

# Biološka aktivnost ekstrakata kore naranče pripremljenih eutektičkim otapalima

---

Glavan, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:407109>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Vedrana Glavan

1329/MB



**BIOLOŠKA AKTIVNOST  
EKSTRAKATA KORE NARANČE  
PRIPRAVLJENIH EUTEKTIČKIM  
OTAPALIMA**



## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević na uloženom vremenu, trudu i savjetima prilikom pisanja ovog rada.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji na potpori, a veliko hvala Marijanu i Marini na strpljenju tijekom studija te izrade ovog rada, bez njihove podrške ne bih bila gdje jesam.



## 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 KORE NARANČE PRIPRAVLJENIH EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

*Vedrana Glavan, 1329/MB*

**Sažetak:** Preradom naranče, kao jednog od najviše korištenih agruma u svijetu, stvara se velika količina otpada, primarno u obliku kore. Kora naranče predstavlja veliku količinu biomase bogate biološki aktivnim spojevima koji bi se mogli izdvojiti te koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U skladu s načelima zelene kemije, ključno je pronaći proces ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz biljnih izvora koji je ekonomski održiv i prihvatljiv za okoliš. U tom smislu su se eutektička otapala pokazala kao dobra zamjena za organska otapala konvencionalno korištena u procesima ekstrakcije, koja su često hlapiva i štetna za okoliš. U ovom radu ispitano je citotoksično djelovanje ekstrakta kore naranče pripremljenog u eutektičkom otapalu kolin-klorid:glicerol s različitim udjelima vode te je istražen tip stanične smrti na HeLa i HaCaT stanicama. Najjače djelovanje pokazao je ekstrakt pripremljen u ChClGly s 30 % (v/v) vode, u odnosu na ekstrakte u puferu i ChClGly s 80 % (v/v) vode, koji nisu pokazali značajni učinak na rast stanica. Djelovanje ekstrakta pripremljenog u ChClGly s 30 % (v/v) vode ovisno je o dozi i vremenu trajanja tretmana, a može se povezati s indukcijom nekroze kod HeLa stanica te apoptoze kod HaCaT stanica. Jača citotoksičnost ekstrakata kod HeLa stanica u odnosu na HaCaT stanice ukazuje na potencijalno antitumorsko djelovanje ekstrakta kore naranče, čija je biološka aktivnost izražena u prirodnom eutektičkom otapalu nego u konvencionalnom otapalu.

**Ključne riječi:** biološka aktivnost, kora naranče, prirodna eutektička otapala, zelena kemija

**Rad sadrži:** 50 stranica, 21 sliku, 2 tablice, 62 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević

**Pomoć pri izradi:** -

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. *Marina Cvjetko Bubalo*
2. Izv. prof. dr. sc. *Kristina Radošević*
3. Izv. prof. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*
4. Doc. dr. sc. *Teuta Murati (zamjena)*

**Datum obrane:** 29. rujna 2020.





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 izv.prof.dr.sc. Kristine Radošević.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF ORANGE PEEL EXTRACTS OBTAINED BY NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS

*Vedrana Glavan, 1329/MB*

**Abstract:** As one of the most used citrus fruits in the world, orange produces a large amount of waste, mostly in the form of peels. Orange peel represents a large amount of biomass rich in bioactive compounds that could be reused in the food and pharmaceutical industry. According to green chemistry principles, it is essential to invent an extraction process that is economically acceptable and safe for the environment. *According to this*, deep eutectic solvents have shown to be an excellent substitute to commonly used organic solvents in extractions that are often volatile and harmful to the environment. In this paper, the cytotoxic ability of orange peel extract prepared in choline-chloride:glycerol with different water ratios has been explored, as well as the type of cell death on HeLa and HaCaT cell cultures. The extract prepared in ChClGly with 30 % (v/v) water has shown the strongest antiproliferative effects compared to the ones prepared in buffer solution and ChClGly with 80 % (v/v) water. The effect of the extract in ChClGly with 30 % (v/v) water is dose- and time-dependent, and could be connected with the induction of necrosis in HeLa cells, and apoptosis in HaCaT cells. Extracts prepared in buffer solution and ChClGly with 80 % (v/v) water have shown no significant results. The cytotoxic effect that was stronger on HeLa cells than on HaCaT cells could imply potential antitumor properties of orange peel extract whose biological activity has also been enhanced in natural deep eutectic solvents in comparison to conventional solvents.

**Keywords:** biological activity, orange peel, natural deep eutectic solvents, green chemistry

**Thesis contains:** 50 pages, 21 figures, 2 tables, 62 references, 0 supplements

**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, Associate professor

**Technical support and assistance:** -

**Reviewers:**

1. PhD *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
2. PhD *Kristina Radošević*, Assistant professor
3. PhD *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor
4. PhD *Teuta Murati*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** September 29<sup>th</sup>, 2020



## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | 3  |
| 2.1. KORA NARANČE .....   | 3  |
| 2.1.1. Sastav i struktura agruma .....  | 4  |
| 2.2. EKSTRAKTI KORE NARANČE .....   | 6  |
| 2.2.1. Flavonoidi .....   | 6  |
| 2.2.2. Vitamin C .....  | 7  |
| 2.2.3. Pektini .....  | 9  |
| 2.2.4. Terpeni .....  | 9  |
| 2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA KORE NARANČE .....   | 11 |
| 2.3.1. Antimikrobna svojstva .....  | 11 |
| 2.3.1.1. Antibiotička rezistencija .....  | 13 |
| 2.3.1.2. Mehanizam djelovanja ekstrakata agruma na mikroorganizme .....                         | 14 |
| 2.3.2. Antioksidacijska svojstva .....  | 14 |
| 2.3.3. Protuupalna svojstva .....   | 16 |
| 2.3.4. Antitumorska aktivnost .....   | 17 |
| 2.4. EUTEKTIČKA OTAPALA .....   | 20 |
| 2.4.1. Primjena eutektičkih otapala u zelenoj kemiji .....                                      | 21 |
| 2.4.2. Ekstrakcija korištenjem eutektičkih otapala .....  | 22 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | 24 |
| 3.1. MATERIJALI .....   | 24 |
| 3.1.1. Ekstrakti kore naranče .....   | 24 |
| 3.1.2. Kemikalije .....   | 24 |
| 3.1.3. Otopine i puferi .....   | 25 |
| 3.1.4. Humane stanične linije .....   | 25 |
| 3.1.5. Uređaji i oprema .....   | 26 |
| 3.2. METODE .....   | 26 |
| 3.2.1. Uzgoj stanica .....  | 26 |
| 3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo .....                                     | 27 |
| 3.2.3. Tretman stanica ekstraktima naranče i određivanje preživljenja stanica MTS metodom ..... | 27 |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.4. Protočna citometrija i određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a ..... | 28        |
| 3.3. OBRADA REZULTATA .....   | 30        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>31</b> |
| 4.1. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI EKSTRAKATA KORE NARANČE .....                                  | 32        |
| 4.1.1. Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata kore naranče na HeLa staničnoj liniji .....                       | 32        |
| 4.1.2. Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata kore naranče na HaCaT staničnoj liniji .....                      | 34        |
| 4.1.3. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a .....                        | 36        |
| 4.1.3.1. Određivanje tipa stanične smrti u HeLa staničnoj liniji .....  | 37        |
| 4.1.3.2. Određivanje tipa stanične smrti HaCaT stanične linije .....  | 40        |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b>   | <b>46</b> |





# 1. UVOD

Dobro je poznato da agrumi imaju koristan učinak za ljudsko zdravlje zbog različitih fitokemikalija koje sadrže. Jedan od najviše korištenih agruma u prehrani je naranča, koja se najviše prerađuje u sokove pri čemu nastaje velika količina otpada narančine kore koja je nejestiva. Budući da otpad kore naranče predstavlja veliku količinu biomase bogate različitim fitonutrijentima, moguće je izdvojiti njene pojedine komponente i iskoristiti ih s ciljem razvoja pripravaka korisnih za ljudsko zdravlje.

Biološki aktivne komponente su spojevi koji se mogu u maloj koncentraciji pronaći u prirodi, mogu biti esencijalni ili neesencijalni za organizam u kojem se proizvode te je poznato da imaju učinak na ljudsko zdravlje, koji može biti povoljan ili nepovoljan. Najvećim dijelom ovi spojevi se nalaze u biljkama koje ih sintetiziraju kao produkte sekundarnog metabolizma te pružaju zaštitu biljci od stresnih okolišnih faktora, a tada se mogu nazivati fitokemikalijama ili fitonutrijentima (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

Kora naranče je otpad prehrambene industrije te se smatra obnovljivim izvorom komponenata s dodanom vrijednošću, a njeno je iskorištavanje u skladu s načelima održivog razvoja i gospodarenja otpadom. Nadalje, u skladu s principima zelene kemije poželjno je razviti i primijeniti proces ekstrakcije koji je ekološki prihvatljiv i ekonomski održiv. U tom smislu, posljednjih su se godina eutektička otapala pokazala kao odlična zamjena za često korištena otapala u procesima ekstrakcije. Prednosti primjene eutektičkih otapala u ekstrakciji su sljedeće: iskorištenje ekstrakcije često je znatno bolje u usporedbi s primjenom konvencionalnih otapala, često samo otapalo pridonosi stabilnosti tako izoliranih biološki aktivnih tvari, a također se i pretpostavlja da bi tako pripremljeni ekstrakti mogli biti „*ready-to-use*“ bez potrebe za daljnjim procesom izolacije i pročišćavanja konačnog produkta.

U teorijskom dijelu ovog rada dan je uvid u poboljšanje već postojećih procesa ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz kore naranče primjenom eutektičkih otapala te pregled različitih bioloških aktivnosti dobivenih ekstrakata, s naglaskom na njihovu antitumorsku aktivnost. Eksperimentalno su analizirani ekstrakti iz kore naranče pripremljeni pomoću prirodnih eutektičkih otapala u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije. Odabir eutektičkih otapala i optimizacija ekstrakcija bili su predmet istraživanja diplomskog rada studentice Ane Grubišić (2020), a biološki učinak najboljih ekstrakata, s obzirom na udio polifenola, ispitan je u ovom radu primjenom kultura životinjskih stanica i *in vitro* metoda.

Hipoteza rada je da će ekstrakt kore naranče pripremljen u optimalnim uvjetima primjenom eutektičkog otapala imati izraženiju biološku aktivnost nego ekstrakt pripremljen referentnim otapalom te će se time potvrditi značaj primjene eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz otpada kore naranče.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KORA NARANČE

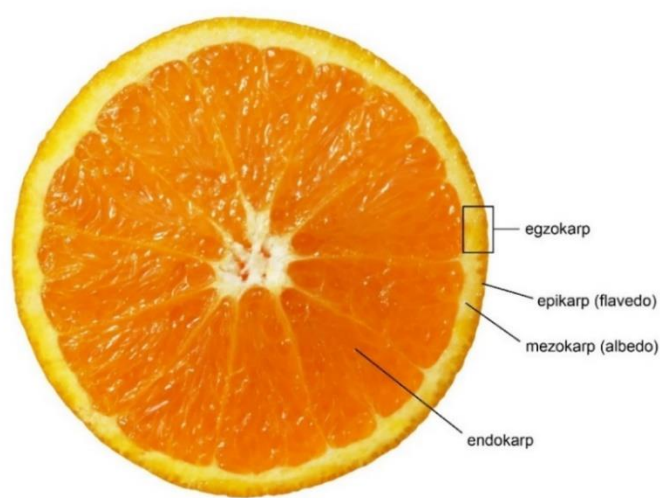
Agrumi su biljke iz porodice *Rutaceae* kojoj pripadaju plodovi poput grejpa, limuna, mandarine i naranče, a bogati su raznim fitonutrijentima za koje je poznato da imaju uglavnom pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Mnogi fitonutrijenti mogu djelovati kao imunostimulansi i antioksidansi, ali pokazuju i antitumorsku aktivnost te sprječavaju nastanak nekih kardiovaskularnih oboljenja zbog svog mineralnog sastava. Fitokemikalije koje sadrže agrumi su biološki aktivni spojevi različitih kemijskih struktura i funkcija u organizmu te mogu biti vitamini, minerali, polifenolni spojevi i polisaharidi, dok antioksidacijska aktivnost agruma potječe najviše od askorbinske kiseline, flavonoida i fenolnih spojeva (Zou i sur., 2016).

Naranča (*Citrus sinensis*) čini veliku većinu cjelokupnog uzgoja agruma, pri čemu se otprilike trećina plodova prerađuje, ponajprije za proizvodnju sokova. Prema podacima Eurostata za 2018. godinu proizvedeno je oko 6.5 milijuna tona naranče, više od bilo kojeg drugog agruma, od kojih Španjolska proizvodi većinu, oko 56 %, odnosno 3.6 milijuna tona. 90 % proizvedenih naranči prodaje se unutar Europske Unije. Osim proizvodnje, također se među agrumima najviše uvozi naranče, 1.1 milijuna tona, uglavnom iz Južne Afrike ili Egipta (Eurostat, 2020).

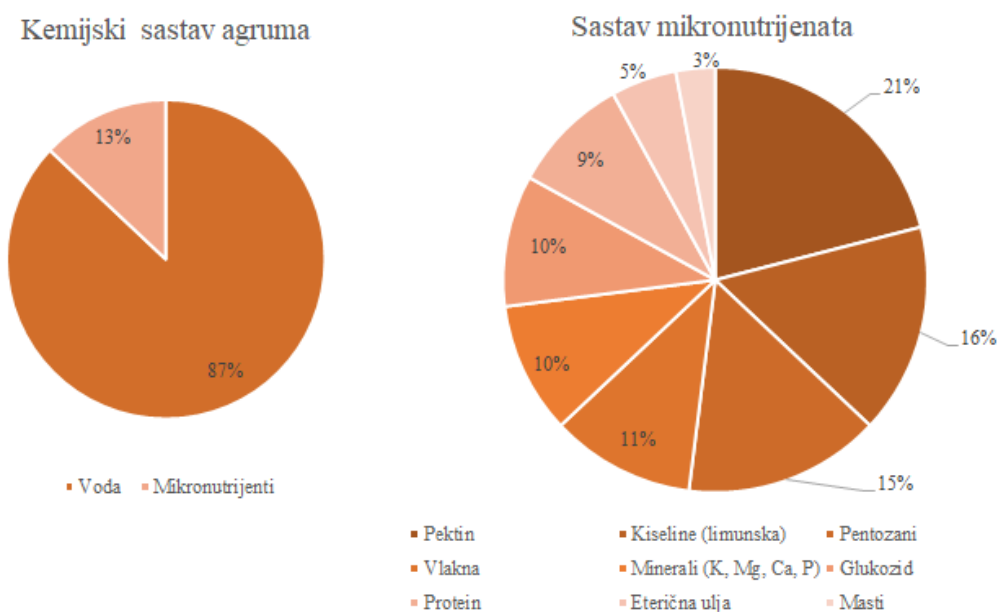
Otprilike trećina cjelokupnog prinosa naranče se prerađuje u prehrambenoj industriji, ponajviše za proizvodnju soka, s korom kao glavnim nusproduktom. Kora naranče, ako se ne obradi i zbrine pravilno, zagađuje okoliš zbog biološki aktivnih komponenti koje sadrži. Nepravilno zbrinjavanje otpada kore naranče može nepovoljno utjecati na mikroorganizme i životinje u tlu i podzemnim vodama zbog eteričnih ulja iz kore agruma koja nisu topiva u vodi i blokiraju organizmima prolaz kisika koji im je potreban za rast i život (Sharma i sur., 2018). Zbog toga je potrebno pravilno obraditi otpadnu koru naranče ili ju iskoristiti za dobivanje drugih proizvoda, čime se rješava problem otpada i dodaje vrijednost cjelokupnom gospodarenju izvornim proizvodom. S obzirom na već spomenutu činjenicu da kora naranče sadrži fitokemikalije s pozitivnom biološkom aktivnošću jedna od mogućnosti je ekstrakcija spojeva koji se nalaze u kori naranče, a mogu se primijeniti u razvoju novih prehrambenih i farmaceutskih pripravaka (Putnik i sur., 2017).

### 2.1.1. Sastav i struktura agruma

Svi plodovi iz skupine agruma imaju sličnu strukturu ploda koja je prikazana na slici 1, sadrže mesnati dio i koru, odnosno endokarp i egzokarp. Kora se sastoji od narančasto obojenog epikarpa koji se zove flavedo i bijelo obojenog mezokarpa koji se zove albedo (Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, 2014). Otpad koji nastaje obradom naranče najviše se sastoji od flaveda i albeda iz kore i srži naranče te pulpe koja ostane nakon cijedenja voća.



