Priprava ekstrakata komine grožđa pomoću eutektičnih otapala, izolacija antocijana te njihova in vitro biološka aktivnost

Panić, Manuela

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:259586

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2016.

Manuela Panić
672/BPI

PRIPRAVA EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA POMOĆU EUTEKTIČNIH OTAPALA, IZOLACIJA ANTOCIJANA TE NJIHOVA *IN VITRO* BIOLOŠKA AKTIVNOST

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Kristine Radošević.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević što me je uvela u svijet ionskih tekućina i eutektičnih otapala. Hvala joj na vodstvu, uloženom trudu i strpljivosti, svim stručnim savjetima, ali i onima najvažnijima – životnima. Hvala joj što me je znala zaustaviti i preusmjeriti tokom rada u laboratoriju te hvala na eksperimentalnoj pomoći. Veliko hvala i izv.prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković na svim stručnim savjetima i novim idejama. Hvala joj što me je zajedno s mentoricom „natjerala" da zavolim područje rada. Hvala im na nesebičnoj pomoći i uloženom vremenu. Hvala izv.prof.dr.sc. Višnji Gaurini Srček što me je zajedno s mentoricom uvela u svijet ionskih tekućina i eutektičnih otapala i doc.dr.sc. Igoru Slivcu na ugodnoj radnoj atmosferi prilikom izrade ovog rada.

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

PRIPRAVA EKSTRAKATA KOMINE GROŽĐA POMOĆU EUTEKTIČNIH OTAPALA, IZOLACIJA ANTOCIJANA TE NJIHOVA *IN VITRO* BIOLOŠKA AKTIVNOST

Manuela Panić, 672/BPI

Sažetak: Eutektična otapala (DES), kao nova zelena otapala, posljednjih se godina istražuju kao alternativa za zelenu ekstrakciju i separaciju antocijana iz komine grožđa. U ovom radu pripremljeno je 5 različitih DES-ova s ciljem pronalaženja najboljeg otapala za ekstrakciju antocijana. Najveći učinak ekstrakcije postignut je s eutektičnim otapalom kolin klorid:prolin:jabučna kiselina. Iz pripravljenih ekstrakata antocijani su izolirani na makroporoznoj smoli Amberlite XAD-16 i eluirani 96%-tnim etanolom. Učinak etanolnih eluata ispitan je u *in vitro* uvjetima na tri stanične linije (HeLa, MCF-7 i HEK293T), a najizraženiji citotoksični učinak je vidljiv kod etanolnog eluata betain:jabučna kiselina. Određen je i antioksidacijski kapacitet etanolnih eluata i najvišu vrijednost ima etanolni eluat betain:jabučna kiselina. Razvijen postupak ekstrakcije i izolacije na makroporoznoj smoli pokazao se kao alternativna i zelena metoda za ekstrakciju i koncentriranje antocijana iz komine grožđa.

Ključne riječi: eutektična otapala, zelena ekstrakcija, antocijani, makroporozna smola, *in vitro* biološka aktivnost

Rad sadrži: 49 stranica, 19 slika, 6 tablica, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc.dr.sc. Kristina Radošević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv.prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. Doc.dr.sc. Kristina Radošević
3. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić
4. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Durgo (zamjena)

Datum obrane: dan, mjesec, godina

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

PREPARATION OF GRAPE POMACE EXTRACTS BY USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS, ISOLATION OF ANTHOCYANINS AND THEIR *IN VITRO* BIOLOGICAL ACTIVITY

Manuela Panić, 672/BPI

Abstract: Deep eutectic solvents (DES), as new extraction solvents, have attracted increasing attention for the green and efficient extraction and separation of anthocyanins from grape pomace. In this study, five different DESs were prepared and observed to determine which of them possess the predominant extraction performance for anthocyanins. The best extraction efficiency was obtained with choline chloride:proline:malic acid. Anthocyanins were separated using macroporous resin Amberlite XAD-16 and were eluted with 96% ethanol. Ethanol eluents were valorised by testing their biological activity in *in vitro* assay using three cell lines (HeLa, MCF-7, and HEK293T), and the most evident toxic effect was caused by betaine:malic acid. Antioxidant activity of the ethanol eluents was also determined, and the highest value obtained for the betaine:malic acid. The developed procedures based on extraction and direct macroporous resin enrichment processes could be an alternative and environmental method for the extraction and enrichment of anthocyanins from grape pomace.

Keywords: deep eutectic solvents, green extraction, anthocyanins, macroporus resin, *in vitro* biological activity

Thesis contains: 49 pages, 19 figures, 6 tables, 58 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Kristina Radošević, Assistant professor

Reviewers:
1. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Associate professor
2. PhD. Kristina Radošević, Assistant professor
3. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor
4. PhD. Ksenija Durgo, Associate professor (substitute)

Thesis defended: day, month, year

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Zelena otapala 2
2.1.1. Eutektična otapala 3
2.1.1.1. Svojstva eutektičnih otapala 3
2.1.1.2. Toksičnost eutektičnih otapala 5
2.1.1.3. Primjena eutektičnih otapala u ekstrakcijama biološki aktivnih spojeva 7

2.2. Biološka aktivnost polifenolnih spojeva 10
2.2.1.Grožđe kao izvor biološki aktivnih tvari 10
2.2.2. Biološka aktivnost antocijana 12

2.3. Primjena *in vitro* testova citotoksičnosti 14

3. MATERIJALI I METODE 17

3.1. Materijali 17
3.1.1. Komina grožđa 17
3.1.2. Kemikalije 17
3.1.3. Eutektična otapala 18
3.1.4. Otopine i puferi 18
3.1.5. Stanične linije 19
3.1.5.1. Humane stanične linije 19
3.1.6. Oprema 20

3.2. Metode rada 20
3.2.1. Sinteza eutektičnih otapala 20
3.2.2. Priprema ekstrakata komine grožđa 21
3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana 22
3.2.4. Adsorpcija i desorpcija antocijana na smoli Amberlite XAD – 16 22
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom 24
3.2.5.1. Mjerenje ORAC vrijednosti 24
3.2.5.2. Izračun ORAC-vrijednosti 24
3.2.6. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti antocijana na HeLa, MCF-7 i HEK293T staničnim linijama 25
3.2.6.1. Uzgoj i nacjepljivanje stanica 25
3.2.6.2. Određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo 25
3.2.6.3. Određivanje biološke aktivnosti etanolnih eluata antocijana na HeLa, MCF-7 i HEK293T staničnim linijama primjenom MTS metode 26
3.2.7. Obrada rezultata 27

4. REZULTATI I RASPRAVA 28

4.1. Odabir DES-ova za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa i optimalni uvjeti ekstrakcije 29

4.2. Ukupni maseni udio antocijana u ekstraktima komine grožđa pripravljenim pomoću eutektičnih otapala 30

4.3. Adsorpcija i desorpcija antocijana na smoli Amberlite XAD-16 32

4.4. Biološka aktivnost ukupnih antocijana u etanolnim eluatima 35
4.4.1. Antioksidacijski kapacitet antocijana u etanolnim eluatima 35
4.4.2. Učinak etanolnih eluata antocijana na MCF-7, HeLa i HEK293T stanične linije 37

5. ZAKLJUČCI 43

6. LITERATURA 44

1. UVOD

Komina, kao nusproizvod prerade grožđa, sadrži visok udio polifenolnih spojeva koji su samo djelomično ekstrahirani tijekom prerade grožđa. U komini grožđa su s najvećim udjelom prisutni flavonoidi, fenolne kiseline i stilbeni. U skupinu flavonoida pripadaju antocijani, spojevi koji se povezuju s nizom različitih bioloških aktivnosti kao što su antitumorski, protuupalni i antioksidativni učinak, s poznatim i dobro opisanim mehanizmima djelovanja na ljudski organizam.

