

# Fitotoksičnost i citotoksičnost hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

---

Železnjak, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:828676>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Martina Železnjak

**FITOTOKSIČNOST I CITOTOKSIČNOST  
HIDROFOBNIH NISKOTEMPERATURNIH  
EUTEKTIČKIH OTAPALA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković te uz pomoć Martine Bagović Kolić, mag.ing.

Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta: „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otopala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ (HRZZ IP-2019-04-7712) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković.



## 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: Molekularna biotehnologija

FITOTOKSIČNOST I CITOTOKSIČNOST HIDROFOBNIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH  
OTAPALA

Martina Železnjak, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058217573

**Sažetak:** Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) imaju velik potencijal za uporabu u industriji zbog svoje nehlapivosti, nezapaljivosti, stabilnosti, jednostavne pripreme i niske cijene početnih sirovina. Glavnina opisanih DES-ova je hidrofilnog karaktera, no zadnjih desetak godina u porastu je i broj publikacija o hidrofobnim DES-ovima, što pokazuje veliki interes za iste u znanstvenom svijetu. U ovom radu ispitana je toksičnost DES-ova timol:dekadaska kiselina (1:3), timol:mentol (1:1) i mentol:oktanska kiselina (1:1) na staničnim linijama HaCaT i HeLa, te na sjemenkama obične pšenice (*Triticum aestivum* sp.). Pšenica je tretirana DES-ovima u rasponu koncentracija od 5 do 500 mg L<sup>-1</sup> pri čemu je praćena germinacija, duljina izdanaka te aktivnost antioksidativnih enzima. Stanične linije tretirane su u koncentracijama od 100 do 200 mg L<sup>-1</sup>, pri čemu nije došlo do ispoljavanja citotoksičnih učinaka.

**Ključne riječi:** hidrofobna niskotemperaturna eutektična otapala, citotoksičnost, fitotoksičnost, antioksidativni enzimi

**Rad sadrži:** 42 stranice, 13 slika, 5 tablica, 55 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

**Pomoć pri izradi:** Martina Bagović Kolić, mag.ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. prof. dr. sc. Ivana Kmetič
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo

**Datum obrane:** 20. rujna 2024.

## 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:** Molecular Biotechnology

PHYTOTOXICITY AND CYTOTOXICITY OF HYDROPHOBIC DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Martina Železnjak, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058217573

**Abstract:** Deep eutectic solvents (DESs) have a great potential for industrial use due to their non-volatility, non-flammability, stability, easy preparation and low cost of starting raw materials. Most of the described deep eutectic solvents are hydrophilic in nature, but the number of publications on hydrophobic DESs has been increasing in the last ten years, which shows a great interest for their development in the scientific world. In this work, the toxicity of DESs thymol:octanoic acid (1:3), thymol:menthol (1:1) and menthol:decanoic acid (1:1) was tested on HaCaT and HeLa cell lines, and on wheat seeds (*Triticum aestivum* sp.). Wheat was treated with DES in the concentration range from 5 to 500 mg L<sup>-1</sup>, where germination, length of shoots and activity of antioxidant enzymes were monitored. The cell lines were treated at concentrations of 100 to 200 mg L<sup>-1</sup>, and no cytotoxic effects were observed.

**Keywords:** hydrophobic deep eutectic solvents, cytotoxicity, phytotoxicity, antioxidative enzymes

**Thesis contains:** 42 pages, 13 figures, 5 tables, 55 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Martina Bagović, mag. ing.

### Reviewers:

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

**Thesis defended:** September 20<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. ZELENA KEMIJA</b> .....	2
<b>2.2. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA</b> .....	3
2.2.1. Hidrofobna eutektička otapala .....	7
<b>2.3. EKOTOKSIKOLOGIJA</b> .....	8
<b>2.4. STANIČNE LINIJE I ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI</b> .....	8
2.4.1. Testovi citotoksičnosti .....	9
2.4.2. HeLa stanična linija .....	10
2.4.3. HaCaT stanična linija .....	10
<b>2.5. FITOTOKSIČNOST</b> .....	11
<b>2.6. TOKSIČNOST NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA</b> .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	14
3.1.1. Stanične linije .....	14
3.1.2. Kemikalije .....	14
3.1.3. Pribor i aparatura .....	15
3.1.4. Otopine i puferi .....	16
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	17
3.2.1. Priprema hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	17
3.2.2. Određivanje fitotoksičnosti hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala određivanjem oksidativnog stresa kod klica obične pšenice .....	18
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina i aktivnosti antioksidativnih enzima.....	19
3.2.3.1. <i>Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina po Bradfordu</i> .....	19
3.2.3.2. <i>Mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze (APOX)</i> .....	19
3.2.3.3. <i>Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)</i> .....	19
3.2.3.4. <i>Mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza (POD)</i> .....	19



3.2.3.5.	<i>Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)</i> .....	20
3.2.4.	Uzgoj staničnih linija HeLa i HaCaT .....	20
3.2.5.	Brojanje stanica metodom tripan-plavo .....	21
3.2.6.	Određivanje citotoksičnosti hidrofobnih niskotemperaturnih eutektskih otapala na staničnim linijama HeLa i HaCaT .....	22
3.2.7.	Izračunavanje EC50 vrijednosti .....	22
3.2.8.	Statistička obrada podataka.....	23
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>24</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>37</b>

# 1. UVOD

Industrija koristi goleme količine otapala svakodnevno. Otapala, najčešće zapaljiva, hlapljiva i toksična pokazuju negativan učinak na sve žive organizme, no ipak se i dalje koriste. Nakon stotina godina industrijalizacije i uvida kakve posljedice je ona ostavila na Zemljin okoliš, konačno se zadnjih pedesetak godina donose zakoni koji reguliraju ljudsko ponašanje prema okruženju u kojem živimo. Osim što se industrija okreće biotehnološkim rješenjima primjenjujući sve više mikroorganizme za proizvodnju industriji vrijednih tvari, pokušavaju se zamijeniti i toksična kemijska otapala koja sa sobom neminovno nose i velike troškove proizvodnje, skladištenja ali i odlaganja nakon korištenja. Zato se u zadnjih 20 godina sve više nameću niskotemperaturna eutektička otapala kao jedna od alternativa koja omogućuje odmak od opasnih organskih otapala koja su neizbježna u industrijskoj proizvodnji (Colberg i sur., 2022).

Glavnina opisanih niskotemperaturnih eutektičkih otapala je hidrofilnog karaktera, no zadnjih desetak godina u porastu je i broj publikacija o hidrofobnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, što pokazuje veliki interes za iste u znanstvenom svijetu. Mali broj opisanih hidrofobnih DES-ova rezultat je ograničenog broja jeftinih, lako dostupnih hidrofobnih soli i drugi komponenta koje stvaraju eutektičke smjese pri sobnoj temperaturi (Zainal-Abidin i sur., 2021).

Kako bi se ta niskotemperaturna eutektička otapala mogla zvati zelenima, bitno je da su, među ostalim i netoksična. Većina njih sintetizira se od netoksičnih komponenti, no to ne garantira njihovu ne-štetnost kao smjesu zbog mogućih sinergističkih efekata. (Martínez i sur., 2022) Upravo zbog toga se za svako otapalo mora odrediti ekotoksikološki profil prije nego što se počne s njegovim korištenjem.

Cilj ovog rada bio je ispitati toksičnost 3 odabrana hidrofobna DES-a: timol:oktanska kiselina (1:3), timol:mentol (1:1) i mentol:dekadna kiselina (1:1). Ispitana je citotoksičnost na humanim staničnim linijama HeLa i HaCaT, određivanjem postotka preživljenja pri različitim koncentracijama dodanih DES-ova. Fitotoksičnost na sjemenkama obične pšenice (*Triticum aestivum* L.) određena je praćenjem stupnja germinacije i duljine izdanaka te određivanjem učinka oksidativnog stresa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ZELENA KEMIJA

Pojam zelene kemije uveden je zbog potrebe za poboljšanjem ekonomičnosti kemijske proizvodnje i povećanja zaštite okoliša. Karakterizira se smanjenjem utjecaja na okoliš, a podrazumijeva dizajn kemijskih procesa s ciljem smanjenja proizvodnje i korištenja opasnih tvari (Saleh i Koller, 2018). Ovo se područje znanosti bazira na 12 jednostavnih principa koji omogućavaju implementaciju zelene kemije:

1. **Bolje spriječiti nego liječiti.** Bolje je spriječiti proizvodnju otpada, nego se baviti njegovim zbrinjavanjem.
2. **Princip „atom ekonomije“.** Sinteza tvari mora se planirati na način da se maksimizira udio tvari koja se ugrađuje u proizvod.
3. **Sigurnija kemijska sinteza.** Kad je moguće, moraju se koristiti metode koje generiraju i koriste tvari koje nemaju značajan utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje.
4. **Dizajniranje sigurnijih kemikalija.** Kemikalije moraju biti razvijane na način da se osim povećanja funkcionalnosti, aktivno smanjuje i njihova toksičnost.
5. **Sigurnija otapala i dodaci.** Korištenje dodataka poput otapala bi se trebalo izbjegavati, a ukoliko to nije moguće, trebali bi se koristiti bezopasni dodaci.
6. **Dizajn za energetske učinkovitost.** Okolišni i ekonomski utjecaj energetskih zahtjeva kemijskih procesa se mora analizirati i optimizirati kod dizajna kemijskih procesa, kad je moguće koristiti sobnu temperaturu i atmosferski tlak.
7. **Obnovljive sirovine.** Kad je moguće, treba koristiti čiste sirovine koje su obnovljive, a ne limitirane
8. **Princip derivatizacije.** Suvišna derivatizacija se treba izbjegavati zbog korištenja dodatnih reagensa i generiranje otpada.
9. **Princip katalize.** Katalizatori bi trebali biti što selektivniji.
10. **Princip degradacije.** Kemijski produkti trebaju biti dizajnirani na način da se nakon uporabe ne nalaze u biosferi, već se razgrade u netoksične produkte.
11. **Analiza u stvarnom vremenu za prevenciju onečišćenja.** Trebaju se razviti analitičke metode koje bi omogućile analizu procesa i kontrolu prije nastajanja opasnih tvari.
12. **Prevencija nesreće korištenjem sigurnije kemije.** Tvari koji se koriste u kemijskom procesu moraju se birati na način da se smanji rizik kemijskih nezgoda, otpuštanja kemikalija, detonacija ili zapaljivanja (Prilagođeno prema Anastas i Warner, 1998).

S obzirom da gotovo 80 % ukupnog volumena kemikalija koje se upotrebljavaju u industrijskim procesima je neki oblik otapala, a većina njih je hlapljiva i povezana s brojnim izazovima za zdravlje, prema 5. principu zelene kemije, potrebno je razvijati takozvana zelena otapala (Martínez i sur., 2022). Ona se definiraju kao kemikalije koje smanjuju utjecaj na okoliš koji proizlazi iz njihovog korištenja u kemijskim procesima i proizvodnji. Idealno zeleno otapalo niske je hlapljivosti ili u potpunosti ne-hlapivo, nezapaljivo, nije opasno za udisanje (nije toksično ni karcinogeno), može se reciklirati te je biorazgradivo. Osim tih svojstava, idealno otapalo ima fizikalne i kemijske karakteristike koje su mu potrebne za određenu tehniku ekstrakcije (Martins i sur., 2023). Primjenom metoda i tehnika ekotoksikologije kao interdisciplinarnog znanstvenog polja koje kombinira znanje ekologije i toksikologije, može se provjeriti ispunjava li proces ili tehnologija principe zelene kemije. Ti kriteriji djelomično su bili zadovoljeni pojavom ionskih kapljevina, a kasnije, i u većoj mjeri, niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (Radošević i sur., 2016a). Ionske kapljevine smatrale su se zelenim otapalima prvenstveno zbog zanemarivog pritiska pare što je napredak u odnosu na problematiku hlapljivih organskih spojeva, no njihova sinteza nerijetko nije uopće u skladu s principima zelene kemije, a osim toga, mnoge ionske kapljevine loše su biorazgradive i pokazuju značajnu toksičnost (Häckl i Kunz, 2018).

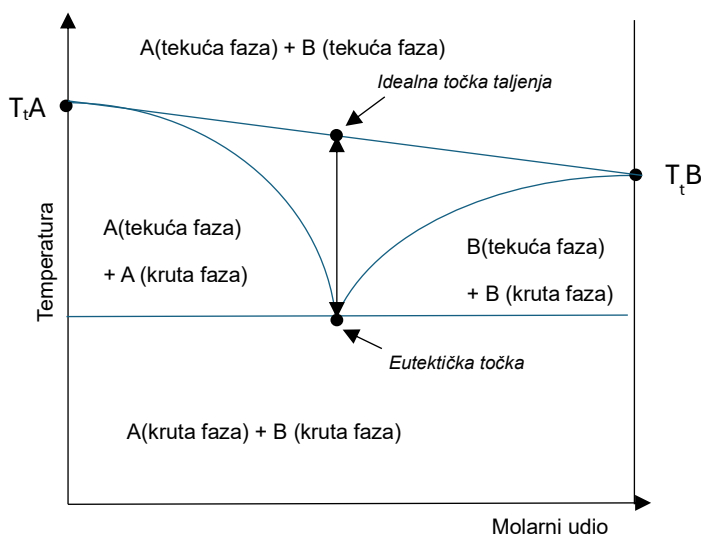
Primjeri područja u kojima DES-ovi pokazuju svoju „zelenu“ praktičnost su organske transformacije vođene metalima koje se u DES-ovima mogu odvijati pri sobnoj temperaturi i tlaku, reakcije katalizirane metalima koje se mogu efikasno odvijati u blažim uvjetima nego u hlapljivim otapalima i to s mogućnošću da se DES i katalizator lako i uspješno recikliraju te kod uporabe biokatalizatora koji često pokazuju veću stabilnost, selektivnost i performanse u DES-ovima (Perna i sur., 2020).

## 2.2. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Niskotemperaturna eutektička otapala počela su biti istraživana iz potrebe za stvaranjem otapala s boljim svojstvima koja bi zamijenila postojeća toksična otapala iz industrije. Niskotemperaturna eutektička otapala pojam je koji u literaturu uvode Abbott i suradnici početkom milenija (Abbott i sur., 2001), definirajući smjesu amida i kvaternih amonijevih soli pri točno određenom omjeru. Danas se taj pojam koristi za definiciju eutektičke smjese kod koje dolazi do značajnog sniženja temperature tališta, a koja se formira kombinacijom 2 ili više komponenti, od kojih je jedna donor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD), a jedna akceptor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA).

Sniženje točke tališta pripisuje se neidealnosti ovih otapala koje proizlaze iz *van der Waalsovih* interakcija, vodikovih veza i pozitivne entropije miješanja komponenti otapala, a sve to doprinosi stabilizaciji tekuće faze pri sobnoj temperaturi. Koliko će biti to smanjenje ovisi o

kemijskoj strukturi komponentni te jačini i vrsti interakcija između njih (Devi i sur., 2023). Temperaturna depresija (vidljivo na slici 1.) definira se kao razlika između izmjerene temperature tališta i teoretski predviđene temperature tališta, a pretpostavlja se da se javlja zbog delokalizacije naboja zbog vodikovih veza te steričkih utjecaja.



