

Biološka aktivnost ekstrakata iz otpada proizvodnje kaka

Belavić, Viktorija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:861210>

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
Preddiplomski studij Biotehnologija

Viktorija Belavić
7188/BT

**BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA IZ OTPADA
PROIZVODNJE KAKAA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: HRZZ 9550,
Zelena otapala za zelene tehnologije
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2019.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Kristine Radošević te uz pomoć Manuele Panić, mag.ing.bioproc.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na vodstvu, savjetima i prenesenom znanju tijekom izvođenja i pisanja ovog rada. Veliko hvala i Manieli Panić, mag.ing.bioproc. na uloženom trudu i vremenu, susretljivosti, strpljivosti, eksperimentalnoj pomoći te pomoći oko pisanja ovog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom školovanja.

Hvala mom M., što uvijek vjeruje u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA IZ OTPADA PROIZVODNJE KAKAA

Viktorija Belavić, 0058208091

Sažetak: Brojna epidemiološka ispitivanja ukazuju da otpad proizvodnje kakaa sadrži prirodne antioksidanse, polifenolne spojeve koji imaju pozitivan učinak na ljudski organizam. Postoji veliki interes za dodatno iskorištavanje tog otpada, jer je još uvijek bogat polifenolnim spojevima. Industrija se okreće zelenim, održivim tehnologijama te se tako za izolaciju polifenolnih spojeva sve više upotrebljavaju alternativne metode poput ekstrakcije prirodnim eutetičkim otapalima (NADES). U ovom radu korišteni su ekstrakti otpada nastalog prilikom obrade kakaa pripremljeni pomoću 6 prirodnih eutetičkih otapala, jednom prirodnom ionskom kapljevnom i jednim konvencionalnim otapalom. Također, ispitan je i učinak izoliranih polifenola iz pripremljenog ekstrakta pomoću betain:glukoza. Antioksidacijski kapacitet određen je ORAC metodom i najvišu vrijednost ima ekstrakt pripremljen pomoću NADES-a betain:glukoza. Biološka aktivnost ispitana je u *in vitro* uvjetima na tumorskoj staničnoj liniji HeLa te normalnoj staničnoj liniji HaCaT. Testirani ekstrakti i izolirani ukupni polifenoli pokazali su blagi inhibitorni učinak na HeLa staničnu liniju te inducirajući učinak na rast HaCaT staničnu liniju.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, *in vitro* biološka aktivnost, polifenolni spojevi, prirodna eutetička otapala, prirodni antioksidansi

Rad sadrži: 33 stranice, 10 slika, 2 tablice, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag.ing.bioproc.

Datum obrane: 09. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM WHOLE COCOA BEANS

Viktorija Belavić, 0058208091

Abstract: Numerous epidemiological studies indicate that whole cocoa beans contain natural antioxidants, polyphenolic compounds which have positive effects on human health. There is a great interest for additional exploitation of this waste because it is still rich in polyphenolic compounds. The industry is turning to green, sustainable technologies so that alternative methods such as natural deep eutectic solvent (NADES) extraction are increasingly being used to isolate polyphenolic compounds. In this work, extracts from whole cocoa beans were prepared using 6 natural deep eutectic solvents, one natural ionic liquid and one conventional solvent. The effect of isolated polyphenols from the prepared extract using betaine:glucose was also examined. The antioxidant capacity was determined by the ORAC method and the highest value was observed in extract prepared by NADES betaine:glucose. Biological activity was tested *in vitro* on a tumor cell line HeLa and a normal HaCaT cell line. Tested extract and isolated total polyphenols showed a low cytotoxic effect on the HeLa cell line and had positive effect on the growth of HaCat cells.

Keywords: antioxidant potential, *in vitro* biological activity, natural antioxidants, natural deep eutectic solvents, polyphenolic compounds

Thesis contains: 33 pages, 10 figures, 2 tables, 38 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Kristina Radošević, Associate professor

Technical support and assistance: M.Sc. Manuela Panić

Defence date: 09 September 2019

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Kakao kao izvor bioloških aktivnih spojeva.....	2
2.2. Biološka aktivnost polifenola iz kakaovog zrna	5
2.3. Ekstrakcija bioloških aktivnih komponenata kaka.....	6
2.3.1. Primjena prirodnih eutektičkih otapala za ekstrakciju bioloških aktivnih spojeva	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. MATERIJALI.....	10
3.1.1. Ekstrakti iz otpada nastalog obradom kaka pripremljeni pomoću prirodnih eutektičkih otapala	10
3.1.2. Humane stanične linije	11
3.1.3. Kemikalije	11
3.1.4. Otopine i puferi.....	12
3.1.5. Uređaji i oprema.....	14
3.2. METODE.....	14
3.2.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom	14
3.2.1.1. Mjerenje ORAC-vrijednosti	15
3.2.1.2. Izračun ORAC-vrijednosti.....	15
3.2.2. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata zrna kaka na HeLa i HaCaT staničnim linijama	16
3.2.2.1. Uzgoj i nacjepljivanje stanica.....	16
3.2.2.2. Određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo.....	16
3.2.2.3. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakata otpada proizvodnje kaka na HeLa i HaCaT staničnim linijama primjenom MTS metode.....	17
3.2.3. Obrada rezultata.....	18
3.2.4. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata otpada proizvodnje kaka	20
4.2. Biološka aktivnost ekstrakata otpada proizvodnje kaka na HeLa i HaCaT staničnim linijama.....	23

4.3. Morfologija HeLa stanica tretiranih ekstraktima otpada kaka.....	27
5. ZAKLJUČCI	29
6.LITERATURA	30

1.UVOD

Theobroma cacao L. je bogat izvor antioksidansa uključujući fenolne spojeve od kojih su najzastupljeniji katehini ili flavan-3-oli (37 %), proantocijanidini (58 %) i antocijani (4 %). Fenolni spojevi imaju visok antioksidacijski kapacitet i mnoge korisne učinke na ljudsko zdravlje. Mnoga istraživanja pokazala su da fenolni spojevi iz kakaovog zrna djeluju antikancerogeno, protuupalno, antimikrobno te imaju pozitivno djelovanje na imunološki i kardiovaskularni sustav (Baharum i sur., 2016).

U prehrambenoj industriji nastaju velike količine otpada i nusproizvoda koji su bogati biološki aktivnim spojevima, a njihovo zbrinjavanje predstavlja problem onečišćenja okoliša. Takav otpad je i otpad proizvodnje kakaa koji se može iskoristiti u druge svrhe zbog još velike količine polifenolnih spojeva koji djeluju kao prirodni antioksidansi. Bioaktivne spojeve možemo izolirati iz otpada i primjeniti u farmaceutskoj, kozmetičkoj ili prehrambenoj industriji.

Za izolaciju bioloških aktivnih komponenti sve više se upotrebljavaju alternativne metode ekstrakcije koje prate načela zelene kemije. Jedna od takvih metoda je ekstrakcija prirodnim eutetičkim otapalima (engl. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). Eutetička otapala su smjese nabijenog akceptora vodika i nenabijenog donora vodika poput ugljikohidrata, amina, amida, alkohola i vitamina povezanih jakim vodikovim vezama (Gorke i sur., 2010). NADES-i u potpunosti zadovoljavaju kriterije idealnog zelenog otapala jer ih karakterizira niska cijena, biorazgradivost, lako dostupne komponente od kojih se pripremaju, netoksičnost i mogućnost reciklacije (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

Cilj ovog rada bio je odrediti biološku aktivnost ekstrakata otpada proizvodnje kakaa i izoliranih pročišćenih polifenola iz pripremljenog ekstrakta pomoću betain:glukoza. Ekstrakti su pripremljeni pomoću 6 prirodnih eutetičkih otapala (betain:glukoza, kolin-klorid:limunska kiselina, kolin-klorid:glicerol, kolin-klorid:saharoza, kolin-klorid:urea, jabučna kiselina:glukoza), jednom prirodnom ionskom kapljevnom te jednim konvencionalnim otapalom (70 % (v/v) etanol). ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet pripremljenih ekstrakata, a biološka aktivnost ekstrakata pripremljenih pomoću betain:glukoze i kolin-klorid:saharoze te ukupnih polifenola ispitana je *in vitro* na humanoj tumorskoj staničnoj liniji (HeLa) i jednoj normalnoj humanoj staničnoj liniji (HaCaT).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kakao kao izvor bioloških aktivnih spojeva

Biljka kakaovac, *Theobroma cacao* L. (porodica *Sterculiaceae*, red *Malvales*) je malo zimzeleno tropsko i suptropsko drvo koje potječe iz neotropskih prašuma, primarno iz Amazone i Gvajane. Sjemenke kakaovca odnosno kakaovo zrno koristi se od davnina u prevenciji i liječenju raznih bolesti. Kakaovo zrno sadrži fitokemikalije i fiziološki aktivne komponente poput fenolnih spojeva koji djeluju kao antioksidansi te posjeduju antitumorsku aktivnost (Baharum i sur., 2016).

Kakaovo zrno (Slika 1) koristi se za dobivanje proizvoda koji su visoko cijenjeni od potrošača diljem svijeta, a najpoznatiji su kakaov prah i čokolada. Posebno značenje u prevenciji i borbi protiv bolesti pripisuje se prirodnim antioksidansima kao što su fenolni spojevi, tokoferoli i metilksantini, a nalazimo ih u strukturi kakaovog zrna te posljedično u proizvodima dobivenim preradom kakaovog zrna (Oracz i sur., 2015).