**Slika 1.** Građa ploda naranče (Vlastita ilustracija).



**Slika 2.** Kemijski sastav agruma (Preuzeto i prevedeno iz: Sharma i sur., 2018).

Slika 2 prikazuje kemijski sastav agruma te je vidljivo kako oko 13 % čine mikronutrijenti među kojima su najznačajnije organske kiseline (limunska), a potom slijede pentozani, minerali i druge skupine kemijskih spojeva. Značajan dio tih tvari zaostane u otpadu, odnosno kori agruma, koja time može postati izvor spojeva važnih i vrijednih za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Među zanimljive biološki aktivne fitokemikalije iz kore agruma se ubrajaju eterična ulja, najviše D-limonen, fenolni spojevi i flavonoidi poput hesperidina i eriocitrina, karotenoidi, različite organske kiseline, vitamini, ugljikohidrati i enzimi. Kao što je već navedeno, razne fitokemikalije u biomedicinskim istraživanjima pokazuju protuupalna, antitumorska, imunomodulacijska, antimikrobna i antioksidacijska svojstva stoga bi uspješna izolacija i identifikacija upravo ovih spojeva pomogla istraživanju istih i omogućila razvoj novih lijekova ili pripravaka za prevenciju raznih oboljenja, dok bi se u isto vrijeme na ekološki prihvatljiv način obradio potencijalno štetan otpad te bi se tako postigla dodana vrijednost cjelokupnom proizvodnom procesu agruma (Sharma i sur., 2018).

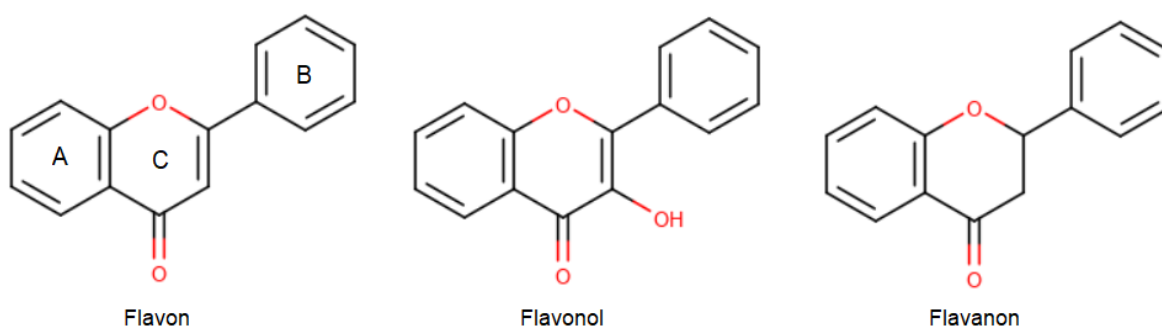
## 2.2. EKSTRAKTI KORE NARANČE

Naranča je plod bogat biološki aktivnim komponentama s brojnim pozitivnim učincima za ljudsko zdravlje i potencijalom korištenja u farmaceutskim i prehrambenim pripravcima. U narednim poglavljima bit će opisane neke od glavnih skupina spojeva koji se mogu naći u kori naranče (slika 2), kao različite biološke aktivnosti koje pokazuju navedeni spojevi.

### 2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi spadaju u skupinu polifenolnih spojeva koji se mogu pronaći u mnogim biljkama kao biološki aktivne komponente. Imaju izražena antioksidativna svojstva zbog mogućnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala, aktivacije antioksidacijskih enzima te inhibicije enzima oksidaza. Flavonoidi čine značajan udio u kemijskom sastavu kore naranče, a prisutni su u tri glavne skupine flavonoida, kao flavoni, flavonoli i flavanoni. Na slici 3 su prikazane osnovne strukturalne razlike navedenih skupina spojeva.

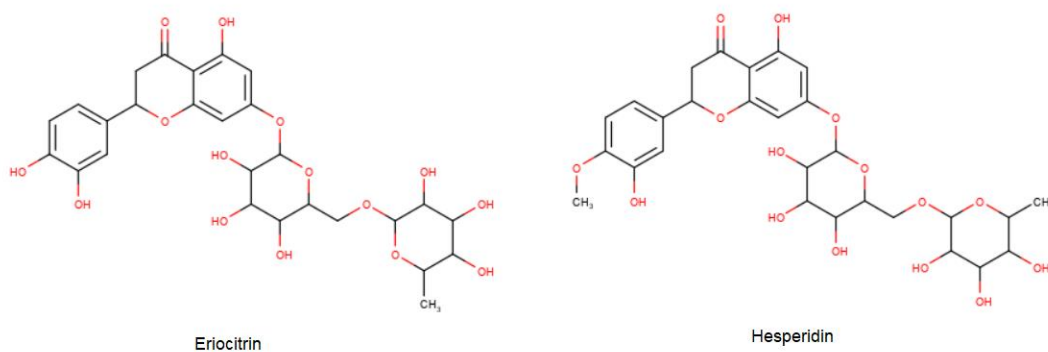
Flavonoidi posjeduju antioksidacijsko djelovanje zbog svoje strukture, točnije zbog hidroksilnih skupina u prstenu B koje imaju veliku sposobnost hvatanja reaktivnih vrsta kisika i dušika. Doniranjem vodikovog atoma i elektrona reaktivnim vrstama dolazi do stabilizacije radikala, a flavonoidni radikal koji nastaje reakcijom stabilizira se rezonancijom preko aromatskih prstenova, pri čemu supstituenti i nezasićene veze prstena C doprinose antioksidacijskoj aktivnosti.



**Slika 3.** Kemijske strukture navedenih flavonoida (Vlastita ilustracija izrađena po PubChem-u u programu MarvinSketch).

Flavoni su pigmenti odgovorni za svijetložutu boju voća i povrća te pokazuju antioksidativnu, protuupalnu i antitumorsku aktivnost. Strukturom slični flavonima, flavonoli zahvaljujući dodatnoj hidroksilnoj skupini imaju jače antioksidativno djelovanje zbog dodatnog donora protona i elektrona. Na kraju, flavanoni koji su zastupljeni u citrusima kao flavanon glikozidi, također imaju antioksidativnu, protuupalnu, protutumorsku i antialergijsku aktivnost. Pomažu metabolizmu ugljikohidrata i sprječavaju oksidaciju lipoproteina male gustoće (eng. low density lipoprotein, LDL).

Glavni flavonoidi koji se mogu naći u naranči su hesperidin, naringin, narirutin i eriocitrin (Schieber i sur., 2001). Hesperidin se može koristiti za tretiranje različitih problema s krvnim žilama poput varikoznih vena i loše cirkulacije, a istraživanja su pokazala da je njegova potencijalna protuupalna aktivnost povezana sa supresijom citokina i oksidativnog stresa. (Xiao i sur., 2018). Slijedeći flavonoid od posebnog interesa je eriocitrin, koji osim jake antioksidativne aktivnosti također pokazuje aktivnost smanjenja lipida u jetri i utječe na gene koji sudjeluju u biogenezi mitohondrija (Hiramitsu i sur., 2015). Kemijske strukture hesperidina i eriocitrina prikazane su na slici 4.



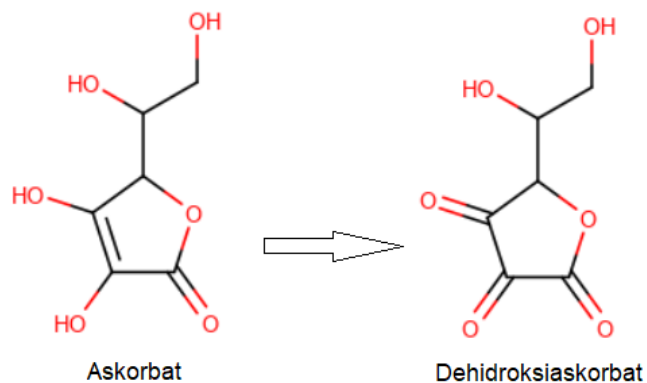
**Slika 4.** Kemijske strukture eriocitrina i hesperidina (Vlastita ilustracija izrađena po PubChem-u u programu MarvinSketch).

### 2.2.2. Vitamin C

Vitamin C ili L-askorbinska kiselina je vitamin topiv u vodi te neophodan za održavanje normalnog metabolizma u čovjeku i drugih životinja, a posjeduje značajna redoks svojstva.



Vitamin C u ljudskom se tijelu najčešće nalazi u obliku askorbata te oksidacijom prelazi u askorbinski radikal te potom u dehidroaskorbat. Djeluje kao kofaktor enzima, zaštitni agens te kao askorbil-radikal u reakcijama s prijelaznim metalima. Antioksidativna svojstva vitamina C potiču iz njegove strukture i njegovoj sposobnosti doniranja elektrona s drugog i trećeg C atoma (Pehlivan, 2017). Reakcija oksidacije askorbata u dehidroksiaskorbat prikazana je na slici 5.



**Slika 5.** Reakcija oksidacije askorbata (Vlastita ilustracija izrađena po PubChem-u u programu MarvinSketch).

Zbog toga što lako gubi elektrone, vitamin C sudjeluje u transportu elektrona i mnogim reakcijama poput sinteze kolagena, hormona i katekolamina (dopamin i norepinefrin) te prevođenju zasićenih masnih kiselina u nezasićene. Bitan je faktor u razvoju imuniteta i borbi protiv infekcija, a zbog sudjelovanja u sintezi kolagena pomaže kod zacjeljivanja mukoze gastrointestinalnog sustava. Osim navedenog, sudjeluje i u metabolizmu lijekova i steroida, neurotransmitera i metalnih iona (apsorpcija željeza). Najvažnijom i najpoznatijom biološkom aktivnošću vitamina C smatra se njegovo antioksidativno djelovanje, s obzirom da je on jedan od najjačih reducirajućih spojeva i hvatača radikala. Također štiti vitamine A i E, kao i polinezasićene masne kiseline od oksidacije što se povezuje s činjenicom da vitamin C pruža zaštitu od kardiovaskularnih bolesti poput aritmija i hipertenzije (Harats i sur., 1998).

Biološka aktivnost koja mu se pripisuje uvelike ovisi o fiziološkom stanju osobe kod koje se primjenjuje, budući da na reakcije u koje je uključen vitamin C utječe veliki broj okolišnih faktora. Osim antioksidativnog svojstva pokazano je da vitamin C ima i prooksidativna svojstva in vitro te može reducirati metalne ione i stvoriti slobodne radikale Fentonovom reakcijom. U ovom slučaju višak askorbinske kiseline sa slobodnim metalnim ionima potiče

reakcije nastajanja slobodnih radikala zbog čega se uzimanje dodatnog vitamina C ne preporuča osobama s povišenim razinama željeza u krvi (Pehlivan, 2017).

### 2.2.3. Pektini

Pektini su polisaharidi kojima je osnova  $\alpha(1-4)$ -galakturonska kiselina s različitom razinom metil-estera. Nalaze se u staničnom zidu biljnih stanica gdje sudjeluju u brojnim staničnim procesima biljke poput prijenosa iona te osiguravaju čvrstoću i potporu stanici. Također, pokazalo se da sudjeluju u nakupljanju antimikrobnih spojeva i aktiviraju obrambene mehanizme biljke u kojoj se nalaze (Hahn i sur., 1981). Kada je riječ o agrumima, pa samim time i narančama, pektini su prisutni u kori i albedu agruma. Međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi, odnosno po duljini ugljikovodičnih lanaca, kompleksnosti i redosljedu monosaharidnih jedinica. U prehrambenoj industriji pektini se koriste zbog njihove sposobnosti zgušnjavanja, želiranja i stabilizacije proizvoda, a kao dio vlakana u proizvodima biljnog podrijetla obavljaju bitnu nutritivnu funkciju i čine veliki dio ljudske prehrane.

U posljednje vrijeme pektini se istražuju zbog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Studije pokazuju kako pektini mogu sniziti razinu kolesterola u krvi, usporiti apsorpciju glukoze u serumu dijabetičara, blokirati adheziju patogenih mikroorganizama u crijevima pomažući tako pri gastrointestinalnim infekcijama (Voragen i sur., 2009), a pokazuju i antitumorska svojstva (Eliaz i Raz, 2019). Pektin se u nativnoj formi ne razgrađuje probavom i zbog svoje veličine se ne može apsorbirati, ali se modifikacijom s enzimatskim tretmanom pri određenom pH i temperaturi može apsorbirati u tankom crijevu (Eliaz i Raz, 2019), što otvara vrata istraživanju modificiranih pektina te primjeni istih.

### 2.2.4. Terpeni

Kora naranče bogata je različitim vrstama terpena u eteričnim uljima, od kojih su neki D-limonen, sabinen i mircen, pri čemu je D-limonen prisutan u najvećoj koncentraciji. Terpeni su najraširenija skupina prirodnih spojeva koje biljka sintetizira kao sekundarne metabolite u svrhu privlačenja insekata ili kao odgovor na stres uzrokovan okolišnim uvjetima. Zbog svojih svojstava i pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje, poput antimikrobne, protuupalne i

antitumorske aktivnosti, terpeni se posljednjih godina intenzivno istražuju u farmaceutskoj industriji (Jaeger i Cuny, 2016).

D-limonen je lipofilni ciklički monoterpen koji ima GRAS (eng. *generally regarded as safe*) status za korištenje u prehrambenoj industriji. D-limonen je jedan od najviše istraženih monoterpena vezano uz njegova kemoterapeutska svojstva, stoga su provedena različita preklinička i klinička istraživanja s D-limonenom u odnosu na različite vrste karcinoma (Bicas i sur., 2011). Unatoč tome što su istraživanja pokazala da D-limonen može biti potencijalni lijek za određene karcinome, D-limonen je relativno toksičan i djeluje i na vijabilnost zdravih stanica, stoga nije prikladan za selektivno uništavanje stanica karcinoma, odnosno nužna su daljnja istraživanja. Pereira i suradnici (2019) su pokazali poboljšana antitumorska svojstva D-limonena kada se pripremi u eutektičkoj smjesi sa zasićenim masnim kiselinama, mentolom i ibuprofenom. Spojevi korišteni za sintezu terapijskog eutektičkog otapala odabrani su zbog svojih protuupalnih svojstava, a poznato je da proces karcinogeneze uključuje različite upalne procese. Najbolji rezultati dobiveni su smjesom D-limonena i ibuprofena u omjeru 1:4, a osim poboljšanih protutumorskih svojstava, eutektička smjesa je također pokazivala bolja protuupalna svojstva (Pereira i sur., 2019).

Sabinen je biciklički monoterpen koji se zbog svojeg mirisa i arome nalazi u raznim začinima za kuhanje kao i u parfemima. Također, sabinen ima protuupalna (Cho i sur., 2017) i antifungalna svojstva te djeluje u zaštiti biljke od fungalnih patogena (Kohzaki i sur., 2009), što ga također čini zanimljivim kandidatom za istraživanja u farmaceutskoj industriji.

Mircen je aciklički monoterpen koji se kao i većina drugih terpena zbog svoje arome koristi u parfemima. Osim u parfumskoj industriji, mircen je svoju upotrebu pronašao i u narodnoj medicini zahvaljujući analgetičkom djelovanju koje je potvrđeno testiranjima na štakorima. Tako se za brojne tegobe koje uzrokuju bol često koristi čaj od limunske trave koji u svome sastavu sadrži mircen (Lorenzetti i sur., 1991).

## 2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKATA KORE NARANČE

### 2.3.1. Antimikrobna svojstva

Neki od spojeva koji se mogu naći u kori naranče pokazuju antimikrobna svojstva, a najčešće su to eterična ulja čija je glavna sastavnica D-limonen. Ovisno o vrsti citrusa, koncentracija D-limonena varira od 25 % do 98 %. U tablici 1 prikazani su glavni sastojci eteričnog ulja naranče, gdje je vidljivo da D-limonen čini oko 91 % kemijskog sastava eteričnog ulja, a slijede ga mircen i  $\alpha$ -pinen (Torres-Alvarez i sur., 2016). Koncentracije različitih sastojaka ekstrakata naranče međusobno se razlikuju u literaturi, najvjerojatnije zbog različitih metoda ekstrakcije i detekcije istih. Istraživanje antimikrobnih spojeva iz kore naranče otvara vrata razvitku novih antibiotika i antiseptika na ekološki prihvatljiv način budući da bi se pri tome prerađivala i zbrinjavala velika količina otpada.

**Tablica 1.** Kemijski sastav eteričnog ulja naranče (Torres-Alvarez i sur., 2016).

| SPOJ                              | POSTOTAK (%) |
|-----------------------------------|--------------|
| <b>D-limonen</b>                  | 91,12        |
| <b><math>\alpha</math>-pinen</b>  | 1,11         |
| <b>Sabinen</b>                    | 0,41         |
| <b>Mircen</b>                     | 4,11         |
| <b>Linalool</b>                   | 0,65         |
| <b>Ugljikovodični monoterpeni</b> | 97,37        |

Studije su pokazale da ekstrakti naranče imaju antimikrobna svojstva protiv Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, kao i protiv filamentoznih fungi i kvasaca (Saleem i Saeed, 2020). Saleem i Saeed (2020) pokazali su da odabir otapala pri ekstrakciji spojeva iz kore naranče uvelike utječe na antimikrobnu aktivnost dobivenih ekstrakata te da su ekstrakti otopljeni u destiliranoj vodi najdjelotvorniji protiv testiranih mikroorganizama u usporedbi s onim otopljenih u metanolu, etanolu i etil acetatu.

Korištenje eteričnog ulja naranče ili ostalih citrusa prikladno je i sigurno za korištenje kod ljudi te se monoterpeni prisutni u ovim eteričnim uljima često koriste kao aditivi u različitim proizvodima, kao što su pića i ostali prehrambeni proizvodi te u proizvodima za njegu kože i tijela poput sapuna i parfema. Korišteni kao aditivi u prehrambenim proizvodima ne smiju mijenjati organoleptička svojstva proizvoda, a služe kao prirodni konzervansi i štite hranu od propadanja uzrokovanog bakterijama i gljivicama te njihovim toksinima.

