

# Primjena ekstrakata komine grožđa u niskotemperaturnim eutekničnim otapalima u prehrambenoj industriji

---

Rožić, Valentina

Master's thesis / Diplomski 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:159:936423>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2022.

Valentina Rožić

**PRIMJENA EKSTRAKATA  
KOMINE GROŽĐA U  
NISKOTEMPERATURNIM  
EUTEKTIČNIM OTAPALIMA U  
PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI**

*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 prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Manuele Panić.*

*Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina“, KK.01.1.1.07.007. Projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Voditelj projekta: prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković*



*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na pruženoj prilici za izradu ovoga diplomskog rada i prenesenom znanju.*

*Veliko hvala dr. sc. Manuli Panić na uloženom vremenu i trudu, strpljivosti, razumijevanju i velikoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela i pisanja rada. Također hvala i dr. sc. Veroniki Gunjević te mag. ing. Anji Damjanović na pomoći pri eksperimentalnom dijelu, ali i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na uvijek ugodnoj radnoj atmosferi i dobrom raspoloženju.*

*Hvala cijeloj mojoj obitelji i prijateljima što su vjerovali u mene i motivirali me te bili podrška sve ove godine studiranja. Upornost se isplatila!*

## 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  
Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

### PRIMJENA EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČNIM OTAPALIMA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

*Valentina Rožić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058212332*

**Sažetak:** Za zelenu ekstrakciju bioaktivnih spojeva upotrebljavaju se prirodna niskotemperaturna eutektična otapala (NADES), kao potencijalna zamjena za štetna konvencionalna otapala. Ekstrakti u NADES-u imaju GRAS status i smatraju se sigurnima za ljudsku prehranu. Komina grožđa, nusproizvod vinske industrije, bogata je bioaktivnim spojevima primjenjivima u prehrambenoj industriji. Bioaktivnost polifenola u hrani ovisi o njihovoj stabilnosti u procesu probave, stoga je cilj ovoga rada ispitati stabilnost polifenola iz komine grožđa u NADES-u. Pripremljeni su ekstrakti komine grožđa bogati vinskom kiselinom i polifenolima u NADES-ima prethodno odabranima COSMOtherm programom. Najviši sadržaj vinske kiseline dobiven je pomoću otapala kolin klorid:urea. Betain:saharoza odabrana je za ekstrakciju polifenola. HPLC analizom određena je prisutnost katehina, epikatehina, epigalokatehina te rutin trihidrata. Na temelju svih ispitanih parametara, NADES može uspješno zamijeniti konvencionalna otapala u procesu ekstrakcije. Također, analizirana je razgradnja polifenola u NADES-u *in vitro* simulacijom gastrointestinalnoga trakta te propusnost polifenola kroz umjetnu membranu PAMPA metodom. S obzirom na uočenu biostabilnost polifenola u NADES-u, ispitani ekstrakti imaju potencijal primjene u prehrambenoj industriji.

**Ključne riječi:** *prirodna niskotemperaturna eutektična otapala, polifenoli, komina grožđa, COSMOtherm, prehrambena industrija*

**Rad sadrži:** 56 stranica, 18 slika, 5 tablica, 52 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Manuela Panić

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (mentor)
3. prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Natka Ćurko (zamjenski član)

**Datum obrane:** 23. studeni 2022.

## 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  
**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### APPLICATION OF GRAPE POMACE EXTRACTS IN DEEP EUTECTIC SOLVENTS IN THE FOOD INDUSTRY

*Valentina Rožić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058212332*

**Abstract:** For the green extraction of bioactive compounds, natural deep eutectic solvents (NADES) are used, as a potential replacement for harmful conventional solvents. NADES extracts have GRAS status and are considered safe for human consumption. Grape pomace, a byproduct of the wine industry, is rich in bioactive compounds applicable in the food industry. The bioactivity of polyphenols in food depends on their stability in the digestion process, therefore the aim of this work is to examine the stability of polyphenols from grape pomace in NADES. Grape pomace extracts rich in tartaric acid and polyphenols were prepared in NADES previously selected using COSMOtherm. The highest content of tartaric acid was obtained using the solvent choline chloride:urea. Betaine:sucrose was chosen for polyphenol extraction. HPLC analysis determined the presence of catechin, epicatechin, epigallocatechin and rutin trihydrate. Based on all tested parameters, NADES can successfully replace conventional solvents in the extraction process. Therefore, the polyphenol degradation in NADES was analyzed by simulating the gastrointestinal tract *in vitro* and the permeability of polyphenols through an artificial membrane using the PAMPA method. Considering the observed biostability of polyphenols in NADES, the tested extracts have the potential application in the food industry.

**Keywords:** *natural deep eutectic solvents, grape pomace, polyphenols, COSMOtherm, food industry*

**Thesis contains:** 56 pages, 18 figures, 5 tables, 52 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** *Manuela Panić, PhD.*

#### **Reviewers:**

1. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (president)
2. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor (mentor)
3. Karin Kovačević Ganić, PhD, Full professor (member)
4. Natka Čurko, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** November 23<sup>rd</sup>, 2022



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
<b>2. 1. GROŽĐE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA</b> .....	3
2. 1. 1. Grožđe kao izvor polifenola .....	5
2. 1. 2. Primjena polifenola u prehrambenoj industriji .....	6
<b>2. 2. ZELENA EKSTRAKCIJA</b> .....	10
2. 2. 1. Niskotemperaturna eutektična otapala .....	11
2. 2. 1. 1. Svojstva eutektičnih otapala .....	14
2. 2. 1. 2. Primjena eutektičnih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
<b>3. 1. MATERIJALI</b> .....	18
3. 1. 1. Komina grožđa .....	18
3. 1. 2. Kemikalije .....	18
3. 1. 3. Otopine i puferi .....	19
3. 1. 4. Oprema .....	21
<b>3. 2. METODE RADA</b> .....	21
3. 2. 1. Određivanje udjela suhe tvari komine .....	21
3. 2. 2. Priprema ekstrakata komine grožđa bogatih ugljikohidratima topljivima u vodi .....	22
3. 2. 2. 1. <i>Određivanje ugljikohidrata dehidracijom s mineralnom kiselinom</i> .....	22
3. 2. 3. Priprema ekstrakata komine grožđa bogatih taninima .....	23
3. 2. 3. 1. <i>Određivanje udjela tanina Bate-Smith metodom</i> .....	23
3. 2. 4. Procjena topljivosti polifenola i vinske kiseline u eutektičnim otapalima pomoću COSMOtherm programa .....	24
3. 2. 5. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičnih otapala (NADES-a) .....	27
3. 2. 6. Priprema ekstrakata komine grožđa bogatih vinskiom kiselinom .....	27
3. 2. 6. 1. <i>Određivanje koncentracije vinske kiseline</i> .....	28
3. 2. 7. Priprema ekstrakata komine grožđa bogatih polifenolima .....	29
3. 2. 7. 1. <i>Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom</i> .....	29
3. 2. 7. 2. <i>Određivanje polifenola u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)</i> .....	31
3. 2. 8. <i>In vitro</i> simulacija gastrointestinalnog trakta .....	32
3. 2. 9. Određivanje propusnosti kroz umjetnu membranu PAMPA metodom .....	33
<b>3. 3. OBRADA REZULTATA</b> .....	35
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	36
<b>4. 1. KARAKTERIZACIJA KOMINE GROŽĐA</b> .....	37
<b>4. 2. ODABIR NADES-a</b> .....	39

<b>4. 3. UKUPNA VINSKA KISELINA U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIMA POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA .....</b>	<b>42</b>
<b>4. 4. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIMA POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA .....</b>	<b>43</b>
4. 4. 1. Usporedba ukupnih polifenola u ekstraktima pripremljenima pomoću DES-a i konvencionalnih otapala.....	43
4. 4. 2. Maksimalni polifenolni kapacitet NADES-a.....	44
<b>4. 5. POLIFENOLI DETEKTIRANI U KOMINI GROŽĐA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) .....</b>	<b>46</b>
<b>4. 6. <i>In vitro</i> RAZGRADNJA POLIFENOLA IZ EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA SIMULACIJOM GASTROINTESTINALNOG TRAKTA .....</b>	<b>47</b>
<b>4. 7. PROPUSNOST POLIFENOLA IZ EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA KROZ UMJETNU MEMBRANU .....</b>	<b>48</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>50</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>51</b>

# 1. UVOD

Vinarska industrija stvara velike količine otpadnih nusproizvoda, od kojih je najznačajnija komina grožđa koju čini mješavina sjemenki, pokožice i peteljki grožđa (Costa i sur., 2019). Kominu karakterizira visoka količina polifenolnih spojeva i sekundarnih biljnih metabolita, s potencijalnim korisnim učincima na ljudsko zdravlje (Antonić i sur., 2020). Zbog svoje biološke aktivnosti ove su fitokemikalije dokazano važan čimbenik u ljudskoj prehrani. Prehrana koja uključuje hranu bogatu polifenolima potiče fermentaciju u debelome crijevu, regulira razinu glukoze u krvi, sprječava pretilost i kardiovaskularne bolesti te je općenito korisna za ljudsko gastrointestinalno zdravlje (Costa i sur., 2019). Stoga je komina izvor bioaktivnih spojeva s antioksidativnim, antimikrobnim i protuupalnim djelovanjem (Caponio i sur., 2022). Recikliranje ovoga otpada kao sirovine za izolaciju bioaktivnih komponenti može povećati ekonomičnost proizvodnje smanjenjem količine otpada te stvaranjem dodane vrijednosti. Sveobuhvatno korištenje ovoga nusproizvoda korisno je za ublažavanje onečišćenja okoliša i postizanje održivosti prehrambene industrije (Cai i sur., 2021). Štoviše, ovaj bi način valorizacije mogao donijeti dodanu vrijednost cjelokupnom procesu proizvodnje vina (Jara-Palacios i sur., 2014).

Kako bi se biološki aktivni spojevi iz ovoga nusproizvoda mogli primijeniti u prehrambenoj industriji, potrebno je naći otapala za ekstrakciju koja bi mogla biti sigurna za ljudsku prehranu, a ujedno ekstrakti dobiveni takvim otapalima bi trebali biti spremni za upotrebu. Zadnjih godina predložena su prirodna niskotemperaturna eutektična otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) koja su mješavina prirodnih primarnih metabolita, kao što su šećeri, aminokiseline ili polioli te se zato njihova konzumacija smatra sigurnom za ljudsku prehranu (Panić i sur., 2019). Budući da je broj mogućih kemijskih struktura ovih otapala velik, a ekstrakcija pomoću njih poštuje principe zelene kemije, posljednjih godina postala su vrlo zanimljiva za upotrebu u prehrambenoj industriji kao zamjena za štetna i hlapljiva konvencionalna otapala (Mišan i sur., 2020). Osim toga, NADES-i pokazuju povećanu biološku aktivnost i stabilnost polifenola (Dabetić i sur., 2020), stoga je važno razumjeti princip njihove apsorpcije u organizmu čovjeka nakon konzumacije proizvoda obogaćenih ekstraktima dobivenim pomoću NADES-a.

Cilj ovoga rada je pripremiti ekstrakte spremne za upotrebu u prehrambenoj industriji, koji su bogati biološki aktivnim spojevima (polifenolima, vinskom kiselinom) iz otpada proizvodnje vina (komine grožđa) koristeći NADES kao ekstrakcijsko otapalo. Prvo je

provedena kemijska karakterizacija komete grožđa sorte Graševina određivanjem udjela ugljikohidrata, tanina, polifenola i vinske kiseline. Za dizajn idealnoga NADES-a korišten je COSMO*therm* program. Zatim su provedene ekstrakcije vinske kiseline i polifenola iz komete s izabranim otapalima. Količina vinske kiseline u ekstraktima određena je pomoću komercijalnoga testa, a koncentracija polifenola Folin-Ciocalteu reagensom. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti identificirani su i kvantificirani pojedini polifenoli. Nadalje, ispitana je biološka aktivnost i dostupnost polifenola u NADES-u kroz simulaciju gastrointestinalne probave, a propusnost kroz stijenku tankoga crijeva simulirana je PAMPA metodom. Svi rezultati uspoređeni su s ekstraktima pripremljenim konvencionalnim otapalima kako bi se usporedila primjena NADES-a u ekstrakcijama biološki aktivnih spojeva.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2. 1. GROŽĐE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA

Grožđe je najveća svjetska voćna kultura s godišnjom proizvodnjom većom od 75 milijuna tona, pri čemu se gotovo 80 % koristi u proizvodnji vina (Antonić i sur., 2020; Dabetić i sur., 2020). Grožđe i proizvodi dobiveni od grožđa, kao što su vino, sok, džemovi i grožđice, imaju veliku gospodarsku važnost (Fontana i sur., 2013). Proizvodnja vina trenutno je jedna od najvažnijih agroindustrijskih djelatnosti u svijetu (Corrêa i sur., 2017).

Proizvodnja vina je značajna poljoprivredna grana i u Republici Hrvatskoj. Ukupna proizvodnja grožđa u vinskoj 2020. godini iznosila je 125 000 tona, od čega najveći udio čini Graševina (slika 1) koja zauzima više od 60 % ukupne površine koja se koristi za proizvodnju vina u kontinentalnoj Hrvatskoj (Sokač i sur., 2022). Tom proizvodnjom stvaraju se i velike količine krutoga otpada, ponajviše komine grožđa kao glavnog nusproizvoda, koji čini oko 25 % ukupne mase grožđa (Sirohi i sur., 2020; Bordiga i sur., 2019), što ukupno iznosi 5-10 milijuna tona na svjetskoj razini, a procjena na razini Hrvatske je preko 15 000 tona krutoga otpada godišnje (Sokač i sur., 2022; Panić i sur., 2021).



**Slika 1.** Grožđe sorte Graševina (vlastita fotografija)

Tradicionalno se proizvodnja vina smatrala ekološki prihvatljivim procesom. Međutim, proizvodnja kao takva zahtijeva znatnu količinu resursa (npr. vode, gnojiva i organskih

podataka), a istovremeno proizvodi veliku količinu nusproizvoda i otpada (Bordiga i sur., 2019; Costa i sur., 2019). Valorizacija komine grožđa, nusproizvoda vinarske industrije, može donijeti dodanu vrijednost procesu proizvodnje vina iskorištavanjem biološki aktivnih spojeva iz komine grožđa (Sokač i sur., 2022; Mišan i sur., 2020), što može osigurati ekonomsku dobit, a istovremeno doprinijeti manjem negativnom utjecaju na okoliš (Panić i sur., 2019). Stoga je svijest o otpadu nastalom kod proizvodnje vina kao visokovrijednom nusproizvodu i njegovom potencijalu kao sirovine danas značajno porasla (Panić i sur., 2021).

Tradicionalno se komina grožđa koristila za proizvodnju različitih vrsta destilata, kao gnojivo ili kao dodatak stočnoj hrani (Caponio i sur., 2022; Bordiga i sur., 2019), ali prisutnost polimernih polifenola (lignina) smanjuje njenu probavljivost jer polifenoli inhibiraju celulolitičke i proteolitičke enzime, kao i rast bakterija buraga (Fontana i sur., 2013). Osim toga, velike količine komine grožđa odložene na odlagališta u kratkome vremenskom periodu tijekom sezone berbe mogu imati negativne učinke na biorazgradnju zbog prisutnosti polifenola koji doprinose sniženju pH te inhibiraju mikrobiološku razgradnju (Antonić i sur., 2020; Bordiga i sur., 2019). Nadalje, odlaganje ovoga nusproizvoda dovodi i do zagađenja zemlje, nadzemnih i podzemnih voda, što doprinosi velikome organskom opterećenju (Taladrid i sur., 2021), te do privlačenja insekata koji mogu širiti bolesti, ali i do osiromašenja tla kisikom zbog tanina koji imaju visoku potrošnju kisika pri njihovoj razgradnji (Panić i sur., 2021).

S druge strane, komina grožđa sadrži značajne količine tvari koje se mogu ekstrahirati i izolirati, a ujedno se smatraju korisnima za zdravlje (Panić i sur., 2019). Neki čimbenici okoliša (npr. sorta, sadnja i uzgoj), kao i način prerade grožđa pri proizvodnji vina, mogu utjecati na kemijski sastav komine grožđa. Iako su procesi kod prerade grožđa poprilično intenzivnog karaktera (npr. prešanje), kemijski sastav komine grožđa, vezan uz sadržaj bioaktivnih spojeva, ne mijenja se značajno. Posljedično, značajna količina bioaktivnih molekula još uvijek bude prisutna u takvome nusproizvodu (Punzo i sur., 2021; Dabetić i sur., 2020; Bordiga i sur., 2019).

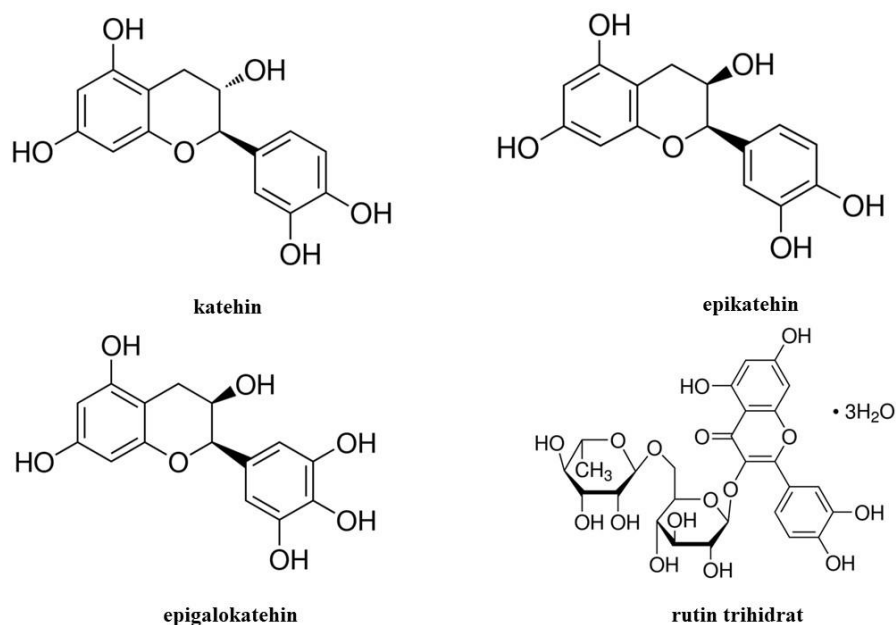
Pokožice, sjemenke, peteljke i ostatak pulpe predstavljaju glavne komponente komine grožđa (Bordiga i sur., 2019; Costa i sur., 2019). U komini su najzastupljenija dijetalna vlakna, posebice glikan, celuloza i pektin te polifenolni spojevi koji uglavnom ostaju u komini nakon procesa proizvodnje vina (Antonić i sur., 2020) zbog njihove nepotpune ekstrakcije (Corrêa i sur., 2017), što naglašava moguću nutritivnu vrijednost komine grožđa kao dodatka prehrani (Fontana i sur., 2013).