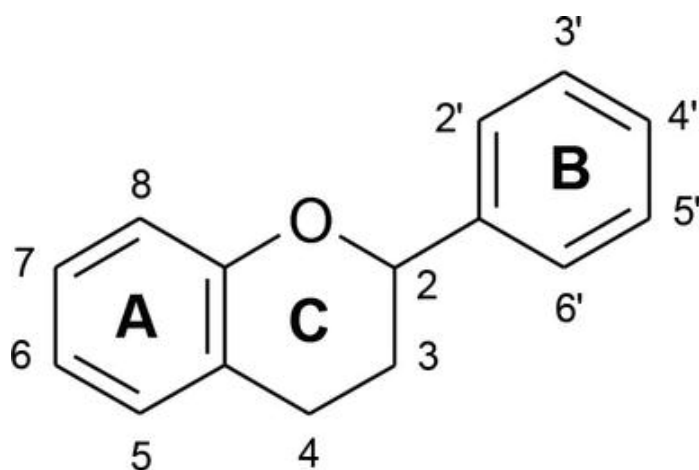


Slika 1. Kakaova zrna (Anonymous 1, 2019)

Prirodni antioksidansi koji su najvećim udjelom zastupljeni u kakaovom zrnu su polifenoli. Polifenoli su sekundarni metaboliti pohranjeni u pigmentiranim stanicama supki, te su zaslužni za obojenje biljke. Polifenoli u kakaovom zrnu odgovorni su za oštar i gorak okus i utječu na stabilnost i probavljivost zrna (Oracz i sur., 2015). Antioksidansi su spojevi koji inhibiraju djelovanje slobodnih radikala, molekula koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u elektronskim orbitalama, što ih čini vrlo reaktivnima prema drugim molekulama u stanici te

svojim vezanjem na neku od molekula dovode do uništavanja stanične strukture (Ames i sur., 1993).

Najveća i najraznovrsnija grupa polifenola prisutnih u kakaovom zrnu su flavonoidi. Osnovna struktura flavonoida se sastoji od 2 aromatična prstena (A i B) i heterocikličkog prstena (C) koji sadrži jedan atom kisika (Slika 2). Ovisno o strukturi centralnog heterocikličkog prstena mogu se podijeliti u 6 različitih podrazreda uključujući flavone, izoflavone, flavanone, flavonole, flavanole i antocijanidine.

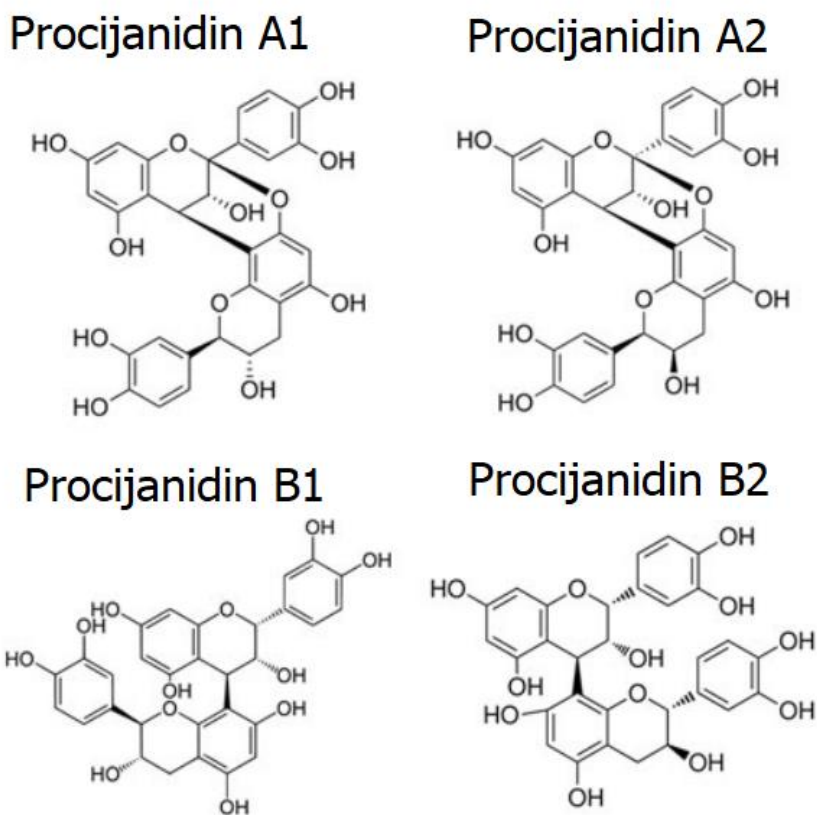


Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Uivarosi, 2017)

Najzastupljeni su flavanoli kao aglikoni u monomernom i polimernom obliku. U monomerne oblike pripadaju flavan-3-oli od kojih je (-)-epikatehin najzastupljeniji i čini 35 % ukupnog sadržaja polifenola u zrnu. Prisutne su i manje količine (+)-katehina i tragovi (+)-galokatehina, (-)-epigalokatehina i (-)-epikatehin-3-O-galata (Oracz i sur., 2015).

U kakaovom zrnu prisutni su i proantocijanidini ili kondenzirani tanini koji su dimeri, trimeri, viši oligomeri i polimeri flavonoidnih struktura, najčešće flavan-3-ola. Proantocijanidini koji se sastoje isključivo od podjedinica (+)-katehina i (-)-epikatehina nazivaju se procijanidini (Brahem i sur., 2018). Ovi spojevi se sastoje uglavnom od flavan-3,4-diola (leukoantocijanidina), sastavljenih od elementarnih epikatehinskih i / ili katehinskih jedinica oksidativno povezanih preko $C4\beta \rightarrow C8$ i / ili $C4\beta \rightarrow C6$ veza (procijanidini B-tipa). Procijanidini također mogu imati dodatnu etersku vezu između $C2 \rightarrow O7$ (procijanidini A-tipa) (Slika 3). Procijanidini čine 58 % ukupnih polifenola u kakaovom zrnu. Topljivi i netopljivi tanini

zaslužni su za gorčinu i trpkost svježeg ubranog zrna zbog sposobnosti stvaranja kompleksa s proteinima (Oracz i sur., 2015).



Slika 3. Struktura procijanidina A-tipa i B-tipa (Bansode, 2015)

Antocijani su još jedna velika grupa polifenola prisutni u kakaovom zrnu kao cijanidin-3-*O*-galaktozid i cijanidin-3-*O*-arabinozid. Oni čine 4 % ukupnih polifenola u kakaovom zrnu (Oracz i sur., 2015).

U manjim postocima zastupljeni su i ostali fenolni spojevi poput flavonola, flavona i flavanona. Ovi spojevi se nalaze u kakao proizvodima u konjugiranom obliku gdje je šećerni dio vezan za hidroksilnu skupinu flavonoida najčešće glukoza, arabinoza ili galaktoza. Predstavnici flavonola su kvercetin aglikon i njegovi glikozidi među kojima možemo izdvojiti kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercitrin), kvercetin-3-*O*-arabinozid, kvercetin-3-*O*-galaktozid i kvercetin-3-*O*-glukuronid. Poznato je da su u kakaovom zrnu prisutni i flavoni osobito apigenin, luteolin, apigenin-8-*C*-glukozid (viteksin), apigenin-6-*C*-glukozid (izoviteksin), luteolin-7-*O*-glukozid,

luteolin-6-C-glukozid i luteolin-8-C-glukozid. Među flavanonima u kakau su pronađeni naringenin i njegov konjugat naringenin-7-O-glukozid (Oracz i sur., 2015).

Prisutnost neflavonoidnih polifenola kao derivata hidroksibenzojeve i hidroksicinaminske kiseline također je pronađena u zrnu kaka. Derivati benzojevih kiseline prisutnih u kakaovom zrnu su galna, p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i siriginska kiselina. S druge strane, od hidroksicinaminske kiseline prevladavaju kafeinska, ferulinska, p-kumarinska, esteri kafeinske kiseline te klorogenska kiselina (Oracz i sur., 2015).

2.2. Biološka aktivnost polifenola iz kakaovog zrna

Tri su skupine polifenola u kakaovom zrnu: katehini ili flavan-3-oli (37 %), procijanidini (58 %) i antocijani (4 %). Zbog prisutnosti fenolnih spojeva, naročito procijanidina i flavanola, kakaovo zrno bogat je izvor antioksidansa. Fenolni spojevi zbog svoje građe i prisutnosti hidroksilnih grupa djeluju tako da inaktiviraju slobodne radikala, zbog čega dolazi do smanjenja oksidacijskog stresa, što znači da imaju visok antioksidacijski potencijal (Baharum i sur., 2016).

Uz antioksidacijsku aktivnost, polifenoli iz kakaovog zrna, a posebice flavonoidi djeluju antitumorski, protuupalno i antimikrobno. Brojna epidemiološka ispitivanja ukazuju na potencijalne pozitivne učinke polifenola iz kakaovog zrna na ljudsko zdravlje. Pokazala su da hrana bogata flavonoidima smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti. Epikatehin ima koristan utjecaj na kardiovaskularni sustav jer stimulira sintezu dušikovog oksida koji sudjeluje u procesu proširenja krvnih žila. Također, sprečava stvaranje krvnih ugrušaka i snizuje krvni tlak. Procijanidini, poznati kao kemopreventivni spojevi imaju jako antioksidacijsko djelovanje. Nekoliko studija pokazalo je da polifenolni ekstrakti zrna kaka sprečavaju oksidaciju lipoproteina niske gustoće (engl. Low Density Lipoprotein, LDL) i pozitivno utječu na smanjenje kolesterola te dovode do povećanje koncentracije lipoproteina visoke gustoće (engl. High Density Lipoprotein, HDL). Nadalje, hrana bogata antioksidansima djeluje pozitivno na imunološki sustav te sudjeluje u regulaciji razine inzulina u krvi. Polifenoli iz kakaovog zrna pokazuju antitumorsko djelovanje jer mogu mijenjati strukturu enzima važnih za imunološke reakcije pa tako smanjuju rizik od nastanka i razvoja tumora. Hrana bogata kakaom npr.