**Slika 1.** Shematski prikaz faznog dijagrama DES-a s 2 komponente (prema Martinez i sur., 2022)

DES-ovi se prema sastavu svojih komponenata mogu podijeliti u sljedećih 5 tipova:

- I. Smjesa metalnog halogenida ( $MX_n$ , gdje je M = metal, a X = halogenid) i kvaterne soli (QS)
- II. Smjesa hidriranog metalnog halogenida ( $MX_n \cdot mH_2O$ ) i kvaterne amonijeve soli
- III. Smjesa kvaterne amonijeve soli i donora vodikove veze (HBD)
- IV. Smjesa metalnog halogenida i donora vodikove veze (HBA)
- V. Smjesa neutralnog donora i akceptora vodikove veze (Devi i sur., 2023)

Većina danas sintetiziranih i okarakteriziranih DES-ova spada u kategoriju III. zbog jednostavnosti nabave i niske cijene komponenata, netoksične kvaterne amonijeve soli kao akceptora vodikove veze (npr. betain) te nenabijenog donora vodikove veze poput šećera, poliola, amida i organskih kiselina (npr. glukoza, glicerol, urea, mliječna kiselina, ...). Osim toga, u sastav hidrofilnih DES-ova nerijetko ulazi i voda, s obzirom da lako tvori vodikove veze, a pridonosi smanjenju viskoznosti i gustoće samog otapala, što je vrlo važno kod primjene tih otapala u industriji (Radović i sur., 2021). Vrlo velik broj različitih komponenti koje mogu ući u sastav DES-a te kombinacije tih komponenti omogućuju stvaranje vrlo velikog, gotovo neograničenog broja niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Baš zbog velike mogućnosti različitih kombinacija komponenti koje rezultiraju i različitim svojstvima samih otapala, često se nazivaju dizajniranima. Racionalnim dizajnom ovih otapala može se postići puno veća

topljivost tvari u odnosu na tradicionalna otapala, što predstavlja veliku prednost u njihovoj primjeni.

DES-ovi su se u literaturi pojavili kao alternativa ionskih kapljevine (engl. *Ionic Liquids*, IL). Pojam ionskih kapljevine uveden je još početkom prošlog stoljeća, a često je bio povezivan s ne hlapljivim, ne zapaljivim i stabilnim zelenim otapalima, no zadnjih se godina dokazalo da nisu baš sve ionske kapljevine tako benigne, dapače, za mnoge od njih dokazano je da su zapaljiva, nestabilna i toksična, zavisi o njihovim sastojcima (Płotka-Wasyłka i sur., 2020).

Prednost DES-ova nad IL leži u činjenici da su pripravljeni od uglavnom netoksičnih, lako dostupnih jeftinih i održivih komponenti. Također, sama sinteza DES-ova jednostavnija je jer se uglavnom koristi zagrijavanje na temperature između 50 i 100 °C i to ne duže od nekoliko sati. Sinteza IL-a bazira se na stvaranju kationa pomoću protonacije amina kiselinom ili kvaterniziranja amina haloalkanom kao prvog koraka te anionske izmjene tretmanom s halidnom soli kao Lewisovom bazom ili pomoću metateze aniona, nerijetko traje i do 48 sati, što je znatno duže vrijeme pripreme. Još neke razlike prikazane su na slici 2 (Płotka-Wasyłka i sur., 2020).



**Slika 2.** Usporedba ionskih kapljevine i niskotemperaturnih eutektičkih otapala (prema Płotka-Wasyłka i sur., 2020)

HBA – akceptor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), HBD – donor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD)

Postoji više načina pripreme DES-ova, a najčešće korišteno je već spomenuto zagrijavanje na temperature do 100 °C, uz blago miješanje do formiranja bistre tekućine. Osim toga, Cvjetko Bubalo i sur. (2016) spominju korištenje vakuum uparavanja gdje se najprije komponente otope u vodi, pa se voda uklanja uparivačem te korištenje liofilizacije kao alternativne metode pripreve. Uz to, koristi se primjena ultrazvuka, mikrovalno zračenje te njihova istovremena uporaba kao dodatni načini sinteze ovih otapala, pomoću kojih se vrijeme pripreve može ubrzati i do 7 puta .

Važno je napomenuti kako komponente niskotemperaturnih eutektičkih otapala međusobno ne ulaze u kemijske reakcije, već se povezuju vodikovim vezama. Također, svi atomi supstrata ugrađuju se u produkt, što rezultira 100 %-tnim prinosom, pri čemu se ne stvara otpad, što je vrlo bitno s obzirom da DES-ove smatramo zelenim otapalima (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

Osim prema vrsti komponenata, DES-ove možemo podijeliti i na podvrste, koje uključuju prirodna i terapijska niskotemperaturna eutektička otapala. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) tvore se od komponentni koje su proizvodi primarnog metabolizma živih organizama, a koje svakodnevno unosimo prehranom poput kolina, amina, šećera i drugih. Pretpostavlja se da su pojedini NADES-i prisutni u stanicama te sudjeluju u mnogim procesima (Cvjetko Bubalo i sur., 2018). Terapijska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES) su pak klasa eutektičkih otapala čija je jedna od komponenti djelatna stvar lijeka (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API), koja zajedno s drugim komponentama otapala međusobnim vodikovim ili ionskim vezama postiže strukturu DES-a, što povoljno utječe na topljivost i biodostupnosti djelatne tvari lijeka (Radović i sur., 2021).

Fizikalna svojstva DES-ova ovise o vrsti veza koje se uspostavljaju između njegovih komponenti. Glavna proučavana svojstva uključuju pH, viskozitet, gustoću, i sadržaj vode.

Različita područja primjene stvaraju potrebu za različitim svojstvima, a viskoznost je jedna od najvažnijih. DES-ovi su uglavnom, kao i ionske kapljevine, puno viskoznije od hlapljivih organskih otapala koja se često primjenjuju u gotovo svim industrijama (engl. *Volatile Organic Compounds*, VOC), više od 100 cP pri sobnoj temperaturi. Iznimku čine DES-ovi u čijem su sastavu kolin klorid i etilen glikol. Viskoznost DES-ova ovisi o kemijskoj prirodi komponenata smjese, temperaturi i udjelu vode. Ukoliko komponente DES-a tvore mnogo vodikovih veza, to dovodi do njihove slabije mobilnosti unutar smjese. DES-ovi imaju gustoću veću od vode, između 1,0 i 1,35 g cm<sup>-3</sup> pri sobnoj temperaturi, a variraju s obzirom na komponente koje ga tvore (Martínez i sur., 2022).

Svoju primjenu DES-ovi pronalaze u mnogim industrijama, upravo zbog mogućnosti da se pažljivim odabirom komponenata utječe na svojstva DES-a. Tako se ova otapala mogu primjenjivati u prehrambenoj industriji za ekstrakciju bioaktivnih komponenti i uklanjanje teških metala. Primjerice, moguće je ekstrahirati flavonoide u puno većoj koncentraciji, te s značajno većom antioksidativnom aktivnosti i stabilnosti u odnosu na etanolni ekstrakt, te ukloniti kadmij iz rižinog brašna uporabom DES-ova na bazi kolin klorida (Negi i sur., 2024). Osim toga, svoju primjenu pronalaze i u katalizi što rezultira izvrsnim prinosima, kako se navodi nastavno na eksperimente bromiranja 1-aminoantra-9,10-kinona u kolin klorid:urei. Također, ova zelena otapala već su bila korištena i za sintezu biološki aktivnih tvari poput dihidropirimidinona, kvinazolina i drugih. Nadalje, testira se njihov potencijal i u elektrotaloženju, pripremi anorganskih materijala poput analoga zeolita, sinteze nanočestica te za mnoge druge primjene (Zhang i sur., 2012).

### 2.2.1. Hidrofobna eutektička otapala

Eutektička otapala podliježu još jednoj bitnoj podijeli, a to je na hidrofobna i hidrofilna otapala. Većina proučavanih DES-ova hidrofilne je prirode, primarno zbog malog broja jeftinih, lako dostupnih hidrofobnih soli ili drugih komponenti koje bi tvorila hidrofobne DES-ove. Postoje dvije vrste hidrofobnih DES-ova (skraćena hDES), prvu tvore hDES-ovi s kvaternom amonijevom soli s dugim alkilnim lancima, dok je druga vrsta smjesa dviju neutralnih hidrofobnih komponenti poput karboksilnih kiselina ili alkohola s dugim alkilnim lancima. Prisutnost nabijenih i polarnih dijelova hDES-a te hDES-ovi koji su bazirani na solima dovode do formiranja višestrukih vodikovih veza koje posljedično dovode do veće depresije temperature taljenja. S druge strane, neutralni hDES-ovi imaju manje depresije temperature taljenja, a ujedno i tvore manje viskozne hDES-ove što je svakako poželjna karakteristika (Zainal-Abidin i sur., 2021).

Temperatura taljenja hDES-ova uglavnom je ispod 25 °C, a raste s povećanjem dužine alkilnog lanca ili sadržaja masnih kiselina donora vodikove veze. Ipak, primijećeno je da primjerice hDES-ovi mentol:dekadska kiselina i mentol:pirogroždana kiselina pokazuju različite temperature tališta iako se radi o istom HBD, što se pripisuje postojanju dva polimorfa kemijske strukture mentola,  $\alpha$  i  $\beta$  (Zainal-Abidin i sur., 2021).

Kako bi hidrofobno otapalo moglo biti korišteno za ekstrakciju, jedan od kriterija jest da ima različitu gustoću od vode. Većina hDES ima gustoću manju od vode, što omogućuje manju pojavnost emulzija i lakše razdvajanje između tih dviju faza (Devi i sur., 2023). Van Osch i sur. (2019) testirali su 17 različitih hDES-ova i procjenjivali zadovoljavaju li 4 kriterija koja bi omogućavala DES-ovima uporabu kao otapala za ekstrakciju, a uključuju viskoznost ispod 100 mPa s, gustoću različitu od vode (veću ili jednaku 50 kg m<sup>-3</sup>), malu promjenu pH vodene



faze nakon miješanja te nisku razinu hDES-a koji prelazi u vodenu fazu. Sva 4 kriterija zadovoljili su hDES-ovi timol:kumarin (2:1), timol:mentol (1:1), timol:kumarin (1:1), timol:mentol (1:2) i 1-tetradekanol:mentol (1:2) zbog čega autori zaključuju da ih se može smatrati održivim hidrofobnim dizajniranim otapalima.

hDES-ovi nalaze svoju primjenu u mnogim područjima. Prvi put su 2015. godine korišteni za ekstrakciju hlapljivih masnih kiselina iz organskog otpada kao alternativni put proizvodnji kemikalija na bazi nafte (Van Osch i sur., 2015). Te su se godine hDES istraživali i za uklanjanje različitih biomolekula iz voda (Ribeiro i sur., 2015). Nadalje, istražuje se njihov potencijal u čišćenju otpadnih voda od bisfenola A, izopropanola, policikličkih aromatskih ugljikovodika i drugih štetnih tvari (Devi i sur., 2023).

### **2.3. EKOTOKSIKOLOGIJA**

Ekotoksikologija je znanost koja objedinjuje toksikologiju i ekologiju, a bavi se izučavanjem utjecaja tvari iz okoliša na sve razine bioloških zajednica, od molekula, stanica, tkiva, organa i organizama pa sve do populacija i ekosustava. Ekotoksikološka istraživanja uključuju fizikalno-kemijske, molekularne, toksikološke, fiziološke i ekološke procese, a usmjerena su na razumijevanje toksikoloških pojava u različitim biotopima, populacijama i ekosustavima te sam mehanizam toksikološkog djelovanja i ekoloških procesa, budući da samo integrirani pristup omogućuje razumijevanje ekotoksikoloških učinaka u kontaminiranim sustavima (Radošević i sur., 2016a).

Jedna od strategija za procjenu razine i učinka različitih onečišćenja u okolišu je korištenje biomarkera, dok je drugi pristup ispitivanje toksičnosti primjenom *in vivo* i *in vitro* laboratorijskih testova. *In vitro* testovi su našli svoje mjesto u ekotoksikologiji, jer se međudjelovanje kemikalije koja je prisutna u okolišu i živog svijeta odvija upravo na površini stanice ili u njezinoj unutrašnjosti. Budući da je glavni cilj primjene *in vitro* testova procjena rizika za ljude, živi svijet i okoliš, ključno je pitanje ekotoksikologije u kakvom je odnosu učinak ispitivane tvari na nivou stanice i toksičnost te iste tvari na višem biološkom nivou, pri čemu je nužno uzeti u obzir niz faktora koji na to utječu te povezati to s utjecajima okoliša kako bi slika bila cjelovita (Radošević i sur., 2016a).

### **2.4. STANIČNE LINIJE I ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI**

Citotoksičnost je sposobnost određenih tvari da unište žive stanice, a može biti uzrokovana djelovanjem kemijske tvari, izlaganjem drugim stanicama ili pak fizikalnim ili okolišnim uvjetima (izloženost radijaciji, promjeni temperature i slično). Toksičnost kemijskih tvari ispoljava se na mnogo načina, no klasificira se u dvije kategorije koje uključuju poremećaj specifičnih biomolekularnih ciljeva ili puteva (npr. agonizam/antagonizam receptora i

aktivacija/inhibicija enzima) ili generalni poremećaj stanične mašinerije koji dovodi do staničnog stresa i smrti stanice (Čelik, 2018).

Od velike je važnosti odrediti citotoksičnost neke tvari kako bi se odredilo predstavlja li testirana tvar opasnost po zdravlje ljudi te se smatra jednom od najvažnijih *in vitro* evaluacijskih sistema. Za ispitivanje biološke aktivnosti spojeva najčešće se koriste humane kontinuirane stanične linije koje se mogu nabaviti preko banki stanica. Testovi citotoksičnosti mjere gubitak stanične ili interstanične strukture i/ili funkcije, uključujući i letalnu citotoksičnost. Oni služe za predviđanje potencijala neke tvari da izazove ozljedu stanice i staničnog tkiva, no ta predviđanja znaju varirati od stvarnog učinka zbog stalne izloženosti staničnih linija testiranoj tvari zbog manjka biološkog zaštitnog mehanizma, uključujući mukozu. Najčešće korištene stanične linije, ovisno o primjeni ispitivane tvari, uključuju stanice izolirane iz epitela rožnice, fibroblaste pluća, stanice jajnika kineskog hrčka (engl. *Chinese Hamster Ovary*, CHO), bubrežne stanice pasa, stanice izolirane iz humanog raka vrata maternice (HeLa stanice), stanice keratinocita kože (HaCaT) i mnoge druge.

#### 2.4.1. Testovi citotoksičnosti

Stanične linije često se koriste kao modelni sustav za istraživanje reakcije biološkog sustava na neku tvar. Testovi citotoksičnosti uključuju izlaganje stanica tvari od interesa te određivanje vijabilnih stanica nakon određenog perioda inkubacije. Za sve metode koji koriste stanične linije kao modelni sustav, bitno je odrediti koji je udio stanica preživio tretman te usporediti te podatke s preživljenjem stanica u kontroli, kako bi se moglo napraviti razlikovanje između citotoksičnosti i citostaze ili prestanka rasta.

Prema načinu mjerenja, metode za određivanje vijabilnosti stanica dijelimo na metode u kojima se žive stanice ne boje (Tripin plavo, eozin, Congo crveno, erithrozin B,...), zatim kolorimetrijske metode (MTT, MTS, XTT, WST-1, kristal violet,...), fluorometrijske metode (AlamarBlue, CFDA) te luminometrijske metode (ATP) (Riss i sur., 2019).

Najčešće korištene metode koriste pojavu gubitka integriteta membrane stanica što omogućava prolazak tvari iz ili u stanicu. Metoda bojanja bojom tripin plavo koju slijedi pregled i brojanje stanica samo jedna je od metoda koje koriste boje i njihovo prodiranje u mrtve stanice za diferencijaciju živih i mrtvih stanica. Drugi najčešći način uključuje mjerenje markera koji istječu iz citoplazme mrtvih stanica u medij. Najčešći marker koji se koristi je laktat dehidrogenaza (Riss i sur., 2019).

