablici 1, uz udjel vode od 30 %. Reakcijska smjesa se zagrijava na magnetnoj mješalici do 3 sata na temperaturi od 40 do 60 °C uz neprestano miješanje, a reakcija je gotova kada se dobije bistro, tekuće i homogeno eutektično otapalo.

Tablica 1. Pripravljena eutektična otapala korištena u radu

Eutektično otapalo (DES)	Molarni omjer komponenata	Kratica
Betain:Limunska kiselina	1:1	B:Cit
Kolin klorid:Limunska kiselina	2:1	ChCl:Cit
Betain:Jabučna kiselina	1:1	B:Ma
Prolin:Jabučna kiselina	1:1	Pro:Ma
Kolin klorid:Prolin:Jabučna kiselina	1:1:1	ChCl:Pro:Ma
Jabučna kiselina:Glukoza:Glicerol	1:1:1	Ma:Glc:Gly
Kolin klorid:Jabučna kiselina	1:1	ChCl:Ma
Jabučna kiselina:Glukoza	1:1	Ma:Glc

3.2.2. Priprema ekstrakata komine grožđa

Za pripremu ekstrakata korištena je komina grožđa koja je odvagana i usitnjena sjeckalicom. Uz prethodno navedenih osam eutektičnih otapala, za ekstrakciju su korištena i tri konvencionalna otapala: voda, 70 % etanol i zakiseljeni 70 % etanol. Odvaganjoj količini

komine grožđa dodano je 10 mL određenog otapala te su tako priređene smjese stavljene u ultrazvučnu kupelj na 60 °C i provedena je ekstrakcija u trajanju od jednog sata. Nakon ekstrakcije, smjesa je centrifugirana 15 minuta pri 6000 o min⁻¹ i odvojen je supernatant od taloga, uklonjen pomoću Buchnerovog lijevka te spremljen do analize na +4 °C.

3.2.3. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu (FC) reagensom

FC reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se pri oksidaciji fenola reduciraju u plavo obojeni volframov oksid i molibdenov oksid. Nastali intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva.

Postupak određivanja

Pripremljene ekstrakte komine grožđa potrebno je razrijediti 20 puta destiliranom vodom. U posebnu epruvetu otpipetira se 0,25 mL razrijeđenog uzorka te se doda 1,25 mL FC reagensa. Nakon 5 min na sobnoj temperaturi dodaje se 1 mL Na₂CO₃ (75 g L⁻¹) te slijedi termostatiranje u vodenoj kupelji 5 min pri 50 °C. Reakcija se brzo zaustavi u ledenoj kupelji. Na UV/VIS spektrofotometru se mjeri apsorbanacija pri $\lambda = 760$ nm (Singleton i sur., 1999).

Izrada baždarnog dijagrama

Priredi se otopina standarda galne kiseline koncentracije 500 mg L⁻¹ te njena razrjeđenja koncentracija 10, 20, 30, 40 i 50 mg L⁻¹. Izmjerene vrijednosti apsorbanacije uzoraka nanesu se na ordinatu koordinatnog sustava, a koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹) nanesu se na apscisu. Pomoću računala se nacrtava baždarni pravac. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima.

3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana

Metoda za određivanje ukupnih antocijana temelji se na činjenici da se hidrogensulfitni ion veže na 2' položaju i prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko

oblik. Paralelni uzorak istovremeno se tretira destiliranom vodom. Spektrofotometrijski se određuje razlika apsorbancije u oba uzorka (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966).

Postupak određivanja je priprema otopine uzorka u koju se dodaje 1 mL uzorka, 1 mL etanola (96 %) s 0,1 % klorovodične kiseline i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. Otopini uzorka se u jednoj paraleli dodaje 4 mL destilirane vode, a u drugoj 4 mL 15 % otopine natrijevog hidrogensulfata. Nakon 15 minuta u obje otopine se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm.

Rezultati se izražavaju kao mg antocijana po g suhe tvari (s.t.) uzorka:

$$Ac = (875 \times (D1 - D2)) / \gamma \quad [1]$$

pri čemu je:

Ac – maseni udio antocijana u uzorku (mg g^{-1} s.t.)

875 – faktor preračunavanja

D1 – apsorbancija uzorka s 4 mL destilirane vode

D2 – apsorbancija uzorka s 4 mL 15 % otopine natrijevog hidrogensulfata

γ – masena koncentracija kumine u ekstraktu (g L^{-1})

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

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

Mjerenje ORAC vrijednosti

Mjerenje se provodi spektrofluorimetrijski pri temperaturi od 37 °C uz $\lambda_{\text{eks.}} = 485 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em.}} = 520 \text{ nm}$. Ekstrakti kumine grožđa razrijeđeni su 600 puta. U kivetu za mjerenje doda se 2,250 mL fluoresceina i 0,375 mL uzorka. Otopine se termostatiraju 30 min na 37 °C u vodenoj kupelji. Nakon 30 min dodaje se 0,375 mL otopine AAPH te se mjeri promjena

intenziteta fluorescencije svaku minutu. Na isti način napravi se i slijepa proba, ali se umjesto uzorka koristi fosfatni pufer (0,075 mol L⁻¹). Kao standard se koristi Trolox, iz osnovne otopine (500 μmol L⁻¹) pripreme se razrjeđenja.

Izračun ORAC-vrijednosti:

$$\text{Relativna ORAC - vrijednost} = \left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}} \right) \times k \times a \times h \quad [\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1} \text{ uzorka}] \quad [2]$$

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

pri čemu je:

AUC_U = antioksidacijski kapacitet uzorka

AUC_{SP} = antioksidacijski kapacitet slijepe probe

AUC_{TRX} = antioksidacijski kapacitet Troloxa

k = faktor razrjeđenja

a = molarna koncentracija Troloxa

$$h = \frac{V_{uzorka}}{S_{ekstrakta}} \quad [4]$$

3.2.6. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata komine grožđa na MCF-7, HEK293T i HeLa staničnoj liniji

Za vrijeme rada u laboratoriju s kulturama životinjskih stanica potrebno je održavati aseptične uvjete rada i koristiti sterilni laboratorijski pribor kako ne bi došlo do kontaminacije kulture stanica. MCF-7, HEK293T i HeLa stanice uzgajane su u Petrijevim posudama za potrebe održavanja stanica u kulturi te postavljanja pojedinačnih pokusa. Svakodnevno se pod

inverznim mikroskopom pratilo prihvaćanje stanica za podlogu, njihovo opće stanje, brojnost i morfologija stanica.

