

Antioksidacijski potencijal bioaktivnih tvari iz ljuski oraha i kakaovog zrna

Glavina, Duje

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:391482>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam**

Duje Glavina
0058215612

**ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL BIOAKTIVNIH
TVARI IZ LJUSKI ORAHA I KAKAOVOG ZRNA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina, HRZZ (br. 9717), voditelj: prof.dr.sc. Božidar Šantek

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Antioksidacijski potencijal bioaktivnih tvari iz ljuski oraha i kakaovog zrna Duje Glavina, 0058215612

Sažetak: U posljednje vrijeme sve se više iskorištava potencijal otpadnih nusproizvoda iz prehrambene industrije. Primjeri nusproizvoda koji će se spominjati u ovom radu su ljuske oraha i kakaovog zrna. Cilj ovog rada je utvrditi mogu li ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna, odnosno fitokemikalije koje se nalaze u njima, utjecati na preživljenje i koncentraciju slobodnih radikala humane stanične linije pločastog epitela karcinoma jezika Cal27. Također će se ispitati učinak navedenih ekstrakata na modelnim makromolekulama (plazmid phiX174 RF DNA, protein albumin iz goveđeg seruma i linoleinska kiselina). Rezultati su pokazali da dnevne preporučene koncentracije ispitivanih ekstrakata nemaju značajan utjecaj na preživljenje stanične linije Cal27, kao i na karbonilaciju proteina. Ekstrakt ljuske kakaovog zrna s polisaharidima pokazuje prooksidacijski učinak, dok ekstrakt ljuske oraha s polisaharidima pokazuje antioksidacijsko djelovanje na Cal27 stanice. Svi uzorci tretirani navedenim ekstraktima sprječavaju prooksidativni učinak na genetički materijal, a skoro svi uzorci pri višim koncentracijama smanjuju postotak peroksidacije linoleinske kiseline pa se može reći da imaju antioksidacijsko djelovanje na te modelne makromolekule.

Ključne riječi: ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna, antioksidacijski potencijal, citotoksičnost, nusproizvodi prehrambene industrije

Rad sadrži: 35 stranica, 10 slika, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Pomoć pri izradi: Ana Huđek-Turković, mag.ing.biotechn.

Datum obrane: 11. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Genetics of Microorganisms

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Antioxidant potential of bioactive substances from walnut shell and cocoa bean shell

Duje Glavina, 0058215612

Abstract: Recently, the potential of food industry by-products is recognized as a valuable source for other industries. In this paper, water extract of walnut shell and cocoa bean shell will be investigated. The aim of this study is to determine whether extracts of walnut shell and cocoa bean shell, or the phytochemicals found in them, can affect the survival rate and the concentration of reactive oxygen species in the human squamous epithelial tongue carcinoma cell line Cal27. Additionally, the effect of the extracts on cellular macromolecules (plasmid phiX174, protein albumin from bovine serum and linoleic acid) will be tested. The results showed that the daily recommended concentrations of the examined extracts have no significant effect on the survival of the Cal27 cell line, as well as on protein carbonylation. Cocoa bean shell extract with polysaccharides shows a prooxidative effect, while walnut shell extract with polysaccharides shows an antioxidant effect on Cal27 cells. All samples treated with the mentioned extracts prevent the prooxidative effect on the genetic material and almost all samples at higher concentrations reduce the percentage of linoleic acid peroxidation, so it can be said that they have an antioxidant effect on these macromolecules.

Keywords: walnut shell and cocoa bean extracts, antioxidant potential, cytotoxicity, food industry by-products

Thesis contains: 35 pages, 10 figures, 35 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ksenija Durgo, Full professor

Technical support and assistance: MSc Ana Huđek-Turković, Assistant

Thesis defended: July 11th, 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. NUSPROIZVODI PREHRAMBENE INDUSTRIJE	2
2.1.1. PROIZVODNJA BIOGORIVA	2
2.1.2. EKSTRAKCIJA BILOŠKI AKTIVNIH TVARI IZ NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE	3
2.2. LJUSKA ORAHA.....	4
2.3. LJUSKA KAKAOVOG ZRNA	5
2.4. POLISAHARIDI.....	6
2.5. FITOKEMIKALIJE	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.2. METODE	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČCI.....	30
6. POPIS LITERATURE	31

1. UVOD

Proizvodnja i prerada hrane u mnogim ekonomski razvijenim zemljama stvaraju visoke razine otpadnih nusproizvoda, uzrokujući time negativan utjecaj na okoliš i značajne troškove zbrinjavanja otpada. Pravilna upotreba otpadnih nusproizvoda kao sirovina ili aditiva za hranu mogla bi proizvesti ekonomske dobitke za industriju, pridonijeti smanjenju broja gladnih ljudi, proizvela bi korisne učinke na zdravlje i smanjila bi ekološke posljedice koje nastaju lošim upravljanjem otpadom (Torres-León i sur., 2018).

Kora, ljuska, sjemenke, koštice i drugi dijelovi voća koji nakon prerade završe u otpadu mogli bi se značajno iskoristiti kao izvori mnogih biološki aktivnih komponenti te tako pretvoriti otpadne nusproizvode u vrijedne proizvode (Galali i sur., 2020). Nusproizvodi su najčešće bogatiji fitokemikalijama, antioksidativnim i antimikrobnim spojevima od samih proizvoda od kojih su nastali (Ayala-Zavala i sur., 2010), stoga je u posljednje vrijeme moderna tehnologija usmjerena u iskorištavanje ovih nusproizvoda u proizvodnji novih korisnih proizvoda sa značajnim fizikalno-kemijskim svojstvima kao aditivi i suplementi hrani, budući da posjeduju mnoge prednosti koje uključuju antivirusna, antibakterijska, kardioprotektivna i antimutagena svojstva (Djilas i sur., 2009). Navedena svojstva će krajnji proizvod učiniti funkcionalnom hranom, no prije stavljanja na tržište potrebno je dokazati da su ti spojevi sigurni za upotrebu i konzumaciju te da dnevne doze nisu toksične.

Cilj ovog rada je ispitati citotoksični, antioksidacijski, prooksidacijski i protektivni učinak ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna sa i bez polisaharida pri koncentracijama za koje je realno očekivati da budu unesene u organizam u 24 sata. Biološki učinak bit će određen djelovanjem na genetički materijal, određivanjem karbonilacije proteina te određivanjem lipidne peroksidacije. Kao test sustavi će biti korišteni modeli staničnih makromolekula (plazmid phiX174 RF DNA, protein albumin iz goveđeg seruma i linoleinska kiselina kao model lipida) te kontinuirana humana stanična linija karcinoma epitela usne šupljine Cal27. Za očekivati je da će biološki aktivni spojevi iz ljuski djelovati citotoksično na staničnu liniju Cal27 te da će pokazati antioksidacijski i protektivni učinak na modelnim makromolekulama. Očekuje se da će prisustvo polisaharida utjecati pozitivno na antioksidacijsku aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NUSPROIZVODI PREHRAMBENE INDUSTRIJE

Prehrambena industrija jedna je od najvećih industrija na svijetu i izrazito doprinosi mnogim nacionalnim ekonomijama. Naglo povećanje populacije zahtijeva veće potrebe za hranom što znači i više otpada. Otprilike 1/3 proizvedene hrane za ljudsku potrošnju svake godine završi u otpadu. Taj otpad se uglavnom sastoji od organskih ostataka prerađenih sirovina.

U prehrambenoj industriji se često koristi izraz nusproizvod, a predstavlja proizvod koji nastaje tijekom obrade sirovina koji se ne smatra korisnim resursom od strane njegovog proizvođača (Chandrasekaran, 2012). Uzimajući u obzir broj gladnih ljudi te ograničene prirodne resurse, jasno je da će uskoro načini upravljanja otpadom postati jedni od najvažnijih izazova 21. stoljeća. Glavne strategije za smanjenje i iskorištavanje otpadnih nusproizvoda uključuju spaljivanje, anaerobnu fermentaciju, kompostiranje, odlaganje ili korištenje za poljoprivredne svrhe, kao hrana za životinje ili gnojivo.

Tradicionalno, iskorištavanje nusproizvoda prehrambene industrije kao stočne hrane jedna je od uobičajenih praksi. Posljednjih godina sve veći interes se pokazuje prema novim metodama upravljanja otpadom koje se fokusiraju na ponovno korištenje vrijednih sastojaka iz otpadnih nusproizvoda, a također se otpadni materijal sve više koristi kao biogorivo za dobivanje toplinske ili električne energije. Kompostiranje i vermikompostiranje je koristan način za pretvaranje otpadnih nusproizvoda u gnojivo. Međutim, najveći potencijal otpadnih nusproizvoda iz prehrambene industrije leži u ekstrakciji biološki aktivnih tvari (Otles i sur., 2015).

2.1.1. PROIZVODNJA BIOGORIVA

Porast globalne potrošnje energije, zajedno s nestankom rezerve fosilnih goriva, istaknulo je važnost razvoja tehnologija za iskorištavanje novih i obnovljivih izvora energije. Osim održivosti, klimatske promjene su još jedan značajni problem koji je potaknuo potragu za čistim, ugljično neutralnim gorivima.

Biogoriva su obnovljivi izvori energije, uglavnom za prometni sektor, koji se proizvode od

bioloških izvora, biomasa (Hodúr i sur., 2012). Biorazgradivost, ekološka prihvatljivost i održivost važne su značajke koje su učinile biomasu primarnim kandidatom za proizvodnju bioenergije. Izvor biomase može biti drvo, drvenasti usjevi, drvni i poljoprivredni otpad, zeljaste vrste, bagasa, industrijski ostatci, otpadni papir, čvrsti komunalni otpad, piljevina, otpad od prerade hrane, trava, alge, životinjski otpad, vodeno bilje itd. (Shah i sur., 2018). Biogoriva se mogu koristiti kao aditivi za gorivo ili u svom čistom obliku, a obično se klasificiraju u bioetanol i biodizel (Mahapatra i sur., 2021). Tehnologije koje se sve više koriste za proizvodnju biogoriva iz otpadnih nusproizvoda hrane su anaerobna digestija, aerobna digestija i proces mikrobne fermentacije (Nayak i Bhushan, 2019).

