

# Biološka aktivnost ekstrakata nusproizvoda prehrambene industrije pripremljenih pomoću eutektičkih otapala

---

Kelava, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:537625>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2017.

Ivana Kelava  
793/MB

**BIOLOŠKA AKTIVNOST  
EKSTRAKATA NUSPROIZVODA  
PREHRAMBENE INDUSTRIJE  
PRIPRAVLJENIH POMOĆU  
EUTEKTIČKIH OTAPALA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Kristine Radošević, te uz pomoć Manuele Panić, mag.ing.bioproc. Rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta 9550.

*Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević na vodstvu, savjetima i uloženom vremenu, i posebice na strpljenju tijekom izvođenja i pisanja ovog rada. Veliko hvala Manueli Panić, mag.ing.bioproc. na susretljivosti i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima, a posebno hvala mojim roditeljima i sestrama na podršci i strpljenju tijekom studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE PRIPRAVLJENIH POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA

*Ivana Kelava, 793/MB*

**Sažetak:** Nusproizvodi prehrambene industrije često predstavljaju problem zbog zbrinjavanja, ali su ujedno i bogat izvor biološki vrijednih spojeva, kao što su fitokemikalije. Posljednjih se godina eutektička otapala (DES) istražuju kao alternativna otapala za zelenu ekstrakciju, a u ovom radu su korištena za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Pripremljeni su ekstrakti komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače pri prethodno optimiranim uvjetima s eutektičkim otapalima i konvencionalnim otapalima. Nadalje, pripremljenim ekstraktima spektrofotometrijskom metodom je određen udio polifenolih spojeva, antioksidacijski kapacitet ORAC metodom te je ispitana biološka aktivnost na trima staničnim linijama (HeLa, MCF-7, HEK293T). Najveći udio polifenolnih spojeva ekstrahiran je iz komine grožđa s eutektičkim otapalom kolin-klorid:limunska kiselina, a isti ekstrakt imao je najveći antioksidacijski kapacitet te najizraženiji inhibitory učinak na stanične linije. Tretiranim humanim tumorskim staničnim linijama određen je i tip stanične smrti te je indukcija apoptoze izražena nakon tretmana ekstraktom komine grožđa pripremljenog u zakiseljenom etanolu.

**Ključne riječi:** *antioksidacijski kapacitet, apoptoza, eutektička otapala, in vitro biološka aktivnost, nusproizvodi prehrambene industrije*

**Rad sadrži:** 46 stranica, 16 slika, 4 tablice, 78 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*
2. Doc.dr.sc. *Klara Kraljić*
3. Doc.dr.sc. *Kristina Radošević*
4. Izv.prof.dr.sc. *Ivana Kmetič*

**Datum obrane:** 07.12.2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF FOOD INDUSTRY BY-PRODUCTS PREPARED USING EUTECTIC SOLVENTS

*Ivana Kelava, 793/MB*

**Abstract:** Recurring problem in food industry is disposal of by-products which are also a rich source of biologically active compounds, such as phytochemicals. In recent years deep eutectic solvents (DES) are investigated as alternative solvents for green extraction and in this paper they are used for extraction of biologically active compounds from plant materials. Extracts from grape pomace, olive pomace and flaxseed pressed cake were prepared in optimized conditions with eutectic and conventional solvents. Furthermore, total polyphenols were analyzed using spectrophotometric method, antioxidant capacity was determined using ORAC method and biological activity was tested on three cell lines (HeLa, MCF-7, HEK93T). Grape pomace in DES exhibited the highest value of polyphenols, the highest antioxidant activity and the most prominent inhibitory effect on cell lines. Type of cell death was determined for treated human tumor cell lines and the induction of apoptosis was most significant after treatment with acidified ethanol.

**Keywords:** *antioxidative capacity, apoptosis, eutectic solvents, food industry by-products, in vitro biological activity*

**Thesis contains:** 46 pages, 16 figures, 4 tables, 78 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Kristina Radošević, Assistant professor*

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

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
2. PhD. *Klara Kraljić*, Assistant professor
3. PhD. *Kristina Radošević*, Assistant professor
4. PhD. *Ivana Kmetič*, Associate professor

**Thesis defended:** 07.12.2017.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Nusproizvodi prehrambene industrije .....	2
2.1.2. Komina masline.....	4
2.1.3. Prešana lanena pogača.....	4
2.2. Polifenolni spojevi.....	5
2.3. Zelena otapala .....	6
2.3.1. Eutektička otapala .....	7
2.3.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala .....	8
2.3.1.2. Biorazgradivost i toksičnost eutektičkih otapala .....	9
2.3.1.3. Primjena eutektičkih otapala .....	10
2.4. Zeleni pristupi u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva.....	11
2.5. Primjena kultura životinjskih stanica .....	12
2.5.1. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti .....	13
2.5.2. Ispitivanje biološke aktivnosti polifenolnih spojeva na kulturama stanica.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI .....	16
3.1.1. Ekstrakti nusproizvoda prehrambene industrije .....	16
3.1.2. Kemikalije .....	17
3.1.3. Otopine i puferi .....	17
3.1.4. Humane stanične linije .....	18
3.1.5. Uređaji i oprema.....	19
3.2. METODE .....	19
3.2.1. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu (FC) reagensom .....	19
3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.....	20
3.2.2.1. Mjerenje ORAC vrijednosti .....	20
3.2.2.2. Izračun ORAC-vrijednosti .....	21
3.2.3. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata nusproizvoda prehrambene industrije na HeLa, MCF-7 i HEK293T staničnoj liniji.....	21
3.2.3.1. Uzgoj stanica.....	21
3.2.4. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo .....	22
3.2.5. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakata nusproizvoda prehrambene industrije na HeLa, MCF-7 i HEK293T stanične linije pomoću MTS metode.....	22
3.2.6. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Annexin V & Dead Cell Kit-a .....	23
3.3. Obrada rezultata .....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25



4.1. Ukupni polifenolni spojevi u ekstraktima komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače .....	26
4.2. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače.....	28
4.3. Učinak ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače na HeLa, MCF-7 i HEK293T stanične linije .....	29
4.4. Učinak ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače na tumorske HeLa i MCF-7 stanične linije određen protočnom citometrijom .....	34
5. ZAKLJUČCI .....	38
6. LITERATURA .....	39

# 1. UVOD

Nusproizvodi prehrambene industrije su bogati bioaktivnim (pogotovo polifenolnim spojevima) i nutritivnim tvarima koje pogoduju ljudskom zdravlju, a njihovom daljnjom obradom može se ostvariti dodana vrijednost proizvodnog proces i eventualno razviti novi proizvod (Ferri i sur., 2015). Mnogi polifenolni spojevi posjeduju antioksidacijsku, antibakterijsku, antiviralnu i antiupalnu aktivnost te imaju antitumorska i/ili antimutagena svojstva (Han i sur., 2007; Baidez i sur., 2007; Veeriah i sur., 2006; Owen i sur., 2000) zbog čega se sve više istražuje dodatno iskorištavanje nusproizvoda prehrambene industrije.

Zamjena hlapivih organskih sa zelenim otapalima jedan je od 12 principa na kojima se temelji zelena kemija, grana znanosti koja istražuje razvoj i primjenu kemijskih proizvoda koji reduciraju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš (Anastas i Warner, 1998). Kao jedno od alternativnih otapala predloženo je nekoliko tipova otapala među kojima su i eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES). Eutektička otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, amida, alkohola i vitamina. Supstrati za sintezu DES-ova su lako dostupne, jeftine, sigurne, netoksične i biorazgradive tvari koje se povezuju vodikovim vezama. Mogućnost odabira poželjnih fizikalno-kemijskih svojstava DES-a za određenu namjenu čini eutektička otapala „dizajniranim otapalima“.

U ovom radu pripremljenim ekstraktima komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače s eutektičkim otapalima te konvencionalnim otapalima pri prethodno optimiranim uvjetima, odredit će se udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet primjenom ORAC metode. Ispitat će se *in vitro* biološka aktivnost na humanim tumorskim staničnim linijama (HeLa i MCF-7) te humanoj normalnoj staničnoj liniji (HEK293T). Primjenom analizatora staničnog zdravlja Muse™ i odgovarajućeg kita odredit će se tip stanične smrti.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Nusproizvodi prehrambene industrije

Prehrambena industrija diljem svijeta stvara velike količine otpada i nusproizvoda na godišnjoj razini. Upravo ti otpadni materijali i nusproizvodi mogu biti izvrstan izvor bioaktivnih, nutritivnih tvari koje pogoduju ljudskom zdravlju. Upravljanje otpadom sastavni je dio zaokruženog procesa proizvodnje hrane, a iskorištavanje velikih količina prehrambenih nusproizvoda niske cijene predstavlja ekonomsku prednost upravo zbog sadržaja potencijalno vrijednih tvari. Stoga, uporaba nusproizvoda i njihova preinaka mogu imati značajan pozitivan utjecaj na radnike, vlasnike pa i državu. Također, javnost postaje sve upućenija i svjesnija povezanosti pravilne prehrane i dobrog zdravlja. Stoga se i zbog stava potrošača prema zdravoj prehrani i očuvanju okoliša u budućnosti očekuje razvoj prehrambene industrije usmjerene na upravljanje nusproizvodima i otpadom (Helkar i sur., 2016).

Ovisno o prirodi proizvedenog proizvoda, nusproizvodi prehrambene industrije sastoje se od dijetalnih vlakana, peptida, lipida, masnih kiselina i polifenolnih spojeva. Tablica 1. prikazuje različite grane prehrambene industrije i otpadne materijale koji popratno nastaju.

**Tablica 1.** Grane prehrambene industrije te nusproizvodi i otpad nastali obradom sirovina (Ezejiofor i sur., 2014)

<b>Prehrambena industrija</b>	<b>Nusproizvodi i otpad</b>
Procesiranje žitarica	Ljuske, kožica, zrna riže
Procesiranje voća i povrća	Koža, kora, pulpa, sjemenke, stabljike, vlakna
Procesiranje peradi	Koža, kosti, krv, perje, jetra, iznutrice
Procesiranje morskih namirnica	Utroba, glave, kralježnica, krc, školjke
Procesiranje mliječnih namirnica	Sirutka, laktoza

Pretpostavlja se da će, zbog brzorastuće industrije procesiranja hrane, nastajati sve više nusproizvoda (Sharma, 2010), stoga je od velikog značenja razumno i ekonomično upravljanje i iskorištavanje navedenih nusproizvoda.

### 2.1.1. Komina grožđa

Grožđe (*Vitis vinifera*) je jedan od najvećih voćnih usjeva na svijetu (proizvodi se više od 60 milijuna tona godišnje). Grožđe se koristi za dobivanje širokog spektra proizvoda – etanola, ulja sjemenki grožđa, ekstrakata sjemenki grožđa, ekstrakata kore grožđa i praha sjemenki grožđa. Otprilike 80 % ukupnih usjeva grožđa iskorišteno je za proizvodnju vina, dok ostalih 20 % otpada na nusproizvode nastale prilikom proizvodnje među kojima je i komina grožđa (Scheiber i sur., 2001b). Preostala komina koristi se najčešće za kompostiranje, za dobivanje limunske kiseline, metanola, etanola i ksantan gume ili se odbacuje u okoliš gdje može uzrokovati probleme. Nutritivne karakteristike i kemijski sastav komine grožđa variraju ovisno o sorti grožđa, klimatskim uvjetima rasta i uvjetima procesiranja (Deng i sur., 2011).

Uzimajući u obzir pojedinačne frakcije komine grožđa udio sjemenki iznosi od 38 % do 52 % suhe tvari. Sjemenke se sastoje prvenstveno od 40 % vlakana, 16 % esencijalnih ulja, 11 % proteina te 7 % kompleksnih polifenolnih spojeva kao što su tanini. S druge strane pokožica čini 65 % komine te je bogat izvor polifenolnih spojeva čiji sastav ovisi o prethodnom procesu vinifikacije i metodi ekstrakcije (odabiru otapala, temperaturi i vremenu ekstrakcije) (Teixeira i sur., 2014). Peteljka se u najvećoj mjeri sastoji od vlakana, prije svega lignina i celuloze i osim toga sadrži visok postotak nutritivno vrijednih minerala kao što je dušik i kalij (Nerantzis i Tataridis, 2006). Komina grožđa (slika 1) tako predstavlja visokovrijednu sirovinu za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva te se njeni ekstrakti mogu primijeniti kao funkcionalna hrana i sirovina, prirodno sredstvo za bojanje, kao konzervans u hrani i dr. (Ferri i sur., 2015).



**Slika 1.** Komina grožđa (Anonymous 1, 2014)

### 2.1.2. Komina masline

Maslina (*Olea europaea*) je zimzeleno drvo rasprostranjeno po Mediteranu koje se koristi za dobivanje ulja iz ploda. Maslinovo ulje predstavlja proizvod od velike ekonomske važnosti na mediteranskom području.

Nusproizvod proizvodnje maslinovog ulja je komina masline (slika 2) koja u zadnje vrijeme privlači mnogo pozornosti jer je bogat izvor polifenolnih spojeva te može sadržavati  $\geq 90$  % polifenolnih spojeva iz svježe masline (Suárez i sur., 2009). Komina masline sadrži organske i anorganske spojeve kao što su kalcij, magnezij, metali, šećeri ali je bogata i polifenolnim spojevima (Sánchez Moral i Ruiz Méndez, 2006). Prilikom proizvodnje maslinovog ulja, udio komine masline može biti i do 30%, ovisno o procesu mljevenja.



