

Priprava, karakterizacija i primjena ekstrakta komine grožđa u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Pavić, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:363828>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Klara Knežević

**PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA
I PRIMJENA EKSTRAKTA
KOMINE GROŽĐA U
NISKOTEMPERATURNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**

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 Anje Damjanović, mag. ing.

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



Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na pruženoj prilici za izradu ovog rada, na korisnim savjetima i svemu što me naučila. Hvala dr. sc. Manueli Panić te mag. ing. Anji Damjanović na strpljivosti, svim savjetima, uputama i velikoj pomoći pri izradi ovoga rada. Hvala i svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na nesebičnoj pomoći, strpljivosti i ugodnoj atmosferi. Bila mi je čast raditi sa svima Vama.

Hvala mome suprugu, cijeloj mojoj obitelji i prijateljima na ljubavi i podršci. Njihova motivacija i vjera pomogla mi je kroz sve godine školovanja.

Ovaj rad posvećujem svojoj kćerkici Lauri. Trudit ću se odgajati je najbolje što znam kako bi jednog dana postala najbolja verzija sebe.

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

PRIPRAVA, KARAKTERIZACIJA I PRIMJENA EKSTRAKTA KOMINE GROŽĐA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Klara Knežević, univ. bacc. ing. biotechn.
0058212860

Sažetak: Niskotemperaturna eutektička otapala (NADES) sve se češće koriste za zelenu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva. Njihova fizikalno-kemijska svojstva mogu se dizajnirati za posebne namjene tako da zadovoljavaju tehnološke i ekonomske zahtjeve industrije. Cilj ovog rada bio je dizajnirati i odabrati NADES pomoću programa COSMOtherm za ekstrakciju polifenola. Polifenoli su ekstrahirani iz komine grožđa, nusproizvoda vinske industrije, bogate biološki aktivnim spojevima. Odabrano je otapalo betain:saharoza te je određena ukupna koncentracija polifenola Folin-Ciocalteu reagensom i uspoređena sa ekstraktima u konvencionalnim otapalima (metanolu i etanolu). Pojedini polifenoli identificirani su HPLC metodom. Ispitana je mogućnost ekstrakata za inhibiciju aktivnosti kolagenaze te je analiziran utjecaj ekstrakata na staničnu liniju ljudskih keratinocita (engl. *Cultured Human Keratinocyte*, *HaCaT*). Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da NADES otapala mogu zamijeniti konvencionalna otapala, a zbog uočene proliferacije HaCaT stanica ekstrakti imaju mogućnost primjene u kozmetičkoj industriji.

Ključne riječi: prirodna niskotemperaturna eutektička otapla, polifenoli, komina grožđa, COSMOtherm, kozmetička industrija

Rad sadrži: 47 stranica, 12 slika, 4 tablice, 44 literaturnih 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: Anja Damjanović, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (mentor)
3. doc. dr. sc. Teuta Murati (član)
4. prof. dr. sc. Ivana Kmetič (zamjenski član)

Datum obrane: 28. rujna 2023.

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

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF GRAPE POMACE EXTRACTS IN DEEEP EUTECTIC SOLVENTS

Klara Knežević, univ. bacc. ing. techn. biotechn.
0058212860

Abstract: Natural deep eutectic solvents (NADES) are increasingly being used for the green extraction of biologically active compounds. Their physicochemical properties can be designed for special purposes so that they fulfill the technological and economic requirements of the industry. The aim of this work was to design and select NADES using the COSMOtherm program for the extraction of polyphenols. Polyphenols are extracted from grape pomace, a byproduct of the wine industry, rich in biologically active compounds. The solvent betaine:sucrose was chosen and the total concentration of polyphenols was determined with the Folin-Ciocalteu reagent and compared with extracts in conventional solvents (methanol and ethanol). Individual polyphenols were identified by the HPLC method. The ability of the extracts to inhibit collagenase activity was tested, and the influence of the extracts on the human keratinocytes cell line (HaCaT) was analyzed. Based on the obtained results, it can be concluded that NADES solvents can replace conventional solvents, and due to the observed proliferation of HaCaT cells, the extracts have the possibility of application in the cosmetic industry.

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

Thesis contains: 47 pages, 12 figures, 4 tables, 44 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: Anja Damjanović, MSc.

Reviewers:

1. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (president)
2. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor (mentor)
3. Teuta Murati, PhD, Assistant professor (member)
4. Ivana Kmetič, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 28th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. GROŽĐE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA	3
2.1.1. Grožđe kao izvor polifenola	4
2.1.2. Primjena polifenola u kozmetičkoj industriji	5
2.2. ZELENA EKSTRAKCIJA	8
2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala	9
2.2.1.1. Svojstva eutektičkih otapala.....	11
2.2.1.2. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Komina	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Otopine i puferi	16
3.1.4. Stanične linije.....	17
3.1.5. Oprema	17
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Karakterizacija komine grožđa.....	18
3.2.1.1. <i>Udio suhe tvari</i>	18
3.2.1.2. <i>Udio polifenola</i>	18
3.2.1.3. <i>Udio tanina</i>	19
3.2.1.4. <i>Udio ukupnih ugljikohidrata</i>	19
3.2.1.5. <i>Udio vinske kiseline</i>	20
3.2.2. Procjena topljivosti polifenola u eutektičnim otapalima pomoću programa COSMOtherm	21
3.2.3. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala	22
3.2.4. Priprema ekstrakta komine grožđa bogatih polifenolima.....	22
3.2.4.1. <i>Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteau reagensom</i>	22
3.2.4.2. <i>Određivanje polifenola u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)</i>	24
3.2.5. <i>Određivanje inhibicije aktivnosti kolagenaze</i>	25
3.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata na HaCaT staničnoj liniji	26
3.2.6.1. <i>Uzgoj HaCaT stanične linije</i>	26
3.2.6.2. <i>Određivanje preživljenja stanica MTS metodom</i>	27

3.2.7. <i>Scratch</i> test	28
3.3. OBRADA REZULTATA	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. SASTAV KOMINE GROŽĐA	30
4.2. ODABIR NADES-A	31
4.3. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIM POMOĆU NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA	33
4.3.1. Ukupni polifenoli određeni pomoću Folin-Ciocalteu reagensa	33
4.3.2. Određivanje polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	34
4.4. INHIBICIJA AKTIVNOSTI KOLAGENAZE	35
4.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTA KOMINE GROŽĐA	38
4.5.1. <i>In vitro</i> aktivnost ekstrakata komine grožđa na HaCaT staničnu liniju	38
4.5.2. Utjecaj ekstrakata na mogućnost <i>in vitro</i> zacjeljivanja rana	39
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Vinarstvo i vinogradarstvo jedne su od vodećih gospodarskih grana u svijetu koje, kao i ostale proizvodne djelatnosti, generiraju velike količine organskog otpada čije zbrinjavanje za proizvođača predstavlja velik ekonomski, a za okoliš ekološki problem (Skračić i sur., 2023). Glavni nusproizvod proizvodnje vina je komina grožđa, koja se sastoji od sjemenki, pokožice i peteljki (Sokač i sur., 2022). Komina grožđa bogata je biološki aktivnim komponentama, kao što su flavonoidi, polifenoli te antocijanini (Modesti i sur., 2021).

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji su bitan dio ljudske prehrane zbog svojih iznimnih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava te antimutagenog, antikarcinogenog i protuupalnog djelovanja (Bordiga i sur., 2019). Uloga ovih spojeva u prevenciji kardiovaskularnih bolesti potvrđena je brojnim znanstvenim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, stoga ekstrakcija polifenolnih spojeva, njihova stabilizacija i integracija postaje sve više istraživana. Industrija nastoji uspostaviti ekološki prihvatljive i sigurne procese za valorizaciju otpadnih nusproizvoda (Panić i sur., 2021). Recikliranje komine kao sirovine za izolaciju bioaktivnih komponenti može povećati ekonomičnost proizvodnje smanjenjem količine otpada te stvaranjem dodane vrijednosti (Cai i sur., 2021). Valorizacija uključuje ekstrakciju i izolaciju bioaktivnih spojeva za korištenje u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Panić i sur., 2019). U kozmetičkoj industriji i dermatologiji važnost polifenolih spojeva se uglavnom temelji na njihovom antioksidacijskom potencijalu. Proizvodi s polifenolnim ekstraktima koriste se za prevenciju starenja, zaštitu kože od sunčevog zračenja, uklanjanje hiperpigmentacijskih nepravilnosti ili zaštitu kozmetičkih formulacija kako bi im se produljio rok trajanja (Dvorneković, 2021).

Za pripremu ekstrakata bogatih biološki aktivnim spojevima mogu se koristiti niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) (Panić i sur., 2021). DES-ovi se sintetiziraju miješanjem akceptora vodikove veze, npr. kvaterne amonijeve soli, i donora vodikove veze, npr. urea, glicerol i šećeri. Budući da je većina sastojaka DES-ova prirodnog podrijetla, primjena DES-ova prihvatljiva je za okoliš (Chen i sur., 2019). Struktura te fizikalno-kemijska svojstva tih otapala mogu se dizajnirati za specifične namjene tako da zadovoljavaju tehnološke i ekonomske zahtjeve industrije (Radović i sur., 2021), a osim toga mogu pojačati stabilnost biološki aktivnih spojeva, kao što su polifenoli (Panić i sur., 2020).

Cilj ovog rada bio je pripremiti ekstrakte bogate biološki aktivnim spojevima (polifenolima) ekstrakcijom iz komine grožđa koristeći DES kao otapalo. U komini grožđa sorte *Graševina* određeni su udjeli ugljikohidrata, tanina, polifenola i vinske kiseline. Tekućinskom

kromatografijom identificirani i kvantificirani su pojedini polifenoli. Pomoću COSMOtherm programa odabrano je optimalno otapalo te je provedena ekstrakcija. Određena je sposobnost ekstrakata pripremljenih u DES-u da inhibiraju aktivnost kolagenaze te je određen *in vitro* utjecaj na proliferaciju HaCaT stanica. Rezultati su uspoređeni s ekstraktima pripremljenim u konvencionalnim otapalima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GROŽĐE KAO IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA

Proizvodnja grožđa na svjetskoj razini veća je od 79 milijuna tona godišnje. Otprilike 75 % proizvedenog grožđa se koristi za proizvodnju vina, dok 20-30 % predstavlja otpadne produkte (Antonić i sur., 2020). Taj otpad se naziva komina grožđa, a sastoji se od pokožice, ostatka pulpe, sjemenki i peteljke (Panić i sur., 2021; Costa i sur., 2019).

Proizvodnja vina je značajan poljoprivredni sektor u Republici Hrvatskoj. Ukupna proizvodnja grožđa u 2020. godini iznosila je 125.043 tone, čime se ujedno stvaraju velike količine krutog otpada nakon proizvodnje vina (Sokač i sur., 2022; Panić i sur., 2021).

Odlaganje otpada stvara ekološke probleme kao što je zagađenje podzemnih i površinskih voda, privlačenje prijenosnika zaraznih bolesti te potrošnja kisika u tlu i podzemnim vodama. Niski pH i prisutnost antibakterijskih supstanci, kao što su polifenoli, imaju negativan učinak na biorazgradnju ako je komina odložena na polja tijekom sezone berbe. Iako je komina grožđa bogata proteinima, kod većine životinja stopa probavljivosti je mala zbog velike količine vlakana, lignina i tanina (Nistor i sur., 2014). Zbog nedostatka esencijanih nutrijenata, nije ekonomski isplativo koristiti kominu za kompostiranje (Antonić i sur., 2020).

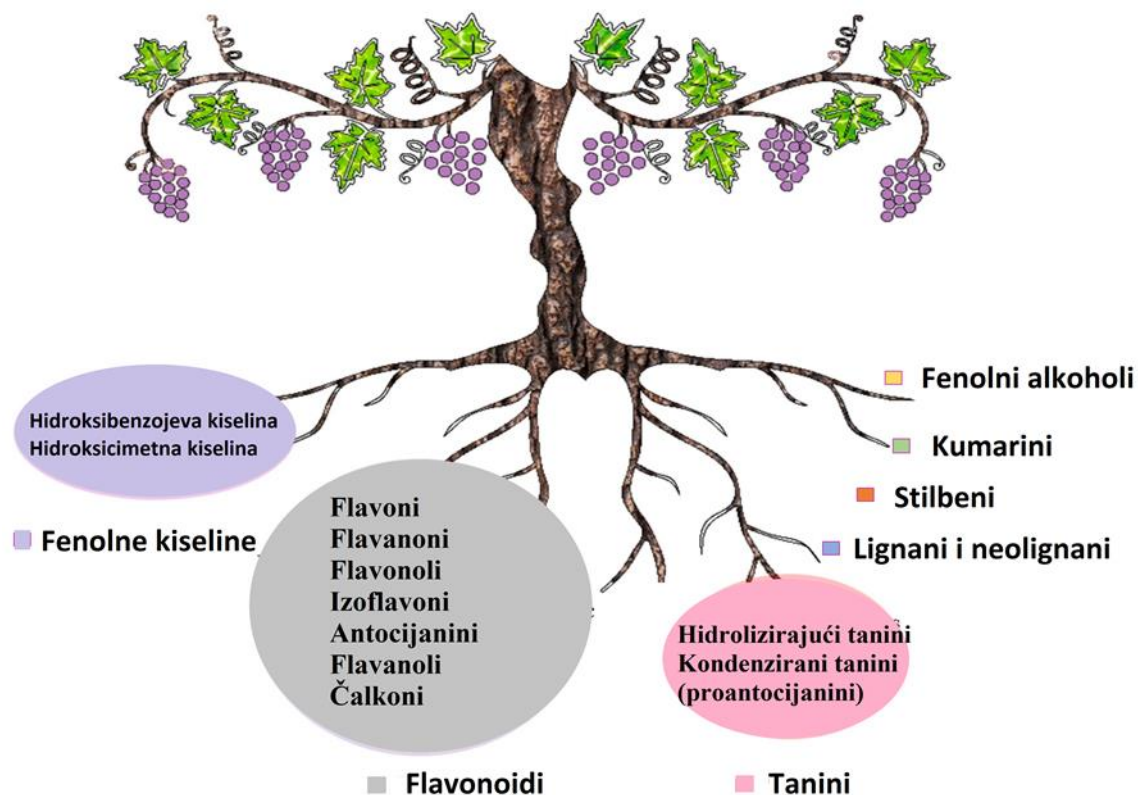
S druge strane, komina grožđa iznimno je bogata biološki aktivnim spojevima. Epiderma, sjemenke i stabljika su bogat izvor polifenolnih spojeva. Osim toga, ulje sjemenki sadrži polifenolne antioksidanse kao i visok sadržaj esencijalnih masnih kiselina, uglavnom linolenske i oleinske kiseline, i druge antioksidanse kao što su tokoferol i β -karoten, ali i fitosterole, dok se u kožici grožđa uglavnom nalazi vinska kiselina. Izolacijom biološki aktivnih komponenti smanjit će se količina otpada, a time će se povećati ekonomičnost proizvodnje (Panić i sur., 2021).