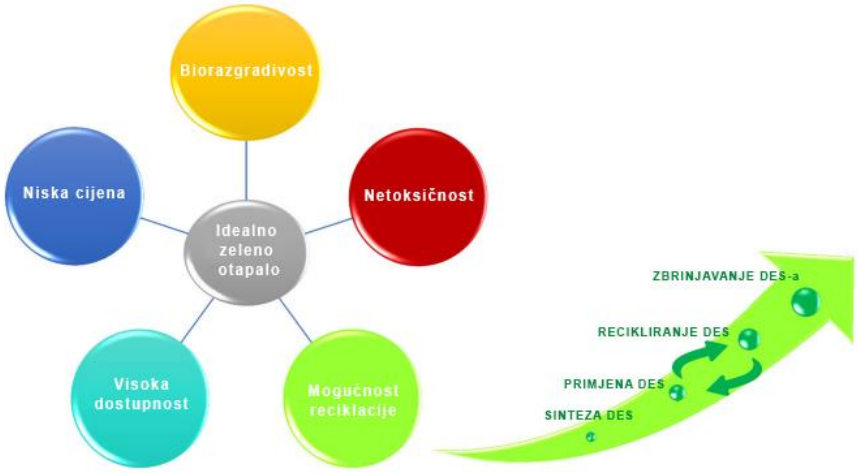
Štetan utjecaj čovjeka na okoliš potaknuo je razvoj i istraživanje alternativnih zelenih ekstrakcija kojima je osnova sinteza selektivnog otapala iz jeftinih, obnovljivih i netoksičnih supstrata. Osim boljeg ekološkog profila zelenih otapala, u odnosu na organska otapala, u tako vođenim procesima ekstrakcije smanjuje se utrošak energije, što je također jedan od zahtjeva zelene tehnologije. Kao otapalo za zelenu ekstrakciju predloženo je nekoliko tipova otapala među kojima su i eutektična otapala (DES). Eutektična otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, amida, alkohola i vitamina. Kao supstrati za sintezu DES-ova koriste se lako dostupne, jeftine, sigurne, netoksične i biorazgradive tvari, a navedene tvari povezuju se jakim vodikovim vezama. Obzirom da su DES-ovi skupina otapala baziranih na tvarima koje su sigurne za konzumaciju u ljudi, očekuje se njihova široka primjena u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Da bi eutektična otapala u potpunosti bila potvrđena kao ekološka opcija za zelene ekstrakcije potrebno je prethodno ispitati njihov ekotoksikološki profil, bez obzira na pretpostavku da su neškodljiva obzirom na sigurnost ishodnih tvari koje se koriste za njihovu sintezu.

U industrijskom smislu ekstrakcija antocijana primjenom organskih otapala je ekonomski neisplativa zbog malog stupnja reciklacije, stoga se ekstrakcija primjenom DES-a u kombinaciji s izolacijom na makroporoznim smolama razmatra kao učinkovita i za okoliš prihvatljiva metoda izolacije organskih molekula iz biljaka. Cilj rada je sinteza i odabir najboljeg od pet DES-ova za zelenu ekstrakciju antocijana iz komine grožđa, što će se pratiti spektrofotometrijski. Primjenom makroporozne smole Amberlite XAD-16 biti će izolirani antocijani iz pripremljenih ekstrakata. Nadalje, ispitat će se djelovanje izoliranih antocijana u etanolnom eluatu ispitivanjem *in vitro* biološke aktivnost na HeLa, MCF-7 i HEK293T stanicama te će se odrediti njihov antioksidacijski kapacitet primjenom ORAC metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Zelena otapala

Napredak ljudskog razvoja očituje se i u razumnom raspolaganju prirodnim resursima Zemlje pri čemu se podrazumijevaju neobnovljivi izvori kao što je nafta, ali i čista voda, zrak i dr. Sve više istraživanja usmjereno je k pronalaženju novih rješenja usmjerenih na upotrebu alternativnih izvora energije, a posebni se naglasak stavlja na održivost procesa. Zelena kemija ima sve veći značaj za održivi razvoj s ciljem smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanih tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje. Neki od principa zelene kemije su: zaštita okoliša, ekonomičnost tehnoloških procesa, dizajniranje sigurnijih kemikalija, primjena sigurnijih otapala, učinkovito korištenje energije, korištenje obnovljivih sirovina, korištenje proizvoda koji se mogu biorazgraditi itd. Smatra se da se usvajanjem navedenih načela mogu riješiti globalni ekološki problemi kao što su sve prisutnije klimatske promjene, učinkovito upravljanje energijom i raspolaganje prirodnim resursima (Kudlak i sur., 2015).



Slika 1. Kriteriji idealnog zelenog otapala i životni ciklus eutektičnog otapala (Kudlak i sur., 2015.)

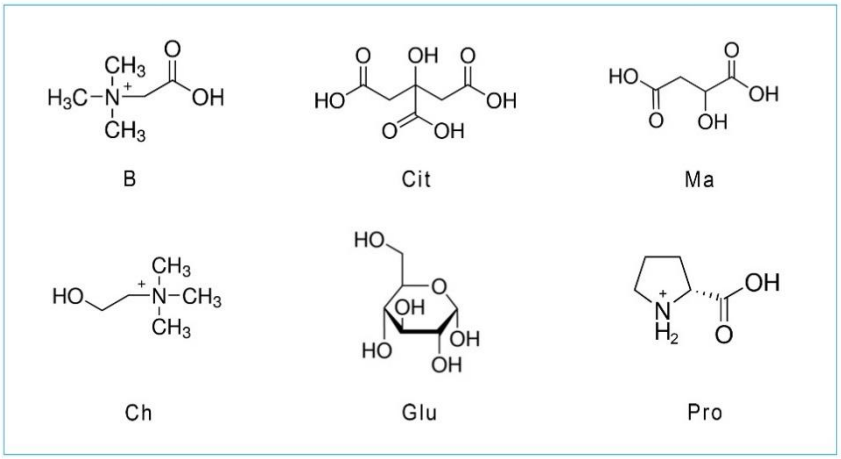
Organska otapala su najčešće korišten medij za provođenje kemijskih reakcija. Razlog tome je što otapala omogućavaju međusobni kontakt reaktanata te utječu na kemo-, regio- i stereospecifičnost reakcije. Njihova primjena nužna je i u procesima kao što su ekstrakcija, razdvajanje, pročišćavanje i sušenje produkta, ali i kod analitičkih metoda. Ta sveprisutnost organskih otapala, čija primjena ima niz nedostataka, kako za ljude koji s njima rade, tako i za