**Slika 2.** Komina masline (Anonymous 2, 2012)

### 2.1.3. Prešana lanena pogača

Lan (*Linum usitatissimum*) pripada obitelji *Linaceae*, i uzgaja se za proizvodnju tekstilnih vlakana, sjemenki i lanenog ulja. Poznato je da su sjemenke lana (slika 3) bogate proteinima, vlaknima i visokim sadržajem poluzasićenih masnih kiselina (Pradhan i sur., 2010). Ulje lana bogato je alfa-linolenskom, linolnom i oleinskom kiselinom i zbog toga je godinama od interesa.

Nakon ekstrakcije ulja (uz iskorištenje od oko 30 %) ostaje velika količina prešane lanene pogače, koja se zatim odbacuje jer se smatra otpadom, ili u najboljem slučaju nusproduktom bez vrijednosti (Figuerola i sur., 2008). Prešana lanena pogača uglavnom se koristi kao stočna hrana, a ponegdje i kao aditiv u pekarskoj industriji (Coşkuner i Karababa, 2007). Obzirom na znatan potencijal lipida, proteina, topivih vlakana i lignana u pogači, ovaj nusproizvod postao je zanimljiv za istraživanje i uporabu.



**Slika 3.** Sjemenke lana i prešani lan (Anonymous 3, 2012)

## **2.2. Polifenolni spojevi**

Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju utjecaj na gorčinu, boju, okus, miris i oksidativnu stabilnost hrane (Pandey i sur., 2009). Prirodni polifenoli su naveliko proučavani i pokazalo se da imaju mnoge važne biološke funkcije kod čovjeka (Arts i Hollman, 2005).

Do danas je poznato više od 10000 polifenolnih spojeva, a kemijski, većina ih ima zajednički intermedijer ili prekursor (Li i sur., 2014). Polifenolni spojevi u biljkama imaju esencijalne uloge u njihovom reproduktivnom sustavu i njihovom rastu, služe kao obrambeni mehanizam protiv patogena, parazita i predatora, te utječu na boju biljke (Baidez i sur., 2007). Mnogi polifenolni spojevi posjeduju antioksidacijsku, antibakterijsku, antiviralnu i antiupalnu aktivnost te imaju antitumorska i/ili antitumorigena svojstva (Han i sur., 2007; Baidez i sur.,

2007; Veeriah i sur., 2006; Owen i sur., 2000). Veliki broj polifenolnih spojeva ima dokazanu biološku aktivnost i pokazuje pozitivne učinke na zdravlje ljudi.

Polifenolni spojevi nastaju različitim metaboličkim putevima, iz šikiminske kiseline, fenilpropanoida ili pentoza fosfatnim putem, a svi polifenolni spojevi sadrže barem jedan hidroksilirani aromatski prsten (Morton i sur., 2000). Unatoč strukturnim razlikama velikog broja polifenolnih spojeva, oni se mogu kategorizirati u sedam razreda prikazanih u tablici 2., od kojih se fenolne kiseline, flavonoidi i tanini smatraju glavnim prehranbenim polifenolnim spojevima (King i Young, 1999).

**Tablica 2.** Razredi polifenolnih spojeva u biljkama (Harborne, 1989.; Harborne i sur., 1999)

RAZRED	STRUKTURA
Jednostavni polifenoli, benzokinoni	$C_6$
Hidroksibenzojeve kiseline	$C_6 - C_1$
Acetofenoni, fenilacetatne kiseline	$C_6 - C_2$
Hidroksicimetne kiseline, fenilpropanoidi (kumarini, izokumarini...)	$C_6 - C_3$
Naptokinoni	$C_6 - C_4$
Ksantoni	$C_6 - C_1 - C_6$
Stilbeni, antrakinoni	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoidi, izoflavonoidi	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignani, neolignani	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoidi	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Lignini	$(C_6 - C_3)_n$
Kondenzirani tanini	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

### 2.3. Zelena otapala

Zelena kemija je, prema definiciji, grana kemije koja istražuje razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš (Anastas i Warner, 1998). Temelji se na 12 principa, a jedan od njih je pronalaženje i ispitivanje novih alternativnih reakcijskih medija kao što su otapala.

U kemijskoj industriji organska otapala se danas koriste u velikim količinama. Farmaceutska industrija i industrija finih kemikalija iziskuju velike količine raznih otapala po prinosu konačnog produkta. O njihovoj primjeni ovisi učinak proizvodnog procesa na okoliš, cijenu, sigurnost i zdravlje konačnog proizvoda. Ideja zelenih otapala obuhvaća minimalizaciju negativnih utjecaja na okoliš. Stoga bi sa stajališta zelene kemije, prema Matzke i sur. (2016), otapala trebala biti:

1. Nehlapljiva – kako bi se smanjilo zagađenje zraka;
2. Nezupaljiva – kako bi se osigurala sigurnost procesa;
3. Stabilna – za recikliranje i potencijalnu ponovnu uporabu;
4. Sintetizirana postupkom neškodljivim za okoliš;
5. Netoksična i biorazgradiva – zbog utjecaja na okoliš.

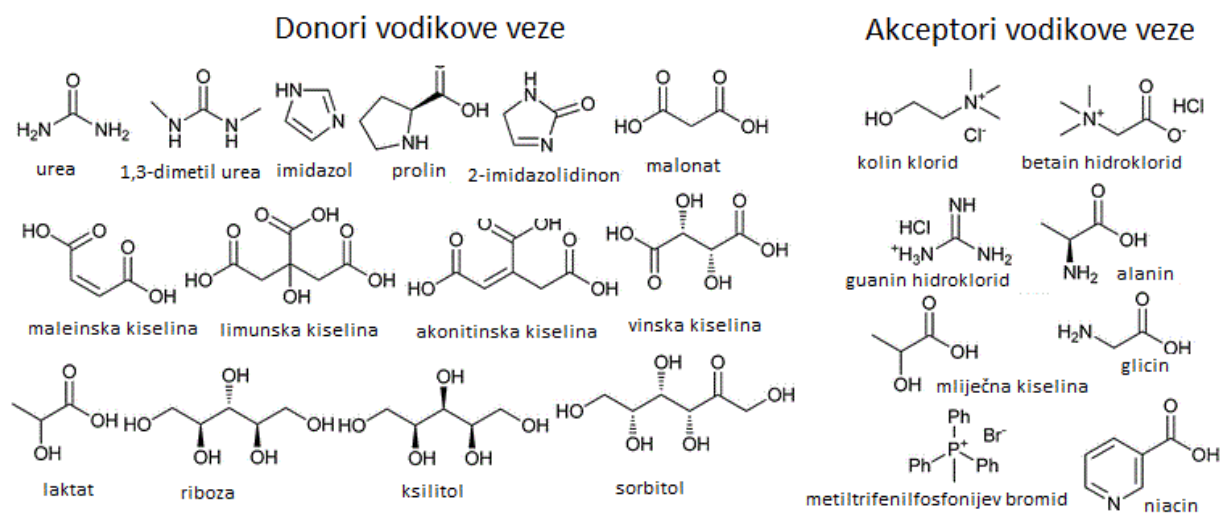
Sukladno navedenom postoje četiri smjera u razvoju alternativnih zelenih otapala, prema Matzke i sur. (2016):

1. Zamjena opasnih otapala onima koji pokazuju svojstva bolja za okoliš, zdravlje i sigurnost (eng. *environmental, health i safety*, EHS)
2. Otapala proizvedena iz obnovljivih izvora energije
3. Zamjena organskih otapala superkritičnim tekućinama koje su bezopasne za okoliš
4. Zamjena organskih otapala ionskim kapljevinama i eutektičkim otapalima (Paiva i sur., 2014) koje imaju nizak tlak para

### 2.3.1. Eutektička otapala

Kriterije zelenih otapala djelomično su ispunile prirodne ionske kapljevine (eng. *ionic liquids*, ILs), a kasnije i eutektička otapala. Eutektička otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika (eng. *hydrogen bond donor*, HBD) poput šećera, amina, amida, alkohola i vitamina (Gorke i sur., 2010), gdje su navedene komponente povezane jakim vodikovim vezama. Neke od struktura supstrata korištenih za sintezu eutektičkih otapala prikazane su na slici 4. Eutektička otapala se pripremaju od lako dostupnih, jeftinih, sigurnih, netoksičnih i biorazgradivih tvari koje imaju sposobnost samoudruživanja.





**Slika 4.** Tipične strukture donora i akceptora vodikove veze u sintezi DES-a (Liu i sur., 2015)

Baza većine DES-ova je kolin klorid koji je esencijalni sastojak vitamina B<sub>4</sub> i uvelike se koristi kao aditiv u hrani, a klasificiran je kao siguran spoj (Shahriari i sur., 2013). Derivati kolina imaju metaboličku ulogu u pohrani ugljikohidrata, enzimske aktivnosti i sintezi vitamina (Zhao i sur., 2011a).

Nova generacija eutektičkih otapala su prirodna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES), čiji su donori vodikove veze u eutektičkom otapalu primarni metaboliti (aminokiseline, organske kiseline, ugljikohidrati, šećeri, alkoholi, šećerni alkoholi, polialkoholi, amidi).

### 2.3.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala

Fizikalno-kemijska svojstva kao što su talište, gustoća, vodljivost i viskoznost ovise uvelike o strukturi samog DES-a (Tang i sur., 2015). Ovisno o broju različitih donora i akceptora vodikove veze koji se mogu upotrijebiti za pripravu DES-a, Smith i sur. (2014) opisali su DES-ove prema sljedećoj formuli:  $Cat^+X^-zY$ .  $Cat^+$  predstavlja katione različitih amonijevih, fosfornih i sulfatnih soli,  $X^-$  je halidni anion soli,  $Y$  je Lewisova ili Brönstedova kiselina, a  $z$  broj molekula  $Y$ -a. Ovisno o formuli, postoje različiti tipovi DES-ova i prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Vrste eutektičkih otapala (Smith i sur., 2014)

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

Kemijska priroda donora i akceptora vodikove veze i njihov molarni omjer faktori su koji utječu na fizikalno-kemijska svojstva DES-a. Mogućnost odabira poželjnih fizikalno-kemijskih svojstava DES-a za određenu namjenu čini eutektička otapala „dizajniranim otapalima“. Prilikom sinteze DES-a može se utjecati na fizikalno-kemijska svojstva kao što su provodljivost, gustoća, točka leđišta, viskoznost i dr. U usporedbi sa ionskim kapljevinama, DES-ovi su viskozniji, ali imaju manju vodljivost (Smith i sur., 2014) te dobro otapaju anorganske soli i organske molekule (Abbott i sur., 2004).

### 2.3.1.2. Biorazgradivost i toksičnost eutektičkih otapala

Eutektička otapala smatraju se „lako biorazgradivima“ (Juneidi i sur., 2015; Wen i sur., 2015) što se pripisuje činjenici da je i većina početnih tvari koje se koriste za sintezu DES-ova također klasificirana kao biorazgradiva. Tako je kolin klorid poznat kao lako biorazgradiva sol jer prema kriterijima međunarodno uvažene Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) postiže 93 %-tnu razinu degradacije u roku od 14 dana (Mbous i sur., 2016). Prema OECD kriteriju spoj, koji postiže razinu degradacije od 60 % u prvih deset dana testa u trajanju od 28 dana, smatra se lako biorazgradivim.

U radu Radošević i sur. (2015) dokazana je korelacija između biorazgradnje i citotoksičnosti otapala. Ispitivana je biorazgradnja tri DES-a na bazi kolin klorida u vodenom mediju koji je sadržavao mikroorganizme iz otpadnih voda. Svi ispitani DES-ovi lako su biorazgradivi, a rezultati su temeljeni na njihovoj visokoj razini mineralizacije. Ispitivanja toksičnosti pokazala su toksično djelovanje  $[\text{ChCl}]-[\text{OA}]$  te blagu toksičnost preostalih DES-ova,  $\text{ChGly}$  i  $\text{ChGlc}$ . Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da sastav DES-a, tj. odabir donora vodikove veze utječe na toksičnost DES-a. U radu Wen i sur. (2015) ispitana je biorazgradivost osam DES-ova na bazi kolin klorida i kolin acetata u vodenom mediju s

mikroorganizmima iz otpadnih voda, i samo su dva DES-a pokazala sposobnost biorazgradnje. Različiti rezultati u radu Radošević i sur. (2015) i Wen i sur. (2015) pripisani su faktorima kao što su različite koncentracije DES-ova, različiti mikroorganizmi otpadnih voda upotrijebljeni u testu biorazgradnje te različita koncentracija DES-a i aktivnog mulja.

Ispitivanja toksičnosti DES-ova su brojnija, dok je manje radova koji izučavaju biorazgradnju tih otapala stoga su potrebna daljnja istraživanja i procjene učinka tih otapala na okoliš, budući da je u više navrata pokazano da se njihova „zelenost“ ne može temeljiti na činjenici da su građeni od neškodljivih komponenata. Najveća prednost DES-ova je mogućnost modificiranja njihove strukture odabirom odgovarajućeg donora i akceptora vodika čime se može utjecati na njihovu ekotoksičnost i biorazgradnju te pronaći najbolja kombinacija za određeni proces.

### *2.3.1.3. Primjena eutektičkih otapala*

DES-ovi su primjenu našli u organskim sintezama i (bio)katalizama zbog mogućnosti prilagodbe njihovih svojstava odabirom početnih sirovina, elektrokemiji, proizvodnji polimera, u procesima separacije i analize te pri ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala (otapaju ih 10 do 100 puta bolje nego voda) (Zhang i sur., 2012).