Kolorimetrijska MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) metoda radi na principu utvrđivanja mitohondrijske funkcije stanica tako što mjeri aktivnost mitohondrijskih enzima poput sukcinat dehidrogenaze. MTT se reducira do ljubičasto obojenog formazana

pomoću NADH. Nedostatak metode leži u netopljivosti formazana u vodi, pa je prije mjerenja apsorbancije potrebno dodati organsko otapalo poput DMSO (dimetilsulfoksid) ili izopropanola da bi se otopili nastali kristali (Aslantürk, 2018).

MTS (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiazol)-3-(4-sulfofenil) tetrazolij) kolorimetrijska metoda bazira se na konverziji tetrazolijeve soli u obojeni formazan, čija je količina proporcionalna broju živih stanica u kulturi. Trajanje inkubacije MTS reagensa je između 1-3 sati, nakon čega se mjeri apsorbancija na 492 nm. MTS metoda brza je, osjetljiva, ekonomična i specifična *in vitro* metoda za određivanje toksičnosti, te se često koristi zbog lakoće korištenja i pouzdanosti (Aslantürk, 2018).

#### 2.4.2. HeLa stanična linija

HeLa stanična linija uspostavljena je 1952., a izolirana je iz invanzivnog adenokarcinoma vrata maternice pacijentice Henriette Lacks. Ova je stanična linija prvi uspješni pothvat u uspostavljanju besmrtnih ljudskih staničnih linija, a od tada je njeno korištenje pridonijelo mnogim znanstvenim otkrićima, uključujući prvo cjepivo protiv polio virusa (Frattini i sur., 2015). Pri početku uporabe HeLa stanične linije, velik problem predstavljala je križna kontaminacija. Naime, HeLa stanice mogu preživjeti i biti raspršene u aerosolima, te su se tako kontaminirale druge stanične linije što je dovelo do pojave derivata HeLa staničnih linija za koje se mislilo da su stanične linije drugih ljudskih tkiva. Tek analizom genoma utvrdilo se da su stanične linije na kojima su rađena istraživanja zapravo potekle iz HeLa stanične linije što je dovelo pod upitnik vjerodostojnost mnogih istraživanja. Upravo zbog toga 1960-ih započinje korištenje laminara kako bi se spriječile kontaminacije (Korch i Varella-Garcia, 2018).

#### 2.4.3. HaCaT stanična linija

Iz etičkih razloga, testiranje iritacija kože na animalnim modelima nastoji se smanjiti zbog čega se stanične linije keratinocita ispoljavaju kao alternativno rješenje. Moguće je proizvesti različite ekvivalente kože, zavisno o tipu stanica kože koji se koristi. Korištenje staničnih linija dovodi do uniformnosti istraživanja i omogućava reproducibilnost eksperimenata što dovodi do lakše identifikacije i razumijevanja određenih procesa, dok uporaba primarnih stanica može biti preferirana kad se procjenjuju razlike između članova određene populacije ili pak stanica kože iz različitih dijelova tijela.

HaCaT stanična linija je netumorigena monoklonalna stanična linija, izolirana iz keratinocita odraslog čovjeka te spontano immortalizirana, a koristi se kao model za proučavanje funkcija keratinocita. Do 1988., transformacija ljudskih keratinocita bivala je postignuta samo

infekcijom sa simian virusom-40 (SV40) ili pak transfekcijom s DNA izoliranom iz tog virusa, no te su stanične kulture pokazivale promijenjena svojstva rasta te redukciju normalne keratinizacije. Te su godine Boukamp i suradnici izolirali staničnu liniju iz kože odraslog čovjeka koja je pokazala sposobnost spontane *in vitro* transformacije, ali zadržavajući normalne diferencijacijske karakteristike i strukturu nakon *in vivo* transformacije. Karakteristike HaCaT stanične linije pokazuju da se spontana transformacija ljudskih odraslih keratinocita može pojaviti *in vitro* kao rezultat je kromosomskih aberacija, bez da dovodi do velikih defekata u diferencijaciji (Boukamp i sur., 1988). HaCaT stanice koriste se u farmakološkim studijama, kao i studijama toksičnosti na kožu, ali i istraživanjima biologije kože i mehanizama diferencijacije stanica (Boelsma i sur., 1999).

## 2.5. FITOTOKSIČNOST

Fitotoksičnost se definira kao kapacitet tvari da nanese privremenu ili dugoročnu štetu biljkama, te se koristi kao pokazatelj utjecaja na okoliš (EPPO, 2014). Testovi fitotoksičnosti dijele se na makroskopske testove koji procjenjuju utjecaj na germinaciju i rani razvoj izdanka te na mikroskopske koji proučavaju kromosome i promjene u jezgri. Testovi na biljkama provode se kako bi se ispitala toksičnost zbog jednostavnosti, niske cijene, brojnosti mogućih parametara za procjenu i dobre korelacije s animalnim modelima (Jitäreanu i sur., 2019).

Biljke su sesilni organizmi zbog čega im je jedina opcija u reakciji na nepovoljne uloge prilagodba. Nepovoljni uvjeti nastaju pod djelovanjem abiotičkih i biotičkih čimbenika, od kojih u prve spada radijacija, salinitet, poplave, suša, temperaturni ekstremi i slično. S druge strane, u biotičke čimbenike ubrajamo napade raznih patogena (plijesni, bakterija, biljojeda i slično). Stresori u biljkama izazivaju podražaj, nakon čega biljke generiraju odgovarajući stanični odgovor (Gull i sur., 2019).

Kod velike razine stresnih čimbenika, dolazi do poremećaja u proizvodnji reaktivnih kisikovih čestica. Reaktivne kisikove čestice (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) proizvode se kao normalni produkt biljnog staničnog metabolizma. U ROS ubrajaju se slobodni radikali poput superoksidnog aniona ( $O_2^{\cdot-}$ ) i hidroksilnog radikala ( $\cdot OH$ ) te neradikalne molekule poput vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), jediničnog kisika ( $^1O_2$ ) i tako dalje. Unatoč svojoj destruktivnoj prirodi, ROS-ovi služe kao sekundarni glasnici u mnogim staničnim procesima, uključujući toleranciju na okolišni stres. Okolišni stres u mnogim oblicima vodi do pojačane proizvodnje ROS-ova što može dovesti to oksidativnih oštećenja i konačno, stanične smrti. Kako bi se stanica obranila od prekomjerne proizvodnje kao rezultata okolišnog stresa, mora ih prevesti u druge oblike pomoću enzimskih i neenzimskih antioksidansa prisutnih u tkivima. Antioksidans je tvar koja ima sposobnost korištenja ROS-a bez da i sam podliježe konverziji u destruktivni radikal, a antioksidativni enzim se definira kao enzim koji ili katalizira tu reakciju

ili pak je uključen u direktnu obradu ROS-a (Noctor i Foyer, 1998). ROS-ovi dakle mogu sudjelovati u staničnim procesima kao signalne molekule ili tim istim stanicama nanositi štetu, što ovisi o delikatnoj ravnoteži između proizvodnje i korištenja ROS-a (Sharma i sur., 2012). Enzimski antioksidansi uključuju superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), gvajakol peroksidazu (GPX), ezime askorbat-glutation puta (AsA-GSH) poput askorbat peroksidaze (APOX), monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) i glutacion reduktaze (GR). Ovi enzimi kataliziraju redox reakcije, od kojih puno ovisi o elektronima čiji su izvor reducenski niske molekulske mase poput askorbata i glutationa.

Kako bi se odredilo utječe li ispitivana tvar na pojavu oksidativnog stresa koji negativno utječe na rast i razvoj biljke, koriste se direktne i indirektno metode određivanja oksidativnog stresa. Direktnim metodama određuje se količina ROS-a prisutna u stanici pomoću kemijskih proba, biosenzora i elektronske paramagnetične rezonance, no kako je većina ROS-ova kratkoživuća, najviše metoda detekcije ROS-a oslanja se na mjerenje vodikovog peroksida i superoksidnog aniona kao relativno stabilnih vrsta. Indirektno određivanje uključuje mjerenje stvorenih oksidativnih nusprodukata proteina, lipida i nukleinskih kiselina, mjerenje biokemijskih komponentu poput klorofila, antocijana i malondialdehida (Venkidasamy i sur., 2019).

## 2.6. TOKSIČNOST NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Tvrdnje o netoksičnosti DES-ova na početku su izlazile iz premise da netoksične komponente tvore netoksični DES. Međutim, treba se uzeti u obzir i moguće sinergističko djelovanje komponentata kod procjene njihove sigurnosti za uporabu. Toksičnost uvelike ovisi o obliku izloženosti (ingestija, dodir kožom ili pak inhalacija), a s obzirom da se primjerice hDES-ovi najčešće upotrebljavaju u ekstrakciji tvari iz hrane te za farmaceutske i medicinske svrhe iznimno je bitno procijeniti njihovu ekotoksičnost i biorazgradivost (Sharma i Lee, 2024; Martínez i sur., 2022). Istraživanja u kojima se procjenjuje toksičnost DES-ova većinom se baziraju na citotoksičnosti i ekotoksičnosti. Citotoksičnost se procjenjuje na staničnim linijama ljudskih stanica (npr. Hela S3, CaOV3, HEK-293T), tumorskih stanica (HeLa, PC3,...) te stanica animalnih organizama ali i *in vivo* na organizmima poput miševa, štakora i morskih životinja. S druge strane, ekotoksikološke studije provode se na bakterijama (*A.fischeri*), račićima (*D.Magna*, *A.salina*), algama (*R.subcapitata*) i ribama (*C. carpio*) kao predstavnicima vodenog okoliša, te biljkama (*T.aestivum*, *A.sativum*, *H.vulgare*) kao predstavnicima kopnenog okoliša (Lomba i sur., 2021).

Promjene u toksikološkom profilu otapala proizlaze iz različitih struktura komponentni koje ga tvore. Također, poznato je da kationi imaju glavnu ulogu u toksičnosti otapala (Radošević i sur., 2016b). Osim sastava, veliku razliku u toksičnosti čini međusobni omjer komponenti. Primjerice DES-ovi s kolin kloridom kao HBA te ureom, glicerolom i etilen glikolom kao HBD

nisu inhibirali rast bakterije *E.coli* kad su bili omjeru 1:3 (Hayyan i sur., 2013), no pri omjeru 1:1 otapala istih komponenti su pokazala letalan učinak na *E.coli* (Wen i sur., 2015).

Najviše podataka o citoksičnosti DES-ova postoji za one na bazi kolin klorida. Ispitivanjem na različitim staničnim linijama, pokazano je da njihov citotoksični utjecaj varira s obzirom na stanične linije, a primijećena je i korelacija povećanja toksičnosti s povećanjem viskoznosti DES-ova. (Hayyan i sur., 2015, Hayyan i sur., 2016). Također, Ahmadi i sur. (2018) došli su do zaključka da su smjese pokazale veću toksičnost u odnosu na pojedine komponentne, no manju u odnosu na odgovarajuće ionske kapljevine. Nadalje, primijetili su da se citotoksičnost povećava s brojem okretnih veza, što se povezuje s fleksibilnosti molekula i njihovim potencijalom za prodiranje kroz staničnu membranu, te sa srednjim atomskim van der Waalsovom volumenom HBD. Toksičnost za bakterije zabilježena je i za Gram-pozitivne i za Gram-negativne bakterije za neke DES-ove na bazi fosfonija i to u većoj mjeri u odnosu na komponente tih DES-ova (Hayyan i sur., 2013). Ispitan je učinak i DES-ova na bazi betaina, kolin klorida i limunske kiseline na bakterije pri čemu su DES-ovi s limunskom kiselinom pokazali najveću toksičnost, vjerojatno zbog velike kiselosti (Radošević i sur., 2018). Primijećeno je također i da su DES-ovi na bazi kiselina više toksični za bakterije od onih s drugim komponentama (Zhao i sur., 2015).

Za hDES-ove postoji puno manje dostupnih radova o citoksičnosti. Ahmadi i sur. (2018) ispitali su utjecaj nekoliko DES-ova na bazi mentola i zasićenih masnih kiselina na HaCaT staničnoj liniji iz čega su zaključili da je DES mentol:laurinska kiselina pokazao najveću citotoksičnost, sličnu onoj čistog mentola, dok su DES-ovi s miristinskom i stearinskom kiselinom pokazali manju toksičnost od njihovih komponenata.

Osim gore navedenih, rade se i procijene fitotoksičnosti DES-ova na biljne organizme, no ta su istraživanja manje brojnosti. Ispitan je utjecaj DES-ova na sjemenkama pšenice, ječma, zelene salate i češnjaka. Većina DES-ova korištenih u tim istraživanjima je na bazi kolin klorida, pri čemu je izveden generalni zaključak kako su ta otapala niske toksičnosti za germinaciju sjemena, no imaju inhibitoran utjecaj na rani rast izdanaka (Radošević i sur., 2015, Rodrigues i sur., 2021a). Dakako, postoje iznimke pa su tako DES-ovi kolin klorid:oksalna kiselina i kolin klorid:mliječna kiselina pokazali toksičniji profil, što se pripisuje sniženju pH medija zbog kiseline kao komponente DES-a kod većih koncentracija (da Costa i sur., 2023). Fitotoksičnost hidrofobnih DES-ova procijenjena je u radu da Costa i sur. (2023) za DES-ove Pt:Gy:La i Oc:Gy:La (Pt – pentanol, Gy – glicerol, Oc – oktanol, La – mliječna kiselina) koji su pokazali znatno toksičniji ekotoksikološki profil u odnosu na hidrofilne DES-ove. S obzirom da na relativno mali broj istraživanja na temu fitotoksičnosti DES-ova, potrebno je ispitati veći broj različitih DES-ova na različitim biljkama kako bi se dobila šira slika.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Stanične linije

U izradi ovog rada korištene su HeLa stanična linija iz banke stanica American Type Culture Collection te HaCaT stanična linija iz banke stanica CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Njemačka).