Sjemenke grožđa bogate su ekstraktabilnim fenolnim antioksidansima, kao što su fenolna kiselina, flavonoidi, procijanidini i resveratrol, dok pokožica grožđa sadrži obilje antocijana i tartarata (Yu i Ahmedna, 2013). Komina također sadrži i značajne količine lipida, proteina, neprobavljivih vlakana i minerala. Sjemenke grožđa sadrže 13-19 % ulja, koje je bogato esencijalnim masnim kiselinama, oko 11 % proteina, 60-70 % neprobavljivih ugljikohidrata i drugih antioksidansa kao što su tokoferoli i  $\beta$ -karoten (Panić i sur., 2021; Yu i Ahmedna, 2013).

### 2. 1. 1. Grožđe kao izvor polifenola

Kominu grožđa karakteriziraju velike količine polifenola zbog nepotpune ekstrakcije tijekom procesa proizvodnje vina (Antonić i sur., 2020; Fontana i sur., 2013). Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji su bitan dio ljudske prehrane zbog svojih iznimnih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava te antimutagenog, antikarcinogenog i protuupalnog djelovanja (Rajha i sur., 2022; Bordiga i sur., 2019). Polifenolni spojevi u svojoj molekularnoj strukturi sadrže nekoliko hidroksilnih skupina vezanih na jedan ili više aromatskih prstenova (Yu i Ahmedna, 2013). Mogu u svojoj strukturi imati vezane monosaharide, disaharide i oligosaharide (Cutrim i Cortez, 2018). Postoje u različitim oblicima spojeva, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, antocijanini, tanini, lignani i stilbeni (Cai i sur., 2021). Fenolni spojevi sadržani u grožđu i vinu općenito se mogu klasificirati u tri skupine: (1) fenolne kiseline (benzojeva i hidroksicimetna kiselina), (2) jednostavni flavonoidi (katehini, flavonoli i antocijani) te (3) tanini i proantocijanidini (Sokač i sur., 2022). Među fenolnim spojevima grožđa najzastupljeniji su antocijanini, hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina, flavonoli, flavan-3-oli i stilbeni (Bordiga i sur., 2019).

Resveratrol je, kao najzastupljeniji stilben, fitoaleksin koji se proizvodi u biljci kao odgovor na napad patogena i prirodni je fungicid te ima nisku toksičnost za ljude (Bordiga i sur., 2019; Yu i Ahmedna, 2013). Fenolne kiseline dijele se na hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Hidroksicimetne kiseline su češće od hidroksibenzojeve, a uglavnom uključuju galnu kiselinu, *p*-kumarinsku, kafeinsku, ferulinsku i sinapinsku kiselinu. Najbolje proučeni polifenoli su flavonoidi koji se dijele u sedam podrazreda: flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, antocijanini, flavanoli (ili katehini i procijanidini) i čalkoni (Yu i Ahmedna, 2013). Još jedna skupina flavonoida, koja nije uključena u ovu klasifikaciju, su proantocijanidini.



**Slika 2.** Strukturne formule polifenola identificiranih i kvantificiranih u ovome radu (vlastita fotografija, izrađena pomoću PowerPoint programa)

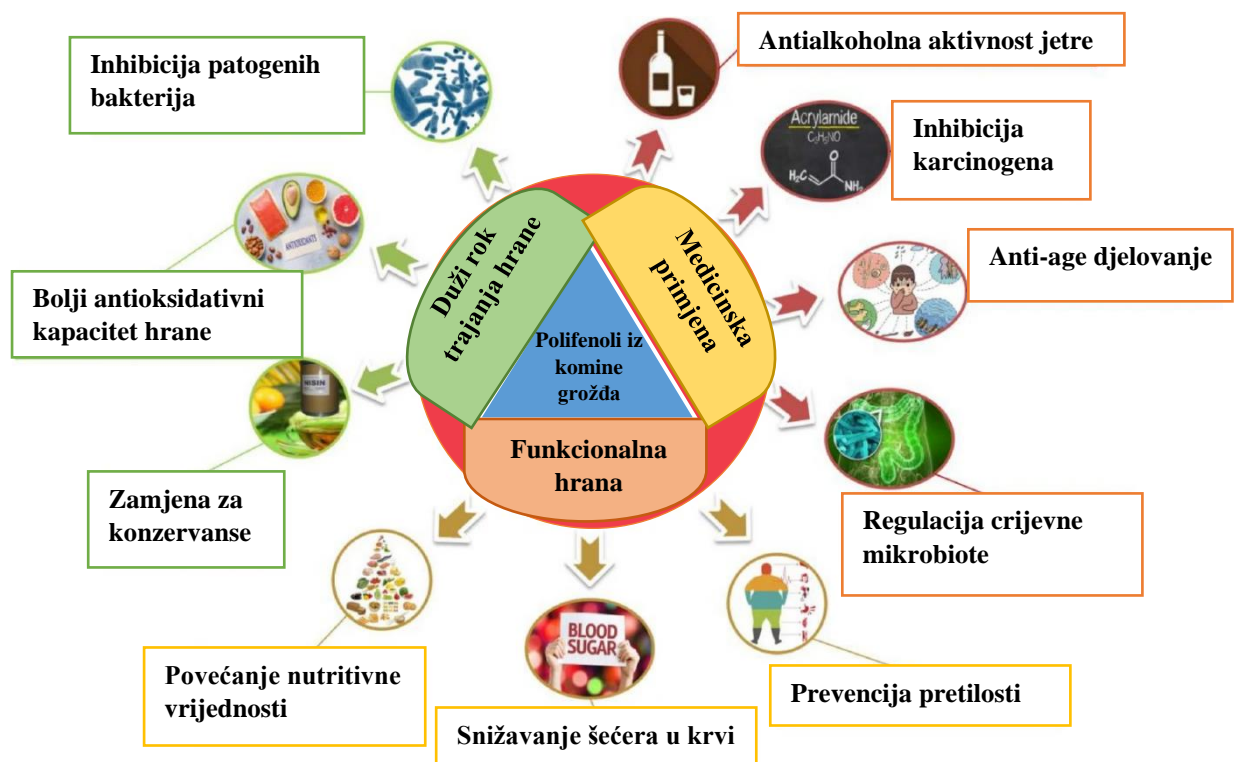
Sastav polifenola svakoga dijela komine varira ovisno o sorti grožđa i pod utjecajem je mjesta uzgoja, klime, zrelosti i vremena fermentacije (Dabetić i sur., 2020). Crvene sorte obično su bogate antocijaninima (69-151 mg kg<sup>-1</sup> svježega grožđa), koji su u zanemarivim količinama prisutni u bijelim sortama, dok su flavan-3-oli (slika 2) najzastupljeniji fenoli u bijelim sortama grožđa (52-81 mg kg<sup>-1</sup> svježeg grožđa). Pokožica grožđa dokazano je bogat izvor antocijanina, hidroksicimetnih kiselina, flavanola i flavonolnih glikozida, dok su galna kiselina i flavan-3-oli (monomeri katehin, epikatehin i epikatehin-3-O-galat) uglavnom prisutniji u sjemenkama (Yu i Ahmedna, 2013).

## 2. 1. 2. Primjena polifenola u prehrambenoj industriji

U današnje doba, prehrambena industrija suočava se s izazovima smanjenja količine otpada, boljeg iskorištavanja dobivenih nusproizvoda i izolacije bioaktivnih spojeva koji se mogu dalje koristiti (Mišan i sur., 2020). S povećanjem svijesti potrošača o korištenju aditiva u hrani i pozornosti koju je funkcionalna hrana zadobila posljednjih godina, sve je veća potražnja za zdravim i prirodnim sastojcima hrane koji mogu zamijeniti sintetske antioksidanse i tvari za konzerviranje hrane (Taladrid i sur., 2021; Fontana i sur., 2013). Stoga je ekstrakcija polifenola iz komine grožđa te stabilizacija i integracija tih spojeva u prehrambene proizvode postala veliko istraživačko područje (Cai i sur., 2021).



Polifenoli imaju snažno antioksidativno, protuupalno i antibakterijsko djelovanje te mogu ojačati stijenke krvnih žila, olakšati gastrointestinalnu probavu, inhibirati oksidaciju lipida te spriječiti arteriosklerozu i nastanak tromba, ali posjeduju i antikarcinogeno djelovanje te inhibicijom kolagenaze sprječavaju starenje stanica kože (Rajha i sur., 2022; Cai i sur., 2021). Posljednjih godina polifenoli se koriste u različite svrhe, kao što su produljenje roka trajanja hrane, razvoj funkcionalne hrane te u medicini (slika 3). Tijekom toplinske obrade hrane, ekstrakti polifenola mogu smanjiti stvaranje kancerogenog spoja akrilamida (Bordiga i sur., 2019). Mnogi znanstvenici dokazali su pozitivne učinke dodavanja ekstrakata komine grožđa bogatih polifenolima u hranu poput proizvoda od brašna, mesnih i mliječnih proizvoda te mnogih drugih (Antonić i sur., 2020). Dosad je utvrđeno da dodatak ekstrakata polifenola iz komine grožđa može poboljšati antioksidativno djelovanje mesnih (pileće i svinjske pljeskavice, riba) i mliječnih (sir, jogurt) proizvoda bez utjecaja na senzorske karakteristike tih namirnica (Cai i sur., 2021). Štoviše, nekim proizvodima s dodanim polifenolima poboljšaju se senzorska svojstva (Cutrim i Cortez, 2018). Ekstrakti komine grožđa mogu se koristiti i kao aditiv za bojenje voćnih sokova i aromatiziranih pića (Yu i Ahmedna, 2013).



**Slika 3.** Različite primjene polifenola iz komine grožđa (prema Cai i sur., 2021)

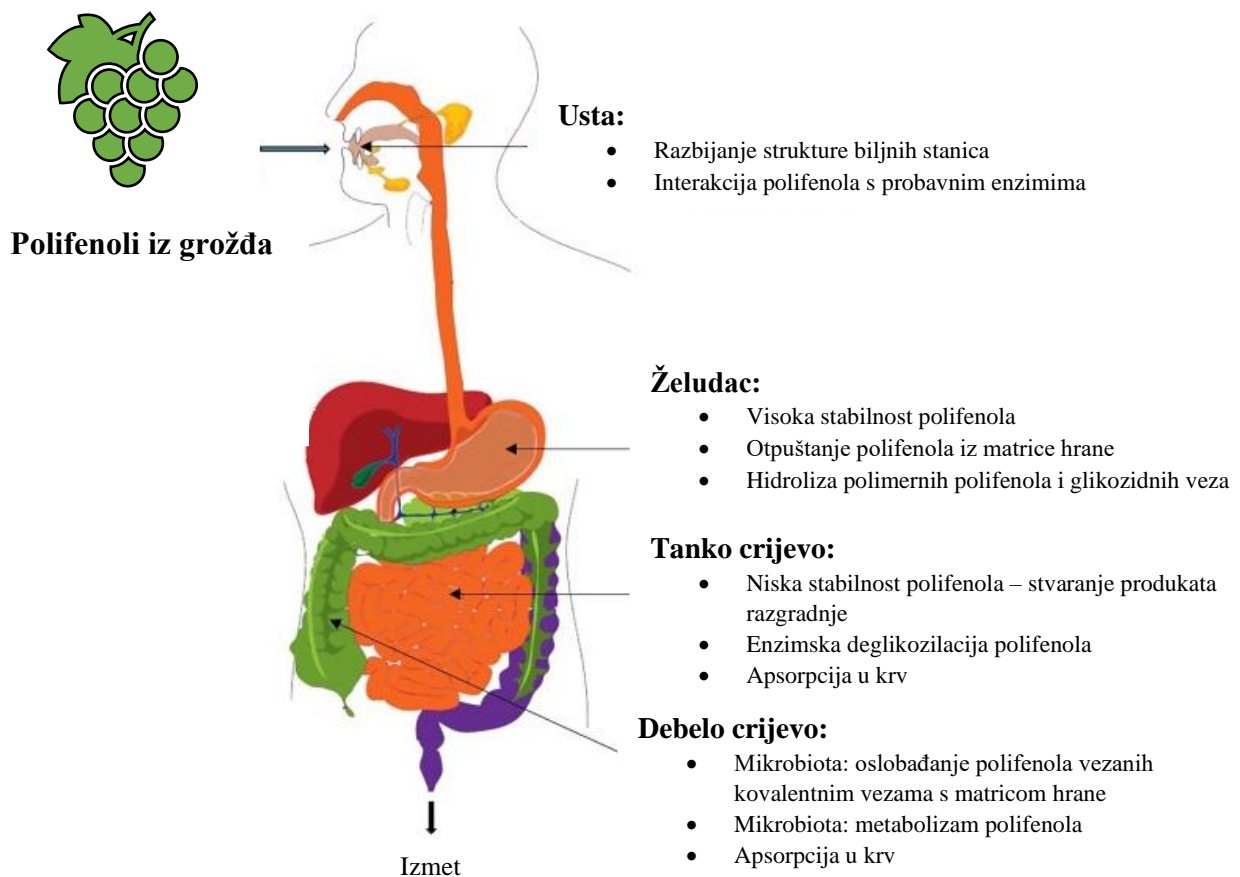
Nadalje, vinska kiselina još je jedan zanimljiv metabolit dobiven iz komine grožđa, koji se može primijeniti kao sredstvo za zakiseljavanje i pojačivač okusa u prehrambenoj, pekarskoj i farmaceutskoj industriji, a pokazuje antioksidativne i konzervansne aktivnosti te regulira pH (Sokač i sur., 2022). Također, ima ugodan kiselkasti okus i može dati pozitivne senzorske karakteristike proizvoda. Prisutnost vinske kiseline u komini grožđa povezana je sa ostacima pulpe, jer pulpa općenito ima najviše razine vinske kiseline (García-Lomillo i González-SanJosé, 2017).

U novije vrijeme posebnu pozornost privukao je utjecaj gastrointestinalne probave na sadržaj fitokemikalija u hrani, te na njihovu bioaktivnost, posebice antioksidativni kapacitet (Corrêa i sur., 2017). Premda polifenoli pozitivno djeluju na zdravlje ljudi, njihova učinkovitost ovisi o bioraspoloživosti, antioksidativnoj aktivnosti i protuupalnim svojstvima na mjestima djelovanja (Mišan i sur., 2020). Međutim, bioraspoloživost polifenola ovisi i o drugim svojstvima, uključujući: (1) relativni sadržaj spojeva koji se oslobađaju iz matrice hrane duž probavnoga sustava (biodostupnost), (2) stabilnost takvih spojeva tijekom probave te (3) učinkovitost propusnosti u intestinalnoj apsorpciji (Caponio i sur., 2022).

Pokusi *in vivo* na životinjama i ljudima daju precizne podatke o probavi, ali zahtijevaju dosta vremena i materijalnih sredstava. To objašnjava razvoj *in vitro* modela koji su u korelaciji s *in vivo* eksperimentima. *In vitro* simulacija gastrointestinalne probave predstavlja koristan alat za procjenu biodostupnosti i probavljivosti bioaktivnih spojeva iz hrane (Morgana i sur., 2022). Gastrointestinalni simulacijski modeli obično uključuju razgradnju hrane u ustima, želucu i tankome crijevu te pokušavaju prikazati fiziološka stanja u probavnome sustavu uzimajući u obzir prisutnost probavnih enzima i soli te njihovu koncentraciju, pH vrijednost i vrijeme zadržavanja u pojedinom dijelu probavnoga sustava (Jurinjak Tušek i sur., 2020).

Probava i apsorpcija polifenola u probavnome sustavu regulirana je njihovim biološkim svojstvima (slika 4). Samo polifenoli koji su oslobođeni iz matrice hrane u tankom i debelom crijevu mogu se probaviti. Polifenoli se obično nalaze u obliku estera, glikozida i polimera, koji se ne mogu apsorbirati u svome prirodnom obliku te zahtijevaju hidrolizu probavnim enzimima ili crijevnom mikroflorom. Nakon unosa, hidroliza flavonoidnih glikozida u jedinice glukoze odvija se u usnoj šupljini. Potom polifenoli ulaze u želudac gdje se apsorbira mali dio fenolnih kiselina. Brojni čimbenici utječu na apsorpciju probavljenih sastojaka u tankome crijevu poput molekulske mase, glikolizacije i esterifikacije. Povećanjem molekulske mase smanjuje se mogućnost apsorpcije u tankom crijevu, pa se iz toga razloga visokomolekularni proantocijanidi ne apsorbiraju u tankome crijevu. Većina flavonoida, osim flavanola, nalazi se

u obliku glikozida, a tip šećerne jedinice ima značajan utjecaj na apsorpciju pojedinih flavonoida u tankome crijevu. Većina flavonoidnih glikozida apsorbira se u tankome crijevu, a cijepaju ih crijevne bakterije ili enzimi  $\beta$ -glikozidaze. Samo 5 % polifenola apsorbira se u tankome crijevu, dok ostalih 95 % prolazi kroz debelo crijevo kako bi ih mikrobiom fermentirao (Jurinjak Tušek i sur., 2020; Nagar i sur., 2020).



**Slika 4.** Prolazak polifenola kroz gastrointestinalni trakt (prema Nagar i sur., 2020)

Prolazak bioaktivnih spojeva kroz crijevni epitel može se dogoditi transcelularnim ili paracelularnim putevima. Transcelularni putovi odvijaju se putem olakšane, pasivne difuzije ili aktivne difuzije kroz staničnu membranu (Human, 2019). Najčešće korištene *in vitro* metode za predviđanje propusnosti su stanične (najčešće Caco-2 stanice) i PAMPA (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). PAMPA model može se učinkovito koristiti kao *in vitro* model za transcelularnu pasivnu apsorpciju prirodnih proizvoda, a naširoko se koristi u farmaceutskim industrijama za određivanje propusnosti lijekova. Brzina prodiranja kroz jednostavnu umjetnu membranu, koja oponaša pasivni transcelularni transport, dobar je pokazatelj potencijala apsorpcije lijeka (Krstić i sur., 2015). PAMPA model brza je i jeftina tehnika koja se rutinski koristi za predviđanje pasivnog transporta spojeva kroz tri glavne

biološke barijere: kožnu barijeru, krvno-moždanu barijeru i barijeru gastrointestinalnog trakta (Bélair i sur., 2021). Budući da su polifenoli tvari koje se apsorbiraju pasivnim transcelularnim transportom, PAMPA test prikladna je metoda za procjenu njihove propusnosti (Krstić i sur., 2015). Upotrebom specifičnog sastava umjetne membrane može se simulirati apsorpcija polifenola kroz gastrointestinalni trakt (Human, 2019).