Gljivice koje proizvode mikotoksine mogu se pronaći na žitaricama, orašastim plodovima, začinima i ostalim prehrambenim proizvodima, najčešće u toplijim i vlažnim uvjetima (WHO, 2018). U hrani su najčešće prisutne gljivice vrsta *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium* (Sakai i sur., 2004). Prisutnost gljivica u prehrambenim proizvodima djeluje nepovoljno na te proizvode tako da smanjuju njihovu prehrambenu vrijednost, čine ih mikrobiološki neispravnima ili opasnim za konzumaciju zbog proizvodnje mikotoksina. Aflatoksini su vrsta mikotoksina koje proizvode gljivice *Aspergillus* vrste, mogu imati mutagenu i imunosupresivnu aktivnost, a mogu se naći na velikom broju različitih prehrambenih proizvoda.

Singh i suradnici (2010) su tako pokazali da eterična ulja naranče i D-limonen kao njegova glavna sastavnica pokazuju antifungalnu aktivnost i inhibitornu aktivnost prema aflatoksinu te predlažu korištenje eteričnog ulja naranče i pomela kao konzervansa. Nadalje, sam D-limonen je pokazao inhibitorno djelovanje prema aflatoksinu pri nižoj koncentraciji nego što su pokazivala eterična ulja naranče i pomela, što ukazuje da se pročišćeni D-limonen može koristiti kao inhibitor aflatoksina. Slične rezultate su objavili Dias i suradnici (2019) čiji je zaključak da eterična ulja naranče s D-limonenom kao vodećom komponentom imaju antifungalnu aktivnost protiv gljivičnog fitopatogena *Sclerotinia sclerotiorum*.

### 2.3.1.1. Antibiotička rezistencija

Rezistencija bakterija na antibiotike posljednjih godina vrlo brzo raste, a osim rezistencije na antibiotike bakterije pokazuju otpornost i na različite spojeve koji se nalaze u antisepticima i ostalim sličnim preparatima koji se svakodnevno koriste za suzbijanje rasta bakterija u bolnicama i industriji. Ovo predstavlja veliki problem u zdravstvu i prehrambenoj industriji, budući da patogeni mikroorganizmi mogu uzrokovati vrlo ozbiljna oboljenja koja se potencijalno ne mogu izliječiti ukoliko se radi o bakteriji s razvijenom rezistencijom na sve antibiotike. Bitno je napomenuti da je pojava rezistencije bakterija na antibiotike, kao i neke druge karakteristike bakterija, prirodan proces, no pogrešno i pretjerano korištenje antibiotika za liječenje ljudi te tretiranje hrane, značajno doprinosi porastu bakterijske rezistencije, kao i korištenje antibiotika na koje bakterije imaju poznati mehanizam odgovora u obliku rezistencije.

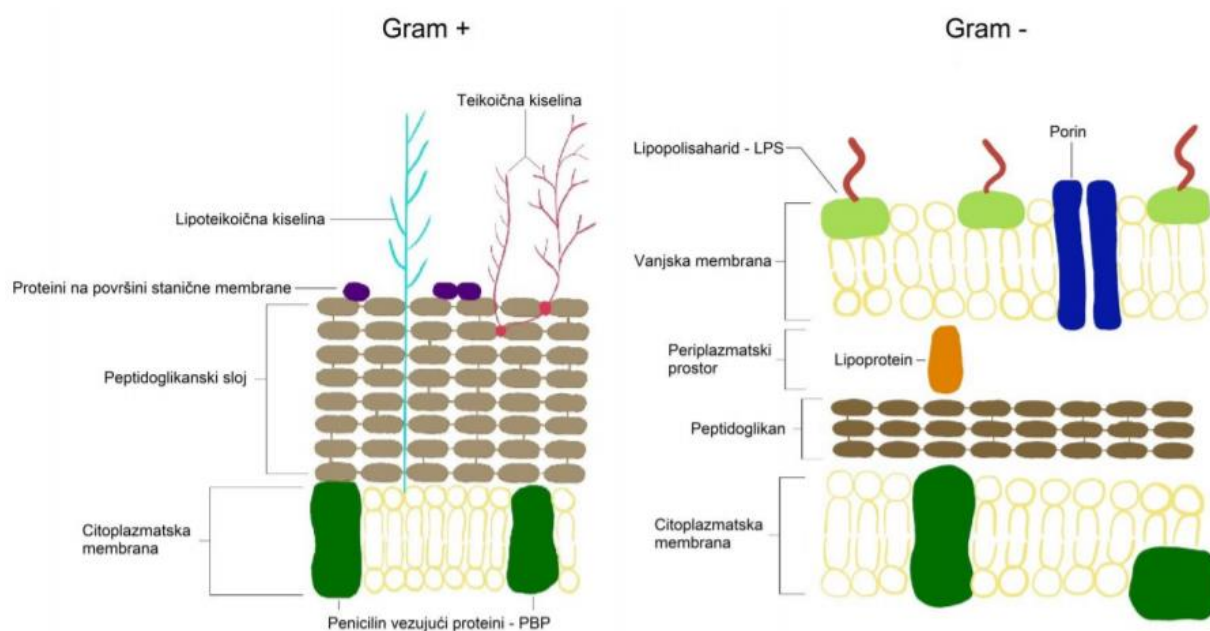
Postoji nekoliko strategija borbe protiv antibiotske rezistencije, a to su:

- razvitak novih antimikrobnih spojeva,
- pronalazak novih meta za antimikrobne spojeve te
- prevencija razvitka bakterijske rezistencije (Aminov, 2010).

Istraživanje prirodnih spojeva iz kore naranče s ciljem doprinosa u rješavanju problema antibiotske rezistencije, spadalo bi u prve dvije strategije, budući da su istraživanja pokazala da kora naranče posjeduje spojeve s antimikrobnim djelovanjem. Stoga je daljnja istraživanja potrebno usmjeriti k metodama uspješnih, po mogućnosti zelenih ekstrakcija spojeva sa željenom aktivnošću te razvoju stabilnih formulacija za primjenu u prehrambenoj i/ili farmaceutskoj industriji.

### 2.3.1.2. Mehanizam djelovanja ekstrakata agruma na mikroorganizme

Saleem i Saeed (2020) u svojoj su studiji pokazali da su Gram-negativne bakterije osjetljivije na ekstrakte limuna i naranče, što je najvjerojatnije posljedica razlika u membranama bakterija što je prikazano na slici 6. Naime, Gram-pozitivne bakterije sadrže debeli sloj peptidoglikana koji služi kao barijera mnogim spojevima koji bi mogli naštetiti bakteriji. Kao dodatnu zaštitu sadrže teikoičnu i lipoteikoičnu kiselinu koje daju dodatnu strukturu i otpornost Gram-pozitivnim bakterijama na vanjske uvjete i strane spojeve, poput onih sadržanih u ekstraktima naranče. Za razliku od njih, Gram-negativne bakterije nemaju niti jedno od navedenih svojstava Gram-pozitivnih bakterija te su stoga podložnije djelovanju ekstrakata agruma.



**Slika 6.** Razlike u građi membrana Gram-pozitivnih i -negativnih bakterija (Vlastita ilustracija).

### 2.3.2. Antioksidacijska svojstva

Staničnim metabolizmom organizam prilikom provođenja uobičajenih staničnih procesa proizvodi reaktivne kisikove vrste (ROS, eng. *reactive oxygen species*). Reaktivne kisikove vrste su vrsta nestabilnih i vrlo reaktivnih molekula koje sadrže kisik, a nakupljanjem ROS-ova u stanicama može doći do oštećenja nukleinskih kiselina te ostalih strukturnih spojeva kao što

su lipidi, proteini i ugljikohidrati. Nakupljanje ROS-ova i posljedično time nastanak neravnoteže antioksidansa i oksidansa u stanicama dovodi do oksidativnog stresa. Sprječavanje upravo ove situacije ključno je za održavanje zdravlja stanica i organa. Aerobni organizmi stoga koriste sustave antioksidativnih enzima i antioksidansa koji eliminiraju ROS-ove i održavaju ravnotežu između oksidansa i antioksidansa.

Najčešće fiziološki prisutni ROS-ovi u organizmu su superoksid anion ( $O_2^-$ ), hidroksil radikal ( $\bullet OH$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), a nastaju kao posljedica izlaganja dimu, posebice cigareta, izlaganja ozonu, većoj koncentraciji kisika, teškim metalima te kao posljedica ionizirajućeg zračenja (Birben i sur., 2012). Oksidativni stres doprinosi nastanku različitih patoloških stanja, kao što su karcinomi, kardiovaskularne bolesti, neurološke bolesti, dijabetes te različite respiratorne bolesti. Epidemiološke studije ukazuju na to da osobe koje imaju prehranu bogatu antioksidansima manje boluju od kardiovaskularnih bolesti, što ukazuje na mogućnost korištenja vitamina C ili određenih polifenolnih spojeva kao dodatak terapiji za povišen krvni tlak ili kao profilaksa za hipertenziju i kardiovaskularne bolesti. Pokazano je da vitamin C u visokim dozama poboljšava funkciju endotela krvnih žila utjecajem na smanjenje proizvodnje slobodnog radikala dušikovog oksida (Jackson i sur., 1998). Studije *in vitro* pokazuju poželjan učinak vitamina C na krvni tlak, dok su kliničke studije hipertenzije i vitamina C još uvijek nedosljedne. Uglavnom se radi o kratkotrajnim studijama, ponekad s premalim brojem pacijenata te je potrebno provesti dugoročne kliničke studije kako bi se potvrdio učinak vitamina C na krvni tlak (González, 2014).

Kao što je navedeno, aerobni organizmi koriste antioksidativne sustave koji se mogu temeljiti na endogenim antioksidativnim enzimima, ali i na egzogenim neenzimskim spojevima. Ovo mogu biti vitamini C i E te različiti polifenolni spojevi i terpenoidi za koje je poznato da imaju antioksidativno djelovanje, a prisutni su u mnogim biljkama, kao što je naranča i kora njenog ploda. Unatoč tome što je vitamin C jak antioksidans, on može biti izvor superoksidnih radikala u reakciji s kisikom te hidroksilnih radikala u reakciji s ionima bakra pri visokim koncentracijama vitamina C (Murray i sur., 2011). Iako je za ove reakcije potrebna vrlo visoka doza vitamina C koja je rijetko prisutna u organizmu, ovo ukazuje na važnost reguliranja doze i pažljivo korištenje vitamina C.



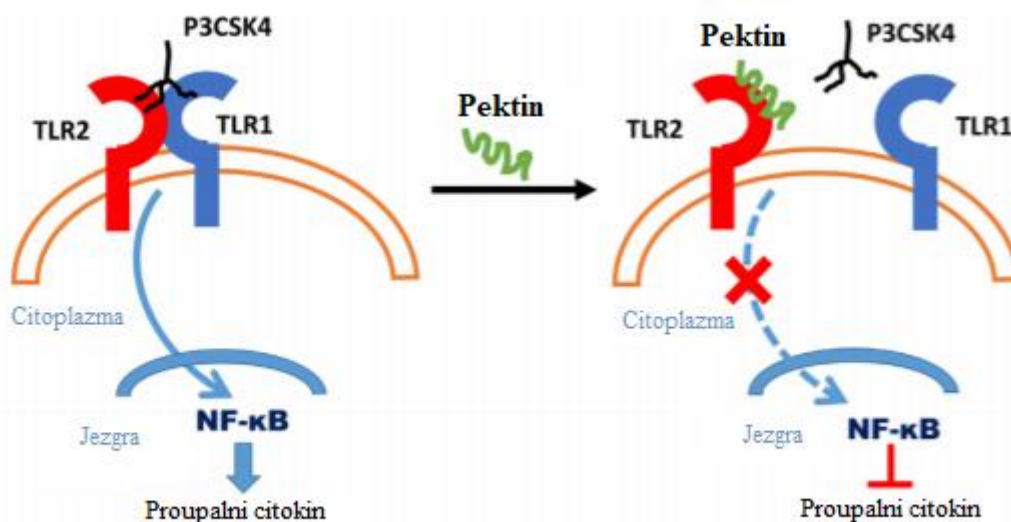
### 2.3.3. Protuupalna svojstva

Upala je najmoćniji obrambeni mehanizam organizma koji se javlja kao odgovor na štetne vanjske čimbenike. Obrambena upalna reakcija spada u nespecifičan imuni odgovor te uključuje različite procese, kao što su stvaranje kisikovih radikala, fagocitične mehanizme, lučenje antimikrobnih tvari, promjene tkivne strukture zahvaćenog organa i druge (Gamulin i sur., 2011). Unatoč važnosti ovog obrambenog sustava, upala potencijalno može biti i kronični samorazorni proces ukoliko se poremeti sustav kontrole upale te tada dolazi do različitih degenerativnih bolesti, kardiovaskularnih, neuroloških i autoimunih poremećaja, gdje upalni procesi tijela napadaju vlastito tkivo i stvaraju štetu.

Za liječenje upale i autoimunih bolesti koriste se protuupalni lijekovi, koji mogu biti steroidni i nesteroidni protuupalni lijekovi, koji se zbog svojih kemijsko-fizikalnih svojstava često lošije apsorbiraju te je potrebno uzimati veću dozu lijeka. Osim toga, protuupalni lijekovi zbog svojeg načina djelovanja imaju određene nuspojave zbog kojih korištenje ovih lijekova postaje nepoželjno ili onemogućeno ukoliko su nuspojave preteške. Dugotrajno korištenje nesteroidnih protuupalnih lijekova može dovesti do razvitka ovisnosti.

Kao izvor neiskorištenih bioaktivnih komponenti, kora naranče sadrži različite spojeve poput pektina, dijetalnih vlakana te polifenolnih spojeva koji pokazuju protuupalna i antioksidacijska svojstva koja bi mogla poboljšati djelovanje protuupalnih lijekova ili se koristiti u istraživanju i formulaciji novih protuupalnih lijekova.

Dijetalna vlakna ključni su dio ljudske prehrane te osim za zdravlje gastrointestinalnog sustava, djeluju i na imunološki sustav. Epidemiološke studije pokazuju kako sniženi unos vlakana doprinosi nastanku određenih bolesti, kao što su dijabetes, pretilost, alergije te kolorektalni karcinom (Burkitt i sur., 1972). Poznato je da dijetalna vlakna ulaze u interakcije sa epitelnim i imunim stanicama probavnog sustava vezujući se na receptore za prepoznavanje obrazaca (PRR, eng. *pattern recognition receptors*) dok se pektini specifično vežu na receptore čija građa slični Toll proteinu (TLR, eng. *Toll-like receptors*) (Prado i sur., 2020). Interakcije između pektina i receptora ovise o njihovoj strukturi, a istraživanja pokazuju da pektini s nižom razinom metil-estera smanjuju upalu u gastrointestinalnom sustavu. Sahasrabudhe i suradnici (2018) predložili su protuupalni mehanizam pektina koji je prikazan na slici 7. Vezanje pektina na TLR2 blokira heterodimerizaciju TLR2-TLR1 sprječavajući tako upalnu reakciju.



**Slika 7.** Predloženi mehanizam protuupalnog djelovanja pektina (Preuzeto i prevedeno iz: Sahasrabudhe i sur., 2018).

Osim učinka imunskog sustava na upalu, utjecaj na nastanak tkivnog oštećenja također ima i oksidativni stres koji može doprinijeti nastanku ili pogoršanju kronične upale. Oksidacija makromolekula, posebice određenih proteina stvara spojeve koje imuni sustav prepoznaje kao signale za opasnost i pokretanje upale (Salzano i sur., 2014). Osim pektina i dijetalnih vlakana, kora naranče bogat je izvor polifenolnih spojeva koji također pokazuju protuupalna svojstva, dijelom zbog svoje mogućnosti „hvatanja“ kisikovih radikala, ali i zbog toga što moduliraju učinak proupalnih molekula i enzima, na primjer u metabolizmu arahidonske kiseline (Hussain i sur., 2016).

#### 2.3.4. Antitumorska aktivnost

Rak je jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu te je drugi glavni uzrok smrti nakon kardiovaskularnih bolesti u Hrvatskoj (HZJZ, 2020). Nastaje kao posljedica poremećenih mehanizama regulacije staničnog ciklusa. Poremećaj u tim, inače vrlo pažljivo reguliranim mehanizmima, dovodi do nekontroliranog rasta i diobe stanica, koje se mogu širiti u okolna tkiva i ometati funkcioniranje organizma. Tumorske stanice imaju određene karakteristike koje im olakšavaju preživljenje, dijeljenje i izbjegavanje imunog sustava domaćina. Manje su povezane s okolnim stanicama lokalnog tkiva, nemaju kontaktne inhibicije te su manje ovisne o faktorima rasta, koje u nekim slučajevima mogu i same proizvoditi, što im olakšava brz rast

i metastaziranje, odnosno širenje unutar organizma. Također izlučuju faktore rasta koji stimuliraju angiogenezu što im omogućuje vlastitu opskrbu kisikom i hranom. Stanice raka ne ulaze u apoptozu te nemaju normalnu diferencijaciju, što znači da se neprekidno dijele i žive dulje od „normalnih“ stanica. Bilo koja vrsta stanice može postati tumorska stanica, stoga postoje na stotine vrsta tumora što još dodatno otežava pronalazak prikladne terapije za ovu bolest.