2.1.2. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH TVARI IZ NUSPROIZVODA PREHRAMBENE INDUSTRIJE

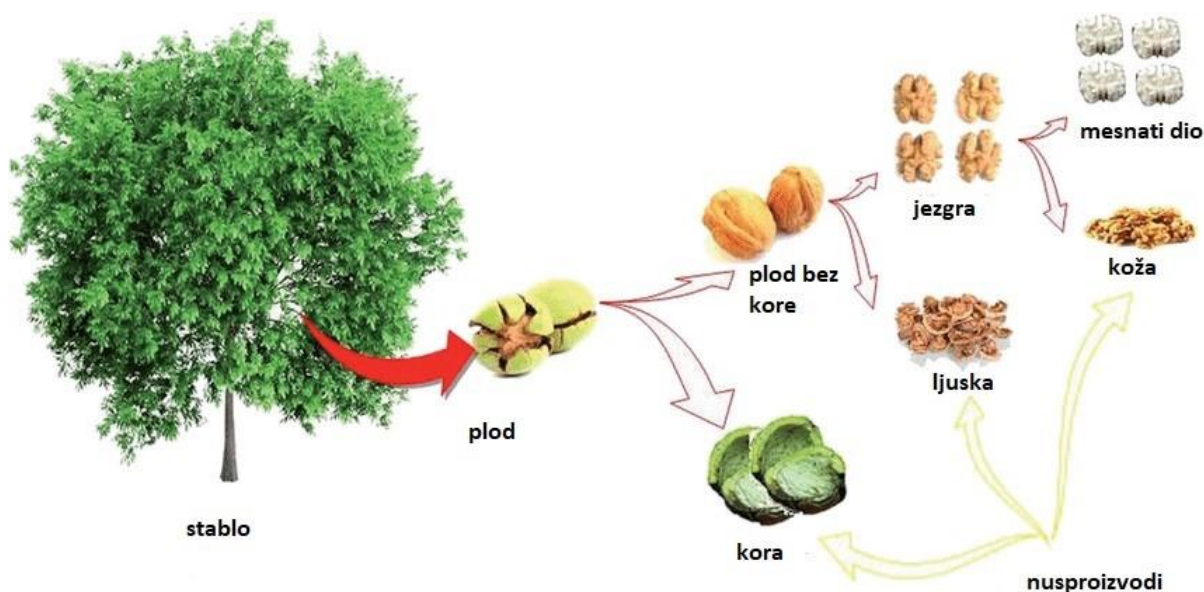
Otpad koji nastaje preradom raznih biljnih proizvoda bogat je šećerima, pektinom, proteinima, lipidima, polisaharidima, vlaknima i fitokemikalijama. Potencijal leži u ekstrakciji takvih spojeva koji bi onda imali veliku vrijednost kao aditivi, nutraceutici, terapeutici, kozmetika i sl. Novi proizvodi nastali od otpadnih nusproizvoda prehrambene industrije pomogli su povećati dostupnost hrane i produljiti rok trajanja. Također se smanjuje korištenje primarne sirovine. Može se zaključiti da ovaj pristup vodi ka učinkovitijem korištenju prirodnih resursa i minimiziranju količine nusproizvoda koji završavaju u odlagalištima.

Za obnovu biološki aktivnih spojeva iz otpadnih nusproizvoda mogu se koristiti razne tehnike koje uključuju prethodnu obradu, odvajanje makro i mikromolekula, ekstrakciju i pročišćavanje. Predobrada otpada od hrane glavni je i početni korak koji se radi kako bi se izvršile prilagodbe s obzirom na sadržaj vode, enzimatsku aktivnost i propusnost tkiva za ekstrakcijsko otapalo. Postoje razne tehnike ekstrakcije koje se koriste, a ekstrakcija otapalima je tradicionalna i najčešće korištena metoda koja uključuje upotrebu otapala poput metanola, etanola, acetona ili njihove vodene faze. Nedostatak ove tehnike je produljeno vrijeme ekstrakcije i korištenje skupih, toksičnih organskih otapala koja zahtijevaju naknadno uklanjanje iz ekstrakata. Katkada se ova metoda kombinira s primjenom pritiska kako bi se ubrzala ekstrakcija, a enzimi poput celulaze, pektinaze i α -amilaze se mogu koristiti prije ekstrakcije zbog razbijanja staničnih stijenki i hidrolize strukturnih polisaharida čime se osigurava veća dostupnost otapala. Moderne metode koje se sve više počinju koristiti uključuju

upotrebu superkritičnih tekućina poput CO₂ kao ekstrakcijskog otapala, korištenje ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE), ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i pulsirajućeg električnog polja (PEF) (Nayak i Bhushan, 2019).

2.2. LJUSKA ORAHA

Stablo oraha (*Juglans regia*) pripada porodici Juglandaceae (slika 1). To je najrasprostranjenije stablo s orašastim plodovima, a uzgaja se diljem svijeta zbog svoje vrijedne jezgre. Nedavno su se neka istraživanja usredotočila na antikancerogene učinke juglona (5-hidroksi-1,4-naftokinon). To je fenolni spoj alelopatskog djelovanja, koji pripada klasi naftokinona, a sintetizira se u različitim dijelovima ploda, kore, lišća i korijena oraha (Jahanban-Esfahlan i Amarowicz, 2018). Uočeno je da redovita konzumacija oraha može smanjiti rizik od raka i koronarnih bolesti srca (Ros, 2009). Iako je nutritivna i komercijalna važnost oraha do sada bila ograničena na njegovu jezgru, sve se više pažnje pridaje ostalim dijelovima ovog voća, uključujući kožu, ljusku, koru, pa čak i lišće ili grane stabla. Različita svojstva nusproizvoda ploda oraha, kao vrijednih izvora bioaktivnih spojeva, nisu sveobuhvatno istražena, što uzrokuje nastavak tradicionalne upotrebe otpadnih nusproizvoda od ploda oraha koji se danas uglavnom bacaju u otpad ili spaljuju za potrebe grijanja (Akbari i sur., 2012). Iz tog razloga, znanstvenici sve više istražuju biološku aktivnost i funkcionalna svojstva otpadnih nusproizvoda od ploda oraha kako bi ih što bolje iskoristili, a kao neki od načina upotrebe navode se funkcionalni sastojci, hrana s dodanom vrijednošću, hrana za životinje, izvor bioaktivnih fitokemikalija za kozmetičku, prehrambenu i farmaceutsku industriju (Jahanban-Esfahlan i Amarowicz, 2018). Sastav orahove ljuske vrlo je sličan onom druge drvene biomase jer su celuloza, hemiceluloza i lignin glavne komponente. Predložene su različite metode za hidrolizu celuloze i hemiceluloze u drvnjoj biomasi kao sredstva za proizvodnju ugljikohidrata koji se prevode u etanol iz kojeg se može proizvesti bioetanol. Ljuska oraha pruža učinkovit način za poliranje nakita, kućišta pištolja, metalnih dijelova i olovaka. Također služi kao učinkovit filtracijski medij za odvajanje sirove nafte, opasnih materijala i teških metala iz vode (Jahanban-Esfahlan i sur., 2019). I na kraju, ljuska oraha ima i antioksidativne spojeve, kao što su flavonoidi (Jahanban-Esfahlan i sur., 2020).

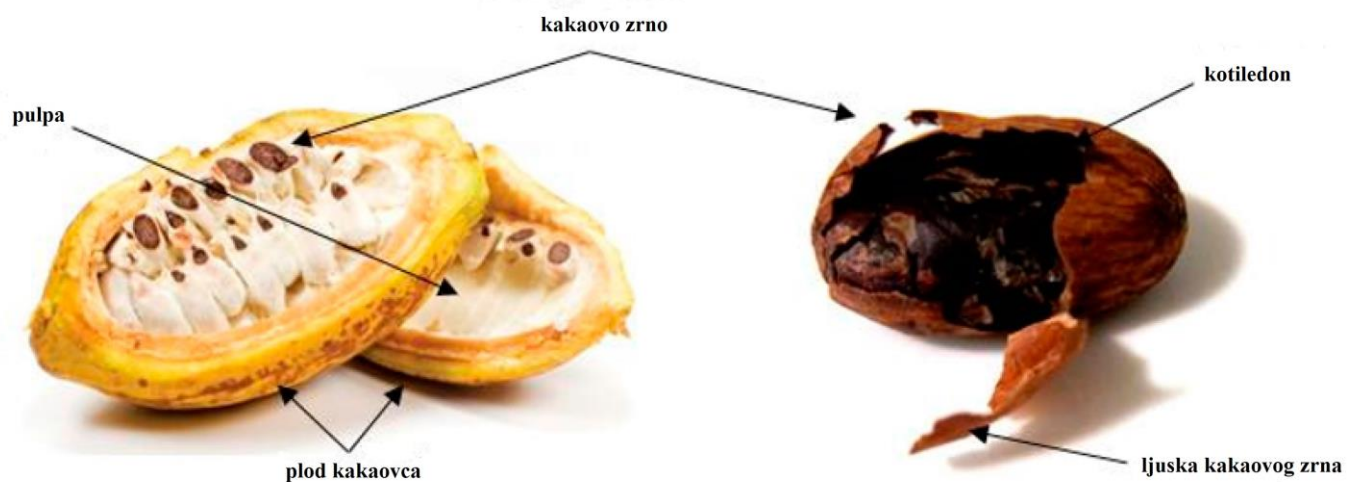


Slika 1. Različiti dijelovi oraha i odgovarajući nusproizvodi (prema Jahanban-Esfahlan i sur., 2020)

2.3. LJUSKA KAKAOVOG ZRNA

Theobroma cacao L., drvo koje proizvodi kakao (slika 2), pripada redu Malvales, porodici Malvaceae i rodu *Theobroma*. Naziv roda ima grčko podrijetlo, a Theos i Bromos znači „hrana bogova“. Unatoč tome što ima pulpu ugodnog okusa, zrna kakaa su dio kakaovca koji se najviše koristi u prehrambenoj industriji, generirajući nekoliko proizvoda s najvećim fokusom na čokoladu (Soares i Oliveira, 2022). Postoje četiri glavne sorte *Theobroma cacao* L.: Nacional, Criollo, Forastero i Trinitário (Castro-Alayo i sur., 2019). Godišnja proizvodnja kakao industrije iznosi oko 4,7 milijuna tona zrna kakaa, a najveći proizvođači su Obala Bjelokosti, Gana i Ekvador. Samo 10 % od godišnje proizvodnje odgovara zrnju kakaa, dok preostala vrijednost otpada na veliki broj ostataka (ljuska kakaovog zrna, pulpa, kotiledon). Ovi nusproizvodi su izvor hranjivih tvari i spojeva sa značajnim interesom u prehrambenoj industriji. Ljuska kakaovog zrna dobiva se nakon odvajanja sjemena, u procesu toplinske predobrade ili pečenjem. Ovaj nusproizvod je lignin celulozni kompleks posebno bogat dijetalnim vlaknima (u rasponu od 18 do 60 %). Učinkovit je kao jeftina sirovina za adsorbense za industrijska bojila, plinove i teške metale. Ekstrakti ovog nusproizvoda mogu smanjiti učestalost kroničnih bolesti (pretilost, dijabetes i rak) i štiti ljudske stanice od ishemijskog oštećenja (Soares i Oliveira, 2022). Promatrajući sadržaj minerala, ljuska kakaovog zrna ima najveću koncentraciju minerala od svih nusproizvoda kakaa, a posebno je bogata kalijem,

magnezijem, fosforom i kalcijem (Vītola i Ciproviča, 2016). Jedno istraživanje je pokazalo da je maslac proizveden od mlijeka krava koje su bile hranjene ljuskom kakaovog zrna imao više razine vitamina D od onog proizvedenog od mlijeka krava koje su bile hranjene normalnom hranom (Kon i Henry, 1935). Neka istraživanja su pokazala da ljuska kakaovog zrna ima mnogo hlapljivih organskih spojeva, a oko 10 do 20 % ovih spojeva se također nalazi u prženim zrnima kaka. Zbog ovog podatka, ovaj nusproizvod ima potencijal korištenja u različitim područjima prehrambene industrije, kao npr. u pekarstvu kod proizvodnje kolača i kruha, s obzirom da su ovi aromatični spojevi neophodni za stvaranje okusa i arome čokolade (Rojo-Poveda i sur., 2019). Nadovezujući se na spomenutu prednost, masti iz ljuski kakaovog zrna se počinju koristiti za smanjenje količine biljnog ulja koje se stavlja u funkcionalne kolače i čokoladne muffine (Öztürk and Ova 2018).