##### 3.1.2. Kemikalije

**Tablica 1.** Popis i podrijetlo kemikalija korištenih u izradi rada

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač</b>
Bradford reagens	Applichem, Njemačka
Destilirana voda	PBF, Zagreb, RH
Dimetilsulfoksid	Honeywell – Riedel-de Haen, Seelze, Njemačka
DMEM (engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)	Kemika, Zagreb, RH
Etanol, p.a.,	Kemika, Zagreb, RH
FBS (engl. Fetal Bovine Serum)	GIBCO Invitrogen Corporation, Auckladin, Novi Zeland
Gvajakol	Acros-Organics, SAD
Kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1M)	Kemika, Zagreb, RH
Kalijev hidrogen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1M)	Kemika, Zagreb, RH
Kalijev jodid, 1M	Kemika, Zagreb, RH
L-askorbinska kiselina	Kemika, Zagreb, RH
Metionin	Acros-Organics, SAD
Natrijev askorbat	T.T.T. d.o.o., Hrvatska
Natrijev hipoklorit	Gram-mol, Hrvatska
Nitro plavi tetrazolijev klorid (NBT)	Alfa Aesar, SAD

**Tablica 1.** Popis i podrijetlo kemikalija korištenih u izradi rada - nastavak

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač</b>
Polivinil-polipirrolidon (PVPP)	Acros-Organics, SAD
Riboflavin	Kemika, Hrvatska
The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, SAD
Tiobarbituratna kiselina (TBA)	Acros-Organics, SAD
Trikloroctena kiselina (TCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Tripan-plavo	Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Tripsin-EDTA, 0,25 %	GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija
Vodikov peroksid	Gram-mol, Hrvatska

## 3.1.3. Pribor i aparatura

**Tablica 2.** Popis opreme korištene u izradi rada

<b>Vrsta opreme</b>	<b>Proizvođač</b>
Analitička vaga	Boeco BAS 31 plus, Njemačka
Centrifuga	MRC, Izrael
Čitač ploča	Tecan Sunrise, Mannedorf, Švicarska
Digestor	Waldner, Njemačka
Hladnjak i zamrzivač (+4 °C i -20 °C)	Gorenje, Slovenija
Inkubator s kontroliranom atmosferom CO <sub>2</sub>	Kambič, Slovenija
Komora za sterilni rad	Kambič, Slovenija
Magnetska miješalica s grijanjem	RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
Neubauer komorica za brojanje stanica	Reichert, NY, SAD
Spektrofotometar	TECAN, Infinite 200Pro, Švicarska
Svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
Tresilice	Crux, Hrvatska
Zamrzivač (-75 °C)	TT 80 FRYKA, Njemačka



### 3.1.4. Otopine i puferi

Pufer za ekstrakciju proteina, pH = 7,0

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) 3,85 mL
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 M) 6,15 mL
- EDTA (10 mM) 2,00 mL
- L-askorbinska kiselina 176,00 mg
- destilirana voda do 200 mL

Kalij fosfatni pufer (50 mM), pH = 7,0

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) 0,96 mL
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 M) 1,54 mL
- destilirana voda do 50 mL

Kalij fosfatni pufer (100 mM), pH = 7,4

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) 0,99 mL
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 M) 4,01 mL
- destilirana voda do 50 mL

Pufer za mjerenje aktivnosti superoksid-dismutaze, pH = 7,8

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 M) 0,92 mL
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 M) 9,08 mL
- EDTA (10 mM) 2,00 mL
- metionin 388,0 mg
- NBT 127,0 mg
- Destilirana voda do 200,00 mL

Pufer za mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza

- $\text{H}_2\text{O}_2$  (w = 0,3) 25,50  $\mu\text{L}$
- gvajakol (18 mM) 100,65  $\mu\text{L}$
- kalij fosfatni pufer (50 mM) do 50,00 mL

Pufer za mjerenje aktivnosti katalaze, pH = 7,0

- kalij fosfatni pufer (50 mM) 50,0 mL
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) 51,0 µL

Pufer za mjerenje aktivnosti askorbat-peroksidaze, pH = 7,0

- kalij fosfatni pufer (50 mM) 50,0 mL
- EDTA (0,1 mM) 500,0 µL

PBS (engl. Phosphate-Buffered Saline) pufer, pH = 7,4

- NaCl 8,0 g
- KCl 0,2 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g
- Destilirana voda do 1000 mL

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Za pripremu otapala korištenih u eksperimentalnom dijelu rada, pomiješane su komponente hDES-ova u određenim molarnim omjerima (navedeni u tablici 3) nakon čega su dobivene smjese stavljene u tresilicu na 180 rpm-a, pri 50 °C na nekoliko sati do formiranja bistre homogene smjese.

**Tablica 3.** Hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala korištena pri izradi ovog rada

<b>Niskotemperaturno eutektičko otapalo</b>	<b>Kratica</b>	<b>Molarni omjer komponenata</b>
mentol:timol	Me:Ty	1:1
mentol:oktanska kiselina	Me:C8	1:3
timol:dekadska kiselina	Ty:C10	1:1

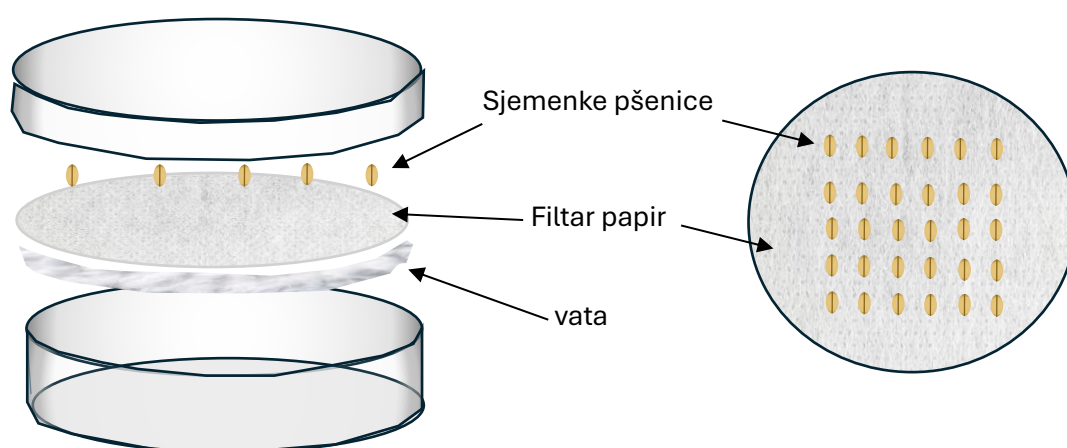
Kako se radi o hDES-ovima, za pripravu razrjeđenja najprije su DES-ovi otopljeni u etanolu, tako da je ukupni maseni udio etanola u nastalom razrjeđenju 10 %, nakon čega je dodano vode do određenog razrjeđenja. Primjerice, za koncentraciju od 500 mg L<sup>-1</sup> dodano je 50 mg

hDES-a u 5 mg EtOH te je nadopunjeno do 100 mL s demineraliziranom vodom. Za ispitivanje fitotoksičnosti korištene su koncentracije 5, 25, 50 i 500 mg L<sup>-1</sup>, dok su za stanice korištene koncentracije od 100, 125, 150 i 200 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.2.2. Određivanje fitotoksičnosti hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala određivanjem oksidativnog stresa kod klica obične pšenice

Eksperimentalni sustav sastoji se od 30 sjemenki pšenice po Petrijevoj zdjelici, a postavljen je u 15 Petrijevih zdjelica. Sjemenke obične pšenice (*Triticum aestivum* L.) najprije su sterilizirane namakanjem u 1 %-tnoj otopini natrijevog hipoklorita tijekom 30 minuta, nakon čega su isprane sterilnom demineraliziranom vodom 3 puta i inkubirane u mraku 24h na filter papiru.

Nakon toga, u Petrijeve zdjelice promjera 15 cm položena je vata u ravnomjernom sloju, na nju je stavljen filter papir, pa je na njega položeno 30 prethodno steriliziranih sjemenki, te je sve zalijano sa 30 mL otopine DES-a određene koncentracije (5, 25, 50 i 500 mg L<sup>-1</sup>), prema shemi pokazanoj na slici 3. Postavljeno je više kontrolnih skupina, od kojih je jedna Petrijeva zdjelica zalijevana etanolom u koncentraciji od 5 %, jedna s etanolom u koncentraciji 10 %, dok je treća zalijevana sa demineraliziranom vodom. Svi eksperimentalni sustavi stavljeni su na inkubaciju pri kontroliranim uvjetima: temperaturi od 30 °C te uz izmjenu svjetla prema ciklusu dan/noć (14/10 sati). Svakih 24 sata tijekom 7 dana uzgoja mjerena je duljina izdanaka i korijena, te je na kraju uzgoja prikupljen biljni materijal. Drugi i peti dan mijenjana je vata te je dodano po 30 mL DES-a/kontrolne otopine kako bi se osigurao stalni kontakt sjemena s testiranim otapalima, te kako bi se osigurala vlažnost sjemena.



**Slika 3.** Shema eksperimentalnog sustava za testiranje fitotoksičnosti na sjemenju obične pšenice

### 3.2.3. Određivanje koncentracije proteina i aktivnosti antioksidativnih enzima

Nakon uzgoja i mjerenja duljine izdanaka i korijena, izdanci su homogenizirani uz pomoć tarionika i tučka na ledu. Za ekstrakciju je najprije izvagano 200 mg biljnog materijala, koji je zatim uz dodatak 2 mL pufera za ekstrakciju proteina pH = 7,0 te polivinilpoliprolidona, polimer koji služi za stabilizaciju proteina, podvrgnut homogenizaciji. Dobiveni ekstrakt centrifugiran je pri 10 000 rpm, dekantiran i čuvan na -20 °C do analize. Taj ekstrakt koristi se za određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina metodom po Bradfordu, te za mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze (APOX), katalaze (CAT), nespecifičnih peroksidaza (POD) te superoksid dismutaze (SOD).

#### 3.2.3.1. *Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina po Bradfordu*

Analiza ukupnih topljivih proteina provedena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). U ploču s 96 jažica se najprije otpipetira po 10 µL uzorka, na što se dodaje 225 µL Bradfordovog reagensa. Ploča s uzorcima inkubira se 15 minuta u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 595 nm spektrofotometrom.

#### 3.2.3.2. *Mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze (APOX)*

Za mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze praćen je protokol Ambriović Ristov i suradnika iz 2007. godine. U kvarcnu je kivetu najprije otpipetirano 970 µL pufera za mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze, pa je dodano 10 µL Na-askorbata te 10 µL ekstrakta, nakon čega je dodano 10 µL alikvota vodikovog peroksida čime započinje reakcija. Tijek reakcije mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 290 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost APOX odgovara smanjenju količine askorbata s ekstinkcijskim koeficijentom 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, a izražava se kao nmol po minuti i mg ukupnih proteina (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> P).

#### 3.2.3.3. *Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)*

Aktivnost katalaze mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 290 nm, svakih 5 sekundi tijekom 1 minute. Početak mjerenja označava dodatak 5 µL razrijeđenog uzorka u 995 µL pufera za mjerenje aktivnosti katalaze (Ambriović Ristov i sur., 2007). Ekstinkcijski koeficijent iznosi 40 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Aktivnost katalaze izražava se kao nmol po minuti i mg ukupnih proteina (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> P).

#### 3.2.3.4. *Mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza (POD)*

Kako bi izmjerili POD, u ploču s 96 jažica se otpipetira 190 µL pufera za mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza, te se započinje reakcija dodatkom 10 µL ekstrakta, nakon čega se prati porast apsorbancije svakih 15 sekundi tijekom 5 minuta, pri valnoj duljini 470 nm. (Ambriović Ristov i sur., 2007). Tijekom reakcije nastaje tetragvajakol, čiji molarni

ekstinkcijski koeficijent iznosi  $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Aktivnost nespecifičnih peroksidaza izražava se kao mmol po min i mg ukupnih proteina ( $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$ ).

### 3.2.3.5. *Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)*

Za mjerenje aktivnosti SOD pripreme se različita razrjeđenja ekstrakta miješanjem određenih volumena ekstrakta i pufera za ekstrakciju proteina pH = 7,0 do ukupnog volumena od  $33,3 \mu\text{L}$  ako se radi u pločama s 96 jažica. U svaku se jažicu dodaje  $300 \mu\text{L}$  pufera za mjerenje aktivnosti superoksid-dismutaze, pH = 7,8 i  $0,67 \mu\text{L}$   $2 \mu\text{M}$  riboflavina te se enzimaska reakcija pokrene uključivanjem izvora svjetla od 36 W. Reakcija traje 10 min nakon čega se prekida zamračivanjem uzoraka. Mjerenje se odvija 5-10 min nakon zamračivanja uzoraka pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 560 nm, nakon čega se izrađuje krivulja aktivnosti enzima. Aktivnost SOD izražava se kao inhibicija redukcije supstrata:

$$\text{NBT (\%)} = [(A-B)/A] \cdot 100$$

A - apsorbancija izmjerena nakon reakcije bez enzima (najveća vrijednost apsorbancije)

B - apsorbancija izmjerena nakon reakcije s enzimom (smanjenje apsorbancije)

Krivulja aktivnosti enzima konstruira se na način da se na ordinatu nanese vrijednosti inhibicije redukcije supstrata NBT(%), a na apscisu volumeni enzimskog ekstrakta koji su korišteni za pripremu razrjeđenja. Iz pravca se odredi volumen enzimskog ekstrakta koji je potreban za 50 % inhibicije NBT-a u reakcijskoj smjesi pa se iz koncentracije ukupnih proteina izračuna specifična aktivnost SOD koja se izražava u jedinicama enzimske aktivnosti po miligramu ukupnim proteina ( $\text{U mg}^{-1} \text{ P}$ ).

### 3.2.4. Uzgoj staničnih linija HeLa i HaCaT

Kako bi se odredila citotoksičnost hDES, korištene su 2 stanične linije. HeLa stanična linija adenokarcinoma vrata maternice te HaCaT stanična linija epidermalnih keranocita. Obje stanične linije su nakon odmrzavanja uzgajane u DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza, Belgium) mediju kojem je dodano 5 % (v/v) FBS-a i 1 % (v/v) antibiotika. Uzgoj je proveden u inkubatoru, u atmosferi koja sadrži 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$  pri temperaturi od  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Svakog dana prati se broj stanica, morfologija i adherencija stanica pomoću inverznog mikroskopa. Tijekom rada sa staničnim linijama od izrazite je važnosti primjenjivati aseptične tehnike rada kako ne bi došlo do kontaminacije.

Stanice se nakon odmrzavanja održavaju u Petrijevim zdjelicama, uz redovito pasažiranje i mijenjanje medija kako bi se osigurale potrebne hranjive tvari za njihovu proliferaciju. Pri postavljanju eksperimenta stanice su precijepljene iz Petrijevih zdjelica u kojima su uzgajane u ploče s 96 jažica. Kako bi se mogle precijepiti, stanice je najprije potrebno odvojiti od

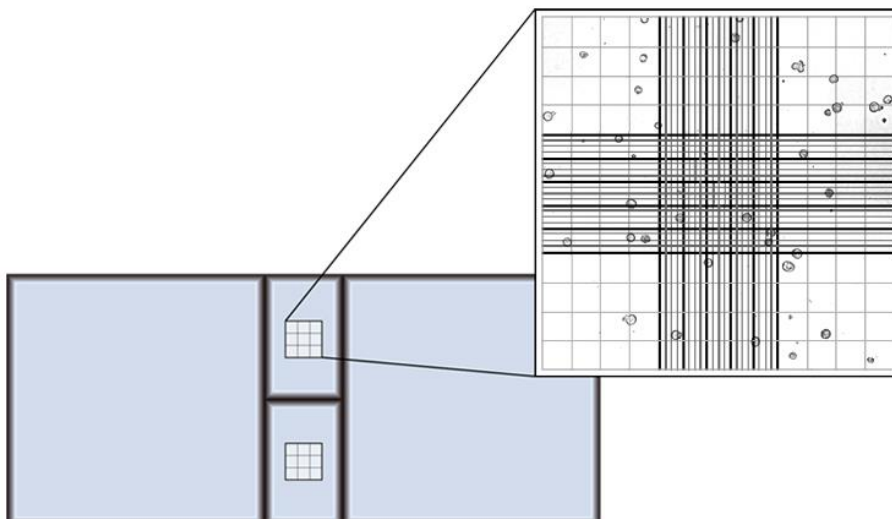
podloge, pa se dodaje PBS kako bi se uklonili ostaci medija. Nakon 1 minute, PBS se izuzima i baca, nakon čega se dodaje Tripsin/EDTA te se stanična kultura inkubira 3 – 5 minuta u CO<sub>2</sub> inkubatoru na +37 °C uz povremeno protresanje. Kad se makroskopski i mikroskopski utvrdi da su se sve stanice podigle s dna kultivacijske posude, dodaje se 1 mL medija kako bi se zaustavilo djelovanje Tripsin/EDTA. Uzorak suspenzije stanica zatim se uzima kako bi se odredio broj stanica pomoću metode tripan-plavo pod svjetlosnim mikroskopom. Nakon što je određen broj stanica, računa se potrebni volumen stanične suspenzije za naciepljivanje u ploču s 96 jažica, tako da u svakoj jažici bude naciepljeno po 100 µL suspenzije početne koncentracije 3×10<sup>4</sup> stanica mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.5. Brojanje stanica metodom tripan-plavo

Brojanje stanica vrši se u Neubauerovoj komorici (slika 4) pomoću metode tripan-plavo. Tripansko modriilo koristi se kako bi se razlikovale žive od mrtvih stanica s obzirom da se veže za oštećene dijelove membrane i tako boja mrtve stanice u plavo.