okoliš, potaknula je znanstvenike na istraživanje alternativnih otapala koja bi zadržala tehnološka svojstva organskih otapala, ali s povoljnijim učinkom za ljude i okoliš. S ciljem zamjene organskih otapala prije desetak godina krenulo se s intenzivnim istraživanjima ionskih kapljevina zbog mogućnosti dizajniranja velikog broja kapljevina različitih fizikalno–kemijskih svojstava. Prvotna očekivanja od ionskih kapljevina bila su velika, i u tehnološkom smislu su opravdana, no neki parametri kao što su: slaba biokompatibilnost, problem razgradnje i odlaganja ionskih kapljevina nakon provođenja procesa, njihova toksičnost te cijena sinteze otapala (koja je 5-20 puta veća od sinteze organskih otapala) ne uklapaju se u načela zelene kemije. Navedeni nedostaci u načelu se odnose na imidazolijeve i piridinijeve ionske kapljevine te je razvoj alternativnih otapala posljednjih godina usmjeren ka prirodnim ionskim kapljevinama i eutektičnim otapalima (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) koja su pokazala najveći potencijal u području zelene kemije (slika 1).

2.1.1. Eutektična otapala

2.1.1.1. Svojstva eutektičnih otapala

Eutektična otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, amida, alkohola i vitamina (Gorke i sur., 2010), gdje su navedene komponente povezane jakim vodikovim vezama. Strukture supstrata korištenih za sintezu eutektičnih otapala u ovom radu prikazane su na slici 2.



Slika 2. Strukture supstrata korištenih za sintezu eutektičnih otapala

Zbog sličnih fizikalno–kemijskih svojstava i velikog broja mogućih struktura eutektična otapala svrstavaju se u četvrtu generaciju ionskih kapljevina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015) iako je upitno mogu li se smatrati ionskim kapljevinama obzirom da su sastavljena od neutralnih

molekula povezanih vodikovim vezama. DES-ovi zbog delokalizacije naboja imaju svojstvo eutektičnosti tj. sniženo im je talište u odnosu na tališta zasebnih ishodnih tvari. Klasični primjer je smjesa kolin klorida (Ch) (T_t = 302°C) i uree (T_t = 133°C) u molarnom omjeru 1:2, temperatura tališta navedenog eutektičnog otapala je 12 °C (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Kudlak i sur., 2015). Temperatura tališta ovisi o udjelu nenabijenog donora vodika. Obzirom na ishodne tvari koje se koriste za sintezu eutektičnih otapala razlikujemo četiri vrste DES-ova (tablica 1).

Tablica 1. Vrste eutektičnih otapala (Kudlak i sur., 2015)

Vrsta	**Opis**	**Primjer**
Tip I	metalna sol + organska sol	ZnCl2 + kolin-klorid
Tip II	hidrat metalne soli + organska sol	CoCl2*6H2O + kolin-klorid
Tip III	organska sol + donor vodikove veze	kolin-klorid + urea
Tip IV	metalna sol + donor vodikove veze	ZnCl2 + urea

Eutektična otapala se pripremaju od lako dostupnih, jeftinih, sigurnih, netoksičnih i biorazgradivih tvari koje imaju sposobnost samoudruživanja uslijed nastalih nekovalentnih interakcija, najčešće vodikovih veza. Raznolikost DES-ova omogućena je velikim brojem mogućih kombinacija ishodnih tvari korištenih za sintezu. Razne vrste šećera i organskih kiselina mogu tvoriti eutektična otapala kao npr. jabučna s limunskom kiselinom ili glukoza s jabučnom kiselinom (Kudlak i sur., 2015). Jedna od najpopularnijih tvari koja tvori DES je Ch. Ch je jeftina, biorazgradljiva i netoksična sol koju je Vijeće Europske agencije za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) odobrilo kao prehrambeni aditiv za konzumiranje bez vremenskog ograničenja (70/524/EEC8) (EFSA, 2011). Tako se Ch, koji je kolokvijalno poznat i kao vitamin B4, koristi u velikim količinama kao aditiv u hrani za perad i kao glavni mikronutrijent za ljudsko zdravlje. Nadalje, prema OECD (engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) kriteriju i MITI-I testu, više od 93 % Ch-a razgradi se kroz 14 dana (Anonymous, 2005).

Kada su spojevi koje tvore DES primarni metaboliti (aminokiseline, organske kiseline, ugljikohidrati ili derivati kolina), takve smjese nazivaju se prirodnim eutektičkim smjesama

(engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Zbog različitih kombinacija NADES-a, mogućnosti koje se javljaju za njihovu primjenu su nebrojene.

NADES-ovi imaju veću gustoću od vode dok viskoznost ovisi o udjelu vode u sintetiziranom DES-u i temperaturi (Kudlak i sur., 2015). NADES-ovi u potpunosti ispunjavaju kriterije idealnog zelenog otapala (slika 1), jer ih karakterizira niska cijena, dostupnost, biorazgradivost, netoksičnost i mogućnost reciklacije.

Mogućnost odabira poželjnih fizikalno–kemijskih svojstava DES-a za određenu namjenu čini eutektična otapala „dizajniranim otapalima“. Prilikom sinteze DES-a može se utjecati na fizikalno-kemijska svojstva kao što su provodljivost, gustoća, točka ledišta, viskoznost i dr. Većina DES-ova ima gustoću veću od vode i sirovina od kojih su sintetizirani, a ona također ovisi o omjeru ishodnih tvari. Viskoznost većine DES-ova je veća od 0,1 Pa s. U literaturi je matematički opisana ovisnost prema kojoj se mijenja površinska napetost i viskoznost DES-ova (Tang i sur., 2015).

Opći postupak priprave DES-ova uključuje miješanje dvije (ili više) tvari u određenom omjeru uz zagrijavanje do nastanka prozirne tekućine. Omjer ishodnih tvari moguće je optimirati tako da pogoduje nastanku vodikovih veza između tih tvari. Ponekad je za uspješnost sinteze potrebno dodati određenu količinu vode, koja se kasnije lako ukloni uparavanjem. Smatra se da tijekom priprave DES-a ne nastaju nikakvi toksični i neželjeni produkti niti otpad. Nekoliko je načina određivanja održivosti procesa, a E-faktor (engl. *Environment Factor*) je jedan od najčešće i najbolje primjenjivanih. E-faktor je mjera zelenosti neke reakcije, a definiran je kao omjer proizvedenog otpada i dobivenog produkta. Što je taj faktor niži, to je proces zeleniji. U slučaju DES-ova, teoretski E-faktor iznosi 0. Također, prednost njihove sinteze je 100 %-tni prinos procesa, koji se takvim smatra zato što je DES smjesa dviju (ili više) komponenti. Osim toga, za sintezu DES-a nije potrebna nikakva reakcija pa je *ekonomija atoma* 100 % (Paiva i sur., 2014).