Uočeno je da komina grožđa ima antimikrobnu sposobnost, posebno protiv mikroorganizama povezanih s kvarenjem hrane i crijevnim infekcijama, uključujući *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella infantis* i *Candida albicans*. Antimikrobno djelovanje grožđa povezuje se s prisutnošću fenolnih spojeva kao što su resveratrol i antocijanini (Costa i sur., 2019).

2.1.1. Grožđe kao izvor polifenola

Fenoli su sekundarni metaboliti biljaka. Kemijski se mogu definirati kao tvari koje posjeduju aromatski prsten koji nosi jednu ili više hidroksilnih skupina, uključujući njihove funkcionalne derivate (Ignat i sur., 2011). Zbog loše ekstrakcije polifenola prilikom proizvodnje vina, komina grožđa bogata je istima (Antonić i sur., 2020; Bordiga i sur., 2019).

Polifenoli su spojevi koji imaju više od jedne fenolne hidroksilne skupine vezane na jednu ili više benzenskih prstena (Tsao, 2010). Unutar ove klase spojeva, u komini grožđa su otkriveni katehini, flavonolni glikozidi, fenolne kiseline i alkoholi, stilbeni, a posebno antocijanini (Slika 1) (Kammerer i sur., 2005). Četiri glavne klase polifenola, koji se nalaze u hrani su fenolne kiseline, flavonoidi, lignani i stilbeni (Spencer i sur., 2008).



Slika 1. Shematski prikaz fenolnih spojeva (prema Hoss i sur., 2021)

Fenolne kiseline dijele se na hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Hidroksicimetne kiseline su češće od hidroksibenzojevih kiselina, a uglavnom uključuju galnu, *p*-kumarinsku, kafeinsku, klorogensku, ferulinsku i sinapinsku kiselinu. Vezani oblici su glikozilirani derivati ili esteri kininske, šikiminske i vinske kiseline (Yu i Ahmenda, 2013).

Najbolje proučeni polifenoli su flavonoidi. Na temelju njihove molekularne strukture, flavonoidi se dijele u sedam podklasa: flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, antocijanini, flavanoli (ili katehini i procijanidini) i čalkoni (He i Giusti, 2010). Flavonoidi, koji nisu uključeni u ovu klasifikaciju su proantocijanidini, koji se također nazivaju procijanidini, kondenzirani tanini ili oligomerni procijanidini (Yu i Ahmedna, 2013). Flavonoidi su najzastupljenije fitokemikalije koje biljkama služe kao zaštita od UV zračenja, fungalnih parazita, patogena i oksidativnog oštećenja stanica (Ignat i sur., 2011).

Najzastupljeniji stilben je resveratrol (Bordiga i sur., 2019). Resveratrol je fitoaleksin koji se proizvodi u biljci kao odgovor na napad patogena. Ima nisku toksičnost za ljude i prirodni je fungicid (Yu i Ahmenda, 2013; Ignat i sur., 2011).

Lignani su fitoestrogeni koji se sastoje od međusobno spojene dvije fenilpropanoidne jedinice vezane između β - položaja u bočnim lancima. Pronađeni su u drvenim dijelovima biljaka, listovima, korijenju, cvjetovima, plodovima i sjemenkama. Mogu se naći u slobodnom obliku ili glikozidno povezani sa različitim ugljikohidratima (Willför i sur., 2006).

Sastav polifenola svakog dijela komine grožđa varira ovisno o sorti grožđa te je pod utjecajem mjesta uzgoja, klime, zrelosti i vremena fermentacije. Crvene sorte grožđa obično su bogate antocijaninima, koji su zanemarivi u bijelim sortama (Yu i Ahmedna, 2013). Xia i sur. (2010) su pokazali da je pokožica grožđa bogat izvor antocijanina, hidroksicimete kiseline, flavanola i flavonolnih glikozida, dok su sjemenke izvor galne kiseline i flavanola.

2.1.2. Primjena polifenola u kozmetičkoj industriji

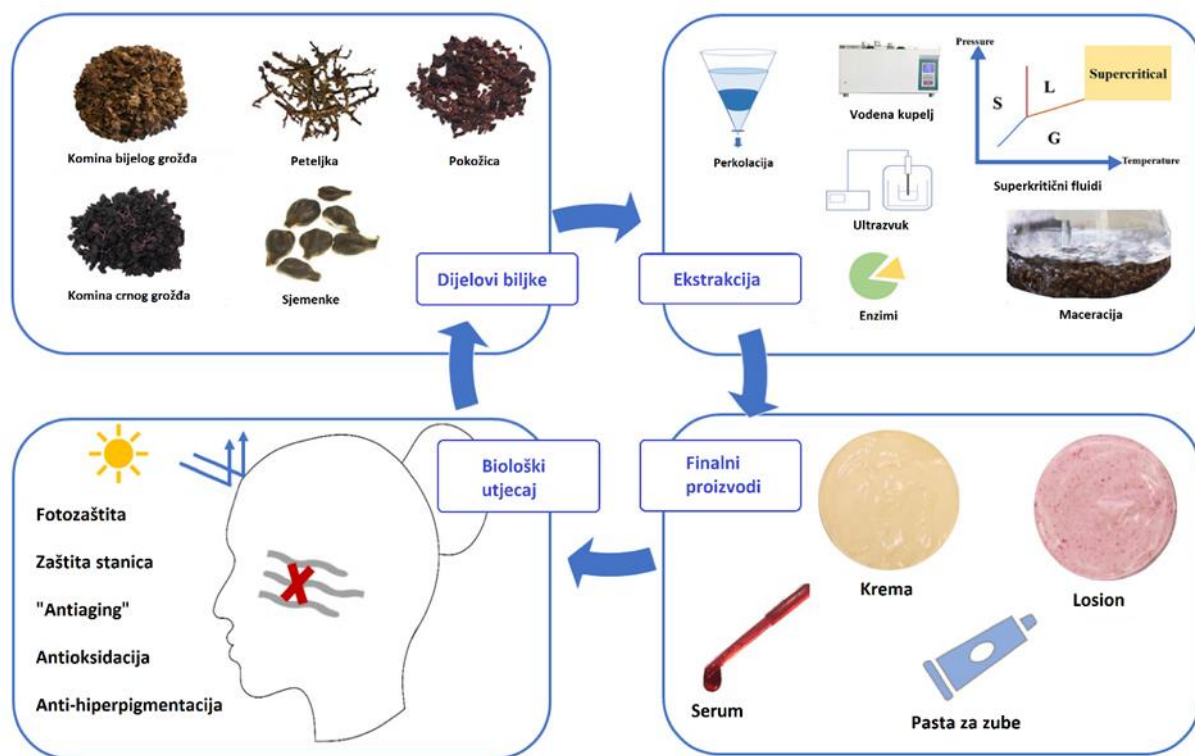
Polifenoli imaju antimutageno, antikancerogeno, antioksidativno i protuupalno djelovanje (Panić i sur., 2021; Bordiga i sur., 2019), dobra su prevencija za kardiovaskularne bolesti, produljuju životni vijek i usporavaju nastanak markera povezanih sa starenjem. Zbog toga se polifenoli ekstrahirani iz komine grožđa mogu koristiti za konzerviranje hrane, suzbijanje rasta patogenih bakterija i sprječavanje oksidacije lipida (Yu i Ahmadna, 2013). Zbog svojih antioksidativnih svojstava polifenoli su našli svoju primjenu u kozmetičkoj industriji i dermatologiji. Ekstrakti polifenola komine grožđa pokazali su obećavajuće antioksidativno djelovanje te pružanje zaštite od prijevremenog starenja, hiperpigmentacije i UV zračenja u *in vitro* testiranjima (Hoss i sur., 2021).

Antioksidativna svojstva fenolnih spojeva uglavnom se pripisuju sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i mogućnosti keliranja metala, kao i djelovanju na stanične signalne putove i na ekspresiju gena (Xia i sur., 2010). Polifenolni antioksidansi mogu zaštititi ljudske stanice i

tkiva od oksidativnog stresa (Hoss i sur., 2021). Oksidativni stres uzrokovan je viškom reaktivnih vrsta kisika (engl. *Reactive Oxygen Species, ROS*). U normalnim uvjetima, endogeni antioksidativni sustav kože je vrlo učinkovit, ali kada je organizam izložen oksidativnom stresu, učinkovitost endogenog antioksidativnog sustava je smanjena. Nakon zračenja, ROS pokreću lančanu reakciju peroksidacije lipida u staničnoj membrani i zadiru u putove prijenosa signala koji su uključeni u ekspresiju gena koji reguliraju metabolizam kolagena. Uslijed signalne kaskade dolazi do prekomjerne ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP), kao što su MMP-1 (kolagenaza), MMP-3 (stromelizin) i MMP-9 (želatinaza) (Zillich i sur., 2015). Ovi enzimi kataliziraju razgradnju odgovarajućih proteina i uslijed toga može doći do progresivnog gubitka funkcije kože i preuranjenog starenja (gubitak elasticiteta, duboke bore, gruba i hrapava koža) (Vujnović, 2022). Budući da se ekspresija MMP-a događa u epidermalnim keratinocitima i dermalnim fibroblastima, ovi slojevi kože su posebno osjetljivi na oštećenja od sunca. Kako bi podržali endogeni antioksidativni sustav, antioksidansi se mogu unijeti putem prehrane ili nanijeti izravno na kožu. Oni mogu „hvatati“ ROS i inaktivirati MMP što rezultira normalnom proizvodnjom strukturnih proteina kože (Zillich i sur., 2015). Polifenolni ekstrakti inhibiraju i elastazu, čime se neometano stvara elastin koji je odgovoran za čvrstoću i elastičnost kože (Hoss i sur., 2021; Bordiga i sur., 2019). Osim starenja kože, jedan od slijedećih problema je pigmentacija kože povezana s nakupljanjem i proizvodnjom melanina koji sintetizira enzim tirozinaza. Fenolni spojevi imaju strukturne analoge sa supstratom tog enzima te stoga mogu inhibirati proizvodnju melanina. Aktivnost inhibicije tirozinaze ne ovisi samo o količini polifenolnih spojeva, već i o njihovoj raznolikosti. Rezultati su pokazali potencijalnu kozmetičku primjenu polifenola kao aktivnog sastojka protiv hiperpigmentacije (Hoss i sur., 2021). Sposobnost polifenola da djeluju kao fotoprotektori također je važna za kozmetičke primjene. Faktori zaštite od sunca (engl. *Sun Protection Factor, SPF*) flavonoida, stilbena i derivata hidroksicimetne kiseline, bili su od 7 do 29, što odgovara „minimalnom“ (SPF od 2 do 12) i „umjerenom“ (SPF od 12 do 30) svojstvu zaštite od sunca. Predtretman HaCaT keratinocita s polifenolima ili fenolnim ekstraktima doveo je do smanjenog stvaranja ROS-a, izazvano UVB zračenjem ili vodikovim peroksidom. Osim toga, uočena je prevencija oštećenja DNA i prevencija stanične apoptoze. Ova istraživanja pokazuju da polifenolni ekstrakti mogu biti korisni sastojci za kreme za sunčanje i kozmetičke proizvode za poslije sunčanja. Budući da fotooštećenja mogu dovesti do nastanka raka kože, gore opisana svojstva ukazuju na pozitivne učinke biljnih polifenola tijekom terapije protiv raka, ali realizirano je samo nekoliko kliničkih istraživanja (Zillich i sur., 2015). Prema Xia i sur. (2010) fenolni spojevi su imali dvostruki učinak na stanice i proliferacija stanica je značajno ovisila o dozi. Pri visokoj

koncentraciji polifenola izazvan je toksični učinak i inducirana smrt stanica. Rezultati nekih istraživanja su sugerirali da su negativni učinci fenolnih spojeva povezani sa sinergističkim učinkom nekih molekula te da koncentracija nije uvijek bila presudan faktor (Xia i sur., 2010). Polifenoli mogu biti nestabilni i dovesti do stvaranja radikala ili se ponašati kao prooksidansi. Kada djeluju kao antioksidansi, također mogu stvarati radikale, a učinci na kožu nisu još definirani. Nadalje, mogu stvarati produkte čija potencijalna toksičnost također još nije dokazana (Soto i sur., 2015). Potrebno je dodatno istražiti dozu i sastav ekstrakata grožđa za sigurnu i zdravu primjenu (Xia i sur., 2010). Većina znanstvenih istraživanja je još uvijek povezana s istraživanjem korisnih svojstava polifenola i mehanizama njihovog biološkog djelovanja (Hoss i sur., 2021).

Nakon povoljnih *in vitro* testiranja provedenih sa ekstraktima grožđa, polifenoli su dodani u različite kozmetičke proizvode kao što su kreme, losioni, paste za zube i serumi, u svrhu testiranja njihove *in vitro* i/ili *in vivo* djelotvornosti (Slika 2).



Slika 2. Shematski prikaz životnog ciklusa *Vitis vinifera*, počevši od biljke, zatim ekstrakcijskih tehnika te kozmetičkih proizvoda u kojima se nalaze polifenoli koji imaju biološki utjecaj (prema Hoss i sur., 2021)

Zabilježeno je da ekstrakt sjemenki *Vitis vinifera* (grožđe) djeluje kao sredstvo za njegu usne šupljine i sredstvo protiv karijesa, protiv prhuti, protiv gljivica, kao antimikrobno sredstvo,

antioksidans, aroma, stabilizator svjetlosti te kao sastojak krema za sunčanje i regeneraciju kože (Soto i sur., 2015).

Biološki aktivne komponente moraju biti oslobođene iz formulacije, doprijeti do kože i konačno prevladati barijeru i prodrijeti u epidermu i dermu. Oslobođanje aktivnih tvari i daljnje prodiranje kroz kožu ovisi o svojstvima molekule kao što su molekularna težina i lipofilnost, ali i formulacija nosača. Formulacije moraju biti kemijski, fizički i mikrobiološki stabilne kako bi se osigurala stabilnost i isporuka aktivne tvari na ciljne slojeve kože (Zillich i sur., 2015). Kozmetička industrija treba kontrolirati ostatke pesticida i teške metale koji mogu biti prisutni u sastojcima porijeklom iz biljaka kako bi se ograničile nečistoće u sastojcima prije miješanja u kozmetičku formulaciju (Soto i sur., 2015). Ipak, korisni učinci *in vitro* kao i *in vivo* pokazuju ogroman potencijal polifenolnih ekstrakta kao aktivnih sastojaka u proizvodima za lokalnu primjenu za prevenciju UV oštećenja, starenja kože kao i nastanka tumora (Zillich i sur., 2015).