Bojilo se pomiješa sa staničnom suspenzijom u omjeru 1:1, pa se smjesa inkubira 3 minute. Za to se vrijeme komorica i pokrovnica steriliziraju izopropilnim alkoholom, te se pokrovnica pričvrsti pomicanjem po komorici do nastanka Newtonovih kolobara. Iz pripremljene smjese uzima se 10 µL i nanosi se na Neubauerovu komoricu. Stanice se zatim promatraju pomoću svjetlosnog mikroskopa te se broje u 4 kvadrata, pa se koncentracija računa prema formuli:

$$\text{broj stanica po mL suspenzije} = \text{broj izbrojenih stanica u sva 4 kvadrata} \times 5000 \times \text{faktor razrjeđenja}$$

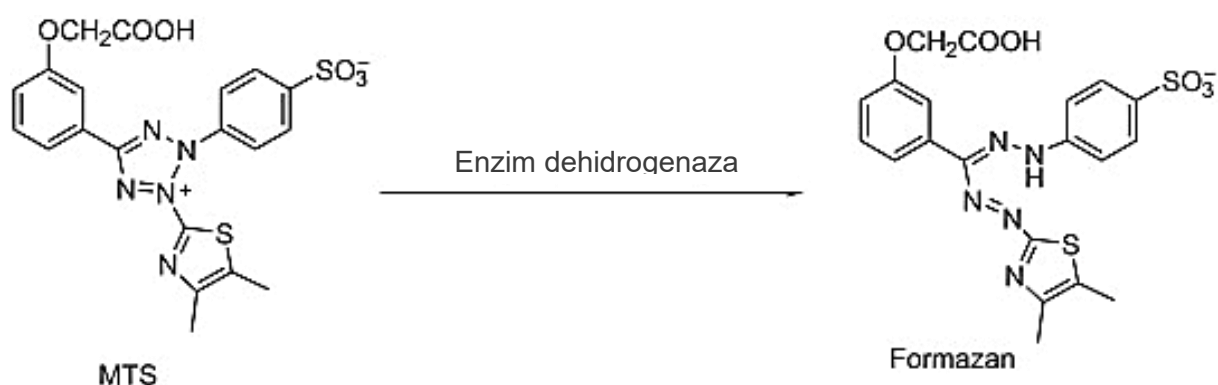


**Slika 4.** Neubauerova komorica i mreža za brojanje stanica (Logosbio, 2024)

### 3.2.6. Određivanje citotoksičnosti hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na staničnim linijama HeLa i HaCaT

Za ispitivanje citotoksičnosti korištenih DES-ova stanice su uzgajane u pločama s 96 jažica. U svaku jažicu naciepljeno je 100  $\mu\text{L}$  suspenzije početne koncentracije  $3 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ . Za tretman stanica pripremljene su matične otopine otapala koncentracije  $2 \text{mg mL}^{-1}$ , pri čemu su DES-ovi razrijeđeni u otopini EtOH i PBS-a (omjer 1:9). Nakon prekonoćne inkubacije, stanične linije tretirane su dodatkom hDES tako da je ukupna koncentracija hDES u mediju bila 100, 125, 150 i 200  $\text{mg L}^{-1}$ .

Kako bi se odredio postotak preživljenja stanica, korištena je MTS metoda (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay). Metoda se bazira na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u ljubičasto obojeni formazan pomoću enzima dehidrogenaze te NADH i NADPH kao koenzime (slika 5). Ta se reakcija odvija u metabolički aktivnim stanicama, pri čemu dolazi do oksidacije koenzima NAD(P)H u NAD(P)+. Intenzitet obojenja proporcionalan je broju živih stanica te se očitava spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 490 nm.



**Slika 5.** Redukcija MTS-a u formazan (prema Kuete i sur., 2017)

Nakon 72 sata od tretmana hDES-ovima, dodaje se po 10  $\mu\text{L}$  MTS reagensa u svaku jažicu te se stanice inkubiraju 3 sata pri 37 °C, nakon čega se spektrofotometrijski mjeri intenzitet razvijene boje pri 490 nm, a iz dobivene vrijednosti apsorbancije računa se postotak preživljenja stanica računa pomoću sljedeće formule: .

$$\text{Postotak preživljenja stanica} = \frac{\text{apsorbancija trerianih stanica}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica}} \times 100$$

### 3.2.7. Izračunavanje EC50 vrijednosti

EC50 vrijednost (engl. *Effective Concentration* 50, EC50) definira se kao koncentracija tvari izražena u gramima po litri ( $\text{g L}^{-1}$ ) a koja uzrokuje odgovor koji je na točno polovici između bazne linije i maksimalnog odgovora (Singh i sur., 2020). Krivulje doza-odgovor i izračunate

EC50 vrijednosti koriste se za procjenu utjecaja kojeg kemikalija ima na određeni biološki sistem (Nyman i sur., 2015). U kontekstu ovog rada EC50 vrijednosti se koristi za iskazivanje koncentracije hDES-a koja uzrokuje inhibiciju germinacije, odnosno rasta izdanaka na 50 % tretiranih sjemenki pšenice.

Za određivanje EC50 vrijednosti potrebno je grafički prikazati rezultate te pronaći jednadžbu krivulje koja ju najbolje opisuje, a to je ona kod koje je vrijednost  $R^2$  najbliža 1. U tu se jednadžbu uvrštava 50 kako bi se pronašla koncentracija pri kojoj je na 50 % tretiranog uzroka primijećen utjecaj na ispitivani organizam.

### 3.2.8. Statistička obrada podataka

Sva su mjerenja provedena u paralelama, a rezultati su prikazani kao prosječne vrijednosti mjerenja  $\pm$  standardna devijacija (S.D.). Razlike između uzoraka određene su ANOVA testom te *post hoc* Turkey's HSD testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini vjerojatnosti  $p < 0,05$ .



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U dosadašnjim istraživanjima pretpostavljalo se kako su DES-ovi netoksični i ekološki prihvatljivi zbog činjenice da su pripremljeni od prirodnih komponenata za mnoge od kojih je potvrđena netoksičnost, no s obzirom da DES-ovi posjeduju različita svojstva od pojedinih tvari od kojih su načinjeni, ta se tvrdnja mora provjeravati za svaku pojedinu formulaciju niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Također, pretpostavlja se kako delokalizacija naboja do koje dolazi zbog povezivanja vodikovim vezama kod formiranja DES-a može dovesti do toksičnijeg sistema za organizme jer su kemikalije s delokaliziranim nabojima toksičnije od kemikalija s lokaliziranim nabojima (Hayyan i sur., 2013).

S obzirom na narativ uključivanja DES otapala u sve aspekte industrije, bitno je procijeniti njegov utjecaj na žive organizme. Osim što bi uporabom u industriji hDES-ovi bili u direktnom doticaju s ljudskim organizmom, zbog čega je izrazito bitno da nije toksičan prema životinjskim i ljudskim stanicama, neizbježno je da kao rezultat primjene hDES-ova u raznim procesima, rezidue dolaze i u druge dijelove ekosustava, posebice vodu i tlo i tako ova otapala imaju direktan dodir s biljkama zbog čega je bitno procijeniti fitotoksičnost ovih otapala prije njihove uporabe. Proučavanje utjecaja tvari na više vrsta omogućuje otkrivanje sličnosti i različitosti u toksikološkoj reakciji na ispitivanu tvar, što u krajnosti dovodi do stvarnog shvaćanja potencijalnih opasnosti (Sharma i Lee, 2024).

U izradi ovog rada procijenjena je fitotoksičnost hDES-ova Ty:C10 (1:1), Me:Ty (1:1) i Me:C8 (1:3), u vidu klijavosti sjemenja i duljine izdanaka pšenice (*T. aestivum L.*), što je prikazano u tablici 4. te na slici 6. Nadalje, određena je aktivnost antioksidativnih enzima u ekstraktima izdanaka pšenice tretirane tim hDES-ovima, a rezultati su vidljivi na slikama 7-11. Citotoksičnost testiranih hDES-ova na stanične linije HeLa i HaCaT procijenjena je određivanjem vijabilnosti staničnih linija nakon tretmana hDES-ovima, te su dobiveni rezultati prikazani na slikama 12 i 13.

### 4.1. FITOTOKSIČNOST

Za procjenu fitotoksičnosti odabranih hDES-ova korišteno je sjeme obične pšenice (*T. aestivum*). Odabrana je ta vrsta jer je jednostavna za uzgoj, a predstavlja svjetski značajnu žitaricu s velikim utjecajem na gospodarstvo. Sjeme pšenice tretirano je različitim koncentracijama hDES-ova tijekom 7 dana, a pritom su praćene klijavost i duljina izdanaka kao varijable koje prikazuju rast biljke. Klijanje biljke rezultat je enzimskih reakcija koje aktiviraju anaboličke i kataboličke procese u stanici, a ukoliko dođe do ometanja tih procesa zbog prisustva ksenobiotika, klijanje je inhibirano. Također, kao rezultat toksičnosti ksenobiotika dolazi do usporavanja rasta i akumulacije biomase, pa je duljina izdanaka

vrijedan pokazatelj fitotoksičnosti (Jitärenau i sur., 2019). Vrijednosti EC50 za obje varijable izračunate su iz pripadajućih krivulja doza-odgovor te su prikazane u tablici 4.

**Tablica 4.** EC50 vrijednosti za uzorke pšenice tretirane testiranim hDES, nakon sedmodnevne inkubacije

hDES	EC50 [mg L <sup>-1</sup> ]	
	Klijavost	Duljina izdanka
Ty:C10 (1:1)	77,50	28,79
Me:Ty (1:1)	31,64	27,52
Me:C8 (1:3)	50,18	24,62

hDES- hidrofobno nikotemperaturno eutektičko otapalo, Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadaska kiselina, C8 – oktanska kiselina

Inhibicija germinacije prisutna je tek kod 25 mg L<sup>-1</sup> dodanog hDES, dok je kod koncentracije od 50 mg L<sup>-1</sup> značajnije izražena, najviše kod uzoraka tretiranih Me:Ty, za koje je i EC50 najmanji (31,64 mg L<sup>-1</sup>). Dobivene EC50 vrijednosti ukazuju na znatno veću toksičnost testiranih hDES-ova naspram EC50 vrijednosti DES-ova u kojima je donor vodikove veze kolin klorid. Naime, Radošević i sur. (2015) su istraživali toksične učinke DESova kojima je akceptor vodikove veze kolin klorid (ChCl), što čini, za razliku od DESova ispitivanih u ovom radu, hidrofilno otapalo pa su i ispitivane koncentracije bile mnogo veće (do 20 000 mg L<sup>-1</sup>). U tom radu EC50 vrijednosti germinacije za ChCl:Glc i ChCl:Gly iznosile su više od 20 000 mg L<sup>-1</sup>, osim za ChCl:OA (OA – oksalna kiselina) za koji je EC50 vrijednost iznosila oko 5000 mg L<sup>-1</sup>, što su znatno veće vrijednosti od onih dobivenih za hDES-ove. Slično primjećuju i Rodrigues i sur. (2021a), koji pokazuju EC50 vrijednosti za germinaciju sjemenki pšenice preko 20000 mg L<sup>-1</sup> za DES-ove na bazi betaina. Također, da Costa i sur. (2023) zaključuju da svi hidrofilni DES-ovi koje su oni testirali pokazuju EC50 vrijednosti iznad 5000 mg L<sup>-1</sup> na sjemenkama zelene salate, dok za hDES-ove Pt:Gy:La i Oc:Gy:La primjećuju potpunu inhibiciju rasta, osim u vrlo niskim koncentracijama, čime dokazuju toksičniji ekotoksični profil hDES-ova. Da Costa i sur. (2023) isto kao i Radošević i sur. (2015) primjećuju veću toksičnost DES-ova čija je jedna od komponenti kiselina, te to pripisuju niskom pH koji se stvara pri koncentracijama višim od 1000 mg L<sup>-1</sup>.

Uzevši u obzir tablicu klasifikacije kemikalija koju su predložili Passino i Smith (1987) (tablica 5.), testirani hDES spadaju u kategoriju blago toksičnih supstanci (10 do 100 mg L<sup>-1</sup>). Prema toj istoj klasifikaciji, Rodrigues i sur. (2021b) svrstavaju DES-ove na bazi kolin klorida u bezopasne (1000 mg L<sup>-1</sup> i više).

**Tablica 5.** Klasifikacija toksičnosti kemikalija (prema Passino i Smith, 1987)

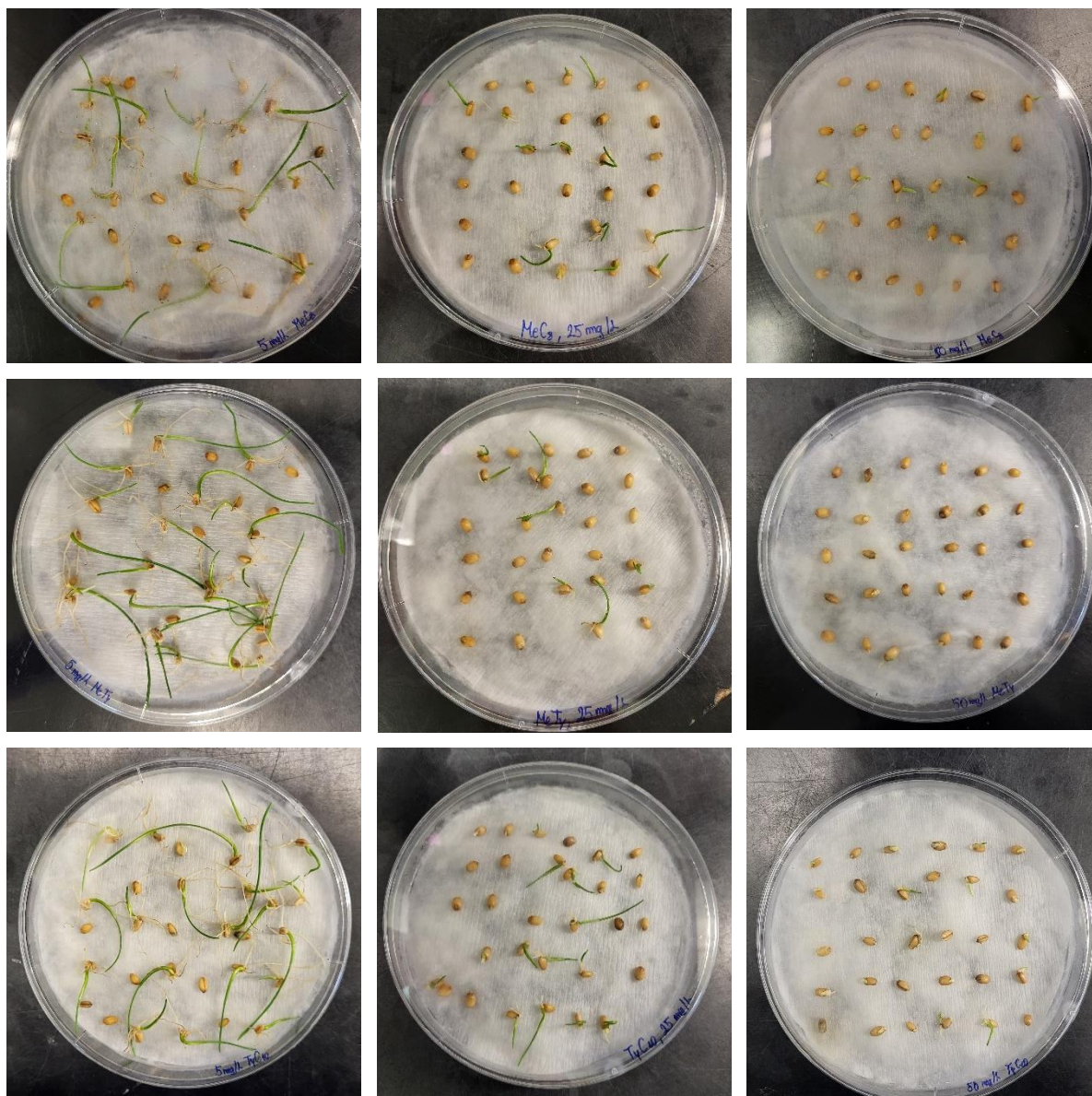
Relativna toksičnost	EC50 [mg L <sup>-1</sup> ]
Super toksično	< 0,01
Ekstremno toksično	0,01 – 0,1
Visoko toksično	0,1 – 1,0
Umjereno toksično	1,0 – 10,0
Slabo toksično	10,0 – 100,0
Gotovo bezopasno	100,0 – 1000,0
Relativno bezopasno	> 1000

Kako bi se hDES-ovi lakše homogenizirali s demineraliziranom vodom u pripravi razrjeđenja, u smjesu se dodaje i 10 % EtOH (mase EtOH naspram mase dodanog hDES-a), stoga povećanje koncentracije hDESa u vodi povlači za sobom i povećanje koncentracije etanola koji je sam po sebi toksičan za biljke, pa tako pri koncentraciji hDESa od 500 mg L<sup>-1</sup> (i EtOH 50 mg L<sup>-1</sup>, što odgovara otprilike 5,95 % (v/v) etanola u smjesi) nije došlo do germinacije niti jednog sjemena. Upravo to je potvrđeno i uzgojem pšenice tretirane s 5 % v/v EtOH, i 10 % v/v EtOH bez dodatka hDES-ova, gdje također nije došlo do germinacije niti jednog sjemena na uzorku od 30 sjemenki (rezultati nisu prikazani). Koncentracija od 25 mg L<sup>-1</sup> hDES-a najveća je testirana koncentracija kod koje je došlo do germinacije sjemena. Za izradu tog razrjeđenja korišteno je 2,5 mg L<sup>-1</sup> EtOH što odgovara otprilike 2,98 % (v/v). Ishodi ovih eksperimenata podudaraju se s prijašnjim istraživanjima koja navode da su koncentracije od 5 % (v/v) i više etanola prouzrokovale znatnu inhibiciju germinacije, dok su otopine s manje etanola pokazale čak i poboljšanu germinaciju u odnosu na kontrolu (Miyoshi i Sato, 1997).