Eutektička otapala primjenjuju se u farmaceutskoj i biomedicinskoj industriji, molekularnoj biologiji te u mnogim procesima kao što su biotransformacije. Gill i sur. (2014) u svojem su radu pokazali da eutektička otapala korištena kao otapala za enzimске reakcije pokazuju bolje rezultate u odnosu na uobičajena organska otapala. Eutektička otapala zbog svoje visoke vodljivosti imaju primjenu i u galvanizaciji metala (Paiva i sur., 2014). Proces biokatalize provedeni sa DES-om kao biokatalizatorom rezultirali su povećanjem stabilnosti i reaktanata i produkata, te povećanom topljivošću enzima. DES je također povećao učinkovitost enzima povećanjem njegove enantioselektivnosti i regioselektivnosti (Juneidi i sur., 2017).

Choi i sur. (2011) upotrijebili su NADES-e kao otapalo za prirodne bioaktivne spojeve i pokazali njihovu prednost u odnosu na hlapive organske spojeve i ionske kapljevine, posebice u procesima ekstrakcije u kojem je uvjet da je bioaktivni spoj topljiv u ekstrakcijskom mediju. Primjena DES-a pokazala se uspješnom u sklapanju nanomaterijala. Raghuvanshi i sur. (2014) su u svom istraživanju pokazali svojstva DES-a kao dobrog medija za sklapanje nanomaterijala u željenu strukturu.

Goldsborough i Bates (2014) su prepoznali potencijal DES-a u molekularnoj biologiji i otkrili da DES-ovi imaju sposobnost stabilizacije i očuvanja biomolekula, čitavih stanica i tkiva. Spojevi na bazi DNA, RNA i proteina uspješno su stabilizirani u mješavinama DES-a neovisno o njihovom agregatnom stanju, a fiksacija stanica i očuvanje njihove strukture i morfoloških svojstava uporabom DES-a omogućili su DES-u primjenu u analitičkim metodama kao što su brojanje stanica, imunocitokemija, bojanje, protočna citometrija, masena spektrometrija i in situ hibridizacija.

#### **2.4. Zeleni pristupi u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva**

Konvencionalne metode ekstrakcije biološki aktivnih spojeva su obično povezane sa potrošnjom velikih količina organskih otapala, kao i uz veliku potrošnju energije te nedovoljno iskorištenje ekstrakta (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Chemat i sur., 2012). Uz to, širok raspon polarnosti i fizikalnih svojstava prirodnih spojeva u sirovinama čini postupak ekstrakcije pomoću organskih otapala u samo jednom koraku gotovo nemogućim (Dai i sur., 2013b). Procjenjuje se da otapala koja se koriste tijekom ovakvih procesa ekstrakcije čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih hlapljivih organskih emisija u cijelom svijetu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Prema tome, potrebno je okrenuti se principima zelene ekstrakcije.

Definicija zelene ekstrakcije je sljedeća: „Zelena ekstrakcija se temelji na pronalaženju i dizajniranju ekstrakcijskih procesa koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti uporabu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurati visokokvalitetan i siguran ekstrakt, odnosno proizvod. Prema Chemat i sur. (2012), poznata su šest principa zelene ekstrakcije.

Jedan od principa zelene ekstrakcije je i upotreba alternativnih otapala, a jedna od njih, koja posljednjih godina privlače veliku pozornost, su eutektička otapala. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova imaju utjecaj na proces ekstrakcije. DES-ovi imaju sposobnost doniranja i primanja protona i elektrona što omogućuje stvaranje vodikovih veza, čime se povećava sposobnost otapanja ciljanih molekula. Njihove prednosti kao ekstrakcijskog otapala su :

- (i) tekuće agregatno stanje na sobnoj temperaturi
- (ii) mogućnost smanjenja viskoznosti otapala dodatkom vode
- (iii) mogućnost podešavanja polarnosti te posljedično ekstrakcija različitih skupina spojeva

Tehnike ekstrakcije i separacije spojeva pomoću DES-ova uspješno su implementirane u razne grane industrije kao što su proizvodnja biodizela, bioaktivnih komponenata i metala (Bi i sur., 2013).

Osim primjene alternativnih otapala, drugi princip zelene ekstrakcije jest i primjena alternativnih izvora energije čime se nastoji skratiti vrijeme ekstrakcije, povećati prinos u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije i time dovesti do uštede energije (Chemat i sur., 2012). U ovom radu ekstrakti su pripremljeni primjenom alternativne zelene tehnologije – ekstrakcija potpomognuta istovremenim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem.

## **2.5. Primjena kultura životinjskih stanica**

Kultura životinjskih stanica podrazumijeva laboratorijsku tehniku *in vitro* uzgoja pojedinačnih stanica izoliranih iz životinjskih tkiva ili organa. Uzgoj započinje uspostavljanjem primarne kulture životinjskih stanica koje su izolirane direktno iz željenog organa ili organizma i njihovo nacjepljivanje u hranjivom mediju. Kultura se održava u optimalnim *in vitro* uvjetima koji uključuju odgovarajuću temperaturu i pH, faktore rasta i druge potrebne nutrijente. Stanice se umnažaju sve dok populacija stanica ne postane limitirana prostorom ili nutrijentima za rast a tada je stanice potrebno precijepiti.

Primjena kultura životinjskih stanica uključuje brojna područja znanosti, a u znanstveno-istraživačkom radu najčešće se koriste kontinuirane stanične linije dobivene subkultiviranjem primarne kulture. One se koriste u staničnoj i molekularnoj biologiji, imunologiji, fiziologiji, biotehnologiji kao proizvodne stanične linije, u područjima genetičkog i tkivnog inženjerstva, te imaju bitnu ulogu u farmakologiji za ispitivanje djelovanja i metabolizma lijekova, kao i u toksikologiji za ispitivanje citotoksičnosti.

Razvoj *in vitro* testova potaknut je zbog znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. Obzirom na činjenicu da je danas u upotrebi oko 100 000 kemikalija, a svake godine na tržište izlazi 1000 novih, njihovu toksičnost je nužno ispitati prije široke primjene koja za posljedicu ima prisutnost tih kemikalija u okolišu. Primjena *in vitro* testova uvelike doprinosi procjeni rizika već poznatih, ali i novo sintetiziranih kemikalija.

### 2.5.1. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti

Biološka aktivnost i učinak eutektičkih otapala, i drugih kemikalija, određuju se izvođenjem niza testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*). Na temelju tih testova procjenjuje se učinak na ljude i okoliš. *In vitro* testovi citotoksičnosti razvijeni su kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima koji se provode na pokusnim životinjama i uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, staničnim linijama, dijelovima tijela, kulturama organa, itd. (Kniewald i sur., 2005). Već dugi niz godina postoji težnja da se reducira broj *in vivo* ispitivanja zbog znanstvenih i ekonomskih, a preventivno etičkih razloga. Cilj je smanjenje broja pokusnih životinja i minimalizacija njihove boli i smrti. Pristup koji se primjenjuje naziva se 3R pristup (eng. *Reduce, Refine, Replace*) i potiče prijelaz s *in vivo* na *in vitro* ispitivanja, gdje god postoji mogućnost. Obzirom da *in vitro* testovi ne mogu u potpunosti odgovoriti na pitanja tkivno-specifične toksičnosti, pojavu adaptivnog odgovora te metaboličke promjene koje se zbivaju u živom organizmu, *in vivo* ispitivanja se još uvijek ne mogu u potpunosti zamijeniti i izostaviti. Iako stanice uzgojene *in vitro* imaju izmjenjena svojstva u odnosu na *in vivo* stanice te postoji mogućnost reakcije između ispitivane tvari i sastojaka medija za uzgoj, pokazana je vrlo visoka podudarnost (oko 80 %) rezultata toksičnosti dobivenih primjenom *in vitro* i *in vivo* testova (Fent, 2001). Primjenom staničnih kultura u kratkom se vremenu može analizirati veliki broj tvari u širokom rasponu koncentracija, stoga rezultati dobiveni *in vitro* testovima mogu pružiti uvid i usmjeriti planiranje daljnjih *in vivo* testova. Druge prednosti *in vitro* testova uključuju nižu cijenu u odnosu na *in vivo* testove, visok stupanj standardizacije, reproducibilnost i veću brzinu izvođenja pri čemu nastaje manja količina toksičnog otpada.

1990. je nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) predložio primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija (Boyd i Paull, 1995) s ciljem utvrđivanja relativnog stupanja inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju. Ovaj i slični *in vitro* testovi koriste se kao sredstvo za odabir spojeva od interesa.

Kod izvođenja *in vitro* testova citotoksičnosti najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwall, 1995). Testovi koji se koriste su *Kenacid Blue* metoda, *Trypan Blue*

metoda, *Neutral Red* metoda i drugi (Fent, 2001), a najčešće korišten test za određivanje citotoksičnosti kemikalija primjenom kultura stanica je test redukcije tetrazolijeve soli (MTT). MTT je kolorimerijska metoda a bazira se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija na način da se mjeri redukcija topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan (Mosmann, 1983). Novije izvedbe ove metode uključuju uporabu supstrata odnosno soli (WST-1, MTS i druge) koje se metaboliziraju u produkt topiv u mediju u kojem se uzgajaju stanice, čime se preskače jedan korak u odnosu na klasičan test.

#### 2.5.2. Ispitivanje biološke aktivnosti polifenolnih spojeva na kulturama stanica

Široka uporaba *in vitro* testova na kulturama stanica uključuje, osim klasičnih testova toksičnosti neke tvari, i određivanje djelovanja potencijalno aktivnih spojeva iz biljaka. Pri *in vitro* ispitivanju biološke aktivnosti ekstrakata biljnog podrijetla najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije. One su dostupne putem banka stanica, od kojih su najveće *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC). Budući su mnoga epidemiološka istraživanja ukazala na povoljan učinak biološki aktivnih tvari iz ljekovitog bilja, žitarica, voća i povrća na zdravlje ljudi intenzivno se ispituju biljni ekstrakti, pojedine frakcije te izolirani i pročišćeni sastojci, pri čemu su antitumorski i antioksidacijski učinak najčešće ispitivana biološka svojstva. Velika raznolikost i veliki broj prirodnih spojeva, konkretno iz biljaka, već je rezultirala razvojem nekoliko antitumorskih lijekova koji su u kliničkoj primjeni (Furniss i sur., 2008).

Neki prirodni spojevi, među njima i polifenoli, djeluju tako da smanjuju oksidativni stres, stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih, slobodnih kisikovih čestica (O<sup>•</sup>). Oni se još nazivaju „reaktivne kisikove vrste“ (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Nije točno poznato kako antioksidacijsko djelovanje utječe na tumore, ali obzirom da inaktiviraju slobodne radikale koji doprinose mutagenezi, smatra se da antioksidansi sprečavaju njihovo nastajanje u početnoj fazi. Polifenolni spojevi mogu djelovati i kao prooksidansi, koji dovode do zastoja staničnog ciklusa i apoptoze u tumorskim stanicama. Takvo svojstvo ovisi o koncentraciji i izvoru slobodnih radikala te o prisutnosti prijelaznih metala kao što je bakar, koji potiče njihovu prooksidativnu aktivnost (Gomes i sur., 2003).

Brojna istraživanja s flavanolima (katehin i epikatehin) i fenolnim kiselinama (galna kiselina i elaginska kiselina) ukazuju na njihovu antioksidacijsku i antitumorsku aktivnost *in vivo* i *in vitro*. Antioksidacijsko djelovanje flavonoida usko je povezano s antitumorskom

aktivnošću spomenutih spojeva i povoljnim učinkom kod kardiovaskularnih bolesti i nekih kožnih oboljenja (Yilmaz i Toledo, 2004). Xia i sur. (2010) u svojem su istraživanju pokazali da polifenoli iz groždanog soka izazivaju značajnu inhibiciju sinteze DNA u stanicama tumora dojke, te da ekstrakt pokožice grožđa inducira apoptozu stanične linije tumora prostate.

*In vivo* i *in vitro* istraživanjima antocijana (jedna od podskupina polifenolnih spojeva) dokazano je da antocijani smanjuju proliferaciju tumorskih stanica, a brojna znanstvena literatura opisuje mehanizme njihovog antioksidacijskog i protuupalnog djelovanja. Antitumorsko djelovanje antocijana povezano je s njihovom antioksidacijskim kapacitetom te inhibitornim djelovanjem na enzim ciklooksigenazu koji je ključni enzim u biosintetskom putu prostaglandina (Radojčić Redovniković i sur., 2016). Biološka aktivnost antocijana određena je njihovom kemijskom strukturom. Ovisno o broju hidroksilnih grupa antocijani imaju veći ili manji antioksidacijski potencijal.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Ekstrakti nusproizvoda prehrambene industrije

U radu su korišteni ekstrakti komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače prethodno pripremljeni u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije te u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Za izolaciju polifenolnih spojeva iz navedenih nusproizvoda koristili su se NADES-ovi na bazi kolin-klorida koji su sadržavali 30% (w/w) vode te zakiseljeni etanol i metanol. Ekstrakcija se provodila pomoću ultrazvučnog-mikrovalnog reaktora/ekstraktora (Lab Kits, MW-ER-01, Hong Kong).

U Tablici 4. navedena su i otapala upotrijebljena za izolaciju polifenolnih spojeva: NADES-ovi, prethodno sintetizirani u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija PBF-a, te metanol i zakiseljeni etanol.