Unatoč velikom broju istraživanja molekularnih mehanizama nastanka tumora te istraživanja novih terapija, nije pronađen lijek za sve vrste tumora, a lijekovi koji se koriste nisu uvijek potpuno djelotvorni zbog razvitka rezistencije tumora na kemoterapiju. Osim toga, antitumorski lijekovi često imaju teške nuspojave koje uvelike mogu smanjiti kvalitetu života pacijenata. U posljednje vrijeme se različite bioaktivne komponente biljaka i voća ističu djelotvornima protiv rasta stanica tumora, među kojima su bioaktivne komponente kora agruma. Flavonoidi iz kore agruma tako pokazuju antitumorsku, protuupalnu i anti-proliferacijsku aktivnost kod različitih vrsta tumora, specifično tumora kože, prostate, želuca i debelog crijeva, kao i na svim staničnim linijama humanog karcinoma (Shafique i sur., 2019).

Jedan od prethodno spomenutih flavonoida, hesperidin, u istraživanjima na štakorima koji su tretirani kancerogenim spojem pokazuje antitumorsko djelovanje samostalno i u kombinaciji s diosminom (Tanaka, 1997). Oba flavonoida mogu se pronaći u korici naranče. Kora agruma, posebice naranče i mandarine, sadrži još jednu vrstu polifenolnih spojeva, a to su polimetoksisflavoni. Ovi spojevi su vrlo zanimljivi zbog antitumorske i protuupalne biološke aktivnosti koje pokazuju, a primijećeno je da hidrosilirani polimetoksisflavoni pokazuju jaču biološku aktivnost od nehidrosiliranih oblika (Tung i sur., 2019). Nobiletin i tangeretin, vrsta su polimetoksisflavona, koji se mogu pronaći u kori naranče i za koje je uočen velik broj antitumorskih bioloških aktivnosti kao i protuupalnih aktivnosti te su zbog ovoga, ali i zbog toga što se mogu pronaći u najvećoj količini u kori naranče, najviše istraživani. Tangeretin inhibira adheziju i invaziju stanica raka te njihovu proliferaciju tako da može zaustaviti stanični ciklus u G1 fazi inhibicijom ciklin-ovisnih kinaza i poticanjem proteina koji inhibiraju ciklin-ovisne kinaze. Nobiletin također utječe na proliferaciju stanica karcinoma tako da inhibira fosforilaciju kinaza izvanstaničnog matriksa (Li i sur., 2009).

Ekstrakti kore naranče osim antitumorske aktivnosti pokazuju i antioksidativna i protuupalna svojstva, od kojih se oba pojavljuju u etiologiji karcinogeneze. Zbog toga može se zaključiti da bi smanjenje upale u tkivu koje je zahvaćeno karcinomom, kao i obnavljanje ravnoteže

oksidansa i antioksidansa moglo pomoći spriječiti prodiranje karcinoma i smanjiti nepoželjne učinke koje tumor ima na okolna tkiva.

Daljnjim istraživanjima bioaktivnih komponenti kore naranče, ali i molekularnih mehanizama njihovog djelovanja, mogli bi biti otkriveni novi spojevi s navedenim učincima ili poboljšati formulacije poznatih spojeva kako bi bili prikladniji za kliničku primjenu, samostalno ili u sinergiji s ostalim lijekovima koji se već koriste za liječenje karcinoma. Cilj poboljšanja terapije jest, naravno, bolji učinak lijeka, ali i smanjenje nuspojava i bolja kvaliteta života pacijenta, što bi se moglo postići novo sintetiziranim lijekom prirodnog podrijetla ili već postojećim lijekom u manjoj koncentraciji, ali u kombinaciji s nekom od bioaktivnih komponenti za koje je pokazano da ima poželjan učinak na tijek bolesti.

## 2.4. EUTEKTIČKA OTAPALA

Eutektička otapala (DES, eng. *deep eutectic solvents*) definiraju se kao smjese dvaju ili više spojeva, koje imaju niže talište od tališta bilo koje od pojedinačnih komponenti te su stoga najčešće u tekućem stanju. Eutektičke smjese odstupaju od idealne termodinamike čvrste i tekuće faze. Snažne vodikove veze između donora (HBD, eng. *hydrogen-bond donor*) i akceptora (HBA, eng. *hydrogen-bond acceptor*) koji stvaraju eutektičke smjese razlog su smanjenja temperature tališta smjese koja je stoga u tekućem stanju na sobnoj temperaturi (Pedro i sur., 2019).

Priprema eutektičkih otapala sastoji se od miješanja dvaju ili više spojeva, uz miješanje i grijanje, pri čemu se temperatura mora pratiti kako bi se izbjegao raspad pojedinih komponenti (Bubalo i sur., 2016). Mreža vodikovih veza koja nastaje ovom reakcijom odgovorna je za specifične karakteristike eutektičkih otapala, kao što su nezapaljivost, kemijska i termička stabilnost, visoka topivost i viskoznost te niska toksičnost i mogućnost biološke razgradivosti. Eutektička otapala ne reagiraju s vodom, stoga je također olakšan proces skladištenja (Mbous i sur., 2017). Kao akceptor vodikove veze često se koristi kvaterna amonijeva sol kolin klorid (ChCl) koja ulazi u interakcije s lako dostupnim i jeftinim donorima vodika kao što su glicerol i urea. Kolin klorid je biorazgradiv i netoksičan te je njegovo korištenje ekonomično zbog toga što se radi o sirovini koja se proizvodi u velikim količinama iz fosilnih goriva ili biomase (Bubalo i sur., 2016).

U prošlosti su eutektičke smjese korištene kako bi se smanjila temperatura tališta ili energija kristalne rešetke određenih soli (Sunol i sur., 2019), a danas im je primjena vrlo široka te se koriste u organskoj sintezi, biokemiji, procesima razdvajanja i analize različitih spojeva i postupcima ekstrakcije. Novije primjene eutektičkih otapala uključuju njihovu primjenu u biomedicini i farmaciji, primjerice za poboljšanje topljivosti djelatnih aktivnih tvari teško topivih u vodi.

#### 2.4.1. Uloga eutektičkih otapala u zelenoj kemiji

U području zelene kemije značajan je fokus na razvoju otapala koja nisu štetna za okoliš te koja bi mogla zamijeniti klasična otapala koja se koriste u biotehnološkoj i kemijskoj industriji. Otapalo koje bi zadovoljilo uvjete definirane zelenom kemijom mora biti jednostavno za uporabu, niske hlapljivosti i netoksično za ljude i okoliš (Bubalo i sur., 2016). Posebna kategorija eutektičkih otapala su prirodna eutektička otapala (NADES, engl. natural deep eutectic solvents), odnosno eutektička otapala čije su komponente primarni metaboliti poput aminokiselina, organskih kiselina, šećera i drugih (Paiva i sur., 2014). Budući da kod sinteze eutektičkih otapala dolazi do formiranja vodikovih veza, cjelokupan supstrat se prevodi u produkt pa sam proces pripreme ovih otapala nema nusprodukata, što ga čini prihvatljivim za okoliš, jer nema tvorbe otpada. Kod prirodnih eutektičkih otapala ishodne komponente koje se koriste za njihovu sintezu nisu toksične za okoliš pa je pretpostavka da i sama otapala neće biti ekotoksična, što se uglavnom pokazalo točnim kada su u pitanju NADES, dok su neka DES pokazala jaču citotoksičnost nego njegove polazne tvari, najvjerojatnije zbog sinergističkog učinka u smjesi tvari. Zbog toga što su eutektička otapala netoksična, biorazgradiva, nehlapiva i stabilna, njihova primjena u proizvodnim procesima bolja je alternativa klasičnim otapalima. Budući da postoji velik broj spojeva kojim se mogu tvoriti prirodna eutektička otapala, moguće je dizajnirati njihova fizikalno kemijska svojstva za različite aplikacije poput sinteza, ekstrakcija, biokemijskih procesa te kemijske i enzimske katalize (Smith i sur., 2014). Durand i suradnici (2015) su prikazali kako korištenje eutektičkog otapala kao otapala za biokatalizu povećava aktivnost enzima. Korištenje nekog drugog organskog otapala nije pokazalo ovakve rezultate, stoga su zaključili da je povećana aktivnost enzima s eutektičkim otapalom zbog svojstava eutektičkog otapala. Zbog kompleksnog procesa imobilizacije enzima i potrebe za poboljšanjem stabilizacije i reciklacije enzima, postoji potencijal da se eutektička otapala koriste kao otapala u biokatalizi.

Osim kao alternativa klasičnim otapalima u kemijskoj i biotehnološkoj industriji zbog njihovih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava, prirodna eutektička otapala mogu imati i biološki učinak, neki od kojih pokazuju antimikrobna i antitumorska svojstva. Određena prirodna eutektička otapala, pogotovo ona koja sadrže organske kiseline, imaju antibakterijska svojstva (Wikene i sur., 2017), dok tzv. terapijsko eutektičko otapalo D-limonena u smjesi s ibuprofenom pokazuje poboljšana antitumorska i protuupalna svojstva (Pereira i sur., 2019).

#### 2.4.2. Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva korištenjem eutektičkih otapala

Vrijedni sekundarni metaboliti koji potječu iz životinja i biljaka koriste se u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji gdje služe kao bioaktivne komponente u različitim proizvodima. S obzirom na to da postoji veliki broj različitih sekundarnih metabolita, koriste se različite metode ekstrakcije specifične za određeni spoj. Osim lošijeg iskorištenja procesa i dužeg vremena ekstrakcije, glavni nedostatak ovih „klasičnih“ metoda ekstrakcije su primjena otapala koja su često toksična za okoliš i mogu utjecati na bioaktivne komponente koje se žele ekstrahirati. U prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji najčešće korištena otapala su voda i hlapivi organski spojevi (Mbous i sur., 2017). Ova otapala nisu dobra za sve ekstrakcije, jer voda nije učinkovita u ekstrakciji hidrofobnih i nepolarnih spojeva, a hidrofilna onečišćenja koja nastaju u smjesi dodatno otežavaju proces ekstrakcije. Što se tiče hlapivih organskih otapala, njihovo korištenje doprinosi onečišćenju zraka i voda te su potrebni dodatni troškovi zbrinjavanja i remedijacije nastalog otpada. Zbog ovih razloga, postoji potreba za zelenom ekstrakcijom uz uporabu otapala koja su djelotvornija od dosadašnjih te nisu štetna za okoliš.

Kao odgovor potrebi za ekološki prihvatljivijim procesom ekstrakcije, pojavio se pojam zelene ekstrakcije, koja se temelji na razvitku procesa ekstrakcije koji će smanjiti potrošnju energije, koristiti alternativna otapala i obnovljive prirodne proizvode te osigurati siguran i visokokvalitetan ekstrakt (Chemat i sur., 2012). Anastas i Warner (1998) su definirali dvanaest načela zelene kemije, a nalažu da bi proizvodni procesi trebali biti dizajnirani tako da minimiziraju primjenu ili stvaranje opasnih tvari. Korištena otapala bi po ovim kriterijima trebala biti netoksična, biorazgradiva, nehlapiva i nezapaljiva te jednostavna za rukovanje. Navedeni zahtjevi su većinom ispunjeni primjenom eutektičkih otapala. Osim toga što prirodna eutektička otapala sadrže primarne metabolite pa su netoksična i sigurna za okoliš, također se pokazalo da su i efikasnija kod određenih procesa ekstrakcije. Ozturk i suradnici (2018) su pokazali bolji prinos ekstrakcije koristeći eutektička otapala na bazi kolin-klorida pri ekstrakciji polifenolnih spojeva u odnosu na konvencionalno otapalo 30 %-tne vodene otopine etanola. Na uspješnost ekstrakcije također utječu fizikalno-kemijska svojstva otapala pa je jedan od problema prirodnih eutektičkih otapala njihova velika viskoznost čime se otežava i usporava proces otapanja. Kao rješenje se nameće povećanje temperature ili dodavanje vode (Liu i sur., 2018). Jeliński i suradnici (2019) su korištenjem prirodnog eutektičkog otapala na bazi kolin-klorida pokazali kako je prikladan za ekstrakciju kurkumina iz prirodnog izvora, ali

i za otapanje i održavanje stabilnosti kurkumina u NADES-u. Topljivost kurkumina u kolin-klorid:glicerolu 12 tisuća puta je veća nego u vodi te je spriječena degradacija kurkumina djelovanjem sunčeve svjetlosti, što je inače problem kod konvencionalnih otapala ili samog kurkumina u praškastom obliku.

Općenito, netoksičnost i biorazgradivost te mogućnost optimizacije fizikalno-kemijskih svojstava prirodnih eutektičkih otapala odabirom donora vodika pokazuje ogroman potencijal u primjeni prirodnih eutektičkih otapala za ekstrakciju, otapanje i njihovu primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Prirodna eutektička otapala su netoksična i sigurna te bi se potencijalno s istim otapalom mogao provesti cijeli proces od ekstrakcije do otapanja i formulacije uz ostvarenje energetske uštede i smanjene količine korištenih kemikalija te posljedično time i uz manje onečišćenje okoliša. Proces proizvodnje lijeka ili dodatka prehrani ovim putem također olakšava činjenica da su određena prirodna eutektička otapala sigurna za konzumaciju kod ljudi, što znači da su procesi odvajanja otapala od konačnog produkta nakon ekstrakcije nepotrebni, čime se dodatno smanjuje korištenje kemikalija i potrošnja energije.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Ekstrakti kore naranče

Priprava ekstrakata kore naranče i optimizacija ekstrakcije uz primjenu eutektičkih otapala s ciljem proizvodnje visokovrijednih ekstrakata bio je predmet istraživanja diplomskog rada studentice Ane Grubišić (2020). U tablici 2 prikazan je sastav korištenih ekstrakata kore naranče u ovom radu, te maseni udjeli određenih komponenti u kori naranče.

**Tablica 2.** Sastav ekstrakata kore naranče korištenih u radu (Grubišić, 2020).

| Spoj u ekstraktima kore naranče | Ekstrakt u puferu (mg g <sup>-1</sup> narančine kore) | Ekstrakt u ChClGly 30 % (v/v) (mg g <sup>-1</sup> narančine kore) | Ekstrakt u ChClGly 80 % (v/v) (mg g <sup>-1</sup> narančine kore) |
|---------------------------------|---|---|---|
| <b>D-limonen</b>                | 6,37*   | 3,69  | 2,02  |
| <b>Polifenolni spojevi</b>      | 41,59**   | 50,32   | 44,26   |
| <b>Proteini</b>                 | 8,92  | 7,72  | 7,12  |

\*referentno otapalo je n-heptan

\*\*referentno otapalo je zakiseljeni EtOH

##### 3.1.2. Kemikalije

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
- Tripin-plavo, Sigma-Aldrich, St-Louis, SAD
- 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UKThe CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega, SAD

- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, SAD

### 3.1.3. Otopine i puferi

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

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Natrijev klorid           | 8,0 g     |
| Kalijev klorid            | 0,2 g     |
| Dinatrijev hidrogenfosfat | 1,44 g    |
| Kalijev dihidrogenfosfat  | 0,24 g    |
| Destilirana voda          | do 100 mL |

#### 0,4 % otopina tripan-plavo:

|                   |          |
|-------------------|----------|
| boja tripan-plavo | 0,08 g   |
| PBS pufer         | 20,00 mL |

### 3.1.4. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su humane stanične linije HeLa i HaCaT dobivene iz *American Type Culture Collection* (ATCC) banke stanica.

Stanična linija HeLa je prva humana kultura stanica malignog tumora koja je izolirana iz adenokarcinoma vrata maternice pacijentice Henriette Lacks 1950-ih. Zbog neprekidne diobe HeLa stanična linija se koristi u biomedicini za istraživanje karcinogeneze, razvoj cjepiva i ispitivanje drugih učinaka na ljudske stanice.

HaCaT je humana kultura stanica spontano immortaliziranih keratinocita izoliranih iz kože odrasle osobe. Uloga keratinocita u fiziološkim uvjetima je popravak i obrana kože stoga se ova stanična linija koristi u istraživanjima u područjima imunologije i stanične diferencijacije.

### 3.1.5. Uređaji i oprema

- Čitač ploča, Tecan Sunrise, Mannedorf, Švicarska
- Analizator staničnog zdravlja Muse (eng. *Muse™ Cell Analyzer*), Merck Milipore, Burlington, Massachusetts, SAD
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Kambič, Slovenija
- Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijski pribor (pipete, nastavci za pipete, Eppendorfice/Eppice)
- Petrijeve posude za uzgoj stanica, Thermo Scientific BioLite, SAD
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert Bright-Line, Buffalo, NY, SAD
- Ploče s 6 i 96 jažica, Corning, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Uzgoj stanica

Kulture HeLa i HaCaT stanica su uzgajane u DMEM mediju uz dodatak 10 % (v/v) FBS-a u plastičnim Petrijevim zdjelicama kako bi se održala biomasa za potrebe postavljanja pojedinačnih eksperimenata. U pločama s jažicama postavljeni su pojedinačni eksperimenti u kojima je ispitivana biološka aktivnost ekstrakata kore naranče otopljenih u ChClGly s različitim udjelima vode. Uzgoj stanica vođen je u kontroliranim uvjetima u inkubatoru s reguliranom atmosferom koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub> na temperaturi od 37 °C.