## 2. 2. ZELENA EKSTRAKCIJA

Različita otapala upotrebljavaju se u brojnim industrijama za ekstrakciju krutih komponenata, prijenos tvari i topline te pri izdvajanju i pročišćavanju produkata. Smatra se da hlapljiva organska otapala uzrokuju brojne negativne učinke na okoliš, poput promjene klime na globalnoj razini, onečišćenja zraka, narušavanja ozonskoga omotača, narušavanja ljudskoga zdravlja i dr. Osim toga, većina tradicionalno upotrijebljenih organskih otapala je toksična, zapaljiva i korozivna, a njihova regeneracija i ponovna uporaba povezana je s energetski zahtjevnom destilacijom uz znatne gubitke (Radović i sur., 2021). Današnja velika potreba za ekstraktima biološki aktivnih spojeva zadovoljava se ekstrakcijama koje se obično provode u prisutnosti organskih otapala, kao što su metanol, etanol i aceton (Chen i sur., 2019).

Kemičar P. T. Anastas je 1991. godine ukazao na potrebu za smanjenjem štetnih otapala te pronalaskom novih, ekološki prihvatljivih i neškodljivih otapala koja se mogu reciklirati, kroz program nazvan zelena kemija, koji se zasniva na prihvatljivom usuglašavanju ekonomskih i ekoloških zahtjeva tijekom proizvodnje različitih industrijskih kemikalija (Radović i sur., 2021). Jedna od važnih grana zelene kemije je zelena ekstrakcija koja se definira kao dizajniranje ekstrakcijskoga procesa koji smanjuje potrošnju energije, omogućuje upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurava siguran i visoko kvalitetan proizvod – ekstrakt. S obzirom na potražnju za održivim i zelenim procesima, razvoj zelenih otapala postaje glavnim prioritetom za postizanje sigurnijih postupaka ekstrakcije (Morgana i sur., 2022). Prema principima zelene kemije alternativna otapala trebaju se temeljiti na sigurnosti radnika (netoksičnost, nekancerogenost, nemutagenost), sigurnosti procesa (nezapaljivost, neeksplozivnost, nehlapljivost), sigurnosti okoliša (ekotoksičnost, postojanost, bez kontaminacije podzemnih voda) i održivosti procesa (sposobnost recikliranja i mogućnost višekratne uporabe). Stoga bi se istraživači trebali usredotočiti na mogućnost primjene novih netoksičnih otapala koja zadovoljavaju GRAS (eng. *Generally Recognised as Safe*) status (Fontana i sur., 2013), a među njima se ističu ionske kapljevine, superkritični fluidi, fluorirana

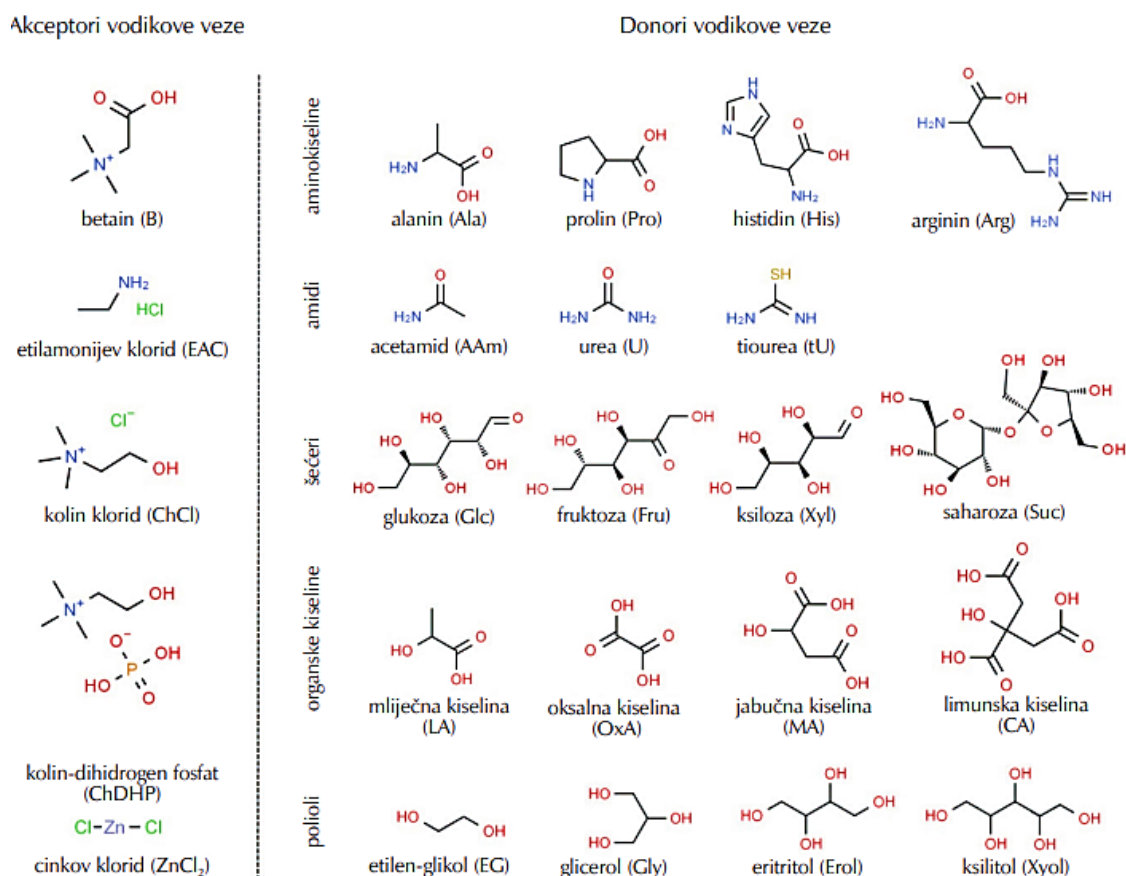
otapala te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora (npr. niskotemperaturna euteklična otapala i otapala na bazi glicerola) (Radović i sur., 2021). Ionske kapljevine su grupa otapala nastala spajanjem organskoga kationa i organskoga ili anorganskoga aniona, a temperatura tališta takvoga otapala je ispod 100 °C. Posljednjih desetljeća razvijene su sintetičke ionske kapljevine, koje imaju prednost da su na sobnoj temperaturi nezapaljive, nehlapljive i lako se recikliraju, ali su izrađene od nafte što utječe na njihovu sigurnost i prikladnost za primjenu u prehrambenoj industriji (Mišan i sur., 2020). S ciljem razvoja ekološki prihvatljivih otapala koja mogu biti upotrebljavana u hrani, niskotemperaturna euteklična otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) nedavno su se pojavila kao nova i zelena otapala (Chen i sur., 2019).

### 2. 2. 1. Niskotemperaturna euteklična otapala

Primjena niskotemperaturnih eutekličnih otapala (DES-ova) – zelenih tekućina na bazi prirodnih sastojaka smatra se obećavajućom, ekološki prihvatljivom alternativom konvencionalnim organskim otapalima (Mišan i sur., 2020). DES-ovi pokazuju vrlo učinkovitu primjenu u različitim područjima poput elektrokemije, organske sinteze i (bio)katalize, biotehnologije i prehrambene tehnologije, farmaceutskog inženjerstva te biomedicine (Radović i sur., 2021). DES-ovi privlače veliku pozornost znanstvene zajednice zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava (npr. tekuće stanje u širokom temperaturnom rasponu, neznatna hlapljivost, biorazgradivost, kemijska i toplinska stabilnost, nezapaljivost, netoksičnost) (Panić i sur., 2021; Mišan i sur., 2020). Ova zelena otapala euteklična su smjese sastavljene od prirodnih metabolita prisutnih u svim stanicama i organizmima (Morgana i sur., 2022). Neka istraživanja sugeriraju da DES-ovi postoje u živim stanicama, uz vodu i lipide, kao treći medij u organizmu te imaju ključnu ulogu u održavanju metabolizma u biljkama u odsutnosti vode tijekom suše ili hladnoće (Mišan i sur., 2020). Štoviše, DES-ovi su uključeni u biosintezu, otapanje i skladištenje različitih, u vodi slabo topljivih metabolita i nestabilnih spojeva koji imaju važnu ulogu u stanici (Radović i sur., 2021).

DES je mješavina dviju ili više kemikalija koje su međusobno povezane vodikovim vezama, a posjeduje svojstvo eutekličnosti, odnosno ima temperaturu tališta daleko nižu od temperature tališta komponenata koje ga čine (Palmelund i sur., 2019). To svojstvo posljedica je delokalizacije naboja, koja ometa sposobnost kristalizacije kod jakih međumolekulskih interakcija (Radović i sur., 2021). DES-ovi se mogu lako sintetizirati miješanjem akceptora

vodikove veze (HBA) i donora vodikove veze (HBD) u određenom stehiometrijskom omjeru uz zagrijavanje i miješanje pri atmosferskome tlaku, dok ne nastane homogena smjesa. Najčešće korišteni HBA su jeftine kvaterne amonijeve soli (npr. kolin klorid), dok su HBD urea, etilen glikol, glicerol, šećeri, aminokiseline i karboksilne kiseline (Panić i sur., 2021; Chen i sur., 2019). Primjeri takvih spojeva s njihovim strukturnim formulama dani su na slici 5. Također, voda može ulaziti u sastav DES-ova s obzirom da je voda idealan spoj za stvaranje vodikove veze. Prisutnost vode (do 50 %) snižava točku taljenja nekih DES-ova i mijenja njihova fizikalno-kemijska i solvacijska svojstva (Mišan i sur., 2020). Osim toga, prisutnost određene količine vode u DES-u doprinosi smanjenju gustoće i viskoznosti otapala, što je iznimno važno kod njegove daljnje primjene (Radović i sur., 2021). DES-ovi se mogu podijeliti u 4 tipa, ovisno o tome koje komponente čine DES. Otapalo tip I čine kvaterna amonijeva sol i metalna sol, tip II kvaterna amonijeva sol i hidrat metalnog klorida, tip III kvaterna amonijeva sol i HBD, a tip IV hidrat metalnog klorida i HBD. Relativno nova skupina je i tip V kojega čine neionski HBA-i i HBD-i (Hansen i sur., 2020).



**Slika 5.** Primjeri spojeva za pripremu niskotemperaturnih eutektičnih otapala (Radović i sur., 2021)

Nedavno je uveden i pojam terapijska niskotemperaturna eutektična otapala (eng. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES) kao nova klasa eutektičnih otapala s mogućom primjenom u formulaciji lijekova. Djelatna tvar lijeka (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) može biti jedna od komponenata takvoga niskotemperaturnog eutektičnog otapala s mogućnošću kontroliranog otpuštanja u tijelo (Radović i sur., 2021). Ukoliko su DES-ovi pripremljeni od organskih kiselina, aminokiselina, šećera ili uree, tada se nazivaju prirodnim niskotemperaturnim eutektičnim otapalima (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Njihova prednost u odnosu na ionske kapljevine i DES-ove leži u još manjoj toksičnosti, boljem utjecaju na okoliš i većoj održivosti. Također, cijena pripreme je niska, moguće ih je reciklirati te su komponente za sintezu lako dostupne u prirodi (Mišan i sur., 2020).

Moguće je konstruirati DES-ove sa specifičnim fizikalno-kemijskim svojstvima i biološkom aktivnošću za određenu namjenu tako da zadovoljavaju tehnološke i ekonomske zahtjeve industrije (Radović i sur., 2021; Panić i sur., 2019). Međutim, eksperimentalno je skup i dugotrajan proces pronalaska optimalnoga DES-a za željenu ekstrakciju spojeva. Kako bi se uštedjelo vrijeme i novac te smanjio broj eksperimenata za pronalaženje najprikladnijega otapala među brojnim kombinacijama, može se koristiti softver COSMO $_{therm}$ . Trenutno se *Conductor-like Screening Model for Real Solvents* (COSMO-RS) smatra jednom od najpreciznijih *ab initio* računalnih metoda dostupnih za odabir otapala (Panić i sur., 2021).

NADES-i se mogu pripremiti primjenom nekoliko različitih fizikalnih metoda: isparavanjem, zagrijavanjem uz miješanje, sušenjem smrzavanjem, mljevenjem, zagrijavanjem uz pomoć ultrazvuka te pomoću mikrovalova (Mišan i sur., 2020). Unatoč tome, priprema NADES-a zagrijavanjem uz miješanje najčešća je korištena metoda. Ova metoda nije samo ekonomična, već omogućuje i jednostavno održavanje konstantne temperature i formiranje NADES-a, što je od velike važnosti u slučaju korištenja termički nestabilnih komponenata (Radović i sur., 2021; Mišan i sur., 2020). Takva jednostavna i laka priprema NADES-a visoke čistoće i bez stvaranja otpada zadovoljava svih 12 principa zelene kemije (Mišan i sur., 2020). Za kvantificiranje količine proizvedenog otpada određuje se E-faktor (eng. *Environmental factor*, *E-factor*), koji se definira kao kilogram proizvedenoga otpada po kilogramu proizvoda. Do stvaranja otpada ne dolazi ako se DES priprema u pravilno postavljenom molarnom omjeru HBA i HBD te se može pretpostaviti da E-faktor = 0 kg kg<sup>-1</sup> ima idealnu vrijednost (Radović i sur., 2021), što je također u skladu s principima zelene kemije.

### 2. 2. 1. 1. Svojstva eutektičnih otapala

Jedna od glavnih značajki DES-ova je njihova mogućnost korištenja kao ekstrakcijskih otapala za širok raspon različitih molekula. Upotreba DES-ova u ekstrakciji ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima DES-ova, kao što su talište, viskoznost, gustoća, polarnost i pH vrijednost. Fizikalno-kemijska svojstva ovise o strukturi i međumolekulskim interakcijama komponenata DES-a (Mišan i sur., 2020).

Gustoća DES-ova obično je veća od gustoće vode i tradicionalnih organskih otapala (npr. etanol, metanol, n-heksan i dr.) i kreće se u rasponu  $1,1 - 1,4 \text{ g cm}^{-3}$  (Radović i sur., 2021). Nadalje, viskoznost DES-a općenito je viša od viskoznosti konvencionalnih organskih otapala pri sobnoj temperaturi (veća od  $0,1 \text{ Pa s}$ ) zbog slabe pokretljivosti slobodnih grupa koja je pod utjecajem jakih međumolekulskih interakcija te zbog malih praznina u strukturi (Hansen i sur., 2020). Stoga se, za poboljšanje prijenosa mase tijekom ekstrakcija, viskoznost i gustoća DES-a može prilagoditi promjenom udjela vode i molarnoga omjera HBA-a i HBD-a, kao i temperature tijekom ekstrakcije (Chen i sur., 2019). Struktura tih otapala znatno utječe na spomenute karakteristike, pa su tako, primjerice, otapala na bazi kolin klorida sa šećerom kao donatorom vodikove veze najviskozija i najgušća, dok su ona na bazi poliola najmanje gusta i viskozna (Radović i sur., 2021).

Priroda komponenti koje sačinjavaju DES određuje i njegovu pH vrijednost. Otapala s organskom kiselinom kao donatorom vodikove veze su kisela ( $\text{pH} < 3$ ), dok su otapala koja sadrže amid kao donor vodikove veze bazična ( $\text{pH} > 8$ ) (Radović i sur., 2021). Što se tiče polarnosti, najviše upotrebljavani DES-ovi su polarni, pri čemu su otapala na bazi organskih kiselina najpolarnija, dok su ona na bazi šećera i poliola najmanje polarna (Mišan i sur., 2020). Najčešće istraživani DES-ovi uglavnom su hidrofилnog karaktera, no posljednjih su godina istraživanja proširena i za hidrofobna otapala (npr. mentol : oktanska kiselina u molarnom omjeru 1 : 1), čime se pruža mogućnost pripreme DES-ova različitih raspona polariteta i hidrofилnosti/hidrofobnosti (Radović i sur., 2021).

DES-ovi se smatraju ekološki sigurnim i netoksičnim zelenim otapalima. Međutim, važno pitanje za njihovu komercijalnu primjenu je njihov toksikološki utjecaj na različite žive organizme. Što se tiče njihove toksičnosti i biorazgradivosti, pretpostavka da su ta otapala neškodljiva temelji se na podacima o kemijskoj prirodi DES-ova, odnosno toksičnosti pojedinih komponenata koje ih sačinjavaju (većina komponenata dobiva se iz prirodnih izvora) (Mišan i sur., 2020). Većina ispitanih NADES-a smatra se biorazgradivima jer su komponente



koje čine takva otapala primarni metaboliti (aminokiseline, šećeri i sl.), koje mogu razgraditi različiti organizmi iz prirode (Radović i sur., 2021). Do sada je procijenjena toksičnost pojedinih DES-ova na različite organizme i stanične linije poput: bakterija (npr. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*), riba (*Cyprinus carpio*), vodenih rakova (*Artemia salina*), biljaka (korijen češnjaka *Allium sativum*, sjeme pšenice *Triticum aestivum*) i staničnih linija (npr. CCO). Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da otapala s prisutnim organskim kiselinama kao HBD (npr. oksalna, limunska, vinska i jabučna kiselina) pokazuju veću citotoksičnost od onih koja uključuju šećere kao HBD (npr. glukoza, manoza, fruktoza i ksiloza), što je vjerojatno povezano s niskim pH vrijednostima otapala koja u svojem sastavu posjeduju organske kiseline (Radović i sur., 2021; Mišan i sur., 2020; Radošević i sur., 2016a). Također, dokazano je i da veća prisutnost vode smanjuje toksičan učinak takvih otapala te olakšava njihovu biorazgradivost, ali smanjuje mikrobiološku stabilnost DES-a (Mišan i sur., 2020).

#### 2. 2. 1. 2. Primjena eutektičnih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva

Posljednjih godina DES-ovi se intenzivno proučavaju u: (1) elektrokemiji zbog električne provodnosti; (2) sintetskoj kemiji i (bio)katalizi zbog sposobnosti otapanja organskih i anorganskih spojeva; (3) biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji u procesima ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora, za obradu lignoceluloznih sirovina te u proizvodnji biodizela; (4) separacijskim procesima; (5) farmaceutskom inženjerstvu za razvoj novih formulacija aktivnih djelatnih tvari kao jedne od komponenti THEDES-a; (6) biomedicini kao sredstvo za čuvanje bioloških molekula i materijala i dr. (Radović i sur., 2021).