čokolada je zaštitni faktor ljudskog zdravlja jer sadrži polifenole koji sudjeluje u prevenciji mnogih bolesti (Oracz i sur., 2015).

Brojna *in vitro* istraživanja pokazala su da flavonoidi djeluju antitumorski inhibirajući kinaze i transkripcijske faktore čime je onemogućeno stvaranje neželjenih tumorskih stanica. Pentameri procijanidina iz kakaovog zrna dovode do zastoja u G0/G1 fazi staničnog ciklusa u tumorskim stanicama raka dojke te im se stoga pripisuje antiproliferacijski učinak na tumorske stanice. Flavonoidi iz ekstrakata zrna kakaa potencijalna su antitumorska sredstva i kao takve potrebno ih je uključiti u liječenje tumora (Baharum i sur., 2016).

2.3. Ekstrakcija bioloških aktivnih komponenata kaka

Ekstrakcija je prema Drmić i Režek Jambrak (2010) tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Obzirom na polaznu fazu iz koje se vrši ekstrakcija, dijeli se na: ekstrakciju kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) i ekstrakciju tekuće-tekuće.

Ekstrakcija je prvi korak pri izolaciji biološki aktivnih komponenata iz biljaka. Najraširenija, konvencionalna metoda koja se koristi za izolaciju polifenola iz kakaovog zrna je ekstrakcija kruto-tekuće. Kao otapalo primjenjuju se organska otapala poput metanola, etanola, acetona i etil-acetata. Zbog efikasnosti, jednostavnosti i široke primjene, ekstrakcija otapalom se najčešće koristi za izolaciju polifenolnih spojeva. Prinos ekstrakcije ovisi o trajanju i temperaturi ekstrakcije, kemijskom sastavu i fizikalnim karakteristikama uzorka te o polarosti otapala (Baharum i sur., 2016). S druge strane, upotreba velikih količina organskih otapala utječe štetno na ljudsko zdravlje te je ekološki neprihvatljiva. Konvencionalne metode ekstrakcije iziskuju primjenu toksičnih i biološki nerazgradivih organskih otapala te zbog dugotrajnog postupka ekstrakcije može doći do raspadanja bioaktivnih spojeva. Da bi se ubrzala ekstrakcija, temperatura ekstrakcije je obično visoka što također može degradirati spojeve. Radi velikog interesa za izolaciju biološki aktivnih komponenti, konvencionalne metode se nastoje zamijenit alternativnim metodama ekstrakcije koje su osjetljivije, selektivnije, ali brže i ekološki prihvatljivije (Xia i sur., 2010).

Novije, alternativne metode ekstrakcije polifenolnih spojeva uključuju mikrovalnu, ultrazvučnu te ekstrakciju superkritičnim fluidom. Njihova je prednost to što je smanjeno trajanje ekstrakcije i količina otapala, manji utrošak energije, veći prinos i efikasnost. Ove metode ekstrakcije su nove zelene tehnologije, što znači da su manje štetne za okoliš (Baharum i sur., 2016).

Također, danas se sve više organska konvencionalna otapala, korištena za ekstrakcije, zamjenjuju zelenim otapalima. U zelena otapala ubrajamo bio-otapala, ionske kapljevine, voda, superkritične tekućine i eutektička otapala (Tang i Row, 2013).

2.3.1. Primjena prirodnih eutektičkih otapala za ekstrakciju bioloških aktivnih spojeva

Jedna od zelenih, alternativnih otapala su eutektička otapala (engl. Deep Eutectic Solvents, DES). Eutektičko otapalo je smjesa dvije ili nekoliko komponenti, koja ima nižu točku taljenja od pojedinačnih sastavnih komponenta (Tang i Row, 2013). Eutektičko 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). Nenabijeni donori vodika najčešće su ugljikohidrati, amini, amidi, alkoholi i vitamini koji s amonijevom soli tvore jake vodikove veze (Gorke i sur., 2010).

Eutektička otapala svrstavaju se u četvrtu generaciju ionskih kapljevina radi sličnih fizikalno-kemijskih svojstava i velikog broja mogućih struktura (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). DES-i su puno jeftiniji i sigurniji za okoliš, imaju nisku toksičnost te se mogu brzo i jednostavno sintetizirati s biorazgradivim kemikalijama niskih cijena u odnosu na tradicionalno korištene ionske kapljevine (Smith i sur., 2012). Prema Kudlak i sur. (2015) postoje četiri vrste eutektičkih otapala koje su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Vrste eutektičkih otapala (Kudlak i sur., 2015)

Vrsta	Opis	Primjer
1	metalna sol + organska sol	ZnCl ₂ + kolin-klorid
2	hidrat metalne soli + organska sol	CoCl ₂ *6H ₂ O + kolin-klorid

3	organska sol + donor vodikove beze	Kolin-klorid + urea
4	metalna sol + donor vodikove veze	ZnCl ₂ + urea

Ako za pripremu DES-a koristimo primarne metabolite poput aminokiselina, organskih kiselina, ugljikohidrata ili derivate kolina tada govorimo o prirodnim eutetičkim otapalima, podskupini eutetičkih otapala (engl. Natural Deep Eutectic solvents, NADES)(Paiva i sur., 2014). NADES-i potpuno prate načela zelene kemije te imaju mnoge prednosti pred ostalim alternativnim otapalima uključujući jednostavnu pripremu, lako dostupne komponente, prilagodljivu viskoznost, tekuće stanje čak i na temperaturi nižoj od 0 °C, nisku toksičnost, biorazgradivost, mogućnost reciklacije, nisku cijenu te sigurnost za ljudsku primjenu i okoliš. Prirodna eutetička otapala uključena su u biosinteze, otapanje i skladištenje različito slabo topljivih metabolita u vodi i nestabilnih spojeva u stanici te se zbog toga istražuje njihova moguća primjena u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Postoje brojne studije o ekstrakciji biološki aktivnih komponenti uključujući flavonoide, antocijane, terpenoide i ostale fenolne spojeve pomoću NADES-a (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Choi i sur. (2011) upotrijebili su NADES-e za ekstrakciju bioaktivnih komponenti i pokazali njihovu prednost pred hlapivim organskim spojevima i ionskim kapljevinama. Dai i sur. (2013b) proveli su ekstrakciju fenolnih spojeva šafranike primjenom različitih eutetičkih otapala i dokazali da eutetička otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva zato jer nastaju jake i stabilne vodikove veze između fenolnih spojeva i komponenata otapala.

Eutetička otapala smatraju se netoksičnima, a kao najčešći supstrat za pripremu DES-a se koristi kolin-klorid koji je jeftin, biorazgradiv i netoksičan. Kolin-klorid može tvoriti eutetičko otapalo u smjesi s drugim sigurnim i nisko toksičnim komponentama iz čega proizlazi da je i samo eutetičko otapalo netoksično, no ipak zbog njihove očekivane šire primjene svakako je potrebno istražiti njihov citotoksični i genotoksični učinak (Hayyan i sur., 2013a; Hayyan i sur., 2013b).

Učinkovitost procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenti pomoću prirodnog eutetičkog otapala ovisi o tipu NADES-a, pH i polarnosti otapala, udjelu vode u NADES-u, temperaturi i trajanju ekstrakcije (Radošević i sur., 2016). Za uspješnu ekstrakciju polifenolnih spojeva pomoću NADES-a potrebno je 1) dizajnirati NADES s željenim fizikalno-kemijskim

svojstvima 2) odabrati najučinkovitiju metodu ekstrakcije i optimirati ju 3) izolirati konačni proizvod iz pripremljenih ekstrakata, ako je potrebno (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

Da bi se prirodna eutetička otapala našla u široj primjeni za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala, potrebno je provesti još mnogo istraživanja uvjeta ekstrakcije, metode ekstrakcije, odabira komponenata eutetičkog otapala s obzirom na cijenu otapala i učinkovitost ekstrakcije, metode sinteze otapala te ispitivanja kako navedeni parametri utječu na učinkovitost procesa ekstrakcije (Dai i sur., 2013a).

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Ekstrakti iz otpada nastalog obradom kakaa pripremljeni pomoću prirodnih eutektičkih otapala

U radu su korišteni ekstrakti otpada nastalog proizvodnjom kakaa dopremljeni iz industrije kojoj je primarna djelatnost proizvodnja čokolade. Ekstrakti su pripremljeni i okarakterizirani u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pomoću prirodnih eutektičkih otapala (NADES) te ultrazvuka. Također su i izolirani polifenoli iz pripremljenih ekstrakata pomoću otapala BGlc primjenom makroporozne smole Sepabeads SP825L. U Tablici 2 navedena su otapala kojima su pripremljeni ekstrakti te kratice pripremljenih ekstrakata korištenih u radu.