2.1.1.2. Toksičnost eutektičnih otapala

Eutektična otapala smatraju se netoksičnima, no, zbog njihove očekivane veće industrijske primjene njihov citotoksični i genotoksični učinak treba i nadalje istraživati. Naime, netoksičnost DES-ova *a priori* proizlazi iz činjenice da su početne tvari koje se koriste za sintezu DES-a netoksične.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da DES-ovi bazirani na Ch-u nemaju citotoksični utjecaj na bakterijske kulture, dok su DES-ovi temeljeni na fosfonijevom anionu pokazali laganu antibakterijsku aktivnost (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). Citotoksični učinak je zapažen na staničnoj kulturi larva račića (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). U navedenim istraživanjima Hayyana i sur. (2013a, 2013b) zapaženo je da je citotoksičnost DES-ova bila veća nego citotoksičnost svake tvari zasebno, što ukazuje na mogući sinergistički učinak tih tvari u DES-u. Razlog tome može biti sama kemijska priroda DES-a (nastala kao posljedica interakcije donora vodikove veze i organske soli), ali i loš prijenos kisika u kulturi stanica u hranjivoj podlozi zbog povećane viskoznosti DES-a (Hayyan i sur., 2013a; 2013b).

Citotoksičnost kolinijevih eutektičnih otapala s glicerolom, glukozom ili oksalnom kiselinom kao donorom vodika ispitana je *in vitro* u kulturi stanica (Radošević i sur., 2015). Kolin klorid:glukoza i kolin klorid:glicerol pokazali su se netoksičnima (EC_{50} > 10 mM) dok je kolin klorid:oksalna (ChOA) pokazala blagu citotoksičnost (EC_{50} vrijednosti su bile 1,64 mM i 4,19 mM za CCO, odnosno MCF-7 staničnu liniju). Zapažena blaga citotoksičnost ChOA može se objasniti oštećenjem stanice kao posljedica nastanka kristala kalcijevog-oksalata, što je zapaženo u kulturi. Također, nakon dodatka DES-a u medij za uzgoj zapažen je i pad pH vrijednosti medija, zbog kiselosti ChOA. U radu Radošević i sur. (2015) dokazana je i korelacija između biorazgradnje i citotoksičnosti otapala. Procjena toksičnosti i biorazgradnje kolinijevih ionskih tekućina i eutektičnih otapala često je vezana uz istraživanja sinteze i primjene istih. Ispitivanja njihove toksičnosti provode se na enzimima i bakterijama kao *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis* i *Listeria monocytogenes* (Hou i sur., 2013; Gouveia i sur., 2014), morskoj bakteriji *Vibrio fischeri* (Ventura i sur., 2014) te na staničnoj kulturi larva račića *Artemia salina* (Gouveia i sur., 2014). Također, objavljeno je nekoliko znanstvenih radova s rezultatima citotoksičnosti kolinijevih DES-ova na staničnim linijama (Paiva i sur., 2014; Radošević i sur., 2015; Hayyan i sur., 2015). Iako je broj istraživanja usmjerenih k DES-ovima i NADES-ovima posljednjih godina u porastu, još uvijek nema dovoljno podataka o njihovoj toksičnosti, zbog čega je važno provoditi daljnja ispitivanja (cito)toksičnosti kako bi se proširila znanja o učinku DES-ova na živi svijet i okoliš te spoznali mehanizmi njihovog djelovanja. Također, istraživanja čiji je primarni cilj sinteza i primjena DES-ova, moraju biti popraćena procjenom njihove toksičnosti i biorazgradivosti kako bi u širu industrijsku primjenu išla ona otapala s najboljim fizikalno-kemijskim svojstvima i najboljim ekotoksikološkim profilom.

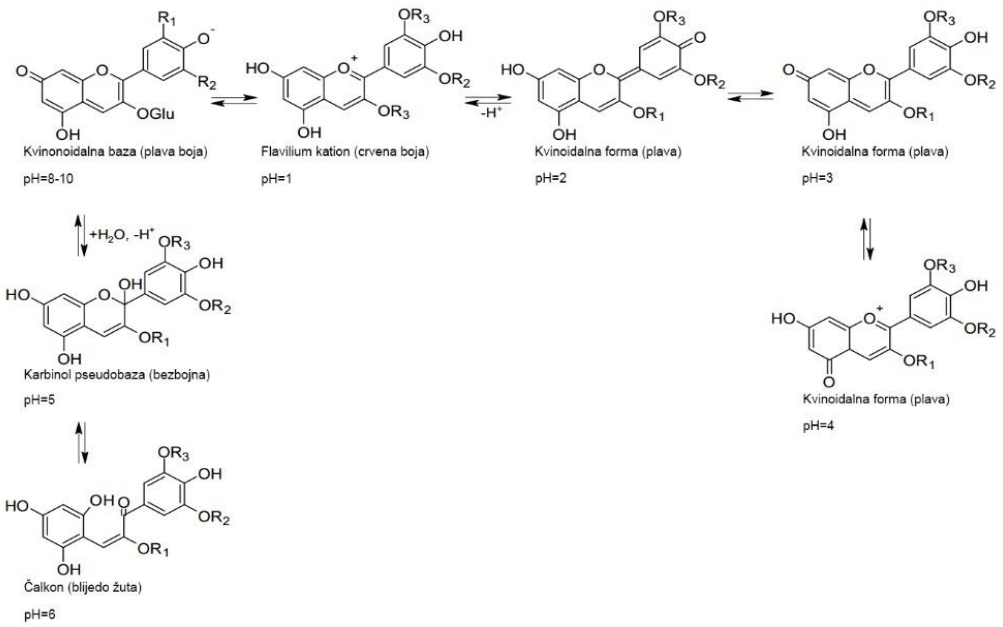
2.1.1.3. Primjena eutektičnih otapala u ekstrakcijama biološki aktivnih spojeva

Brojne epidemiološke studije ukazale su na važnost prehrane za zdravlje ljudi te su mnoga znanstvena istraživanja usmjerena k ispitivanju učinka spojeva iz biljaka. Do sada je za mnoštvo biološki aktivnih tvari iz hrane dokazan pozitivan utjecaj na žive organizme, tkiva ili stanice. Stoga su mnoga znanstvena istraživanja usmjerena k izolaciji biološki aktivnih tvari iz biljaka. Današnja istraživanja stavljaju naglasak na održivost i ekonomičnost proizvodnih procesa time što se nastoje iskoristiti nusproizvodi i/ili otpad prehrambene industrije. Kod predobrade grožđa zaostane kao otpad oko 20-30% težine ukupnog prerađenog grožđa. Komina, kao jedan nusproizvod prerade grožđa, sadrži visok udio biološki vrijednih tvari koje se mogu ekstrahirati i koristiti u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Ferri i sur., 2015). U radu Tanga i sur. (2015) istaknuta je važnost i veliki potencijal primjene eutektičnih otapala u procesima razdvajanja i ekstrakcije niza prirodnih spojeva iz različitih polaznih sirovina, stoga se može pretpostaviti njihova uspješna primjena u procesu ekstrakcije antocijana iz komine grožđa.