**Tablica 4.** Pregled otapala korištenih u radu

<b>Sirovina</b>	<b>Otapalo</b>	<b>Kratica otapala</b>	<b>Kratica pripremljenog ekstrakta</b>
Komina grožđa	Zakiseljeni etanol (60 %, v/v)	EtOH	GPEtOH
	Kolin-klorid:limunska kiselina (70 %, v/v)	ChCit	GPChCit
Komina masline	Metanol (70 %, v/v)	MeOH	OPMeOH
	Kolin-klorid:limunska kiselina (70 %, v/v)	ChCit	OPChCit
Prešana lanena pogača	Lužnati metanol (70 %, v/v)	MeOH	FPCMeOH
	Lužnati kolin-klorid:urea:glicerol (60 %, v/v)	ChUGly	FPCChUGly

### 3.1.2. Kemikalije

- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- 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
- Dinatrijev hidrogen fosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidrogenkarbonat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, NaCl, Kemika, Zagreb, RH
- MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, Promega, SAD
- CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega Corporation, Madison, WI, SAD
- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

### 3.1.3. Otopine i puferi

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

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

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

AAPH	0,207 g
------	---------

Fosfatni pufer (0,075 M) do 5 mL

#### Otopina fluoresceina

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

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

Ishodna otopina 3: 50  $\mu$ L ishodne otopine 2 nadopuniti s 50 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

#### PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24g
Destilirana voda	do 1000 mL
0,4% otopina tripan plavo	
Boja tripan plavo	0,04 g
PBS pufer	10 mL

#### 3.1.4. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su dvije humane tumorske stanične linije, HeLa i MCF-7 te jedna normalna stanična linija, HEK293T. Navedene stanične linije dobivene su iz *American Type Culture Collection* (ATCC).

HeLa je prva humana stanična linija, koja je uspostavljena 1952.g. a izolirana je iz tumora grlića maternice pacijentice Henriette Lacks, odakle potječe njeno ime. MCF-7 je uspostavljen 1973.g. na institutu u Detroitu, a naziv joj potječe od Michigan Cancer Foundation-7. Riječ je o staničnoj liniji tumora dojke. HEK293T stanična linija izvorno potječe iz humanih embrionalnih stanica bubrega, a dobivena je transfekcijom HEK293T stanične linije u laboratoriju na Stanfordu.

Sve stanične linije pripadaju skupini adherentnih stanica a njihov uzgoj provodi se u plastičnim T-bocama ravnih stijenki. Optimalni uvjeti za uzgoj uključuju rast na temperaturi od 37 °C, i atmosferi koju čine 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub>. Stanice su održavane u ekspanzionalnoj fazi rasta, a medij korišten za uzgoj je *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS).

### 3.1.5. Uređaji i oprema

- Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australia
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Germany
- Hladnjak (4 °C i - 20°C), Gorenje, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Muse™ Cell Analyzer (Analizator staničnog zdravlja), EMD Milipore Corporation, Massachusetts, SAD
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichart Bright\_line, Buffalo, NY, SAD
- Petrijeve posude za uzgoj stanica, Thermo Scientific BioLite, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka

## 3.2. METODE

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

Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfomolibdene i fosfovolframove kiseline koje se pri oksidaciji polifenola reduciraju u plavo obojani volframov oksid i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva.

#### Postupak određivanja

Pripremljeni ekstrakti razrijede se 50 puta destiliranom vodom. 0,25 mL razrijeđenog uzorka otpipetira se u posebnu epruvetu i doda se 1,25 mL FC reagensa prethodno razrijeđenog 10 puta. Reakcija se odvija 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se dodaje 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g L<sup>-1</sup>). Slijedi termostatiranje u vodenoj kupelji 5 min pri 50 °C, i brzo zaustavljanje reakcije u ledenoj kupelji. Apsorbancija se mjeri na UV/VIS spektrofotometru pri 760 nm (Singleton i sur., 1999.). Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) na g suhe tvari uzorka (mg GAE g<sup>-1</sup> s.t.). Spektrofotometrijske analize provedene su u tri paralele.

### Izrada baždarnog dijagrama

Kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda galne kiseline kao najzastupljenijeg polifenola u komini grožđa. Priredi se otopina standarda galne kiseline koncentracije  $500 \text{ mg L}^{-1}$  te njena razrjeđenja koncentracija 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 i  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka nanese se na ordinatu koordinatnog sustava a koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) nanese se na apscisu. Pomoću računala nacrtaju se baždarni pravci. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunava se koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima.

#### 3.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

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

##### 3.2.2.1. Mjerenje ORAC vrijednosti

ORAC vrijednost (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*) mjeri se spektrofotometrijski prema Mazor Jolić i sur. (2011). Pri temperaturi od  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  uz  $\lambda_{\text{eks.}} = 485 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em.}} = 520 \text{ nm}$ . Uređaj Cary Eclipse Spectrofluorimeter koristio se za mjerenje fluorescencije. Uzorci se razrijede 600-800 puta.  $375 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka dodaje se u  $2250 \text{ }\mu\text{L}$  fluoresceina, termostatira se na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  u vodenoj kupelji. Nakon 30 min dodaje se  $375 \text{ }\mu\text{L}$  otopine AAPH i mjeri se promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu. Slijepa proba priprema se na isti način, ali umjesto uzorka koristi se fosfatni pufer ( $0,075 \text{ mol L}^{-1}$ ), a kao standard koristio se Trolox ( $50 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

### 3.2.2.2. Izračun ORAC-vrijednosti

ORAC-vrijednost računa se prema formulama:

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

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

Gdje je:

- Relativna ORAC-vrijednost ( $\mu\text{mol Trolox ekvivalenta g}^{-1}$  uzorka)
- $\text{AUC}_U$  - antioksidacijski kapacitet uzorka
- $\text{AUC}_{SP}$  - antioksidacijski kapacitet slijepe probe
- $\text{AUC}_{TRX}$  - antioksidacijski kapacitet Troloxa
- $k$  - faktor razrjeđenja
- $\alpha$  - molarna koncentracija Troloxa
- $h = \frac{V_{uzorka}}{m_{komine}}$  [3]

### 3.2.3. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata nusproizvoda prehrambene industrije na HeLa, MCF-7 i HEK293T staničnoj liniji

#### 3.2.3.1. Uzgoj stanica

Stanice su se čuvale u mediju za smrzavanje na  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . Uzgoj stanica započeo je odmrzavanjem ampule sa stanicama (1 mL) u koncentraciji od oko  $1 \times 10^7$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  nakon čega su stanice centrifugirane pri 1000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 3 minute. Supernatant je uklonjen pipetom a talog, u kojem su se nalazile stanice, je resuspendiran u mediju za uzgoj koji sadrži 10 % FBS-a. Stanice su se zatim prebacile u petrijevku, te postavile u inkubator s reguliranom atmosferom (95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$ , temperatura  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ). Stanice su pasažirane svaka 3-4 dana kako bi se održale u eksponencijalnoj fazi rasta a njihov rast pratio se inverznim mikroskopom. Također se pratila i boja medija, jer njena promjena može ukazivati na pojavu kontaminacije. Prilikom rukovanja sa stanicama potrebno je održavati aseptične uvjete rada.

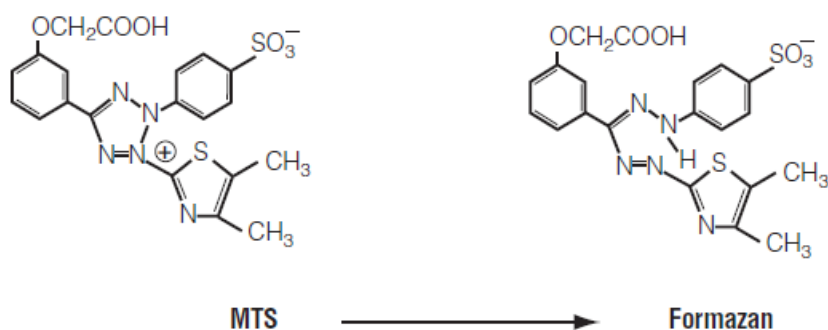
### 3.2.4. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Postupak određivanja broja stanica započinje uklanjanjem hranjivog medija i zatim dodavanjem 1 mL prethodno zagrijane otopine tripsina. Posuda sa stanicama se stavlja natrag u inkubator na oko 3 do 4 minute kako bi se one, djelovanjem tripsina, odvojile od površine za uzgoj. Zaokružnost stanica predstavlja njihovu odvojenost od podloge a provjerava se pod inverznim mikroskopom. Odvojenim stanicama dodaje se 1 mL medija (DMEM + 10 % FBS) kako bi se inaktivirao tripsin, stanice se resuspendiraju i koriste za određivanje broja stanica u uzorku. Alikvotu od 20  $\mu\text{L}$  dodaje se 20  $\mu\text{L}$  boje tripan-plavo, koja će obojati samo mrtve stanice, čija je membrana oštećena, dok žive stanice ostaju nebojane. Obojena suspenzija nanosi se na Neubauer-ovu komoricu za brojanje i broj stanica po mL suspenzije stanica računa se prema izrazu:

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

### 3.2.5. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakata nusproizvoda prehrambene industrije na HeLa, MCF-7 i HEK293T stanične linije pomoću MTS metode

Učinak pripremljenih ekstrakata na proliferaciju stanica ispitivao se pomoću CellTiter 96® AQueous One Solution testa, MTS metoda. MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi najčešće za praćenje proliferacije stanica i analizu citotoksičnosti. Princip metoda je redukcija tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] prilikom čega nastaje produkt smeđe boje, formazan (slika 5). Količina nastalog formazana, tj intenziteta obojenja, proporcionalna je broju živih stanica u uzorku a određuje se mjerenjem apsorbancije pri 490 nm.



**Slika 5.** Struktura tetrazolijeve soli i produkt njene redukcije (formazan)

HeLa, MCF-7 i HEK293T stanične linije nacičeppljene su u ploče s 96 jažica u početnoj koncentraciji od  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . 24h nakon nacičeppljivanja stanice su tretirane sa šest različitih ekstrakata, koji su prethodno sterilizirani filtracijom kroz filter (pore veličine 0,22  $\mu\text{m}$ ) a zatim razrijeđeni u mediju (nominalni volumni postoci bili su između 0,015 % (v/v) do 10 % (v/v)). Nakon 72 h od tretmana u svaku jažicu se dodalo 10  $\mu\text{L}$  CellTiter 96® Aqueous One Solution reagensa. Stanice su inkubirane naredna 4 sata a nakon inkubacije mjerila im se apsorbancija na 490 nm. Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih stanica i netretiranih (kontrolnih) stanica, prema izrazu:

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

### 3.2.6. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Annexin V & Dead Cell Kit-a

Protočna citometrija primjenjena je u ovom radu kako bi se ispitalo uzrokuje li djelovanje pripremljenih ekstrakata indukciju stanične smrti (primjena Muse™ Annexin & Dead Cell Kita). Postupak je proveden prema uputama proizvođača.

Važan dio staničnog procesa čini apoptoza, programirana stanična smrt. Stanice reagiraju na specifične signale koji induciraju apoptozu na način da pokreću procese koji rezultiraju fiziološkim promjenama. Jedna od tih promjena je translokacija fosfatidil serina (PS) s unutrašnje strane membrane na površinu stanice, proces karakterističan za početnu fazu apoptoze. Protein aneksin V specifično se veže na PS na vanjskoj membrani stanice a, obzirom da je označen fluorescentnim bojama, koristi se za detektiranje apoptoze pomoću protočne citometrije. Detekcija se odvija najčešće uz primjenu još jedne boje (kao što je npr propidij jodid) koja se veže na DNA i fluorescira u nekrotičnim stanicama.

Kvantitativna analiza živih, apoptotičnih i mrtvih stanica tretiranih pripremljenim ekstraktima obavljena je pomoću Muse® Cell Analyzer-a (EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA) korištenjem Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a. Navedeni kit sadrži dvije boje – 7-amino aktinomicin D (engl. 7-amino actinomycin D, 7-AAD) i fikoeritrin (engl. phycoerythrin, PE). 7-AAD se izlučuje iz zdravih stanica i zadržava u stanicama u kasnoj apoptozi i mrtvim stanicama (Merck Millipore, 2017). U fazi rane apoptoze aneksin V,



obilježen fluorescentnom bojom, veže se na fosfatidil-serin na površini stanične membrane. Prema ovoj metodi moguće je razlikovati:

- žive i zdrave stanice: aneksin V (-) i 7-ADD (-)
- rano apoptotične stanice: aneksin V (+) i 7-ADD (-)
- kasno apoptotične stanice: aneksin V (+) i 7-ADD (+)
- mrtve stanice i stanične ostatke: aneksin V (-) i 7-ADD (+)

Postupak određivanja tipa stanične smrti uključuje prikupljanje i adherentnih stanica i stanica slobodnih u mediju i to 72h nakon tretmana ekstraktima. Stanice su odcentrifugirane ( $600 \text{ g min}^{-1}$ ) i resuspendirane u mediju za uzgoj u koncentraciji koja odgovara protokolu proizvođača. Zatim se uzeo alikvot suspenzije stanica od  $100 \mu\text{L}$  kojemu se dodao  $100 \mu\text{L}$  Muse<sup>TM</sup> Annexin V & Dead Cell reagensa i smjesa se inkubirala na sobnoj temperaturi u mraku, kroz dvadeset minuta. Stanice su potom analizirane pomoću uređaja Muse<sup>®</sup> Cell Analyzer. Svaka koncentracija ispitana je u duplikatu i svaki eksperiment je proveden dva puta.

### 3.3. Obrada rezultata

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [6]$$

S pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [7]$$

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

Statistička analiza provedena je u programu Statistica 8.1. Razlike između uzoraka su analizirane ANOVA testom te post hoc Turkey's HSD testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Prehrambena industrija proizvodi značajan udio organskih nusproizvoda. Iako su bogati bioaktivnim spojevima, tek male količine ovih nusproizvoda se prenamjenjuju ili recikliraju, dok se najveći dio koristi za kompostiranje ili čak odbacuje u okoliš gdje može uzrokovati probleme. Obzirom na povoljan nutritivni sadržaj, pozornost industrije počela se usmjeravati na iskorištavanje potencijala nastalih nusproizvoda.