2.2. ZELENA EKSTRAKCIJA

Godine 1991. kemičar P. T. Anastas je kroz program nazvan zelena kemija, koji se zasniva na prihvatljivom usuglašavanju ekonomskih i ekoloških zahtjeva tijekom proizvodnje različitih industrijski značajnih kemikalija, ukazao na potrebu za smanjenjem štetnih otapala te pronalaskom novih, ekološki prihvatljivih i neškodljivih otapala koja se mogu reciklirati (Radović i sur., 2021). Cijeli koncept je složen i sažet u dvanaest načela zelene kemije. Cilj zelene kemije je dobivanje ekološke i ekonomske koristi kroz nekoliko pravaca kao što su biokataliza, korištenje obnovljivih sirovina, ekonomska učinkovitost, korištenje alternativnih uvjeta reakcije (uz pomoć ultrazvuka i mikrovalova), kao i primjena nekonvencionalnih otapala kao zamjena za opasna organska otapala. Sa stajališta zelene kemije, otapala trebaju biti: nehlapljiva, kako bi se smanjilo onečišćenje zraka; nezapaljiva, zbog sigurnosti procesa; stabilna, zbog recikliranja i potencijalno ponovne upotrebe; sintetizirana ekološki prihvatljivim sintetskim postupkom; netoksična i biorazgradiva, zbog utjecaja na okoliš (Radošević i sur., 2016).

Otapala su dobila mnogo pozornosti u okviru zelene kemije što se pripisuje velikom volumenu otapala koje se koristi u reakciji (obično u fazi pročišćavanja) ili u formulaciji. Osim toga, otapalo nije izravno odgovorno za sastav produkta reakcije niti je aktivna komponenta formulacije. Stoga bi se uporaba toksičnih, zapaljivih ili ekološki štetnih otapala činila nepotrebnom jer te karakteristike nemaju utjecaja na funkciju ili poboljšanje sustava u kojem se otapalo primjenjuje (Byrne i sur., 2016). S vremenom je došlo do toga da su se spojevi koji

su se prvo koristili kao otapala (npr. benzen, ugljikov disulfid i dietil eter) počeli mijenjati s novim tvarima koje su bile učinkovitije ili manje opasne. Smanjeni utjecaj otapala može se postići izbjegavanjem emisija i zamjenom štetnih otapala što obično zahtijeva velike inovativne promjene u reakcijskom inženjerstvu i procesnoj tehnologiji. Zamjene za trenutno korištena otapala vrše se ili prenamjenom postojećih kemijskih tvari ili otkrivanjem nekih potpuno novih materijala (Winterton, 2021).

Osim toga, otpad u svim njegovim oblicima, njegovim izvorima (kućanskim, institucionalnim i industrijskim), utjecaju i metodama konačnog zbrinjavanja je već dugo predmet javne brige. U posljednjih 40-50 godina sve je veći naglasak (kroz zakone, propise, pritisak javnosti i konkurenciju) na količinu proizvedenog otpada, osobito u kemijskoj industriji (Winterton, 2021). Danas je potreba za ograničavanjem hlapljivih otapala uključena u zakonodavstvo i politiku Europske unije u području očuvanja okoliša za razdoblje od 2010. do 2050. godine. Pri odabiru otapala za primjenu u industrijskom mjerilu iznimno je važan i utjecaj njihove primjene na ukupnu ekonomsku računicu. Zbog netoksičnosti i nezapaljivosti te dostupnosti i niske cijene, voda se nameće kao najbolji izbor te se upotrebljava u industrijskim razmjerima. Ipak, zanemariva topljivost mnogih organskih i organometalnih spojeva u vodi, visoko talište ($T_t = 0\text{ }^\circ\text{C}$) te visoka molarna entalpija isparavanja ($\Delta H_v = 40,65\text{ kJ mol}^{-1}$) glavni su ograničavajući faktori primjene vode kao otapala u kemijskoj i biotehnološkoj industriji.

Na scenu dolaze nova otapala kao što su ionske kapljevine, superkritični i subkritični fluidi, fluorirana otapala te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora (npr. niskotemperaturna eutektička otapala i otapala na bazi glicerola) (Radović i sur., 2021).

2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (DES) su otapala koja bi potencijalno mogla pojačati stabilnost biološki aktivnih spojeva kao što su polifenoli (Panić i sur., 2021). Općenito, eutektička se otapala definiraju kao eutektička smjesa dvije ili više komponenata koje pri određenim uvjetima mogu tvoriti kapljevinu zbog formiranja jakih vodikovih veza između prisutnih komponenata. Sniženje tališta (T_t) uzrokovano je delokalizacijom naboja uslijed formiranja snažnih intermolekulskih interakcija (npr. vodikove, ionske i van der Waalsove veze). U toj točki sustav djeluje kao cjelina pa kruti sustavi postaju kapljevit. Pojam niskotemperaturna eutektička otapala odnosi se na eutektičke smjese kod kojih dolazi do značajnog sniženja T_t te su ove smjese često kapljevine pri sobnoj temperaturi (Radović i sur., 2021).

DES su mješavina donora vodikove veze (HBD), npr. šećera, poliola, aminokiselina, amida i akceptora vodikove veze (HBA), kao što je kolin klorid, u definiranom stehiometrijskom omjeru (Panić i sur., 2021). Obično su komponente DES-a netoksičane, jeftine i lako dostupne (Dabetić i sur., 2019). Niskotemperaturna eutektička otapala se obično dijele na četiri vrste: tip I (kvaterna sol i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe), tip II (kvaterna sol i halogenid metala poput Cr, Co, Fe), tip III (kvaterna sol i donor vodikove veze poput amida, kiseline i alkohola) i tip IV (halogenid metala i donor vodikove veze poput amida i alkohola). Budući da se temelje na mješavini jeftinih i lako dostupnih spojeva (netoksične kvaterne amonijeve soli koja predstavlja akceptor vodikove veze te nenabijenog donora vodikove veze poput šećera, poliola, amida i organskih kiselina), većina niskotemperaturnih eutektičkih otapala pripadaju skupini III. U sastav niskotemperaturnih eutektičkih otapala može ulaziti i voda kao idealan spoj za stvaranje vodikove veze. Također, prisutnost određene količine vode u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu doprinosi smanjenju viskoznosti i gustoće otapala, što je iznimno važno kod njegove primjene (Radović i sur., 2021).

Moguće je dizajnirati otapala sa specifičnim fizikalno-kemijskim svojstvima za posebne namjene. Eksperimentalno, pronaći optimalni DES za željenu ekstrakciju spojeva je skup i dugotrajan proces. Kako bi se uštedjeli vrijeme i novac i smanjio broj eksperimenata, koristi se softver COSMOtherm. Trenutno, *Conductor-like Screening Model for Real Solvents* za stvarna otapala (COSMO-RS) smatra se jednom od najtočnijih *ab initio* računalnih metoda dostupnih za rangiranje otapala. Iako nije bio razvijen za DES-ove, moguće je izraditi vlastitu bazu podataka pomoću softvera TmoleX. Kombinacija ovih dvaju softvera omogućuje računalno rangiranje DES-ova ovisno o topljivosti ciljanih molekula (Panić i sur., 2021). Usporedba izračunatih svojstava pruža zadovoljavajuće informacije o stabilnosti i učinku odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Postoji relativno dobro slaganje između predviđenih vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava i onih navedenih u literaturi (Benabid i sur., 2019).

DES-ovi se mogu lako sintetizirati miješanjem HBA i HBD nakon blagog zagrijavanja (60–90 °C) od 30 minuta do jednog sata (Chen i sur., 2019). Osim toga mogu se pripremiti i isparavanjem, sušenjem smrzavanjem, mljevenjem, zagrijavanjem uz pomoć ultrazvuka te pomoću mikrovalova. Priprema DES-ova zagrijavanjem uz miješanje najčešća je korištena metoda jer je ekonomična i omogućuje jednostavno održavanje konstantne temperature (Mišan i sur., 2020).

Prema strukturi, odnosno funkciji niskotemperaturnih eutektičkih otapala, uvedeni su različiti pojmovi kojima se definiraju podvrste tih otapala. Pod pojmom prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*)

podrazumijevaju se otapala kod kojih su komponente iz prirodnih izvora, poput poliola, šećera, organskih kiselina, aminokiselina i masnih kiselina. Za većinu NADES-a dokazano je da su niske toksičnosti. Nedavno je uveden i pojam terapijska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents, THEDES*) kao nova klasa eutektičkih otapala kojima je jedna komponenta djelatna tvar lijeka (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient, API*). Takva otapala imaju mogućnost primjene u dizajniranju i formulaciji lijekova (Radović i sur., 2021).

DES-ovi su u skladu s načelima zelene kemije, a cijena DES-a je usporediva s cijenom konvencionalnih otapala. DES-ovi su kemijski i toplinski stabilni, nehlapljivi, nezapaljivi, netoksičani i biorazgradivi (Panić i sur., 2021).

2.2.1.1. Svojstva eutektičkih otapala

Osim dobrih ekonomskih i ekoloških svojstava, DES-ove je moguće dizajnirati da budu specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava ovisno o namjeni (Panić i sur., 2021). Važna fizikalno-kemijska svojstva na koja se može utjecati prilikom izrade DES-a su talište, gustoća, viskoznost, polarnost i pH vrijednost.

Kao što je već spomenuto, eutektička otapala nisu čisti spojevi već smjese dvaju ili više čistih spojeva. Takav sustav je predstavljen faznim dijagramom čvrsto-tekuće, koji pokazuje temperaturu taljenja u funkciji sastava smjese. Točke smrzavanja većine eutektičkih otapala obično se kreću između -69 i 149 °C, ali sve imaju točku tališta nižu od 150 °C (El Achkar i sur., 2021). Najviše se primjenjuju ona otapala koja imaju talište ispod 50 °C pa se mogu upotrebljavati na sobnoj temperaturi (Radović i sur., 2021). Nije pronađena korelacija između točke smrzavanja eutektičkog otapala i tališta njegovih čistih komponenti, ali je uočeno da donor vodikove veze ima utjecaj na talište (El Achkar i sur., 2021).

Gustoća niskotemperaturnih eutektičkih kreće se u rasponu $\rho = 1,1 - 1,4$ g cm⁻³ što je veće od gustoće vode i tradicionalnih organskih otapala (npr. etanol, metanol, etil-acetat i dr.) (Radović i sur., 2021). Gustoća DES-a može varirati ovisno o vrsti korištenog HBD-a, stoga će DES na bazi etilen glikola imati manju gustoću u usporedbi s DES-om na bazi glicerola. Također, DES s većim molarnim omjerom HBA prema HBD ima manju gustoću (Hansen i sur., 2020). Gustoća DES-a ovisna je i o temperaturi; linearno se smanjuje povećanjem temperature (El Achkar i sur., 2021). Većina eutektičkih otapala pokazuje visoke vrijednosti viskoznosti u rasponu $\eta = 0,02 - 0,5$ Pa s (Radović i sur., 2021), što se uglavnom pripisuje mreži vodikovih veza između komponenta otapala. Tako otapala na bazi šećera imaju veće vrijednosti viskoznosti u odnosu na otapala na bazi poliola. Zaključeno je da viskoznost eutektičkih otapala

ovisi o prirodi komponenti otapala, njihovom molarnom omjeru, temperaturi i sadržaju vode (El Achkar i sur., 2021). Optimiranjem sadržaja vode u DES-u mogu se smanjiti problemi s prijenosom mase i pumpanjem kada se DES-ovi primjenjuju na industrijskoj razini. U mnogim slučajevima, dodavanjem vode između 20 i 30 % (w/w) smanjuje se viskoznost DES-a i povoljno se utječe na prinos ekstrakcije polarnih i nepolarnih spojeva (Dabetić i sur., 2019).

Priroda komponenti otapala i sadržaj vode utječe i na pH vrijednost. Tako su otapala s organskom kiselinom kao donorom vodikove veze kisela ($\text{pH} < 3$), dok su otapala koja sadrže amid kao donor vodikove veze bazična ($\text{pH} > 8$). Povećanje pH vrijednosti s povećanjem sadržaja vode pojavljuje se kod otapala s iznimno niskim pH vrijednostima. Suprotno, kod otapala s pH u gornjem području kiselosti, pH vrijednost smanjuje se s povećanjem sadržaja vode (Radović i sur., 2021).

DES-ovi se s obzirom na polarnost dijele na hidrofilne i hidrofobne, što je bitno za proces ekstrakcije. Hidrofobni DES-ovi su prikladni za ekstrakciju organskih i anorganskih analita iz vodenih uzoraka, dok su hidrofilni DES-ovi prikladni za ekstrakciju analita iz niskopolarnih uzoraka (Chen i sur., 2019). Najčešće se koriste polarna otapala, od kojih su otapala na bazi organskih kiselina najpolarnija, dok su ona na bazi šećera i poliola najmanje polarna (Mišan i sur., 2020).

Upravo zbog širokog raspona u vrijednostima fizikalno-kemijskih karakteristika, niskotemperaturna eutektička otapala smatraju se dizajniranim otapalima. Izborom sastavnica i njihovim omjerom moguće je upravljati karakteristikama otapala te samim time utjecati na uspješnost njihove primjene (Radović i sur., 2021).

2.2.1.2. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva

Industrija se suočava s novim izazovima: kako uspostaviti ekološki prihvatljivije i sigurnije procese, a da njihova proizvodnja bude ekonomski održiva. Ekstrakti spremni za upotrebu mogu biti savršeno rješenje za pripremu proizvoda koji sadrže sekundarne biljne metabolite namijenjene ljudskoj prehrani jer priprema takvih ekstrakata ne zahtijeva procese pročišćavanja čime se reduciraju troškovi i vrijeme. Upravo eutektička otapala mogu biti idealna otapala za njihovu pripremu.