Dizajn zelenih i održivih metoda ekstrakcije zahtijeva otapala koja osiguravaju učinkovitu, sigurnu, održivu i isplativu alternativu konvencionalnim otapalima. To bi, također, trebalo uključivati smanjenje potrebne energije u koracima pročišćavanja ekstrakata. Ekstrakti spremni za upotrebu (eng. *ready-to-use*), koji se mogu izravno primijeniti u različitim prehrambenim, kozmetičkim, agrokemijskim i farmaceutskim proizvodima, poželjni su jer izbjegavaju dodatne skupe korake pročišćavanja (Panić i sur., 2021; Mišan i sur., 2020). Stoga se očekuje da se takvi ekstrakti mogu dobiti pomoću NADES-a, s obzirom da su njegove komponente prisutne u prirodi i dio su naše svakodnevne prehrane (Panić i sur., 2019), što je velika prednost u odnosu na konvencionalna otapala (Mišan i sur., 2020).

Biljni materijali bogat su izvor biološki aktivnih spojeva koji imaju pozitivan učinak na živi organizam. Iz toga razloga, mnoga znanstvena istraživanja usmjerena su na izolaciju takvih spojeva iz biljaka. Zbog visokoga sadržaja biološki aktivnih spojeva u komini grožđa, uloženi su znatni naponi kako bi se provela ekstrakcija ovih spojeva i proširila njihova uporaba u prehrambenoj industriji (Sokač i sur., 2022; Fontana i sur., 2013). Tako su za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz pokožice grožđa Radošević i sur. (2016b) ispitali NADES-e različitih pH vrijednosti i polarnosti. Korišteni NADES-i bili su bazirani na kolin kloridu s organskim kiselinama, koji su polarniji i imaju nižu pH vrijednost te šećerima i polialkoholima, čija polarnost je bliža metanolu i pH vrijednost im je viša. Rezultati su pokazali da NADES-i s organskim kiselinama dobro ekstrahiraju antocijane, dok je za druge fenolne spojeve bolje izabrati NADES-e sa šećerima. U brojnim pokusima prinosi ekstrakcije pomoću NADES-a bili su veći od onih s konvencionalnim organskim otapalima (Panić i sur., 2021). Također, povećana stabilnost prirodnih spojeva tijekom ekstrakcije i skladištenja (kao što su fenolni spojevi i  $\beta$ -karoten) još je jedna prednost korištenja NADES-a u odnosu na tradicionalna otapala (Mišan i sur., 2020). NADES-i su pokazali veliku sposobnost stabilizacije bioloških spojeva otvarajući zanimljive mogućnosti za razvoj nove funkcionalne hrane (Morgana i sur., 2022).

Budući da hidrofilni NADES-i imaju sličnu polarnost kao voda i najpolarnija organska otapala (metanol, etanol), većina primjena u literaturi odnosi se na ekstrakciju upravo fenolnih spojeva (Mišan i sur., 2020). Nestabilnost fenolnih spojeva utječe na aktivnost i potencijalne zdravstvene dobrobiti polifenola. Tijekom obrade, skladištenja ili u gastrointestinalnom traktu, ti spojevi brzo oksidiraju, što dovodi do značajnoga gubitka njihove biološke aktivnosti. Učinkovitost polifenola ovisi o zaštiti njihovih nezasićenih veza, osjetljivih na različite čimbenike (npr. oksidanse, pH i enzimske aktivnosti), čime se čuva stabilnost, bioaktivnost i bioraspoloživost aktivnih sastojaka (Bordiga i sur., 2019). Osim zelenoga karaktera NADES-a, činjenica da takva otapala posjeduju sposobnost bolje ekstrakcije i stabilnosti bioloških spojeva, NADES-i predstavljaju veliki potencijal za povećanje biopristupačnosti fenolnih spojeva komine grožđa tijekom procesa digestije (Morgana i sur., 2022; Panić i sur., 2021). Neka istraživanja sugeriraju da su NADES-i sa izoliranim katehinima spremni za upotrebu bez pročišćavanja katehina, budući da su katehini stabilni u NADES-u koji se sastoji od betaina, glicerola i glukoze (Jeong i sur., 2017). Stabilizirajuća sposobnost NADES-a objašnjava se postojanjem međumolekulskih interakcija, uglavnom vodikovih veza između otopljenih tvari i NADES-a koje stabiliziraju molekule otopljenih tvari i dovode do smanjenja njihova kretanja te posljedično štite otopljene tvari od razgradnje (Mišan i sur., 2020).

Zabilježeno je da NADES-i igraju važnu ulogu u poboljšanju antioksidativnog djelovanja biljnih ekstrakata samim posjedovanjem toga djelovanja (Dabetić i sur., 2020). Prethodno je dokazano da bi NADES korišten u svrhu ekstrakcije mogao pojačati antioksidacijsku aktivnost dobivenih biljnih ekstrakata, što bi se moglo objasniti aktivnostima hvatanja reaktivnih kisikovih vrsta samoga NADES-a ili spojeva koji tvore NADES (Panić i sur., 2019). Antioksidativna aktivnost NADES-a nije neočekivana jer neki spojevi koji ga čine (npr. limunska kiselina, jabučna kiselina, betain i prolin) također posjeduju antioksidacijsku aktivnost. Štoviše, primjena ovih otapala za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva mogla bi dovesti do selektivne ekstrakcije spojeva, što bi rezultiralo novim proizvodom koji se ne bi mogao dobiti s konvencionalnim otapalima (Panić i sur., 2021).

Korištenje *in vitro* testa uz MCF-7 i HeLa tumorske stanice prvi su put primijenili Radošević i sur. (2016b) kako bi dokazali da NADES, odnosno komponente NADES-a pojačavaju biološke aktivnosti polifenolnih spojeva iz pokožice grožđa. Pokazali su da većina ekstrakata u različitim NADES-ima pokazuje veći citotoksični potencijal protiv stanica raka od konvencionalnog ekstrakta u metanolu, pri čemu ekstrakt u NADES-u kolin klorid : jabučna kiselina (1 : 1) pokazuje najveću inhibiciju. Primjenom *in vivo* modela sa miševima, Faggian i sur. (2016) uspjeli su postići poboljšanje apsorpcije rutina s NADES-om prolin : glutaminska kiselina (2:1) u usporedbi s vodenom suspenzijom. Ovaj NADES uspio je ekstrahirati količinu rutina kao etanol i dvadeset puta veću od vode. Autori su također primijetili da oralna primjena rutina s NADES-om poboljšava bioraspoloživost ovoga polifenola u usporedbi s vodenom suspenzijom, što je povezano s činjenicom da NADES omogućuje veću biodostupnost rutina za apsorpciju u gastrointestinalnom traktu te zaključuju da se NADES može davati oralno u umjerenim dozama bez većih opasnosti po zdravlje.

Stoga, NADES-i bi mogli biti od iznimnoga značaja u biotehnologiji, biomedicini i farmaceutici budući da oponašaju prirodne uvjete u stanici za aktivaciju i stabilizaciju biomolekula (Radović i sur., 2021). Osim toga, potrebno je razviti mogućnosti primjene NADES-a u proizvodima za ljudsku prehranu, uključujući procjenu njihovoga reološkoga ponašanja, kao i toksikološkoga i biološkoga utjecaja na samoga čovjeka (Mišan i sur., 2020).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3. 1. MATERIJALI

#### 3. 1. 1. Komina grožđa

Pri izradi ovoga rada korištena je komina hrvatske autohtone sorte grožđa *Vitis vinifera* cv. Graševina, dobivena od Kutjevo d. d. Komina je osušena u sušioniku te pohranjena na 4 °C do pripreme ekstrakata.

#### 3. 1. 2. Kemikalije

- Aceton, Kemika, Zagreb, RH
- Betain, 98%, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Destilirana voda, PBF
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Ekstrakt žuči (iz gušterače svinje), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Etilen glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Fenol, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, RH
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Glukoza, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Kolin klorid, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Komplet za analizu vinske kiseline, Megazyme, NEOGEN, Michigan, SAD
- L- $\alpha$ -fosfatidilkolin, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Metanol, Merck, Dormstadt, Njemačka

- n-dodekan, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidrogenkarbonat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev karbonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Oktanska kiselina, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Pankreatin, (iz gušterače svinje), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Pepsin A, (iz gušterače svinje), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Saharoza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sumporna kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Timol, Kemika, Zagreb, RH
- Urea, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- $\alpha$ -amilaza (iz *Aspergillus oryzae*), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a voda korištena u sintezi eutektičnih otapala i pripravi otopina bila je destilirana voda s PBF-a.

### 3. 1. 3. Otopine i puferi

- Folin-Ciocalteu reagens
 

FC reagens	10 mL
Destilirana voda	do 100 mL
- Fosfatni pufer (0,2 M, pH=7)
 

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode)	48,75 mL
Dinatrijev hidrogenfosfat (2,8435 g do 100 mL destilirane vode)	76,25 mL
Destilirana voda	do 250 mL
- Fosfatni pufer (0,2 M, pH=5,5)
 

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (5,082 g do 200 mL destilirane vode)	120,50 mL
Dinatrijev hidrogenfosfat (3,581 g do 100 mL destilirane vode)	4,50 mL
Destilirana voda	do 250 mL

- Otopina natrijevoga karbonata
 

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7,5 g
Destilirana voda	do 100 mL
- Otopina L- $\alpha$ -fosfatidilkolina u dodekanu
 

L- $\alpha$ -fosfatidilkolin	20 mg
Dodekan	1 mL
- Otopine za *in vitro* simulaciju gastrointestinalnoga trakta
 

Otopina za simulaciju sline (pH=6,75):

Dinatrijev hidrogenfosfat	0,24 g
Kalijev dihidrogenfosfat	19 mg
Natrijev klorid	0,8 g
$\alpha$ -amilaza 200 U mL <sup>-1</sup>	0,666 g
Destilirana voda	do 100 mL

Otopina za simulaciju želučanoga soka (pH=2):

Pepsin A 300 U mL <sup>-1</sup>	44,51 mg
Natrijev klorid (0,03 M)	do 100 mL

Otopina za simulaciju probavnog soka tankoga crijeva:

Pankreatin	0,143 g
Ekstrakt žuči	0,857 g
Natrijev hidrogenkarbonat (0,1 M)	do 100 mL

Otopina natrijevoga klorida:

NaCl	701,28 mg
Destilirana voda	do 100 mL

Otopina kalijevoga klorida:

KCl	37,28 mg
Destilirana voda	do 100 mL

### 3. 1. 4. Oprema

- Analitička vaga, Sartorius, Entris, Njemačka
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- HPLC, Agilent1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Laboratorijski pribor (epruvete, kivete, laboratorijske čaše i boce, lijevci, menzure, nastavci za pipete, odmjerne tikvice, pipete, sterilni filter, viale)
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Orbitalni homogenizator/inkubator, Biosan, Riga, Latvija
- pH metar, Mettler Toledo, Švicarska
- Ploče s 96 jažica, Thermo Fisher Scientific, USA
- Sušionik, Instrumentaria Zagreb, RH
- UV/Vis spektrofotometar, GENESYS<sup>TM</sup>10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

## 3. 2. METODE RADA

### 3. 2. 1. Određivanje udjela suhe tvari komine

Za određivanje udjela vode u komini grožđa sorte Graševina koristi se gravimetrijska metoda sušenja uzoraka u sušioniku do konstantne mase pri atmosferskom tlaku na temperaturi  $103 \pm 2$  °C. U prethodno osušene i izvagane posudice odvažuje se 3 g komine grožđa. Posudica s uzorkom suši se do postizanja konstantne mase, odnosno sve dok razlika između dva uzastopna mjerenja ne iznosi 0,005 g ili manje. Nakon hlađenja, posudice se važu te se vrši proračun za ukupnu suhu tvar sljedećom formulom:

$$w_{s.tv.}[\%] = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je:

$m_0$  – masa posudice [g]

$m_1$  – masa iste posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja [g]

$m_2$  – masa iste posudice s ostatkom uzorka poslije sušenja [g]

Rezultat se izražava kao aritmetička sredina dvaju mjerenja svakoga uzorka.

### 3. 2. 2. Priprema ekstrakata komine grožđa bogatih ugljikohidratima topljivima u vodi

Šećeri topljivi u vodi iz komine grožđa sorte Graševina odrede se tako što se najprije pripravi ekstrakt bogat šećerima topljivima u vodi (Beres i sur., 2016). Ekstrakt se pripravi tako što se 10 g osušene komine grožđa pomiješa sa 100 mL destilirane vode te se ekstrakcija provodi na 60 °C kroz 2 h u orbitalnom homogenizatoru. Kada je ekstrakcija završena, provodi se filtracija preko Büchnerovog lijevka te se filtrat pohrani u hladnjak na 4 °C do daljnjih analiza. Udio šećera odredi se dehidratacijom s mineralnom kiselinom.

#### 3. 2. 2. 1. *Određivanje ugljikohidrata dehidratacijom s mineralnom kiselinom*

Ugljikohidrati topljivi u vodi u ekstraktu komine grožđa odrede se dehidratacijom s mineralnom kiselinom (Nielsen, 2010). Ovom metodom koncentrirana sumporna kiselina razgrađuje sve polisaharide, oligosaharide i disaharide do monosaharida, koji zatim reagiraju s fenolom i proizvode zlatno-žutu boju čiji je intenzitet proporcionalan udjelu ugljikohidrata u ispitivanom uzorku, a detektira se spektrofotometrijski pri 490 nm.

1 mL razrijeđenoga ekstrakta i 1 mL deionizirane vode otpipetira se u epruvetu te se doda 0,05 mL 80 %-tne (g/g) otopine fenola. Potom se naglo doda 5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u epruvetu. Otopina u epruveti zatim se snažno pomiješa i ostavi 10 min na 25 °C kako bi se ohladila. Apsorbancija se mjeri na 490 nm, u kvarcnoj kivetici, na spektrofotometru GENESYS™ 10S (TermoFisher, Madison, USA), nasuprot slijepe probe. Glukoza se koristi kao standard, te se udio ugljikohidrata izračuna prema baždarnoj krivulji koja je izrađena mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija glukoze, redom 112, 80, 60, 40 i 20 mg L<sup>-1</sup>. Izmjerene vrijednosti apsorbancije uzoraka nanese se na ordinatu koordinatnog sustava, a koncentracije glukoze (mg L<sup>-1</sup>) nanese se na apscisu. Pomoću računala nacrti se baždarni pravac. Prema dobivenoj



jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih ugljikohidrata u ekstraktima. Analiza je provedena u tri paralele.

Ukupni ugljikohidrati računaju se kao ekvivalent glukoze prema jednadžbi baždarnoga pravca:

$$Y = ax + b \quad [2]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 490 nm

x – koncentracija glukoze ( $\text{mg L}^{-1}$ )

### 3. 2. 3. Priprema ekstrakata komete grožđa bogatih taninima

Kako bi se odredio udio tanina, najprije je potrebno provesti ekstrakciju tanina iz komete grožđa. U tikvicu s okruglim dnom odvažuje se 10 g samljevenog osušenog uzorka komete grožđa sorte Graševina te se doda 100 mL otapala (70 % vodena otopina acetona) (Nollet i Toldra, 2012). Ekstrakcija tanina provodi se ukupno 2 sata na 50 °C uz miješanje u vodenoj kupelji i refluks. Nakon zadanoga vremena ekstrakcija se prekida te se provodi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. Udio ukupnih tanina zatim se odredi prema Bate-Smith metodi.

#### 3. 2. 3. 1. Određivanje udjela tanina Bate-Smith metodom

Ukupni tanini određuju se Bate-Smith metodom koja se temelji na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966). Razlika obojenja između zagrijanoga, hidroliziranoga i nehidroliziranoga uzorka držanoga na sobnoj temperaturi određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku.

Pripremljeni ekstrakti komine grožđa razrijede su ovisno o uzorku (u ovome slučaju najčešće 50x). U dvije staklene epruvete otpipetira se po 1 mL razrijeđenoga uzorka ekstrakta komine grožđa, 0,5 mL destilirane vode te 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline nakon čega se epruvete hermetički zatvore. Jednu epruvetu ostavi se na sobnoj temperaturi, dok se druga stavlja u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon 30 minuta, epruveta se izvadi iz vodene kupelji te se tijekom 5 minuta ohladi u ledenoj kupelji kako bi se što prije zaustavila daljnja reakcija kiselinske hidrolize. U svaku od epruveta potom se doda 250 µL etanola. Apsorbancija se mjeri pri 550 nm na spektrofotometru GENESYS™ 10S (TermoFisher, Madison, USA) nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Koncentracija tanina u razrijeđenom uzorku izračuna se prema formuli:

$$Tanini [g L^{-1}] = 19,33 \cdot (A_1 - A_2) \quad [3]$$

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

A<sub>1</sub>- optička gustoća hidroliziranoga uzorka

A<sub>2</sub>- optička gustoća nehidroliziranoga uzorka

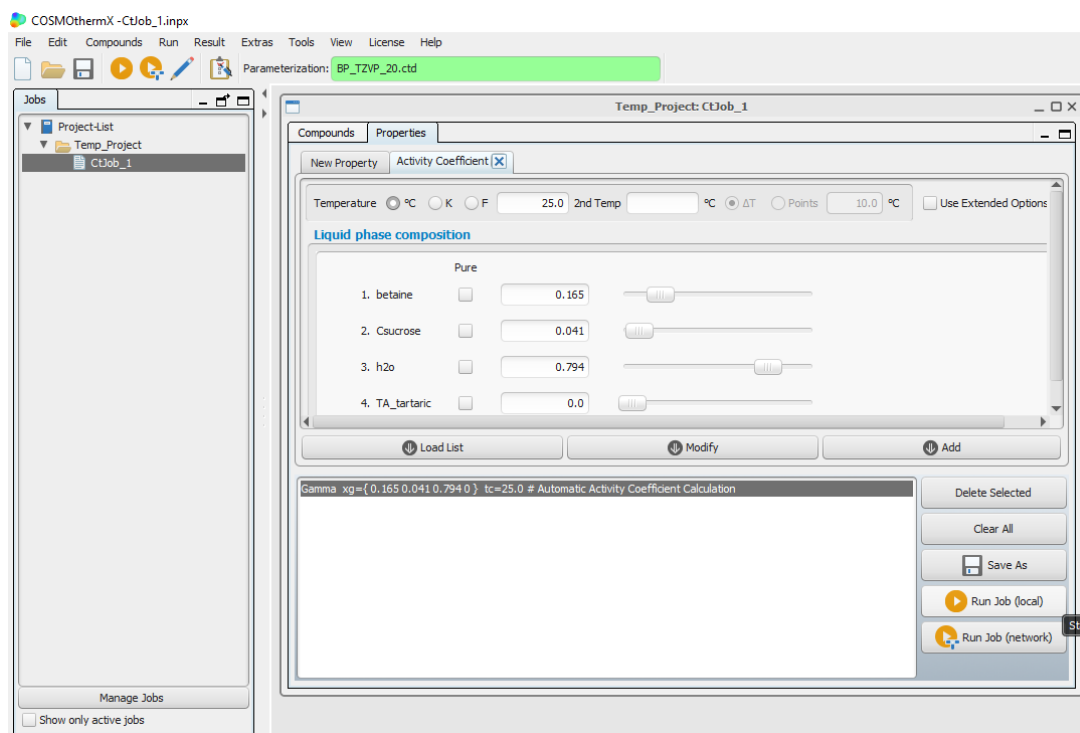
Koncentracija ukupnih tanina u komini grožđa preračuna se i izrazi u mg g<sup>-1</sup> suhe tvari biomase.