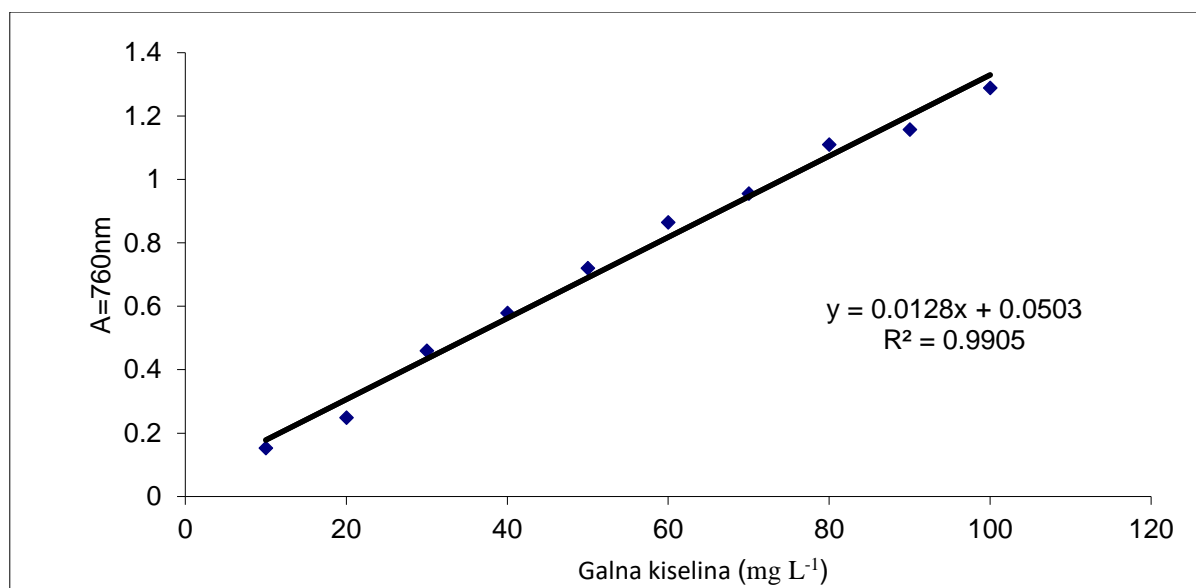
Komina grožđa i komina masline sadrže još uvijek veliki udio polifenolnih spojeva te se ispituje njihova antioksidativna aktivnost. Nusproizvod proizvodnje ulja lana, prešana lanena pogača, također je bogat polifenolnim spojevima - lignanima. Metode ekstrakcije polifenolnih spojeva iz navedenih nusproizvoda trebaju se bazirati na „zelenoj“ i održivoj tehnologiji, koja slijedi načela zelene ekstrakcije (Bosiljkov i sur., 2017; Radošević i sur., 2016a). Navedeno se može postići poboljšavanjem i optimizacijom postojećeg procesa ili inovacijama u procesima i procedurama koje se koriste. Jedan od principa zelene ekstrakcije je upotreba alternativnih otapala.

U ovom radu NADES-ovi su se koristili kao alternativa konvencionalnim uobičajeno korištenim otapalima, za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače. Za pripremu ekstrakata korišten je i alternativni izvor energije – ultrazvuk i mikrovalovi, koji su korišteni pojedinačno ili simultano. Analizirani ekstrakti komine grožđa pripremljeni su u zakiseljenom etanolu i kolin-klorid:limunskoj kiselini, ekstrakti komine masline pripremljeni su u metanolu i kolin-klorid:limunskoj kiselini dok je ekstrakt prešane lanene pogače pripremljen u lužnatom metanolu i kolin-klorid:urea:glicerolu.

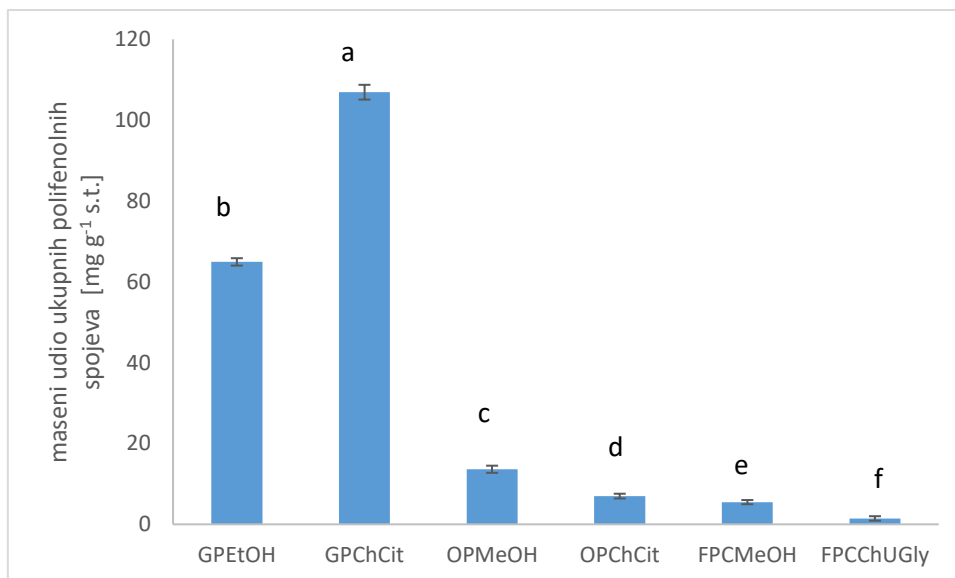
Ukupni polifenolni spojevi određeni su u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom uz galnu kiselinu kao standard. Antioksidacijski kapacitet pripremljenih ekstrakata ispitivao se spektrofotometrijskom ORAC metodom. Biološka aktivnost ekstrakata ispitivana je na HEK293T normalnoj staničnoj liniji te na humanim tumorskim staničnim linijama HeLa i MCF-7 primjenom MTS kolorimetrijske metode. Koristila se protočna citometrija kako bi se dodatno ispitala uočena citotoksičnost pripremljenih ekstrakata na HeLa i MCF-7 tumorskim staničnim linijama.

#### 4.1. Ukupni polifenolni spojevi u ekstraktima komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače

Ukupni polifenoli mogu se kvalitativno i kvantitativno određivati primjenom različitih metoda. U ovom su radu ukupni polifenolni spojevi u različitim ekstraktima komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače analizirani UV/Vis spektroskopskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom. Ovisnost koncentracije i apsorbancije za galnu kiselinu prikazana je baždarnim dijagramom (slika 6) a rezultati mjerenja izraženi su u mg galne kiseline po g suhe tvari (s.t.) uzorka i prikazani na slici 7. Vrijednosti polifenolnih spojeva iz ispitivanih ekstrakata različitih prehrambenih nusproizvoda iznose od 6,99 do 106,93 mg g<sup>-1</sup> s.t. što ukazuje na veliku varijaciju u iskorištenju ekstrakcije uporabom različitih otapala. Također, vidljiva je razlika s obzirom na vrstu komine. Najveći udio polifenolnih spojeva ekstrahirani je prirodnim eutektičkim otapalom kolin-klorid:limunska kiselina iz komine grožđa (106,93 ± 0,91 mg g<sup>-1</sup> s.t.) dok je najmanji udio polifenolnih spojeva ekstrahirani kolin-klorida:urea:glicerolom iz prešane lanene pogače (1,46 ± 0,55 mg g<sup>-1</sup> s.t.).



Slika 6. Baždarni dijagram galne kiseline



**Slika 7.** Maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače

Rezultati istraživanja pokazali su da je više ukupnih polifenola iz komine grožđa ekstrahirano s NADES-om u usporedbi sa zakiseljenim etanolom. Također, mnogi autori su svojim istraživanjima pokazali da je ekstrakcija polifenolnih spojeva učinkovitija pomoću DES-ova u odnosu na konvencionalna otapala (Woo Nam i sur., 2015; Bi i sur., 2013., Dai i sur., 2013a, Dai i sur., 2013b).

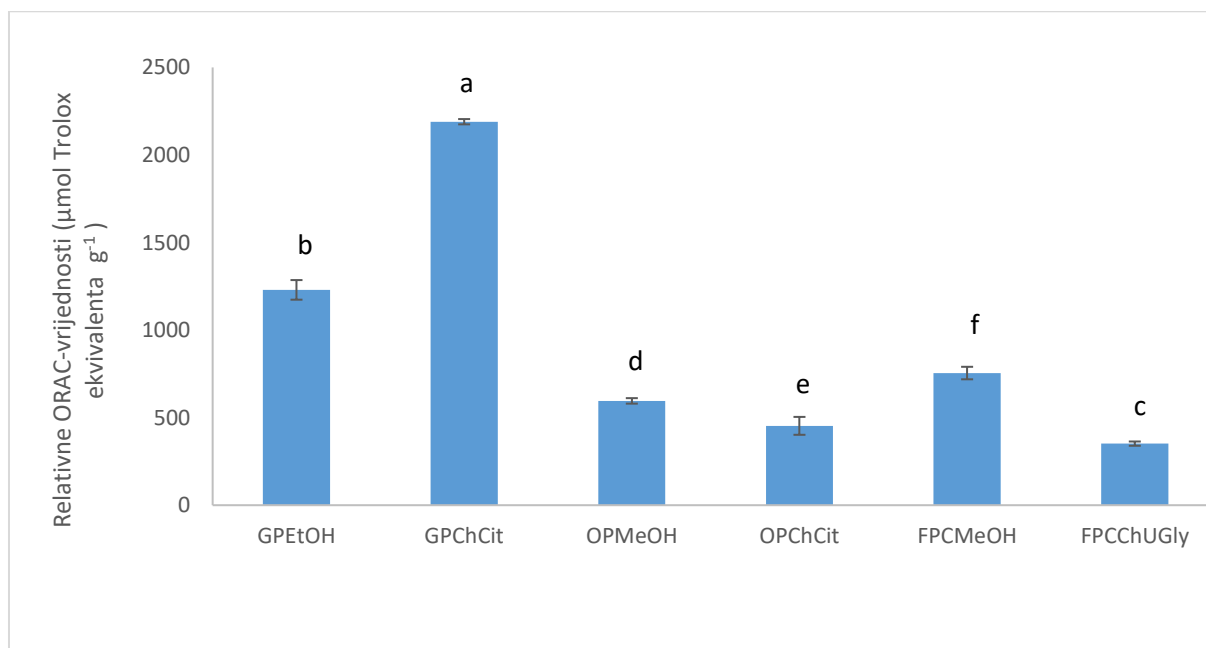
Istraživanje Garcíe i sur. (2015) pokazalo je bolju ekstrakciju polifenolnih spojeva iz maslinovog ulja pomoću DES-ova u odnosu na klasična otapala (metanol i etanol) dok rezultati uspješnosti ekstrakcije u ovom radu pokazuju da je više polifenola ekstrahirano s metanolom.

Rezultati ekstrakcije polifenola iz prešane lanene pogače s DES-om i metanolom pokazuju prilično niske vrijednosti s tim da je ekstrakcija s metanolom neznatno uspješnija ( $5,50 \pm 0,52 \text{ mg g}^{-1}$ ) u odnosu na DES ( $1,46 \pm 0,55 \text{ mg g}^{-1}$ ).

## 4.2. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače

Antioksidacijski kapacitet prirodnih spojeva u hrani i biološkim sustavima može se odrediti nizom standardiziranih metoda. One se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidanasa, kao što su uklanjanje ili inhibicija slobodnih radikala ili keliranja metalnih iona, koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala. ORAC metoda se smatra jednom od najboljih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, te je upotrijebljena u ovom radu. 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.

ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet (AUC) ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače. Praćena je inhibicija djelovanja slobodnog radikala AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid) na fluorescentni spoj fluorescein. Rezultati se izražavaju u ekvivalentima Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-ugljična kiselina), tj. kao  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t., a prikazani su na slici 8.