Posljednjih se godina eutektička otapala intenzivno proučavaju u: (1) području elektrokemije; (2) sintetskoj kemiji i (bio)katalizi; (3) biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji u procesima ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora; (4) separacijskim procesima; (5) farmaceutskom inženjerstvu; (6) biomedicini. Novija istraživanja ukazuju na postojanje

NADES-a u živim stanicama kao trećeg medija u organizmu, stoga bi mogla biti od iznimnog značaja u biotehnologiji, biomedicini i farmaceutici budući da oponašaju prirodne uvjete u stanici za stabilizaciju biomolekula (npr. proteina, enzima, nukleinskih kiselina) (Radović i sur., 2021).

Postoji veliki interes za korištenjem komine grožđa u različitim područjima za dobivanje biološki aktivnih spojeva, uglavnom fenolnih spojeva koji imaju značajno antioksidativno djelovanje (Sokač i sur., 2022). Tako su u radu Panić i sur. (2021) ispitane različite vrste DES-ova za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa. Ekstrakt pripremljen u DES-u betain:glukoza (1:1, 30 % vode) sadržavao je najveći ukupni prinos polifenola (26,07 mg g⁻¹ komine), analogno onom dobivenom s etanolom kao referentnim otapalom (26,06 mg g⁻¹ komine). Time je naglašena mogućnost zamjene konvencionalnog otapala DES-om u procesu ekstrakcije, a osim toga ekstrakti pripremljeni u DES-u mogli bi imati drugačiju i/ili poboljšanu biološku aktivnost od čistih polifenola. Radošević i sur. (2016) su pokazali da različite pH vrijednosti i polarnost DES-ova utječe na izolaciju različitih spojeva; DES-ovi s organskim kiselinama dobro ekstrahiraju antocijane, dok je za druge fenolne spojeve bolje izabrati DES-ove sa šećerima. Eutektička otapala na bazi kolin klorida imaju visoku sposobnost stabilizacije fenolnih spojeva, a mogu se koristiti i za stabilnost enzima i enzimske reakcije (Dabetić i sur., 2019). Panić i sur. (2021) uočili su 15 % veći stimulacijski učinak ekstrakata pripremljenih u DES-u na HaCaT stanice, u odnosu na etanol. Učinak je bio proporcionalan koncentraciji polifenola u ekstraktu. Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost primjene ekstrakata pripremljenih u DES-ovima u kozmetičkoj industriji; kao zaštita stanica kože od oksidativnog stresa i poticanje proliferacije stanica. Iako se NADES-i sastoje od prirodnih spojeva, moguć je sinergijski učinak između komponenti što može rezultirati drugačijim toksikološkim profilom NADES-a. Kao i biološka aktivnost ekstrakta, mora se dodatno dokazati da je takva primjena NADES-a sigurna za komercijalnu i industrijsku upotrebu. Ispitani NADES-i (kolin klorid: glukoza, kolin klorid: fruktoza, kolin klorid:ksiloza, kolin klorid: glicerol i kolin klorid: jabučna kiselina) u radu Radošević i sur. (2016) posjedovali su nisku citotoksičnost i bili su, dakle, dobri kandidati za zelenu ekstrakciju fenola iz pokožice grožđa. Četiri od pet ekstrakata imala su antiproliferacijski učinak na tumorske stanice (HeLa i MCF-7) za razliku od klasičnog metanolnog ekstrakta.

Bitno svojstvo je da se DES-ovi mogu koristiti kao održiva otapala zbog niske cijene početnih materijala (urea, ChCl, šećeri i organske kiseline). DES-ovi se sve više koriste i za analizu hrane u predtretmanima uzoraka (ekstrakcija ili razdvajanje komponenti). Zbog svojstva nehlapljivosti mogu se koristiti za brzu analizu hrane pomoću HPLC-a ili UV-Vis spektrofotometrije (Chen i sur., 2019).

Eutektička otapala omogućavaju unaprjeđenje postojećih i uspostavljanje novih procesa, ali i osiguravaju vođenje procesa sigurnih za ljude i okoliš. Potrebno je proširenje temeljnih istraživanja o svojstvima tih otapala, kao i razvoj matematičkih modela i alata za njihovo dizajniranje, prije primjene u industriji (Radović i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Komina

Pri izradi ovog rada korištena je komina hrvatske autohtone sorte grožđa *Vitis vinifera* cv. *Graševina*, dobivena od Kutjevo d.d. Komina je osušena u sušioniku i mljevena te je čuvana na sobnoj temperaturi prije upotrebe.

3.1.2. Kemikalije

- Aceton, Kemika, Zagreb, RH
- Antibiotik, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Betain, 98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Cinkov klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda, PBF
- DMSO (dimetil sulfoksid), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM), Ebsdorfergrund, Njemačka
- EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Fenol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, RH
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalcijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Kolagenaza (iz *Clostridium histolyticum*), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kositrov (II) klorid dihidrat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Leucin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Limunska kiselina monohidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Metanol, Merck, Dormstad, Njemačka
- MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij], Promega, SAD
- Natrijev citrat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH

- Natrijev karbonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ninhidrin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- PBS pufer, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- PEG 6000 (polietilen glikol), Acros Organics, Geel, Belgija
- Saharoza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sumporna kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tripsin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tris-HCl, Angus Chemical, Illinois, SAD
- Želatina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

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

3.1.3. Otopine i puferi

- Citratni pufer (0,2 M; pH=5,0)

Natrijev citrat dihidrat	3,95 g
Limunska kiselina monohidrat	1,88 g
Destilirana voda	do 100 mL
- Otopina kositrovog (II) klorida dihidrata

Kositrov (II) klorid dihidrat	80 mg
Citratni pufer	50 mL
- Otopina ninhidrina

Ninhidrin	0,5 g
DMSO	10 mL
- Reakcijski pufer

Tris-HCl (50 mM; pH=7,5)	605,7 mg
Kalcijev klorid (5 mM)	55,49 mg
Cinkov klorid (1 μ M)	1,36 μ g
Destilirana voda	do 100 mL

- Quench pufer
PEG (12 % w/v) 1,2 g
EDTA (25 mM) 73,06 mg
Destilirana voda do 10 mL
- Folin-Ciocalteu reagens
FC reagens 10 mL
Destilirana voda do 100 mL
- Otopina natrijevog karbonata
Na₂CO₃ 7,5 g
Destilirana voda do 100 mL

3.1.4. Stanične linije

Korištena je besmrtna stanična linija HaCaT keratinocita iz kože odrasle osobe dobivena od CLS Cell Lines Service GmbH (Eppenheim, Njemačka). Stanice se uzgajaju u Petrijevim zdjelicama za kulture stanica. Optimalni uvjeti održavanja HaCaT stanične linije su 37 °C te atmosfera koju čini 95 % zraka i 5 % CO₂. Za rast je korišten Dulbeccov modificirani Eagleov medij (DMEM) kupljen od Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, Njemačka) uz dodatak 5 % FBS i 1 % antibiotika.

3.1.5. Oprema

- Analitička vaga, Sartorius, Entris, Njemačka
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- HPLC, Agilent1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (epice, epruvete, kivete, laboratorijske čaše, lijevak, menzure, nastavci za pipete, odmjerne tikvice, pipete, sterilni filter, vialo)
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka

- Orbitalni homogenizator/inkubator, Biosan, Riga, Latvija
- Petrijeve zdjelice za uzgoj stanica, Thermo Fisher Scientific, Drive Rochester, NY, SAD
- Ploče s 96 jažica, Thermo Fisher, USA
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- UV–Vis spektrofotometar, XUB Series Digital Ultrasonic Baths, BioSan, Latvija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Karakterizacija komine grožđa

Prije provedbe eksperimenata, komina grožđa sorte *Graševina* je okarakterizirana te je određen udio suhe tvari, polifenola, tanina, ukupnih ugljikohidrata te vinske kiseline.

3.2.1.1. Udio suhe tvari

Za određivanje suhe tvari korištena je metoda sušenja u sušioniku pri atmosferskom tlaku i temperaturi od 100 °C. U prethodno osušene i izvagane posudice odvagano je 3 g uzorka te su uzorci sušeni do postizanja konstante mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, posudice su izvagane, a udio suhe tvari izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

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

Pri čemu 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 nakon sušenja [g]

Rezultat se izražava kao aritmetička sredina dvaju mjerenja uzorka.

3.2.1.2. Udio polifenola

U tikvicu s okruglim dnom odvagano je 10 g samljevenog uzorka komine grožđa te je dodano 100 mL 80 %-tnog metanola. Ekstrakcija je provedena uz miješanje i refluks kroz 2 sata pri 80 °C. Nakon ekstrakcije slijedi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov

lijevak. Udio polifenola određen je Folin-Ciocalteu metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.4.1.

3.2.1.3. Udio tanina

U tikvicu s okruglim dnom odvagano je 10 g samljevene komete grožđa te je dodano 100 mL 70 %-tnog acetona. Ekstrakcija je provedena uz miješanje i refluks kroz 2 sata pri 80 °C. Slijedi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. Udio tanina određen je Bate-Smith metodom.

U dvije staklene epruvete otpipetirano je po 1 mL razrijeđenog uzorka, 0,5 mL destilirane vode te 1,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline nakon čega su epruvete hermetički zatvorene. Jedna epruveta je ostavljena na sobnoj temperaturi, a druga u vodenoj kupelji na 100 °C kroz 30 minuta. Reakcija je zaustavljena hlađenjem u ledu, nakon čega je dodano 250 µL etanola te je izmjerena optička gustoća pri 550 nm. Destilirana voda služila je kao slijepa proba. Koncentracija tanina izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{Tanini [g L}^{-1}\text{]} = 19,33 * (A_1 - A_2) \quad [2]$$

Pri čemu je:

19.33- faktor preračunavanja

A₁- optička gustoća hidroliziranog uzorka

A₂-optička gustoća nehidroliziranog uzorka

Koncentracija ukupnih tanina u komini grožđa preračuna se i izrazi u mg g⁻¹ suhe tvari (s. tv.) pokožice.

3.2.1.4. Udio ukupnih ugljikohidrata

U tikvicu s okruglim dnom odvagano je 10 g samljevene komete grožđa te je dodano 100 mL vode. Ekstrakcija je provedena uz miješanje i refluks kroz 2 sata pri 60 °C. Nakon toga slijedi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. Udio ugljikohidrata određen je Phenol-sulfuric metodom.

1 mL razrijeđenog uzorka i 1 mL demineralizirane vode otpipetirano je u epruvetu te je dodano 0,05 mL 80 %-tne otopine fenola. Zatim je naglo dodano 5 mL H₂SO₄. Otopina je snažno promiješana i ostavljena 10 min na sobnoj temperaturi kako bi se ohladila. Zatim je

izmjerena apsorbancija pri 490 nm na UV-Vis spektrofotometru. Glukoza je korištena kao standard te je udio ugljikohidrata izračunat iz baždarne krivulje koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji glukoze (mg L^{-1}) prikazane na Slici 3.

Jednadžba pravca glasi:

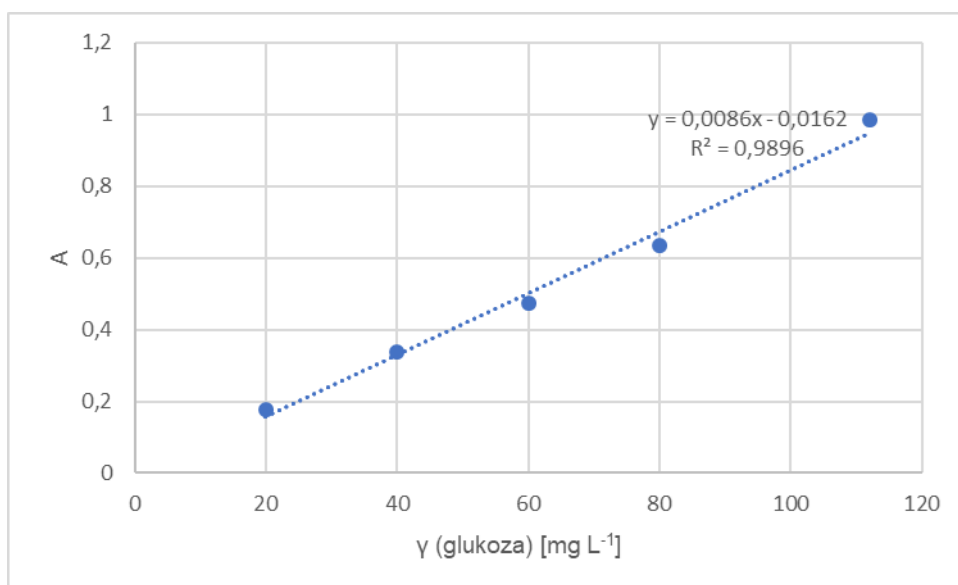
$$Y = 0,0086x - 0,0162, R^2 = 0,9896 \quad [3]$$

Pri čemu je:

Y –apsorbancija pri 490 nm,

x –koncentracije glukoze (mg L^{-1})

Konačni rezultati su izraženi kao mg glukoze g^{-1} suhe tvari komine.



Slika 3. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji glukoze (mg L^{-1}) (baždarni pravac)

3.2.1.5. Udio vinske kiseline

U tikvicu s okruglim dnom odvagano je 10 g samljevene komine grožđa te je dodano 100 mL vode zakiseljene sa H_2SO_4 na pH 3. Ekstrakcija je provedena uz miješanje kroz 2 sata pri $80\text{ }^\circ\text{C}$. Slijedi filtracija kroz filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. Udio vinske kiseline određen je pomoću HPLC-a.

3.2.2. Procjena topljivosti polifenola u eutektnim otapalima pomoću programa COSMOtherm

Model COSMO-RS koristi se za računalno predviđanje eutektnične točke i topljivosti komponenata u eutektnom otapalu. Metoda započinje proračunima optimalne geometrije molekula te volumne i površinske raspodjele električnog naboja. Proračunima se dobivaju σ -profili, a program za izradu je BIOVIA TmoleX19 version 2021 (Dassault Systemes, Paris, France). σ -potencijali izrađuju se pomoću programskog paketa COSMOtherm version 20.0.0. (Dassault Systemes, Paris, France).

U programu se dobije logaritam koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$, koji iskazuje topljivost željene tvari. Manji koeficijent aktivnosti ukazuje na veću topljivost u otapalu i obrnuto. Tablica 1 prikazuje molarne omjere NADES-a u kojima je testirana topljivost katehina kao najzastupljenijega polifenola u grožđu (Yu i Ahmedna, 2013).