Tablica 2. Ekstrakti i izolirani polifenoli otpada proizvodnje kakaa korišteni u ovom radu

Otapala korištena za pripremu ekstrakta	Kratice
1. Betain:glukoza	BGlc
2. Kolin-klorid:limunska kiselina	ChCit
3. Kolin-klorid:glicerol	ChGly
4. Kolin-klorid:saharoza	ChScu
5. Kolin-klorid:urea	ChU
6. Jabučna kiselina:glukoza	MaGlc
7. Prirodna ionska kapljevina kolin hidroksid-limunska kiselina	[Ch][Cit]
8. 70 % (v/v) etanol	EtOH
Izolirani polifenoli	Kratice
9. Izolirani polifenoli iz ekstrakta pripremljenog pomoću BGlc	TP

3.1.2. Humane stanične linije

U ovom radu korištena je tumorska stanična linija HeLa te humana stanična linija HaCaT. Stanične linije dobivene su iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica.

HeLa je prva stanična linija izolirana iz tumora vrata maternice. Uspostavljena je 1952. i od tada se koristi kao biološki model u raznim istraživanjima. Dobila je ime prema pacijentici Henriette Lacks iz koje je prvi put izolirana.

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.

Stanične linije pripadaju adherentnim stanicama i njihov uzgoj se provodi u Petrijevim posudama za održavanje biomase ili u pločama s jažicama koje su korištene za ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata iz otpada nastalog obradom kakaa. Optimalni uvjeti uzgoja su: 37 °C, 95 % zraka i 5 % CO₂. Medij za rast je Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS).

3.1.3. Kemikalije

- 0,25 % Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- 2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetratilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 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
- Flourescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- The Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega Corporation, Madison, WI, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

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

0,4 % otopina tripan-plavo

Boja tripan-plavo	0,04 g
PBS pufer	10 mL

0,2 % otopina kristal-ljubičasto

Boja kristal-ljubičasto	0,02 g
-------------------------	--------

Etanol 10 mL

Puferi i otopine za određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom

- Fosfatni pufer (0,2 M, pH=7):
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,424 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
- Fosfatni pufer (0,075 M, pH=7):
Fosfatni pufer (0,2 M) 75 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 s 10 mL fosfatnog pufera (0,075 M)
Ishodna otopina 3: 50 µL ishodne otopine 2 nadopuniti s 50 mL fosfatnog pufera (0,075M)
- Otopina AAPH:
AAPH 0,207 g
Fosfatni pufer (0,075 M) do 5 mL
- Trolox (500 µM):
Trolox 6,26 mg
Fosfatni pufer (0,075 M) 50 mL
- Trolox (50 µM):

Trolox (500 μ M)	1 mL
Destilirana voda	9 mL

3.1.5. Uređaji i oprema

- Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgave, Australia
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga Tehnica ET-1111, Železnik, Slovenija
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichart Bright-line, Buffalo, NY, SAD
- Petrijeve posude za uzgoj stanica, Corning, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda se koristi za određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta uzoraka hrane, pića, dodataka hrani i farmaceutskih pripravaka (Ninfali i sur., 2005; Proteggente i sur., 2002). Njome se mjeri stupanj inhibicije djelovanja oksidirajućeg agensa antioksidansom i vrijeme trajanja antioksidativnog djelovanja. 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 odnosno dolazi do

smanjenja inteziteta fluorescencije. Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala i oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije (Cao i sur., 1993).

3.2.1.1. Mjerenje ORAC- vrijednosti

ORAC-vrijednost mjeri se kao što je opisano u Mazor Jolić i sur. (2011). Mjerenje je provedeno spektrofluorimetrijski pri temperature od 37 °C uz $\lambda_{eks}=485$ nm i $\lambda_{em}=520$ nm. Uzorci su razrijeđeni 1000-1700 puta. 2250 μ L fluoresceina dodaje se u 375 μ L razrijeđenog uzorka te se termostatira 30 minuta u vodenoj kupelji na 37 °C. Neposredno prije samog mjerenja inteziteta fluorescencije dodaje se 375 μ L otopine AAPH. Intezitet fluorescencije mjeri se svaku minutu. Slijepa proba priprema se na isti način, ali umjesto uzorka dodaje se fosfatni pufer (0,075 mol L⁻¹), a kao standard koristio se Trolox (50 μ M).

3.2.1.2. Izračun ORAC-vrijednosti

Relativna ORAC-vrijednost računa se prema formulama 1 i 2:

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

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

Gdje je:

- Relativna ORAC-vrijednost (μ mol Trolox ekvivalenta g⁻¹ uzorka)
- AUC_U –antioksidacijski kapacitet uzorka
- AUC_{SP}–antioksidacijski kapacitet slijepa probe
- AUC_{TRX}–antioksidacijski kapacitet Troloxa
- *k*-faktor razrjeđenja
- *a*-molarna koncentracija Troloxa
- $h = \frac{V_{uzorka}}{m_{ekstrakta}}$

3.2.2. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata zrna kakaa na HeLa i HaCaT staničnim linijama

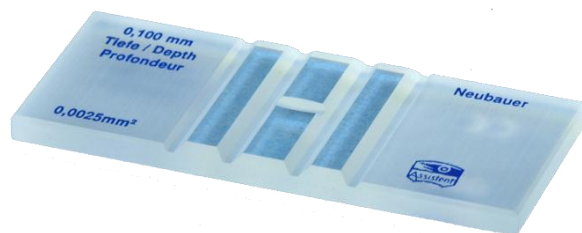
Pri radu s kulturama životinjskih stanica potrebno je osigurati aseptične uvjete da ne bi došlo do kontaminacije stanica. Rad se izvodi u komori za sterilan rad i koristi se sterilan laboratorijski pribor, a prije samog izvođenja pokusa ruke i radnu površinu potrebno je obrisati 70 %-tnim etanolom.

3.2.2.1. *Uzgoj i nacjepljivanje stanica*

HeLa i HaCaT stanice čuvaju se u mediju za smrzavanje na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Stanice su odmrznute naglim uranjanjem u vodenu kupelj na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zatim se centrifugiraju da bi se odvojio medij za zamrzavanje, a talog koji sadrži stanice resuspendira se u mediju za uzgoj koji sadrži 10 % FBS pufera. Stanice se održavaju u petrijevkama, u inkubatoru, u uvjetima od $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ te 95 % zraka i udjela CO_2 5 %. Stanice su svakodnevno promatrane pod inverznim mikroskopom i pasažirane svaka 3-4 dana da bi se održale u ekspanzijskoj fazi rasta i u toj su fazi postavljani pojedinačni pokusi.

3.2.2.2. *Određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo*

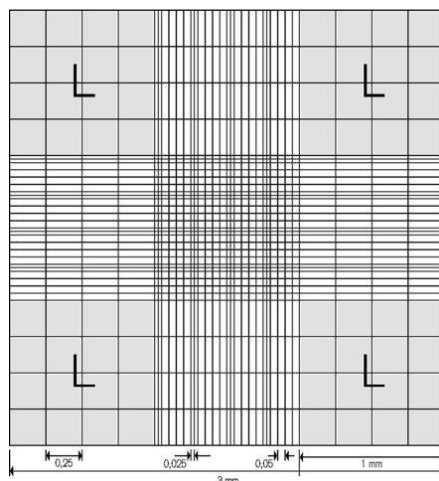
Za određivanje broja stanica koristi se bojanje otopinom tripan-plavo i brojanje stanica u Neubauer-ovoj komorici (slika 4).



Slika 4. Neubauer komora za brojanje stanica (Anonymous 2, 2019)

Postupak određivanja broja stanica započinje tripsinizacijom tj. odvajanjem stanica od podloge. Iz petrijevke gdje su stanice održavane uklonjen je hranjivi medij te je dodano 1 mL

otopine tripsina. Petrijevka je vraćena u inkubator na 5 minuta kako bi se stanice odvojile od površine. Djelovanje tripsina provjereno je pod inverznim mikroskopom, a kad su stanice zaokružene dodano je 1 mL hranjivog medija. Stanice su resuspendirane i alikvot suspenzije stanica od 20 μL pomiješan je s 20 μL boje tripan-plavo te je 20 μL nanijeto na komoru za brojanje. Komora se sastoji od 4 velika kvadrata, a u svakom velikom kvadratu se nalazi 16 malih kvadratića (slika 5).



Slika 5. Izgled mrežice Neubauer-ove komore za brojanje stanica (Anonymous 3, 2019)

U sva 4 kvadrata brojane su žive i mrtve stanice obojane plavo zbog oštećene membrane. Koncentracija stanica po mL računa se prema formuli 3:

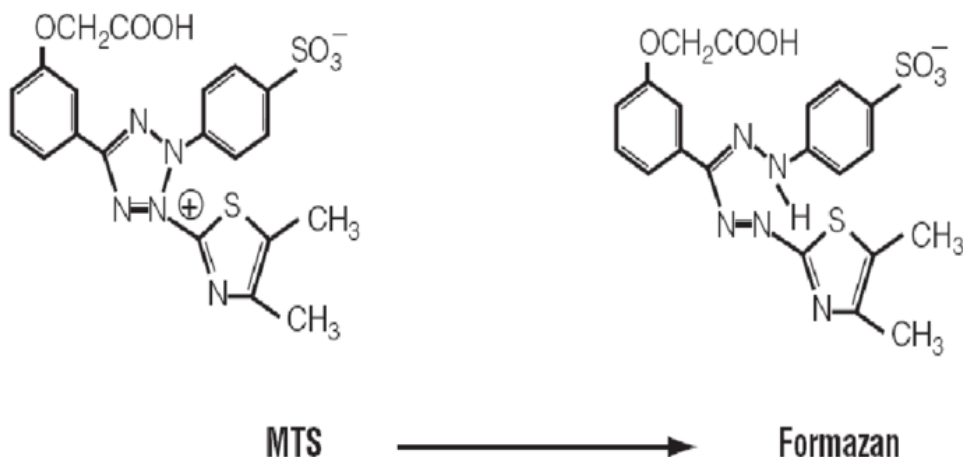
$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{broj stanica u 4 velika kvadrata} \times 5000 \quad [3]$$

3.2.2.3. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakata otpada proizvodnje kaka na HeLa i HaCaT staničnim linijama primjenom MTS metode

HeLa i HaCaT stanice nacijepljene su na ploče od 96 jažica u početnoj koncentraciji od $3 \cdot 10^4$ stanica mL^{-1} i volumenu od 100 μL po jažici. Nakon 24 h stanice su tretirane s različitim volumenima ekstrakata 1-5 % (v/v). Stanice su inkubirane na 37 °C tijekom 72 h nakon čega je određen citotoksičan učinak 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. MTS reagens se sastoji od tetrazolijeve soli

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] i PES [phenazine ethosulfate]. MTS se reducira do formazana ljubičaste boje koji je otopljen u mediju djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza pri čemu se NADPH ili NADH oksidira do NADP⁺ ili NAD⁺ (slika 6).