**Slika 8.** Relativne ORAC vrijednosti za analizirane ekstrakte komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače. Rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3)

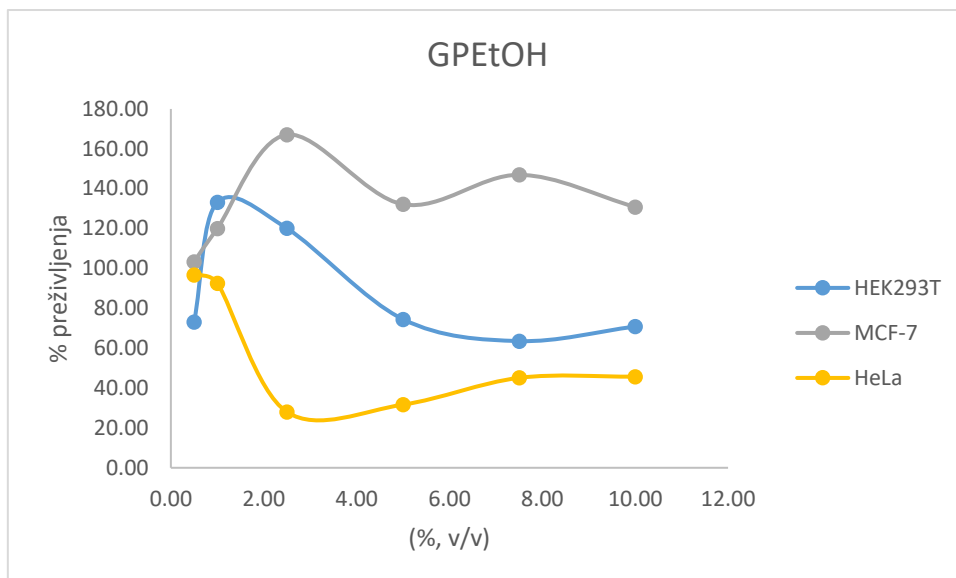
Na slici 8 vidljiv je široki raspon ORAC-vrijednosti određenih za polifenolne spojeve različitih ekstrakata iz različitih nusproizvoda od 351,58 do 2189,97  $\mu\text{mol Trolox ekvivalenta}$  po g suhe tvari. Najveći antioksidativni kapacitet ima ekstrakt komine grožđa u ChCit. Slijede

etanolni ekstrakt komine grožđa, metanolni ekstrakt prešane lanene pogače, metanolni ekstrakt komine masline, ekstrakt komine maslineu ChCit, te prešana lanena pogača u ChUGly s najnižim antioksidacijskim kapacitetom. Uspoređujući relativnu ORAC vrijednost s udjelom ukupnih polifenola u pripremljenim ekstraktima vidljiva je pozitivna korelacija te se antioksidacijska aktivnost može pripisati polifenolnim spojevima (Radošević i sur., 2016b). Prema dosadašnjim literaturnim podacima, otapala koja su korištena za pripremu ekstrakata ne posjeduju antioksidacijsku aktivnost (Nam i sur., 2015; Hayyan i sur., 2015).

#### **4.3. Učinak ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače na HeLa, MCF-7 i HEK293T stanične linije**

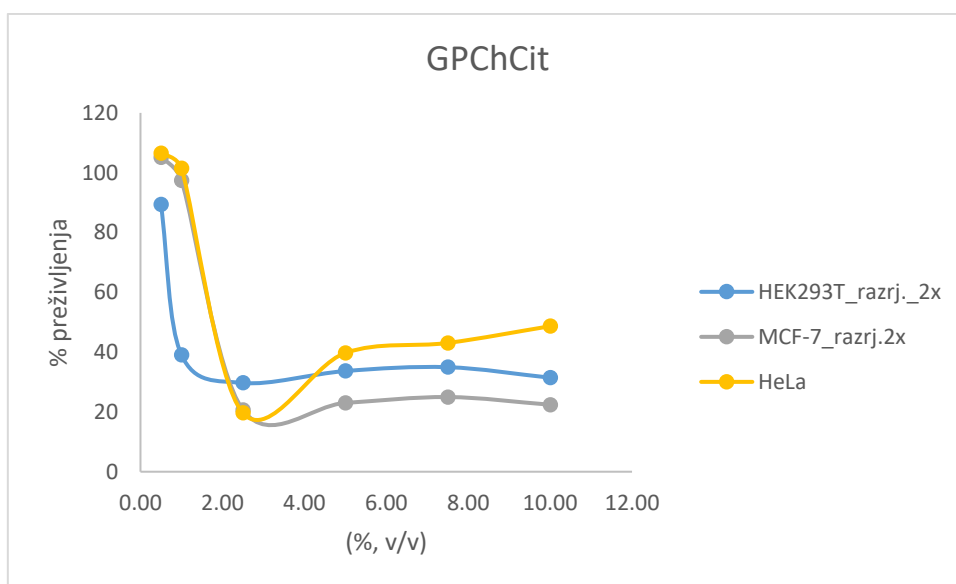
*In vitro* testovi koriste se kao testovi određivanja biološke aktivnosti prirodnih komponenata ili spojeva koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi. Rezultati takvih *in vitro* testova mogu poslužiti kao preliminarni rezultati za *in vivo* ispitivanja i omogućiti bolje planiranje eksperimenta. Primjenom staničnih kultura u kratkom se vremenu može analizirati veliki broj tvari u širokom rasponu koncentracija, a metoda je jednostavna, brza i jeftina i kao takva, izvrsna je alternativa *in vivo* ispitivanjima. Bazalna citotoksičnost se najčešće određuje kod provođenja *in vitro* testova, a definirana je kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu.

Provedeno je ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače na dvije tumorske stanične linije (HeLa i MCF-7) te jednoj normalnoj staničnoj liniji (HEK293T). Ekstrakti su pripremljeni u prirodnim eutektičkim otapalima, koja se smatraju ekološki prihvatljivijim otapalima za ekstrakciju te pomoću metanola i zakiseljenog etanola, koji se koriste kao konvencionane metode za pripremu biljnih ekstrakata. HeLa, MCF-7 i HEK293T stanice naciepljene su u ploče s 96 jažica, a početna koncentracija iznosila je  $5 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Nakon 24h stanice su izložene pripremljenim ekstraktima u različitim volumnim udjelima od 0,015 % (v/v) do 10 % (v/v), a nakon 72h je određena vijabilnost stanica MTS metodom. Postotak preživljenja izražen je u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Rezultati testova citotoksičnosti na HeLa, MCF-7 i HEK293T stanicama prikazani su na slikama 9-14.



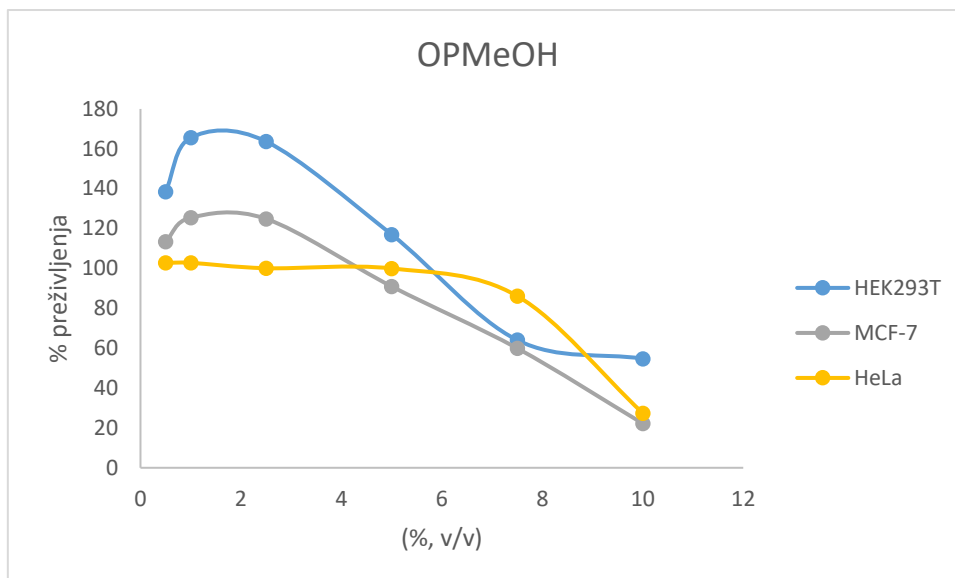
**Slika 9.** Utjecaj ekstrakta komine grožđa u zakiseljenom etanolu (GPEtOH) na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanične linije

Iz rezultata prikazanih na slici 9 može se uočiti da ekstrakt komine grožđa dobiven ekstrakcijom u zakiseljenom etanolu nema inhibitorni učinak na proliferaciju HEK293T i MCF-7 stanične linije, dok na HeLa staničnu liniju ima izraženi inhibitorni učinak i to već pri volumnom postotku od 2,5 % (v/v).



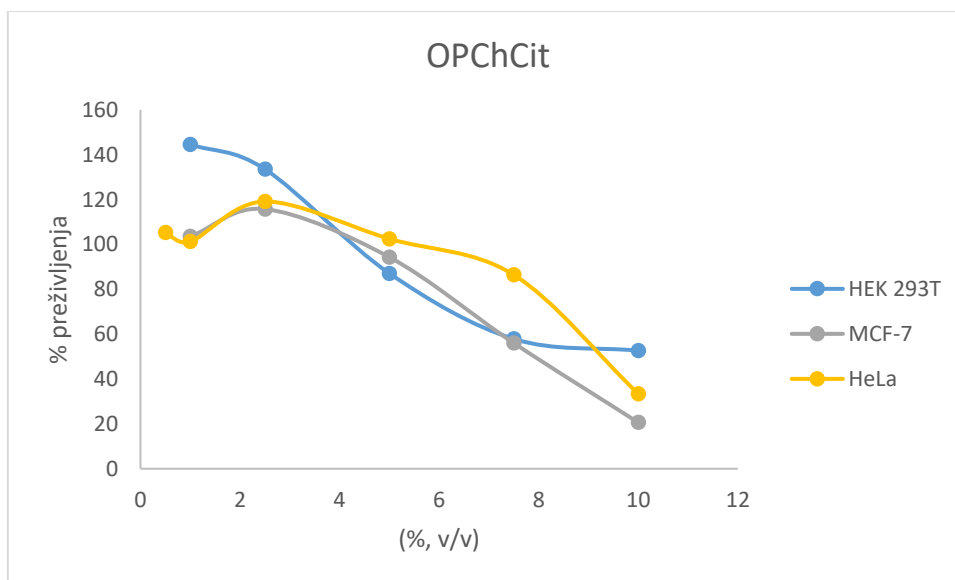
**Slika 10.** Utjecaj ekstrakta komine grožđa u eutektičkom otapalu kolin-klorid:limunska kiselina (GPChCit) na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanične linije

Na temelju rezultata prikazanih na slici 10 može se uočiti da ekstrakt komine grožđa pripremljen u eutektičkom otapalu ChCit ima jak inhibitorni učinak na proliferaciju sve tri stanične linije. Inhibitorni učinak primijećen je već pri koncentraciji ekstrakta od 2,5 % (v/v).



**Slika 11.** Utjecaj ekstrakta komine masline u metanolu (OPMeOH) na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanične linije

Ekstrakt komine masline u metanolu prikazan na slici 11 prikazuje inhibitorski učinak na sve tri stanične linije. Može se primijetiti da HEK293T ima veće preživljenje u odnosu na MCF-7 i HeLa. Inhibitorski učinak na MCF-7 raste povećanjem volumnog postotka ekstrakta, dok na HeLa ima inhibitorski učinak tek pri volumnom postotku  $\geq 7,5$  % (v/v).

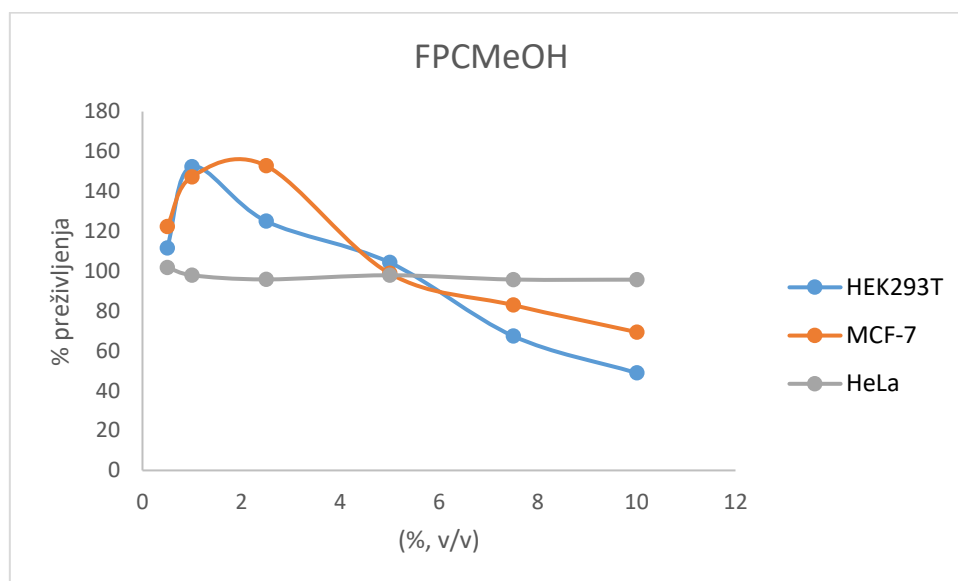


**Slika 12.** Utjecaj ekstrakta komine masline u eutektičkom otapalu kolin-klorid:limunska kiselina (OPChCit) na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanične linije

Iz rezultata prikazanih na slici 12 može se uočiti da ekstrakt komine masline pripremljen u eutektičkom otapalu ChCit ima sličan i jak citotoksični učinak na sve tri stanične

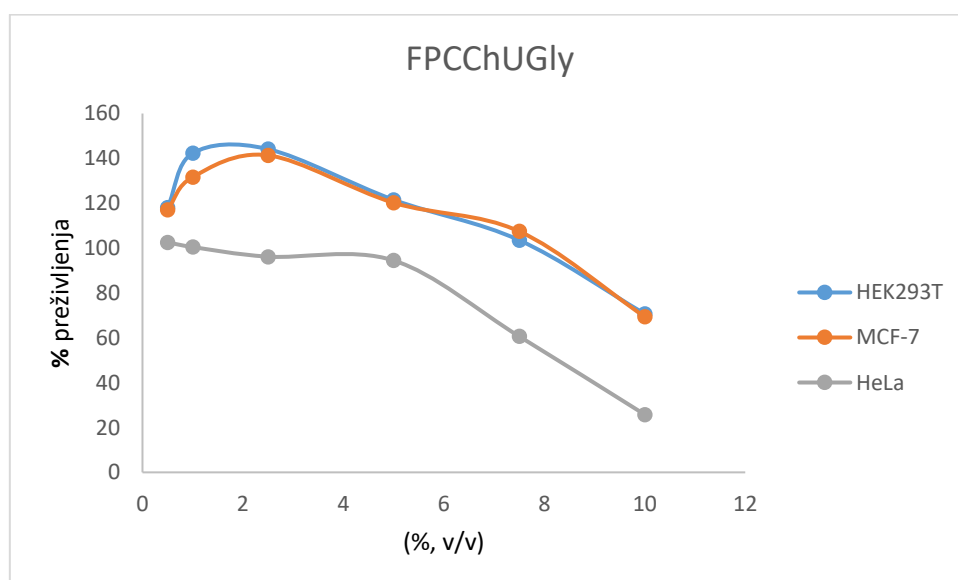


linije a tim da je najveći postotak inhibicije zabilježen kod HeLa stanica tretiranih s 10 % (v/v). HEK293T ima najbolje preživljenje pri najvećem volumnom postotku.