Slika 2. Plod kakaovca i kakaova zrna (prema Rojo-Poveda i sur., 2020)

2.4. POLISAHARIDI

Polisaharidi su prirodne biološke makromolekule sastavljene od 10 ili više molekula monosaharida povezanih α - ili β -glikozidnim vezama. Pronađene su stotine aktivnih polisaharida. Prema različitim biološkim izvorima, mogu se podijeliti na polisaharide gljiva, polisaharide viših biljaka, životinjske polisaharide, bakterijske polisaharide itd. (Chen i Huang, 2017).

Mnoge studije u posljednje vrijeme istražuju polisaharide biljnog podrijetla zbog potencijalnog terapijskog učinka i niske razine toksičnosti. Otkriveno je da se osnovni mehanizmi

imunostimulacije, antitumorski, baktericidni, antioksidativni i drugi terapijski učinci polisaharida javljaju putem stimulacije makrofaga i sustava komplementa (Schepetkin i Quinn, 2006).

Prehrambena vlakna su definirana kao neprobavljivi biljni polisaharidi, a uključuju celulozu, hemicelulozu, oligosaharide, pektine i lignine. Preporučuje se unos hrane bogate vlaknima jer mogu smanjiti razine kolesterola u krvi, smanjiti mogućnost nagle hiperglikemije, potaknuti crijevnu peristaltiku te tako prevenirati konstipaciju, divertikulozu i nastanak hemoroida. Također se smatra da mogu doprinijeti smanjenju krvnog tlaka te smanjiti vjerojatnost pojave mnogih tumora (Chawla i Patil 2010).

2.5. FITOKEMIKALIJE

Fitokemikalije su sekundarni biljni metaboliti jer ne sudjeluju direktno u primarnim procesima biljaka - rastu, razvoju i razmnožavanju. Ti sekundarni metaboliti imaju ključnu ulogu u obrambenim mehanizmima biljaka, posebice u borbi protiv njihovih patogena. Smatra se da neki od ovih spojeva imaju ulogu u odbijanju biljojeda i privlačenju oprašivača. Pomoću fitokemikalija biljke preživljavaju stresne okolišne uvjete poput UV svjetla, ekstremnog pH i temperatura te nedostatak vode. Posljednjih desetljeća fitokemikalije sve više dobivaju na važnosti zbog potencijalne uloge u ljudskoj prehrani, kozmetici, lijekovima i obrani biljaka (Ahmed i sur., 2017).

Sekundarni metaboliti biljaka mogu se podijeliti u 4 glavne kategorije, a to su terpeni, fenolni spojevi, spojevi koji sadrže dušik i spojevi koji sadrže sumpor. Ne mogu se sintetizirati u tijelu pa se moraju unositi hranom, a njihov deficit nije moguć, za razliku od vitamina i mineralnih tvari. Nalaze se u voću, povrću, cjelovitim žitaricama, mahunarkama, orašastim plodovima, vinu, začinima, čaju, čokoladi itd.

Sve je više dokaza da dugotrajni unos fitokemikalija može imati povoljan učinak na pojavu raka i kroničnih bolesti, kao što su dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti i poremećene kognitivne funkcije (del Rio i sur., 2013). Najraznovrsnije i najistraživanije fitokemikalije su fenolni spojevi. To su jaki antioksidansi topljivi u vodi koji mogu pomoći u obrani od oksidativnog stresa nastalog viškom reaktivnih kisikovih vrsta (Tsao, 2010).

Glavni fenolni spojevi koji se nalaze u kakau su flavanoli, koji uključuju katehine, epikatehine i procijanidine. Od svih proizvoda i nusproizvoda dobivenih od kaka, ljuške kakaovog zrna

sadrže veliku količinu fenolnih spojeva i pokazale su se kao dobar i jeftin izvor fenolnih spojeva sa značajnim antioksidacijskim učinkom (Okiyama i sur., 2017).

Jezgra oraha sadrži velike količine raznih fenolnih spojeva, a blago opor okus može biti povezan s prisutnošću tanina. Utvrđeno je da je najveća koncentracija fenolnih spojeva u koži oraha. Elaginska kiselina i flavonoidi iz oraha imaju potencijalno djelovanje na modulaciju kolesterola u serumu, a jedna grupa flavonoida ima kardioprotektivno djelovanje. Anderson i sur. (2001) ustanovili su da ekstrakt oraha koji je sadržavao galnu kiselinu, elaginsku kiselinu i flavonoide inhibira oksidaciju LDL kolesterola.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Liofilizirani ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna, sa i bez polisaharida, priređeni su u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ljuske oraha i kakaovog zrna sakupljene su nakon izdvajanja jezgre. Prikupljeni uzorci sušeni su na zraku kroz 3 dana, nakon čega je uslijedilo usitnjavanje, a potom prosijavanje. Za ekstrakciju kao otapalo je korištena destilirana voda. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji na temperaturi od 100 °C kroz 20 min. Nakon ekstrakcije slijedi centrifugiranje na 9500 rpm kroz 15 min te filtracija. Iz pripremljenih ekstrakata precipitirani su polisaharidi dodatkom 4 x većeg volumena etanola (96 %) u ekstrakt. Ekstrakti s polisaharidima i bez polisaharida koncentrirani su pod vakuumom, nakon čega se podvrgavaju liofilizaciji (-47 °C, 24 h) kako bi se dobili ekstrakti u praškastom obliku.

Za provođenje eksperimenta, dobiveni liofilizati korišteni su za pripremu ishodišnih otopina ekstrakata koje su sadržavale 10 mg mL⁻¹ polifenola te su kasnije iz njih pripremljene radne otopine u koncentracijama 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹ polifenola. Odabrani raspon koncentracija temelji se na preporučenom dnevnom unosu polifenola.

3.1.2. Modelne makromolekule

Modelne makromolekule koje su korištene u ovom radu su plazmid phiX174 RF DNA, protein albumin iz goveđeg seruma (BSA) te linoleinska kiselina.

3.1.3. Biološki test sustavi

Kao biološki test sustav korištena je kontinuirana humana stanična linija epitela karcinoma jezika Cal27. Stanice Cal27 su izolirane iz tkiva 56-godišnjeg bijelca s lezijom na sredini

jezika. Stanična linija je kultivirana u monosloju u plastičnim T-bocama u kompletiranom hranjivom mediju RPMI (eng. *Roswell Park Memorial Institute*) s dodatkom 10 %-tne otopine fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS). Stanice su uzgajane u inkubatoru u kontroliranim uvjetima atmosfere uz 5 % CO₂ i pri temperaturi od 37 °C. Stanice se nakon uzgoja odvajaju od podloge pomoću 0,25 %-tne otopine tripsina, te se nakon 10-ak minuta zaustavlja djelovanje tripsina dodatkom medija sa serumom. Početna koncentracija od 10⁵ stanica mL⁻¹, koja je potrebna za daljnju provedbu eksperimenta, podešena je brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici.

3.1.4. Kemikalije

- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Amonijev tiocijanat (NH₄SCN), Fischer, Velika Britanija
- Askorbinska kiselina, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Bromtimol plavo, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etanol (C₂H₅OH), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Etidij bromid (C₂₁H₂₀BrN₃), *Sigma Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Fetalni goveđi serum, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Glicerol, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Gvanidin-hidroklorid, *Acros Organics*, SAD
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Klorovodična kiselina (37% (v/v)), *Carlo Erba Reagents*, Francuska
- Linoleinska kiselina, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Metanol, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (NaH₂PO₄ x 2H₂O), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev dodecil-sulfat (SDS), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), *Gram-mol d.o.o.*, Hrvatska

- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Sigma-Aldrich*, Steinheim, Njemačka
- Plazmid PhiX174 RF DNA, *Promega*, SAD
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, *Corning*, SAD
- Trikloroetena kiselina (TCA), Fischer, Velika Britanija
- Tripsin, *Capricorn Scientific GmbH*, Njemačka
- Tris-HCl, *Invitrogen*, SAD
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), *Fluka*, Švicarska
- Tween 20, *Sigma-Aldrich-Chemie*, Steinheim, Njemačka
- Vodikov peroksid, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Željezov (III) klorid (FeCl_3), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Željezov sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

3.1.5. Otopine

i. Otopine korištene za ispitivanje protektivnog učinka ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna na modelnoj DNA molekuli

a) TAE pufer, 10x

Tris-HCl	48,4 g
Ledena octena kiselina	11,4 mL
EDTA	3,7 g
Demineralizirana voda	do 1000 mL

b) Agarozni gel (1 %)

Agarozna	1,5 g
TAE pufer, 1x	150 mL

c) Obojeni pufer za nanošenje na agarozni gel (eng. loading buffer)

Bromtimol plavo	0,2 g
Glicerol, 50 %	6 mL
Demineralizirana voda	4 mL

d) Radna otopina etidij bromida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$)

- Ishodišna otopina etidij bromida, $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ 37,5 μL
- Demineralizirana voda do 750 mL

ii. *Otopine korištene za određivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma*

a) BSA, 1 mg mL⁻¹

BSA	100 mg
Demineralizirana voda	10 mL

b) Željezov (III) klorid, 0,5 mM

FeCl ₃	0,811 mg
Demineralizirana voda	10 mL

c) Askorbinska kiselina, 0,1 mM

Askorbinska kiselina	0,176 mg
Demineralizirana voda	10 mL

d) Vodikov peroksid, 25 mM

Vodikov peroksid, 3 %	0,28 mL
Demineralizirana voda	10 mL

e) Dinitrofenilhidrazin (DNPH), 10 mM

DNPH	0,198 g
Apsolutni etanol, 96 %	100 mL

f) Trikloroetena kiselina (TCA), 10 %

TCA	10 g
Demineralizirana voda	100 mL

g) Klorovodična kiselina (HCl), 2 M

HCl, 37 %	16,65 mL
Demineralizirana voda	100 mL

h) Gvanidin hidroklorid, 6 M

Gvanidin-HCl	56,118 g
HCl, 2 M	do 100 mL

iii. *Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti Neutral red metodom*

a) Fosfatni pufer – PBS (pH = 7,2 - 7,4)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	1,16 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Demineralizirana voda	1000 mL

Sterilizacija fosfatnog pufera provodi se 15 minuta pri temperaturi od 120°C i tlaku od 1,01 x 10⁵ Pa.

b) Ishodišna otopina Neutral red-a, 5 mg mL⁻¹

Neutral red	50 mg
Etanol	10 mL

c) Radna otopina Neutral red-a

Ishodišna otopina Neutral red-a, 5 mg mL ⁻¹	0,1 mL
RPMI 1640 hranjivi medij	9,9 mL

d) Otopina za odbojavanje

Demineralizirana voda	100 mL (50 %)
Etanol	98 mL (49 %)
Ledena octena kiselina	2 mL (1 %)

iv. *Otopine korištene za određivanje reaktivnih kisikovih radikala DCFH-DA metodom*

a) Ishodišna otopina 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA), 2 mM