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

Za određivanje broja stanica nakon određenog vremena uzgoja kulture stanica prvo se ukloni hranjivi medij sa serumom te se doda 1 mL tripsina. Petrijeva zdjelica s dodanim tripsinom je vraćena u inkubator na 5 minuta za HeLa stanice, dok se za HaCaT stanice pokazalo da je potrebno oko 10 minuta inkubacije da bi se stanice uspješno odvojile od podloge za rast. Pod inverznim mikroskopom praćeno je djelovanje tripsina, odnosno jesu li se stanice zaokružile i odvojile od podloge.

Nakon što su se stanice odvojile od podloge, dodan je 1 mL svježeg hranjivog medija kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina. Potom je izuzet alikvot suspenzije tripsiniziranih stanica (20  $\mu$ L) i dodano je 20  $\mu$ L boje tripan-plavo te je 10  $\mu$ L nanešeno na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Stanice su potom brojane u sva četiri velika kvadrata te je broj stanica po mL suspenzije računat prema izrazu:

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \quad (1)$$

### 3.2.3. Tretman stanica ekstraktima naranče i određivanje preživljenja stanica MTS metodom

Za potrebe provođenja eksperimenta stanične kulture HeLa i HaCaT su u eksponencijalnoj fazi rasta tripsinizirane, izbrojane uz pomoć Neubauerove komorice i boju tripan-plavo te naciepljene na mikrotitarske pločice od 96 jažica. Početna koncentracija stanica u svakoj od jažica bila je  $3 \times 10^4$  st mL<sup>-1</sup> u volumenu od 100  $\mu$ L po jažici.

Prije tretmana stanica ekstrakti kore naranče su sterilizirani sterilnom filtracijom kroz filter od 0,22  $\mu$ m. Ekstrakti kore naranče su čuvani u zamrzivaču (-20 °C) te su neposredno prije svakog korištenja otopljeni. Nakon 24 sata od naciepljivanja, stanice su tretirane pripremljenim ekstraktima kore naranče u puferu te u eutektičkom otapalu (kolin-klorid:glicerol, ChClGly) s različitim udjelima vode, 30 % (v/v) i 80 % (v/v). Stanice su tretirane uzorcima u volumnim udjelima 1 % (v/v), 5 % (v/v) i 10 % (v/v) u 100  $\mu$ L suspenzije stanica po 6 paralela za svaku koncentraciju. Na ovaj način su postavljeni pokusi za određivanje učinka odabranih ekstrakata

kore naranče na rast i preživljenje HeLa i HaCaT stanica nakon vremena tretmana od 24, 48 i 72 sata pri 37 °C.

Nakon inkubacije određen je citotoksičan učinak ekstrakata uz pomoć CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation testa, odnosno MTS metodom. MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja uključuje korištenje reagensa koji sadrži MTS, tetrazolijevu sol, koja se djelovanjem dehidrogenaza ovisnih o NAD(P)H u metabolički aktivnim stanicama reducira u obojeni produkt formazan. Nakon provedenog tretmana, stanice su inkubirane s MTS reagensom u inkubatoru pri 37 °C tijekom 3 sata nakon čega se intenzitet obojenja mjerio spektrofotometrijski pri 492 nm korištenjem čitača ploča. Budući da formazan nastaje metabolizmom živih stanica, izmjerena apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u jažici. Preživljenje stanica nakon tretmana izražena je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih stanica i kontrole, odnosno netretiranih stanica, prema izrazu:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ uzorka}}{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ kontrole}} \times 100 \% \quad (2)$$

#### 3.2.4. Protočna citometrija i određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse<sup>™</sup> Annexin V & Dead Cell Kit-a

Protočna citometrija je metoda koja služi za brojanje i sortiranje stanica ovisno o njihovoj veličini i izgledu te omogućuje analizu velikog broja stanica u kratkom vremenu stoga predstavlja dobru i brzu kvantitativnu analizu uzoraka.

Pomoću Muse<sup>™</sup> Annexin V & Dead Cell Kit i Muse<sup>™</sup> analizatora provedena je kvantitativna analiza stanične smrti. Određen je broj živih stanica, stanica u ranoj i kasnoj apoptozi te mrtvih stanica u uzorcima tretiranih stanica. Muse<sup>™</sup> Annexin V & Dead Cell reagens sadrži protein aneksin V i 7-aminoaktinomicin (7-AAD). Aneksin V je protein ovisan o kalciju koji se specifično veže na fosfatidilserin (PS), molekulu koja se ispoljuje na površinu stanične membrane tijekom procesa apoptoze, a u zdravim stanicama se nalazi na unutarnjoj strani stanične membrane. 7-AAD je fluorescentni interkalator koji ima spektralni pomak nakon vezanja na DNK te služi kao indikator za strukturalni integritet stanične membrane i kao marker za mrtve stanice. Uglavnom se uspješno izlučuje iz živih stanica, ali se može koristiti

za obilježavanje stanica s narušenim integritetom stanične membrane ili stanica koje su prethodno permeabilizirane i fiksirane. Kompleks 7-AAD/DNK pobuđuje energija pri 488 nm dok mu je maksimum emisije pri 647 nm, što se može primijeniti pri analizi uzoraka fluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom.

Primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a moguće je razlikovati četiri populacije stanica:

- Žive i zdrave stanice: aneksin V (-) i 7-AAD (-)
- Stanice u ranoj apoptozi: aneksin V (+) i 7-AAD (-)
- Stanice u kasnoj apoptozi i mrtve stanice: aneksin V (+) i 7-AAD (+)
- Mrtve stanice i stanični ostaci: aneksin V (-) i 7-AAD (+)

Djelovanje ekstrakta kore naranče na poticanje stanične smrti u HeLa stanicama ispitano je nakon 48 sati tretmana. Pokus je postavljen kao što je opisano za ispitivanje preživljenja stanica, s tom razlikom da su stanice nacijepnjene na ploče s 6 jažica i to s 2 mL suspenzije stanica po jažici te su nakon 24 sata inkubacije tretirane s ekstraktima u volumnim udjelima od 1 % (v/v), 5 % (v/v) i 10 % (v/v). Za ekstrakte naranče pripravljene u puferu i ChClGly postavljene su po 2 paralele za svaki uzorak (30 % (v/v) i 80 % (v/v) vode), a za kontrolu po 3 paralele.

Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a provedeno je prema uputama proizvođača. Ukratko, iz jažica je sakupljen medij u kojem su stanice uzgajane u obilježene „Eppice“, te je sadržaj centrifugiran 5 minuta na 3000 rpm (eng. *revolutions per minute*) te je supernatant bačen. U jažice je dodano 300 µL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge, a po završetku tripsinizacije dodano je 700 µL medija. Stanice odvojene od podloge su pripojene istaloženim stanicama iz medija u „Eppicama“ te je prije centrifugiranja izuzet alikvot suspenzije stanica (20 µL) za određivanje broja stanica u uzorku budući da je prema protokolu za analizu potrebna koncentracija stanica  $1-5 \times 10^5$  st mL<sup>-1</sup> po uzorku. Stanice su potom ponovno centrifugirane na 3000 rpm, 5 minuta, supernatant je bačen, a talog stanica je resuspendiran u odgovarajućem volumenu DMEM-a s minimalno 1 % FBS-a. Iz tako pripremljene suspenzije stanica u kojoj je bilo  $1-5 \times 10^5$  st mL<sup>-1</sup> po uzorku, 100 µL suspenzije stanica stavljeno je u nove „Eppice“ u koje je potom dodano 100 µL Muse reagensa u zamračenoj prostoriji. Reakcijska smjesa je stavljena na inkubaciju 20 minuta na sobnoj temperaturi zaštićena od svjetla.

Prije analize uzoraka na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja parametri analize postavljeni su s pozitivnom i negativnom kontrolom te su uzorci analizirani nakon čišćenja uređaja i provjere sustava. Prije same analize svaki uzorak treba resuspendirati kako ne bi bilo nakupina stanica koje mogu začepiti cjevčice uređaja te kako bi uzorak bio homogen i imao pojedinačne stanice.

### 3.3. OBRADA REZULTATA

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3)$$

te su iskazani zajedno sa standardnom devijacijom ( $\pm$  S.D.):

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (4)$$

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Jedan od najviše korištenih agruma u prehrambenoj industriji u svijetu je naranča, koja se najčešće prerađuje u sokove nakon čega zaostaje velika količina kore kao otpada. Narančina kora nije jestiva, ali se smatra obnovljivim izvorom tvari s dodanom vrijednošću. Spojevi koji se mogu pronaći u kori naranče imaju potencijalnu primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji zbog niza pozitivnih učinaka te mogu biti formulirani kao dodaci prehrani odnosno kao nutraceutici, koristiti se uz već postojeće konvencionalne terapije ili mogu biti okosnica za razvoj novih lijekova. Kora naranče bogata je biološki aktivnim tvarima kao što su organske kiseline, pektini, flavonoidi i esencijalna ulja te D-limonen koji je prisutan u najvećoj koncentraciji.

Činjenica je da su karcinomi drugi uzrok smrtnosti u svijetu i da terapije koje se koriste često imaju vrlo bolne i neugodne nuspojave te nisu ponekad dovoljno učinkovite. Zbog toga su ispitivanja molekularne biologije tumora te razvoj novih antitumorskih lijekova česta tema istraživanja, pri čemu je velik interes za spojeve biljnog podrijetla među kojima se ističu različiti polifenolni spojevi i eterična ulja. Budući da otpad narančine kore predstavlja bogat izvor fitonutrijenata, ekstrakcijom je moguće izdvojiti željene komponente koje bi se mogle iskoristiti u farmaceutskoj industriji upravo s ciljem prevencije i/ili liječenja tumorskih oboljenja.

Posljednjih godina sve se više istražuje primjena zelene tehnologije u različitim područjima, pa tako i za ekstrakcije biološki aktivnih tvari iz biljnih izvora. Do sada korištene metode ekstrakcije i kemijske sinteze raznih biološki aktivnih spojeva često uključuju korištenje velike količine hlapivih i toksičnih organskih spojeva kao otapala, a korištenje zelenih otapala bi uvelike smanjilo onečišćenje uzrokovano tim organskim otapalima. U tom smislu su se eutektička otapala pokazala kao dobra alternativa klasičnim otapalima, posebice zbog boljeg iskorištenja procesa ekstrakcije te povećanja stabilnosti izoliranih bioloških aktivnih tvari.

S obzirom na to da je u literaturi pokazano da primjena eutektičkog otapala u formulaciji biološki aktivnih komponenta pojačava biološku aktivnost ekstrahiranih tvari prisutnih u biljnim ekstraktima (Radošević i sur., 2016), u ovom radu je istražen učinak ekstrakta kore naranče na dvije humane stanične linije. Ispitano i uspoređeno djelovanje ekstrakata kore naranče pripravljeno pomoću eutektičkog otapala s različitim udjelom vode naspram ekstrakata



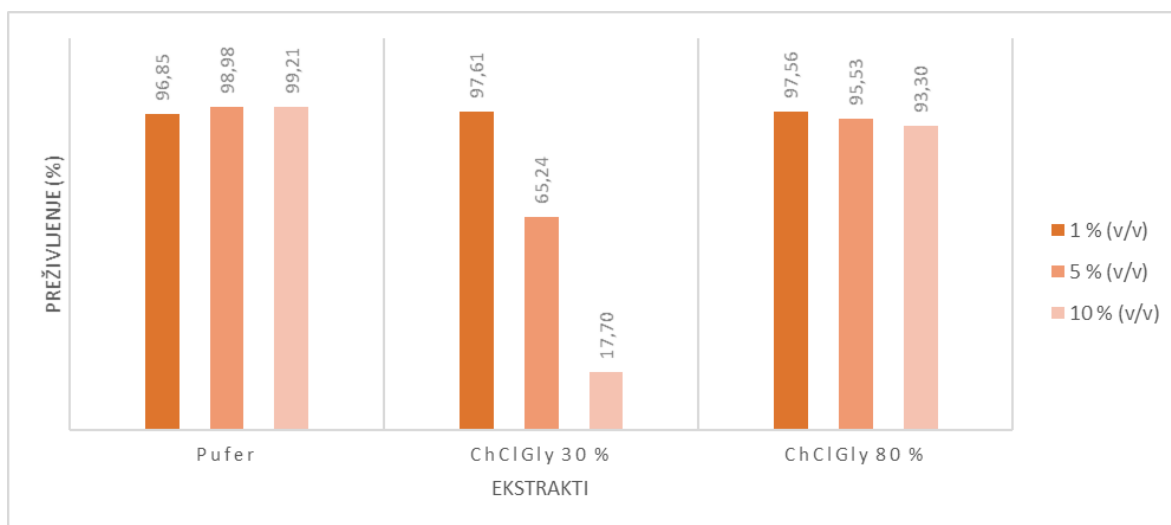
naranče pripravljenog referentnim otapalom kako bi se potvrdio značaj primjene eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz otpada kore naranče.

#### 4.1. *IN VITRO* ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI EKSTRAKATA KORE NARANČE

Za ispitivanje biološkog djelovanja ekstrakata kore naranče korištene su dvije humane stanične linije, HeLa i HaCaT, kako bi se usporedio učinak na tumorske i normalne stanice. S obzirom na sastav dobivenih ekstrakata, pretpostavlja se izraženija biološka aktivnost ekstrakata naranče pripravljenih u kolin-klorid:glicerolu (ChClGly) naspram onog dobivenog primjenom pufera. Citotoksičnost ekstrakata i preživljenje stanica određeno je MTS metodom, a tip stanične smrti određen je primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a.

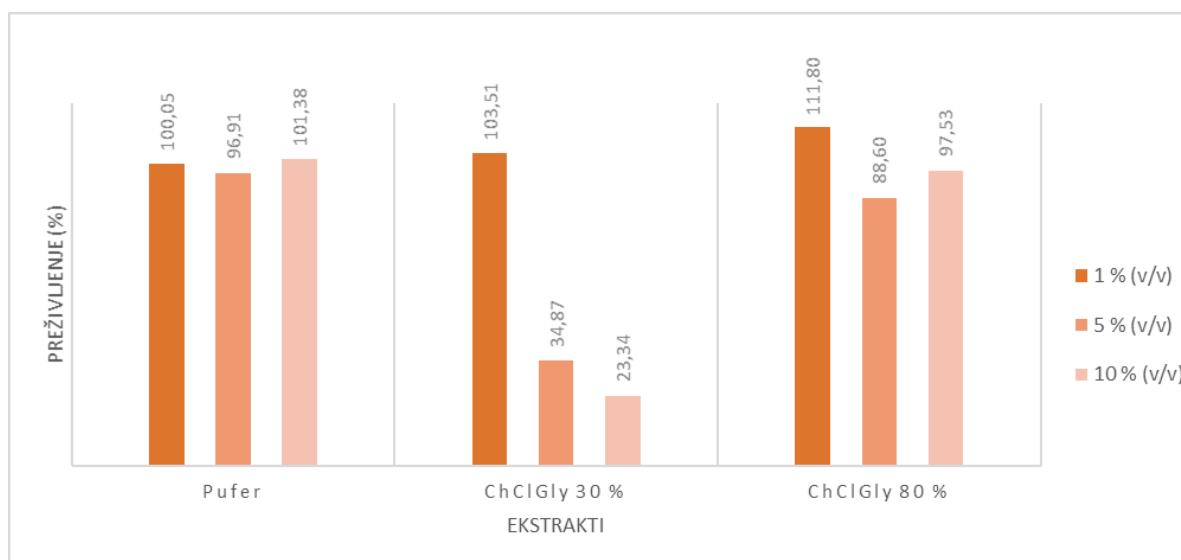
##### 4.1.1. Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata kore naranče na HeLa staničnoj liniji

Stanice HeLa uzgojene su u pločama s 96 jažica i tretirane s ekstraktima kore naranče pripravljenim u puferu, ChClGly s 30 % (v/v) vode i ChClGly s 80 % (v/v) vode dodanim u tri različita volumna udjela: 1 %, 5 % i 10 % (v/v). Vrijeme trajanja tretmana odabranim ekstraktima kore naranče iznosilo je 24, 48 i 72 sata nakon čega je određeno preživljenje stanica. Rezultati učinka na HeLa stanice prikazani su na slikama 8, 9 i 10.