Stanice su održavane u eksponencijalnoj fazi rasta, a prije postavljanja pokusa tretirane su tripsinom kako bi se odvojile od podloge. Ukupan broj stanica izbrojan je u Neubauer-ovoj komorici metodom tripanplavo te je izračunat volumen suspenzije potreban za naciepljivanje ploče s 96 jažica i postavljanje pokusa sa svakom staničnom linijom pojedinačno. U svaku jažicu naciepljeno je 100 μL suspenzije stanica u početnoj koncentraciji od 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon 24 sata od naciepljivanja, odnosno nakon prihvaćanja stanica za podlogu, stanice su tretirane ekstraktima komine grožđa pripremljenih primjenom jedanaest različitih otapala. Ekstrakti su prije primjene na stanicama sterilno profiltrirani kroz 0,22 μm filtre. Svi ispitani ekstrakti dodani su u volumnom omjeru 12,5%, odnosno 12,5 μL sterilnog ekstrakta na 100 μL suspenzije stanica. Svaki pokus ponovljen je dva puta, a u pojedinačnom pokusu je za ispitanu koncentraciju postavljeno po 4 paralele. Kontrolne stanice su bile netretirane. Nakon 72 sata inkubacije i tretmana stanica ekstraktima komine grožđa, MTS metodom određeno je preživljenje stanica i izraženo kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice.

Kontrolne stanice su bile netretirane budući da je učinak samih DES-ova, koji su korišteni za pripravu testiranih ekstrakata, prethodno ispitan u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na istim stanicama koje su korištene u ovom radu (Milešević, 2016). Ni pri najvišoj ispitanoj koncentraciji DES-a (2000 mg L^{-1}) nije zapažen negativan učinak na rast stanica.

3.2.6.1. Određivanje broja stanica metodom tripanplavo

Za utvrđivanje broja stanica pomoću metode tripanplavo (0,4% m/v) potrebno je najprije ukloniti hranjivi medij, površinu za uzgoj isprati sterilnim PBS puferom i potom dodati potreban volumen tripsina. Stanice se potom stavljaju natrag u inkubator na oko 5 minuta kako bi se odvojile od površine pod djelovanjem tripsina što provjerimo pod inverznim mikroskopom. Stanice se resuspendiraju dodatkom određenog volumena kompletnog medija (DMEM + 10 % FBS) i alikvot suspenzije stanica (20 μL) pomiješa se s 20 μL boje tripanplavo. Zatim se 20 μL tako pripremljene suspenzije stanica nanese u Neubauer-ovu komoricu za brojanje. Plavo obojane stanice su mrtve stanice, koje se boje

plavo zbog oštećene membrane, te ih tako razlikujemo od živih stanica, koje su nebojane. Za svaki uzorak izračuna se broj stanica po mL suspenzije stanica prema izrazu:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \quad [5]$$

3.2.6.2. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se obično koristi za određivanje broja živih stanica u proliferacijskim testovima ili testovima citotoksičnosti. Princip testa baziran je na MTT metodi koju je opisao Mosmann (1983) kao brzu kolorimetrijsku metodu za praćenje stanične proliferacije i citotoksičnosti. Danas se koriste razne tetrazolijeve soli (MTS, WST-1 te XTT) koje su supstrati za djelovanje mitohondrijskih dehidrogenaza u živim stanicama. MTS test se temelji na bioredukciji nove tetrazolijeve soli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium u smeđi produkt koji je topiv u mediju za uzgoj stanica što ovaj test čini jednostavnim za korištenje, od originalnog MTT testa na kojem je temeljen. Količina nastalog formazanskog produkta određuje se mjerenjem apsorbancija uzorka pri 490 nm, a izmjerena apsorbancija direktno je proporcionalna broju živih stanica u uzorku.

Stanice su bile izložene različitim ekstraktima komine grožđa tijekom 72 sata, nakon čega je uklonjen medij s ispitivanim ekstraktima te je dodan svježi DMEM s MTS reagensom (10 μ L MTS reagens/100 μ L medija za uzgoj). Ploča sa stanicama se zatim vrati u inkubator na 3-4 sata. Po završetku inkubacije sadržaj ploče se protrese na tresilici kroz 15 do 30 s, a intenzitet razvijene boje određuje se spektrofotometrijski pomoću čitača ploča pri 490 nm. Postotak preživljenja stanica izračunat je kao omjer apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica prema izrazu:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \left[\frac{\text{srednja vrijednost A450(uzorka)}}{\text{srednja vrijednost A450(kontrola)}} \right] \times 100 \quad [6]$$

3.3. OBRADA PODATAKA

Sva mjerenja su provedena u triplicatu, tako da su rezultati prikazani kao prosječne vrijednosti dvaju iskazana zajedno sa standardnom devijacijom (\pm S.D.). Statistička analiza provedena je uporabom programa Statistica 7.1. Razlike između uzoraka su analizirane

ANOVA testom te post hoc Turkey's HSD testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini vjerojatnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Otkrićem i razvojem eutektičnih otapala, kao *zelenih* otapala, pokazale su se mnoge njihove prednosti za korištenje u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva naspram klasičnih organskih otapala. Ova otapala imaju sposobnost doniranja i prihvaćanja protona i elektrona zbog čega mogu formirati vodikove veze čime se povećava njihova sposobnost otapanja drugih spojeva. Istraživanjem Paive i sur. (2014), koji su proučavali ekstrakciju polifenolnih spojeva iz zrna zelene kave koristeći različita eutektična otapala, utvrđeno je da ta otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije polifenolnih spojeva (Paiva i sur., 2014).