### 3. 2. 4. Procjena topljivosti polifenola i vinske kiseline u eutektičnim otapalima pomoću COSMO<sub>therm</sub> programa

Model COSMO-RS (eng. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) primjenjuje se za računalno predviđanje eutektične točke otapala i topljivosti komponenata u eutektičnom otapalu kao jedna od najtočnijih računskih metoda *ab initio*. Računalno predviđanje topljivosti komponenata u otapalu može značajno smanjiti količinu eksperimentalnoga rada i posljedično potrošnju kemikalija. Za primjenu COSMO-RS-a prvo je potrebno izraditi σ-profile koji podrazumijevaju različite proračune koji obuhvaćaju optimalnu geometriju molekula te volumnu i površinsku raspodjelu električnoga naboja. To se postiže modelom COSMO i programom BIOVIA TmoleX19 version 2021 (Dassault Systemes, Paris, France). Zatim se pomoću programskoga paketa COSMO<sub>therm</sub> version 20.0.0. (Dassault Systemes, Paris, France) iz σ-profila dobivaju σ-potencijali komponenata ili njihovih smjesa i

odgovarajući kemijski potencijali (Panić i sur., 2021). Metodama fizikalne kemije i kemijsko-inženjerske termodinamike izračunavaju se zatim i izvedena termodinamička svojstva otapala i otopljenih tvari poput koeficijenta aktivnosti, koeficijenta raspodjele, ravnotežnog tlaka para, topljivosti ključnih komponenata u otapalu (NADES-u) ili čitavi fazni dijagrami na temelju disperzijskih međudjelovanja i vodikovih veza između otapala i otopljenih tvari (Palmelund i sur., 2019).

U programski paket COSMOtherm prvo je potrebno unijeti .cosmo datoteke molekula koje želimo ispitati i molekule koje čine otapalo (NADES). Nakon toga se u sekciji *Activity Coefficient* odabire temperatura pri kojoj se ispituje topljivost te sastav smjese, odnosno udio akceptora vodikove veze (eng. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), donora vodikove veze (eng. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) i ispitivane tvari (slika 6). Kao rezultat proračuna dobije se logaritam koeficijenta aktivnosti,  $\ln(\gamma)$  koji govori o topljivosti ispitivanoga spoja u ispitivanome otapalu, a suma svih udjela mora biti jednaka 1. Ovaj podatak direktno govori o topljivosti željene tvari; manji (tj. negativniji) koeficijent aktivnosti tvari ukazuje na veću topljivost u promatranome otapalu i obratno. Ispitana je topljivost katehina i vinske kiseline u 47 različitih NADES-a prikazanih u tablici 1.



**Slika 6.** Sučelje softvera COSMOtherm – definiranje sastava smjese i temperature za određivanje koeficijenata aktivnosti vinske kiseline pri beskonačnom razrjeđenju u NADES-u betain:saharoza (4:1) s 30 % H<sub>2</sub>O

**Tablica 1.** Molarni omjeri NADES-a u kojima je testirana topljivost katehina i vinske kiseline pomoću COSMO $therm$  programa

NADES	Molarni omjer	NADES	Molarni omjer
B:CA	1:1	Fru:EG	1:2
B:Glc	5:2	Glc:EG	1:2
B:Gly	1:2	Glc:Fru	1:1
B:EG	1:3	Gly:Glc	2:1
B:Ma	1:1	Gly:Sol	2:1
B:Scu	4:1	Ma:Fru	1:1
B:Xyl	1:1	Ma:Glc	1:1
ChCl:CA	2:1	Ma:Scu	2:1
ChCl:EG	1:2	Pro:Ma	1:1
ChCl:Fru	1:1	Scu:EG	1:2
ChCl:Glc	1:1	Scu:Glc:U	1:1:2
ChCl:Gly	1:2	Sol:EG	1:2
ChCl:Ma	1:1	Sor:EG	1:2
ChCl:OxA	1:1	Xyl:EG	1:2
ChCl:Scu	2:1	Me:Cam	1:1
ChCl:Sol	1:1	Me:SA	4:1
ChCl:Sor	1:1	Me:C8	1:1
ChCl:U	1:2	Me:C10	1:1
ChCl:Xyl	2:1	Me:C18:2	1:1
ChCl:Xyol	5:2	Me:Ty	3:2
CA:Fru	1:1	Ty:C8	1:3
CA:Glc	1:1	Ty:C10	1:1
CA:Sor	2:3	Ty:Cou	3:2
CA:Scu	1:1		

B: betain, C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, CA: limunska kiselina, Cam: kamfor, ChCl: kolin klorid, Cou: kumarin, EG: etilen glikol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, Ma: jabučna kiselina, Me: mentol, OxA: oksalna kiselina, Pro: prolin, SA: salicilna kiselina, Scu: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, U: urea, Xyl: ksiloza, Xyol: ksilitol.

### 3. 2. 5. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičnih otapala (NADES-a)

Eutektična otapala sintetizirana su u orbitalnom homogenizatoru. Prema određenim omjerima (tablica 2) izračuna se masa komponenata otapala te doda u staklene boce uz željeni udio vode (Mitar i sur., 2019). Smjesa se zatim homogenizira miješanjem pri temperaturi od 50 °C kroz 2-6 sati u zatvorenom sustavu dok ne nastane homogena, tekuća, prozirna i viskozna smjesa. Pripremljena otapala zatim su dobro zatvorena i čuvana na sobnoj temperaturi do sljedećega korištenja.

**Tablica 2.** Molarni omjeri korištenih NADES-a i udjeli vode

<b>NADES</b>	<b>Kratica</b>	<b>Molarni omjer</b>	<b>Udio vode</b>
Betain:etilen glikol	B:EG	1:3	30 %
Betain:saharoza	B:Scu	4:1	30 %; 50 %
Kolin klorid:urea	ChCl:U	1:2	30 %
Timol:oktanska kiselina	Ty:C8	1:3	0 %

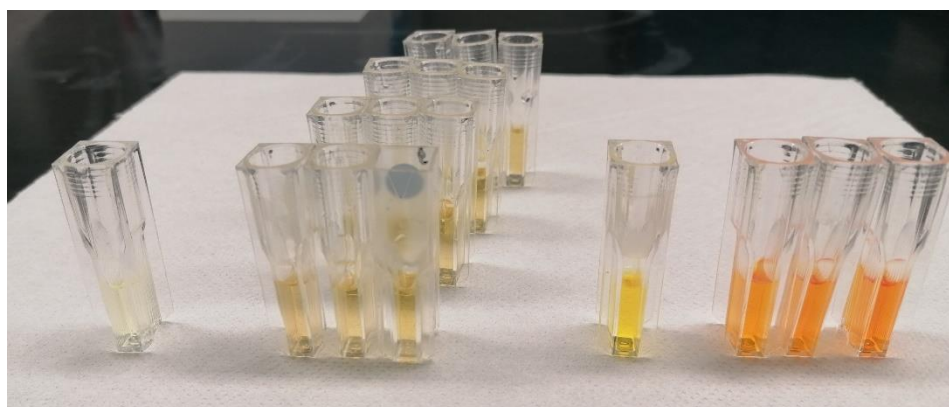
### 3. 2. 6. Priprema ekstrakata komine grožđa bogatih vinskih kiselina

Kako bi se odredio udio vinske kiseline, najprije je potrebno provesti ekstrakciju vinske kiseline iz komine grožđa. U tikvicu s okruglim dnom odvaži se 10 g samljevenoga svježega uzorka komine grožđa sorte Graševina te se doda 100 mL otapala (NADES-i navedeni u tablici 2 te voda zakiseljena s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 3). Ekstrakcija se provodi ukupno 2 sata u vodenoj kupelji na 50 °C uz miješanje (Nurgel i Canbas, 1998). Nakon 2 sata ekstrakcija se prekida te se provodi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. Identifikacija i kvantifikacija vinske kiseline zatim se provodi komercijalnim testom za određivanje koncentracije vinske kiseline.

### 3. 2. 6. 1. Određivanje koncentracije vinske kiseline

Količina vinske kiseline u uzorcima ekstrakata odredi se pomoću komercijalnog testa za analizu vinske kiseline (Megazyme, NEOGEN, Michigan, SAD). Do obojenja, koje se očitava spektrofotometrijski pri 505 nm, dolazi reakcijom uzorka koji sadrži vinsku kiselinu sa *Reagensom I* i *Reagensom II* vinske kiseline pri čemu vinska kiselina ulazi u kompleks s vanadijem stvarajući žuto obojenje (slika 7).

U staklene kivete s 25  $\mu\text{L}$  uzorka ekstrakta vinske kiseline doda se 437,5  $\mu\text{L}$  otapala u kojemu je provedena ekstrakcija te 100  $\mu\text{L}$  *Reagensa I* vinske kiseline te se nakon 1 minute mjeri apsorbanacija ( $A_1$ ) na spektrofotometru GENESYS<sup>TM</sup> 10S (TermoFisher, Madison, USA) pri 505 nm. Zatim se u istu smjesu doda 62,5  $\mu\text{L}$  *Reagensa II* vinske kiseline te se nakon 4 minute ponovno mjeri apsorbanacija ( $A_2$ ). Za slijepu probu korištena je destilirana voda umjesto uzorka i otapala. Za standard je korištena otopina *Standarda* iz kita. Sve analize provedene su u tri paralele.



**Slika 7.** Određivanje koncentracije vinske kiseline (vlastita fotografija)

Koncentracija vinske kiseline u uzorcima zatim se odredi:

$$\Delta A_{vinska} = A_2 - A_1 \quad [4]$$

$$c = \frac{\Delta A_{vinska-uzorak}}{\Delta A_{vinska-standard}/c_{vinska-standard}} [\text{g L}^{-1}] \quad [5]$$

gdje je:

$c_{vinska-standard}$  = koncentracija vinske kiseline u standardu ( $5 \text{ g L}^{-1}$ )

### 3. 2. 7. Priprema ekstrakata komine grožđa bogatih polifenolima

Kako bi se odredio udio polifenola, najprije je potrebno provesti ekstrakciju polifenola iz komine grožđa. U epruvetu se odvažuje 1 g samljevenoga osušenoga uzorka komine grožđa sorte Graševina te se doda 10 mL pripremljenih NADES-a B:Scu (4:1), dok su za usporedbu korištene iste količine konvencionalnih otapala za ekstrakciju (80 %-tna vodena otopina metanola te 70 %-tna vodena otopina etanola) (Nollet i Toldra, 2012). Ekstrakcija polifenolnih spojeva provodi se ukupno 2 sata na 50 °C uz miješanje u homogenizatoru. Nakon zadanoga vremena, ekstrakcija se prekida te se provodi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. Udio ukupnih polifenola zatim se odredi prema Folin-Ciocalteu metodi.

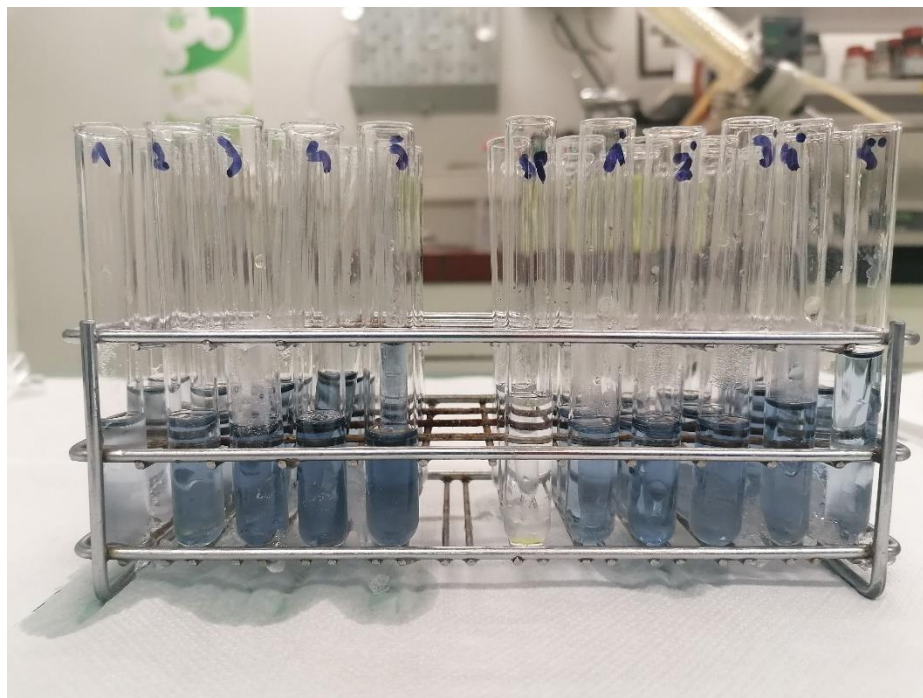
Za definiranje maksimalnog kapaciteta NADES-a za polifenole, provedene su uzastopne ekstrakcije polifenola u NADES-u B:Scu (4:1) uz 50 % H<sub>2</sub>O prethodno navedenim postupkom uz trajanje od 10 minuta na 50 °C. Nakon svake ekstrakcije polifenola uzet je alikvot ekstrakta za određivanje polifenola te je ostatak ekstrakta nadopunjen s pripremljenim NADES-om do 10 mL i pomiješan s novih 1 g samljevenog osušenog uzorka komine grožđa kako bi se provela sljedeća ekstrakcija. Ovaj postupak se ponavlja dok se u uzorcima ekstrakata koncentracija ukupnih polifenola određena Folin-Ciocalteu metodom ne ustali.

#### 3. 2. 7. 1. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom

Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se pri oksidaciji fenola reduciraju u plavo obojeni volframov i molibdenov oksid (slika 8). Nastalo obojenje proporcionalno je udjelu polifenolnih spojeva u ispitivanom ekstraktu, a mjeri se spektrofotometrijski pri 760 nm.

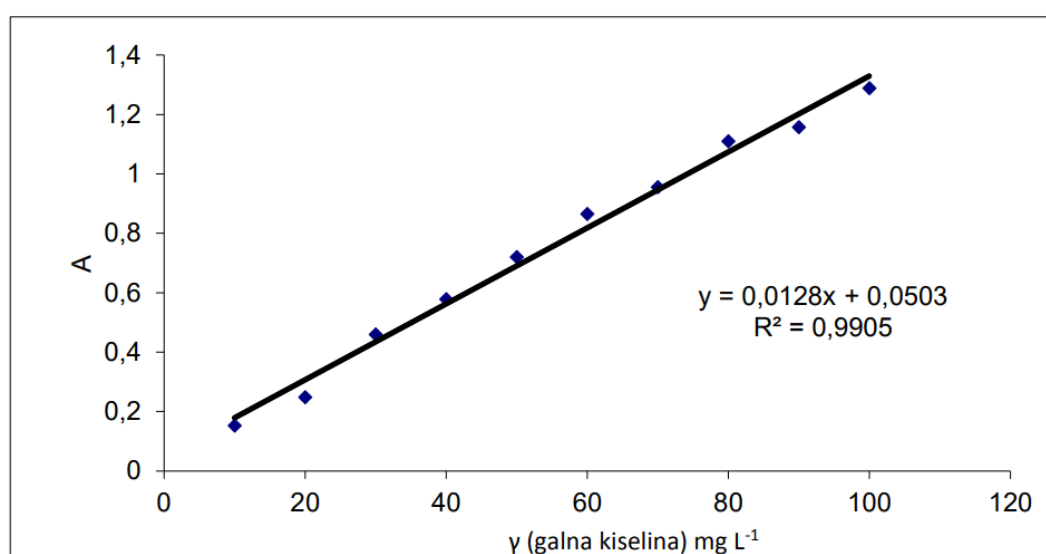
U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta (koji je razrijeđen ovisno o vrsti uzorka, u ovom slučaju najčešće 20x), 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa (koji je 10x razrijeđen destiliranom vodom) te nakon 5 minuta na sobnoj temperaturi doda se 1 mL 7,5 %-tne otopine natrijevog karbonata. Na isti način pripremi se slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo u kojem je provedena ekstrakcija. Uzorci se promiješaju, a zatim termostatiraju u vodenoj kupelji 5 minuta pri temperaturi od 50 °C. Reakcija se zatim zaustavlja u ledenoj kupelji te se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 760 nm na spektrofotometru GENESYS™ 10S (TermoFisher, Madison, USA) (Ainsworth i Gillespie, 2007). Mjerenja se provode u tri paralele. Ukupni polifenoli se proračunaju prema baždarnoj krivulji pripremljenoj pomoću galne

kiseline, a rezultati se izražavaju kao udio ekvivalenata galne kiseline u gramu suhe tvari biomase.



**Slika 8.** Određivanje polifenola Folin-Ciocalteu reagensom (vlastita fotografija)

Izračunaju se srednje vrijednosti tri mjerene paralele i te vrijednosti apsorbancije uvrste se u jednadžbu baždarnoga pravca izrađenoga za razrjeđenja galne kiseline kao standarda. Baždarni pravac ovisnosti koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) o apsorbanciji prikazan je na slici 9.



**Slika 9.** Baždarni pravac ovisnosti koncentracije galne kiseline o apsorbanciji (Šango, 2017)



Pri izračunu vrijedi:

$$Y = ax + b \quad [6]$$

$$Y = 0,0128 x + 0,0503; \quad R = 0,9905 \quad [7]$$

gdje je:

$Y$  – apsorbancija pri 760 nm

$x$  – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Konačni rezultati izraženi su kao mg polifenola po g suhe tvari komine grožđa.

### *3. 2. 7. 2. Određivanje polifenola u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)*

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u ekstraktima komine grožđa provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-DAD detektorom.

Kromatografska analiza provodi se na HPLC uređaju Agilent1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) uz module binarne pumpe (Bin Pump SL G1312B), degazera (G1379B), autosampler-a (HiP-ALS G1367B), termostata autosampler-a (FC/ALS Term G1330B), modula kolone (TCC SL G1316B) te uz detekciju na PDA detektoru (DAD SL G1315C). Polifenoli se razdvoje na Poroshell 120 SB-C18 koloni dimenzija 4,6 x 150 mm, 4  $\mu\text{m}$ . Injektirani volumen uzoraka je 15  $\mu\text{L}$ . Mobilne faze su otapalo A (0,25 % octena kiselina) i otapalo B (acetonitril) pri temperaturi od 40  $^{\circ}\text{C}$  i protoku 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Uvjeti kromatografske analize prikazani su u tablici 3.