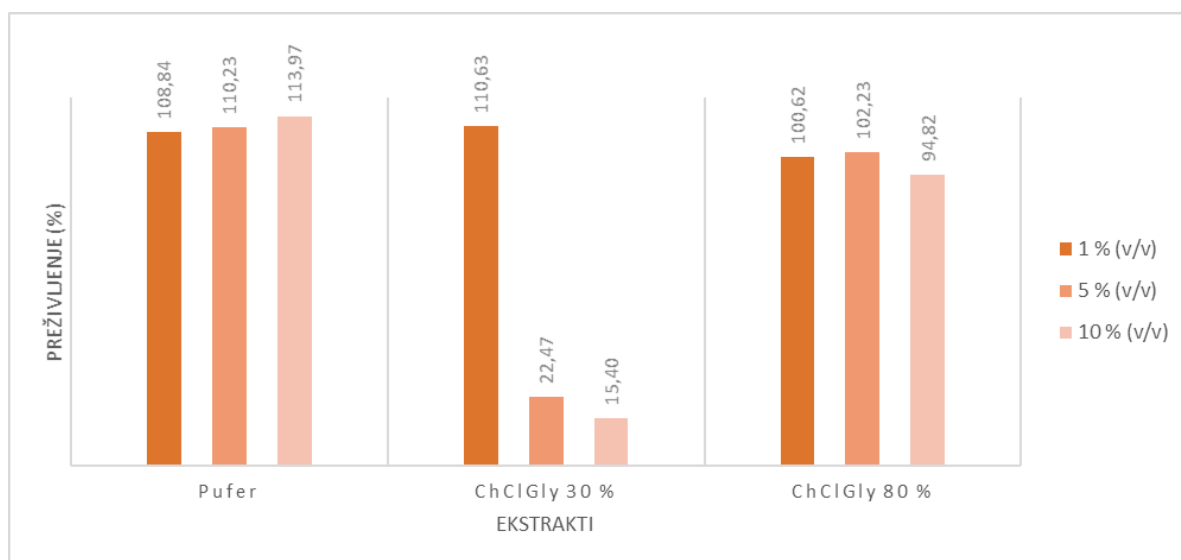


**Slika 8.** Preživljenje HeLa stanica nakon 24-satnog tretmana ekstraktima kore naranče.

Već se nakon 24 sata (slika 8) može primijetiti djelovanje ekstrakata kore naranče pripremljenih u ChClGly s 30 % (v/v) vode na preživljenje HeLa stanica, gdje je pri 5 % (v/v) uočen značajni pad preživljenja HeLa stanica, dok je pri tretmanu s 10 % (v/v) ChClGly 30 % postotak živih stanica niskih 17,70 %. Ekstrakti pripremljeni u puferu i ChClGly s 80 % (v/v) vode nemaju učinka na preživljenje HeLa stanica nakon 24 sata tretmana, jer je pri sva tri ispitana volumna udjela ekstrakata preživljenje iznad 90 %.



**Slika 9.** Preživljenje HeLa stanica nakon 48-satnog tretmana ekstraktima kore naranče.



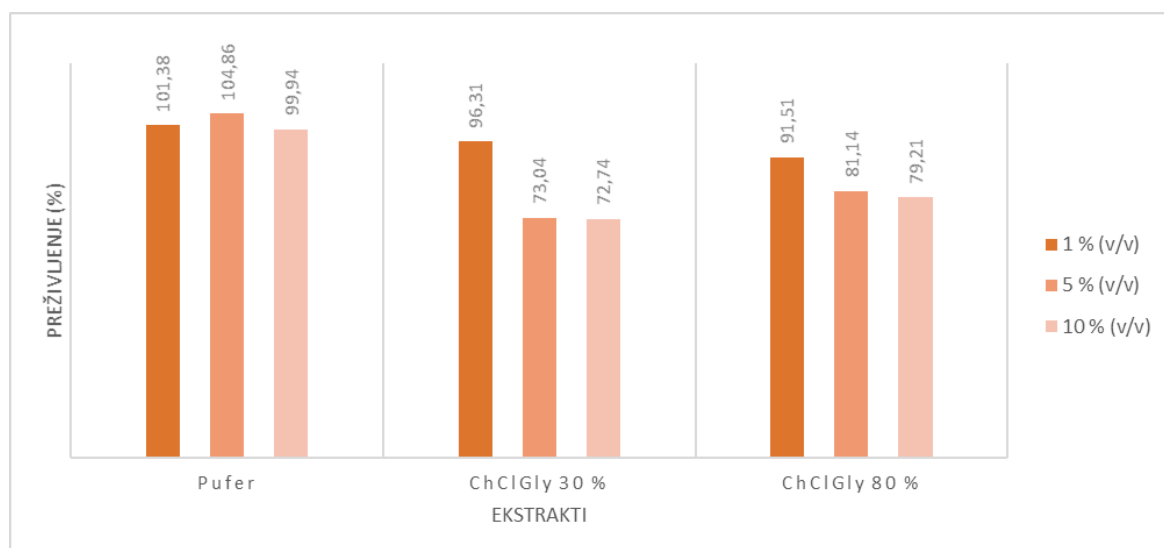
**Slika 10.** Preživljenje HeLa stanica nakon 72-satnog tretmana ekstraktima kore naranče.

Nakon 48 i 72 sata tretmana HeLa stanica s ispitivanim ekstraktima kore naranče (slike 9 i 10), citotoksičnost ekstrakata pripremljenih u puferu i ChClGly s 80 % (v/v) vode ne mijenja se značajno te nema negativnog učinka na preživljenje HeLa stanica, dok ekstrakt kore naranče

pripremljen u ChClGly s 30 % (v/v) vode pokazuje citotoksično djelovanje ovisno o vremenu trajanja tretmana, odnosno, učinak je izraženiji što je djelovanje duže. Također, može se reći da je djelovanje ekstrakta pripremljenog s ChClGly (30 % (v/v)) ovisno o dozi, to jest, što je dodani volumni udio ekstrakta veći to je postotak preživljenja HeLa stanica manji.

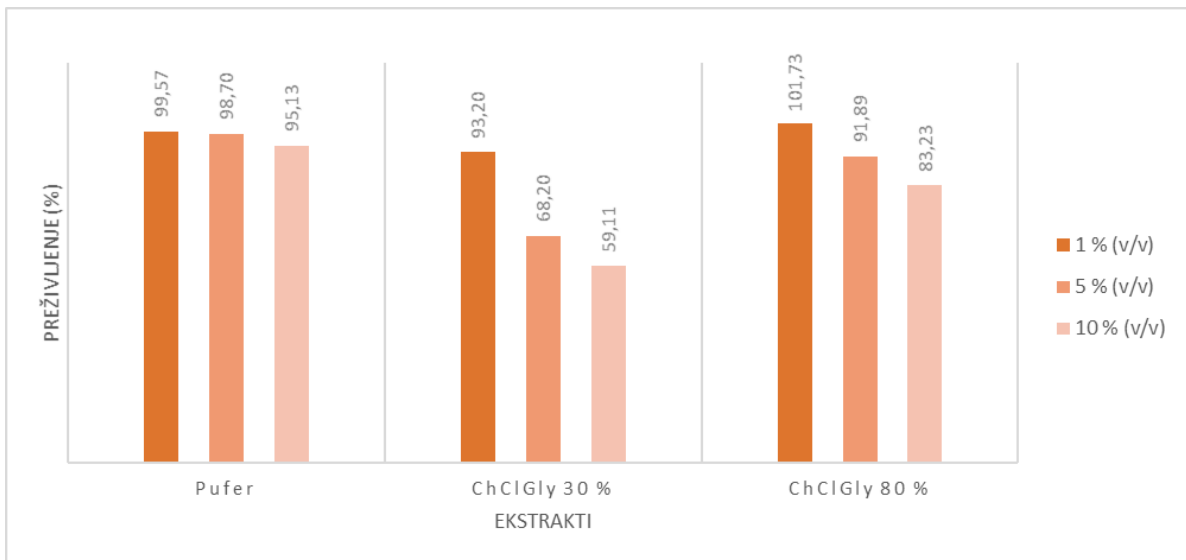
#### 4.1.2. Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata kore naranče na HaCaT staničnoj liniji

HaCaT stanice tretirane su ekstraktima naranče pripremljenih u puferu, ChClGly s 30 % (v/v) i 80 % (v/v) vode na isti način kao i HeLa stanice. Rezultati učinka prikazani su na slikama 11, 12 i 13.

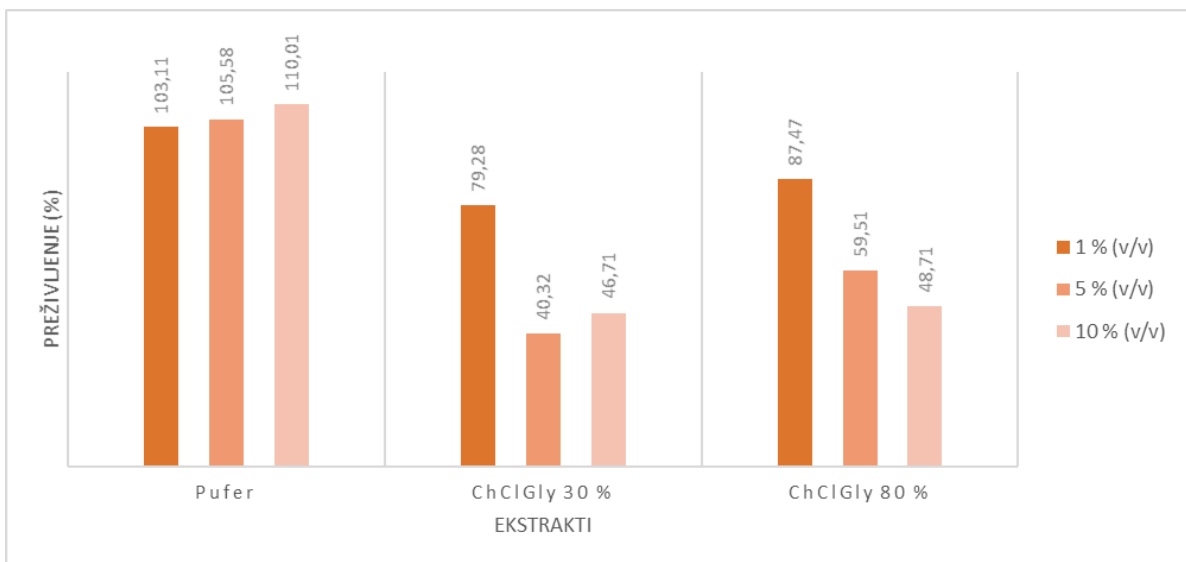


**Slika 11.** Preživljenje HaCaT stanica nakon 24-satnog tretmana ekstraktima kore naranče.

Nakon 24 sata tretmana HaCaT stanica s ekstraktima kore naranče (slika 11) vidljiv je blagi pad preživljenja stanica pri tretmanu stanica s ekstraktima pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) i 80 % (v/v) vode.



**Slika 12.** Preživljenje HaCaT stanica nakon 48-satnog tretmana ekstraktima kore naranče.



**Slika 13.** Preživljenje HaCaT stanica nakon 72-satnog tretmana ekstraktima kore naranče.

Nakon 48-satnog i 72-satnog tretmana HaCaT stanica može se primijetiti jači učinak ekstrakata kore naranče pripremljenih s ChClGly, i to pri dodatku 5 % i 10 % (v/v) jer je preživljenje stanica niže nego nakon 24 sata tretmana (slika 12 i 13).

U ovom su radu ispitani ekstrakti kore naranče otopljeni u puferu i ChClGly s različitim udjelima vode. Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz kore naranče korištenjem eutektičkih otapala bila je predmet diplomskog rada Ane Grubišić te su za ovaj rad odabrani ekstrakti pripremljeni u ChClGly s obzirom na uspješnost ekstrakcije biološki aktivnih spojeva (D-limonena, polifenola i proteina). Ekstrakti pripremljeni u ChClGly s 30 % (v/v) i 80 % (v/v) vode

ispitani su jer se pokazalo da udio vode utječe na učinkovitost ekstrakcije, a kao referentni uzorak ispitan je ekstrakt kore naranče pripremljen u puferu.

Nakon ispitivanja biološke aktivnosti, odnosno citotoksičnosti ekstrakata kore naranče pripremljenih u puferu i ChClGly može se primijetiti da najjače djelovanje na rast stanica ima ekstrakt pripremljen u ChClGly s 30 % (v/v) vode i to na HeLa stanice. Njegovo djelovanje je ovisno o dozi i o vremenu trajanja tretmana, odnosno najjače djelovanje vidljivo je pri 10 % (v/v) te je preživljenje stanica manje što tretman dulje traje.

Dobiveni rezultati u skladu su s već provedenim istraživanjima ekstrakata kore naranče i njihovog biološkog učinka (Diab i sur., 2015; Al-Ashaal i El-Sheltawy, 2011), odnosno da ekstrakti kore naranče pripremljeni uz pomoć konvencionalnih otapala imaju inhibitoran učinak na rast stanica, ali je njihov učinak slabiji u usporedbi s citotoksičnom aktivnošću ekstrakta kore naranče pripremljenog u ChClGly. U literaturi se antiproliferativna aktivnost ekstrakata kore naranče najviše pripisuje polifenolnim spojevima, koji se u ispitanim ekstraktima nalaze u koncentracijama od oko 50 mg g<sup>-1</sup> narančine kore te D-limonenu (od 2 do 3,7 mg g<sup>-1</sup> narančine kore; tablica 2). Također je moguće da se radi i o međudjelovanju pojedinih bioaktivnih komponenti u ekstraktu kore naranče budući da je citotoksično djelovanje ekstrakta na stanice često bolje od djelovanja pojedinih komponenti istog ekstrakta (Katiyar i sur., 2012). Potrebno je nadalje istraživati kako bi se dokazala i opravdala bolja biološka aktivnost ekstrakta kore naranče pripremljenih primjenom eutektičkih otapala u usporedbi s onim pripremljenim uz pomoć konvencionalnih otapala, s obzirom da u literaturi nema dostupnih istraživanja biološke aktivnosti ekstrakata kore naranče pripremljenih primjenom NADES-a, no na temelju rezultata dobivenih u ovom radu citotoksična aktivnost ekstrakta kore naranče pripremljena u ChClGly izraženija je nego pri djelovanju ekstrakta pripremljenog u etanolu na tumorske HL-60 stanice (Diab i sur., 2015).

#### 4.1.3. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse<sup>TM</sup> Annexin V & Dead Cell Kit-a

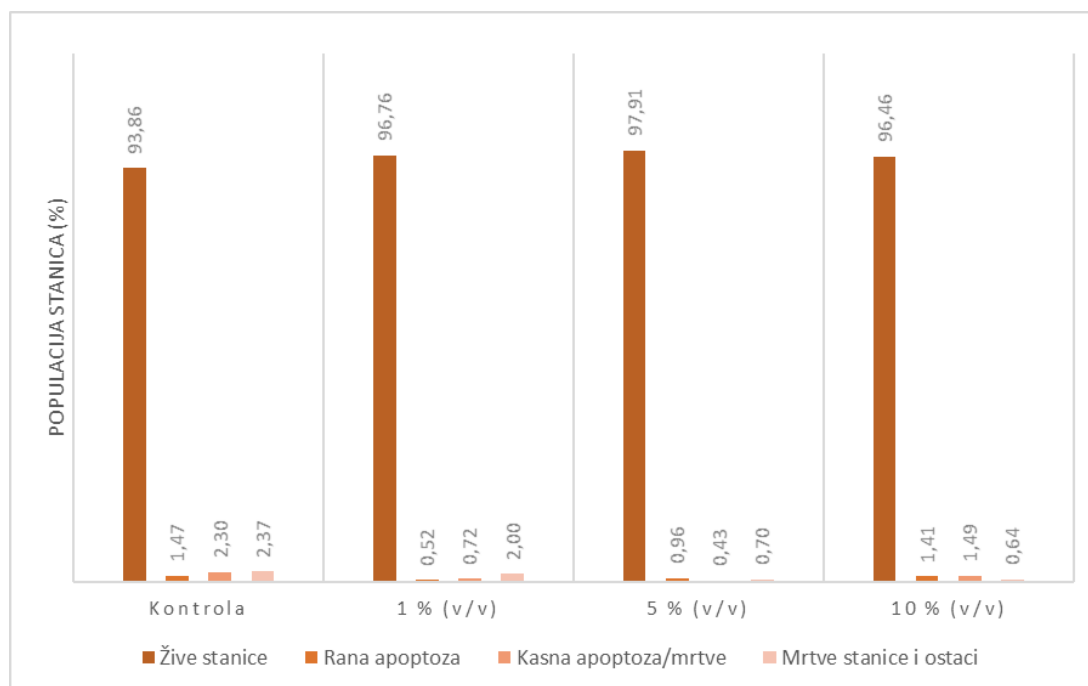
Budući da je ekstrakt kore naranče pripremljen u ChClGly pokazao inhibitorni učinak na rast stanica, provedena je analiza tipa stanične smrti kako bi se otkrilo utječe li ovako pripremljeni ekstrakt kore naranče na poticanje procesa stanične smrti.

Stanične linije HeLa i HaCaT uzgojene su u pločama s 6 jažica i tretirane ispitivanim ekstraktima te je nakon 48 sati provedena analiza stanične smrti na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja. Primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a mogu se razlikovati četiri populacije stanica: žive, rano apoptotične, kasno apoptotične i mrtve te mrtve stanice i stanični ostaci.