Što se tiče rasta izdanaka u prvih 7 dana, njihova je prosječna duljina u uzorcima tretiranim s 5 mg L<sup>-1</sup> Ty:C10 i Me:Ty čak i veća u odnosu na kontrolu, dok s povećanjem koncentracije na 25, odnosno na 50 mg L<sup>-1</sup> prosječna duljina izdanaka opada (slika 6).

EC50 vrijednosti uglavnom su niže za duljinu izdanaka, što pokazuje da se toksični utjecaji hDES više ispoljavaju na rani rast nego na samu germinaciju sjemena, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima Radošević i sur. (2015) i Rodrigues i sur. (2021b). Ipak, i tu su evidentne razlike u toksičnosti, s EC50 vrijednostima klijanja sjemenki pšenice između 24 i 30

mg L<sup>-1</sup> za hDES-ove testirane u ovom radu, naspram EC50 vrijednosti između 450 i 3600 za DES-ove na bazi kolin klorida u radu Radošević i sur. (2015).



**Slika 6.** Pšenica 7.dan eksperimenta, prvi red - tretman s Me:C8, drugi red - tretman s Me:Ty, treći red - tretman s Ty:C10, prvi stupac – tretman s hDES-om u koncentraciji od 5 mg L<sup>-1</sup>, drugi stupac – tretman s hDES-om u koncentraciji od 25 mg L<sup>-1</sup> i treći stupac – tretman s hDES-om u koncentraciji od 50 mg L<sup>-1</sup> (vlastite fotografije)

Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadaska kiselina, C8 – oktanska kiselina

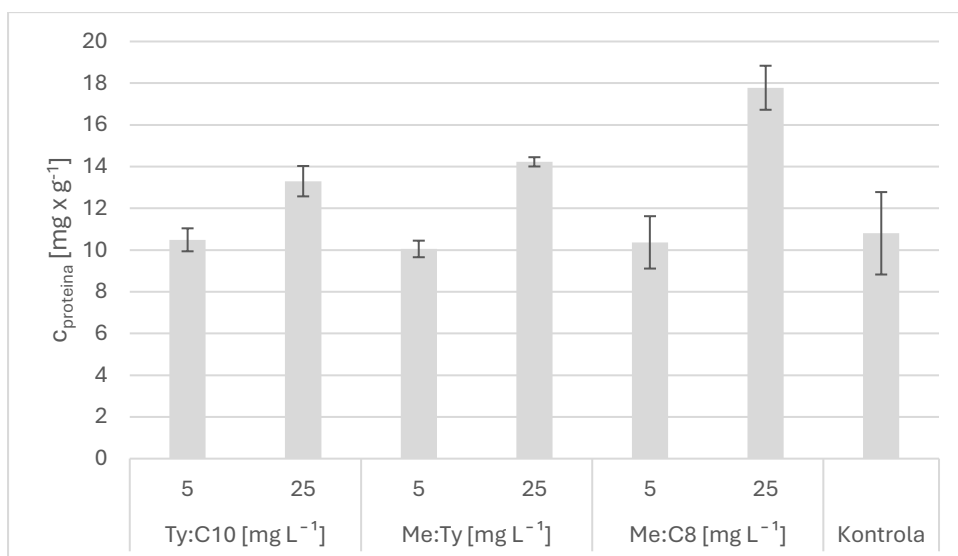
Osim ovih faktora rasta, utjecaj hDES-ova na biljne organizme procijenjen je i ispitivanjem koncentracije antioksidativnih enzima odgovornih za zaštitu biljke od oksidativnog stresa koji se javlja pri povećanoj razini okolišnih stresora. Antioksidativni mehanizmi bazalni su fiziološki odgovor biljaka u kontaktu sa ksenobioticima te rezultiraju modifikacijom enzimske aktivnosti enzima uključenih u te mehanizme.

Antioksidativni enzimi čija je aktivnost određivana su askorbat-peroksidaza (APOX), katalaza (CAT), peroksidaza (POD) i superoksid dismutaza (SOD). Ti enzimi odgovorni su za održavanje homeostaze redukcijom koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, *reactive oxygen species*). ROS, kao proizvodi staničnog metabolizma služe za staničnu signalizaciju, zbog čega kontroliraju biološke procese poput upale, proliferacije i stanične smrti, a kad dođe do poremećaja zbog prekomjerne proizvodnje ili pak pogreške u antioksidativnom sistemu, dolazi do njihovog nakupljanja što može dovesti do oštećenja stanica, zbog čega je izrazito bitno da se njihov suvišak ukloni pomoću antioksidativnih enzima (Almeida i sur., 2022).

U mnogim se radovima spominje povećana aktivnost antioksidativnih enzima u procesima borbe protiv oksidativnog stresa, a takav se povećani antioksidativni kapacitet povezuje sa povećanom tolerancijom biljaka na okolišne stresore (Sharma i sur., 2012).

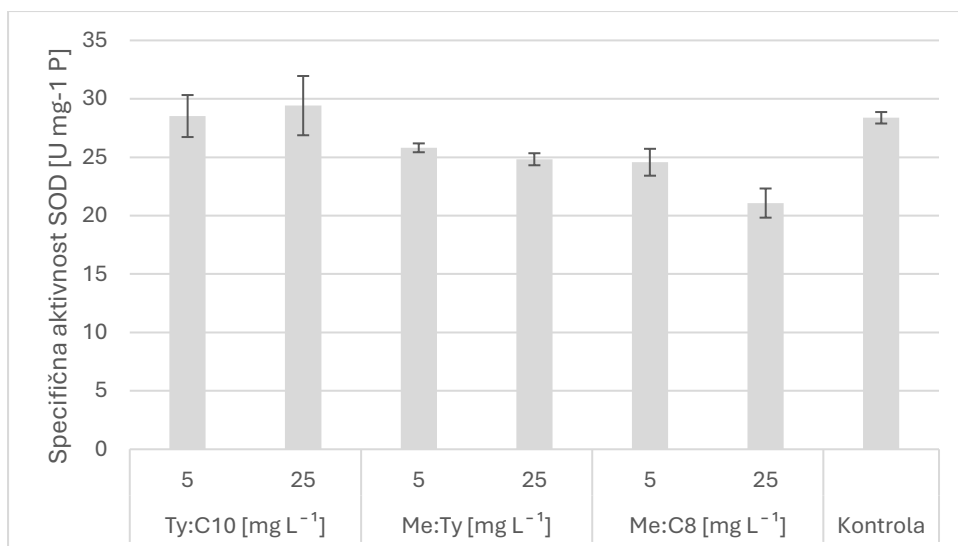
Aktivnost antioksidativnih enzima određena je u uzorcima dobivenim homogeniziranjem biljnog materijala, konkretno, izdanaka pšenice, u tarioniku na ledu. Nakon 7 dana provođenja eksperimenta, prikupljeni biljni materijal kod koncentracija od 50 i 500 mg L<sup>-1</sup> nije bio dovoljan za ekstrakciju proteina, stoga ti uzorci nisu korišteni u određivanju aktivnosti antioksidacijskih enzima. Za ekstrakciju korišten je polivinil-polipirrolidon i hladni pufer za ekstrakciju proteina. Homogenizirani materijal centrifugiran je, te je dobiveni supernatant korišten za mjerenja aktivnosti enzima.

S obzirom da se aktivnost antioksidativnih enzima iskazuje u jedinicama aktivnosti po miligramu ukupnih proteina, najprije su određeni ukupni proteini metodom po Bradfordu. Mase dobivene iz baždarnog dijagrama nakon spektrofotometrijskog mjerenja uzoraka s Bradfordovim reagensom pri 532 nm, prikazane su na slici 7. Promatrajući koncentracije proteina u uzorcima s 5 mg L<sup>-1</sup> hDES, nije zamijećena bitna razlika u odnosu na kontrolu. Koncentracije proteina u tim uzorcima variraju između 10,05 i 10,8 mg proteina po gramu suhe biljne tvari. Nadalje, vidljivo je kako je u uzorcima s 25 mg L<sup>-1</sup> svakog od dodanih hDES povećana koncentracija ukupnih proteina u odnosu na kontrolu i kreće se između 13,3 i 17,8 mg po gramu suhe biljne tvari, što ukazuje na moguće povećanje antioksidativnih enzima, što je pokazano korištenjem metoda u nastavku. Kao što je očekivano, pronađene su razlike u aktivnosti antioksidativnih enzima s obzirom na različite koncentracije hDES-ova.



**Slika 7.** Udio ukupnih proteina u izdancima pšenice nakon uzgoja s dodatkom različitih koncentracija hDES. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 3) Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadna kiselina, C8 – oktanska kiselina

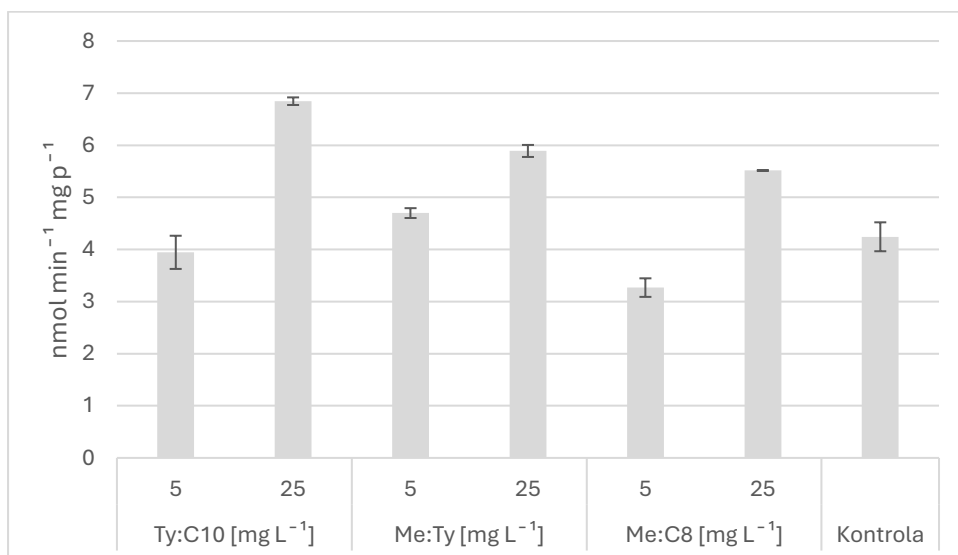
Superoksid dismutaza (SOD) djeluje tako što balansira koncentraciju superoksidnih radikala unutar i izvan stanica. On predstavlja prvu liniju obrane stanice protiv suviška ROS tako što pretvara  $O_2^-$  u  $H_2O_2$ , koji dalje ulazi u reakcije katalizirane drugim enzimima. Izmjerene aktivnosti SOD enzima vidljive su na slici 8. U odnosu na kontrolu, statistički značajno ( $p < 0.05$ ) smanjenje aktivnosti superoksid-dismutaze vidljivo je samo kod uzoraka tretiranih sa Me:C8 u koncentraciji od  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , dok se ostali rezultati statistički ne razlikuju od kontrole. Radošević i suradnici su 2015. godine zabilježili pozitivnu korelaciju aktivnosti SOD enzima i koncentracije DES-a Ch:OA do koncentracije od  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , nakon čega se bilježi pad aktivnosti tog enzima, dok su Rodrigues i sur. (2021a) uočili pad aktivnosti SOD enzima s porastom koncentracije DES-ova na bazi betaina. Usporedimo li rezultate i s istraživanjima na bazi ionskih kapljevina kao prethodnika DES-ova u dizajniranju zelenih otapala, smanjenje aktivnosti SOD-a s porastom koncentracije tretirane tvari, kao što je u ovom slučaju s Me:C8, zabilježili su Chen i sur. (2018), ispitivajući učinak ionskih kapljevina na bazi imidazolija na pšenici.



**Slika 8.** Antioksidativna aktivnost superoksid-dismutaze u uzorcima tretiranim s ispitivanim hDES, prikazana je kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 3)

Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadna kiselina, C8 – oktanska kiselina, SOD – superoksid dismutaza

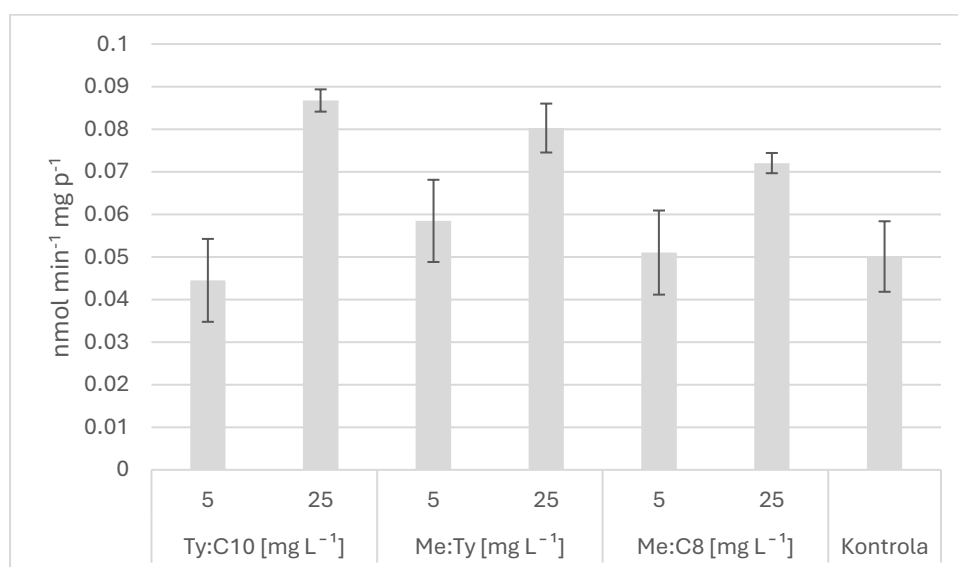
Na slici 9. prikazana je aktivnost askorbat peroksidaze (APOX) u ekstraktima izdanaka pšenice tretiranih različitim koncentracijama hDES-ova. U odnosu na kontrolu vidljivo je statistički značajno ( $p < 0.05$ ) povećanje aktivnosti enzima APOX kod uzoraka zalijevanih s Ty:C10 i Me:Ty u koncentraciji od 25 mg L<sup>-1</sup>. Povećanje aktivnosti enzima koje je u korelaciji s porastom koncentracije DES-a bilježe i Radošević i sur. (2015), kad su ispitali utjecaj Ch:OA na pšenicu. S druge strane, Rodrigues i sur. (2021a) bilježe porast samo kod DES-a B:PG u koncentraciji 20000 mg L<sup>-1</sup>, dok se drugi rezultati statistički ne razlikuju od kontrole.