Tablica 1. Molarni omjeri prirodnih niskotemperaturnih eutektničkih otapala (NADES-a) u kojima je testirana topljivost katehina

Popis NADES sustava	Kratice	Molarni omjer	Popis NADES sustava	Kratice	Molarni omjer
Betain:limunska kiselina	B:CA	1:1	Jabučna kiselina:fruktoza	Ma:Fru	1:1
Betain:glukoza	B:Glc	5:2	Jabučna kiselina:glukoza	Ma:Glc	1:1
Betain:glicerol	B:Gly	1:2	Prolin:jabučna kiselina	Pro:Ma	1:1
Betain:jabučna kiselina	B:Ma	1:1	Saharoza:etilen-glikol	Suc:EG	1:2
Betain:etilen-glicol	B:EG	1:1	Sorbitol:etilen-glikol	Sol:EG	1:2
Betain:ksiloza	B:Xyl	1:1	Ksiloza:etilen-glikol	Xyl:EG	1:2
Betain:saharoza	B:Suc	4:1	L mentol:D,L kapor	Me:Cam	1:1
Kolin-klorid:fruktoza	ChCl:Fru	1:1	L mentol:salicilna kiselina	Me:SA	4:01
Kolin-klorid:glukoza	ChCl:Glc	1.1	L mentol:oksalna kiselina	Me:C8	1:1
Kolin-klorid:jabučna kiselina	ChCh:Ma	1:1	L mentol:dekanska kiselina	Me:C10	1:1
Kolin-klorid:oksalna kiselina	ChCl:OxA	1:1	L mentol:linolna kiselina	Me:C18:2	1:01

Tablica 1. Molarni omjeri prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES-a) u kojima je testirana topljivost katehina – *nastavak*

Kolin-klorid:sorbitol	ChCl:Sol	1:1	L mentol:timol	Me:Ty	3:2 (3C)
Limunska kiselina:fruktoza	CA:Fru	1:1	Timol:oktanska kiselina	Ty:C8	1:03
Limunska kiselina:saharoza	CA:Suc	1:1	Timol:kumarin	Ty:Cou	3:2 (23.6C)
Limunska kiselina:glukoza	CA:Glc	1:1	Timol:dekanska kiselina	Ty:C10	1:01
Glukoza:fruktoza	Glc:Fru	1:1			

3.2.3. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Eutektično otapalo pripremljeno je u staklenim bočicama. Prema programu COSMO $therm$ odabrano je otapalo sastavljeno od betaina i saharoze (B:Scu) u molarnom omjeru 4:1. Iz omjera komponenti, izračunata je masa sastojaka te je dodan željeni udio vode (50 %). Bočica sa smjesom je stavljena na tresilicu pri 60 °C te je miješana kroz 2-4 sata dok nije nastala homogena i prozirna tekuća smjesa. Otapalo se čuva na sobnoj temperaturi do korištenja.

3.2.4. Priprema ekstrakta komine grožđa bogatih polifenolima

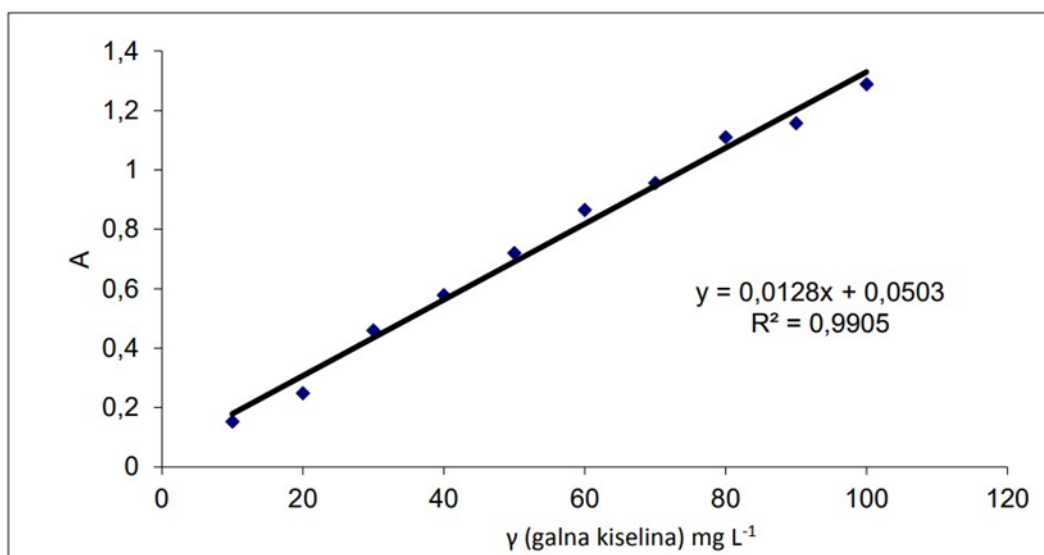
Prethodno osušena komina usitnjena je sjeckalicom. Zatim su ekstrakcijom u vodi, pri sobnoj temperaturi i uz miješanje, uklonjeni ugljikohidrati kako ne bi ometali daljnju obradu. Odvagan je 1 g komine te je dodano 10 mL NADES-a. Za usporedbu je odvagan 1 g komine te je dodano 10 mL 80 %-tnog metanola ili 70 %-tnog etanola. Za svako otapalo napravljene su po dvije paralele. Ekstrakcija je provedena na 50 °C tijekom 60 minuta na termostatiranoj tresilici. Nakon ekstrakcije slijedi vakuum filtracija preko Büchnerovog lijevka u Falcon kivete. Ekstrakti su čuvani na +4 °C do slijedećeg korištenja.

3.2.4.1. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteau reagensom

Metoda za određivanje ukupnih polifenola se temelji na redukciji smjese fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline uz oksidaciju polifenola. Reakcijom nastaju volframov oksid i molibdenov oksid uz razvoj plavog obojenja. Intenzitet obojenja proporcionalan je udjelu polifenola u uzorku.

Ekstrakti su najprije razrijeđeni 20 puta destiliranom vodom. 0,25 mL razrijeđenog uzorka otpipetirano je u epruvetu te je dodano 1,25 mL FC reagensa (razrijeđenog 10 puta). Reakcija se provodi 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim je dodan 1 mL Na₂CO₃, a epruvete su termostahirane 5 minuta pri 50 °C. Reakcija se zaustavlja hlađenjem epruveta u ledu. Nakon toga slijedi mjerenje apsorbancije na UV/Vis spektrofotometru pri $\lambda=760$ nm. Mjerenja su provedena u tri paralele.

Standard za ovu metodu je galna kiselina. Za različita razrjeđenja galne kiseline izrađen je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline (mg L⁻¹). Izračunate su srednje vrijednosti paralela koje su uvrštene u jednadžbu baždarnog pravca. Baždarni pravac prikazan je na Slici 4.



Slika 4. Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline (mg L⁻¹) (Šango, 2017)

Jednadžba pravca glasi :

$$Y = 0,0128x + 0,0503, R^2 = 0,9905 \quad [4]$$

Pri čemu je:

Y –apsorbancija pri 760 nm,

x –koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹)

Konačni rezultati su izraženi kao mg polifenola g⁻¹ suhe tvari komine.

3.2.4.2. Određivanje polifenola u komini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u ekstraktima grožđa provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-DAD detektorom. Kromatografska analiza provedena je 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 su razdvojeni na Poroshell 120 SB-C18 koloni dimenzija 4,6 x 150 mm, 4 µm. Injektirani volumen uzoraka bio je 15 µL. Mobilne faze bile su otapalo A (0,25 % octena kiselina) i otapalo B (acetonitril) pri temperaturi od 40 °C i protoku 1 mL min⁻¹. Uvjeti kromatografske analize prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti kromatografske analize

HPLC uvjeti				
Kolona	Poroshell 120 SB-C18 4,6 X 150 mm, 4 µm			
Mobilna faza	Otapalo A	0,25 % octena kiselina		
	Otapalo B	Acetonitril		
Vrijeme analize (min)	25			
Temperatura (°C)	40			
Protok (mL min⁻¹)	1			
Volumen injektiranja (µL)	15			
Eluiranje	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

Identifikacija i kvantifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena spojeva i vanjskih standarda katehina, epikatehina, epigalokatehina i rutin trihidrata kao najzastupljenijih polifenola u grožđu. Rezultati su izraženi kao mg g⁻¹ suhe tvari biomase.

3.2.5. Određivanje inhibicije aktivnosti kolagenaze

Pripremljeno je nekoliko razrjeđenja ekstrakta otopljenih u NADES-u (720, 600, 450, 300 i 150 mg mL⁻¹) i ekstrakta otopljenih u metanolu (400, 300, 200 i 100 mg mL⁻¹). Reakcijska smjesa pripremljena je u epici. Najprije je otpipetirano 343 μL otopine želatine (1,9 mg mL⁻¹) u reakcijskom puferu te je dodano 7 μL ekstrakta. Smjesa se inkubira 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 7 μL otopine kolagenaze (1 mg mL⁻¹), a reakcija se provodi kroz 10 minuta pri 37 °C. U novu epicu otpipetirano je 50 μL reakcijske smjese i dodano je 50 μL *quench* pufera za zaustavljanje reakcije. Za razvoj obojenja dodano je 500 μL prethodno pripremljenog ninhidrin reagensa. Smjesa se inkubira 10 minuta na 80 °C nakon čega slijedi hlađenje na ledu. Slijedi mjerenje apsorbancije na 570 nm. Mjerenja su provedena u tri paralele. Kao pozitivna kontrola korištena je otopina galne kiseline, a kao negativna kontrola destilirana voda.

Standard za ovu metodu je leucin. Za različita razrjeđenja otopine leucina izrađen je baždarni dijagram (Slika 5). Srednje vrijednosti apsorbancija paralela uvrštene su u jednadžbu baždarnog pravca koja glasi:

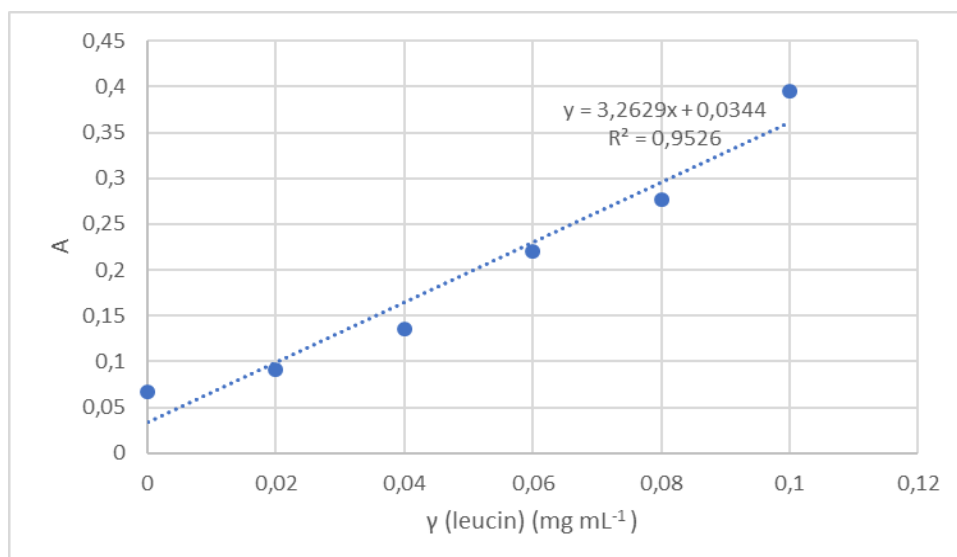
$$Y = 3,2629x + 0,0344, R^2 = 0,9526 \quad [5]$$

Pri čemu je:

Y –apsorbancija pri 570 nm,

x –koncentracija leucina (mg mL⁻¹)

Konačni rezultati su izraženi kao mg mL⁻¹ leucina.



Slika 5. Baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji leucina (mg mL⁻¹)

3.2.6. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata na HaCaT staničnoj liniji

HaCaT je spontano transformirana besmrtna stanična linija keratinocita iz kože odrasle osobe, koja se naširoko koristi u znanstvenim istraživanjima. Prilagođene su dugom rastu bez hranidbene podloge ili faktora rasta. Mogu formirati slojevitú epidermalnu strukturu, ali se mogu vraćati između diferenciranog i bazalnog stanja nakon promjena u koncentraciji Ca²⁺ u mediju (Colombo i sur., 2017).

3.2.6.1. Uzgoj HaCaT stanične linije

HaCaT stanice uzgajane su u Petrijevim posudama i održavane su u eksponencijalnoj fazi rasta. Mikroskopom je praćena morfologija stanica i njihovo prihvaćanje za podlogu kao i mogućnost pojave kontaminacija. Prilikom rukovanja i radom sa stanicama potrebno je pridržavati se aseptične tehnike rada. Stanice su uzgajane u DMEM mediju s dodatkom 5 % seruma i 1 % antibiotika u inkubatoru na 37 °C.

Eksperiment započinje uklanjanjem medija i ispiranjem dva puta sa 1 mL PBS pufera nakon čega su tretirane sa 1 mL tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Stanice su inkubirane na 5-10 minuta pri 37 °C te je djelovanje tripsina provjereno pod mikroskopom. Ako je odvajanje stanica od podloge bilo uspješno, stanice su imale kružni oblik. Stanicama je zatim dodan 1 mL medija kako bi se zaustavilo djelovanje tripsina.

Za brojanje stanica uzet je alikvot od 10 μL te im je dodano 10 μL boje tripan plavo. Stanice su izbrojane u Neubauerovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Nisu brojane mrtve stanice koje su za razliku od živih stanica bile plavo obojane. Žive stanice brojane su u 4 velika kvadrata komorice koja sadrži 16 manjih. Koncentracija stanica u mL suspenzije izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = (N1+N2+N3+N4)*5000 \quad [6]$$

Pri čemu je:

N1–broj stanica u prvom velikom kvadratu

N2–broj stanica u drugom velikom kvadratu

N3–broj stanica u trećem velikom kvadratu

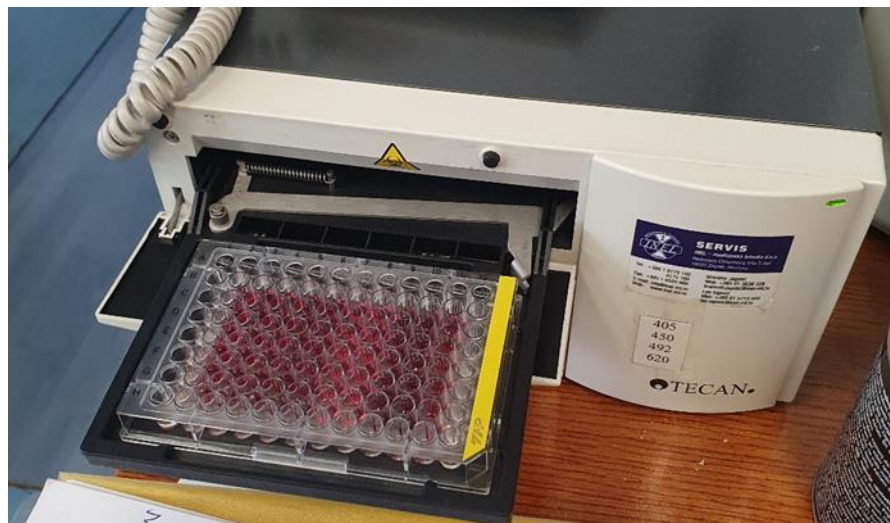
N4–broj stanica u četvrtom velikom kvadratu

3.2.6.2. *Određivanje preživljenja stanica MTS metodom*

MTS metoda temelji se na korištenju MTS reagensa koji se sastoji od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] te PES-a (fenazin etosulfat). PES služi kao komponenta za prijenos elektrona s NADH u citoplazmi na tetrazolijevu sol. Pri tome dolazi do redukcije tetrazolijeve soli u mediju pri čemu nastaje topljivi produkt formazan. Formazan je obojeni produkt te je intenzitet obojenja formazana proporcionalan broju živih stanica u uzorku. Metoda se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima, za određivanje antitijela koja inhibiraju rast te za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva (Dvorneković, 2021).