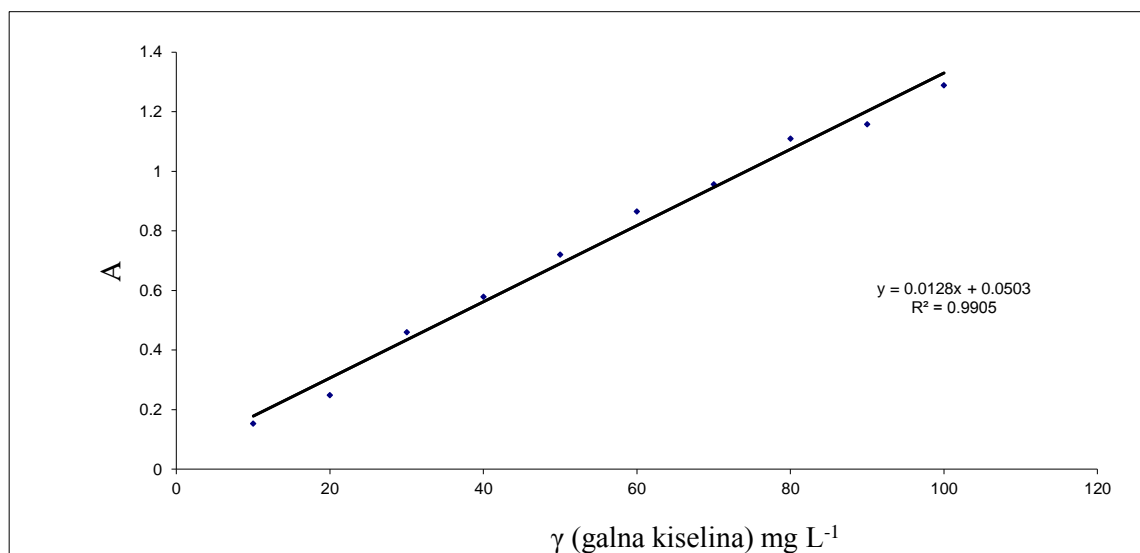
Obzirom da polifenolni spojevi imaju značajnu ulogu u sprječavanju raznih bolesti djelujući kao antioksidansi i kelatori te im se pripisuju antikancerogena, antiteratogena, protuupalna, antimikrobna, antialergijska i mnoga druga pozitivna svojstva u ovom radu su pripremljeni ekstrakti komine grožđa sorte Plavac mali primjenom osam različitih eutektičnih otapala: betain:limunska kiselina, kolin klorid:limunska kiselina, betain:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, kolin klorid:jabučna kiselina i jabučna kiselina:glukoza. Također su analizirani ekstrakti komine grožđa sorte Plavac mali pripremljeni u konvencionalnim otapalima: voda, 70 % etanol i zakiseljeni 70 % etanol.

U različito pripremljenim ekstraktima komine grožđa, analizirani su udjeli ukupnih polifenolnih spojeva i antocijana te antioksidacijski kapacitet. Ukupni polifenoli određeni su u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom uz galnu kiselinu kao standard, dok su ukupni antocijani određeni u reakciji vezanja hidrogensulfitnog iona na 2' položaj pri čemu se obojeni kation antocijana prevodi u bezbojni leuko oblik. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa analiziran je spektrofotometrijskom ORAC metodom. Nadalje, nakon provedene analize biološki aktivnih komponenti ekstrakata komine grožđa, testirana je njihova biološka aktivnost na HEK293T normalnoj staničnoj liniji te na humanim tumorskim stanicama: HeLa i MCF-7.

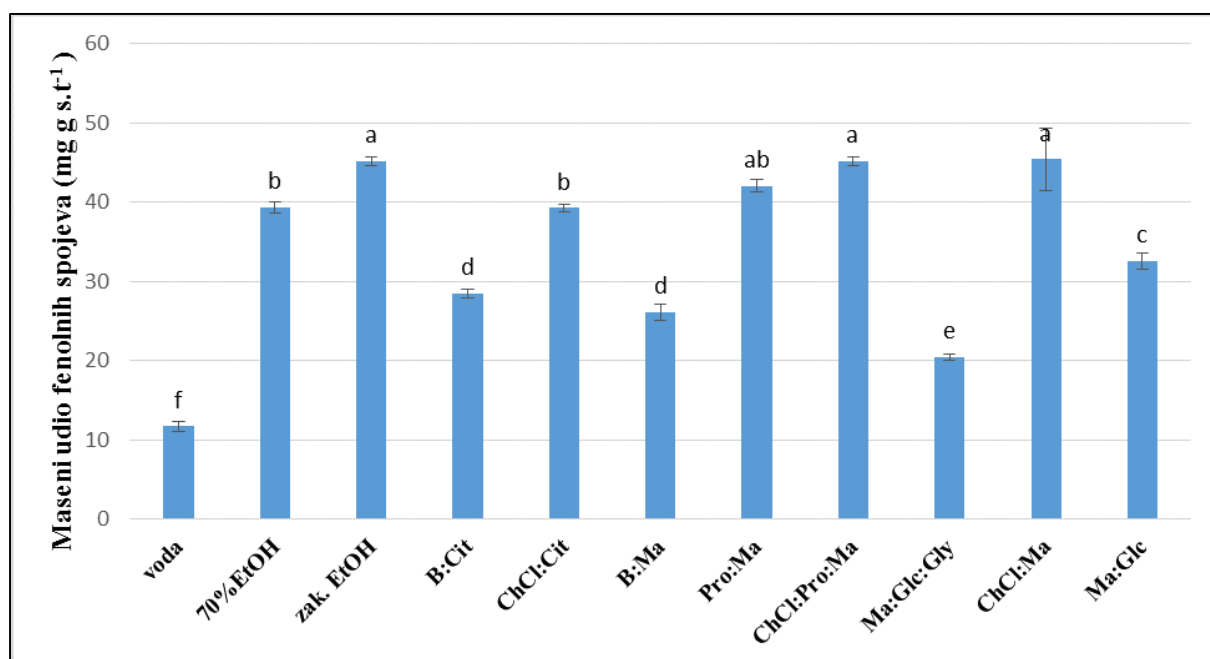
4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA FOLIN- CIOCALTEAU (FC) REAGENSOM

Kvantitativna metoda određivanja ukupnih polifenolnih spojeva provedena je u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom. Rezultati mjerenja izraženi su u mg galne kiseline po

gramu suhe tvari (s.t.) uzorka. Ovisnost koncentracije i apsorpcije za galnu kiselinu prikazana je baždarnim dijagramom (slika 9), a rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3) te su prikazani na slici 10.