**Slika 13.** Utjecaj ekstrakta prešane lanene pogače u metanolu (FPCMeOH) na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanične linije

Na temelju rezultata prikazanih na slici 13 vidljivo je da ekstrakt prešane lanene pogače dobiven primjenom lužnatog metanola nema inhibitoran učinak na HeLa staničnu liniju. Može se primijetiti inhibitoran učinak na MCF-7 i HEK293T stanične linije.



**Slika 14.** Utjecaj ekstrakta prešane lanene pogače u eutektičkom otapalu kolin-klorid:urea:glicerol (FPCChUGly) na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanične linije

Rezultati dobiveni ispitivanjem ekstrakta FPCChUGly prikazani na slici 14 pokazuju slabiji inhibitorski učinak na HEK293T i MCF-7, dok je jaki inhibitorski učinak primijećen na HeLa staničnoj liniji.

Na slikama 9, 11 i 13 različiti ekstrakti pripremljeni su uporabom metanola i zakiseljenog etanola, koji se koriste kao konvencionalne metode pripreme biljnih ekstrakata. Na slici 9 može se primijetiti da ekstrakti komine grožđa pripremljeni u zakiseljenom etanolu ne pokazuju značajan inhibitorski učinak na MCF-7 i HEK293T stanične linije, dok je citotoksični učinak primijećen na HeLa staničnoj liniji. Nasuprot tome, ekstrakt masline pripremljen u metanolu pokazuje inhibitorski učinak na sve tri stanične linije (slika 11), dok se na slici 13 može uočiti da ekstrakt prešane lanene pogače nema učinak na HeLa staničnu liniju, i pokazuje inhibitorski učinak na preostale dvije stanične linije.

Slike 10, 12 i 14 pokazuju učinak ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače pripremljenih pomoću eutektičkih otapala i na svim slikama može se primijetiti inhibitorski učinak na sve tri stanične linije. Najjači citotoksični učinak na sve tri linije primijećen je pri djelovanju ekstrakta komine grožđa u kolin-klorid:limunskoj kiselini. Citotoksični učinak DES-ova ispitan je u prethodno spomenutom radu Radošević i sur. (2015). Od tri ispitana DES-ova, jedan je pokazao citotoksičnost, stoga bi se u budućim istraživanjima trebali ispitati učinci DES-ova na stanice.

Istraživanjem citotoksičnosti ekstrakata pokožice grožđa pripremljenih pomoću NADES-ova (kolin-klorid:glukoza, kolin-klorid:fruktoza, kolin-klorid:ksiloza, kolin-klorid:glicerol i kolin-klorid:jabučna kiselina) i konvencionalnim otapalom metanola (70 %, v/v) u radu Radošević i sur. (2016b) uočen je inhibitorski učinak četiri pripremljena ekstrakta (kolin-klorid:glukoza, kolin-klorid:fruktoza, kolin-klorid:ksiloza i kolin-klorid:jabučna kiselina) na HeLa i MCF-7 stanične linije pri koncentraciji od 2000 mg L<sup>-1</sup>. Citotoksični učinak na tumorske stanične linije veći je u ekstraktima pripremljenima s eutektičkim otapalima nego s konvencionalnim otapalom. Sukladno tome i u ovom radu je dokazana veća citotoksičnost humanih tumorskih staničnih linija tretiranih ekstraktima komine grožđa pripremljenog u eutektičkom otapalu (slika 10).

Lozano-Sánchez i sur., (2010) u svojem su radu pokazali kako povećanje citotoksičnosti ovisi o rastućoj volumnoj koncentraciji ekstrakta komine masline a slični rezultati dobiveni su i u ovom radu. Inhibitorski učinak metanolnog ekstrakta (slika 11) i

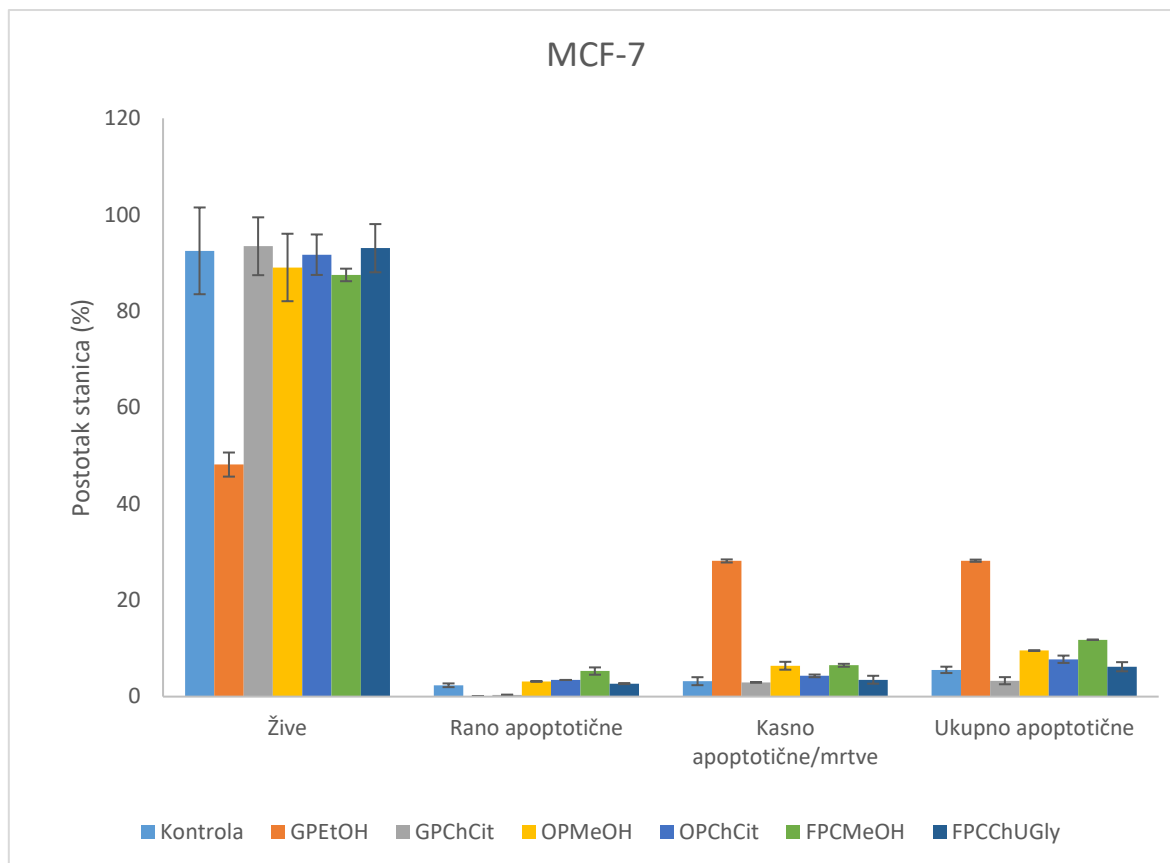
ekstrakta u eutektičkom otapalu (slika 12) raste porastom volumnom postotka ekstrakta. Preživljenje stanica tretiranih s oba pripremljena ekstrakta komine masline veće je kod HEK293T stanica, u odnosu na humane tumorske stanične linije HeLa i MCF-7, što ukazuje na antitumorski učinak pripremljenih ekstrakata (slika 11-12).

Ispitivanje učinka bioaktivnih komponenata iz lana na humane tumorske stanične linije pokazalo je inhibitorski učinak na proliferaciju MCF-7 stanica tek pri koncentracijama anhidrosekoizolarikirezinola izoliranog iz lanene pogače od 34,44 mg L<sup>-1</sup> (Lehraiki i sur., 2010). Nasuprot tome, u ovom radu uočen je inhibitorski učinak pri nižim koncentracijama na humane normalnu i tumorske stanične linije djelovanjem ekstrakta prešane lanene pogače pripremljenog pomoću eutektičkog otapala s najvećim citotoksičnim učinkom na HeLa staničnu liniju pri najvišem volumnom postotku od 10 % (v/v) (tj. 5 mg L<sup>-1</sup>) (slika 14). S druge strane, metanolni ekstrakt pogače lana ne pokazuje inhibitorski učinak na HeLa staničnu liniju (slika 13).

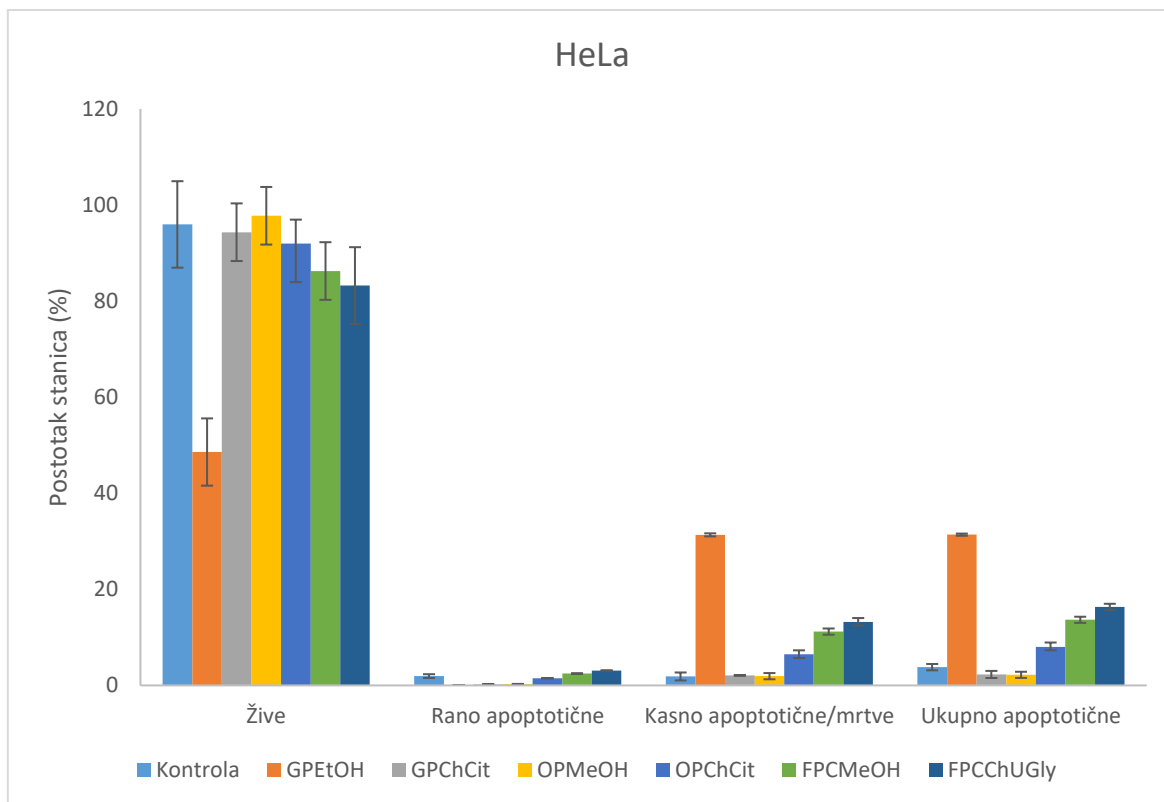
#### **4.4. Učinak ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače na tumorske HeLa i MCF-7 stanične linije određen protočnom citometrijom**

Zapaženi citotoksični učinak ekstrakata komine grožđa, komine masline i prešane lanene pogače može biti posljedica njihovog utjecaja na različite stanične procese, a smanjenje preživljenja tretiranih stanica najčešće je posljedica indukcije stanične smrti ili inhibicije proliferacije. U ovom radu provedena je kvantitativna analiza apoptotičnih i mrtvih stanica (na tumorskim HeLa i MCF-7 staničnim linijama) tretiranih navedenim ekstraktima pomoću Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a.

Stanice su uzgojene te nakon 24 sata tretirane različitim ekstraktima. Iz suspenzije stanica pripremljenih prema protokolu proizvođača, uzme se 100µL alikvota te mu se doda 100µL Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit reagensa, a zatim se inkubira 20 minuta u prostoru zaštićenom od svjetla. Na Muse uređaju postave se parametri analize s negativnom i pozitivnom kontrolom, a zatim se analiziraju pojedinačni uzorci. Rezultati su vidljivi kao „dot-plot“ dijagrami, a parametri mjerenja su postavljeni tako da je moguće razlikovati četiri populacije stanica unutar uzorka (žive, rano apoptotične, kasno apoptotične/mrtve te mrtve stanice).