Za ekstrakcije polifenolnih spojeva iz grožđa, koji predstavljaju najviše istraživanu skupinu biološki aktivnih tvari iz hrane, najčešće se koristi ekstrakcija kruto-tekuće. U „klasičnim“ procesima ekstrakcije najčešće se primjenjuju organska otapala kao što su: etanol, metanol, razrijeđeni aceton ili mravlja kiselina u različitim molarnim omjerima. Navedena organska otapala učinkovita su u ekstrakciji polifenolnih spojeva, no, njihova upotreba ima negativan učinak na zdravlje ljudi i nepovoljna su sa stajališta sigurnosti na radu (Xia i sur., 2010). Stoga je interes procesnih tehnologa i znanstvenika usmjeren na razvoj novih metoda ekstrakcije koje uključuju alternativna otapala kao što su eutektična otapala te nove tehnologije kao što su ekstrakcije uz pomoć mikrovalova, ultrazvuka te ekstrakcije primjenom subkritične vode i superktiričnih tekućina.

Učinkovitost ekstrakcije ovisi o svojstvima otapala. DES ima dobre sposobnosti ekstrakcije zbog svoje kemijske prirode te mogućih interakcija s ciljnim tvarima - može biti donor i akceptor elektrona i tvoriti vodikove i π-π veze čime se povećava topivost tvari koja se želi ekstrahirati (Tang i sur., 2015). Podskupina eutektičnih otapala, NADES, može otopiti i polarne i nepolarne spojeve te može biti pogodno otapalo za ekstrakciju mnogih spojeva, naravno, ovisno o svojstvima samog NADES-a (Paiva i sur., 2014). Dodatna prednost NADES-a kao alternativnog otapala za ekstrakciju je tekuće agregatno stanje pri sobnoj temperaturi (ponekad i ispod 0°C). Učinkovitost ekstrakcije također ovisi o fizikalnim svojstvima NADES-a, kao što su viskoznost, temperatura i polarnost. Zapaženo je da je učinkovitost ekstrakcije s

NADES-om, uz optimizaciju svih potrebnih parametara, znatno veća nego pri ekstrakciji klasičnim otapalima kao što su etanol ili voda (Dai i sur., 2013b; Paiva i sur., 2014). Istraživanjem u kojem je provedena ekstrakcija fenolnih spojeva šafranike primjenom različitih eutektičnih otapala (mliječna kiselina-glukoza, glukoza-kolin klorid i fruktoza-glukoza-saharoza), potvrđeno je da eutektična otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva, zato jer nastaju stabilne i jake vodikove veze između fenolnih spojeva i komponenata otapala (Dai i sur.,2013b). Dodatni čimbenik koji ide u korist primjene DES-ova u procesima ekstrakcije je stabilnost izoliranih tvari u takvom ekstraktu. U radu Cvjetko Bubalo i sur. (2016) istaknuto je da stabilnost fenolnih spojeva u DES-ovima baziranim na šećernim tvarima omogućuje primjenu ekstrakata u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

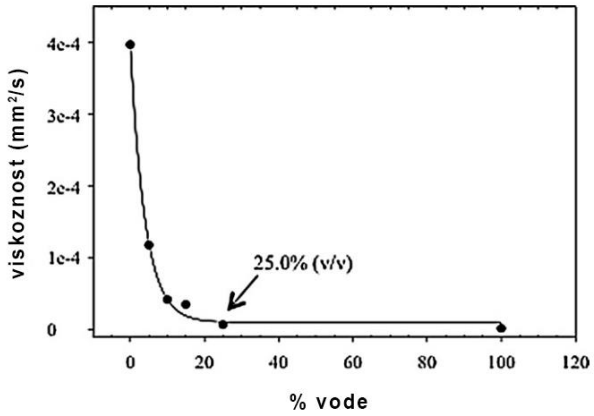


Slika 3. Struktura antocijana pri različitim pH vrijednostima (Miguel, 2011)

Učinkovitost ekstrakcije primjenom eutektičnih otapala ovisi o nizu procesnih parametara te svojstvima samog otapala. Bolja učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih spojeva primjenom DES-ova, u usporedbi s klasičnim otapalima, postiže se optimiranjem parametra kao što su: polarnost i pH DES-a, udio vode u DES-u, temperatura i vrijeme ekstrakcije te omjer otapalo-komina (Tang i sur., 2015). Utjecaj polarnosti i pH vrijednosti DES-a na učinkovitost ekstrakcije antocijana iz pokožice grožđa primjenom različitih DES-ova ispitali su Cvjetko Bubalo i sur. (2016). Najveća količina ekstrahiranih antocijana postignuta je kako slijedi: ChOa>ChMa>ChMaPro>ChGyl>ChSor. Razlika u učinkovitosti ekstrakcije objašnjena je razlikom u polarnosti upotrijebljenih DES-ova, obzirom da su antocijani polarne

molekule. DES-ovi sintetizirani iz organskih kiselina su najpolarniji i najbolji rezultati ekstrakcije ostvareni su upravo s ChOa i ChMa. Budući da molekularno stanje antocijana ovisi o pH (slika 3), na učinkovitost ekstrakcije antocijana značajno utječe i pH otapala. Niža pH vrijednost (pH=1) pogoduje nastanku flavijevog kationa (crvena boja), dok viša pH vrijednost (pH=2-4) pogoduje nastanku kvinoidalne forme (plavo-ljubičasta boja). Pri pH vrijednostima između 5 i 6 antocijani se nalaze u obliku bezbojne karbinol pseudobaze ili blijedo žute čalkon, dok pri pH vrijednostima višima od 7 dolazi do razgradnje antocijana. Stoga se u već spomenutom istraživanju Cvjetko Bubalo i sur. (2016) ChOa pokazao kao najbolji DES za ekstrakciju antocijana jer on, osim što je najpolarnije od svih korištenih otapala, ima i vrlo nisku pH vrijednost, što je važno za stabilnost antocijana. Općenito, DES-ovi s organskim kiselinama imaju kiseli pH dok su DES-ovi s polialkoholima ili šećerima neutralnih pH vrijednosti (Dai i sur., 2013b.; Radošević i sur., 2015).

Također, na učinkovitost ekstrakcije primjenom eutektičnih otapala utječe i udio vode u DES-u. Određeni udio vode u DES-u olakšava manipulaciju otapalom, smanjuje se viskoznost (slika 4) te je bolji prijenos mase između otapala i pokožice grožđa (Nam i sur., 2015). Tako je najučinkovitija ekstrakcija antocijana iz pokožice grožđa ostvarena primjenom DES-a s 30% vode (Cvjetko Bubalo i sur., 2016) .