Slika 9. Baždarni dijagram za galnu kiselinu s pripadajućim baždarinom pravcem koeficijentom determinacije (R^2)



Slika 10. Maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima komine grožđa *, **

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3), vrijednosti sa istim slovom (a-f) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.= suha tvar ** voda= vodeni ekstrakt, 70 % EtOH= ekstrakt pripremljen u 70 % etanolu, zak. EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom 70 % etanolu,

B:Cit=ekstrakt pripravljen u betain:limunska kiselina, ChCl:Cit=ekstrakt pripravljen u kolin klorid:limunska kiselina, B:Ma= ekstrakt pripravljen u betain:jabučna kiselina, Pro:Ma= ekstrakt pripravljen u prolin:jabučna kiselina, ChCl:Pro:Ma= ekstrakt pripravljen u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, Ma:Glc:Gly= ekstrakt pripravljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol, ChCl:Ma= ekstrakt pripravljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Ma:Glc= ekstrakt pripravljen u jabučna kiselina:glukoza

Dobiveni rezultati analize, izraženi na ekvivalent galne kiseline, pokazali su da se sa eutekničnim otapalom kolin klorid:jabučna kiselina ekstrahiralo najviše polifenolnih spojeva ($45,43 \pm 3,93 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$). Slična količina polifenola je ekstrahirana i s upotrebom otapala prolin:jabučna kiselina i kolin klorid:prolin:jabučna kiselina. Upotrebom prethodno navedenih tri otapala, dobiveni su slični rezultati ekstrakcije polifenolnih spojeva kao i kod ekstrakcije pomoću konvencionalnog otapala, zakiseljenog 70 % EtOH ($45,20 \pm 0,58 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$). S eutekničnim otapalom jabučna kiselina:glukoza:glicerol je ekstrahirano najmanje polifenolnih spojeva ($20,40 \pm 0,39 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$).

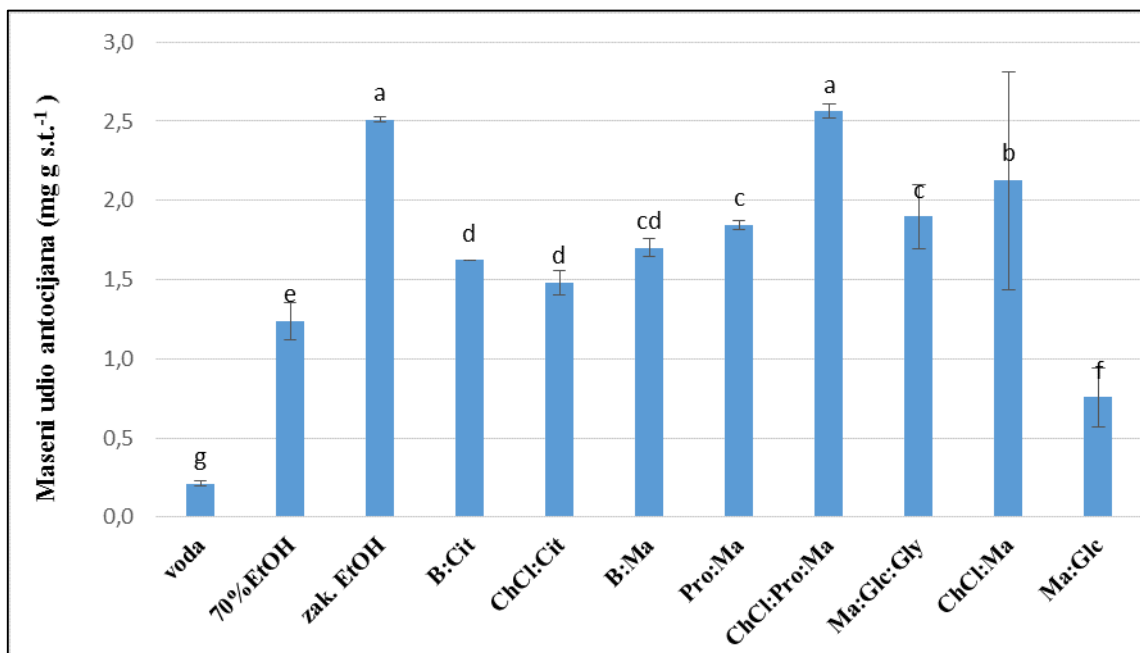
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da euteklična otapala ChCl:Ma, Pro:Ma i ChCl:Pro:Ma mogu konkurirati učinkovitosti ekstrakcije polifenolnih spojeva etanolom. U usporedbi s vodom sva su euteklična otapala postigla bolje rezultate ekstrakcije.

Rezultati istraživanja Radošević i sur. (2016b) pokazali su da je najviše ukupnih polifenola iz pokožice grožđa ekstrahirano s DES-om kolin klorid:fruktoza, a zatim slijede kolin klorid:jabučna kiselina > kolin klorid:ksiloza > kolin klorid:glukoza > kolin klorid:glicerol. Ekstrakcija je provedena i s 70 % metanolom radi usporedbe učinkovitosti i rezultati su potvrdili da NADES-ovi mogu poslužiti kao dobra zamjena za konvencionalna otapala za ekstrakciju. Količine ekstrahiranih ukupnih polifenola bile su od 18 do $100 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ što je u skladu našim rezultatima, gdje je najviše polifenola ekstrahirano s ChCl:Ma i rezultati su u rasponu od 11 do $45 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ Također, mnogi autori su svojim istraživanjima pokazali da je ekstrakcija polifenolnih spojeva učinkovitija pomoću DES-ova u odnosu na ekstrakciju s konvencionalnim otapalima ili uz pomoć vode ili masti (Woo Nam i sur., 2015; Bi i sur., 2013; Dai i sur., 2013a; Dai i sur., 2013b).

4.2. ODREĐIVANJE ANTOCIJANA

Kvantitativna metoda određivanja antocijana provodi se vezanjem hidrogensulfidnog iona na 2' položaj čime se prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Rezultati

mjerenja izraženi su u mg antocijana po g suhe tvari (s.t.) uzorka i prikazani su na slici 11 i izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D. (n =3).



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

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3), vrijednosti sa istim slovom (a-g) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.= suha tvar

** voda= vodeni ekstrakt, 70 % EtOH= ekstrakt pripremljen u 70 % etanolu, zak. EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom 70 % etanolu, B: Cit=ekstrakt pripremljen u betain:limunska kiselina, ChCl: Cit=ekstrakt pripremljen u kolin klorid:limunska kiselina, B: Ma= ekstrakt pripremljen u betain:jabučna kiselina, Pro: Ma= ekstrakt pripremljen u prolin:jabučna kiselina, ChCl: Pro: Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, Ma: Glc: Gly= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol, ChCl: Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Ma: Glc= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza

Rezultati mjerenja (slika 11) pokazuju da eutektično otapalo kolin klorid:prolin:jabučna kiselina najbolje ekstrahira antocijane ($2,56 \pm 0,04$ mg g⁻¹ s.t.), a jabučna kiselina:glukoza najslabije ekstrahira antocijane ($0,75 \pm 0,19$ mg g⁻¹ s.t.). Etanol se koristi kao otapalo u klasičnim načinima ekstrakcije antocijana. Rezultati pokazuju da DES ChCl:Pro:Ma nešto bolje ekstrahira antocijane od zakiseljenog 70 % EtOH. Ostala ispitana eutektična otapala imaju manju sposobnost ekstrakcije antocijana od zakiseljenog 70 % EtOH.