**Slika 9.** Antioksidativna aktivnost askorbat-peroksidaze u uzorcima tretiranim s ispitivanim hDES, prikazana je kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 3)

Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadna kiselina, C8 – oktanska kiselina

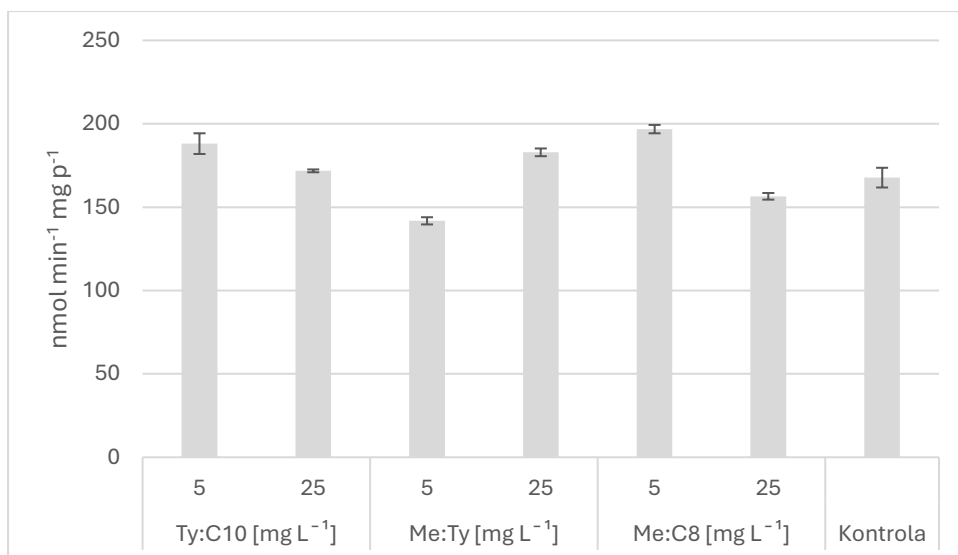
Katalaza je enzim koji katalizira reakciju razlaganja vodikovog peroksida na vodu i molekularni kisik. Vrijednosti aktivnosti enzima katalaze prikazane su na slici 10. Primijećen je statistički značajan ( $p < 0,05$ ) porast aktivnosti katalaze pri uzorcima tretiranim s hDES-ovima u koncentraciji od  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , dok se pri uzorcima tretiranim s manjom koncentracijom hDES-ova rezultati statistički ne razlikuju od kontrole. U radu Radošević i sur. (2015), povećanjem koncentracije hidrofilnog DES-a Ch:Cl, CAT aktivnost se smanjivala. Isti trend bilježe i Rodrigues i sur. (2021a). u istraživanjima s DES-ovima na bazi betaina. Njihovi su rezultatu u opreci s našima što upućuje na različit mehanizam odgovora obrambenog sustava pšenice na različite DES-ove.



**Slika 10.** Antioksidativna aktivnost katalaze u uzorcima tretiranim s ispitivanim hDES, prikazana je kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D ( $n = 3$ )  
 Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadaska kiselina, C8 – oktanska kiselina

Nespecifične peroksidaze, kao što i ime govori, slabo su supstratno specifične pa se njihova aktivnost mjeri uz dodatak gvajakola kao elektron donora. Samo kod uzoraka biljnog materijala tretiranog s Me:Ty primijećen je recipročan porast aktivnosti peroksidaze sa porastom koncentracije hDES-a, dok je kod uzoraka tretiranih drugim hDES-ovima trend obrnut. Rezultati mjerenja prikazani su na slici 11. Najveća aktivnost ovog enzima prisutna je kod uzoraka tretiranih s Me:C8 u koncentraciji  $5 \text{ mg L}^{-1}$  pri čemu je uočeno statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu ( $p < 0,05$ ). Nasuprot ovim rezultatima, Rodrigues i sur. (2021a) su primijetili pad aktivnosti peroksidaze u uzorcima tretiranim s DES-ovima na bazi betaina, koji se ublažavao s porastom koncentracije pojedinih DES-ova, dok su Radošević i sur. (2015) zamijetili rast aktivnosti nespecifičnih peroksidaza do koncentracije od  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  Ch:OA, nakon čega se aktivnost smanjivala s daljnjim povećanjem koncentracije DES-a.





**Slika 11.** Antioksidativna aktivnost peroksidaze u uzorcima tretiranim s ispitivanim hDES, prikazana je kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 3)

Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadaska kiselina, C8 – oktanska kiselina

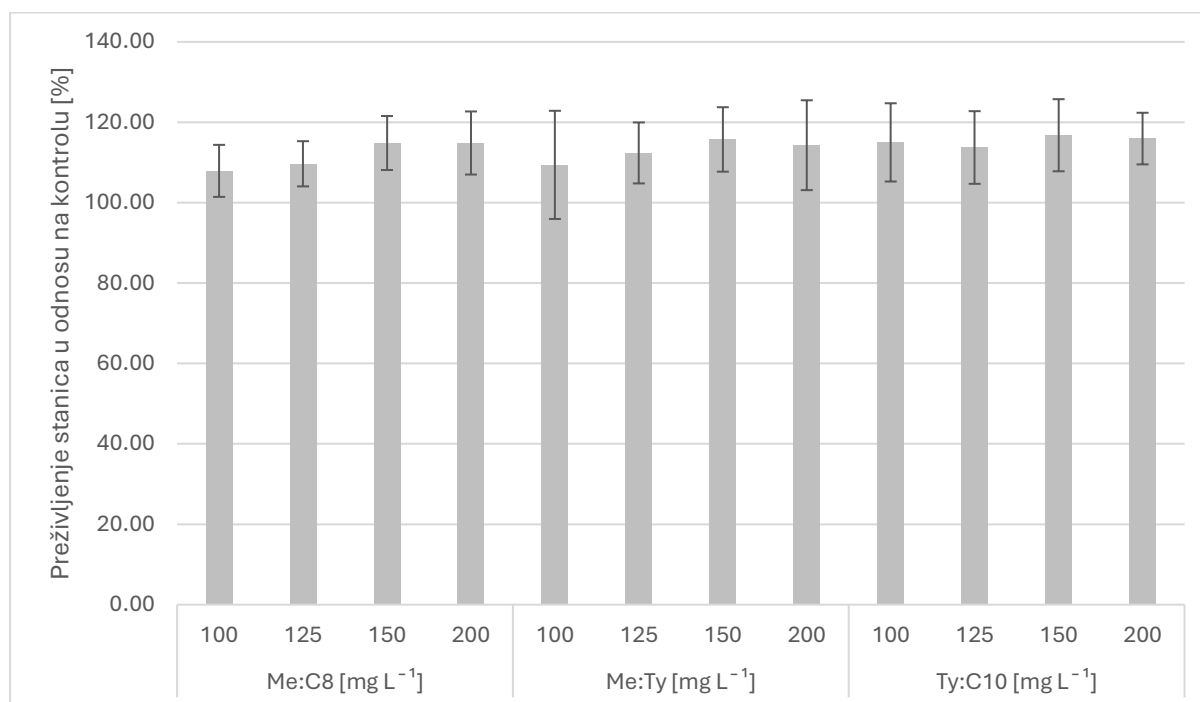
Ukratko, prepoznata je povećana aktivnost antioksidativnih enzima kao rezultat oksidativnog stresa uzrokovanog tretmanom niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Povećanje koncentracije hDES-a u tretmanu uglavnom rezultira povećanom aktivnosti antioksidativnih enzima, što se slaže s prijašnjim istraživanjima napravljenim sa hidrofilnim DES-ovima (Rodrigues i sur., 2021b). Askorbat peroksidaza i katalaza imaju povećanu aktivnost u svim uzorcima tretiranim s 25 mg L<sup>-1</sup> hDES-a, nespecifične peroksidaze bilježe pad aktivnosti kod uzoraka tretiranim Ty:C10 i Me:C8, dok se aktivnost superoksid dismutaze ne mijenja s porastom koncentracije za Ty:C10, dok u uzorcima tretiranim sa druga dva hDES-a aktivnost pada. Ovi rezultati podudaraju se s premisom (Rodrigues i sur., 2021b) koja nalaže obrambeni mehanizmi pšenice rezultiraju različitim antioksidativnim i odgovorima redox homeostaze na oksidativni stres, što ovisi o ispitivanom (h)DES-u, njegovoj koncentraciji te vrsti radikala koje pojedini tretman inducira.

## 4.2. CITOTOKSIČNOST

Citotoksičnost hDES-ova Me:C8, Me:Ty i Ty:C10 ispitana je na 2 stanične linije, HeLa kultura stanica raka grlića maternice kao predstavnik tumorske stanične linije i HaCaT kultura stanica humanih keratinocita kao predstavnik ne-tumorske stanične linije. Stanične linije su nakon jednodnevne inkubacije tretirane s hDES u 4 koncentracije - 100, 125, 150 i 200 mg L<sup>-1</sup>, što s obzirom na volumen medija sa stanicama od 100  $\mu$ L, odgovara dodatku 5, 6,25, 7,5 i 10  $\mu$ L prethodno pripremljene sterilno profiltrirane matične otopine koncentracije 2 mg mL<sup>-1</sup>. Nakon 72 sata ispitana je vijabilnost uzgojenih stanica MTS metodom. Eksperiment je ponovljen dva puta, pri čemu je svaka od koncentracija ispitana u 3 paralele, te su za prikaz

rezultata izračunate srednje vrijednosti postotka preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolu koju čine netretirane stanice.

U ispitivanom rasponu koncentracija, hDES-ovi nisu pokazali citotoksična svojstva ni na jednu od testiranih staničnih linija, naprotiv, vidljiv je trend porasta preživljenja stanica u odnosu na kontrolu s porastom koncentracije hDES (slike 12 i 13), što je vjerojatno rezultat varijacija u metabolizmu ili pak malih pogrešaka u pipetiranju, što pokazuje i standardna devijacija.

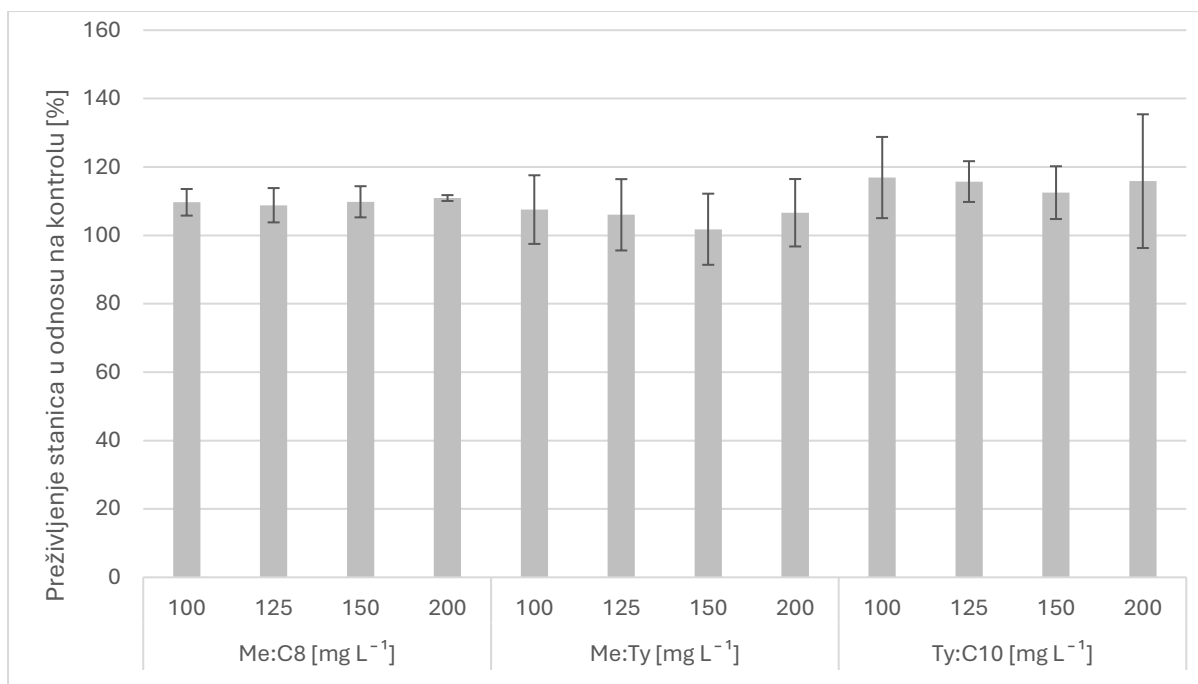


**Slika 12.** Postotak preživljenja HeLa stanica tretiranih hDES-ovima, prikazana je kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 6)

Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadna kiselina, C8 – oktanska kiselina

Radošević i sur. (2018) proveli su eksperimente u kojima su HeLa stanice tretirali s DES-ovima na bazi ChCl, pri čemu je najveći inhibitoryni utjecaj imao DES Ch:Ox. EC50 je za taj spoj iznosio  $330.9 \pm 29,75$  mg L<sup>-1</sup>, dok su svi ostali ispitani DES-ovi imali EC50 preko 2000 mg L<sup>-1</sup> za ovu staničnu liniju.

Macário i sur. (2019) su ispitali utjecaj DES-ova s kolin kloridom, tetrametilamonijevim kloridom (N<sub>1111</sub>) i tetrabutilamonijevim kloridom (N<sub>4444</sub>) na stanične linije HaCaT i MNT-1 u rasponu koncentracija od 0 do 500 mg L<sup>-1</sup>. DES-ovi na bazi N<sub>4444</sub> pokazali su toksični efekt na HaCaT stanice s EC50 vrijednostima ispod 100 mg L<sup>-1</sup> za DES-ove s etilen glikolom, 1-propanolom te ureom, te blago iznad 100 mg L<sup>-1</sup> za one u kojima je donor vodikove veze butanska ili heksanska kiselina. U odnosu na te rezultate, može se tvrditi da hDES-ovi ispitani u ovom radu pokazuju manje citotoksične učinke na HaCaT staničnu liniju.