Slika 4. Promjena viskoznosti DES-a ovisno o udjelu vode (Dai i sur., 2013a)

Izdvajanje antocijana ekstrakcijom kruto-tekuće ili HPLC-om dugotrajan je i skup proces s malim stupnjem reciklacije te nije isplativ u industrijskom mjerilu. Kao alternativna metoda za izdvajanje antocijana posljednjih se godina istražuju makroporozne smole koje karakterizira visoka selektivnost, velika aktivna površina i visoka sposobnost adsorpcije. Makroporozne smole su dostupne s različitim veličinama pora i aktivne površine i moguće ih je regenerirati nakon upotrebe te koristiti za više ciklusa izolacije antocijana (Chen i sur., 2016).

Stoga se ekstrakcija antocijana primjenom DES-a uz izolaciju na smolama razmatra kao učinkovita i za okoliš prihvatljiva metoda izolacije organskih molekula iz biljaka (Qi i sur., 2015; Wei i sur., 2015).

2.2. Biološka aktivnost polifenolnih spojeva

2.2.1.Grožđe kao izvor biološki aktivnih tvari

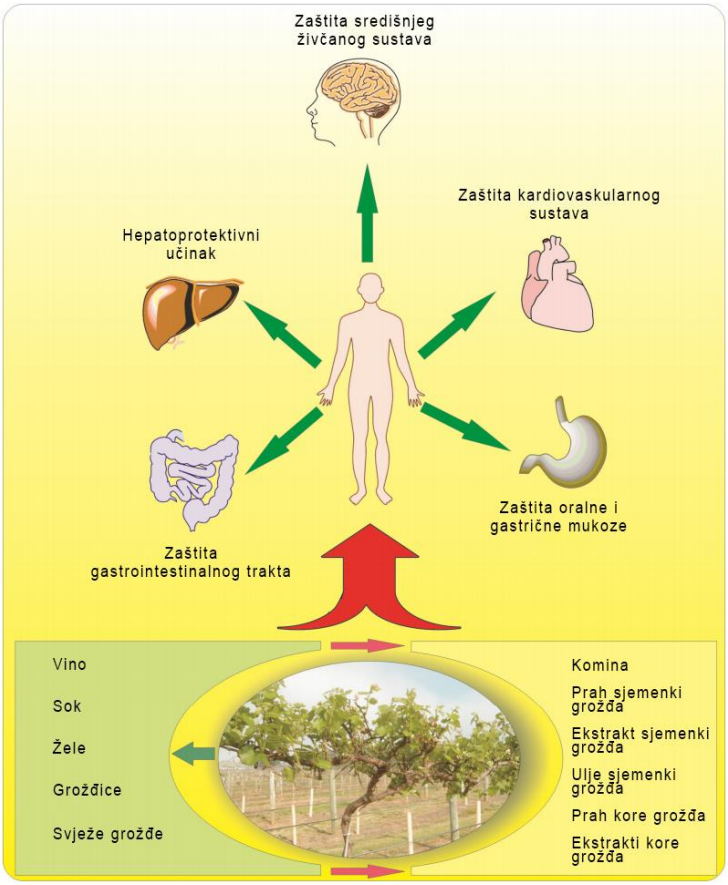
Grožđe (*Vitis* spp.) je jedna od najekonomičnijih biljaka koja se koristi u proizvodnji vina, sokova i ostalih prehrambenih proizvoda te se navodi kao bogat izvor vrijednih fitonutrijenata s izvanrednim pozitivnim učincima na zdravlje (slika 5). Grožđe je bogato mnogim nutrijentima kao što su: polifenolni spojevi, vitamini C i B skupine (osim B12) te mineralne tvari kao što su: kalij, fosfor, kalcij, magnezij, mangan, natrij, bakar, cink i željezo (Georgiev i sur., 2014).

Predobradom grožđa tijekom proizvodnje vina dobiva se komina koja čini 20-30 % težine ukupnog prerađenog grožđa. Komina se sastoji od prešane pokožice, sjemenke i peteljke. Općenito, nusproizvodi prehrambene industrije često predstavljaju problem zbog zbrinjavanja, ali su ujedno i bogat izvor biološki vrijednih spojeva, kao što su fitokemikalije, te se njihovom daljnjom obradom može ostvariti dodana vrijednost proizvodnog procesa i eventualno razviti novi proizvod (Ferri i sur., 2015). Polifenoli su najvažnije fitokemikalije u grožđu, a njihova fiziološka uloga za samu biljku je zaštita od UV zračenja, određuju boju cvijeta, privlače kukce oprašivače, štite tkivo od napada patogenih vrsta te oksidativnog stresa. Veliki broj polifenolnih spojeva ima dokazanu biološku aktivnost i pokazuje pozitivne učinke na zdravlje ljudi. Zbog svojih antioksidacijskih i protuupalnih svojstava polifenolni spojevi povezani su s fenomenom nazvanim „Francuski paradoks" kojim se opisuje statistički niska učestalost bolesti srca u populaciji Mediteranske regije, unatoč prehrani bogatoj zasićenim masnim kiselinama (Georgiev i sur., 2014). Osim toga, pozitivni učinci na zdravlje ljudi očituju se u sprječavanju degenerativnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti te nekih oblika tumora (Xia i sur., 2010).

Komina grožđa tako predstavlja visokovrijednu sirovinu za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva te se njeni ekstrakti mogu primijeniti kao funkcionalna hrana i sirovina, prirodno sredstvo za bojenje, kao konzervans u hrani i dr. (Ferri i sur., 2015). Više od 70% polifenolnih spojeva zaostane u nusproizvodima nakon obrade grožđa u proizvodnji vina ili sokova (Georgiev i sur., 2014). Najzastupljeniji polifenolni spojevi u komini grožđa su flavonoidi, stilbeni i fenolne kiseline (Ferri i sur., 2015). Flavonoidi imaju i najznačajniji biološki utjecaj te im se pripisuju antitumorska, protuupalna, antioksidativna, antimikrobna, antivirusna,

kardio- i neuroprotektivna svojstva. Većina flavonoida nalazi se u pokožici i sjemenkama grožđa (60-70%) (Georgiev i sur., 2014).

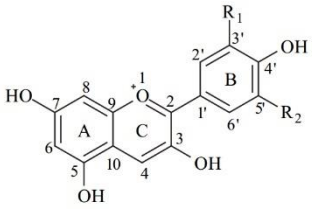
Znanstvena istraživanja usmjerena su i k određivanju profila polifenola u komini grožđa. U radu Antoniolli i sur. (2015) određen je polifenolni profil sorte Malbec, a Fontana i sur. (2016) odredili su polifenolni profil za sortu Cabernet Sauvignon. Općenito, kemijski sastav komine ovisi o sorti grožđa, stupnju zrelosti, stanju biljke te klimatskim uvjetima. Koncentracija ukupnih antocijana u komini grožđa prikupljenoj u dvije uzastopne godine od 50 616 i 131 868 µg po g etanolnog ekstrakta potvrđuju utjecaj klimatskih uvjeta (Kammerer i sur., 2004). Količine antocijana u komini crnih sorta grožđa najčešće su veće nego kod bijelih sorti, a kreću se od 287 do 4527 mg u 100 g metanolnog ekstrakta (Rockenbach i sur., 2011).