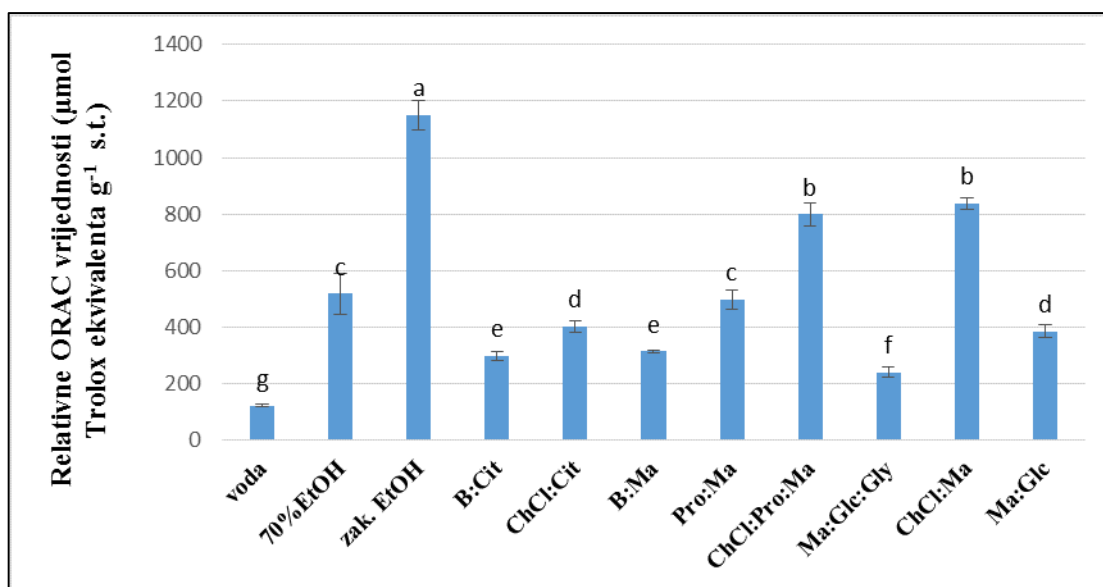
Radošević i sur. (2016b) istraživali su učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz pokožice grožđa primjenom NADES-ova kao otapala te su rezultati pokazali da je ChCl:Ma bio najučinkovitiji u ekstrakciji ukupnih antocijana što je u skladu s našim rezultatima gdje 70 % zakiseljeni etanol najbolje ekstrahira antocijane, zatim ChCl:Pro:Ma i ChCl:Ma.

Utjecaj polarnosti i pH vrijednosti DES-a na učinkovitost ekstrakcije antocijana iz pokožice grožđa primjenom različitih DES-ova ispitali su Cvjetko Bubalo i sur. (2016). Najveća količina ekstrahiranih antocijana postignuta je kako slijedi: kolin klorid:oksalna kiselina>kolin klorid:jabučna kiselina>kolin klorid:jabučna kiselina:prolin>kolin klorid:glicerol>kolin klorid:sorboza. Razlika u učinkovitosti ekstrakcije objašnjena je razlikom u polarnosti upotrijebljenih DES-ova, obzirom da su antocijani polarne molekule. DES-ovi sintetizirani iz organskih kiselina su najpolarniji i najbolji rezultati ekstrakcije ostvareni su upravo s kolin klorid:oksalna kiselina i kolin klorid:jabučna kiselina. Budući da molekularno stanje antocijana ovisi o pH, na učinkovitost ekstrakcije antocijana značajno utječe i pH otapala. Stoga se u već spomenutom istraživanju Cvjetko Bubalo i sur. (2016) kolin klorid:oksalna kiselina pokazao kao najbolji DES za ekstrakciju antocijana jer on, osim što je najpolarnije od svih korištenih otapala, ima i vrlo nisku pH vrijednost, što je važno za stabilnost antocijana. Obzirom da su antocijani polarne molekule i bolje se otapaju u polarnim i kiselim otapalima naši rezultati su u skladu s očekivanjem u kojima se DES kolin klorid:jabučna kiselina pokazao učinkovitim za ekstrakciju antocijana.

4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ORAC METODOM

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta prirodnih spojeva u hrani i biološkim sustavima danas postoji niz standardiziranih metoda, koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidansa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili keliranja metalnih iona, koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala. U ovom radu antioksidacijski kapacitet (AUC) različitih ekstrakata komine grožđa analiziran je ORAC metodom praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog radikala AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid) na fluorescentni spoj fluorescein. Prednosti ove metode su što se odvija u području fiziološkog pH i pri temperaturi od 37 °C te se koristi peroksil radikal sa redoks potencijalom i reakcijskim mehanizmom sličnom onome kakav se odvija u našem organizmu.

Rezultati se izražavaju u ekvivalentima Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina), tj. kao $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.t. Rezultati analize ekstrakata komine grožđa ORAC metodom izraženi su kao srednja vrijednost \pm S.D. (n =3), te su prikazani na slici 12.



Slika 12. Relativne ORAC vrijednosti za analizirane ekstrakte komine grožđa *, **

* rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (n=3), vrijednosti sa istim slovom (a-g) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom; s.t.= suha tvar

** voda= vodeni ekstrakt, 70 % EtOH= ekstrakt pripremljen u 70 % etanolu, zak. EtOH= ekstrakt pripremljen u zakiseljenom 70 % etanolu, B:Cit=ekstrakt pripremljen u betain:limunska kiselina, ChCl:Cit=ekstrakt pripremljen u kolin klorid:limunska kiselina, B:Ma= ekstrakt pripremljen u betain:jabučna kiselina, Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u prolin:jabučna kiselina, ChCl:Pro:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, Ma:Glc:Gly= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza:glicerol, ChCl:Ma= ekstrakt pripremljen u kolin klorid:jabučna kiselina, Ma:Glc= ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza

Najveći antioksidativni kapacitet, među ispitanim ekstraktima s DES-ovima, ima ekstrakt u kolin klorid:jabučna kiselina ($836,20 \pm 19,9847 \mu\text{mol TE g}^{-1}\text{s.t.}$) dok ekstrakt u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina ima nešto manji antioksidativni kapacitet ($798,64 \pm 39,73 \mu\text{mol TE g}^{-1}\text{s.t.}$). Ekstrakt u klasičnom otapalu za ekstrakciju (zakiseljeni 70 % EtOH) ima najveći antioksidativni kapacitet ($1150,19 \pm 52,26 \mu\text{mol TE g}^{-1}\text{s.t.}$), dok svi ekstrakti s DES-ovima imaju niži antioksidativni kapacitet. Najniži antioksidativni kapacitet ima ekstrakt u otapalu jabučna kiselina:glukoza:glicerol ($293,99 \pm 17,64 \mu\text{mol TE g}^{-1}\text{s.t.}$). Radošević i sur. (2016b) istraživali su nekoliko NADES-ova kao otapala za polifenolne ekstrakte pokožice grožđa te su rezultati pokazali da je od ispitanih ekstrakata najveću ORAC vrijednost imao ekstrakt s ChCl:Ma što se podudara s našim rezultatima, a dalje slijede kolin klorid:fruktoza > kolin klorid:ksiloza > kolin klorid:glukoza > metanol > kolin klorid:glicerol. ORAC vrijednost ispitanih ekstrakata bila je u rasponu od 111 do 371 mmol TE g⁻¹ s.t što se ne podudara s našim rezultatima gdje su ORAC vrijednosti niže (123-1150 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.t.)

Visoka ORAC vrijednost ekstrakta ChCl:Ma može biti rezultat, osim količine prisutnih polifenola, i antioksidativne aktivnosti samog NADES-a, jer je jabučna kiselina

dobro poznat antioksidans. Ispitivana je antioksidativna aktivnost NADES-ova pomoću ORAC metode. ORAC vrijednosti bile su u rasponu od 1,6 do 1,87 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s najvišim vrijednostima dobivenim za ChCl:Ma, nakon čega slijede Pro:Ma \approx B:Ma>Ma:Glc:Gly>ChCl:Pro:Ma \approx Ma:Glc>B:Cit \approx ChCl:Cit. Antioksidativno djelovanje ovih NADES-ova nije iznenađujuće obzirom da jabučna kiselina, limunska kiselina i prolin imaju antioksidativnu aktivnost (Tang i sur., 2013). Organske kiseline (jabučna i limunska), prolin i betain u čistom stanju pokazuju različita antioksidativna svojstva te rezultati pokazuju da NADES-ovi koji sadrže navedene spojeve imaju određenu antioksidativnu aktivnost, što se razlikuje sa zapazanjima Hayyan i sur. (2015). Njihovi NADES-ovi (u sastavu imaju kolin klorid i donore vodikovih veza kao što su glicerol, etilen glikol, trieten glikol i urea) ne pokazuju antioksidativnu aktivnost. Obzirom na sastav NADES-a vidi se da najmanju antioksidativnu aktivnost imaju NADES-ovi koji sadrže limunsku kiselinu (ChCl:Cit i B:Cit), za razliku od ostalih koji sadrže jabučnu kiselinu. Iako Triantis i sur. (2001) nisu mjerili antioksidativnu aktivnost NADES-a, vidi se poveznica između rezultata. Oni su na temelju rezultata PSCL metode pokazali da aditiv jabučna kiselina (E296) ima puno veću antioksidativnu aktivnost od limunske kiseline (E330).

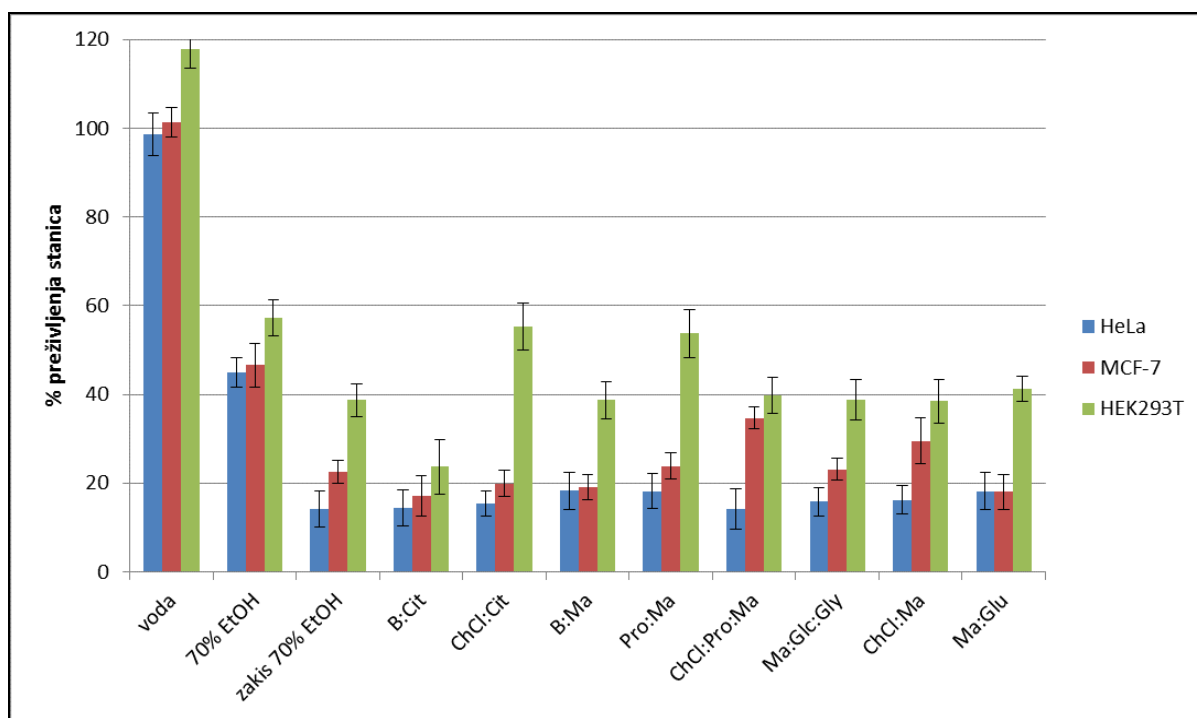
Zanimljivo je napomenuti da su ORAC vrijednosti ChCl:Ma barem 25% veće nego kod drugih NADES ekstrakta, koje nisu rezultat sadržaja fenolnih spojeva, što ukazuje da neki drugi faktori utječu na ukupnu antioksidativnu aktivnost ChCl:Ma ekstrakta. Ta razlika može biti rezultat antioksidativnog djelovanja samog NADES-a, obzirom da je jabučna kiselina poznat antioksidans (Tang i sur., 2013). Također, u istraživanju Radošević i sur. (2016b) NADES ChCl:Ma imao je najveću antioksidativnu aktivnost što također može biti rezultat same jabučne kiseline. Sličan učinak je također uočen u istraživanju ekstrakcije *Flos sophorae* pomoću NADES-a koji sadrži L-prolin i glicerol, u kojem je povećanje antioksidativne aktivnosti rezultat aktivnosti L-prolina koji veže reaktivne kisikove vrste (Woo Nam i sur., 2015), što se podudara s našim rezultatima obzirom da ekstrakt ChCl:Pro:Ma ima sličnu ORAC vrijednosti kao i ekstrakt ChCl:Ma.