Identifikacija i kvantifikacija provedena je usporedbom retencijskoga vremena spojeva i vanjskih standarada katehina, epikatehina, epigalokatehina i rutin trihidrata kao najzastupljenijih polifenola u grožđu. Dobivene vrijednosti izražene su u mg po g suhe tvari biomase.

**Tablica 3.** Uvjeti kromatografske analize polifenola u ekstraktima komine grožđa

<b>HPLC uvjeti</b>			
<b>Kolona</b>	Poroshell 120 SB-C18 4,6 x 150 mm, 4 µm		
<b>Mobilna faza</b>	Otapalo A	0,25 %-tna octena kiselina	
	Otapalo B	Acetonitril	
<b>Vrijeme analize (min)</b>	25		
<b>Temperatura (°C)</b>	40		
<b>Protok (mL min<sup>-1</sup>)</b>	1		
<b>Volumen injektiranja (µL)</b>	15		
<b>Eluiranje</b>	Gradijentno	Vrijeme (min)	Otapalo
			A %    B %
		0,00	90,00    10,00
		7,50	85,00    15,00
		15,00	73,00    27,00
		25,00	90,00    10,00

### 3. 2. 8. *In vitro* simulacija gastrointestinalnog trakta

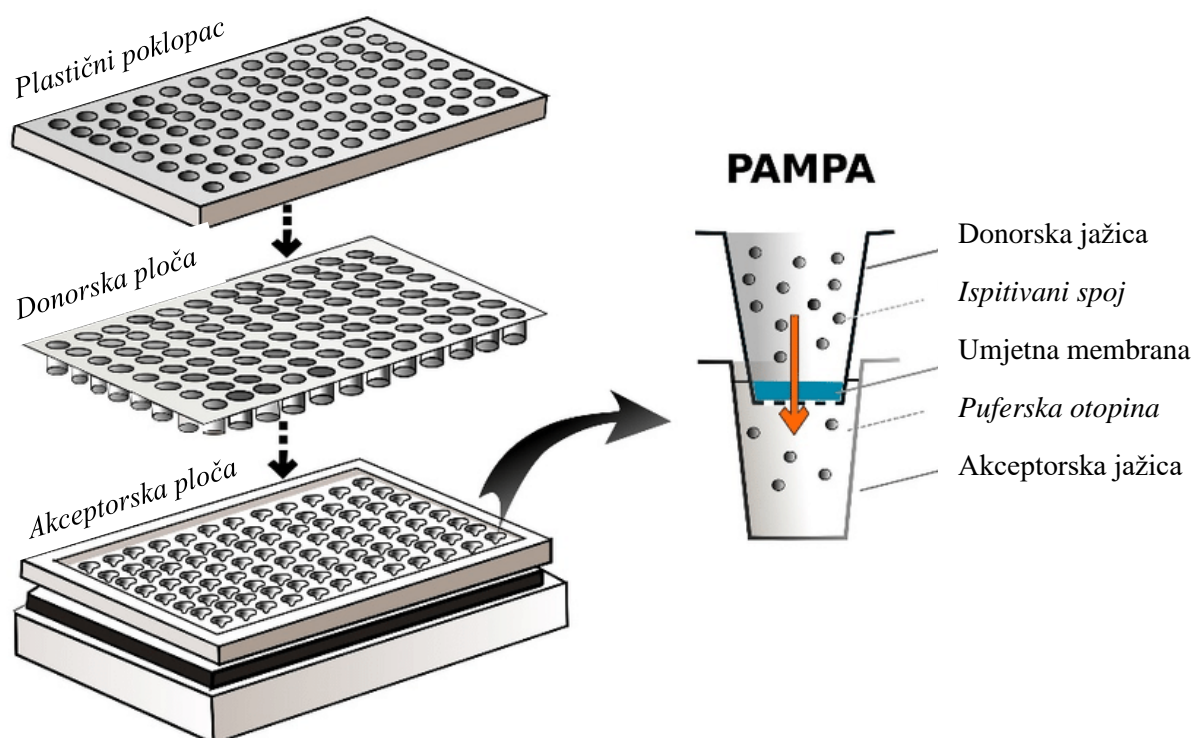
Dobiveni ekstrakti komine grožđa sorte Graševina bogati polifenolima korišteni su za simulaciju razgradnje polifenola kroz gastrointestinalni trakt.

2 g ekstrakta komine grožđa koristi se za simulaciju probavnoga trakta preko orbitalnog homogenizatora uz 1,4 mL otopine za simulaciju sline (pH = 6,75) tijekom 10 minuta na temperaturi 37 °C. Nakon toga doda se 3 mL otopine za simulaciju želučanoga soka, pH vrijednost podesi se na 2 pomoću 1 M HCl te se smjesa ponovno stavi na homogenizator na 37 °C. Nakon 120 minuta doda se 3 mL otopine za simulaciju probavnoga soka tankoga crijeva, 1 mL 120 mM NaCl i 1 mL 5 mM KCl te se pH vrijednost podesi na 7 pomoću 0,1 M NaOH, a takva smjesa ostavi se na homogenizatoru još 60 minuta (Corrêa i sur., 2017). Nakon svake faze digestije izuzme se uzorak za spektrofotometrijsku analizu polifenola Folin-Ciocalteu reagensom prethodno navedenom metodom.

Uzorci su korišteni u dvije paralele, kao ekstrakt samljevene suhe komine grožđa u konvencionalnom otapalu, 80 %-tnom metanolu i 70 %-tnom etanolu te u NADES-u B:Scu. Kao kontrola korištena je galna kiselina otopljena u 70%-tnom etanolu u koncentraciji od 1 mg/mL.

### 3. 2. 9. Određivanje propusnosti kroz umjetnu membranu PAMPA metodom

PAMPA (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) test korišten je za predviđanje pasivne ljudske gastrointestinalne apsorpcije polifenola iz ekstrakata komine grožđa (Krstić i sur., 2015). PAMPA test sastoji se od donorske i akceptorske jažice napunjene puferom i odvojene umjetnom membranom s filterom kroz koju se komponente transportiraju pasivnom difuzijom (slika 10). Umjetne membrane idealni su zamjenski sustav za gastrointestinalne ili druge tipove bioloških membrana u procjeni potencijala apsorpcije pojedinih tvari ili spojeva (Kerns i sur., 2004).



**Slika 10.** Ispitivanje propusnosti kroz umjetnu membranu (PAMPA) s 96 jažica (lijevo); jedna jažica ploče (desno) (prema Ponmozhi i sur., 2021)

U ovoj metodi, Multi Screen Permeability Plate Assembly s filtracijskom pločom s 96 jažica (Millipore, MA, SAD) koristi se kao nosač umjetne membrane i kao akceptorska ploča. Filtarski materijal svake jažice u filtracijskoj (donorskoj) ploči obloži se s 5  $\mu\text{L}$  otopine L- $\alpha$ -fosfatidilkolin u 1 % (m/v) dodekanu. Donorska ploča zatim se postavi na akceptorsku ploču koja je prethodno napunjena sa 300  $\mu\text{L}$  otopine fosfatnoga pufera pH 5,5. Zatim se doda 125  $\mu\text{L}$  ekstrakata u svaku jažicu donorske ploče. Sustav ploča zatvori se plastičnim poklopcem kako bi se spriječilo isparavanje te se inkubira 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, mjere se volumeni u donorskoj i akceptorskoj jažici, a koncentracije ukupnih polifenola na akceptorskoj ploči zatim se odrede spektrofotometrijskom analizom pomoću Folin-Ciocalteu reagensa kao što je prethodno opisano. Kao kontrola korištena je galna kiselina otopljena u 70 %-tnom etanolu u koncentraciji od 1 mg/mL. Mjerenja se provode u četiri paralele.

Koeficijenti prividne propusnosti ( $P_{app}$ ) izračunaju se pomoću sljedećih jednadžbi:

$$\%T = 100 \cdot \frac{C_R V_R}{C_{D0} V_D} \quad [8]$$

$$P_{app} = \frac{V_D V_R}{(V_D + V_R) S t} \cdot \ln \left[ \frac{100 V_D}{100 V_D - \%T (V_D + V_R)} \right] \quad [9]$$

gdje su:

$V_D$  i  $V_R$  – volumeni donorske i akceptorske otopine (mL);

$C_{D0}$  i  $C_R$  – početne koncentracije polifenola ( $\text{mg L}^{-1}$ ) u donorskoj otopini, odnosno konačne koncentracije polifenola ( $\text{mg L}^{-1}$ ) u akceptorskoj otopini;

$S$  – površina umjetne membrane ( $0,5177 \text{ cm}^2$ , prema proizvođaču);

$t$  – vrijeme inkubacije (s);

$\%T$  – opseg transporta kroz membranu.

### 3. 3. OBRADA REZULTATA

Sva mjerenja provedena su u paralelama. Rezultati su prosječne vrijednosti dvaju ili više mjerenja, ovisno o pokusu, i izračunati su prema izrazu:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [10]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [11]$$

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U današnje doba, sve je veće okretanje znanstvene zajednice i raznih industrija principima zelene kemije te održivom načinu proizvodnje. Valorizacija otpada iz prehrambene industrije postala je primarno rješenje globalnoga problema onečišćenja okoliša. Tako npr. nakon proizvodnje vina zaostaju nusprodukti bogati biološki aktivnim spojevima. Stoga bi valorizacija komine grožđa za primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji mogla predstavljati učinkovitu, profitabilnu i ekološki prihvatljivu alternativu za nusproizvode proizvodnje vina (Teixeira i sur., 2014). Kako bi se osigurala izvedivost procesa valorizacije ovoga nusproizvoda, prvo je potrebno formulirati ekološki prihvatljivu metodu za dobivanje ekstrakata s potencijalnim bioaktivnim svojstvima (Costa i sur., 2019). Niskotemperaturna eutektična otapala u današnje doba su sve više u fokusu jer bi takva otapala služila kao zamjena za do sada korištena skupa, toksična i hlapljiva konvencionalna otapala. Stoga bi se DES-ovi mogli koristiti za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz komine grožđa. U sastavu DES-ova nalaze se prirodne komponente te bi ekstrakti u DES-u mogli biti potencijalno primjenjivi u prehrambenoj industriji (Morgana i sur., 2022). Npr. betain je komponenta korištenih otapala u ovome radu, a jeftini je prirodni, biorazgradivi i netoksični resurs koji se dobiva iz šećerne repe (Li i sur., 2016). Prirodno je prisutan u ljudskom tijelu, nastaje oksidacijom kolina u bubrezima i jetri, a glavna funkcija mu je osmoregulacija te zaštita stanica od okolišnoga stresa (Attia i sur., 2019). Saharoza je disaharid koji svakodnevno upotrebljavamo u prehrani, a sastoji se od fruktoze i glukoze.

Karakterizacija komine grožđa sorte Graševina osnova je za njezino daljnje iskorištavanje u svrhu izolacije biološki aktivnih tvari, stoga su u ovome radu prezentirane fizikalno-kemijske karakteristike ovoga nusproizvoda. Tako su uz konvencionalna otapala određivani udjeli suhe tvari komine, ugljikohidrata dehidratacijom s mineralnom kiselinom, zatim tanina Bate-Smith metodom, vinske kiseline te polifenola. Nadalje, COSMO*therm* je korišten kao alat za odabir i dizajn optimalnoga DES-a za ekstrakciju vinske kiseline i polifenola komine. Za ekstrakciju vinske kiseline korišteno je i konvencionalno otapalo, zakiseljena voda, dok su za ekstrakciju polifenola korišteni 80 %-tni metanol i 70 %-tni etanol kako bi se rezultati dobiveni ekstrakcijom pomoću DES-a mogli usporediti. Ekstrakcije su provedene u orbitalnom homogenizatoru tijekom 2 sata pri temperaturi 50 °C. Također, provedeno je određivanje maksimalnoga kapaciteta odabranoga DES-a za polifenole. Udjeli

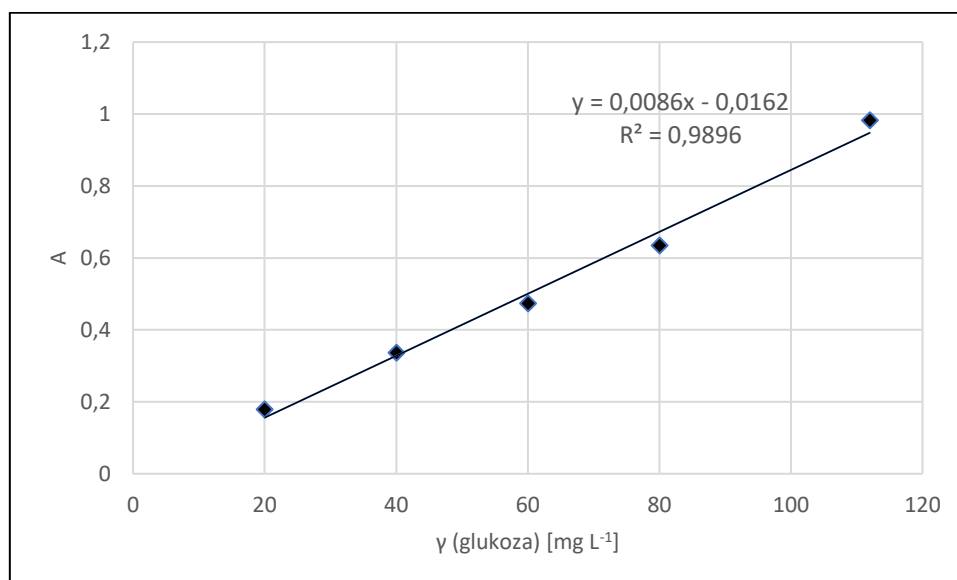
vinske kiseline u svim ekstraktima (B:Scu, ChCl:U, B:EG, Ty:C8, dH<sub>2</sub>O pH=3) određeni su pomoću komercijalnoga testa, a udjeli polifenola (B:Scu, MetOH, EtOH), kako ukupnih reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom, tako i pojedinačnih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-om). Nadalje, procjena bioaktivnih svojstava nakon simulacije *in vitro* gastrointestinalne probave te PAMPA metode provedena je kako bi se dobio uvid u stabilnost i biodostupnost polifenola prisutnih u ekstraktima.

#### 4. 1. KARAKTERIZACIJA KOMINE GROŽĐA

U svrhu fizikalno-kemijske karakterizacije komine grožđa sorte Graševina provedeno je određivanje udjela suhe tvari, ukupnih ugljikohidrata, tanina, vinske kiseline i polifenola.

Određivanje udjela suhe tvari u komini grožđa provedeno je gravimetrijskom metodom sušenja uzoraka u sušioniku do konstantne mase.

Ukupni ugljikohidrati u ekstraktima komine grožđa u vodi određeni su dehidracijom s mineralnom kiselinom, a dobiveni rezultati izraženi su kao mg glukoze po gramu suhe tvari, uz glukozu kao standard. Na slici 11 nalazi se baždarni pravac koji predstavlja ovisnost koncentracije glukoze (mg L<sup>-1</sup>) o apsorbanciji (nm).



**Slika 11.** Baždarni pravac glukoze

Ukupni tanini u ekstraktima komine grožđa u 70 %-tnom acetonu određeni su Bate-Smith metodom, a dobiveni rezultati izraženi su kao mg tanina po gramu suhe tvari komine.

Udio ukupnih polifenola u ekstraktima komine u 80 %-tnom metanolu određen je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, a dobiveni rezultati izraženi su kao mg galne kiseline po gramu suhe tvari komine grožđa.

Udio vinske kiseline u ekstraktima komine u zakiseljenoj vodi (pH = 3) određen je pomoću komercijalnoga testa za određivanje vinske kiseline, a dobiveni rezultati izraženi su kao grami vinske kiseline po litri ekstrakta komine.

Rezultati fizikalno-kemijske karakterizacije komine grožđa prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Sastav komine grožđa \*

<b>Komina grožđa</b>	
Udio suhe tvari (%)	46,55 ± 0,57
Totalni ugljikohidrati (mg g <sup>-1</sup> s. tv.)	242,3 ± 0,17
Udio tanina (mg g <sup>-1</sup> s. tv.)	15,46 ± 0,03
Udio polifenola (mg g <sup>-1</sup> s. tv.)	17,89 ± 0,28
Udio vinske kiseline (g L <sup>-1</sup> )	3,07 ± 0,02

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

Udio suhe tvari u komini grožđa je 46,55 ± 0,57 %. S obzirom da postotak vlage varira od 50 % do 72 %, ovisno o sorti grožđa i stupnju dozrijevanja (Teixeira i sur., 2014), ovaj rezultat je u skladu s literaturnim podacima.

Udio ugljikohidrata u komini je 242,30 ± 0,17 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari. Ovaj rezultat je također u skladu s literaturom – udio ugljikohidrata u komini je obično između 122,0 i 405,3 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari (Antonić i sur., 2020).

Udio tanina je 15,46 ± 0,03 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari te je približno jednak udjelu polifenolnih spojeva (17,89 ± 0,28 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari) što je u skladu s literaturnim navodima (4,55 – 31,13 mg g<sup>-1</sup>) (Jara-Palacios i sur., 2014; Antoniće i sur., 2020).

Prinos vinske kiseline kreće se između 2,5 i 5,0 g vinske kiseline po litri ekstrakta komine grožđa (Canalejo i sur., 2021). Udio vinske kiseline iznosi 3,07 ± 0,02 g L<sup>-1</sup> ekstrakta, što je u skladu s literaturom.



## 4. 2. ODABIR NADES-a

Računalni programi koriste se za smanjenje eksperimentalnoga broja pokušaja i pogrešaka, kao i za uštedu vremena i kemikalija pri traženju idealnoga otapala za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva. Model COSMO-RS jedna je od najtočnijih računalnih metoda *ab initio* koja služi za predviđanje eutektične točke i topljivosti željenih komponenata u eutektičnim otapalima (Panić i sur., 2021).