DCFH-DA	1,5 mg
DMSO	1,5 mL

b) Radna otopina 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA), 50 μM

Ishodišna otopina DCFH-DA, 2 mM	0,25 mL
PBS pufer (pH = 7,2 – 7,4)	9,75 mL

v. *Otopine korištene za određivanje stupnja inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline*

a) Natrij fosfatni pufer, 0,2 M

NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	1 M
Na ₂ HPO ₄	1 M

b) Emulzija linoleinske kiseline

Linoleinska kiselina	0,1402 g
Tween 20	0,1402 g
Fosfatni pufer	25 mL

c) Etanol, 75 %-tni

d) Amonijev tiocijanat, 30 %-tni

NH ₄ SCN	30 g
Destilirana voda	do 100 mL

e) Klorovodična kiselina, 3.5 %-tna

HCl, 37 %-tna	8,12 mL
Destilirana voda	do 100 mL

f) Željezov sulfat, 0,02 M

FeSO ₄	0,3038 g
Destilirana voda	do 100 mL

g) Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, 1 M

NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	7,89 g
Destilirana voda	50 mL

h) Natrijev hidrogenfosfat, 1 M

Na ₂ HPO ₄	7,1 g
Destilirana voda	50 mL

3.1.6. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, 1712 Mp8 Silver Edition, *Sartorius*, Engleska
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu, HC-240, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih ploča, *Cecil Instruments Ltd*, Engleska
- Digestor
- Inkubator sa kontroliranom atmosferom CO₂, *Forma Scientific*, SAD
- Invertni svjetlosni mikroskop, *Optika Microscopes*, Italija
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, *Iskra*, Slovenija
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd*, Engleska
- Spektrofotometar, *Thermo Fisher Scientific*, Engleska
- Svjetlosni mikroskop, *Carl Zeiss*, Jena, Njemačka
- Tehnička vaga, *Sartorius*, Engleska
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies*, New York, SAD
- Vibromikser EV-202, *Tehtnica-Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific*, SAD

3.1.7. Laboratorijski pribor

- Aluminijska folija
- Automatska propipeta, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka
- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf kivete
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena, 20-1000 mL
- Filter papir
- Kivete od kvarcnog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja
- Kivete od optičkog stakla (10 mm) za spektrofotometrijska mjerenja
- Laboratorijske staklene čaše različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Marker za pisanje
- Menzure različitih volumena, 50-1000 mL
- Mikropipete od 20, 200 i 1000 µL, *Eppendorf*, Hamburg, Njemačka

- Mikrotitarske ploče s 24 i 96 jažica, *Falcon*, SAD
- Nastavci za pipete
- Odmjerne tikvice različitih volumena, 25-100 mL
- Pamučna vata
- Pokrovna stakalca
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-25 mL
- Stakleni lijevak
- Sterilni filteri
- Špatula
- T-boce, *Falcon*, *BD Company*, Franklin Lakes, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Mjerenje citotoksičnog i proliferativnog učinka ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna na kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji Cal27 Neutral red metodom

Neutral red metoda se temelji na sposobnosti metabolički aktivnih stanica da vežu boju i koncentriraju ju u lizosomima gdje se onda može spektrofotometrijski odrediti. Samo žive stanice mogu prenijeti boju kroz staničnu membranu i akumulirati ju u lizosomima pa je lako zaključiti da je količina boje proporcionalna broju živih, odnosno metabolički aktivnih stanica.

U mikrotitarske ploče s 96 jažica nacijepljeno je po 100 μL određene suspenzije stanica početne koncentracije 10^5 stanica mL^{-1} . Stanice su kultivirane 24 sata te je nakon toga uklonjen medij, a stanice su tretirane s po 100 μL otopina četiri različite koncentracije ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida (0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL^{-1}), prethodno pripremljenih u odgovarajućem hranjivom mediju iz ishodišne otopine ekstrakta. Svaka koncentracija je na svakoj korištenoj staničnoj liniji ispitana u tri paralele. U kontrolne jažice dodano je po 100 μL hranjivog medija RPMI 1640, bez ekstrakta. Tretman stanica trajao je 1 i 2 sata.

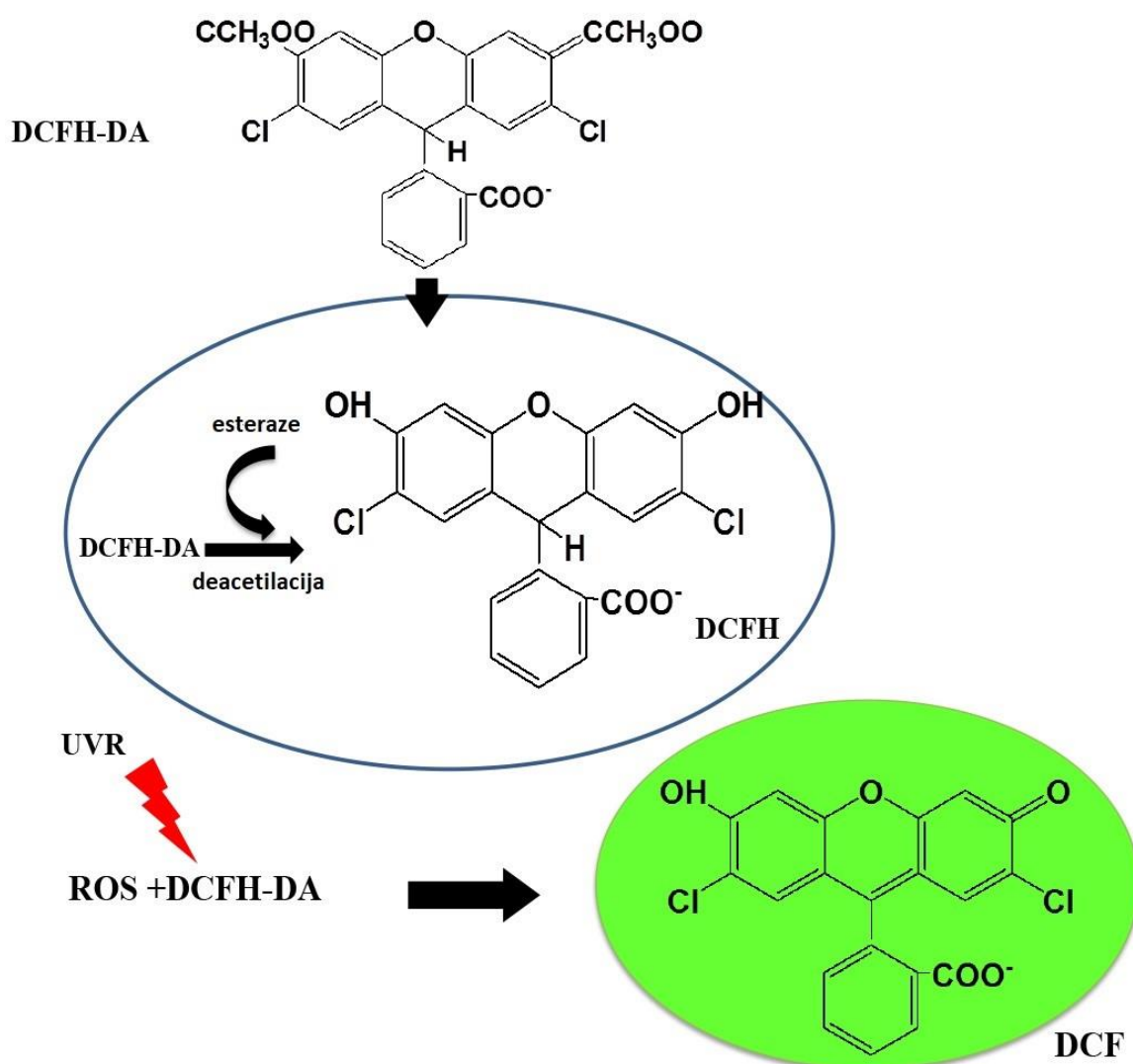
Nakon završetka tretmana istrošeni hranjivi medij s ekstraktom je uklonjen, a u svaku jažicu je stavljeno po 100 μL radne otopine Neutral red. Stanice su zatim inkubirane 45 minuta na 37 $^{\circ}\text{C}$, jer je bitno da Neutral red boja uđe u stanice i akumulira se u lizosomima. Boja je zatim uklonjena te su stanice isprane dva puta sa po 100 μL PBS pufera pomoću kojeg se odstranio višak boje. Nakon ispiranja, u svaku jažicu je dodano po 100 μL otopine za odbojavanje, koja povlači boju iz stanica. Intenzitet nastalog obojenja izmjeren je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 540 nm u odnosu na slijepu probu koja sadrži sve sastojke osim ekstrakata. Postotak preživljenja stanica proporcionalan je intenzitetu obojenja te se računa prema formuli [1]:

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{A_{540}(\text{ekstrakt})}{A_{540}(\text{kontrola})} \times 100 \quad [1]$$

A_{540} - vrijednost apsorbancije izmjerene na 540 nm

3.2.2. Mjerenje antioksidacijskog učinka ekstrakata ljuške oraha i ljuške kakaovog zrna na kontinuiranoj humanoj staničnoj liniji Cal27 DCFH-DA metodom

DCFH-DA (2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat) je nefluorescentna boja koja difundira u stanice te se u stanicama hidrolizira u polarnu formu (DCFH) pomoću enzima esteraze. Reaktivne kisikove čestice (ROS) i razni peroksidi pretvaraju DCFH u jako fluorescentnu formu, 2',7'-diklorofluorescein (DCF) koja se može detektirati spektrofotometrijski. Intenzitet fluorescencije je proporcionalan koncentraciji ROS-a u stanici (Rajneesh i sur., 2017).



Slika 3. Detekcija reaktivnih kisikovih čestica pomoću DCFH-DA testa (prema Rajneesh i sur., 2017)

Pripremljeni su ekstrakti ljuške oraha i ljuške kakaovog zrna sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 0,2, 1 i 10 mg mL⁻¹. 100 µL stanične suspenzije koncentracije 10⁵

stanica mL⁻¹ se naciepljuje u crnu mikrotitarsku ploču s 96 jažica te se nakon 24-satne inkubacije u kontroliranoj atmosferi (95 % zraka i 5 % CO₂) i na temperaturi od 37 °C uklanja stari medij, a stanice se tretira sa po 100 µL otopina navedenih koncentracija. Svaka koncentracija je na svakoj korištenoj staničnoj liniji ispitana u tri paralele. Kontrolne jažice sadržavale su 100 µL RPMI 1640 hranjivog medija. Trajanje tretmana je bilo 1 i 2 sata. Po završetku tretmana uklonjen je hranjivi medij s ekstraktima, a stanice su isprane s po 100 µL PBS pufera. Zatim je u svaku jažicu dodano po 100 µL radne otopine DCFH-DA te su stanice inkubirane 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije očitani su intenzitet fluorescencije pri valnoj duljini emisije od 485 nm i valnoj duljini ekscitacije od 530 nm. Indukcija slobodnih radikala izračunata je prema formuli [2]:

$$\text{Indukcija slobodnih radikala} = \frac{\frac{\text{Intenzitet fluorescencije (ekstrakt)}}{\% \text{ preživljenja}}}{\frac{\text{Intenzitet fluorescencije (kontrola)}}{100}} \quad [2]$$

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog učinka ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna na modelni plazmid phi174 RF DNA

Vodikov peroksid i UV zračenje uzrokuju oštećenja genetskog materijala. Praćen je antioksidacijski učinak navedenih ekstrakata, odnosno mogu li ti ekstrakti popraviti oštećenje DNA. Pri oštećenju, plazmid prelazi iz superzavijene u kružnu formu, a to se prati elektroforezom u agaroznom gelu. Fragmenti DNA imaju negativan naboj zbog fosfatne okosnice te zbog toga uvijek putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi u električnom polju. Fragmenti DNA se razdvajaju na temelju veličine, tj. kraći fragmenti brže putuju kroz gel u odnosu na dulje, a u ovom slučaju superzavijeni oblik plazmida je kraći i putuje brže, dok je cirkularni oblik dulji i putuje sporije u gelu.