Ploča sa 96 jažica nacijepljena je sa 100 μL suspenzije stanica koncentracije 5×10^4 stanica mL^{-1} te su stanice inkubirane tijekom 24 sata na 37 °C kako bi se prihvatile na podlogu. Nakon 24 sata stanice su tretirane ekstraktima komine grožđa otopljenih u NADES-u i metanolu za usporedbu. Ekstrakti su najprije sterilno profiltrirani kroz filtere pora 0,22 μm . Ekstrakti su dodani u volumnom omjeru 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2,5 i 5 % (v/v) sterilnog ekstrakta na 100 μL suspenzije stanica. Ekstrakti su dodani u 2 paralele, u jednoj paraleli stanice su bile tretirane samo otopinom NADES-a, a kontrolu su činile netretirane stanice. Ploča sa stanicama je inkubirana 72 sata na 37 °C.

Nakon inkubiranja u sve jažice je dodano 10 μ L MTS reagensa. Ploča je zatim inkubirana kroz 3 sata na 37 °C. Intenzitet obojenja nastalog produkta mjeren je spektrofotometrijski pomoću čitača ploča pri $\lambda=492$ nm (Slika 6).



Slika 6. Čitač ploča (*vlastita fotografija*)

Preživljenje stanica izraženo je kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih stanica prema jednadžbi:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{429} \text{ uzorka}}{\text{srednja vrijednost } A_{429} \text{ kontrole}} * 100 \quad [7]$$

3.2.7. *Scratch* test

Scratch test koristi se za proučavanje utjecaja raznih faktora, npr. kemikalija, na migraciju stanica tj. zacjeljivanje rana (Chen, 2012). Eksperiment započinje uzgojem HaCaT stanica u monosloju. Monosloj se zatim zarezuje ravnom linijom u centru ploče pomoću vrha pipete, čime se oponaša rana. Prorez je označen markerom s vanjske strane ploče. Odmah su pomoću kamere mikroskopa snimljene slike nastanka rane. Ploče su zatim izložene ekstraktima u NADES-u te samo NADES-u (B:Scu). Za kontrolu su korištene netretirane stanice. Ploče su inkubirane kroz 48 sati. Pod mikroskopom je praćen tijek rasta stanica na mjestu reza tj. zacjeljivanje rana pod utjecajem ekstrakta u NADES-u.

3.3. OBRADA REZULTATA

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [8]$$

S pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [9]$$

Pri čemu je n ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačna vrijednost uzorka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Budući da zagađenje okoliša postaje sve veći problem na globalnoj razini, počinju se razvijati ekološki i industrijski prihvatljivi procesi za održivo zbrinjavanje otpada. Jedan od otpada prehrambene industrije su nusprodukti koji zaostaju nakon proizvodnje vina.

Nusprodukti iz grožđa bogati su biološki aktivnim spojevima koji nalaze svoju primjenu u kozmetičkoj, farmaceutskoj ili prehrambenoj industriji. Polifenoli su bitan dio ljudske prehrane zbog iznimnih antioksidativnih i antimikrobnih svojstva, kao i drugih bioloških aktivnosti (antimutagenih, antikarcinogenih i protuupalnih) (Panić i sur., 2021).

Za ekstrakciju polifenola bilo je potrebno pronaći otapalo koje slijedi principe zelene kemije te se može koristiti u industriji. NADES-i su biorazgradiva otapala koja se sastoje od prirodnih komponenata. U ovom radu, za ekstrakciju polifenola, odabrano je otapalo sastavljeno od betaina, saharoze i vode. Betain je prirodno prisutan u ljudskom tijelu, a glavna funkcija mu je osmoregulacija (Attia i sur., 2019). Saharozu je disaharid, sastavljen od fruktoze i glukoze, koji se koristi u prehrani.

U ovome radu provedena je karakterizacija komine grožđa sorte *Graševina* kao osnova za daljnje istraživanje. Određena su fizikalno-kemijska svojstva (udio suhe tvari, ugljikohidrata, tanina, vinske kiseline i polifenola) korištenjem konvencionalnih otapala. Provedena je usporedba ekstrakcije polifenola u 80 %-tnom metanolu i 70 %-tnom etanolu s ekstrakcijom polifenola u NADES-u. Ekstrakcije su provedene u orbitalnom homogenizatoru tijekom 2 sata pri 50 °C. Određen je maksimalni kapacitet topljivosti polifenola u NADES-u kao ekstrakcijskom otapalu. U dobivenim ekstraktima određen je ukupan sadržaj polifenola Folin-Ciocalteu reagensom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-om). Ispitana je mogućnost ekstrakata za inhibiciju aktivnosti kolagenaze, *in vitro* biološka aktivnost ekstrakata na HaCaT stanice te je proveden *scratch* test.

4.1. SASTAV KOMINE GROŽĐA

Komina grožđa je glavni nusprodukt industrije vina bogata raznim bioaktivnim komponentama. Proizvodnja vina je značajna u Republici Hrvatskoj. U 2018. godini je proizvedeno oko 123,1 t grožđa, odnosno ukupno 984.730 hL vina. Samo otpad iz proizvodnje vina čini 20-25 % ukupne mase grožđa koje se koristi u proizvodnji, što prema procjeni na razini Hrvatske iznosi preko 15.000 tona krutog otpada. Ovaj nusprodukt može donijeti dodanu vrijednost vinskoj industriji budući da se može iskoristiti za proizvodnju različitih

visokovrijednih proizvoda. Valorizacija komine grožđa može osigurati ekonomsku dobit te istovremeno pridonosi zaštiti okoliša (Panić i sur., 2021).

Komina grožđa sorte *Graševina* je analizirana te je njen sastav prikazan u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav komine grožđa sorta *Graševina*

	KOMINA
Udio suhe tvari (g g ⁻¹ , %)*	46,55 ± 0,57
Udio polifenola (g g ⁻¹ , %)*	5,88 ± 0,28
Udio tanina (g g ⁻¹ , %)*	6,42 ± 0,03
Totalni ugljikohidrati (g g ⁻¹ , %)*	24,23 ± 0,17
Udio vinske kiseline (g g ⁻¹ , %)*	3,07 ± 0,02
POJEDINAČNI POLIFENOLI I TANINI	
Galna kiselina (g g ⁻¹ , %)	0,11
Epigalokatehin (g g ⁻¹ , %)	0,06
Katehin (g g ⁻¹ , %)	0,28
Epikatehin (g g ⁻¹ , %)	0,38
Proantocijanidin A1 (g g ⁻¹ , %)	0,004
Proantocijanidin B1 (g g ⁻¹ , %)	0,19
Proantocijanidin B2 (g g ⁻¹ , %)	0,12
Proantocijanidin B3 (g g ⁻¹ , %)	0,22
Proantocijanidin B4 (g g ⁻¹ , %)	0,05
Proantocijanidin C1 (g g ⁻¹ , %)	0,13
Epikatehin galat (g g ⁻¹ , %)	0,02
Rutin trihidrat (g g ⁻¹ , %)	0,005

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

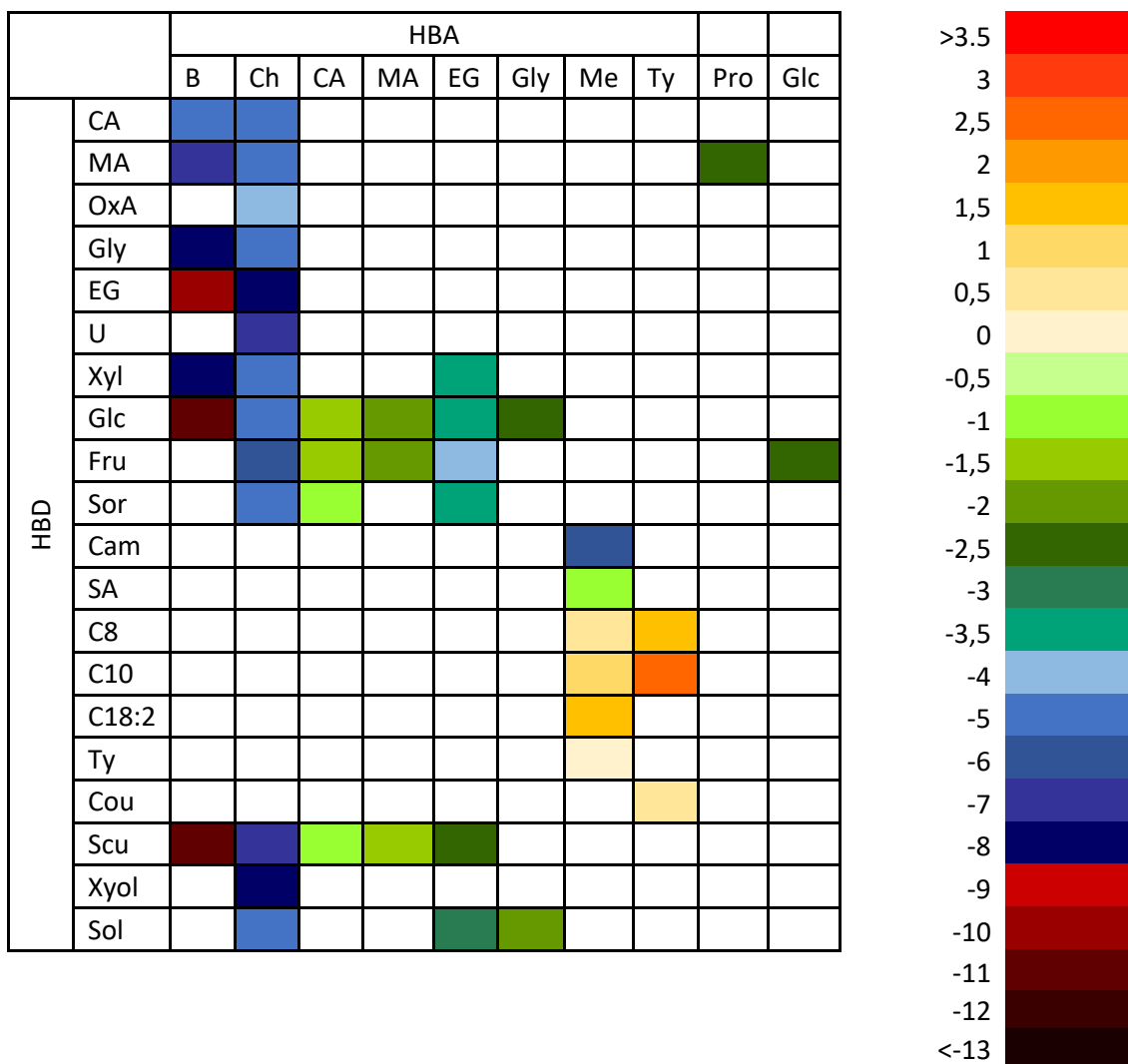
Sjemenke grožđa su bogate fenolnim antioksidansima kao što su fenolne kiseline, flavonoidi i procijanidi, dok pokožica grožđa sadrži antocijane. Ukupni sadržaj polifenola u suhoj tvari komine je oko 4,8–5,4 % (Makris i sur., 2007). Prema Yu i Ahmedna (2013) sjemenke grožđa su bogate spojevima, kao što su katehini, epikatehin, epigalokatehin, te dimernim, trimernim i tetramernim procijanidinima kao što je vidljivo i u Tablici 3. Od pojedinačnih polifenola (određeno HPLC-om) najzastupljeniji je epikatehin (0,38 g g⁻¹) i katehin (0,28 g g⁻¹), te je najviše dimernih proantocijanidina (skupina B). Najveći udio suhe tvari čine ukupni ugljikohidrati (24,23 %).

4.2. ODABIR NADES-A

Pronalazak odgovarajućeg NADES otapala uobičajenim eksperimentalnim metodama pokušaja i pogreške za ekstrakciju željenih spojeva je skup i dugotrajan proces. Da bi se uštedjelo na vremenu i novcu koriste se računalne metode probira otapala. Model COSMO-RS

jedna je od najtočnijih računalnih metoda *ab initio* koja služi za predviđanje eutektičke točke i topljivosti željenih komponenata u eutektičkim otapalima. Baza podataka izrađena pomoću softvera TmoleX u kombinaciji s COSMO-RS omogućuje računalno pretraživanje NADES-a za ekstrakciju polifenola (Panić i sur., 2021).

Budući da je katehin najprisutniji polifenol u komini grožđa, provedena je procjena topljivosti molekule katehina u eutektičnim otapalima pomoću spomenutog programa.



Slika 7. Prikaz $\ln(\gamma)$ vrijednosti katehina u ispitanim prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (NADES-ima)

B: betain, C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, CA: limunska kiselina, Cam: kamfor, Ch: 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

Programom su izračunati logaritmi koeficijenta aktivnosti ($\ln(\gamma)$). Manji koeficijent aktivnosti govori o većoj topljivosti spoja u odabranom otapalu. Slika 7 prikazuje ispitana eutektična otapala i rezultate topljivosti.