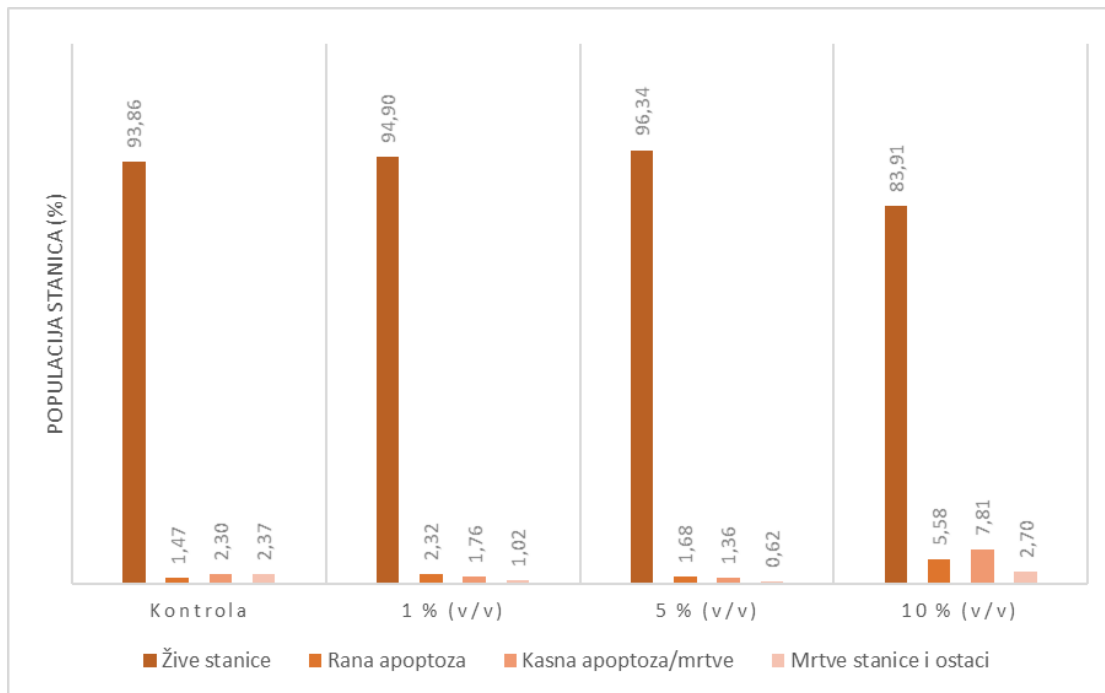
#### 4.1.3.1. Određivanje tipa stanične smrti u HeLa staničnoj liniji

Stanična linija HeLa inkubirana je 48 sati s ekstraktima naranče pripremljenim u puferu i eutektičkom otapalu ChClGly s 30 % (v/v) vode i 80 % (v/v) vode. Na slikama 14, 15 i 16 prikazani su rezultati analize provedene na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja.

Kao što je očekivano, s obzirom na rezultate preživljenja stanica, ekstrakti pripremljeni u puferu (slika 14) i ChClGly s 80 % (v/v) vode (slika 15) imali su najveći udio populacije živih stanica te zanemariv udio stanica u drugim populacijama stanica, koje je moguće razlikovati primjenom ovog kita za određivanje stanične smrti. Uzorci tretirani ekstraktom pripremljenim u puferu, i onim u ChClGly 80 % (v/v) ne razlikuju se značajno od kontrolnog uzorka HeLa stanica.

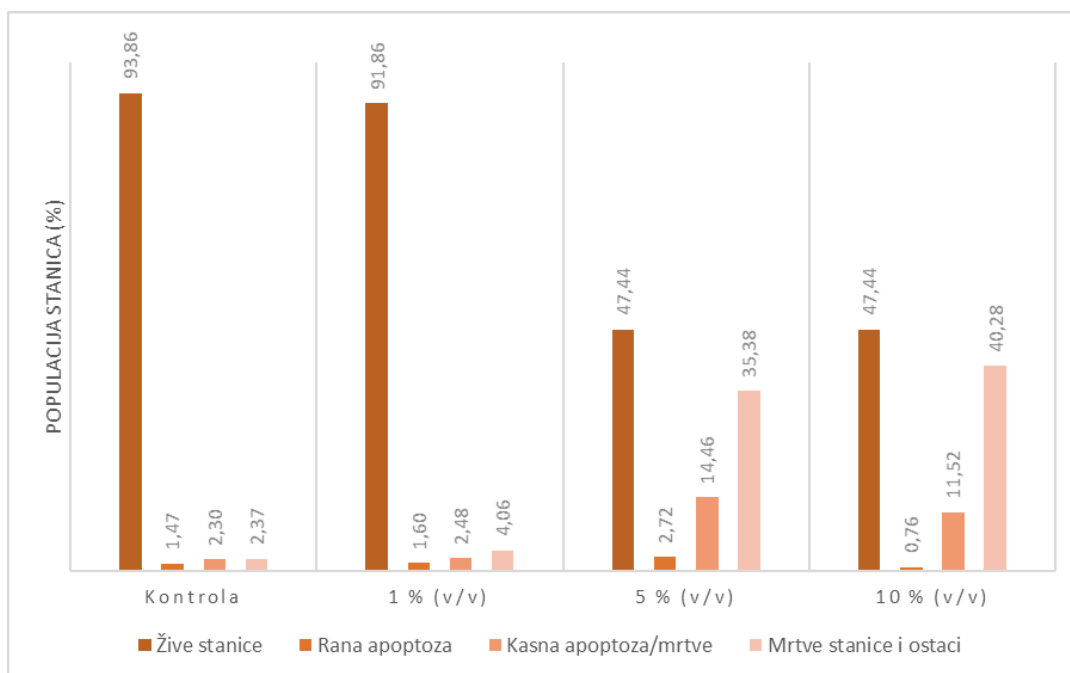


**Slika 14.** Određivanje tipa stanične smrti nakon tretmana HeLa stanica ekstraktom naranče (1 %, 5 % i 10 % (v/v)) pripremljenim u puferu nakon 48 sati tretmana.



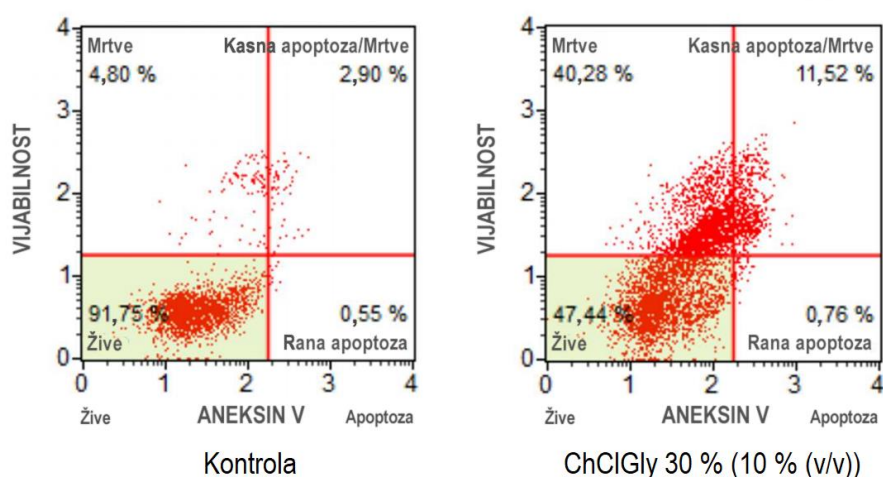
**Slika 15.** Određivanje tipa stanične smrti nakon tretmana HeLa stanica ekstraktom naranče (1 %, 5 % i 10 % (v/v)) pripremljenim u ChClGly s 80% (v/v) vode nakon 48 sati tretmana.

Razdioba HeLa stanica tretiranih ekstraktom kore naranče pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) vode nakon analize s Muse™ analizatorom prikazana je na slici 16. Vidljiv je porast udjela stanica u kasnoj apoptozi te osobito mrtvih stanica pri tretmanu s ispitivanim ekstraktom u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Smanjenje postotka živih stanica te porast udjela svih ostalih tipova stanica prilikom tretmana navedenim ekstraktom kore naranče ovisan je o dozi, odnosno dodanom volumnom udjelu ekstrakta.



**Slika 16.** Određivanje tipa stanične smrti nakon tretmana HeLa stanica ekstraktom naranče (1 %, 5 % i 10 % (v/v)) pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) vode nakon 48 sati tretmana.

Na slici 17 prikazani su reprezentativni histogrami analize stanične smrti HeLa stanica nakon tretmana ekstraktima kore naranče pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) vode pri najvećem volumnom udjelu (10 % (v/v)) u usporedbi s kontrolom budući da je pri toj dozi uočeno najjače inhibitorno djelovanje na rast stanica te je sukladno tome dobivena i najveća razlika u postotku populacije stanica spram kontrole.

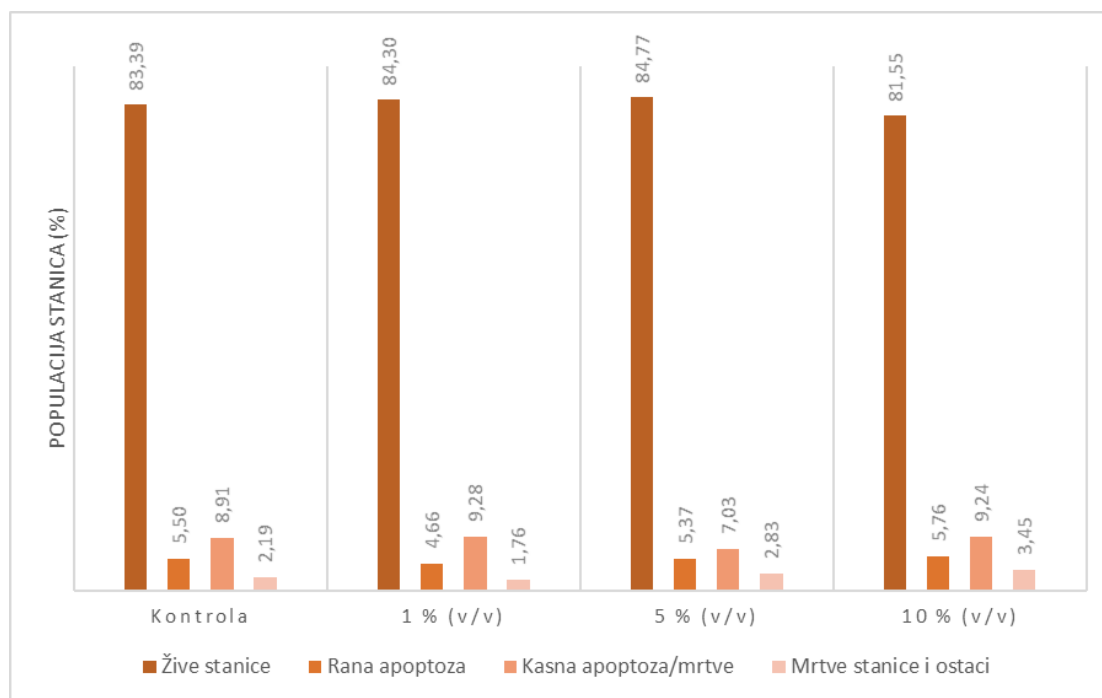


**Slika 17.** Histogram dobiven prilikom određivanja stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a nakon 48h djelovanja ekstrakta kore naranče pripremljenog u ChClGly s 30 % (v/v) vode (10 % (v/v)) na HeLa stanicama.

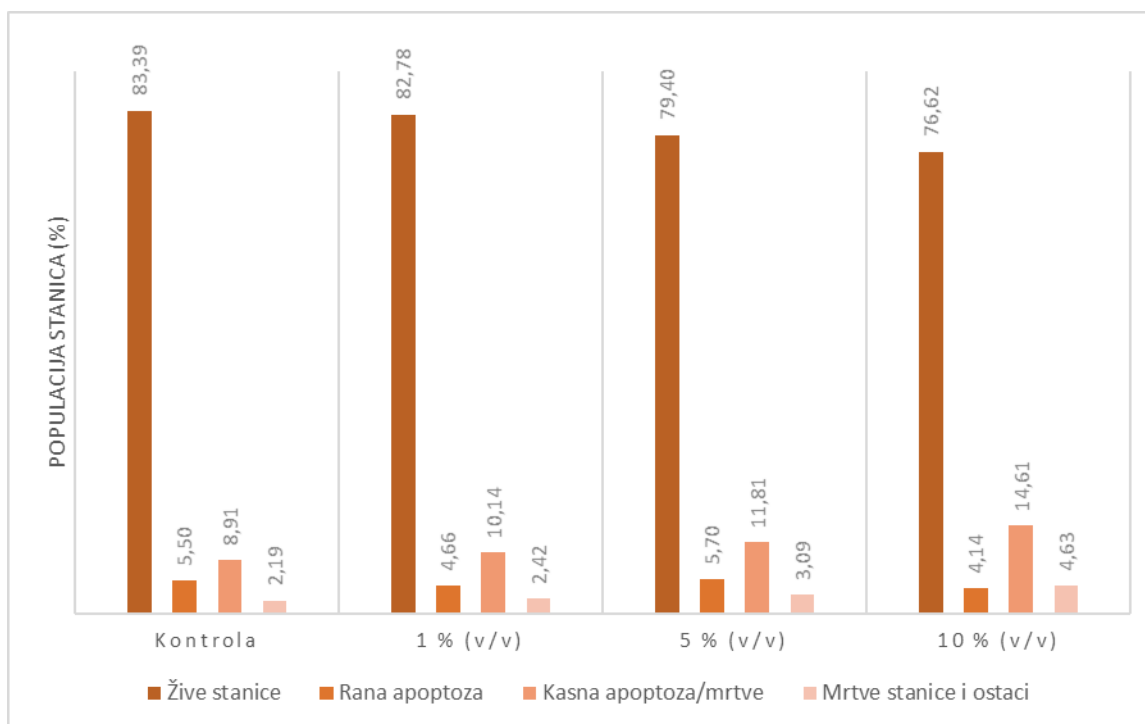


#### 4.1.3.2. Određivanje tipa stanične smrti HaCaT stanične linije

HaCaT stanična linija inkubirana je i tretirana na isti način kao i HeLa stanična linija te je analiza na Muse™ analizatoru staničnog zdravlja provedena 48 sati nakon tretmana uz primjenu Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a (slike 18, 19 i 20).

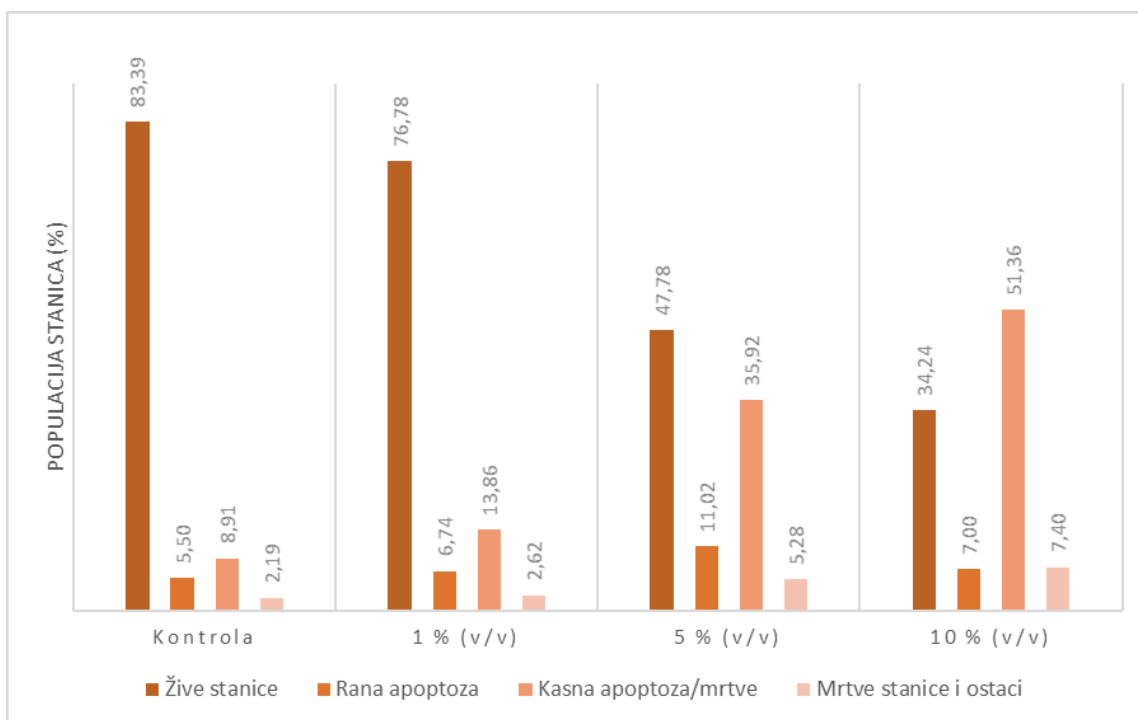


**Slika 18.** Određivanje tipa stanične smrti nakon tretmana HaCaT stanica ekstraktom naranče (1 %, 5 % i 10 % (v/v)) pripremljenim u puferu nakon 48 sati tretmana.



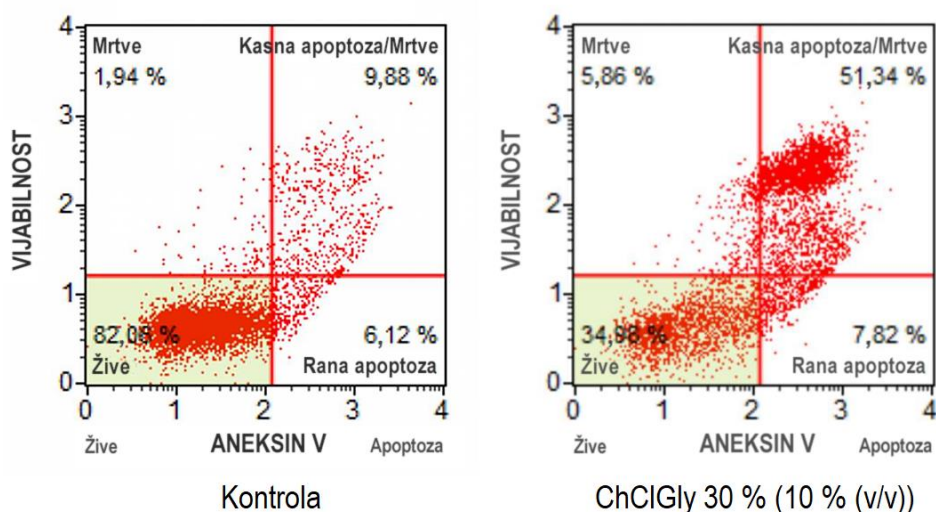
**Slika 19.** Određivanje tipa stanične smrti nakon tretmana HaCaT stanica ekstraktom naranče (1 %, 5 % i 10 % (v/v)) pripremljenim u ChClGly s 80 % (v/v) vode nakon 48 sati tretmana.