Prvi korak je priprema 1 %-tnog agaroznog gela u TAE puferu. Agarozna i pufer se zagrijavaju u mikrovalnoj pećnici dok se agarozna u potpunosti ne otopi, a nakon toga se ohladi do otprilike 60 °C jer je aparatura za elektroforezu od plastike. Gel se zatim prebacuje u kalup, dodaje se češljic za formiranje jažica i ostavlja se par minuta dok se ne stvrdne te se onda izvadi češljic. Uzorci korišteni za elektroforezu sastojali su se od 3 µL 0,1 mg mL⁻¹ otopine plazmida u TAE puferu, 1 µL 3 %-tnog H₂O₂, ekstrakte ljuske oraha ili ljuske kakaovog zrna sa ili bez polisaharida koncentracija 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹ te odgovarajući volumen TAE pufera do

konačnog volumena smjese od 30 μL . Svi uzorci su podvrgnuti UV zračenju u trajanju od 10 minuta. Pozitivna kontrola je sadržavala plazmid, H_2O_2 , pufer te je zračena 10 minuta. Negativna kontrola sastojala se samo od plazmida i pufera te nije podvrgnuta zračenju. U pripremljene uzorke dodano je po 3 μL obojenog pufera za nanošenje (*eng. loading buffer*) koji sadrži bromtimol plavo, čime je omogućeno praćenje tijekom elektroforeze migracijom boje, a pomoću glicerola se povećava viskoznost uzorka i omogućava da uzorak lakše tone u gel. Tako pripremljeni uzorci nanoseni su u jažice gela. Zatim se površina gela prelije s TAE puferom i pokreće se postupak elektroforeze u trajanju od 60 minuta pri jakosti struje od 150 mA. Nakon provedene elektroforeze, gel se oboji u otopini etidij bromida koncentracije 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u trajanju od 15-ak minuta te se nakon toga izlaže UV svjetlu kako bi se omogućila vizualizacija gela. Pomoću programa GelAnalyser izmjeren je intenzitet nastalih vrpca te je izračunat omjer intenziteta superzavijene i relaksirane DNA nakon tretmana.

3.2.4. Ispitivanje stupnja oksidacije na modelnom proteinu albuminu iz goveđeg seruma

Količina proteinskih karbonila u biološkim uzorcima je standardni biomarker oksidativnog stresa. Metoda koja se koristi za određivanje proteinskih karbonila temelji se na reakciji derivatizacije karbonilne grupe proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemu nastaje stabilni produkt 2,4-dinitrofenilhidrazon (DNP). Količina nastalog DNP-a se određuje spektrofotometrijski, a apsorbancija (A_{370}) je proporcionalna s ukupnim sadržajem proteinskih karbonila u uzorku (Purdell, 2014).

Za određivanje stupnja oksidacije proteina albumina koristi se goveđi serum (BSA). Reakcijska se sastojala od 60 μL BSA u koncentraciji 40 mg mL^{-1} , 60 μL FeCl_3 koncentracije 0,5 mM, 60 μL askorbinske kiseline koncentracije 0,1 mM, 60 μL H_2O_2 koncentracije 10 mM, odgovarajućih volumena ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL^{-1} i demineralizirane vode do volumena reakcijske smjese od 600 μL . Svi uzorci su pripremljeni u triplicatima. Pozitivna kontrola je umjesto ekstrakata sadržavala 125 μL metanola, a negativna kontrola 125 μL troloxa. Potom su uzorci inkubirani 30 minuta na 37 °C, a nakon inkubacije je dodano 500 μL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) i smjesa je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodano 500 μL trikloroctene kiseline (TCA) pa se smjesa inkubira na ledu 15 minuta da bi se uspješno istaložili proteini. Uzorci se zatim centrifugiraju te se supernatant odbacuje, a talog je ispran s 1 mL etilacetata da se ukloni višak neizreagiranog DNPH-a. Svi uzorci se potom resuspendiraju u 1 mL

6 M gvanidin-HCl i ostavljaju preko noći te je sutradan izmjerena apsorbanija na 370 nm. Stupanj oksidacije proteina određen je prema formuli [3]:

$$\% \text{ oksidacije} = \frac{A_{370}(\text{uzorak})}{A_{370}(\text{negativna kontrola})} \times 100 \quad [3]$$

A_{370} – vrijednost apsorbanije izmjerene na 370 nm

3.2.5. Ispitivanje protektivnog učinka ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna na modelnim lipidima- linoleinska kiselina

Svi uzorci sadrže 625 μL emulzije linoleinske kiseline, ekstrakte ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹ te natrijev fosfatni pufer do konačnog volumena od 1250 μL . Pozitivna kontrola umjesto ekstrakata sadrži 125 μL Troloxa koncentracije 10 mg mL⁻¹, a negativna kontrola 125 μL metanola.

Iz reakcijske smjene se odvoji 50 μL uzorka te se pomiješa s 2 mL EtOH (75 %) i 50 μL amonijevog tiocijanata (30 %). Na kraju se u reakcijsku smjenu dodaje 50 μL FeSO₄ (0,02 M, razrijeđen u 3,5 % HCl). Nakon 3 minute mjeri se apsorbanija na 500 nm. Svi uzorci su pripremljeni u triplikatima. Postotak inhibicije peroksidacije lipida izračunava se prema formuli [4]:

$$\% \text{ inhibicije} = 1 - \frac{A_{500}(\text{uzorak})}{A_{500}(\text{negativna kontrola})} \times 100 \quad [4]$$

A_{500} -vrijednost apsorbanije izmjerene na 500 nm

3.2.6. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati su obrađeni korištenjem statističkog programa JASP 0.16.0.0, upotrebom Classical ANOVA statističke analize sa Scheffe i Tukey *Post Hoc* testom usporedbe. Odabrana razina značajnosti (p-vrijednost) bila je 0,001, što znači da se svaki rezultat koji pokazuje razinu značajnosti manju od 0,001 smatra statistički značajnim. Rezultati su prikazani grafički korištenjem programa Microsoft Excel 2016.

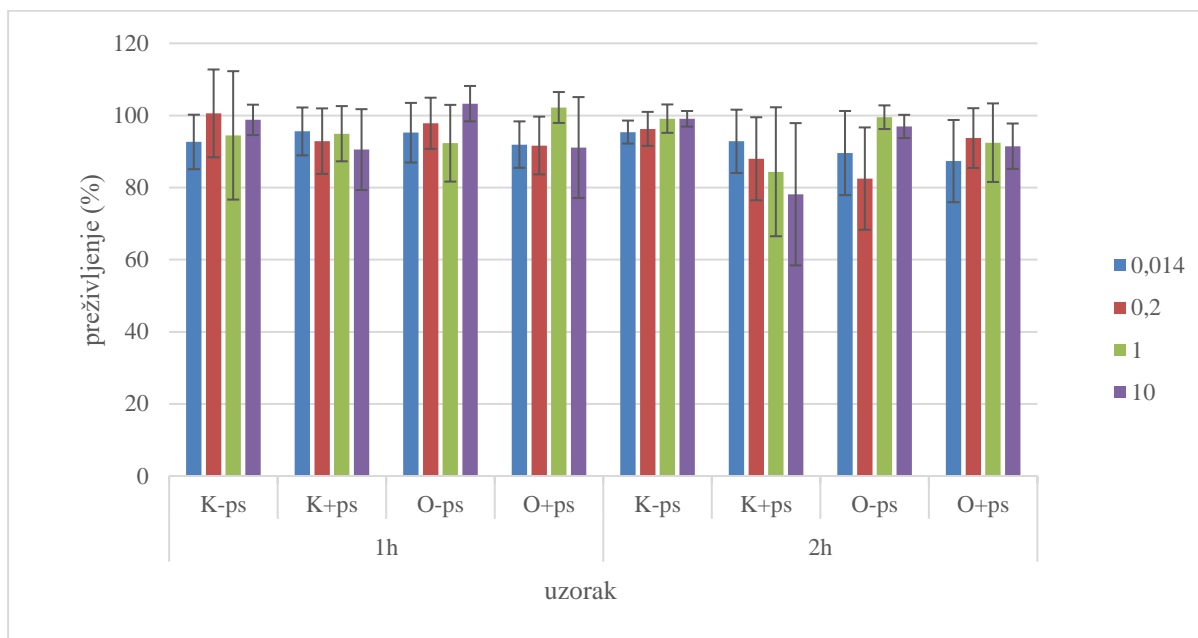
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu analiziran je učinak biološki aktivnih spojeva iz ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida na humanoj staničnoj liniji pločastog epitela karcinoma jezika Cal27, te na modelima staničnih makromolekula (plazmid phiX174 RF DNA, protein albumin iz govedeg seruma i linoleinska kiselina). Odabrane su koncentracije od 0,014 mg mL⁻¹, 0,2 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹ i 10 mg mL⁻¹. Ove vrijednosti su dobivene dijeljenjem preporučene mase dnevnog unosa polifenola (1 gram) s prosječnim volumenom krvi čovjeka (5 litara) i prosječnom tjelesnom masom čovjeka (70 kg), a prva vrijednost je zatim pomnožena 5 i 50 puta.

Citotoksični učinak iz ekstrakta ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna na staničnoj liniji karcinoma usne šupljine Cal27 određen je Neutral red metodom, a antioksidacijski učinak DCFH-DA metodom. Stanice su podvrgnute djelovanju ekstrakata u trajanju od 1 sat i 2 sata. Protektivni učinci aktivnih tvari iz ekstrakata ljuski oraha i kakaovog zrna ispitani su na modelnim makromolekulama (plazmidu, proteinima i lipidima). Protektivni učinak na modelnom plazmidu s obzirom na radikale generirane vodikovim peroksidom i UV zračenjem određen je elektroforezom u agaroznom gelu. Prooksidativni i protektivni učinak na modelnom proteinu određen je DNPH metodom koja se temelji na reakciji karboniliranih proteina s DNPH. Protektivni učinak na lipidima zasniva se na potencijalu ekstrakata ljuski kakaovog zrna i oraha da inhibiraju formiranje peroksida u linoleinskoj kiselini.