U usporedbi s udjelom ukupnih polifenola, rezultati su u korelaciji, ekstrakti u ChCl:Ma i u ChCl:Pro:Ma imaju visoki udio ukupnih polifenola i visoke ORAC vrijednosti, dok ekstrakt u Ma:Glc:Gly ima niski udio ukupnih polifenola i nisku ORAC vrijednost.

4.4. ISPITIVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA NA MCF-7, HEK293T I HELA STANIČNOJ LINIJI

In vitro testovi određivanja biološke aktivnosti služe kao sredstvo za odabir spojeva koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi za daljnja *in vivo* istraživanja (Covell i sur., 2007). Obzirom da niz epidemioloških i znanstvenih istraživanja ukazuju na pozitivne zdravstvene učinke spojeva prisutnih u grožđu, provedeno je ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata komine grožđa pripremljenih primjenom eutektičkih otapala, kao novih, boljih i ekološki prihvatljivih sredstava za ekstrakciju. Određivanje njihovog učinka na stanice u kulturi provedeno je na dvije tumorske humane stanične linije (HeLa i MCF-7) te na normalnoj staničnoj liniji HEK293T.

MCF-7, HEK293T i HeLa stanice nacijepljene su u ploče s 96 jažica u početnoj koncentraciji 3×10^4 stanica mL^{-1} i nakon 24 sata stanice su tretirane s ekstraktima komine grožđa. Nakon 72 sata tretmana, MTS metodom određeno je preživljene stanice. Rezultati mjerenja su izraženi kao % preživljena tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice i prikazani su na slici 13.



Slika 13. Utjecaj ekstrakata komine grožđa dodanih u omjeru 12,5% (v/v) na MCF-7, HEK293T HeLa stanice

Iz dobivenih rezultata može se uočiti da svih osam ekstrakata komine grožđa pripremljenih s eutekničnim otapalima imaju inhibitorni učinak na rast stanica. Postotak inhibicije kod ekstrakata pripremljenih s DES-ovima sličan je onome kao i kod konvencionalnog, klasičnog otapala za ekstrakciju (zakiseljeni 70 % EtOH) te iznosi 14,18% do 55,26%. Veći postotak preživljenja stanica zapažen je samo kod ekstrakata pripremljenih s vodom i 70 % etanolom. Također, može se primijetiti da je kod svih ispitanih ekstrakata veći postotak preživljena HEK293T stanica, koje su podrijetlom iz zdravog tkiva, nego tumorskih MCF-7 i HeLa stanica što je obećavajući rezultat, koji potvrđuje antitumorski učinak polifenolnih spojeva i ukazuje na dobar potencijal primjene eutekčnih otapala za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa. Obzirom na netoksičnost samih DES-ova, možemo pretpostaviti i eventualnu primjenu tako pripremljenih ekstrakata komine grožđa kao dodataka prehrani s mogućim pozitivnim učinkom na zdravlje ljudi.

Xia i sur. (2010) ispitivali su antiproliferativno djelovanje polifenolnih spojeva iz grožđa te su ispitani ekstrakti pokazali inhibitorni učinak na rast stanica tumora dojke, jetre i debelog crijeva, što se podudara s našim rezultatima u kojima su ekstrakti komine grožđa inhibitorno djelovali na rast tumorskih staničnih linija. Također, (Hudson i sur., 2007) pokazali su da ekstrakti pokožice grožđa potiču apoptozu stanica tumora prostate. Hayyan i sur. (2015) dokazali su inhibitorno djelovanje ekstrakata s DES-ovima na niz tumorskih staničnih linija što također ukazuje na njihov mogući antitumorski potencijal te je u skladu s našim rezultatima.

Budući da nisu zapažene značajne razlike u postocima preživljenja stanica tretiranih različitim ekstraktima komine grožđa u DES-ovima, koje bi se mogle dovesti u korelaciju s ukupnim antocijanama, ukupnim polifenolima i ORAC vrijednošću, potrebna su daljnja *in vitro* ispitivanja navedenih ekstrakata u širem rasponu koncentracija i različitim vremenskim trajanjem tretmana.

Na temelju ispitivanja biološke aktivnosti pripremljenih ekstrakata komine grožđa ne može se odabrati najbolji DES za tu namjenu, ali kvantitativne analize su pokazale da ekstrakti u otapalima kolin klorid:jabučna kiselina i kolin klorid:prolin:jabučna kiselina imaju visoke vrijednosti antioksidativnog kapaciteta, ukupnih polifenolnih spojeva i antocijana što ukazuje na to da su eutekčne smjese obećavajuća otapala za daljnji razvoj i primjenu u zelenoj ekstrakciji. Stoga smatramo da će daljnja optimizacija ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz komine grožđa primjenom eutekčnih otapala odgovarajućih svojstava te nastavak istraživanja njihove biološke aktivnosti primjenom *in vitro* metoda rezultirati vrijednim