COSMO-RS koristi kvantno-kemijske metode za otopljene tvari i otapala te statističkom termodinamikom utvrđuje interakcije molekularnih površina. Prva izlazna datoteka programa je  $\sigma$ -profil, odnosno izračunata optimalna geometrija molekule uz odgovarajuću volumnu raspodjelu električnoga naboja te površinsku raspodjelu.  $\sigma$ -profili komponenata preračunavaju se u tzv.  $\sigma$ -potencijale komponenata ili njihovih smjesa i odgovarajuće kemijske potencijale brzim i računski nezahtjevnim statističko-termodinamičkim proračunima u okviru COSMO*therm* programskoga paketa. Nakon toga se metodama fizikalne kemije i kemijsko-inženjerske termodinamike izračunavaju i izvedena svojstva, poput koeficijenata aktivnosti, ravnotežnoga tlaka para, koeficijenata raspodjele, topljivosti ili čitavi fazni dijagrami. Ovim programom izračunati su logaritmi koeficijenta aktivnosti ( $\ln(\gamma)$ ) koji ukazuju na topljivost promatranih spojeva u određenim otapalima. Manji koeficijent aktivnosti govori o većoj topljivosti određenog spoja.

Za odabir najboljega otapala ispitana je topljivost vinske kiseline i katehina kao najzastupljenijega polifenola u grožđu sorte Graševina s udjelom od 21,04 mg L<sup>-1</sup> (Abbas i sur., 2019) u 47 različitih DES-ova pomoću COSMO*therm* programa (tablica 1). Dobiveni logaritmi koeficijenata aktivnosti  $\ln(\gamma)$  katehina prikazani su na slici 12, a vinske kiseline na slici 13.

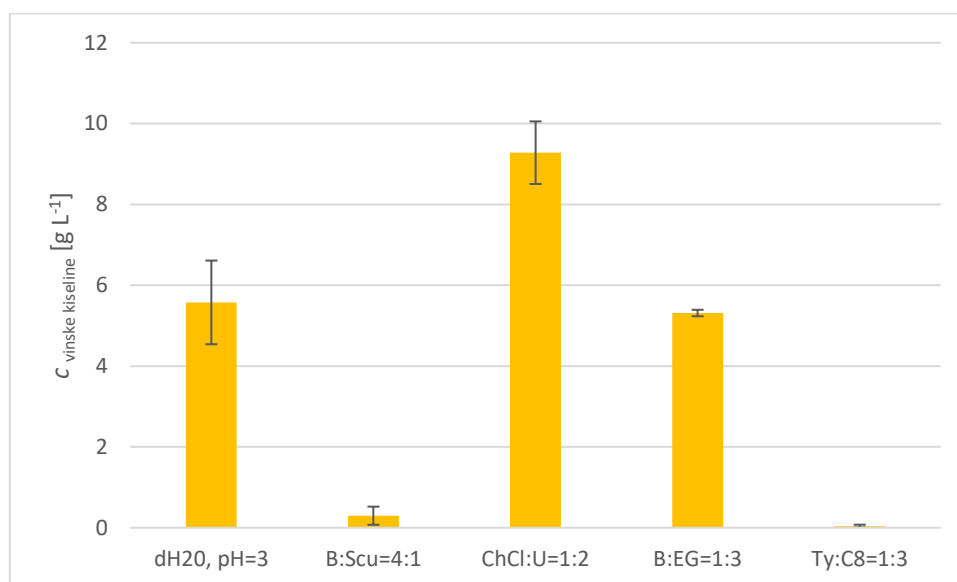




DES timol : oktanska kiselina (Ty:C8) s lošijom topljivošću da bi se utvrdila vjerodostojnost predviđanja.

#### 4. 3. UKUPNA VINSKA KISELINA U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIMA POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA

Udio vinske kiseline u ekstraktima komine grožđa određen je pomoću komercijalnoga testa za određivanje vinske kiseline, a dobiveni rezultati izraženi kao grami vinske kiseline po litri ekstrakta komine prikazani su na slici 14.



**Slika 14.** Topljivost vinske kiseline u ekstraktima komine grožđa \*,\*\*

\*rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 3)

\*\*dH<sub>2</sub>O = ekstrakt pripremljen u kiseloj vodi pH=3, B:Scu = ekstrakt pripremljen u otapalu betain : saharoza, ChCl:U = ekstrakt pripremljen u otapalu kolin klorid : urea, B:EG = ekstrakt pripremljen u otapalu betain : etilen glikol, Ty:C8 = ekstrakt pripremljen u otapalu timol : oktanska kiselina

Prema dobivenim rezultatima (slika 14), možemo zaključiti da je komina grožđa dobar izvor vinske kiseline, pri čemu se masena koncentracija vinske kiseline kreće od 0,3 do 9,3 g L<sup>-1</sup> dobivenih ekstrakata. Vidljivo je kako različiti DES-ovi imaju različitu uspješnost ekstrakcije, a uočeno je kako je najviše vinske kiseline u komini ekstrahirano redom:

ChCl:U>dH<sub>2</sub>O>B:EG>B:Scu>Ty:C8. Kao odlično otapalo pokazao se ChCl:U s najvećom količinom ekstrahirane vinske kiseline iz komine, dok je najmanje ekstrahirano pomoću otapala Ty:C8 kojemu je i predviđena najmanja topljivost.

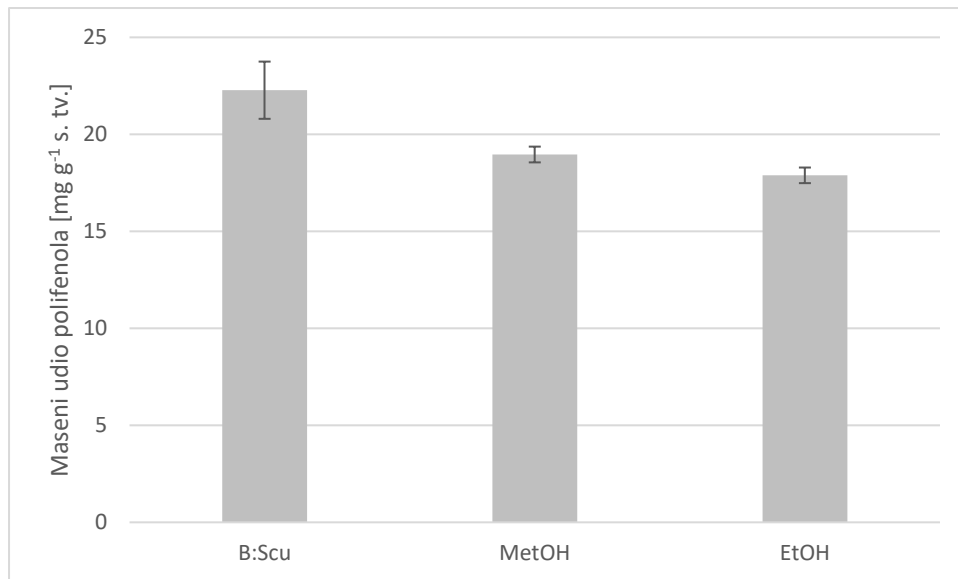
S obzirom na literaturni podatak da se iz komine grožđa može ekstrahirati 2,5 – 5,0 g L<sup>-1</sup> vinske kiseline (Canalejo i sur., 2021), dobiveni rezultati pokazuju da je otapalo ChCl:U premašilo maksimalne okvire ekstrakcije s dobivenom masenom koncentracijom vinske kiseline od 9,28 ± 0,77 g L<sup>-1</sup>, čime nadmašuje i dobivenu količinu u konvencionalnom otapalu (5,57 ± 1,04 g L<sup>-1</sup>), što može sugerirati na mogućnost zamjene takvoga otapala DES-om. Na temelju ovih podataka možemo zaključiti da je izračun koeficijenta aktivnosti dobar parametar za dizajn DES-a, budući da je učinkovitost ekstrakcije s Ty:C8, koji ima najpozitivniju vrijednost ln( $\gamma$ ) vrijednost, najmanja, dok je u slučaju otapala s najnegativnijom vrijednošću ln( $\gamma$ ), učinkovitost veća (Palmelund i sur., 2019).

S obzirom da je ekstrakt u B:Scu s 30 % vode pokazao relativno mali udio ekstrahirane vinske kiseline, zbog pretpostavke da je na učinkovitost ekstrakcije utjecala viskoznost otapala, u daljnjim istraživanjima korišteno je takvo otapalo s 50 % vode, čime se smanjuje viskoznost, a time postiže bolja učinkovitost ekstrakcije (Chen i sur., 2019).

#### **4. 4. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIMA POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA**

##### **4. 4. 1. Usporedba ukupnih polifenola u ekstraktima pripremljenima pomoću DES-a i konvencionalnih otapala**

Udio ukupnih polifenola u ekstraktima komine grožđa određen je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, a dobiveni rezultati izraženi kao mg galne kiseline po gramu suhe tvari komine grožđa prikazani su na slici 15.



**Slika 15.** Maseni udio polifenola u ekstraktima komine grožđa \*,\*\*

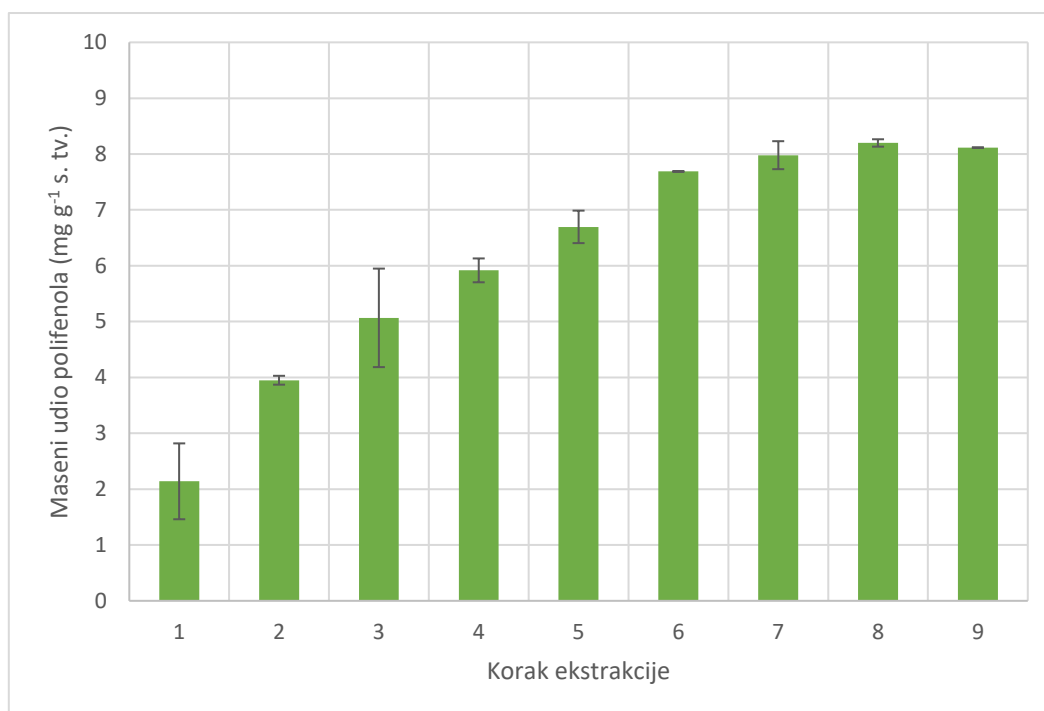
\*rezultati su srednja vrijednost ± S.D (n = 3)

\*\*B:Scu = ekstrakt pripremljen u otapalu betain : saharoza, MetOH = ekstrakt pripremljen u (80 %, v/v) metanolu, EtOH = ekstrakt pripremljen u (70 %, v/v) etanolu

Prema dobivenim rezultatima (slika 15), možemo zaključiti da je komina grožđa dobar izvor polifenola, pri čemu je najveći maseni udio polifenola ( $22,28 \pm 1,48 \text{ mg g}^{-1}$  suhe tvari komine) zabilježen u ekstraktu dobivenom pomoću NADES-a B:Scu, što je u skladu s literaturom (iz komine grožđa može se ekstrahirati  $4,55 - 31,13 \text{ mg g}^{-1}$  polifenola) (Jara-Palacios i sur., 2014). Otapalo B:Scu daje veći udio polifenola naprema oba korištena konvencionalna otapala: metanol je ekstrahirao  $18,96 \pm 0,41 \text{ mg g}^{-1} \text{ s. tv.}$ , a etanol  $17,89 \pm 0,40 \text{ mg g}^{-1} \text{ s. tv.}$ , čime se ukazuje na mogućnost zamjene takvih otapala NADES-om kod ekstrakcija biološki aktivnih spojeva.

#### 4. 4. 2. Maksimalni polifenolni kapacitet NADES-a

Određivanje maksimalnog kapaciteta NADES-a B:Scu provedeno je na sličan način, ali s ciljem smanjenja vremena potrebnog za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa. Stoga su ekstrakcije provedene u vremenu od 10 minuta, a ne u 2 sata. Rezultati su prikazani na slici 16.



**Slika 16.** Kapacitet NADES-a B:Scu za polifenole iz komine grožđa \*

\*rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 3), s. tv. = suha tvar, B:Scu = ekstrakt pripremljen u otapalu betain : saharoza

Kapacitet B:Scu za polifenole određivao se uzastopnim ekstrakcijama po 1 g komine grožđa u dobivenim ekstraktima nadopunjenima do 10 mL čistim DES-om. Kao što se vidi u rezultatima na slici 16, ukupni udio polifenola u ekstraktima povećavao se u svakom koraku ekstrakcije. Nakon osam uzastopnih ekstrakcija, udio polifenola više se nije mijenjao te se smatra da je NADES dosegao maksimalni kapacitet topljivosti polifenola s udjelom polifenola od  $8,20 \pm 0,01$  mg g<sup>-1</sup> suhe tvari komine. Time smo dokazali da 10 mL NADES-a B:Scu može ekstrahirati visoki udio polifenola iz 8 grama suhe komine grožđa u kraćim vremenima ekstrakcije.

Ovi rezultati uvelike se razlikuju od rezultata dobivenih ekstrakcijom u trajanju od 2 sata ( $22,28 \pm 1,48$  mg g<sup>-1</sup> suhe tvari komine), ali ukazuju na potencijalno moguće smanjenje trajanja klasičnih ekstrakcija uz dobivanje potrebnih količina polifenola u ekstraktima za primjenu u prehrambenoj industriji. Međutim, u novije vrijeme razvijaju se nove metode ekstrakcije, poput ekstrakcije pomoću mikrovalova ili ultrazvuka (Mišan i sur., 2020), gdje bi se veće količine polifenola mogle dobiti u kraćem vremenu nego kod klasične ekstrakcije te bi takve pristupe trebalo detaljnije istražiti u naredno vrijeme.

#### 4. 5. POLIFENOLI DETEKTIRANI U KOMINI GROŽĐA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u ekstraktima komine grožđa provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) te usporedbom retencijskoga vremena spojeva i vanjskih standarada katehina, epikatehina, epigalokatehina i rutin trihidrata kao najzastupljenijih polifenola. Katehin, epikatehin i epigalokatehin identificirani su na 280 nm, a rutin trihidrat na 360 nm. Dobivene koncentracije izražene su u  $\text{mg g}^{-1}$  suhe tvari komine grožđa. Rezultati su prikazani u tablici 5.

**Tablica 5.** Polifenoli određeni na HPLC-u u ekstraktima komine pripravljenima u NADES-u i konvencionalnom otapalu ( $\text{mg g}^{-1}$  suhe tvari komine)

POJEDINAČNI POLIFENOLI	B:Scu	EtOH
Epigalokatehin	-	0,27893
Katehin	0,75887	0,81978
Epikatehin	0,39283	0,38260
Procijanidin B1	0,32698	0,50487
Procijanidin B2	0,21745	-
Procijanidin B3	0,19380	1,19690
Procijanidin B4	0,20145	-
Procijanidin C1	0,08840	-
Epikatehin galat	0,24700	0,02070
Rutin trihidrat	0,01660	0,28066

Iz rezultata prikazanih u tablici 5 vidljivo je da u sastavu komine grožđa sorte Graševina u prvome redu nalazimo najznačajnije monomerne jedinice katehin, epikatehin, epigalokatehin te epikatehin galat, a od ostalih flavanola najzastupljeniji su procijanidin dimeri B1, B2, B3 i B4 te procijanidin trimer C1, ali i rutin trihidrat, što je u skladu s literaturom (Teixeira i sur., 2014).

U ekstraktima su najzastupljeniji epikatehin i katehin, što je u skladu s očekivanjima jer su to najdominantniji polifenoli u komini grožđa (Jara-Palacios i sur., 2014). Kao bolje

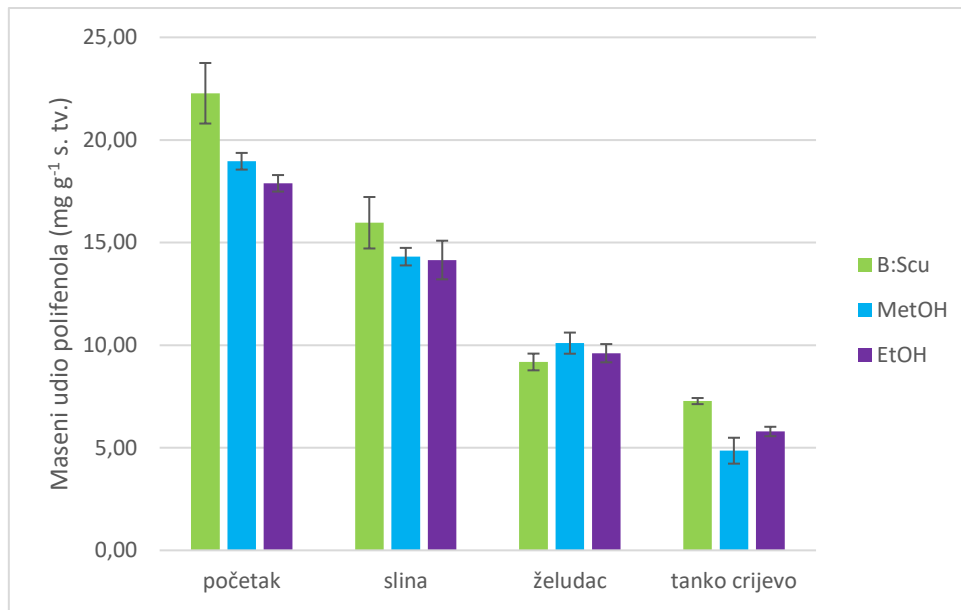


ekstrakcijsko otapalo s obzirom na raznolikost ekstrahiranih polifenola pokazao se NADES B:Scu u odnosu na konvencionalno otapalo etanol. Međutim, veći udjeli pojedinačnih polifenola dobiveni su pomoću etanola. Takvi rezultati nisu u korelaciji s rezultatima mjerenja ukupnih polifenola gdje se otapalo B:Scu pokazalo kao uspješnije.