4.1. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI EKSTRAKATA LJUSKI ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA HUMANOJ STANIČNOJ LINIJI CAL27 NEUTRAL RED METODOM

Ispitivan je citotoksični učinak ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida u koncentracijama od 0,014 mg mL⁻¹, 0,2 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹ i 10 mg mL⁻¹ na humanoj staničnoj liniji Cal27. Korištena metoda je Neutral red, a vrijeme tretmana 1 i 2 sata.



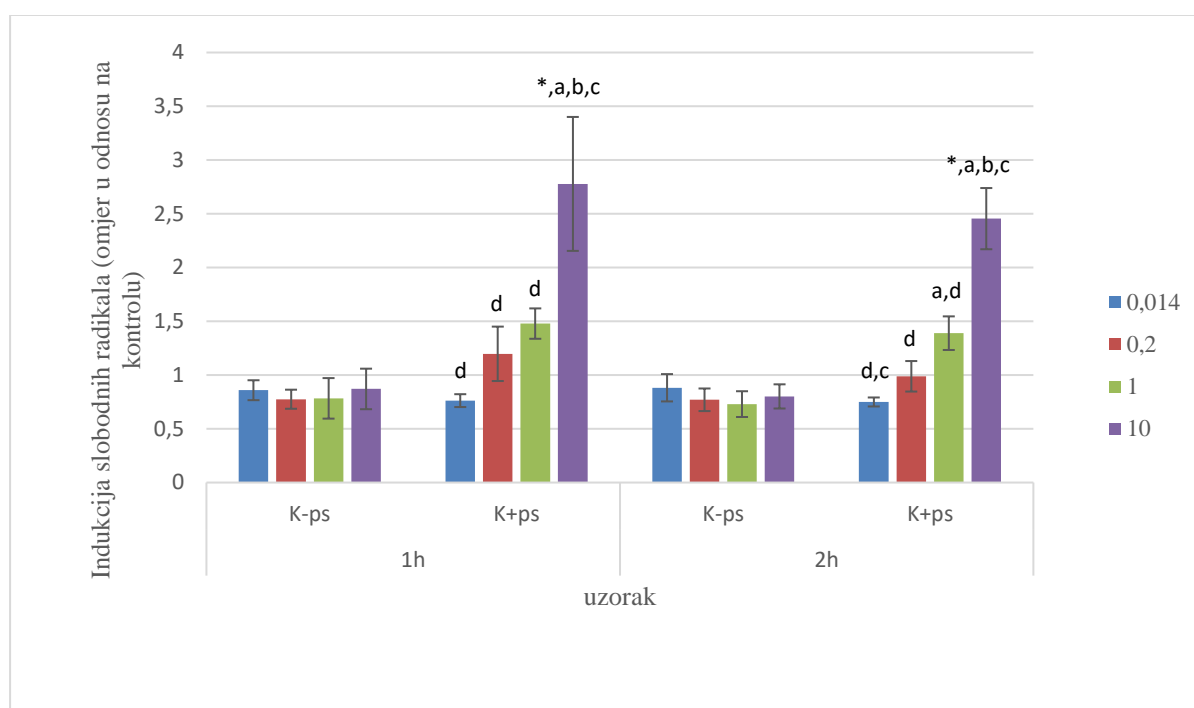
K-ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; K+ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; O-ps- ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; O+ps- ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima

Slika 4. Preživljenje stanične linije Cal27 u ovisnosti o uzorcima ekstrakata ljuski oraha i kakaovog zrna u različitim koncentracijama nakon tretmana od 1 ili 2 sata

Iz rezultata je vidljivo da tijekom 1 ili 2 sata tretmana Cal27 stanica, niti jedna od ispitivanih koncentracija ekstrakta ljuske kakaovog zrna ili oraha ne pokazuje citotoksično djelovanje na Cal27 stanice. U istraživanju provedenom od strane D'Angeli i sur. (2021) ispitivan je utjecaj etanolnog ekstrakta oraha na preživljenje MCF-7, HFF1 i Caco-2 stanica. Utvrđeno je da ekstrakt oraha nije imao utjecaj na preživljenje stanica MCF-7 i HFF1 bez obzira na koncentraciju i vrijeme, dok je tretman ekstraktom oraha u trajanju od 2 i 72 sata pri koncentraciji $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ smanjio preživljenje Caco-2 stanica za oko 40 %. Razlika u dobivenim rezultatima može se objasniti činjenicom da se u etanolnom ekstraktu nalazilo puno više hidrofobnih spojeva nego u vodenom ekstraktu koji je istraživan u ovom radu, a također ne treba zanemariti činjenicu da je postojala značajna razlika u vremenu izlaganja stanica istraživanim spojevima. Također, na rezultat toksičnosti utječe i stanična linija koja se koristi kao test sustav. Stanice adenokarcinoma debelog crijeva su metabolički aktivne te je za očekivati da će tijekom produženog vremena inkubacije nastati metaboliti koji mogu pokazivati određeni citotoksični učinak.

4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA STANIČNOJ LINIJI CAL27 DCFH-DA METODOM

Antioksidativni učinak ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida u različitim koncentracijama ($0,014 - 10 \text{ mg ml}^{-1}$) ispitan je na humanoj staničnoj liniji Cal27 korištenjem DCFH-DA metode, a vrijeme izloženosti stanica bilo je 1 i 2 sata.

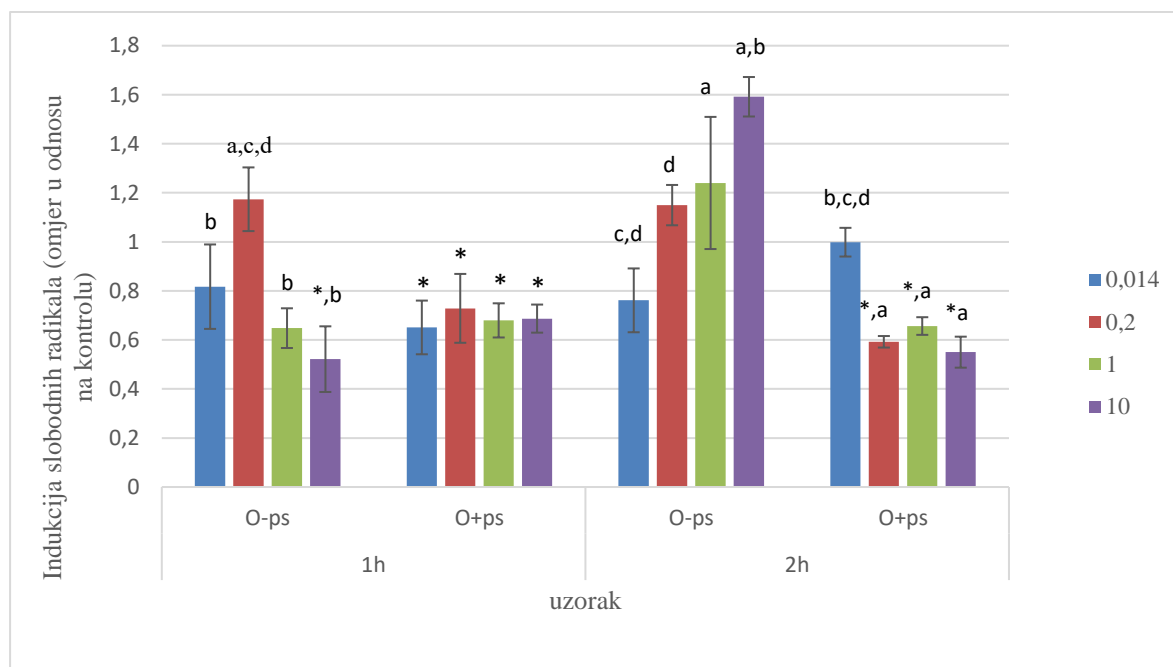


*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a- statistički značajna razlika u odnosu na $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b- statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c- statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL^{-1} ($p < 0,001$); d- statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL^{-1} ($p < 0,001$); K-ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; K+ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna s polisaharidima

Slika 5. Prikaz utjecaja ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida u različitim koncentracijama na indukciju slobodnih radikala stanične linije Cal27 nakon tretmana u trajanju od 1 ili 2 sata

Iz rezultata je vidljivo da ekstrakti kakaovog zrna bez polisaharida u svim koncentracijama pokazuju blago antioksidativno djelovanje na Cal27 stanice koje su bile izložene ekstraktu 1 i 2 sata, ali to nije statistički značajno. Ekstrakti kakaovog zrna s polisaharidima pokazuju porast prooksidacijskog djelovanja na stanice Cal27 s porastom koncentracije ekstrakta, uz to da

najviša koncentracija (10 mg mL^{-1}) pokazuje snažno prooksidacijsko djelovanje. S druge strane, Tran i sur. (2017) su proučavali utjecaj ljuske kakaovog zrna na antioksidacijsku aktivnost bioelastomera i rezultati su pokazali da su svi ekstrakti imali snažno antioksidativno djelovanje na ABTS^{++} slobodne radikale, koje je bilo sve izraženije porastom koncentracije i vremena izlaganja.



*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a- statistički značajna razlika u odnosu na $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b- statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c- statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL^{-1} ($p < 0,001$); d- statistički značajna razlika u odnosu na 10 mg mL^{-1} ($p < 0,001$); O-ps- ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; O+ps- ekstrakt ljuske oraha s polisaharidima

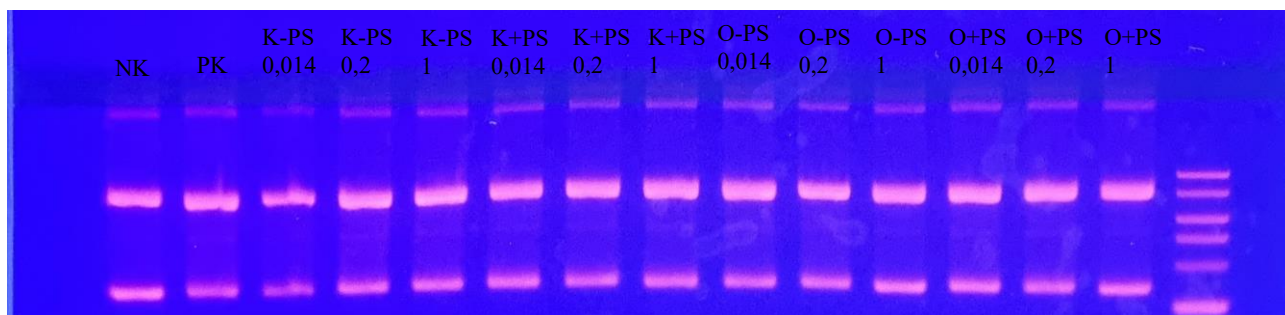
Slika 6. Prikaz utjecaja ekstrakata ljuske oraha sa i bez polisaharida u različitim koncentracijama na indukciju slobodnih radikala stanične linije Cal27 nakon tretmana u trajanju od 1 ili 2 sata

Rezultati pokazuju da ekstrakti ljuske oraha s polisaharidima u svim koncentracijama (osim pri koncentraciji $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ u trajanju izloženosti od 2 sata) te izloženosti od 1 ili 2 sata imaju antioksidacijsko djelovanje na humanu staničnu liniju Cal27. Ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida pokazuje antioksidacijsko djelovanje samo u koncentraciji 10 mg mL^{-1} pri izloženosti od 1 sata, dok se pri izloženosti od 2 sata može vidjeti dozni odgovor- povećanjem koncentracije, povećava se i prooksidacijska aktivnost. Ekstrakti ljuske oraha s polisaharidima

pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost, koja se ne mijenja puno s koncentracijom, za razliku od ekstrakta bez polisaharida. Mnoga istraživanja su dokazala da biljni polisaharidi imaju antioksidacijski potencijal s velikom sposobnošću hvatanja slobodnih radikala (Li i sur., 2017). U istraživanju Salem i sur. (2022) korištena je DPPH metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti i utvrđena je visoka antioksidacijska aktivnost ljuske oraha.