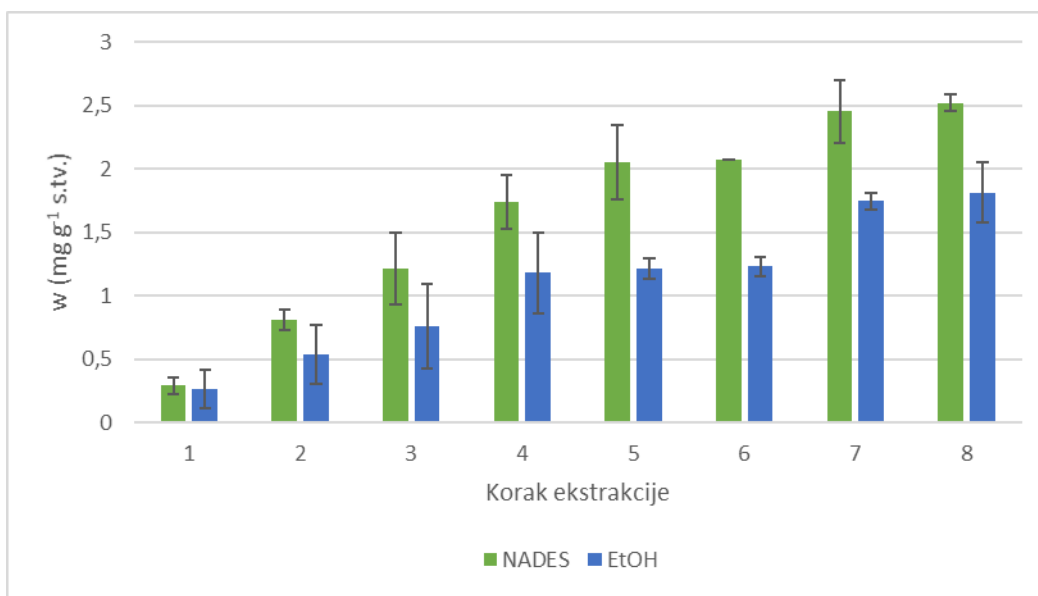
Budući da molekula katehina ima polarne regije, za očekivati je da će polarni DES-ovi biti bolji za ekstrakciju ovog spoja od nepolarnih (Panić i sur., 2021). Najveće vrijednosti koeficijenta topljivosti dobivene su za kombinaciju otapala s timolom što znači da katehin nije dobro topljiv u tim otapalima. Najniže vrijednosti koeficijenta topljivosti dobivene su za kombinaciju betaina s etilen glikolom, glukozom i saharozom. Za ekstrakciju polifenola odabrano je otapalo sastavljeno od betaina i saharoze u molarnom omjeru 4:1 sa 50 % vode.

4.3. UKUPNI POLIFENOLI U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIM POMOĆU NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

4.3.1. Ukupni polifenoli određeni pomoću Folin-Ciocalteu reagensa

Određivanje maksimalnog kapaciteta NADES-a B:Scu provedeno je uzastopnim ekstrakcijama u trajanju od 10 minuta. Ukupni polifenoli u ekstraktima komine grožđa određeni su pomoću Folin-Ciocalteu reagensa nakon svakog koraka ekstrakcije. Reakcijom nastaje plavo obojena otopina, a intenzitet obojenja proporcionalan je količini polifenola.

Galna kiselina korištena je kao standard pa su dobiveni rezultati izraženi kao mg galne kiseline g^{-1} suhe tvari biomase. Rezultati su prikazani na Slici 8.



Slika 8. Maseni udio polifenola u ekstraktima komine grožđa nakon 8 koraka ekstrakcije*

* Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=3), NADES = ekstrakt pripremljen u otapalu betain : saharoza, EtOH = ekstrakt pripremljen u otopini 70 %-tnog etanola

Iz rezultata (Slika 8) je vidljivo da se nakon svakog koraka ekstrakcije povećava ukupna količina ekstrahiranih polifenola. Nakon 8 koraka ekstrakcije udio polifenola se nije mijenjao što znači da se u NADES-u se postigao maksimalni kapacitet tog otapala za ekstrakciju polifenola ($2,52 \pm 0,06$ mg g⁻¹ s.tv.). U jednakom broju koraka ekstrakcije u etanolu je ekstrahirana manja količina polifenola ($1,81 \pm 0,24$ mg g⁻¹ s.tv.). Time se dolazi do zaključka da su za ekstrakciju polifenolih spojeva zelena otapala dobra zamjena za konvencionalna otapala.

4.3.2. Određivanje polifenola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Usporedbom retencijskoga vremena spojeva i standarada katehina, epikatehina, epigalokatehina i rutin trihidrata (najzastupljenijih polifenola) provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola u ekstraktima komine grožđa. Katehin, epikatehin i epigalokatehin su identificirani na 280 nm, a rutin trihidrat na 360 nm. Dobivene koncentracije izražene su u mg g⁻¹ suhe tvari komine grožđa. Tablica 4 prikazuje dobivene rezultate.

Tablica 4. Polifenoli određeni primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u ekstraktima komine pripravljenima u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu (NADES-u) i konvencionalnom otapalu

POLIFENOLI (mg g ⁻¹ s.tv. komine)	Betain:saharoza (B:Scu)	Etanol (EtOH)
Epigalokatehin	-	0,28
Katehin	0,76	0,82
Epikatehin	0,39	0,38
Procijanidin B1	0,33	0,50
Procijanidin B2	0,22	-
Procijanidin B3	0,19	1,20
Procijanidin B4	0,20	-
Procijanidin C1	0,09	-
Epikatehin galat	0,25	0,02
Rutin trihidrat	0,02	0,28

Najzastupljeniji polifenoli u komini su epikatehin i katehin, što je u skladu s literaturom (Yu i Ahmedna, 2013). Zbog viših udjela ekstrahiranih polifenola, ali i veće raznolikosti detektiranih polifenola, NADES B:Scu pokazao se kao bolje ekstrakcijsko otapalo u odnosu na konvencionalno otapalo etanol.

4.4. INHIBICIJA AKTIVNOSTI KOLAGENAZE

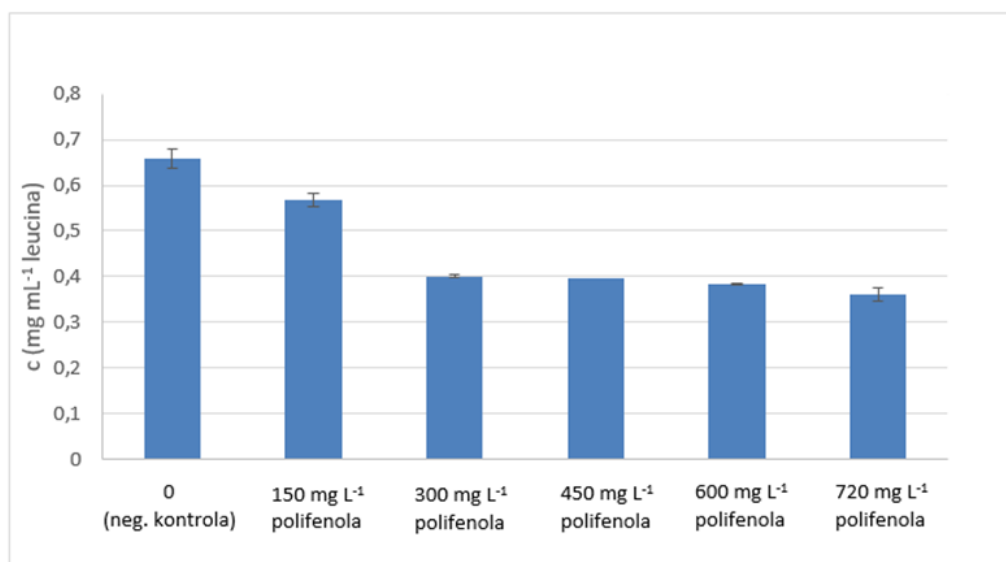
Analiza aktivnosti kolagenaze i inhibitornog učinka ekstrakata grožđa na kolagenazu temelji se na reakciji ninhidrinskog reagensa s aminima. Amini se nalaze u aminokiselinama, na N-terminalnom kraju proteina i na bočnim lancima aminokiselina lizin i arginin (Zhang i sur., 2013).

Za različite koncentracije polifenola u ekstraktu grožđa ispitana je mogućnost inhibicije kolagenze. Stalni parametri ovog eksperimenta su dodana količina želatine i kolagenaze. Aminokiseline i peptidi nastali hidrolizom želatine tvore kompleks s ninhidrinom koji je karakteristične ljubičaste boje i može se detektirati spektrofotometrijski na valnoj duljini od

545 nm. Inhibicijom kolagenaze sprječava se hidroliza želatine na manje fragmente. U tom slučaju ninhidrin nema supstrat za reakciju i ne dolazi do obojenja ispitane otopine.

Što je ljubičasta boja otopine slabijeg intenziteta to je kolagenaza jače inhibirana ekstraktima.

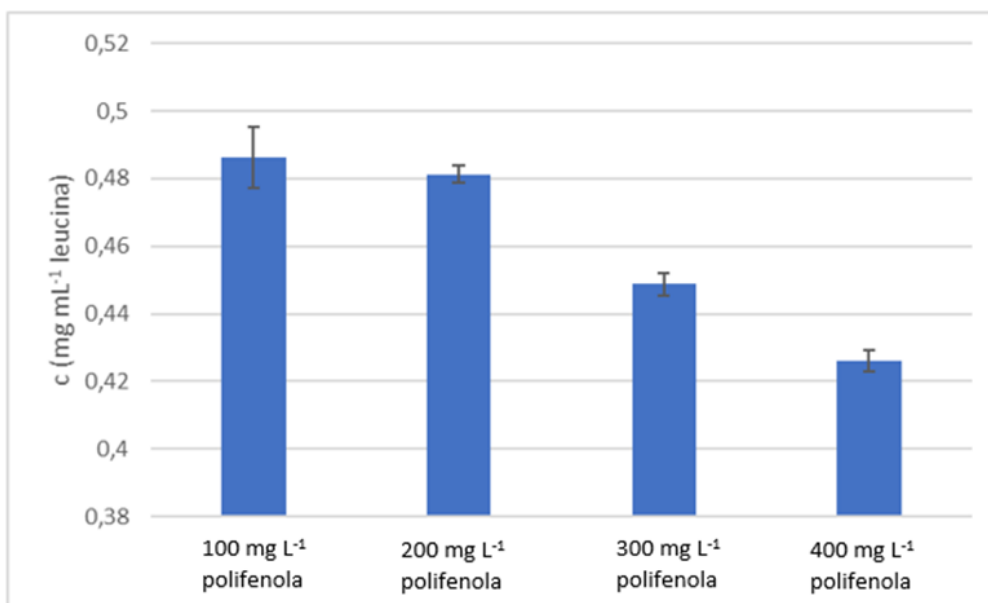
Količina razgrađenih produkata izražena je kao mg mL^{-1} leucina u uzorku. Utjecaj polifenola ekstrahiranih u NADES-u prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Utjecaj polifenola ekstrahiranih u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu (NADES-u) na količinu razgrađenih produkata*

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

Iz grafa je vidljivo da je u uzorcima s većom koncentracijom polifenola na početku, prisutno manje razgrađenih produkata (mg mL^{-1} leucina) na kraju. To znači da polifenoli inhibiraju aktivnost kolagenaze, a povećanjem koncentracije polifenola smanjuje se aktivnost kolagenaze. Isti trend pada aktivnosti kolagenaze vidljiv je i u uzorcima polifenola ekstrahiranih u metanolu prikazanih na Slici 10; većom koncentracijom polifenola, smanjuje se koncentracija razgrađenih produkata.



Slika 10. Utjecaj polifenola ekstrahiranih u metanolu na količinu razgrađenih produkata*

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

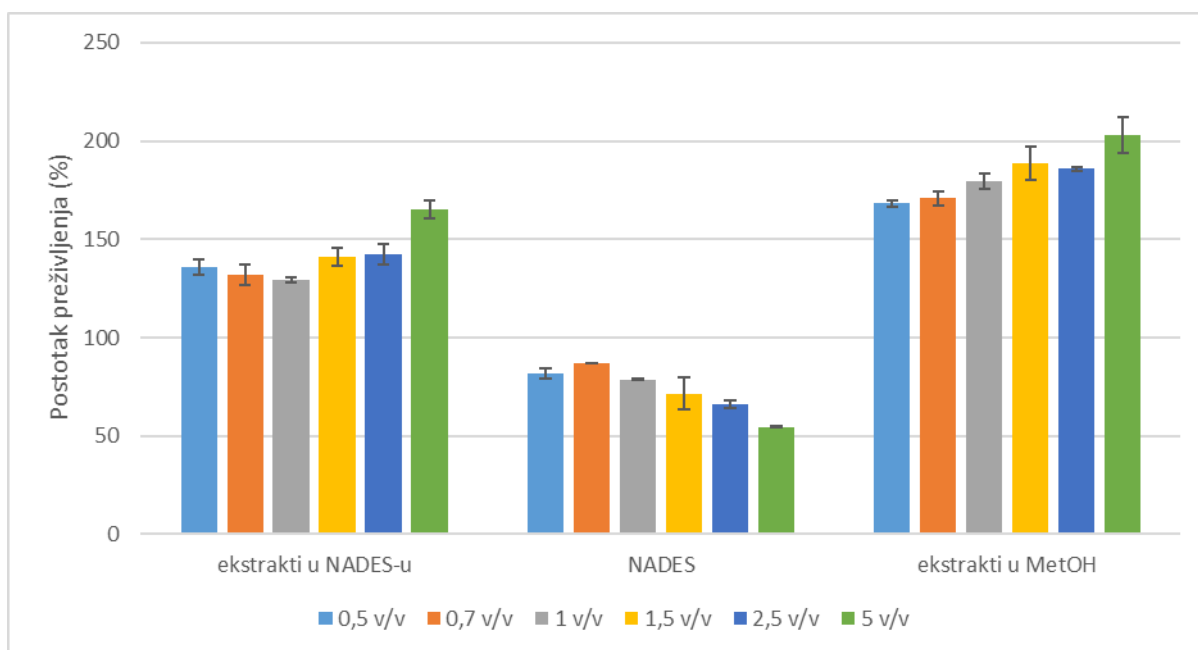
Uspoređujući ova dva različita slučaja, vidljivo je da nema velike razlike između ekstrakata u NADES-u i metanolu. Ista količina polifenola daje jednaku količinu razgradnih produkata; 450 mg L⁻¹ polifenola u NADES-u daje 0,396 mg mL⁻¹ leucina, dok 400 mg L⁻¹ polifenola u metanolu daje 0,43 mg mL⁻¹ leucina. Može se zaključiti da otapalo za ekstrakciju nema utjecaja na inhibiciju kolagenaze, već je bitna koncentracija polifenola.