Slika 5. Proizvodi od grožđa, nusproizvodi i otpad u obradi grožđa te njihov pozitivan učinak na ljudsko tijelo (Georgiev i sur., 2014)

2.2.2. Biološka aktivnost antocijana

Antocijani spadaju u skupinu polifenolnih spojeva i pigmenti su koji daju plavu, crvenu, ljubičastu i narančastu boju voću i povrću. Pripadaju skupini flavonoida, ali se razlikuju od ostalih zbog sposobnosti tvorbe flavilium kationa. Nalaze se u pokožici grožđa i najčešće su glukozidno vezani s octenom, kumarinskom i kafeinskom kiselinom. Antocijani se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih i metilnih grupa, broju šećera vezanih na njihovu strukturu, alifatskih ili aromatskih karboksila vezanih na šećer u molekuli te položaju tih veza (Kong i sur., 2003). Uglavnom se nalaze u glikoziliranom obliku kojeg čine antocijanidin (aglikon) i šećer. Poznato je 17 antocijanidina, ali samo je njih šest važno za ljudsku prehranu (cijanin, delfinidin, malvidin, peonin, petunidin i pelargonidin) (slika 6) (Miguel,2011).



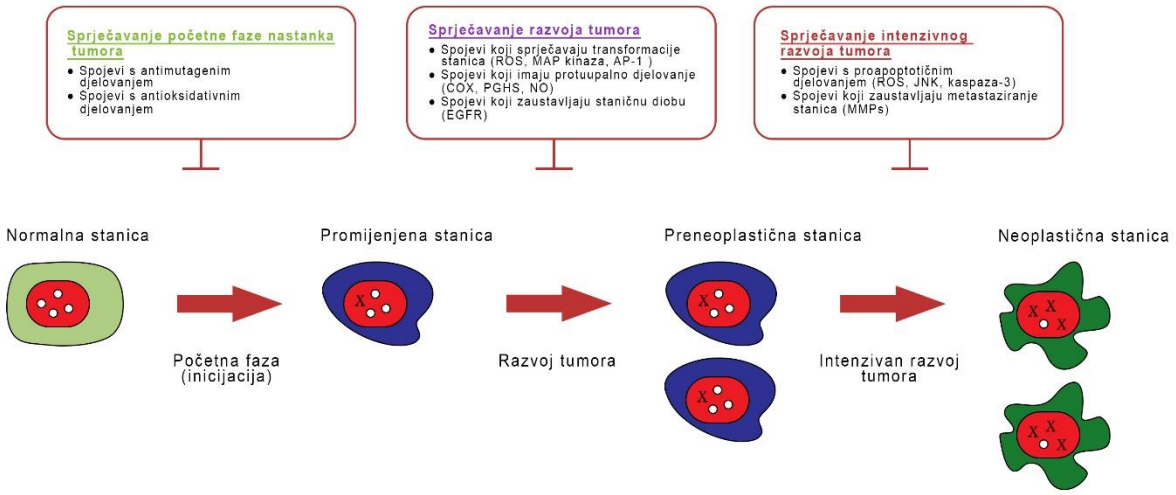
Ime	R1	R2	Boja
Delfinin	OH	OH	Plavo-crvena
Petunidin	OCH_3	OH	Plavo-crvena
Cijanin	OH	H	Narančasto-crvena
Pelargonidin	H	H	Narančasta
Peonidin	OCH_3	H	Narančasto-crvena
Malvidin	OCH_3	OCH_3	Plavo-crvena

Slika 6. Struktura antocijanidina i nazivi najvažnijih spojeva te skupine (Miguel, 2011)

Zbog svog antioksidativnog i protuupalnog djelovanja smatra se da antocijani smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, artritisa i tumora. Da bi antocijani bili djelotvorni moraju se apsorbirati iz probavnog sustava u krvotok i tim putem doći do ciljnog organa, tkiva ili stanice. Dokazano je da je oralna primjena voća bogatog antocijanima, ekstrakata ili „čistih" antocijana učinkovita u suzbijanju bolesti (Ramirez-Tortosa, 2001; Tsuda i sur., 2003; McDougall i sur., 2005; Miguel, 2011).

Biološka aktivnost antocijana određena je njihovom kemijskom strukturom. Ovisno o broju hidroksilnih grupa antocijani imaju veći ili manji antioksidacijski potencijal. Vezanjem antocijana sa šećerima povećava se otpornost antocijana prema oksidaciji (Prior i Wu, 2006; Jaganath i Crozier, 2010; Miguel, 2011). Antioksidacijsko djelovanje antocijana rezultira

smanjenjem oksidativnog stresa. Oksidativni stres je stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja izuzetno reaktivnih, slobodnih kisikovih čestica (O^{-}), koje su glavni uzrok oksidativnog stresa. Takve čestice nazivamo „reaktivne kisikove vrste“ ili skraćeno ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*). Mehanizmi antioksidativnog (Kong i sur., 2003; Miguel, 2011), antitumorskog (Hou, 2003) i protuupalnog djelovanja (Miguel, 2011) antocijana relativno su dobro istraženi i opisani. Na slici 7 prikazani su potencijalni mehanizmi djelovanja antocijana koji rezultiraju antitumorskim učinkom na organizam.



Slika 7. Potencijalni mehanizam antitumorskog djelovanja antocijana (Hou i sur., 2003)

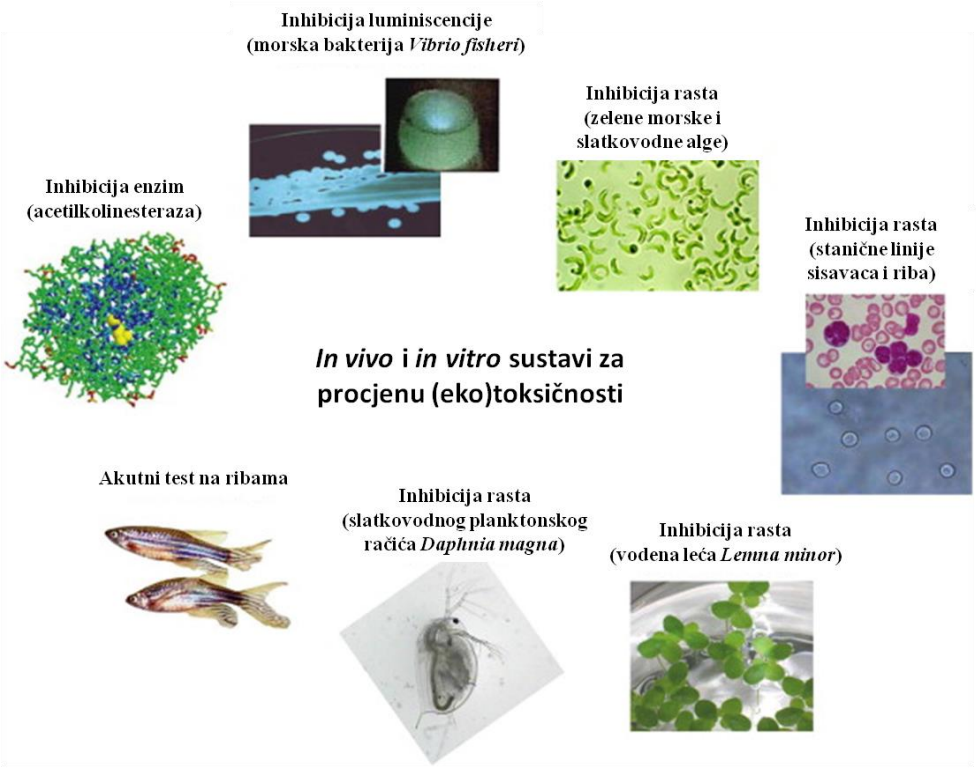
Osim spomenutog antitumorskog i protuupalnog djelovanja, poznati su i drugi pozitivni učinci antocijana. Oštrina vida (noćni vid) može biti poboljšana prilikom oralnog unosa antocijana iz crnog ribiza (Lila, 2004). Antocijani imaju i detoksifikacijski i protuupalni učinak, induciraju apoptozu, inhibiraju probavne enzime (α -glukozidaze, α -amilaze, proteaze i lipaze) čime indirektno mogu utjecati na dijabetes tipa II i pretilost. Povoljan učinak antocijana na funkcioniranje mozga i središnji živčani sustav opisan je u radu Miguela (2011) gdje je pokazano da antocijani mogu inhibirati neuroupale i smanjiti oksidativni stres te time smanjiti rizik od degenerativnih poremećaja kao što je Alzheimerova bolest.