4.3. GENOTOKSIČNI I PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA MODELNOJ DNA

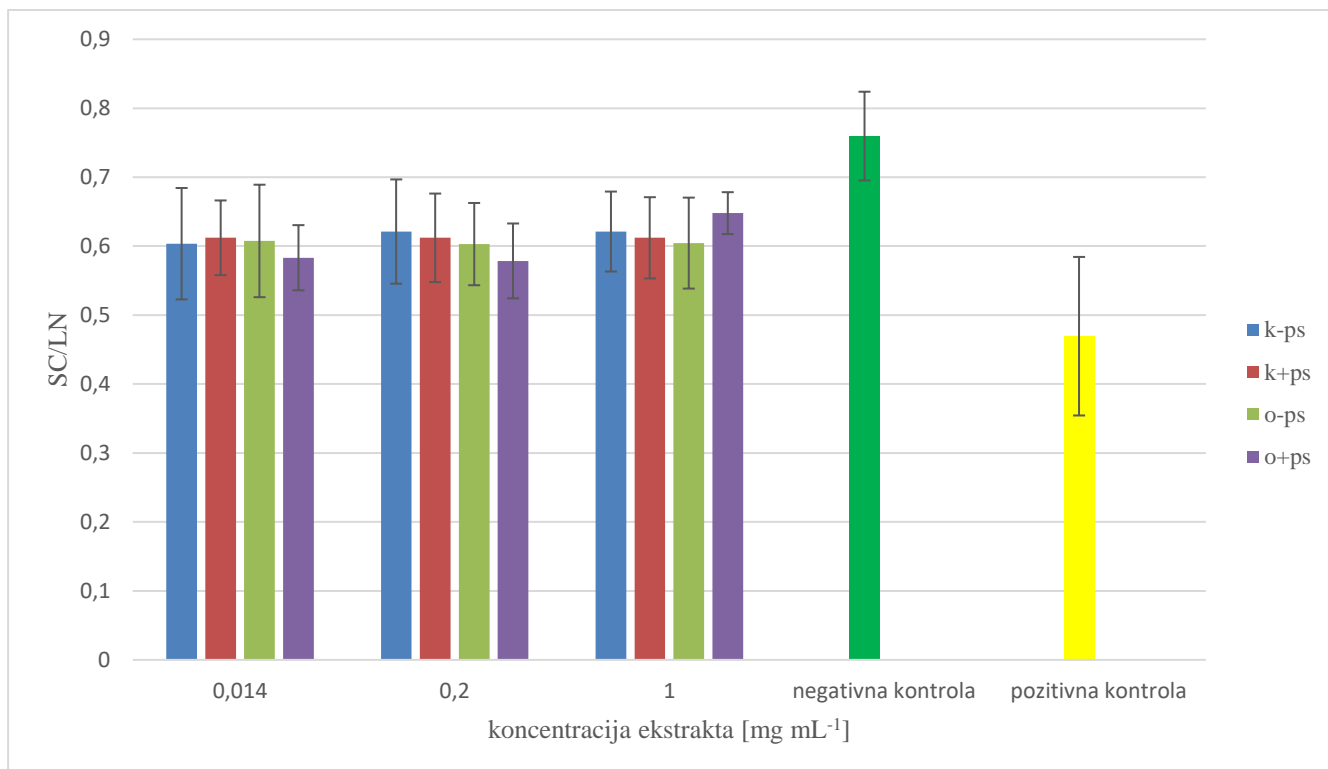
Ispitivano je potencijalno protektivno djelovanje ekstrakata ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna na plazmid phiX174 RF DNA u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹. Plazmid je također bio izložen slobodnim radikalima koji su nastali UV zračenjem i djelovanjem vodikovog peroksida. Stupanj izloženosti slobodnim radikalima se može vidjeti pomoću elektroforeze u agaroznom gelu, jer prilikom oštećenja dolazi do prijelaza superzavijenog plazmida u cirkularni oblik koji putuje sporije u agaroznom gelu.



NK- negativna kontrola; PK- pozitivna kontrola; K-PS- ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida koncentracija 0,014-1 mg mL⁻¹; K+PS- ekstrakt ljuske kakaovog zrna s polisaharidima koncentracija 0,014-1 mg mL⁻¹; O-PS- ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida koncentracija 0,014-1 mg mL⁻¹; O+PS- ekstrakt ljuske oraha s polisaharidima koncentracija 0,014-1 mg mL⁻¹

Slika 7. Protektivni učinak ekstrakta ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna na plazmid

Slika 4 prikazuje izgled gela nakon elektroforeze. Iz slike 4 može se primijetiti da u negativnoj kontroli ima više plazmida u superzavijenoj konformaciji od pozitivne kontrole. Za bolje analiziranje rezultata korištena je aplikacija GelAnalyzer.



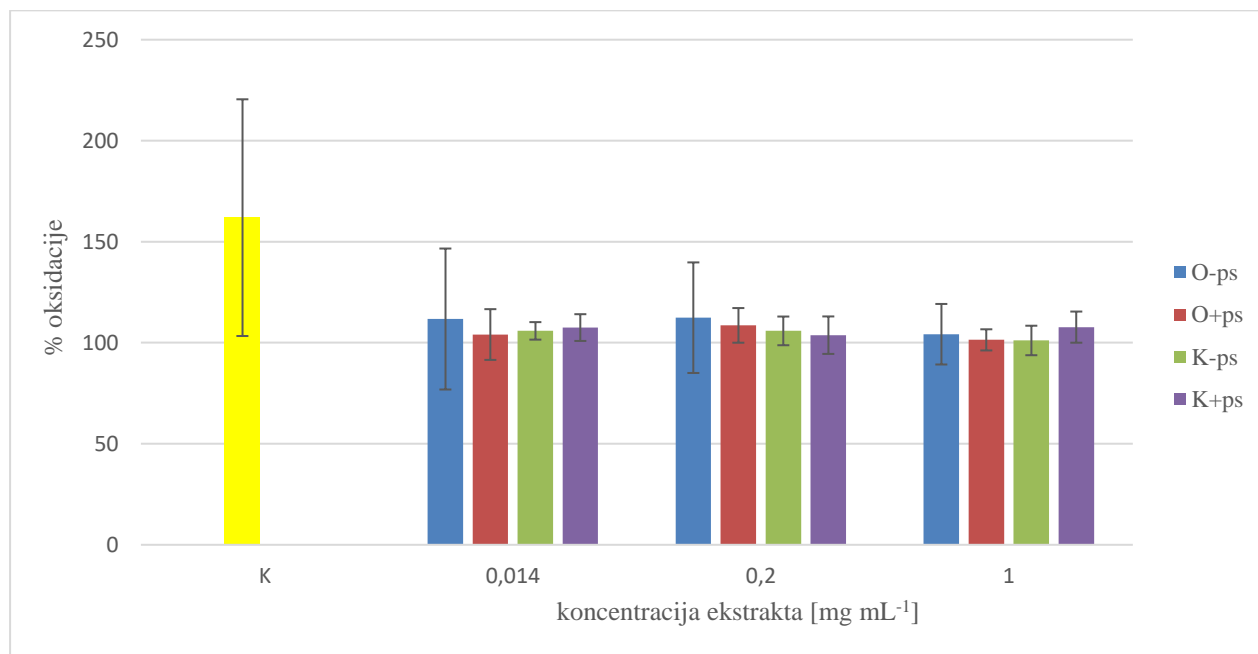
SC- superzavijeni plazmid; LN- cirkularni plazmid; k-ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; k+ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna s polisaharidima; o-ps- ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; o+ps- ekstrakt ljuske oraha s polisaharidima

Slika 8. Ovisnost omjera superzavijenog plazmida i plazmida u cirkularnom obliku o koncentracijama različitih uzoraka

Iz Slike 8. se može vidjeti očita razlika između pozitivne kontrole, koja se sastoji od plazmida izloženog UV zračenju i vodikovom peroksidu, i negativne kontrole koju čini isključivo plazmid. Svi uzorci tretirani ekstraktima ljuske oraha ili ljuske kakaovog zrna imaju veći omjer superzavijene i kružne DNA od pozitivne kontrole pa se zaključuje da ekstrakti ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna imaju potencijalno protektivno djelovanje prema oštećenjima genetičkog materijala.

4.4. PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I LJUSKE KAKAOVOG ZRNA NA MODELNOM PROTEINU ALBUMINU IZ GOVEĐEG SERUMA

Određen je postotak oksidacije proteina albumina iz goveđeg seruma metodom koja se temelji na reakciji oksidiranih proteina s DNPH. Prikazani su rezultati kao ovisnost postotka oksidacije proteina (u odnosu na negativnu kontrolu) o koncentraciji ekstrakta.