Slika 6. Struktura tetrazolijeve soli MTS i produkta formazan (Anakok, 2010)

Nakon 72 sata u svaku jažicu dodaje se 100 μ L MTS reagensa te se ploča vrati u inkubator na 3-4 sata. Intezitet nastale boje mjeri se spektrofotometrijski pomoću čitača ploča pri valnoj duljini od 490 nm. Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica, prema formuli 4:

$$\text{preživljenje (\%)} = \left[\frac{\text{srednja vrijednost } A_{490}(\text{uzorka})}{\text{srednja vrijednost } A_{490}(\text{kontrola})} \right] \times 100 \quad [4]$$

3.2.3. Obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [5]$$

s pripadajućim standardnim devijacama S.D.:

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

[6]

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

3.2.4. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Za potrebe lakšeg praćenja promjena u morfologiji HeLa stanica tijekom tretmana ekstraktima otpada obrade kaka stanice su nacijepljene na ploču s 12 jažica i tretirane kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.2. Nakon 72 sata tretmana uklonjen je hranjivi medij te su stanice isprane PBS puferom, a zatim je dodana otopina boje kristal-ljubičasto u dovoljnoj količini da prekrije dno jažice. Ploča je vraćena u inkubator na 20-tak minuta, nakon čega je uklonjena boja, a stanice su isprane PBS puferom. Stanice su slikane pomoću Dyno-Eye kamere pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio odrediti biološku aktivnost ekstrakata iz otpada proizvodnje kakaa koje industrija svakodnevno proizvodi u velikim količinama. Takav otpad još uvijek sadrži biološki aktivne komponente kao što su polifenoli koji djeluju kao antioksidansi te im se pripisuju antikancerogena, antimikrobna, protuupalna i mnoga druga pozitivna svojstva.

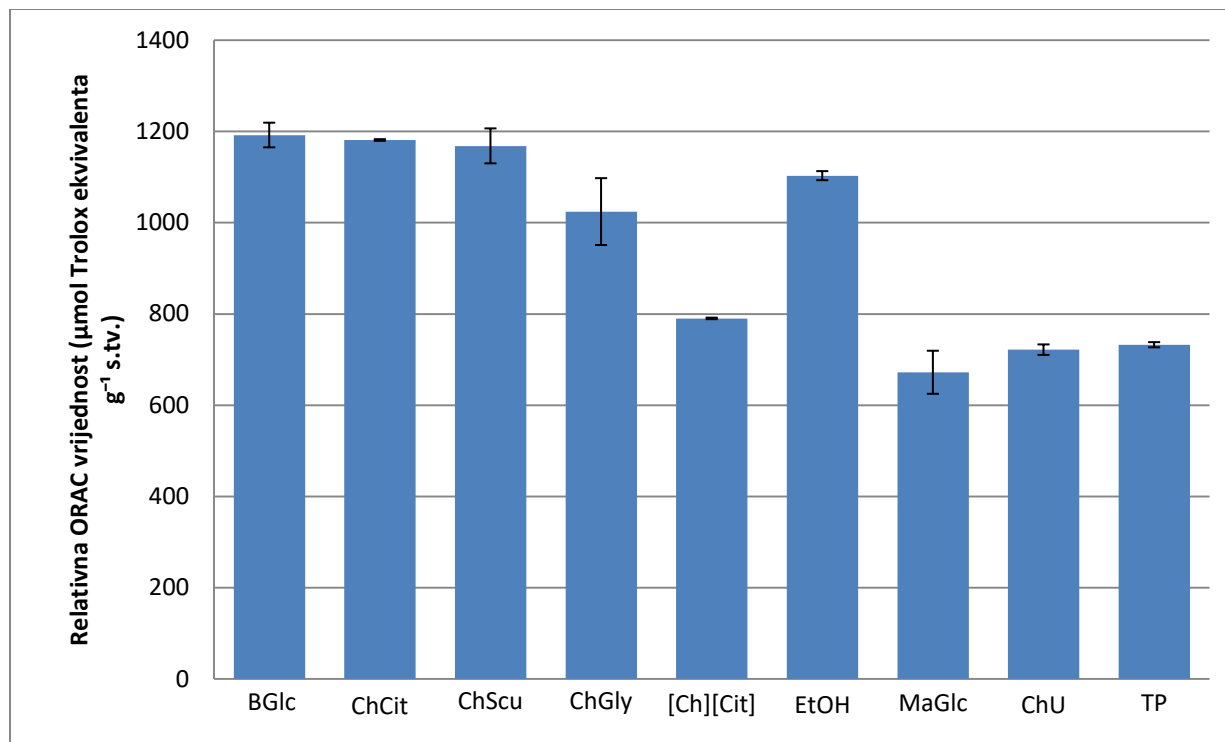
Postupak ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz kakaovog zrna trebao bi osigurati veliki prinos ekstrakta visoke kvalitete (ciljana koncentracija spojeva i potencijalna biološka aktivnost ekstrakta) (Baharum i sur., 2016).

Budući da se industrija okreće zelenim i održivim tehnologijama, ekstrakti zrna kakaa pripremljeni su pomoću 6 prirodnih eutektičnih otapala (NADES): betain:glukoza, kolin-klorid:limunska kiselina, kolin-klorid:glicerol, kolin-klorid:saharoza, kolin-klorid:urea, jabučna kiselina:glukoza, jednom prirodnom ionskom kapljevnom kolin hidroksid-limunska kiselina te jednim konvencionalnim otapalom, 70 % (v/v) etanol. Antioksidacijski kapacitet tako pripremljenih ekstrakata i izoliranih polifenola analiziran je spektrofluorimetrijski ORAC metodom. Biološka aktivnost ekstrakata kakaa ispitivana je *in vitro* na HeLa humanoju tumorskoj staničnoj liniji te na jednoj normalnoj humanoju staničnoj liniji HaCaT primjenom MTS kolorimetrijske metode.

4.1. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata otpada proizvodnje kakaa

Postoji niz standardiziranih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta prirodnih spojeva u hrani i biološkim sustavima. Metode se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidansa kao što su ukljanjanje ili inhibicija slobodnih radikala ili keliranje metalnih iona, koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala. ORAC je najbolja metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta jer se odvija u području fiziološkog pH i temperature od 37 °C te se koristi peroksil radikal s reakcijskim mehanizmom i redoks potencijalom sličnom onome kakav se odvija u našem organizmu.

Antioksidacijski kapacitet (AUC) ekstrakata otpada nastalog obradom kakaa dobivenih primjenom prirodnih eutektičnih otapala i izoliranih polifenola određen je ORAC metodom. Rezultati analize izraženi u ekvivalentima Troloxa tj. kao $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.tv. prikazani su na slici 7.



Slika 7. Relativne ORAC vrijednosti za analizirane ekstrakte otpada obrade kakaa *,**

*BGlc=ekstrakt pripremljen u betain:glukoza, ChScu=ekstrakt pripremljen u kolin-klorid:saharoza, ChCit=ekstrakt pripremljen u kolin-klorid:limunska kiselina, ChGly=ekstrakt pripremljen u kolin-klorid:glicerol, [Ch][Cit]=ekstrakt pripremljen u prirodnoj ionskoj kapljevinu kolin hidroksid-limunska kiselina, EtOH=ekstrakt pripremljen u 70 % (v/v) etanolu, MaGlc=ekstrakt pripremljen u jabučna kiselina:glukoza, ChU=ekstrakt pripremljen u kolin klorid:urea, TP=pročišćeni polifenoli iz ekstrakta

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

Najveći antioksidacijski kapacitet, među ispitanim ekstraktima s NADES-ima, ima ekstrakt u BGlc ($1191,88 \pm 27,03 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.tv.), dok ekstrakt u ChCit ima nešto manji antioksidacijski kapacitet ($1180,95 \pm 1,82 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.tv.). Antioksidacijski kapacitet ekstrakta u ChScu je $1168,08 \pm 38,33 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.tv., a ostali ekstrakti kreću se u rasponu od 671 do $1025 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.tv. i to redom ChGly > [Ch][Cit] > ChU > MaGlc. Ekstrakt u konvencionalnom otapalu za ekstrakciju (70% v/v etanol) ima antioksidacijski kapacitet $1102,79 \pm 9,94 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.tv. Visok antioksidacijski kapacitet pokazao je i ekstrakt u ChGly ($1054,05 \pm 73,29 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ s.tv.), ali manji nego što su ostali ekstrakti u NADES-ima baziranih na kolin-kloridu. Pročišćeni polifenoli iz pripremljenih ekstrakata imaju antioksidacijski kapacitet

732,20 ± 5,70 μmol TE g⁻¹ s.tv., iz čega možemo zaključiti da prisutnost otapala doprinosi većoj antioksidativnoj vrijednosti. [Ch][Cit] ima kapacitet od 789,92 ± 1,69 μmol TE g⁻¹ s.tv., a najmanji antioksidacijski kapacitet imali su ekstrakti u ChU (721,48 ± 11,50 μmol TE g⁻¹ s.tv.) te MaGlc (671,91 ± 47,20 μmol TE g⁻¹ s.tv.).