**Slika 15.** Postotak živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih MCF-7 stanica nakon tretmana GPEtOH, GPChCit, OPMeOH, OPChCit, FPCMeOH i FPCChUGly



**Slika 16.** Postotak živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih HeLa stanica nakon tretmana GPEtOH, GPChCit, OPMeOH, OPChCit, FPCMeOH i FPCChUGly

Na slici 15 prikazani su rezultati mjerenja postotka živih stanica, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih MCF-7 stanica nakon tretmana ekstraktima komine grožđe pripremljenih u zakiseljenom etanolu i eutektičkom otapalu kolin-klorid:limunskoj kiselini, ekstraktima komine masline pripremljenih u metanolu i eutektičkom otapalu kolin-klorid:limunskoj kiselini te ekstraktima prešane lanene pogače pripremljenih u lužnatom metanolu i eutektičkom otapalu kolin-klorid:urea:glicerolu. Uočena je mala razlika u postotku živih stanica tretiranih ekstraktima u odnosu na kontrolne MCF-7 stanice za sve osim za stanice tretirane GPEtOH koje pokazuju značajno manji postotak živih stanica. MCF-7 stanice tretirane GPEtOH također pokazuju značajno veći postotak kasno apoptotičnih/mrtvih te ukupno apoptotičnih stanica u odnosu na stanice tretirane drugim ekstraktima. Postotak kasno apoptotičnih/mrtvih i ukupno apoptotičnih stanica tretiranih sa OPMeOH i FPCMeOH nešto je veći od stanica tretiranih drugim ekstraktima.

Slika 16 prikazuje postotak živih stanica, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih HeLa stanica nakon tretmana ekstraktima komine grožđe pripremljenih u zakiseljenom etanolu i eutektičkom otapalu kolin-klorid:limunskoj kiselini, ekstraktima komine masline pripremljenih u metanolu i eutektičkom otapalu kolin-klorid:limunskoj kiselini te ekstraktima prešane lanene pogače pripremljenih u lužnatom metanolu i eutektičkom otapalu kolin-klorid:urea:glicerolu. Za sve je uzorke, osim one tretirane GPEtOH-om, uočena je mala razlika u postotku živih stanica u odnosu na kontrolne HeLa stanice. Stanice tretirane GPEtOH pokazuju značajno niži postotak živih stanica, značajno viši postotak kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih stanica. Postotak kasno apoptotičnih/mrtvih te ukupno apoptotičnih stanica nešto je viši za stanice tretirane FPCMeOH-om i FPCChUGly-om.

Istraživanja su pokazala da polifenoli inhibiraju utjecaj na rast kancerogenih stanica tako što induciraju apoptozu u mnogim tumorskim staničnim linijama (Ramos i sur., 2005; Ramos, 2007). U skladu s tim, etanolni ekstrakt komine grožđa pokazuje značajno manji postotak živih stanica, odnosno značajno veći postotak kasno apoptotičnih/mrtvih i ukupnih mrtvih stanica. Leouifoudi i sur. (2014) svojim istraživanjem dokazali su da komina masline značajno inducira apoptozu tumorske stanične linije. U ovom radu nije primijećen takav učinak, te je postotak živih stanica neznatno manji ili veći od kontrole (slika 15-16). Budući da rezultati analize tipa stanične smrti ne prate rezultate citotoksičnosti ispitanih ekstrakata te se ne mogu dovesti u korelaciju s određenim ukupnim polifenolima i antioksidacijskim potencijalom istih, potrebna su daljnja ispitivanja. Naime, zapažena citotoksičnost može biti posljedica zastoja u staničnom ciklusu ili djelovanja na neki drugi stanični proces, 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 nusproizvoda prehrambene industrije provela se u ultrazvučnom-mikrovalnom reaktoru uz primjenu kovneacionalnih otapala metanola, lužnatog metanola i zakiseljenog etanola, te primjenom NADES-a koji su se pokazali kao obećavajuća alternativa konvencionalnim otapalima s obzirom na ekstrakciju ukupnih polifenolnih spojeva.
2. Antioksidacijski kapacitet izoliranih polifenolnih spojeva ispitan ORAC metodom u korelaciji je s ukupnim polifenolnim spojevima, a najveći maseni udio ukupnih polifenola ( $106,93 \pm 1,82 \text{ mg g}^{-1}$ ) te najvišu ORAC vrijednost ( $2189,97 \pm 15,07 \text{ } \mu\text{mol Trolox ekvivalenta g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) pokazao je ekstrakt komine grožđa pripremljen u eutektičkom otapalu kolin-klorid:limunska kiselina.
3. Preživljenje stanica tretiranih ekstraktom komine masline u metanolu i ekstraktom komine masline u eutektičkom otapalu ChCit veće je kod HEK293T stanica, u odnosu na humane tumorske stanične linije HeLa i MCF-7, što ukazuje na antitumorski učinak pripremljenih ekstrakata.
4. U ekstraktu komine grožđa pripremljenom zakiseljenim etanolom uočena je indukcija apoptoze na humane tumorske linije HeLa i MCF-7 koja je u skladu sa zapaženim inhibitornim učinkom na humane tumorske stanične linije, no za ostale ekstrakte to nije uočeno.

## 6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016) Grape pomace, <<https://www.distilleriagualco.it/ENG/p/distillery/distillation.html>>. Pristupljeno 15.11.2017.

Anonymous 2 (2012) Olive pomace <<https://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-health-news/potential-for-parkinsons-treatment-from-olive-oil-waste/26737>>. Pristupljeno 24.11.2017.

Anonymous 3 (2012) Flaxseed pressed cake <<http://healthyating.sfgate.com/cold-milled-flax-much-much-12486.html>>. Pristupljeno 24.11.2017.

Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. (2004) Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9142-9147.

Anastas, P. T., Warner, J. C. (1998) Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, str.30.

Arts, I.C., Hollman, P.C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 317–325.

Baidez, A.G., Gomez, P., Del Rio, J.A., Ortuno, A. (2007) Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *J. Agr. Food Chem.* **55**, 3373–3377.

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.

Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatić, E., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2017) Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod. Process.* **102**, 195-203.



- Boyd, M.R., Paull, K.D. (1995) Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute *in Vitro* Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Develop. Res.* **34**, 91–109.
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical. Bio. Med.* **14**, 303-311.
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G. (2012) Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8615–8627.
- 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 Physiol.* **156**, 1701–1705.
- Coşkuner, Y., Karababa, E. (2007) Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng.* **78**, 1067-1073.
- 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.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631-1639.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013a) Natural deep 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.
- Deng, Q., Penner, M.H., Zhao, Y. (2011) Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Res. Int.* **44**, 2711-2719.

Ekwall, B. (1995) The basal cytotoxicity concept. U: *Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences*, (Goldberg, A., van Zutphen, L., ured.), The World Congress on 54 Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing, 11. Mary Ann Libert, New York, str. 721-725.

Ezejiolor, T.I.N., Enebaku, U.E., Ogueke, C. (2014) Waste to wealth-value recovery from agro-food processing wastes using biotechnology: A review. *Br. Biotechnol. J.* **4**, 418–481.

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. *Toxicology in Vitro.* **15**, 477-488.

Ferri, M., Bin, S., Vallini, V., Fava, F., Michelini, E., Roda, A., Minnucci, G., Bucchi, G., Tassoni, A. (2015) Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *New Biotechnol.* **33**, 338-344.

Figuerola, F., Muñoz, O., Estévez, A. (2008) Flaxseed as a source of bioactive compounds for food processing. *AgroSur* **36**, 49-58 (na španjolskom).

Furniss, C.S.M, Bennett, R.N., Bacon, J.R., LeGall, G., Mithen, R.F. (2008) Polyamine metabolism and transforming growth factor- $\beta$  signaling are affected in Caco-2 sells by differentially cooked broccoli extracts. *J. Nutr.* **38**, 1840-1845.

García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J.J., Fernández-Bolaños, J. (2016) Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs) *Food Chem.* **197**, 554-561.

Gill, I., Vulfson, E., (1994) Enzymatic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. *Trends Biotechnol.* **12**, 118–122.

Goldsborough, A.S., Bates, M.R. (2014) Sample fixation and stabilisation. United States patent US 20140295404.

Gomes, C.A., Giraio da Cruz, T., Andrade, J.L., Milhazes, N., Borges, F., Marques, P.M. (2003) Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure Activity Study. *J. Med. Chem.* **46**, 5395-5401.

- Gorke, J., Sreenc, F., Kazlauskas, R. (2010) Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess E.* **15**, 40–53
- Han, X.Z., Shen, T., Lou, H.X. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **8**, 950–988.
- Harborne, J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. U: Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics, (J. B. Harborne, ured.), Academic Press, London, str. 1–28.
- Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P. (1999) Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants, 2. Izd., Taylor & Francis, London.
- Hayyan, M., Looi, C.J., Hayyan, A., Wong, W.F., Hashim, M.A. (2015) *In Vitro* and *in Vivo* Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLoS ONE.* **10**, 1–18.
- Helkar, P.B., Sahoo, A., Patil., N. (2016) Review: Food Industry By-Products used as a Functional Food Ingredients. *Int. J. Waste Resour.* **6**, 248.
- Juneidi, I., Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A. (2017) Pure and aqueous deep eutectic solvents for a lipase-catalysed hydrolysis reaction. *Biochem. Eng. J.* **117**, 129–138.
- Juneidi, I., Hayyan, M., Hashim, M.A. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability for cholinium-based deep eutectic solvents. *RSC Adv.* **5**, 83636–83647.
- King, A., Young, G. (1999) Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* **99**, 213–218.
- Kniewald J., Kmetič I., Gaurina Srček V., Kniewald Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. hig. rada toksik.*, **56**, 195-204.
- Lehraiki, A., Attoumbré, J., Bienaimé, C., Matifat, F., Bensaddek, L., Nava-Saucedo, E., Baltora-Rosset, S. (2010). Extraction of Lignans from Flaxseed and Evaluation of Their Biological Effects on Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *J. Med. Food.* **13**, 834–841.

- Leouifoudi, I., Mbarki, M., Tilaoui, M., Amechrouq, A., Rakib, E.M., Aït Mouse, H., Ziyad, A. (2014) Study of the *in vitro* anticancer activity of Moroccan phenolic olive cake extracts. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2**, 154-165.
- Li, A., Li, S., Zhang, Y., Xu, X., Chen, Y. (2014) Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* **6**, 6020-6047.
- Liu, P., Hao, J., Mo, L., Zhang, Z. (2015) Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *Rsc. Adv.* **5**, 47675-48704.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Menendez, J.A., Oliveras-Ferraro, C., Cerretani, L., Fernández-Gutiérrez, A. (2010) Prediction of Extra Virgin Olive Oil Varieties through Their Phenolic Profile. Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9942–9955.
- Matzke, M., Stolte, S., Thiele, K., Juffernholz, T., Arning, J., Ranke, J., Welz-Biermann, U., Jastorff, B. (2007) The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. *Green Chem.* **9**, 1198-1207.
- 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. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46**, 1793-1800.
- Mbous, Y.P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W.F., Hashim, M.A., Looi, C.Y. (2016) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering – Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.* **35**, 105-134.
- Merck Millipore (2017) Muse Cell Analyzer, <<http://www.merckmillipore.com/muse>>. Pristupljeno 10. studenog 2017.
- Morton, L.W., Abu-Amsha, C.R., Puddey, I.B., Croft, K.D. (2000) Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. P.* **27**, 152–159.

- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Nam, M.W., Zhao, J., Lee, M.S., Jeong, J.H., 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**, 1718–27.
- Nerantzis, E.T., Tataridis, P. (2006) Integrated Enology – Utilization of winery by-products into high added value products. *J. Sci. Technol.* 1-13.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer* **36**, 1235–1247.
- Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Pandey, K.B., Rizvi S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2**, 270–278.
- Pradhan, R., Meda, V., Rout, P., Naik, S. (2010) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of fatty oil from flaxseed and comparison with screw press expression and solvent extraction processes. *J. Food Eng.* **98**, 393-397.
- Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Cro. J. Food Technol. Biotechnol. Nutrit.* **11**, 169-175.
- 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. *LWT - Food Sci. Technol.* **73**, 45–51.

Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46-53.

Ramos, S., Alia, M., Bravo, L., Goya, L. (2005) Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Agric. Food Che.* **53**, 1271-1280.

Ramos, S. (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 427-442.

Raghuwanshi, V.S., Ochmann, M., Hoell, A., Polzer, F., Rademann, K. (2014) Deep eutectic solvents for the self-assembly of gold nanoparticles: A SAXS, UV-Vis, and TEM investigation. *Langmuir* **30**, 6038–6046.

Sánchez Moral, P., Ruiz Méndez, M.V. (2006) Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites* **57**, 47–55.

Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends Food Sci. Tech.* **12**, 401–413.

Shahriari, S., Tome, L.C., Araujo, J.M.M., Rebelo, L.P.N., Coutinho, J.A.P., Marrucho, I.M., Freire, M.G. (2013) Aqueous biphasic systems: a benign route using cholinium-based ionic liquids. *RSC Adv.* **3**, 1835–1843.

Sharma, S. K. (2010) Postharvest Management and Processing of Fruits and Vegetables – Instant Notes, New India Pub. Agency, New Delhi, str. 283–288.

Smith, E.L., Abbott, A.P., Ryder, K.S. (2014) Deep eutectic solvents (DES) and their applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082

Suárez, M., Romero, M.P., Ramo, T., Motilva, A.M., Motilva, M.J. (2009) Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 1463–1472.

- Tang, B., Zhang, H., Row, K.H. (2015), Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J. Sep. Sci.* **38**, 1053-1064.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., Garcia Viguera, C. (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15638 – 15678
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., Pool-Zobel, B.L. (2006) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol. Carcinogen.* **45**, 164–174.
- Wen, Q., Chen, J.-X., Tang, Y.-L., Wang, J., Yang, Z. (2015) Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere* **132**, 63–69.
- 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., Deng, G., Guo, Y., Li, H. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 622-646.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T. (2004) Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 422–433.
- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108 - 7146.
- Zhao, H., Baker, G.A., Holmes, S. (2011a). New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1908–1916.