**Slika 13.** Postotak preživljenja HaCaT stanica tretiranih hDES-ovima, prikazana je kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n = 6)

Me – mentol, Ty – timol, C10 – dekadna kiselina, C8 – oktanska kiselina, SOD – superoksid dismutaza

Citotoksičnost DES-ova u literaturi je ispitana na različitim staničnim linijama no literatura vezana uz hDES-ove je još uvijek limitirana. Viñas-Ospino i sur. (2024) izlažu rezultate testova tretmana hDES-ovima C8:Pro, Me:Eu i C12:C8 i ekstraktima narančine kore s tim hDES-ovima kao otapalom na Caco-2 stanice, pri čemu se EC<sub>50</sub> vrijednosti citotoksičnosti ekstrakata određene MTS testom kreću oko 20 mg L<sup>-1</sup>. U istom istraživanju ispituju i antiproliferativna svojstva tih hDES-ova na HT29 staničnoj liniji, te zaključuju kako ekstrakt s Me:Eu ima najveću selektivnost prema stanicama tumora, što je u skladu sa zaključcima Cao i Su (2021) koji navode da hDES-ovi na bazi mentola imaju antiproliferativna svojstva bez da utječu na normalne stanice. Popović i sur. (2023) ispitali su citotoksičnost 12 DES-ova na bazi kolin klorida na HT-29, Caco-2, MCF-7 i MRC-5 stanične linije, te su EC<sub>50</sub> vrijednosti na svim testiranim sustavima iznosile preko 2000 mg L<sup>-1</sup>, što je izvan raspona koncentracija testiranih u ovom radu, isto kao i u istraživanju Mbous i sur. (2017) koji su ispitali utjecaj DES-ova ChCl:Fru, ChCl:Glu te DAC:TEG na HeLa S3, AGS, MCF-7 i WRL68 stanične linije te su dobili EC<sub>50</sub> vrijednosti iznad 5000 mg L<sup>-1</sup>. Hayyan i sur. (2015) ispitali su citotoksičnost DES-ova na bazi amonijaka na OKF6, MCF-7, PC3, A375, HepG2, HT29 i H413 stanične linije te su ti DES-ovi pokazali veću citotoksičnost u odnosu na hDES-ove iz ovog rada s EC<sub>50</sub> vrijednostima ispod 100 mg L<sup>-1</sup> za sve testirane stanične linije.

S obzirom na veliku hidrofobnost ispitivanih spojeva, hDES-ovi nisu topljivi u staničnom mediju te iziskuju dodatak organskih otapala kako bi došlo do homogenizacije eksperimentalnog

sustava. Homogenost eksperimentalnog sustava izrazito je bitna, jer omogućava stalnu i jednaku izloženost stanica tretmanu i rezultira uniformnim rezultatima toksikoloških studija.

Kao što je bio slučaj kod ispitivanja fitotoksičnosti, hDES-ovi su i za tretman stanica najprije otopljeni u etanolu kod izrade razrjeđenja potrebnih za tretmane stanica. Preliminarni eksperimenti rađeni su većom koncentracijom etanola (5 i 10 % v/v), što je dovelo do drastičnog smanjenja vijabilnosti stanica (rezultati nisu prikazani). Za potrebe ovog rada, koncentracija etanola u razrjeđenjima hDES-ova smanjena je na 1 % EtOH na ukupni volumen medija. Taj je volumen EtOH uspješno korišten za homogenizaciju 1 i 2 mg mL<sup>-1</sup> hDES-a. Kako bi se ispitala citotoksičnost većih koncentracija hDES-ova, potrebno je pronaći alternativni način za homogenizaciju istog u vodenom mediju. Mapa i sur. (2020) proveli su set eksperimenata kako bi utvrdili način za homogenizaciju 3-MCPD mono- i di-estera u vodenom staničnom mediju, sa što manjim utjecajem otapala na same stance. Testirali su etanol, 2-propanol, acetonitril i dimetilsulfoksid u koncentracijama od 0 do 10 % (v/v) staničnog medija u kojem su uzgajali HK-2 stanične linije keratinocita. Iz njihovog istraživanja proizlazi kako su sva testirana otapala pogodna za dodavanje u medij za uzgoj stanica u koncentraciji od 1 % (v/v). U koncentraciji iznad 1 %, samo acetonitril i DMSO omogućuju da stanice odražavaju vijabilnost iznad 50 %, no s obzirom na veliku hlapivost acetonitrila, DMSO se odabire kao najbolja varijanta za korištenje u staničnim kulturama. Mapa i sur. (2020) predlažu da se standardni protokol u kojem se hidrofobna tvar otapa najprije u otapalu, a zatim u staničnom mediju proširi na tri koraka koji osiguravaju bolju topljivost hidrofobnih komponenti. Prvi korak uključuje otapanje tvari u čistom DMSO-u do 10mM otopine, te zagrijavanje na 37 °C nakon čega se smjesa 10x razrjeđuje pomoću FBS-a, prethodno zagrijanog na 50 °C. Zadnji korak njihovog protokola je deseterostruko razrjeđenje u prethodno zagrijanom staničnom mediju do koncentracije od 100 μM. S druge strane, poznato je da DMSO toksičan te se radni na njegovoj zamjeni drugim otapalima, a za tu svrhu predlažu se upravo i DES-ovi, no na tom je području potrebno još istraživanja (Šarac, 2023).

Iako su rezultati pokazali da u ispitivanom rasponu koncentracija testirani hDES-ovi ne pokazuju citotoksična svojstva, njihova netoksičnost mora se uzimati s oprezom. Zbog malih ispitanih koncentracija, nije bilo moguće ekstrapolirati EC50 vrijednost za navedene spojeve, dok kod viših koncentracija dolazi do nehomogenosti eksperimentalnog sustava zbog netopljivosti hDES-ova u vodenom staničnom mediju. Upravo zbog toga potrebno je osmisliti alternativnu metodu ispitivanja toksičnosti hDES-ova koja bi omogućila ispitivanje njihove veće koncentracije.

## 5. ZAKLJUČCI

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem proizlazi:

1. Testirani hDES-ovi pokazali su fitotoksični učinak na sjeme obične pšenice (*Aestivum tirticum sp.*) koji raste s porastom koncentracije hDES-a korištenog za tretman.
2. Najveću fitotoksičnost pokazao je Me:Ty (1:1), s EC50 31,64 mg L<sup>-1</sup>.
3. Korišteni hDES-ovi uzrokovali su povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima askorbat peroksidaze i katalaze s povećanjem koncentracije hDES-ova, dok je promjena aktivnosti nespecifičnih peroksidaza i superoksid dismutaze osim o koncentraciji ovisila i o sastavu hDES-a.
4. Ispitivani hDES-ovi nisu pokazali citotoksične učinke na HeLa i HaCaT stanične linije pri testiranim koncentracijama od 100, 125, 150 i 200 mg L<sup>-1</sup>.
5. Potrebno je osmisliti alternativnu metodu ispitivanja toksičnosti hDES-ova koja bi omogućila ispitivanje njihove veće koncentracije.

## 6. LITERATURA

Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Munro H.L., Rasheed R.K., Tambyrajah V. (2001) Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem. Commun.*;19:2010–2011. <https://doi.org/10.1039/b106357j>

Ahmadi R, Hemmateenejad B, Safavi A, Shojaeifard Z, Mohabbati M, Firuzi O (2018) Assessment of cytotoxicity of choline chloride-based natural deep eutectic solvents against human HEK-293 cells: a QSAR analysis, *Chemosphere*. 209 831–838.

Anastas PT and WJC (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, Oxford.

Aslantürk ÖS (2018) *In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*. U: Larramendy M, Soloneski S (ured.) *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTechOpen, London.

Boelsma E, Verhoeven MCH, Ponc M (1999) Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *J. Invest. Dermatol.* 112, 489–498. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00545.x>

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J Cell Biol.* 106(3):761-71. doi: 10.1083/jcb.106.3.761.

Bubalo MC, Panić M, Radošević K, Redovniković IR (2016) Metode priprave eutektičkih otopala. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 11 (3-4), 164-168. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/177251>

Cao J, Su E (2021) Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. *J Clean Prod* 314, 127965. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127965>

Çelik TA (2018) *Introductory Chapter: Cytotoxicity*. U:Çelik TA (ured.) *Cytotoxicity*. InTechOpen, London.

Chen Z, Zhou Q, Guan W, Wang J, Li Y, Yu N, i sur. (2018) Effects of imidazolium-based ionic liquids with different anions on wheat seedlings. *Chemosphere* 194, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.145>

da Costa WA, de França VF, da Silva Souza LS, de Andrade ASA, de Araújo DAM, Moreira EDT, i sur. (2023) Physical–chemical and ecotoxic evaluation of different deep eutectic solvents for green analytical applications. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 70701–70712. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27398-z>

Devi M, Moral R, Thakuria S, Mitra A, Paul S (2023) Hydrophobic Deep Eutectic Solvents as Greener Substitutes for Conventional Extraction Media: Examples and Techniques. *ACS Omega.* 8:9702–9728.

EPPO (2014) PP 1/135 (4) Phytotoxicity Assessment. EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin, 44: 265-273.

Frattini A, Fabbri M, Valli R, De Paoli E, Montalbano G, Gribaldo L, i sur. (2015) High variability of genomic instability and gene expression profiling in different HeLa clones. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep15377>

Gull A, Lone AA, Wani NUI (2019) Biotic and abiotic stresses in plants. Abiotic and biotic stress in plants. U: de Oliveira A (ured.), IntechOpen, London, str. 1 19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85832>

Häckl K, Kunz W (2018) Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus Chimie* 21, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.010>

Hayyan M, Hashim MA, Al-Saadi MA, Hayyan A, AlNashef IM, Mirghani MES (2013) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* 93, 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.013>

Hayyan M, Looi CY, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA (2015) In Vitro and in Vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117934>

Hayyan M, Mbous YP, Looi CY, Wong WF, Hayyan A, Salleh Z, Mohd-Ali O (2016) Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile, SpringerPlus 5, 913. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2575-9>

Jitäreanu A, Caba I-C, Trifan A, Pădureanu S, Agoroaei L. (2019) Triticum aestivum Assay - A Useful Tool for Environmental Monitoring and Toxicity Assessment. *Not. Bot. Horti Agrobi,* 47, 1005-1018.

Korch C, Varella-Garcia M (2018) Tackling the Human Cell Line and Tissue Misidentification Problem Is Needed for Reproducible Biomedical Research. *Advances in Molecular Pathology* 1, 209-228.e36. <https://doi.org/10.1016/j.yamp.2018.07.003>

Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H (2017) Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In: Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Elsevier, p 271–297.

Logosbio (2024) What is a Hemocytometer and How It Was Replaced by the Automated Cell Counter, 3.6.2024. Logosbio – Logos Biosystems, <https://logosbio.com/what-is-a-hemocytometer-and-how-it-was-replaced-by-the-automated-cell-counter/>. Pristupljeno 15.lipnja.2024.

Lomba L, Ribate MP, Sangüesa E, Concha J, Garralaga M<sup>a</sup>P, Errazquin D, García CB, Giner B. (2021) Deep Eutectic Solvents: Are They Safe? *Appl Sci.* 11(21):10061. <https://doi.org/10.3390/app112110061>

Macário IPE, Oliveira H, Menezes AC, Ventura SPM, Pereira JL, Gonçalves AMM i sur. (2019) Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39910-y>

Mapa MST, Araujo M, Zhao Y, Flynn T, Sprando J, Wiesenfeld P i sur. (2020) A method to dissolve 3-MCPD mono- and di-esters in aqueous cell culture media. *MethodsX* 7. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.100774>

Martínez GM, Townley GG, Martínez-Espinosa RM (2022) Controversy on the toxic nature of deep eutectic solvents and their potential contribution to environmental pollution. *Heliyon* 24;8(12):e12567. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12567

Martins R, Barbosa A, Advinha B, Sales H, Pontes R, Nunes J (2023) Green Extraction Techniques of Bioactive Compounds: A State-of-the-Art Review. *Processes* 11(8) 2255; <https://doi.org/10.3390/pr11082255>

Mbous YP, Hayyan M, Wong WF, Looi CY, Hashim MA (2017) Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/srep41257>

Negi T, Kumar A, Sharma SK, Rawat N, Saini D, Sirohi R i sur. (2024) Deep eutectic solvents: Preparation, properties, and food applications. *Heliyon* 10 (7). doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e28784



Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annu Rev Plant Biol* 49, 249–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>

Nyman E, Lindgren I, Lövfors W, Cervin I, Lundengård K, Sjöström TA i sur. (2015) Mathematical modeling improves EC50 estimations from classical dose-response curves. *FEBS Journal* 282, 951–962. <https://doi.org/10.1111/febs.13194>

Passino DRM, Smith SB (1987) Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in great lakes fish. *Environ Toxicol Chem* 6, 901–907. <https://doi.org/10.1002/etc.5620061111>

Perna FM, Vitale P, Capriati V (2020) Deep eutectic solvents and their applications as green solvents. *Curr Opin Green Sustain Chem* 21, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.004>

Plotka-Wasyłka J, de la Guardia M, Andruch V, Vilková M (2020) Deep eutectic solvents vs ionic liquids: Similarities and differences. *Microchemical Journal* 159. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105539>.

Popović BM, Gligorijević N, Arandžević S, Macedo AC, Jurić T, Uka D i sur. (2023) Cytotoxicity profiling of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *RSC Adv* 13, 3520–3527. <https://doi.org/10.1039/d2ra07488e>

Šarac S (2023) Potencijal niskotemperaturnih eutektičkih otapala za zamjenu dimetilsulfoksida. (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Radošević K, Čanak I, Panić M, Markov K, Bubalo MC, Frece J i sur. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ Sci and Pollut R* 25, 14188–14196. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>

Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Slivac I, Gaurina Srček V, Radojčić Redovniković I (2016a) Green technology meets ecotoxicology. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 8, 120–128. <https://doi.org/10.17508/CJFST.2016.8.2.03>

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

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*. 70(9-10), 551-562. <https://doi.org/10.15255/kui.2020.074>

Riss T, Niles A, Moravec R, Karassina N, Vidugiriene J (2019) Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. U:Markossian S, Grossman A, Arkin M i sur.(ured.) Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences

Rodrigues LA, Cardeira M, Leonardo IC, Gaspar FB, Radojčić Redovniković I, Duarte ARC i sur. (2021a) Deep eutectic systems from betaine and polyols – Physicochemical and toxicological properties. *J Mol Liq* 335. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116201>

Rodrigues LA, Radojčić Redovniković I, Duarte ARC, Matias AA, Paiva A (2021b) Low-Phytotoxic Deep Eutectic Systems as Alternative Extraction Media for the Recovery of Chitin from Brown Crab Shells. *ACS Omega* 6, 28729–28741. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03402>

Saleh HE-DM, Koller M (2018) Introductory Chapter: Principles of Green Chemistry. U:Saleh HE-DM, Koller M (ured.) Green Chemistry. InTechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71191>

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot* 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Singh A, Raju R, Mrad M, Reddell P, Münch G (2020) The reciprocal EC50 value as a convenient measure of the potency of a compound in bioactivity-guided purification of natural products. *Fitoterapia* 143, 104598. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104598>

van Osch DJGP, Zubeir LF, van den Bruinhorst A, Rocha MAA, Kroon MC (2015) Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chem.* 17-9, 4518-4521. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/C5GC01451D>,

van Osch D, Dietz CHJT, van Spronsen J, Kroon MC, Gallucci F, van Sint Annaland M i sur. (2019) *ACS Sustain Chem & Eng* 7 (3), 2933-2942. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03520>

Venkidasamy B, Karthikeyan M, Ramalingam S (2019) Methods/Protocols for Determination of Oxidative Stress in Crop Plants. U: Hasanuzzaman M, Fotopoulos V,

Nahar K, Fujita M (ured.) Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms. John Wiley , Sons Ltd., New Jersey, SAD.

Viñas-Ospino A, Sá-Nogueira I, Duarte AR, López-Malo D, Esteve MJ, Frígola A, i sur. (2024) Exploring the biological properties and bioaccessibility of orange peel extracts using deep eutectic systems. *Food Biosci* 61, 104684. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104684>

Wen Q, Chen JX, Tang YL, Wang J, Yang Z (2015) Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere* 132, 63–69.

Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Wong WF (2021) Hydrophobic deep eutectic solvents: Current progress and future directions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 97:142–162. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.03.011>

Zhang Q, Vigier K, Royer S, Jérôme F (2012) Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev.* 41. 7108-46. 10.1039/c2cs35178a.

Zhao, BY; Xu P; Yang FX; Wu H; Zong MH; Lou WY (2015) Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 3, 2746–2755.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Martina Železnjak 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