U literaturi su već opisana neka istraživanja o ekstrakciji polifenolnih spojeva iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016, Radošević i sur., 2016). Tako su Radošević i sur. (2016) proveli ekstrakciju polifenolnih spojeva iz pokožice grožda pomoću 5 NADES-a baziranih na kolin-kloridu i šećerima i pomoću vodene otopine metanola (70 %, v/v) te odredili njihovu antioksidacijsku vrijednost ORAC metodom. Najveći antioksidacijski kapacitet pokazao je ekstrakt u ChMa, a zatim slijede ChFru > ChXyl > ChGlc > MeOH > ChGly. Kao i u našem slučaju ekstrakti u NADES-ima bazirani na kolin-kloridu pokazali su visoku antioksidacijsku vrijednost, među kojima je onaj s glicerolom imao najmanji antioksidacijski kapacitet, a sa organskom kiselinom kao donorom vodika najveći. Istraživanjem je utvrđeno da su NADES-i dostojna zamjena konvencionalnim otapalima. Može se zaključiti da se ti rezultati podudaraju s našima gdje ekstrakti u BGlc, ChCit, ChScu imaju veći antioksidacijski kapacitet od ekstrakta u etanolu (70 %, v/v).

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata u otapalima je veći od čistih polifenola, čime se veći antioksidacijski kapacitet može pripisati i samim otapalima. Radošević i sur. (2018) ispitali su antioksidacijski kapacitet 10 prirodnih euetičkih otapala, među kojima i same komponente otapala poput jabučne kiseline, limunske kiseline, prolina i betaina imaju antioksidacijsku aktivnost. Tako je najveći antioksidacijski kapacitet imao NADES betain:jabučna kiselina:prolin, a zatim redom BMaGlc > CitPro > ChOx > BGlc > CitGlcGly > CitFruGly. Preostali NADES-i, ChXylol, ChSol i ChU nisu pokazali antioksidacijsku vrijednost jer ni njihove komponente to ne pokazuju. Mitar i sur. (2019) također su ispitali antioksidacijski kapacitet 8 pripremljenih NADES-a baziranih na organskim kiselinama. Koristeći ORAC metodu odredili su da najveći antioksidacijski kapacitet posjeduje ChMa, a zatim ProMa > BMa > MaGlcGly > ChProMa > MaGlc > BCit. Takav poredak je očekivan zbog samih komponenata NADES-a koje posjeduju antioksidacijsku aktivnost pa prema tome i sami NADES-i tako djeluju. Dok s druge strane, NADES-i formirani od kolin-klorida i donora vodika poput glicerola, glikola i uree pokazuju nisku antioksidacijsku vrijednost.

Usporedno s našim rezultatima, ekstrakt u BGlc pokazao je najveću antioksidacijsku vrijednost, ne samo zbog prisutnosti polifenolnih spojeva, nego i zbog antioksidacijske aktivnosti betaina. Također zbog istog razloga visok antioksidacijski kapacitet imao je ekstrakt u ChCit. Ekstrakti u ChGly i ChU imali su nešto niži antioksidacijski kapacitet, te pročišćeni ukupni polifenoli izolirani iz otapala također su pokazali manju antioksidativnu vrijednost. Da antioksidacijski kapacitet ovisi i o vrsti otapala dokazali su Radošević i sur. (2016) gdje je ekstrakt u ChMa imao 25% veću vrijednost od ostalih ekstrakata što nije usko povezano sa sadržajem polifenola nego s jabučnom kiselinom koja je poznati antioksidans korišten u prehrambenoj industriji.

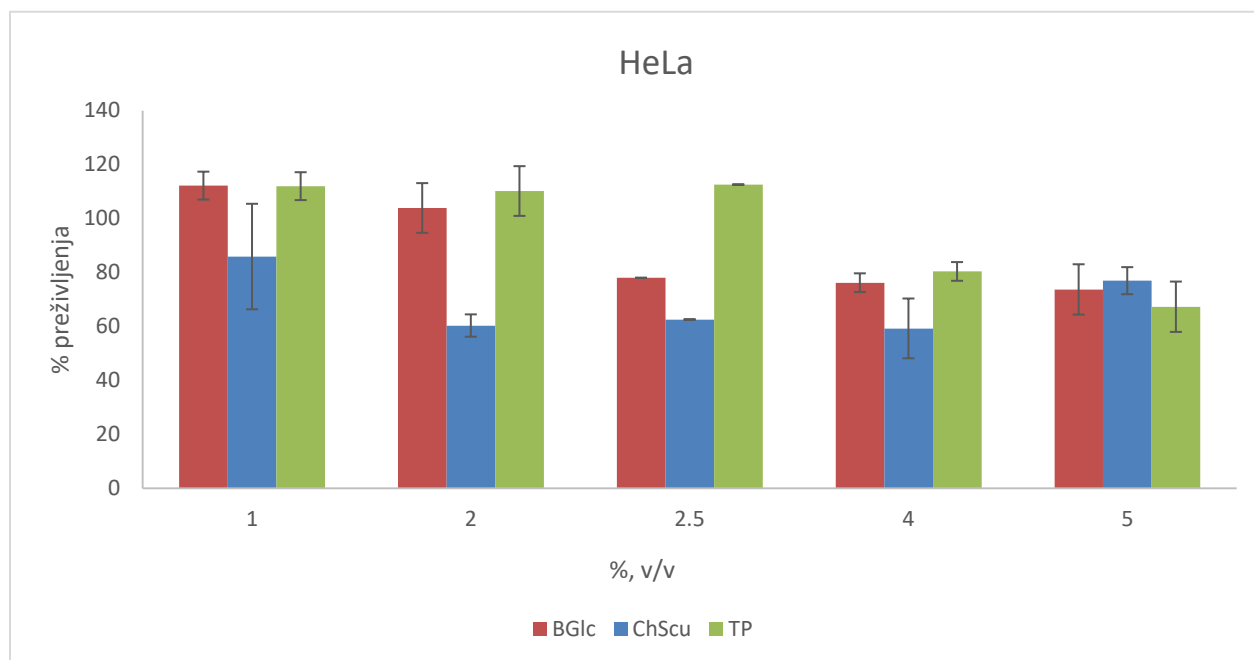
Zillich i sur. (2015) su također proučavali djelovanje polifenolnih spojeva izoliranih iz biljaka kao potencijalne komponente kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda. Zaključili su da antioksidacijski kapacitet biljnih ekstrakata ovisi i o sadržaju ukupnih polifenola te i o samom otapalu koji može povećati antioksidacijsku vrijednost.

Ekstrakti u BGlc, ChScu i ukupni pročišćeni polifenoli korišteni su za daljnja ispitivanja biološke aktivnosti.

4.2. Biološka aktivnost ekstrakata otpada proizvodnje kakaa na HeLa i HaCaT staničnim linijama

Kako je izgledna primjena ekstrakata pripremljenih s prirodnim eutektičkim otapalima u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, ispitana je i biološka aktivnost pripremljenih ekstrakata. Pretpostavlja se da bi se ekstrakti pripremljeni pomoću prirodnih eutektičkih otapala mogli koristiti bez izolacije konačnog proizvoda, u našem slučaju polifenola (Radošević i sur., 2016). Ispitan je i citotoksični učinak polifenola izoliranih iz pripremljenog ekstrakta BGlc kako bi se usporedio njihov učinak i dokazala se ili opovrgnula hipoteza nepotrebne izolacije polifenola i mogućnost korištenja gotovog ekstrakta pripremljenog pomoću prirodnih eutektičkih otapala za ljudsku primjenu. Ispitana je biološka aktivnost samo 2 pripremljena ekstrakta pomoću BGlc i ChScu, pošto je njihov antioksidacijski kapacitet najviši te je njihova buduća primjena najizglednija. Jednaku vrijednost antioksidacijskog kapaciteta imao je i ekstrakt ChCit, ali je već ranijim istraživanjima utvrđeno da je pH - vrijednost ekstrakta pripremljena s eutektičkim otapalom ChCit < 1 te bi bio nepogodan za daljnju industrijsku primjenu i zbog tog nije dalje ispitan (Panić i sur., 2019).

Za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata odnosno njihovog učinka na stanice korištena je humana tumorska stanična linija HeLa, te jedna humana stanična linija HaCaT. Stanice su bile nacičepjene na ploče od 96 jačica i nakon 24 sata tretirane volumnim udjelima od 1 do 5 % (v/v) ekstrakata i ukupnih polifenola. Nakon 72 sata tretmana, preživljenje stanica određeno je MTS kolorimetrijskom metodom i rezultati su izraženi kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice. Na slici 8 i 9 prikazani su rezultati ispitivanja na HeLa i HaCat izraženi kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice.