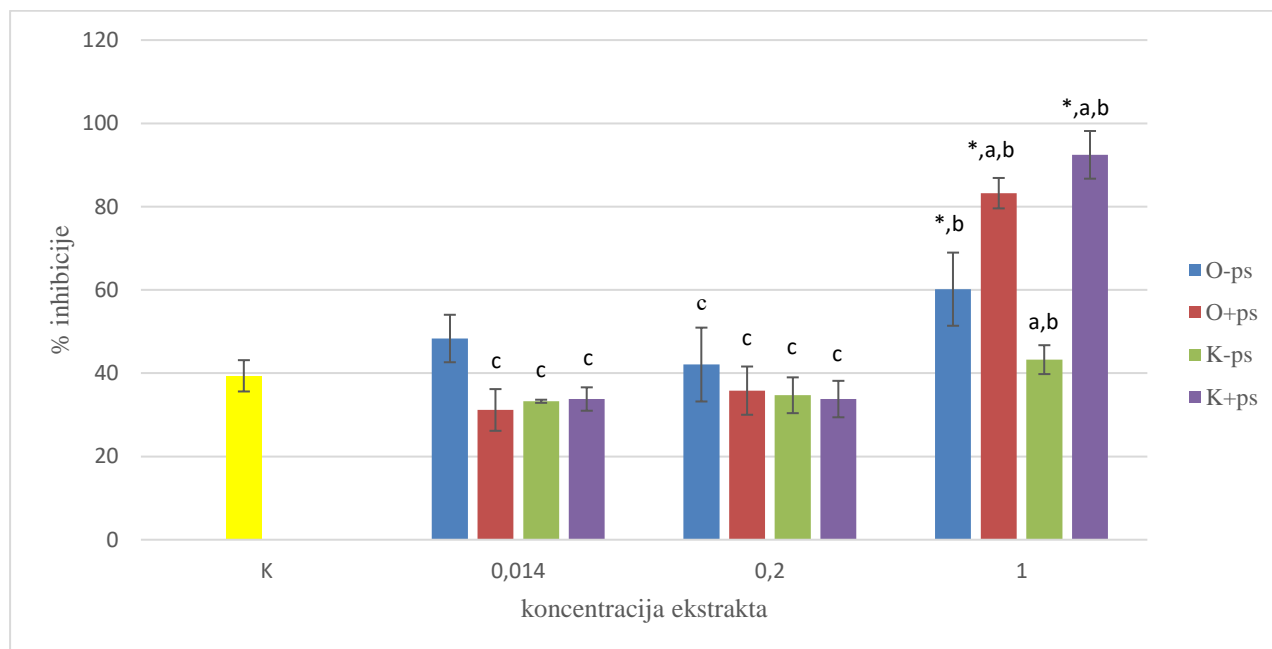
K- pozitivna kontrola (metanol); O-ps- ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; O+ps- ekstrakt ljuske oraha s polisaharidima; K-ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; K+ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna s polisaharidima

Slika 9. Učinak ekstrakta ljuski oraha i kakaovog zrna na stupanj oksidacije proteina

Rezultati na grafu pokazuju da nije utvrđena statistički značajna razlika u % oksidacije ekstrakata u odnosu na pozitivnu kontrolu. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna i ljuske oraha u svim koncentracijama pokazuju blago antioksidativno djelovanje na proteine albumine iz goveđeg seruma, ali ništa statistički značajno.

4.5. PROTEKTIVNI UČINAK EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I LJUSKE KAKAOVOG ZRNA NA LIPIDE

Ispitivan je kapacitet ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna da inhibiraju formiranje peroksida u linoleinskoj kiselini. Visok % inhibicije ukazuje na visoku antioksidativnu aktivnost.



*- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$); a- statistički značajna razlika u odnosu na $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); b- statistički značajna razlika u odnosu na $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,001$); c- statistički značajna razlika u odnosu na 1 mg mL^{-1} ($p < 0,001$); K- pozitivna kontrola (trolox); O-ps- ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; O+ps- ekstrakt ljuske oraha s polisaharidima; K-ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; K+ps- ekstrakt ljuske kakaovog zrna s polisaharidima

Slika 10. Utjecaj ekstrakata ljuski oraha i kakaovog zrna različitih koncentracija na % inhibicije formiranja peroksida u linoleinskoj kiselini

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ekstrakti ljuske oraha sa i bez polisaharida te ekstrakt kakaovog zrna s polisaharidima u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} statistički značajno povećavaju % inhibicije nastanka peroksida, tj. smanjuju % lipidne peroksidacije linoleinske kiseline. To bi značilo da ekstrakti u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} imaju znatnu antioksidacijsku aktivnost na lipide. Ismail i Yee. (2006) su uspoređivali učinak ekstrakta ljuske kakaovog zrna sa učinkom sintetskih antioksidansa (BHT i β -tokoferol) na lipidnu oksidaciju kuhane govedine. Ustanovili su da je lipidna oksidacija bila znatno niža u uzorcima kuhane govedine koja je sadržavala ekstrakt ljuske kakaovog zrna u usporedbi sa sintetskim antioksidansima.

5. ZAKLJUČCI

- 1) Ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna ne pokazuju ni citotoksično ni proliferativno djelovanje na humanu staničnu liniju pločastog epitela karcinoma jezika Cal27
- 2) Ekstrakti ljuske kakaovog zrna s polisaharidima pokazuju na Cal27 stanice dozni odgovor. Pri koncentraciji od 10 mg mL^{-1} imaju snažno prooksidacijsko djelovanje. Vrijeme izlaganja nije utjecalo na učinak. S druge strane, ekstrakti ljuske oraha s polisaharidima pokazuju antioksidacijsko djelovanje pri svim koncentracijama osim $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ u trajanju izloženosti od 2 sata
- 3) Svi uzorci tretirani ekstraktima ljuske oraha i ljuske kakaovog zrna sprječavaju prooksidativni učinak na genetički materijal induciran hidroksil radikalima
- 4) Ispitivani ekstrakti ne sprječavaju karbonilaciju proteina niti ju induciraju
- 5) Svi istraživani uzorci (osim ekstrakta ljuske kakaovog zrna bez polisaharida), pri koncentraciji 1 mg mL^{-1} , smanjuju postotak peroksidacije linoleinske kiseline, odnosno imaju jako antioksidacijsko djelovanje

6. POPIS LITERATURE

- Ahmed E, Arshad M, Khan MZ, Amjad M, Sadaf H, Riaz I, i sur. (2017) Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J Pharmacogn Phytochem* **6(2)**, 205–214.
- Akbari V, Jamei R, Heidari R, Esfahlan AJ (2012) Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. *Food Chemistry* **135**, 2404–2410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.030>
- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM (2001) Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *Journal of Nutrition* **131**, 2837–2842. <https://doi.org/10.1093/jn/131.11.2837>
- Ayala-Zavala JF, Rosas-Domínguez C, Vega-Vega V, González-Aguilar GA (2010) Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science* **75**, 175–181. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1750-3841.2010.01792.x>
- Castro-Alayo EM, Idrogo-Vásquez G, Siche R, Cardenas-Toro FP (2019) Formation of aromatic compounds precursors during fermentation of Criollo and Forastero cocoa. *Heliyon* **5(1)**, e01157. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01157>
- Chandrasekaran M (2012) Valorization of food processing by-products, CRC Press.
- Chawla R, Patil GR (2010) Soluble Dietary Fiber. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**, 178–196. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00099.x>
- Chen L, Huang G (2018) Antitumor Activity of Polysaccharides: An Overview. *Current Drug Targets* **19(1)**, 89-96. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170704143018>
- D'Angeli F, Malfa GA, Garozzo A, Li Volti G, Genovese C, Stivala A, i sur. (2021) Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Juglans regia* L. Pellicle Extract. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* **10(2)**, 1–17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020159>
- Djilas S, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G (2009) By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **15**, 191–202. <http://dx.doi.org/10.2298/CICEQ0904191D>
- Galali Y, Omar ZA, Sajadi SM (2020) Biologically active components in by-products of food processing. *Food Science & Nutrition* **8**, 3004–3022. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1665>
- Hodúr C, László Z, Tommaso G (2012) Food By-products for Biofuels. U: McElhatton A, do

- Amaral Sobral P (ured.) Novel Technologies in Food Science. Integrating Food Science and Engineering Knowledge into the Food Chain, 7 izd., Springer, New York, NY, str. 39-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7880-6_3
- Ismail A, ChewLye Y (2006) Antioxidative effects of extracts of cocoa shell, roselle seeds and a combination of both extracts on the susceptibility of cooked beef to lipid oxidation. *Journal of Food Technology* **4(1)**, 10–15.
- Jahanban-Esfahlan A, Amarowicz R (2018) Walnut (*Juglans regia* L.) shell pyroligneous acid: Chemical constituents and functional applications. *RSC Advances* **8**, 22376–22391. <https://doi.org/10.1039/C8RA03684E>
- Jahanban-Esfahlan A, Jahanban-Esfahlan R, Tabibiazar M, Roufegarinejad L, Amarowicz R (2020) Recent advances in the use of walnut (*Juglans regia* L.) shell as a valuable plant-based bio-sorbent for the removal of hazardous materials. *RSC Advances* **10**, 7026–7047. <https://doi.org/10.1039/C9RA10084A>
- Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Tabibiazar M, Amarowicz R (2019) A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. *Molecules* **24(11)**, 2133. <https://doi.org/10.3390/molecules24112133>
- Kon SK, Henry KM (1935) The effect of feeding cacao shell to cows on the vitamin D content of butter (milk). *Biochemical Journal* **29**, 2051–2056. <https://doi.org/10.1042/bj0292051>
- Li H, Ding F, Xiao L, Shi R, Wang H, Han W, i sur. (2017) Food-Derived Antioxidant Polysaccharides and Their Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients* **9(1)**, 778. <https://doi.org/10.3390/nut9070778>
- Mahapatra S, Kumar D, Singh B, Sachan PK (2021) Biofuels and their sources of production: A review on cleaner sustainable alternative against conventional fuel, in the framework of the food and energy nexus. *Energy Nexus* **4**, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100036>
- Nayak A, Bhushan B (2019) An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. *Journal of Environmental Management* **233**, 352–370. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.041>
- Okiyama DCG, Navarro SLB, Rodrigues, CEC (2017) Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology* **63**, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>
- Öztürk E, Ova G (2018) Evaluation of Cocoa Bean Hulls as a Fat Replacer On Functional Cake

- Production. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* **6**, 1043. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i8.1043-1050.1934>
- Purdel N (2014) Current Methods Used in the Protein Carbonyl Assay. *Annual Research & Review in Biology* **4**, 2015–2026. <http://dx.doi.org/10.9734/ARRB/2014/8763>
- Rajneesh, Pathak J, Chatterjee A, Singh S, Sinha R (2017) Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). *Bio-protocol* **7(17)**, 1-8. <http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.2545>
- del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013): Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* **18**, 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Rajo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Mateus-Reguengo L, Bertolino M, Stévigny C, Zeppa G (2019) Effects of Particle Size and Extraction Methods on Cocoa Bean Shell Functional Beverage. *Nutrients* **11(4)**, 867. <https://doi.org/10.3390/n11040867>
- Rajo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Zeppa G, Stévigny C (2020) Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients* **12(4)**, 1123. <https://doi.org/10.3390/n12041123>
- Ros E (2009) Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **89(5)**, 1649S-1656S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736r>
- Salem MA, Aborehab NM, Al-Karmalawy AA, Fernie AR, Alseekh S, Ezzat SM (2022) Potential Valorization of Edible Nuts By-Products: Exploring the Immune-Modulatory and Antioxidants Effects of Selected Nut Shells Extracts in Relation to Their Metabolic Profiles. *Antioxidants* **11(3)**, 462. <https://doi.org/10.3390/antiox11030462>
- Schepetkin IA, Quinn MT (2006) Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* **6(3)**, 317–333. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.10.005>
- Shah MA, Khan MNS, Kumar V (2018) Biomass residue characterization for their potential application as biofuels. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **134**, 2137–2145. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7560-9>
- Soares TF, Oliveira MBPP (2022) Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules* **27(5)**, 1625. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>

- Tran TN, Heredia-Guerrero JA, Mai BT, Ceseracciu L, Marini L, Athanassiou A, i sur. (2017) Bioelastomers Based on Cocoa Shell Waste with Antioxidant Ability. *Advanced Sustainable Systems* **1(7)**, 1700002. <https://doi.org/10.1002/adsu.201700002>
- Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2(12)**, 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Vītola V, Ciproviča I (2016) The Effect of Cocoa Beans Heavy and Trace Elements on Safety and Stability of Confectionery Products. *Rural Sustainability Research* **35**, 19–23. <https://doi.org/10.1515/plua-2016-0003>

Izjava o izvornosti

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

Glavina

Vlastoručni potpis