Za razliku od HeLa stanične linije, rezultati za HaCaT stanice ukazuju na jači učinak ekstrakta kore naranče pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) (slika 20) pri čemu se značajno smanjuje postotak živih, a raste udio kasno apoptotičnih stanica. U usporedbi s kontrolom porast mrtvih i kasno apoptotičkih stanica nakon tretmana ekstraktima kore naranče u puferu i ChClGly s 80 % (v/v) vode (slike 18 i 19) vrlo je malen i zanemariv.



**Slika 20.** Određivanje tipa stanične smrti nakon tretmana HaCaT stanica ekstraktom naranče (1 %, 5 % i 10 % (v/v)) pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) vode nakon 48 sati tretmana.

Na slici 21 prikazani su reprezentativni histogrami analize stanične smrti HaCaT stanica nakon tretmana ekstraktom kore naranče pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) vode pri najvećem volumnom udjelu (10 % (v/v)) u usporedbi s kontrolom.



**Slika 21.** Histogram dobiven prilikom određivanja stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a nakon 48h djelovanja ekstrakta kore naranče pripremljenog u ChClGly s 30 % (v/v) vode (10 % (v/v)) na HaCaT stanicama.

Proučavajući prikaz utjecaja ekstrakata kore naranče pripremljenih u ChClGly s 30 % (v/v) (slika 21) vode se može primijetiti da je veća populacija HaCaT stanica u kasnoj apoptozi nakon tretmana ekstraktom u usporedbi s HeLa stanicama koje imaju veću populaciju mrtvih stanica i staničnih ostataka u 4. kvadrantu što ukazuje na proces nekroze (slika 17).

Određivanjem tipa stanične smrti primjenom Muse<sup>TM</sup> Annexin V & Dead Cell Kit-a vidljivo je da su ti rezultati u skladu s rezultatima djelovanja ekstrakata na rast HeLa i HaCaT stanica, pri čemu je najizraženija razlika između kontrolnih i tretiranih stanica uočena pri tretmanu s ekstraktom kore naranče pripremljenim u ChClGly s 30 % (v/v) vode. Nadalje, usporedbom rezultata određivanja tipa stanične smrti u dva tipa stanica, vidljiva je razlika između tipa smrti kod HeLa i HaCaT stanica. Ovo je najvjerojatnije zbog toga što su HaCaT stanice otpornije od HeLa stanica, jer je MTS metodom pokazano citotoksično djelovanje ekstrakata kore naranče na HeLa stanicama već nakon 24 sata, a učinak ekstrakata na rast HaCaT stanica vidljivo je tek nakon 48 sati tretmana. Analiza je pokazala da je nakon 48 sati tretmana kod HeLa stanica značajan porast u populaciji mrtvih stanica i staničnih ostataka (40,28 % pri 10 % (v/v)), dok su kod HaCaT stanica to stanice u kasnoj apoptozi i mrtve stanice (51,36 % pri 10 % (v/v)), stoga se može zaključiti da je kod HeLa stanica došlo do indukcije stanične smrti procesom nekroze, a kod HaCaT stanica apoptoze. Velika populacija kasno apoptotičnih stanica u HaCaT kulturi nakon tretmana ispitanim ekstraktom ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima utjecaja ekstrakata kore naranče na stanični ciklus te ispitivanja faza staničnog ciklusa kako bi se moglo bolje zaključiti kako ekstrakti utječu na pojedini tip stanica.

Sergeev i suradnici (2007) proveli su izolaciju polimetoksiflavona iz kore naranče te pokazali da ti spojevi induciraju apoptozu u humanim stanicama karcinoma dojke (stanična kultura MCF-7). Kalcijevi ioni igraju bitnu ulogu kod indukcije apoptoze u ovim stanicama, a polimetoksiflavoni dovode do porasta koncentracije  $Ca^{2+}$  što uzrokuje aktivaciju određenih enzima i kaspaza koje potiču procese apoptoze i nekroze. Još jedan od faktora koji može utjecati na indukciju apoptoze u stanicama posredovan je nastankom ROS i oksidativnim stresom stanica (Chu i sur., 2017). Diab i suradnici (2015) u svojem su radu istraživali učinak ekstrakta kore naranče pripremljenog u etanolu na tumorske HL-60 stanice te na temelju „DNK-ljestve“ dokazali da je antiproliferativni učinak vjerojatno povezan s nekrozom. Ovakav antiproliferativni učinak ekstrakta kore naranče pripremljenog u ChClGly na stanice također je pokazan i u ovom radu, gdje se analizom stanične smrti HeLa stanica može vidjeti porast udjela mrtvih stanica i staničnih ostataka, što ukazuje na to da je došlo do nekroze.

Dobiveni rezultati prikazani u ovom radu vrijedni su kao potvrda potencijala primjene NADES-a za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz biljnih sirovina, konkretno kore naranče, budući da je malo takvih istraživanja, stoga je važno nastaviti u tom smjeru kako bi se potpunije odredio utjecaj NADES-a na biološku aktivnost ekstrakta kore naranče i indukciju stanične smrti.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Ispitani ekstrakt kore naranče pripremljen pomoću ChClGly s 30 % (v/v) vode pokazao je najizraženiju antiproliferativnu aktivnost kod HeLa i HaCaT stanica, ovisnu o dozi i vremenu trajanja tretmana. Ekstrakti pripremljeni u puferu i ChClGly s 80 % (v/v) vode imali su neznatan ili blag učinak na HeLa i HaCaT stanice.
2. Antiproliferativni učinak ekstrakta kore naranče pripremljenog u ChClGly s 30 % (v/v) vode bio je izraženiji na tumorskim HeLa stanicama nego na normalnim HaCaT stanicama, što može ukazivati na njegov antitumorski potencijal.
3. Kod HeLa stanica inhibitorni učinak ekstrakta kore naranče pripremljenog u ChClGly s 30 % (v/v) vode povezuje se s indukcijom nekroze, dok je kod HaCaT stanica najveći udio stanica u kasnoj apoptozi. Rezultati analize stanične smrti nakon tretmana oba tipa stanica ekstraktima pripremljenim u puferu i ChClGly s 80 % (v/v) vode nisu se značajno razlikovali od kontrole.
4. Otpad kore naranče dobar je supstrat za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva s mogućom primjenom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji pri čemu se za ekstrakte pripremljene s eutektskim otapalima pokazalo da imaju jaču biološku aktivnost u odnosu na one pripremljene konvencionalnim otapalom. Stoga primjena eutektskih otapala predstavlja ogroman potencijal za pripremu i primjenu različitih biljnih ekstrakata s povoljnim učincima na ljudsko zdravlje zbog učinkovitosti ekstrakcije, svojstava NADES-a kao otapala i očuvanja biološke aktivnosti ekstrakata.

## 6. LITERATURA

Al-Ashaal, H.A., El-Sheltawy, S.T. (2011) Antioxidant capacity of hesperidin from *Citrus* peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. *Pharm. Biol.* **49**, 276–282.

Aminov, R.I. (2010) A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbiol.* **1**, 1-7.

Anastas, P.T., Warner, J.C. (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*, 1. izd., Oxford University Press, Oxford.

Bicas, J.L., Neri-Numa, I.A., Ruiz, A.L.T.G., De Carvalho, J.E., Pastore, G.M. (2011) Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1610-1615.

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* **5**(1), 9–19.

Bubalo, M.C., Panić, M., Radošević, K., Redovniković, I.R. (2016) Metode priprave eutektičkih otapala. *Croatian journal of food technology, biotechnology and nutrition.* **11**, 164-168.

Burkitt, D.P., Walker, A.R.P., Painter, N.S. (1972) Effect of dietary fibre on stools and transit-times, and its role in the causation of disease. *Lancet.* **300**, 1408–1411.

Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G. (2012) Green Extraction of natural products: Concept and Principles. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8615–8627.

Cho, K.S., Lim, Y., Lee, K., Lee, J., Lee, J.H., Lee, I.-S. (2017) Terpenes from Forests and Human Health. *Toxicol. Res.* **33**, 97–106.

Chu, C.C., Chen, S.Y., Chyau, C.C., Duh, P.D. (2017) Antiproliferative effect of sweet orange peel and its bioactive compounds against human hepatoma cells, in vitro and in vivo. *J. Funct. Foods.* **33**, 363–375.

Diab, K.A., Shafik, R.E., Yasuda, S. (2015) In Vitro Antioxidant and antiproliferative activities of novel orange peel extract and its fractions on leukemia HL-60 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 7053–7060.

Dias, A.L.B., Sousa, W.C., Batista, H.R.F, Alves, C.C.F. (2019) Chemical composition and in vitro inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three *Citrus* species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Braz. J. Biol.* **80**, 460-464.

Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2015) Are emerging deep eutectic solvents (DES) relevant for lipase-catalyzed lipophilizations? *OCL – Oilseeds and fats, Crops and Lipids.* **22**, 1-6.

Eliasz, I., Raz, A. (2019) Pleiotropic Effects of Modified Citrus Pectin. *Nutrients.* **11**, 1-18.

- Eurostat (2020) EU production and trade in oranges, <<https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat-news/-/DDN-20200103-1>>. Pristupljeno 20. svibnja, 2020.
- Gamulin, S. Marušić, M., Kovač, Z. (2011) Patofiziologija, 7. izd., Medicinska naklada, Zagreb, str. 541-573.
- González, J. (2014) Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J. Cardiol.* **6**, 353-366.
- Grubišić, A. (2020) Valorizacija otpadne kore naranče primjenom prirodnih eutektičkih otapala. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Hahn, M.G., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1981) Host-Pathogen Interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* **68**, 1161–1169.
- Harats, D., Chevion, S., Nahir, M., Norman, Y., Sagee, O., Berry, E.M. (1998) Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E *in vivo*. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 240–245.
- Hiramitsu, M., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Inoue, T., Katagiri, T., Zang, L., Nishimura, Y., Nishimura, N., Tanaka, T. (2015) Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci. Rep.* **4**, 1-11.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., Rahu, N. (2016) Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–9.
- HZJZ (2020) Izvješće o smrtnosti prema listi odabranih uzroka smrti u 2018. HZJZ - Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, <<https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/izvjescje-o-smrtnosti-prema-listi-odabranih-uzroka-smrti-u-2018/>>. Pristupljeno 27. srpnja 2020.
- Jackson, T.S., Xu, A., Vita, J.A., Keaney, J.F. (1998) Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ. Res.* **83**, 916–922.
- Jaeger, R., Cuny, E. (2016) Terpenoids with special pharmacological significance: A Review. *Nat. Prod. Commun.* **11**, 1373-1390.
- Jeliński, T., Przybyłek, M., Cysewski, P. (2019) Natural deep eutectic solvents as agents for improving solubility, stability and delivery of curcumin. *Pharm. Res.* **36**, 1-10.
- Katiyar, C., Kanjilal, S., Gupta, A., Katiyar, S. (2012) Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*. **33**, 10-18.



- Kohzaki, K., Gomi, K., Yamasaki-Kokudo, Y., Ozawa, R., Takabayashi, J., Akimitsu, K. (2009) Characterization of a sabinene synthase gene from rough lemon (*Citrus jambhiri*). *J. Plant Physiol.* **166**, 1700–1704.
- Li, S., Pan, M.H., Lo, C.Y., Tan, D., Wang, Y., Shahidi, F., Ho, C.T. (2009) Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *J. Funct. Foods.* **1**, 2–12.
- Liu, Y., Friesen, J.B., McAlpine, J.B., Lankin, D.C., Chen, S.-N., Pauli, G.F. (2018) Natural Deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *J. Nat. Prod.* **81**, 679–690.
- Lorenzetti, B.B., Souza, G.E.P., Sarti, S.J., Santos Filho, D., Ferreira, S.H. (1991) Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *J. Ethnopharmacol.* **34**, 43–48.
- Mbous, Y.P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W.F., Hashim, M.A., Looi, C.Y. (2017) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.* **35**, 105–134.
- Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (2014) Izmijenjena Specifikacija proizvoda „Neretvanska mandarina“ .  
<[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/92/Izmijenjena\\_Specifikacija\\_proizvoda.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/92/Izmijenjena_Specifikacija_proizvoda.pdf)>. Pristupljeno 20. svibnja 2020.
- Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., Weil, A.P. (2011) Harperova ilustrirana biokemija, 28. izd. (preveli Burger N. i sur.) Medicinska naklada, Zagreb, str. 479-480.
- Ozturk, B., Parkinson, C., Gonzalez-Miquel, M. (2018) Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Sep. Purif. Technol.* **206**, 1-13.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Matins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. Natural deep eutectic solvents – Solvents for the 21<sup>st</sup> century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Pedro, S.N., Freire, M.G., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D. (2019) Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **16**, 497–506.
- Pehlivan E. F. (2017) Vitamin C: An antioxidant agent, IntechOpen, str. 23–35.
- Pereira, C.V., Silva, J.M., Rodrigues, L., Reis, R.L., Paiva, A., Duarte, A.R.C., Matias, A. (2019) Unveil the anticancer potential of limonene based therapeutic deep eutectic Solvents. *Sci. Rep.* **9**. doi:10.1038/s41598-019-51472-7
- Prado, S.B.R., Beukema, M., Jermendi, E., Schols, H.A., de Vos, P., Fabi, J.P. (2020) Pectin interaction with immune receptors is modulated by ripening process in Papayas. *Sci. Rep.* **10**. doi:10.1038/s41598-020-58311-0

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F.J., Cravotto G., Binello, A., Lorenzo, J.M., Shpigleman, A. (2017) Innovative „Green“ and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes – A Review. *Molecules* **22**, 1-24.

Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. **11**, 167–175.

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

Sahasrabudhe, N.M., Beukema, M., Tian, L., Troost, B., Scholte, J., Bruininx, E., Bruggeman, G., van den Berg, M., Scheurink, A., Schols, H.A., Faas, M.M., de Vos, P. (2018) Dietary fiber pectin directly blocks toll-like receptor 2–1 and prevents doxorubicin-induced ileitis. *Front. Immunol.* **9**, 1-19.

Sakai, A., Kawakami, K., Takatori, K., Saito, Y. (2004) Foods with Complaints of Fungal Contamination and Physical Problems Caused by Their Ingestion. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **45**, 201–206.

Saleem, M., Saeed, M.T. (2020) Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *J. King Saud Univ. Sci.* **32**, 805–810.

Salzano, S., Checconi, P., Hanschmann, E.M., Lillig, C.H., Bowler, L.D., Chan, P., Vaudry, D., Mengozzi, M., Coppo, L., Sacre, S., Atkuri, K.R., Sahaf, B., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., Mullen, L., Ghezzi, P. (2014) Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12157–12162.

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. Technol.* **12**, 401–413.

Sergeev, I.N., Ho, C.-T., Li, S., Colby, J., Dushenkov, S. (2007) Apoptosis-inducing activity of hydroxylated polymethoxyflavones and polymethoxyflavones from orange peel in human breast cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1478-1484.

Shafique, B., Mahmood, S., Saeed, W., Qamrosh Alam, M. (2019) Anti-Carcinogenic Possessions of Citrus Peel Extracts and Flavonoids: A Review. *Acta Scientifci Nutritional Health*. **3**, 122–132.

Sharma, K., Mahato, N., Lee, Y.R. (2018) Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*. **35**, 265–284.

Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Kumar Mishra, P., Dubey, N.K. (2010) Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1734-1740.

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

Sunol, A.K., Sunol, S.G., Cogswell, K. (2019) Substitution of solvents by safer products, 3. izd., ChemTec Publishing, str. 1455–1634.

Tanaka, T. (1997) Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*. **18**, 957–965.

Torres-Alvarez, C., Núñez González, A., Rodríguez, J., Castillo, S., Leos-Rivas, C., Báez-González, J.G. (2016) Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. *CyTA J. Food*. **15**, 129-135.

Tung, Y.C., Chou, Y.C., Hung, W.L., Cheng, A.C., Yu, R.C., Ho, C.T., Pan, M.H. (2019) Polymethoxyflavones: Chemistry and Molecular Mechanisms for Cancer Prevention and Treatment. *Curr. Pharmacol. Rep.* **5**, 98–113.

Voragen, A.G.J., Coenen, G.J., Verhoef, R.P., Schols, H.A. (2009) Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* **20**, 263–275.

Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., Zhou, Z. (2016) Antioxidant activity of *Citrus* fruits. *Food Chem.* **196**, 885-896.

WHO (2018) Mycotoxins. WHO - World Health Organization. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>>. Pristupljeno 27. svibnja 2020.

Wikene, K.O., Rukke, H.V., Bruzell, E., Tønnesen, H.H. (2017) Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **171**, 27–33.

Xiao, S., Liu, W., Bi, J., Liu, S., Zhao, H., Gong, N., Xing, D., Gao, H., Gong, M. (2018) Anti-inflammatory effect of hesperidin enhances chondrogenesis of human mesenchymal stem cells for cartilage tissue repair. *J. Inflamm.* **15**, 1-8.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vedrana Glavan

Vedrana Glavan