#### **4. 6. *In vitro* RAZGRADNJA POLIFENOLA IZ EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA SIMULACIJOM GASTROINTESTINALNOG TRAKTA**

*In vitro* simulacija gastrointestinalnoga trakta provedena je u svrhu pružanja uvida u biodostupnost i stabilnost polifenola tijekom njihove probave u ustima, želucu i tankom crijevu (Morgana i sur., 2022). Udio ukupnih polifenola u ekstraktima komine grožđa nakon svakoga koraka simulacije probave određen je pomoću Folin-Ciocalteau reagensa, a dobiveni rezultati izraženi kao mg galne kiseline po gramu suhe tvari komine grožđa, prikazani su na slici 17.

Prema dobivenim rezultatima na slici 17, vidljivo je da se nakon probave u ustima koncentracija polifenola u NADES-u B:Scu smanjila na 71,7 % početne vrijednosti. Probava u želucu dodatno je smanjila sadržaj polifenola u NADES-u te je još uvijek očuvano 41,2 % polifenola. Prema literaturi, 90 % polifenola probavlja se prije nego što dopiju u crijeva zbog niske pH vrijednosti i probavnih enzima u želucu (Van de Velde i sur., 2018; Tarko i sur., 2013). Na temelju toga, može se zaključiti da su polifenoli stabilniji u NADES-u, s 41,2 % polifenola dostupnih za daljnju metabolizaciju i apsorpciju. Konačno, nakon probave u tankome crijevu, u ekstraktu B:Scu je 32,6 % polifenola i dalje dostupno za apsorpciju. Za usporedbu, polifenoli iz komine grožđa ekstrahirani u etanolu i metanolu pokazali su slična svojstva u pogledu stabilnosti polifenola, gdje je nakon probave u tankome crijevu ekstrakta u etanolu dostupno još 32,4 %, odnosno 25,6 % polifenola iz ekstrakta u metanolu.



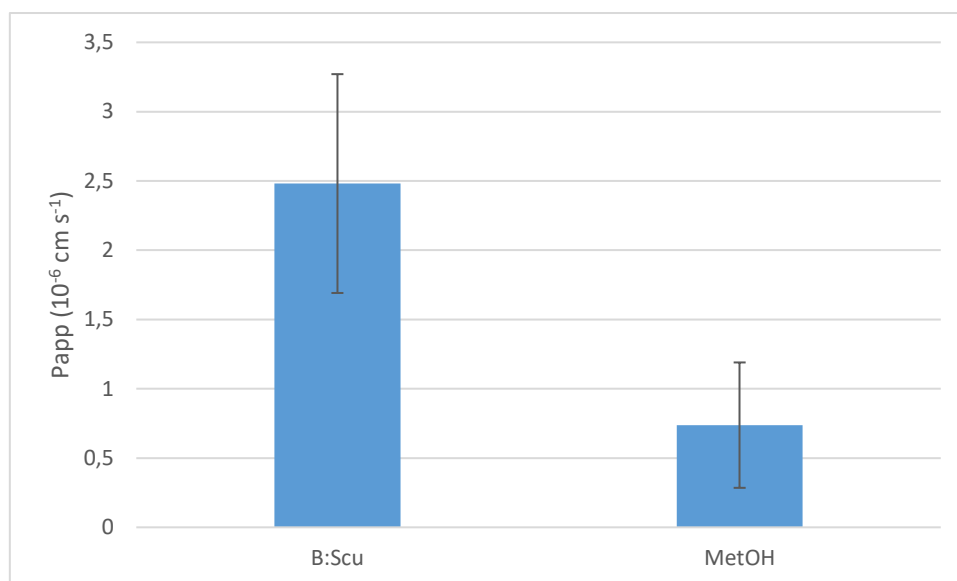
**Slika 17.** Razgradnja polifenola iz ekstrakata komine kroz probavni trakt \*,\*\*

\*rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 3)

\*\*B:Scu = ekstrakt pripremljen u otapalu betain : saharoza, MetOH = ekstrakt pripremljen u (80 %, v/v) metanolu, EtOH = ekstrakt pripremljen u (70 %, v/v) etanolu

#### 4. 7. PROPUSNOST POLIFENOLA IZ EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA KROZ UMJETNU MEMBRANU

S ciljem određivanja pasivnoga transporta polifenola iz ekstrakata komine grožđa kroz epitel tankoga crijeva u krv, provedena je PAMPA metoda kojom se može simulirati propusnost spojeva kroz kožnu barijeru, krvno-moždanu barijeru i barijeru gastrointestinalnoga trakta (Bélair i sur., 2021). Udio ukupnih polifenola u ekstraktima komine grožđa prije i nakon *in vitro* simulacije tankoga crijeva određen je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, a dobiveni rezultati izraženi kao koeficijenti prividne propusnosti (Papp) prikazani su na slici 18.



**Slika 18.** Propusnost polifenola kroz umjetnu membranu \*,\*\*

\*rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 4)

\*\*B:Scu = ekstrakt pripremljen u otapalu betain : saharoza, MetOH = ekstrakt pripremljen u (80 %, v/v) metanolu

Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da je propusnost polifenola u ekstraktu komine grožđa u NADES-u B:Scu 3,4 puta veća nego propusnost ekstrakta u metanolu. Takva povećana propusnost mogla bi se objasniti mogućim interakcijama između NADES-a i fosfolipidnoga dvosloja umjetne membrane. Unatoč tome, propusnost polifenola ovakvih ekstrakata spada u kategoriju niske apsorpcije s obzirom da su vrijednosti prividne propusnosti manje od  $5 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ . Također, pasivna difuzija ovisi o brojnim čimbenicima, poput lipofilnosti, pH vrijednosti, vodikovim vezama te molekulskoj masi spojeva koji trebaju proći kroz membranu (Rastogi i Jana, 2016). Stoga propusnost kroz takav složen proces nije jednostavno definirati, ali je prednost PAMPA testa nad biološkim modelima u jednostavnosti izvedbe, niskoj cijeni i ispitivanju velikoga broja uzoraka u kratkome periodu (Ponmozhi i sur., 2021). Rezultati su u skladu s literaturom jer galna kiselina kao kontrola pokazuje vrijednost propusnosti ( $2,7 \cdot 10^{-6} \pm 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ ) unutar navedenoga raspona u literaturi (Rastogi i Jana, 2016).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Karakterizacija komine hrvatske autohtone sorte grožđa Graševina ukazuje na visoke udjele biološki aktivnih spojeva koji bi se valorizacijom ovoga nusproizvoda vinske industrije mogli kvalitetno iskoristiti.
2. COSMOtherm program pouzdan je način za predviđanje topljivosti spojeva u željenim otapalima jer su odabrana otapala s niskom vrijednosti  $\ln(\gamma)$  uspješno ekstrahirala vinsku kiselinu i polifenole iz komine grožđa.
3. Ekstrakcija vinske kiseline iz komine uspješno je provedena pomoću niskotemperaturnih eutektičnih otapala koja potencijalno mogu zamijeniti konvencionalna otapala. Kao najuspješnije otapalo za ekstrakciju pokazao se  $\text{ChCl}:\text{U}$  s najvišim udjelom ekstrahirane vinske kiseline.
4. Ekstrakcija polifenola iz komine uspješno je provedena pomoću prirodnoga niskotemperaturnoga eutektičnoga otapala  $\text{B}:\text{Scu}$ . Usporedbom učinkovitosti ekstrakcije provedene s etanolom, odnosno metanolom, potvrđeno je da niskotemperaturna prirodna eutektička otapala mogu zamijeniti konvencionalna otapala u procesima ekstrakcije.
5. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti identificirani i kvantificirani su katehin, epikatehin, epigalokatehin i rutin trihidrat kao najčešći polifenoli u komini grožđa.
6. Simulacijom gastrointestinalnoga trakta *in vitro* praćena je stabilnost polifenola iz ekstrakata komine grožđa tijekom probave te je veća stabilnost opažena u ekstraktu komine u prirodnom niskotemperaturnom eutektičnom otapalu  $\text{B}:\text{Scu}$  nego u ekstraktima u konvencionalnim otapalima, etanolu i metanolu.
7. PAMPA metodom određena je prividna propusnost polifenola iz ekstrakata komine grožđa kroz umjetnu membranu te je ekstrakt komine grožđa u prirodnom niskotemperaturnom eutektičnom otapalu  $\text{B}:\text{Scu}$  pokazao 3,4 puta veću vrijednost nego ekstrakt u konvencionalnom otapalu, metanolu. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo kako NADES utječe na interakcije i propusnost kroz umjetnu membranu.
8. Veća biodostupnost te propusnost polifenola iz ekstrakata komine grožđa u niskotemperaturnom eutektičnom otapalu nego u konvencionalnim otapalima, ali i karakteristika NADES-a kao otapala s GRAS statusom ukazuje na moguću primjenu ekstrakata pripremljenih u NADES-u u prehrambenoj industriji.

## 6. LITERATURA

Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* **2**, 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS i sur. (2017) Natural polyphenols: An overview. *Int J Food Prop* **20**, 1689-1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>

Antonić B, Jančíková S, Dordević D, Tremlová B (2020) Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis. *Foods* **9**, 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>

Attia YA, El-Naggar AS, Abou-Shehema BM, Abdella AA (2019) Effect of supplementation with trimethylglycine (betaine) and/or vitamins on semen quality, fertility, antioxidant status, DNA repair and welfare of roosters exposed to chronic heat stress. *Animals* **9**, 547. <https://doi.org/10.3390/ani9080547>

Bélair V, Orsat V, Maheux M, Lafrance CP, Brochu M, Lightburn B i sur. (2021) Permeability of native and digested polyphenols from apple, blueberry and cranberry extracts using PAMPA membrane permeability assays. *J Food Compos Anal* **101**, 103945. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103945>

Beres C, Simas-Tosin FF, Cabezudo I, Freitas SP, Iacomini M, Mellinger-Silva C i sur. (2016) Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. *Food Chem* **201**, 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.039>

Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M (2019) Valorisation of grape pomace: an approach that is increasingly reaching its maturity—a review. *Int J Food Sci Tech* **54**, 933-942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>

Cai H, You S, Xu Z, Li Z, Guo J, Ren Z i sur. (2021) Novel extraction methods and potential applications of polyphenols in fruit waste: a review. *J Food Meas Charact* **15**, 3250-3261. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00901-1>

Canalejo D, Guadalupe Z, Martínez-Lapuente L, Ayestarán B, Pérez-Magariño S (2021) Optimization of a method to extract polysaccharides from white grape pomace by-products. *Food Chem* **365**, 130445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130445>

Caponio GR, Noviello M, Calabrese FM, Gambacorta G, Giannelli G, De Angelis M (2022) Effects of Grape Pomace Polyphenols and In Vitro Gastrointestinal Digestion on Antimicrobial Activity: Recovery of Bioactive Compounds. *Antioxidants* **11**, 567. <https://doi.org/10.3390/antiox11030567>

Chen J, Li Y, Wang X, Liu W (2019) Application of deep eutectic solvents in food analysis: A review. *Molecules* **24**, 4594. <https://doi.org/10.3390/molecules24244594>

Corrêa RC, Haminiuk CW, Barros L, Dias MI, Calhelha RC, Kato CG, i sur. (2017) Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. *J Funct Foods* **36**, 410-417. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.030>

Costa JR, Amorim M, Vilas-Boas A, Tonon RV, Cabral LM, Pastrana L, i sur. (2019) Impact of in vitro gastrointestinal digestion on the chemical composition, bioactive properties, and cytotoxicity of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah grape pomace extract. *Food & function* **10**, 1856-1869. <https://doi.org/10.1039/C8FO02534G>

Cutrim CS, Cortez MAS (2018) A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *Int J Dairy Tech* **71**, 564-578. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12515>

Dabetić N, Todorović V, Panić M, Radojčić Redovniković I, Šobajić S (2020) Impact of deep eutectic solvents on extraction of polyphenols from grape seeds and skin. *Applied sciences* **10**, 4830. <https://doi.org/10.3390/app10144830>

Faggian M, Sut S, Perissutti B, Baldan V, Grabnar I, Dall'Acqua S (2016) Natural deep eutectic solvents (NADES) as a tool for bioavailability improvement: pharmacokinetics of rutin dissolved in proline/glycine after oral administration in rats: possible application in nutraceuticals. *Molecules* **21**, 1531. <https://doi.org/10.3390/molecules21111531>

Fontana AR, Antonioli A, Bottini R (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agr Food chem* **61**, 8987-9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>

García-Lomillo J, González-SanJosé ML (2017) Applications of wine pomace in the food industry: Approaches and functions. *Compr Rev Food Sci F* **16**, 3-22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>

Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, i sur. (2020) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **121**, 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>

Human C (2019) *The physicochemical properties and stability of aspalathin in micro-and nanoencapsulated green rooibos extract formulations* (doktorska disertacija), Stellenbosch University, Stellenbosch.

Jara-Palacios MJ, Hernanz D, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ (2014) Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Res Int* **66**, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.009>

Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Han SY, Lee J (2017) Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J Clean Prod* **151**, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>

Jurinjak Tušek A, Marić L, Benković M, Valinger D, Jurina T, Gajdoš Kljusurić J (2020) *In-vitro* digestion of the bioactives originating from the *Lamiaceae* family herbal teas: A kinetic and PLS modeling study. *J Food Biochem* **44**, 13233. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13233>

Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, Ley R, Jupp P (2004) Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J pharma sci* **93**, 1440-1453. <https://doi.org/10.1002/jps.20075>

Krstić M, Popović M, Dobričić V, Ibrić S (2015) Influence of solid drug delivery system formulation on poorly water-soluble drug dissolution and permeability. *Molecules* **20**, 14684-14698. <https://doi.org/10.3390/molecules200814684>

Li N, Wang Y, Xu K, Huang Y, Wen Q, Ding X (2016) Development of green betainebased deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. *Talanta* **152**, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.042>

Mitar A, Panić M, Prlić Kardum J, Halambek J, Sander A, Zagajski Kučan K, i sur. (2019) Physicochemical properties, cytotoxicity, and antioxidative activity of natural deep eutectic solvents containing organic acid. *Chem biochem eng quarterly* **33**, 1-18. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1454>

Mišan A, Nađpal J, Stupar A, Pojić M, Mandić A, Verpoorte R, i sur. (2020) The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Crit rev food sci* **60**, 2564-2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>

Morgana NM, Magdalena E, de los Angeles Fernandez M, Fernanda SM (2022) NADES for food industry innovation: novel bioadditives based on olive oil byproducts. *Food Bioprod Process* **134**, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.05.007>

Nagar EE, Okun Z, Shpigelman A (2020) Digestive fate of polyphenols: Updated view of the influence of chemical structure and the presence of cell wall material. *Curr Opin Food Sci* **31**, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.009>

Nielsen SS (2010) Food Analysis Laboratory manual, Food Science Texts Series, Springer, Boston, MA, SAD, str. 47 – 53.

Nollet LML, Toldra F (2012) Handbook of analysis of active compounds in functional foods, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, SAD, str. 317 – 348.

Nurgel C, Canbas A (1998) Production of Tartaric Acid From Pomace of Some Anatolian Grape Cultivars. *Am J Enol Vitic* **49**, 95-99.

Palmelund H, Andersson MP, Asgreen CJ, Boyd BJ, Rantanen J, Löbmann K (2019) Tailor-made solvents for pharmaceutical use? Experimental and computational approach for determining solubility in deep eutectic solvents (DES). *Int J Pharma: X* **1**. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100034>

Panić M, Stojković MR, Kraljić K, Škevin D, Radojčić Redovniković I, Srček VG, i sur. (2019) Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food chem* **283**, 628-636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.061>

Panić M, Gunjević V, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Ganić KK, Radojčić Redovniković I (2021) COSMOtherm as an effective tool for selection of deep eutectic solvents based ready-



to-use extracts from graševina grape pomace. *Molecules* **26**, 4722. <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>

Ponmozhi J, Dhinakaran S, Varga-Medveczky Z, Fónagy K, Bors LA, Iván K, i sur. (2021) Development of skin-on-a-chip platforms for different utilizations: Factors to be considered. *Micromachines* **12**, 294. <https://doi.org/10.3390/mi12030294>

Punzo A, Porru E, Silla A, Simoni P, Galletti P, Roda A, i sur. (2021) Grape Pomace for Topical Application: Green NaDES Sustainable Extraction, Skin Permeation Studies, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities Characterization in 3D Human Keratinocytes. *Biomolecules* **11**, 1181. <https://doi.org/10.3390/biom11081181>

Radošević K, Železnjak J, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I, Slivac I, Gaurina Srček V (2016a) Comparative *in vitro* study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. *Ecotox environ safe* **131**, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.005>

Radošević K, Čurko N, Srček VG, Bubalo MC, Tomašević M, Ganić KK, i sur. (2016b) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT* **73**, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala–racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **70**, 551-562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>

Rajha HN, Paule A, Aragonès G, Barbosa M, Caddeo C, Debs E, i sur. (2022) Recent advances in research on polyphenols: effects on microbiota, metabolism, and health. *Mol Nutr Food Res* **66**, 2. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100670>

Rastogi H, Jana S (2016) Evaluation of physicochemical properties and intestinal permeability of six dietary polyphenols in human intestinal colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Eur J Drug Metab Ph* **41**, 33-43. <https://doi.org/10.1007/s13318-014-0234-5>

Ribéreau-Gayon P, Stonestreet E (1966) Le dosage des tanins dans le vin rouge et détermination de leur structure. *Chim Ana* **48**, 188–192.

Sirohi R, Tarafdar A, Singh S, Negi T, Gaur VK, Gnansounou E, i sur. (2020) Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for

sustainable biorefinery. *Biores Tech* **314**, 12377.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>

Sokač T, Gunjević V, Pušek A, Jurinjak Tušek A, Dujmić F, Brnčić M, i sur. (2022) Comparison of Drying Methods and Their Effect on the Stability of Graševina Grape Pomace Biologically Active Compounds. *Foods* **11**, 112. <https://doi.org/10.3390/foods11010112>

Šango, M (2017) Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz komine grožđa primjenom prirodnih eutektičkih otapala (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Taladrid D, González de Llano D, Zorraquín-Peña I, Tamargo A, Silva M, Molinero N, i sur. (2021) Gastrointestinal digestion of a grape pomace extract: impact on intestinal barrier permeability and interaction with gut microbiome. *Nutrients* **13**, 2467. <https://doi.org/10.3390/nu13072467>

Tarko T, Duda-Chodak A, Zajac N (2013) Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* **64**, 79-84.

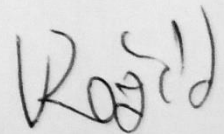
Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, i sur. (2014) Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *Int J Mol Sci* **15**, 15638-15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>

Van de Velde F, Pirovani ME, Drago SR (2018) Bioaccessibility analysis of anthocyanins and ellagitannins from blackberry at simulated gastrointestinal and colonic levels. *J Food Comp Anal* **72**, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.05.007>

Yu J, Ahmedna M (2013) Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Tech* **48**, 221-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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



---

Vlastoručni potpis