Polifenoli, kao inhibitori kolagenaze, imaju veliki potencijal u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji u prevenciji preranog vanjskog starenja kože (Biswajit i sur., 2017).

4.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTA KOMINE GROŽĐA

4.5.1. *In vitro* aktivnost ekstrakata komine grožđa na HaCaT staničnu liniju

Pomoću MTS metode ispitan je *in vitro* utjecaj ekstrakta komine grožđa na HaCaT stanice. Stanice su tretirane ekstraktima 0,5-5 % (v/v) tijekom 72 sata. Slika 11 prikazuje ovisnost preživljenja stanica o volumenu dodanog ekstrakta komine grožđa.



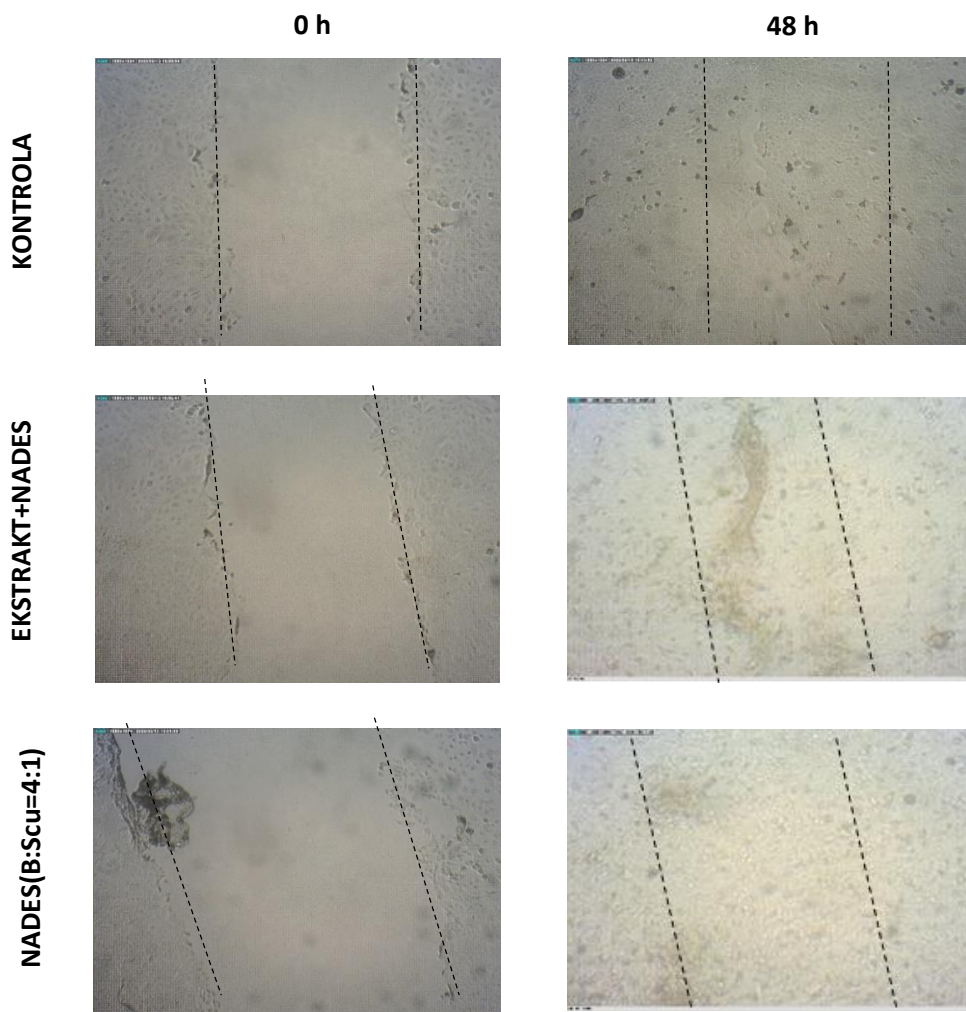
Slika 11. Utjecaj ekstrakta komine grožđa na preživljenje HaCaT stanica*

* Rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=2)

Preživljenje HaCaT stanica ovisi o volumnom udjelu ekstrakta. Iz rezultata na Slici 11 vidljivo je da porastom volumnog udjela ekstrakta grožđa pripremljenog u NADES-u (B:Scu), raste i postotak preživljavanja stanica. Sami NADES povećanjem volumnog udjela ima negativan utjecaj na rast stanica. Ekstrakt u B:Scu i u metanolu uzrokuju proliferaciju HaCaT stanica. Time se dolazi do zaključka da rast stanica proporcionalno ovisi o koncentraciji polifenola. Ovakvi rezultati mogu se pronaći i u prijašnjim istraživanjima (Panić i sur., 2020; Lagha i Grenier, 2019; Hsu i sur., 2003). Zbog pozitivnog utjecaja na proliferaciju stanica keratinocita, ekstrakti grožđa pokazuju potencijal za primjenu u kozmetičkoj industriji, npr. u kremama za regeneraciju oštećene kože.

4.5.2. Utjecaj ekstrakata na mogućnost *in vitro* zacjeljivanja rana

Migracija stanica važan je korak u zacjeljivanju rana. Testovi koji mogu procijeniti migraciju stanica vrlo su korisni za procjenu *in vitro* zacjeljenja rana. *Scratch* testom stvorena je praznina u monosloju keratinocita koja oponaša nastanak rane (Martinotti i Ranzato, 2019). Ovim eksperimentom ispituje se utjecaj ekstrakta dobivenog u NADES-u i samog otapala na migraciju stanica, nasuprot kontroli (samo stanice u monosloju). Slika 12 prikazuje rezultate *scratch* testa.



Slika 12. Rezultati *scratch* testa*

*Kontrola = netretirane HaCaT stanice, ekstrakt + NADES = stanice tretirane ekstraktima pripremljenim u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu betain:saharozna, NADES (B:Scu, 4:1) = stanice tretirane niskotemperaturnim eutektičkim otapalom betain:saharozna

Uspoređujući slike na lijevoj (oponašana rana) i desnoj strani (zacjeljivanje nakon 48 sati), jasno je vidljivo da su stanice tretirane ekstraktima u NADES-u prerasle prazninu i to u većem broju nego stanice koje nisu bile tretirane (kontrola). Stanice tretirane samo NADES-om

također su rasle te je rana zacijelila. Iz ovih podataka može se zaključiti da ekstrakt u NADES-u (B:Scu) i sami NADES pospješuju migraciju stanica, odnosno zacjeljivanje rana te se temeljem rezultata ovog testa može pretpostaviti njihova primjena kozmetičkoj industriji. Ograničenje ovog eksperimenta je da *in vitro* kultura stanica ne predstavlja kiruršku ranu *in vivo*. Kirurške rane se sastoje od više vrsta stanica, pod različitim su mehaničkim silama te lokalnim i sustavnim upalnim odgovorima, što sve utječe na zacjeljivanje rana. Navedeni uvjeti nisu prisutni u jednoslojnoj kulturi, stoga je za konačnu potvrdu mogućnosti primjene ekstrakata u NADES-u u kozmetičkoj industriji potrebno provesti daljnja *in vivo* istraživanja (Liu i sur., 2018).

5. ZAKLJUČCI

1. Karakterizacijom komine grožđa sorte *Graševina* određeni su udjeli raznih biološki aktivnih spojeva zbog čega bi se ovaj nusproizvod vinske industrije mogao kvalitetno iskoristiti u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.
2. Program COSMOtherm pouzdan je alat za predviđanje topljivosti željenih spojeva u otapalima jer su u otapalima s niskom vrijednosti $\ln(\gamma)$ uspješno ekstrahirani polifenoli.
3. Ekstrakcija polifenola iz komine grožđa uspješno je provedena pomoću niskotemperaturnog eutektičkog otapala B:Scu. Ekstrahirano je $2,52 \pm 0,06$ mg polifenola g^{-1} s.tv. komine.
4. Uspoređujući uspješnost ekstrakcije eutektičkog otapala sa ekstrakcijom provedenom s etanolom ($1,81 \pm 0,24$ mg g^{-1} s.tv.), zaključuje se da niskotemperaturna prirodna eutektička otapala mogu zamijeniti konvencionalna otapala.
5. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti identificirani i kvantificirani su katehin, epikatehin, epigalokatehin i rutin trihidrat kao najčešći polifenoli u komini grožđa.
6. Polifenoli imaju inhibicijski učinak na aktivnost kolagenaze zbog čega imaju potencijal korištenja u kozmetičkoj industriji.
7. MTS metodom određeno je preživljenje i proliferacija HaCaT stanica tretiranih pripremljenim ekstraktima bogatim polifenolima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Polifenoli su imali pozitivan učinak na proliferaciju keratinocita.
8. *Scratch* testom pokazano je da ekstrakt u NADES-u (B:Scu) i sami NADES pospješuju migraciju stanica, odnosno zacjeljivanje rana.

6. LITERATURA

Antonić B, Jančíková S, Dordević D, Tremlová B (2020) Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis. *Foods* **9**(11), 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**(8), 547. <https://doi.org/10.3390/ani9080547>

Benabid S, Benguerba Y, Al Nashef IM, Haddaoui N (2019) Theoretical study of physicochemical properties of selected ammonium salt-based deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **285**, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.052>

Biswajit B, Hiranjit C, Pramod T, Suman K (2017) Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis acuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *J Photoch Photobio B* **173**, 686– 695. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.010>

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**(4), 933-942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>

Byrne FP, Jin S, Paggiola G, Petchey TH, Clark JH, Farmer TJ, i sur. (2016) Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. *Sustainable Chemical Processes* **4**(1), 1-24. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0051-z>

Cai H, You S, Xu Z, Li Z, Guo J, Ren Z, Fu C (2021) Novel extraction methods and potential applications of polyphenols in fruit waste: a review. *J Food Meas Charact* **15**(4), 3250-3261. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00901-1>

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

Chen, Y. (2012). Scratch Wound Healing Assay. *Bio-protocol* **2**(5): e100. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.100>

Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, Dell'Agli M (2017) HaCaT cells as a reliable *in vitro* differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. *Mediat. Inflamm.* **2017**, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>

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 Funct* **10**(4), 1856-1869. <https://doi.org/10.1039/C8FO02534G>

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. *Appl Sci* **10**(14), 4830. <https://doi.org/10.3390/app10144830>

Dvorneković I (2021) Priprema i biološka aktivnost ekstrakata nusproizvoda vinske industrije pripremljenih pomoću niskotemperaturnih eutektičkih otapala (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:053280>

El Achkar T, Greige-Gerges H, Fourmentin S (2021) Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ Chem Lett* **19**, 3397-3408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>

Nistor E, Dobrei Alin, Dobrei Alina, Bampidis V, Ciolac V (2014) Grape pomace in sheep and dairy cows feeding. *J Hort Forest Biotech* **18**(2), 146-150.

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**(3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>

He J, Giusti M. M (2010) Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annu Rev Food Sci Technol* **1**(1), 163-187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>

Hoss I, Rajha HN, El Khoury R, Youssef S, Manca ML, Manconi M i sur. (2021) Valorization of wine-making by-products' extracts in cosmetics. *Cosmetics* **8**(4), 109. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040109>

Hsu S, Bollag WB, Lewis J, Huang Q, Singh B, Sharawy M, i sur. (2003) Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **306**(1), 29-34. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.049734>

Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* **126**(4), 1821-1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

Kammerer D, Claus A, Schieber A, Carle R (2005) A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *J Food Sci* **70**(2), 157-163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07077.x>

Lagha AB, Grenier D (2019) Tea polyphenols protect gingival keratinocytes against TNF- α -induced tight junction barrier dysfunction and attenuate the inflammatory response of monocytes/macrophages. *Cytokine* **115**, 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.12.009>

Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS (2018) Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Joint Inf* **3**(4), 165-172. <https://doi.org/10.7150/jbji.26355>

Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK (2007) Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Compos Anal* **20**(2), 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.010>

Martinotti S, Ranzato E (2019) Scratch Wound Healing Assay. U: Turksen K (ured.) Epidermal Cells: Methods in Molecular Biology, vol 2109. Humana, New York, str. 225-229. https://doi.org/10.1007/7651_2019_259

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**(15), 2564-2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>

Modesti M, Macaluso M, Taglieri I, Bellincontro A, Sanmartin C (2021) Ozone and bioactive compounds in grapes and wine. *Foods* **10**(12), 2934. <https://doi.org/10.3390/foods10122934>

Panić M, Stojković MR, Kraljić K, Škevin D, Radojčić Redovniković I, Srček Gaurina V 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, Drakula S, Cravotto G, Verpoorte R, Hruškar M, Radojčić Redovniković I i sur. (2020) Biological activity and sensory evaluation of cocoa by-products NADES extracts used in food fortification. *Innov Food Sci Emerg* **66**, 102514. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102514>

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**(16), 4722. <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>

Radošević K, Čurko N, Srček Gaurina V, Cvjetko Bubalo M, Tomašević M, Ganić KK i sur. (2016) 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. *Kem Ind* **70**(9-10), 551-562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>

Skračić Ž, Ljubenkov I, Mimicac N, Generalić Mekinić I (2023) Valorizacija nusproizvoda proizvodnje vina. *Kem Ind* **72**. <https://doi.org/10.15255/KUI.2022.051>

Sokač T, Gunjević V, Pušek A, Tušek A. J, 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**(1), 112. <https://doi.org/10.3390/foods11010112>

Soto ML, Falqué E, Domínguez H (2015) Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics* **2**(3), 259-276. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2030259>

Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihane AM, Mathers JC (2008) Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Brit J Nutr* **99**(1), 12-22. <https://doi.org/10.1017/S0007114507798938>

Šango M (2017) Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kometine grožđa primjenom prirodnih eutektičkih otapala (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:443411>

Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>

Willför SM, Smeds AI, Holmbom BR (2006) Chromatographic analysis of lignans. *J Chromatogr A* **1112**(1-2), 64-77. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.054>

Winterton N (2021) The green solvent: a critical perspective. *Clean Technol Envir* **23**(9), 2499-2522. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02188-8>

Xia E. Q, Deng G. F, Guo Y. J, Li H. B (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* **11**(2), 622-646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>

Yu J, Ahmedna M (2013) Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Tech* **48**(2), 221-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

Zhang Y, Fu Y, Zhou S, Kang L, Li C (2013) A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry. *Anal Biochem* **437**, 46-48. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.02.030>

Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Eisner P, Kerscher M (2015) Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int J Cosmetic Sci* **37**(5), 455-464. <https://doi.org/10.1111/ics.12218>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja KLARA KNEŽEVIĆ 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.

Klara Knežević

Vlastoručni potpis