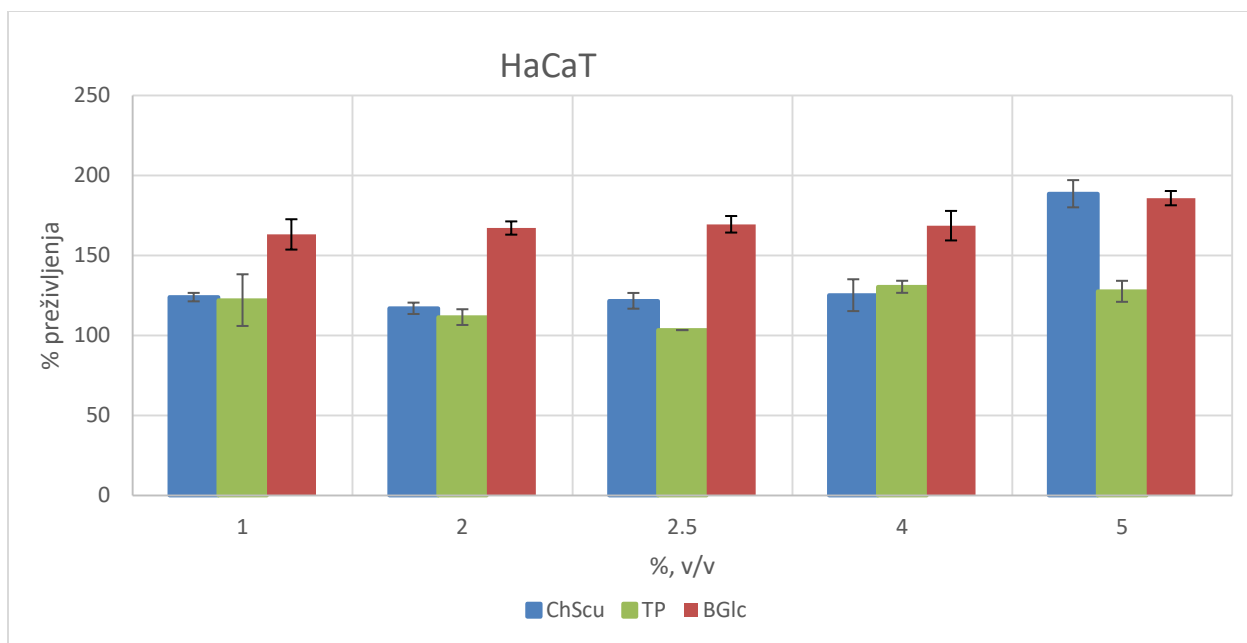


Slika 8. Utjecaj ekstrakata otpada kakaia pripremljenih u betain:glukoza (BGlc), kolin-klorid:saharoza (ChScu) i izoliranih ukupnih polifenola (TP) na HeLa staničnu liniju

Na temelju rezultata prikazanih na slici 8 može se uočiti da ekstrakti otpada kakaia u BGlc, ChScu i izolirani polifenoli imaju blagi inhibitorni učinak na proliferaciju HeLa stanične linije u volumnim udjelima od 1 do 5 % (v/v). Ekstrakti u BGlc u volumnom udjelu od 1 % (v/v) nisu imali inhibitorni učinak na rast tumorske stanične linije, no pri volumnom udjelu od 2 % (v/v) blaga inhibicija je već prisutna (slika 8). Pri volumnom udjelu od 2,5 % (v/v) i 4 % (v/v) ekstrakti u BGlc djelovali su inhibitorno na proliferaciju stanične linije HeLa gdje je postotak inhibicije 22 % odnosno 24 %. Sličan učinak imali su ukupni pročišćeni polifenoli gdje je inhibicija rasta vidljiva tek kod volumnih udjela od 4 i 5 % (v/v) i postotak preživljenja kreće se u rasponu od 67 do 80 %. Ekstrakti u ChScu pokazali su inhibitorni učinak već i pri manjim volumnim

udjelima te je najveći postotak inhibicije od 41 % postignut kod volumnog udjela od 4 % (v/v). Inhibicija rasta HeLa stanične linije najizraženija je kod tretmana ekstraktima u volumnom udjelu od 5 % (v/v), pri čemu su pročišćeni polifenoli pokazali najveći postotak inhibicije (33%) u usporedbi s ostala dva ekstrakta. Inhibitorni učinak na proliferaciju HeLa stanične linije ekstrakata u BGLc i ChScu je približno jednak i iznosi 24 % za ChScu te 27 % za BGLc.

Bauer i sur. (2016) su također primijetili inhibitorni učinak na tumorskim stanicama pluća (A549) djelovanjem ekstraktima kakaa te su zaključili da je nekontroliran rast tumorskih stanica inhibiran polifenolnim spojevima izoliranih iz kakaa. Koristili su različite koncentracije ekstrakta kakaa dobivenih iz sirovih zrna, prženih zrna, sirovih fermentiranih te prženih fermentiranih zrna. Rezultati su pokazali da ekstrakti iz prženih zrna imaju veći inhibitorni učinak na tumorsku staničnu liniju pri koncentraciji od 10 mg mL^{-1} (34,45 %) u odnosu na ekstrakte iz sirovih zrna gdje je postotak inhibicije 21,93 %. Najveći inhibitorni učinak u koncentraciji od 5 i 10 mg mL^{-1} imao je ekstrakt dobiven iz sirovih fermentiranih zrna te je postotak inhibicije iznosio 58,77 % odnosno 72,35 %. Za ekstrakte iz prženih fermentiranih zrna kakaa inhibicija je bila nešto manja te su ekstrakti u većim koncentracijama djelovali inhibitorno na rast stanične linije A459. Prema dobivenim rezultatima zaključili su da je ekstrakt sirovog zrna kakaa imao najveći inhibitorni učinak te je zaključeno da tijekom obrade zrna kakaa dolazi do degradacije polifenolnih spojeva. Suprotno rezultatima ovog rada, ekstrakti iz otpada nastalog obradom kakaa pokazali su inhibitorni učinak na proliferaciju HeLa stanične linije i to pri većim volumnim udjelima što ukazuje da takav otpad i dalje sadrže bioaktivne spojeve, polifenole. Radošević i sur. (2016) ispitali su citotoksični učinak 5 prirodnih eutetičkih otapala (ChMa, ChFru, ChXyl, ChGlc, ChGly) te biološku aktivnost ekstrakata obogaćenih polifenolima iz pokožice grožđa pripremljenih pomoću NADES-a na dvije tumorske stanične linije HeLa i MCF-7 koristeći WST-1 metodu. Rezultati su pokazali da nijedan od navedenih ekstrakata ne uzrokuje inhibiciju proliferacije stanica veću od 50 %, te su naši rezultati u skladu s rezultatima dobivenima u radu Radošević i sur. (2016), dok su Bauer i sur. (2016) primjetili još jači inhibitorni učinak polifenolnih ekstrakata na tumorske stanične linije.



Slika 9. Utjecaj ekstrakata otpada kakaa pripremljenih u betain:glukoza (BGlc), kolin-klorid:saharoza (ChScu) i izoliranih ukupnih polifenola (TP) na HaCaT staničnu liniju

Nadalje, ekstrakti otpada kakaa pripremljeni u euetičkim otapalima pokazuju pozitivan učinak na proliferaciju normalne stanične linije HaCaT što je vidljivo na slici 9. Imortalni keratinociti izolirani iz ljudske kože pokazuju visoku sposobnost proliferacije, a dodatkom ekstrakata otpada proizvodnje kakaa proliferacija raste s povećanjem volumnog udjela ekstrakta. Ekstrakt u BGlc pokazuje najbolji učinak na proliferaciju HaCaT stanične linije, a postotak proliferacije stanica se povećao od oko 60 do 85 %. Ekstrakt u ChScu također utječe pozitivno na rast HaCaT stanične linije, preživljenje stanica je nešto manje pri volumnim udjelima od 1 do 4 % (v/v), a one stanice tretirane s 5 % (v/v) ekstrakta imale su postotak proliferacije od 88 %. Ukupni pročišćeni polifenoli pokazali su nešto slabiji učinak na proliferaciju stanica te se postotak proliferacije kretao od 3 do 30 %, prema tome možemo zaključiti da NADES-i imaju dodatan učinak na rast stanica što je i u korelaciji s antitumorskim djelovanjem na HeLa-u gdje su ekstrakti u BGlc i ChScu pokazali veće inhibitorno djelovanje od samih ukupnih pročišćenih polifenola.

Hsu i sur. (2003) i Lagha i Grenier (2019) su također primijetili stimulirajući rast kod keratinocita pri tretmanu ekstraktima čaja bogatih polifenolima. Zillich i sur. (2015) su rast keratinocita objasnili pozitivnim djelovanjem polifenola iz ekstrakata. Polifenolni spojevi

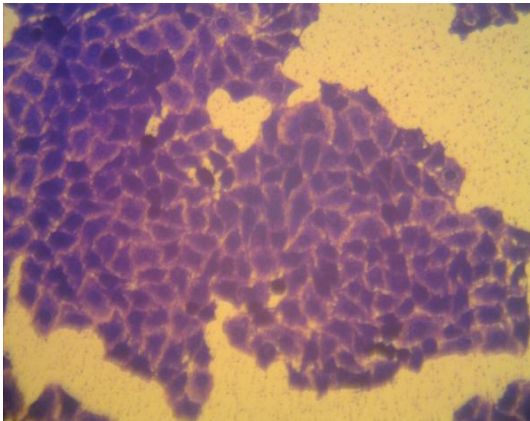
inhibiraju aktivnost proteaza koje kataliziraju cijepanje proteina iz kože poput kolagena i elastina.