rezultatima s mogućom primjenom u ljudi, što će svakako biti predmet naših daljnjih istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine grožđa najučinkovitija je s eutektnim otapalom kolin klorid:jabučna kiselina te potom s kolin klorid:prolin:jabučna kiselina.
2. Ekstrakcija antocijana iz komine grožđa najučinkovitija je upotrebom eutektnog otapala kolin klorid:prolin:jabučna kiselina te kolin klorid:jabučna kiselina.
3. Analizom antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom utvrđeno je da je antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa u korelaciji s udjelom polifenolnih spojeva i antocijana. Ekstrakti komine grožđa u kolin klorid:jabučna kiselina i kolin klorid:prolin:jabučna kiselina imaju najviše vrijednosti antioksidativnog kapaciteta i masenih udjela polifenolnih spojeva i antocijana.
4. Inhibitorni učinak ekstrakata komine grožđa pripremljenih primjenom eutektnih otapala je zapažen na sve tri stanične linije i nešto je izraženiji nego kod ekstrakta s klasičnim otapalom zakiseljenim 70 % etanolom.
5. Ekstrakti komine grožđa u eutektnim otapalima imaju slabiji citotoksični učinak na normalnu humanu staničnu liniju HEK293T, nego na tumorske HeLa i MCF-7 stanice, što upućuje na njihov mogući antitumorski učinak, koji je potrebno nadalje istražiti.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016) Plavac mali, <<http://www.agroklub.com/vinogradarstvo/hrabro-investirali-u-struku-i-kvalitetu-i-uspjeli/17771/>> . Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Anonymous 2 (2016) Komina grožđa, <<http://www.iris-eng.com/grape-pomace-a-winery-waste-or-a-functional-food/>> . Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Anonymous 3 (2016) Komina grožđa, http://stemcellrenewal.com.au/stem_cell_circulation/. Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Anonymous 4 (2013) Osnovna struktura antocijana, <<http://www.pbf.unizg.hr/hr/content/download/23256/91108/version/1/file/Zacinsko+i+aromatsko+2013+5.pdf>>. Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Anonymous 5 (2016) MCF-7 stanice, <<http://www.celeromics.com/en/Support/cell-lines/mcf-7.php>> . Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Anonymous 6 (2013) HeLa stanice, <<http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/30969.html>> . Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Anonymous 7 (2016) HEK293T stanice, <<http://www.hek293.com/>> . Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Anonymous 8 (2000) HEK293T stanična linija, <<http://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photos-cells-microscope-2-image2842928>> . Pristupljeno 24. lipnja 2016.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-product: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203.

Bi, W., Tian, M., Row, K. H. (2013) Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A.* **1285**, 22-30.

Borenfreund, E., Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**, 119-124.

- Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical. Bio. Med.* **14**, 303-311.
- Covell, D. G., Huang, R., Wallqvist, A. (2007) Anticancer medicines in development: assessment of bioactivity profiles within the National Cancer Institute anticancer screening data. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2261-2270.
- Cvjetko-Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević-Ganić, K., Radojčić-Redovniković, I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.* **200**, 159-166.
- Dai, Y., Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61-68.
- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013b) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**, 6272-6278.
- Dai, Y., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2014) Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chem.* **159**, 116-121.
- Drmić, H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva (Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds). *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.
- Dwyer, K., Hosseinian, F., Rod, M. (2014) The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *J. Food Res.* **3**, 91-106.
- Esclapez, M. D., Garcia-Perez, J. V., Mulet, A., Carcel, J. A. (2011) Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng. Rev.* **3**, 108-120.
- Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assesment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and enviromental samples. *Toxicol. in Vitro* **15**, 477-488.
- Fent, K. (2007) Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. *Special issue* **24**, 26-28.

- Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., Revilla, E. (2003) Analysis of Grape and Wine Anthocyanins by HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5622-5629.
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V., (2014) Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients* **6**, 391-415.
- Hayyan, M., Hayyan, A., Hashim, M. A., Alnashef, I. (2013a) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455-459.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013b) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193-2195.
- Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A. (2015, 13. veljače) In Vitro and In Vivo Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLoS ONE* **10**, e0117934. doi:10.1371/journal.pone.0117934
- Hudson, T. S., Hartle, D. K., Hursting, S. D., Nunez, N. P., Wang, T. T. Y., Young, H. A., Arany, P., Green, J. E. (2007) Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer Res.* **67**, 8396-8405.
- Jašić, M. (2010) Uvod u biološki aktivne komponente hrane. <http://prirodnamedicina.org/knjige/M.Jasic---Uvid_u_aktivne_bioloski_aktivne_komponente_hrane.pdf>, pristupljeno 02. lipnja 2016.
- Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 195-204.
- Kudlak, B., Owczarek, K., Namiesnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **16**, 11975-11992.
- Milešević, M. (2016) Priprava i karakterizacija prirodnih eutektičnih otapala. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63.

Mouratoglou, E., Malliou, V., Makris, D. P. (2016) Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass. *Waste Biomass Valor.* 1-11.

NCI-National Cancer Institute (2016) <https://ntp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.html> . Pristupljeno 02. lipnja 2016.

Ovando, A. C. , Hernandez, L. P., Hernandez, E. P., Rodriguez, J. A., Galan-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113**, 859-871.

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L. (2014) Natural deep eutectic solvents-solvents for 21st century. *ACSSustainable Chem. Eng.* **2**, 1063-1071.

Radošević, K., Železnjak, J., Cvjetko-Bubalo, M., Radojčić-Redovniković, I., Slivac, I., Gaurina-Srček, V. (2016a) Comparative in vitro study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. *Ecotox. Environ. Safe.* **131**, 30-36.

Radošević, K., Čurko, N., Gaurina-Srček, V., Cvjetko-Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević-Ganić, K., Radojčić-Redovniković, I. (2016b) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *Food Sci. Technol.* **73**, 45-51.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal - Paris.* **48**, 188-196.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela – Raventós, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* **299**, 152-178.

Smith, E. L., Abbott, A.P., Ryder, K. S. (2012) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060-11082.

Tang, B., Row, K. H. (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh. Chem.* **144**, 1427-1454.

Tang, X., Liu, J., Dong, W., Li, P., Li, L., Lin, C., Zheng, Y., Hou, J., Li, D. (2013) The Cardioprotective Effects of Citric Acid and L-Malic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Evid-based Compl. Alt.* **2013**.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, Diego A., Garcia-Viguera, C. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638-15678.

Triantis, T., Papadopoulou, K., Dimotikali, D., Nikokavouras, J. (2001) Evaluation of food antioxidant activity by photostorage chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta.* **2**, 263-268.

Wahle, K. W., Brown, I., Rotondo, D., Heys, S. D. (2010) Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.* **698**, 36-51.

Woo Nam, M., Zhao, J., Sang Lee, M., Hoon Jeong, J., Lee, J. (2015) Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from Flos sophorae. *Green Chem.* **17**, 1718-1727.

Xia, E.Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 622-646.

Zhu, L., Zhang, Y., Lu, J. (2012) Phenolic Contents and Compositions in Skins of Red Wine Grape Cultivars among Various Genetic Backgrounds and Originations. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3492-3510.