I naši rezultati na HaCaT stanicama tretiranim ekstraktima otpada kakaa u skladu su s navedenim istraživanjima.

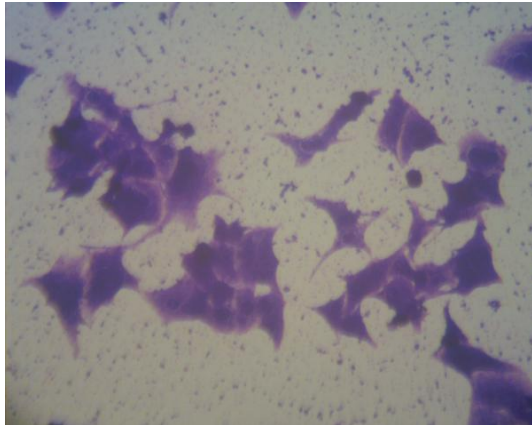
4.3. Morfologija HeLa stanica tretiranih ekstraktima otpada kakaa

Kada su stanice tretirane nekom ispitivanom tvari u svrhu ispitivanja citotoksičnosti, moguće je uočiti promjene i u izgledu stanica koje su posljedica tretmana. Kako su ekstrakti pokazali blagi inhibitorni učinak na HeLa stanice, i to BGlc veći učinak nego ChScu, praćene su i morfološke promjene djelovanjem 2,5 % (v/v) ekstrakta i izoliranih polifenola 72 h. Za potrebe eksperimenta, stanice su obojane kristal-ljubičastom bojom i fotografirane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom, a rezultati su prikazani na slici 10 a-c.

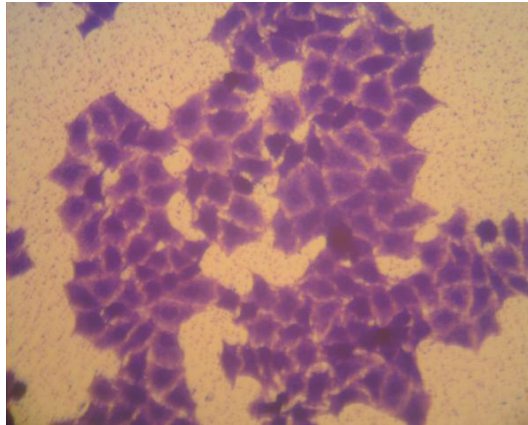
a)



b)



c)



Slika 10. Svjetlosna mikroskopija HeLa stanica obojanih kristal ljubičastim: a) kontrolne stanice b) HeLa stanice tretirane ekstraktom u BGlc (2,5 % (v/v)) c) HeLa stanice tretirane ukupnim polifenolima (2,5 % (v/v))

Slika 10a pokazuje netretirane, kontrolne stanice pravilne morfologije, velike gustoće i visokog stupnja povezanosti. HeLa stanice tretirane ekstraktom u betain:glukoza i ukupnim pročišćenim polifenolima pokazuju znatno manju gustoću u odnosu na kontrolne stanice. Ekstrakti su djelovali inhibirajuće na stanični rast odnosno značajno je manji broj stanica te je kontakt među stanicama narušen. Ekstrakt u betain:glukoza je pokazao veće inhibirajuće djelovanje u odnosu na ukupne polifenole, čime je potvrđen rezultat MTS metode.

5. ZAKLJUČCI

1. Antioksidacijski kapacitet određen je ORAC metodom i najveću vrijednost imali su ekstrakti u betain:glukoza ($1191,88 \pm 27,03 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.tv.}$), kolin-klorid:limunska kiselina ($1180,95 \pm 1,82 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.tv.}$) i kolin-klorid:saharoza ($1168,08 \pm 38,33 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.tv.}$).
2. Biološka aktivnost ekstrakata u betain:glukoza, kolin-klorid:saharoza i ukupnih polifenola u volumnim udjelima od 1 do 5 % (v/v) ispitana je *in vitro* primjenom MTS kolorimetrijske metode na HeLa tumorskoj staničnoj liniji. Postotak inhibicije rastao je s povećanjem volumnog udjela i pri 5 % (v/v) ekstrakt u betain:glukoza djelovao je 27 % inhibirajuće, kolin-klorid:saharoza 24 %, dok su ukupni pročišćeni polifenoli imali postotak inhibicije od 33 %.
3. Biološka aktivnost ekstrakata ispitana je i na normalnoj staničnoj liniji HaCat u volumnim udjelima od 1 do 5 % (v/v) te su ekstrakti odnosno izolirani polifenoli potaknuli proliferaciju stanica. Postotak proliferacije rastao je s povećanjem volumnog udjela i pri 5 % (v/v) ekstrakt u betain:glukoza djelovao je 85 % inducirajuće, kolin-klorid:saharoza 88 % te ukupni pročišćeni polifenoli samo 30 %.
4. Svjetlosnom mikroskopijom HeLa stanične linije potvrđeni su rezultati dobiveni MTS kolorimetrijskom metodom. Ekstrakt u betain:glukoza pokazao je veći inhibitorni učinak na rast HeLa stanične linije pri 2,5 % (v/v) za razliku od ukupnih pročišćenih polifenola.

6.LITERATURA

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7915 - 7922.

Anakok, O. F. (2010) Serrulatanes from *eremophila neglecta*: their spectrum of antibacterial activity, cytotoxicity and mode of action. Doktorska disertacija, University of South Australia.

Anonymous 1 (2019) Kakaova zrna, <<https://www.mojacokolada.hr/novice/kakaovac-hrana-bogova-n557>> . Pristupljeno 15.srpnja 2019.

Anonymous 2 (2019) Neubauer komora, <<https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/neubauer>> . Pristupljeno 2.srpnja 2019.

Anonymous 3 (2019) Neubauer mrežica, <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/br718605?lang=en®ion=HR>> . Pristupljeno 2.srpnja 2019.

Baharum, Z., Akim, A. M., Hin, T. Y. Y., Hamid, R. A., Kasran, R. (2016) *Theobroma cacao*: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. *Tropical Life Science Research* **27**: 21 - 42.

Bansode, R. R., Randolph, P., Ahmedna, M. Williams, L. L, Yu, J. (2014) Bioavailability and hypolipidemic effects of peanut skin polyphenols. *Journal of Medicinal Food* **0**: 1 - 8.

Bauer, D., Pimentel de Abreu, J., Oliveira, H. S. S., Goes-Neto, A., Koblitz, M. G. B., Junger Teodoro, A. (2016) Antioxidant Activity and Cytotoxicity Effect of Cocoa Beans Subjected to Different Processing Conditions in Human Lung Carcinoma Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**: 1 - 11.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988) Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology* **106**: 761 - 771.

- Brahem, M., Renard, C. M. G. C., Bureau, S., Watrelot, A. A. Bourvellec, C. L. (2018) Pear ripeness and tissue type impact procyanidin-cell wall interactions. *Food Chemistry* **275**: 754 - 762.
- Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **14**: 303 - 311.
- Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology* **156**: 1701 - 1705.
- 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 Chemistry* **200**: 159 - 166.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioprocess Processing* **109**: 52 - 73.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica 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. *Analytical Chemistry* **85**: 6272 - 6278.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **2**: 22 - 33.
- Gorke, J. T. (2010) Application of deep eutectic solvents and ionic liquids to hydrolase-catalyzed reactions, Doktorska disertacija, University of Minnesota
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**: 2193 - 2195.

- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E. S. (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**: 455 - 459.
- Hsu, S., Bollag, W. B., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., Yamamoto, T., Schuster, G. (2003) Green Tea Polyphenols Induce Differentiation and Proliferation in Epidermal Keratinocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306**: 29 - 34.
- Kudlak, B., Owezarek, K., Namiešnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents- a review. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 11975 - 11992.
- Lagha, A. B., 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.
- Mazor Jolić S., Radojčić Redovniković, I., Marković, K., Ivanec Šipušić, Đ., Delonga, K. (2011) Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International Journal of Food Science and Technology* **46**: 1793 - 1800.
- Mitar, A., Panić, M., Prlić Kardum, J., Halambek, J., Sander, A., Zagajski Kučan, K., Radojčić Redovniković, I., Radošević, K. (2019) Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **33**: 39 - 56.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M. (2005) Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition* **93**(2): 257 - 66.
- Oracz, J., Zyzelewicz, D., Nebesny, E. (2013) The content of polyphenolic compounds in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), depending on variety, growing region and processing operations: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**: 1176 - 1192.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2**: 1063 - 1071.

Panić, M. (2016) Priprava ekstrakata komine grožđa pomoću eutetičkih otapala, izolacija antocijana te njihova in vitro biološka aktivnost. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Panić, M., Radić Stojković, M., Kraljić, K., Škevin, D., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2019) Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chemistry* **283**: 628 - 636.

Proteggente, A. R., Pannala, A., Paganga, G., Leo-Van, B., Wagner, E., Wiseman, S., Van de Put, F., Dacombe, C., Rice-Evans, C. (2002) The Antioxidant activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. *Free Radical Research* **36**(2): 217 - 33.

Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Cvjetko Bubalo, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research* **14**: 14188 - 14196.

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

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

Tang, B., Row, K. H. (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatshefte für Chemie* **144**: 1427 - 1454.

Uivarosi, V., Munteanu, A. (2017) Flavonoid Complexes as Promising Anticancer Metallo-drugs. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health* **14**: 305 - 333.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 622 - 646.

Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Kerscher, M. (2015) Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science* **37**: 455 - 464.

Izjava o izvornosti

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

Viktorija Belavč

Ime i prezime studenta