Usprkos velikom potencijalu primjene antocijana u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, njihova upotreba je i dalje ograničena zbog relativne nestabilnosti tih molekula i niskom udjelu prilikom ekstrakcije iz biljnog materijala (Lila, 2004). Niz je faktora koji utječu na uspješnost izolacije antocijana: biljna vrsta, klimatski i agronomski uvjeti u kojima raste biljka, tehnološka obrada biljke, način ekstrakcije i izolacije te u konačnici

formulacija u gotov proizvod. Biološko djelovanje antocijana *in vivo* ovisi o spolu, dobi i genetici osobe koja konzumira antocijane te načinu unosa antocijana u organizam. Stoga su i nadalje potrebna istraživanja izolacije antocijana te dobro poznavanje mehanizama njihovog djelovanja kako bi bili prihvaćeni kao proizvod pogodan za prevenciju i/ili liječenje bolesti (Miguel, 2011).

2.3. Primjena *in vitro* testova citotoksičnosti

Određivanje toksičnosti eutektičnih otapala, kao i drugih novih kemikalija provodi se izvođenjem niza testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili u kulturama životinjskih stanica (*in vitro*) kako bi se na temelju toga mogao procijeniti njihov učinak na ljude i okoliš (slika 8).



Slika 8. *In vivo* i *in vitro* sustavi za procjenu (eko)toksičnosti ionskih tekućina (Matzke i sur., 2007).

Razvoj *in vitro* testova potaknut je zbog znanstvenih, ekonomskih i etičkih razloga. Obzirom na činjenicu da je danas u upotrebi oko 100 000 kemikalija, a svake godine na tržište izlazi 1 000 novih, njihovu toksičnost je nužno ispitati prije široke primjene koja za posljedicu ima prisutnost tih kemikalija u okolišu. Primjena *in vitro* testova uvelike doprinosi procjeni rizika već poznatih, ali i novo sintetiziranih kemikalija. Registracija, evaluacija, autorizacija i ograničavanje kemijskih tvari u svrhu zaštite okoliša i čovjeka propisana je zakonima Europske unije koji su na snazi od 2007. godine, a uključuju utvrđivanje toksikoloških i ekotoksikoloških

svojstava kemikalija. Već desetljećima, u laboratorijima koji provode *in vivo* ispitivanja na pokusnim laboratorijskim životinjama, nastoji se primjenjivati takozvani 3R pristup (engl. *Reduce, Refine, Replace*), kojim se želi smanjiti broj životinja koje se koriste, a uznemirenost, bol i patnju životinja tijekom izvođenja testova svesti na minimum te u konačnici zamijeniti *in vivo* testove alternativnim *in vitro* metodama. Osim *in vitro* testova, zamjena *in vivo* pokusa uključuje primjenu metoda kao što su QSAR (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*), genomike, proteomike te metaboličkog i kinetičkog modeliranja (Murati i sur., 2013). Cilj razvoja *in vitro* testova je validacija metode za određenu namjenu, čime se određuje preciznost metode, granica detekcije i osjetljivost, a znak je pouzdanosti i relevantnosti postupka provedenog u različitim laboratorijima. ECVAM (engl. *The European Centre for the Validation of Alternative Methods*) ima za cilj razvoj i primjenu alternativnih metoda i pristupa, a osim europske, takve organizacije postoje i u SAD-u (ICCVAM), Japanu (JaCVAM), itd. Od 1986. godine Europska unija uložila je oko 300 milijuna dolara u razvoj i validaciju alternativnih pristupa.

Kod provođenja *in vitro* testova toksičnosti najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwall, 1995). Citotoksičnost kemikalija može se odrediti na različite načine, uključujući mjerenje stanične smrti, preživljenja i funkcionalnosti, morfologije, energetskog metabolizma, prihvaćanja i proliferacije stanica. Neutral red (NR) test i test redukcije tetrazolijeve soli MTT spadaju u najčešće korištene testove za praćenje citotoksičnosti u adherentnim kulturama (Fent, 2001). NR test temelji se na nakupljanju boje neutral red u lizosomima živih stanica, a tvari koje uzrokuju oštećenja membrane inhibiraju nakupljanje ove boje (Borenfreund i Puerner, 1985). MTT test temelji se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije topljive žute MTT tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan (Mosmann, 1983). Ostali testovi koji se također primjenjuju jesu: otpuštanje laktat dehidrogenaze (LDH), bojanje bojom kristal-ljubičasto, smanjenje razine ATP-a i test proliferacije stanica (Fent, 2001).

U alternativnim metodama, odnosno *in vitro* testovima kreće se od pretpostavke da većina toksičnih spojeva djeluje na nivou stanice i ometa njezin normalan rad. Poznavanjem i razumijevanjem toksičnosti na razini stanice trebalo bi biti moguće pretpostaviti toksičnost na razini čitavog organizma. Iako se teži smanjenju broja životinja koje se koriste za *in vivo* testiranja, razvoj alternativnih *in vitro* metoda ne može u potpunosti zamijeniti ispitivanja na laboratorijskim životinjama, budući da *in vitro* testovi ne mogu u potpunosti odgovoriti na

pitanja tkivno-specifične toksičnosti, pojavu adaptivnog odgovora te metaboličke promjene koje se zbivaju u živom organizmu. Citotoksični odgovor između različitih staničnih linija može znatno varirati što ovisi o: metaboličkoj aktivnosti stanica, sastavu medija za uzgoj, temperaturi inkubacije, vremenu izlaganja i drugim faktorima. Potrebno je voditi računa o tome s kojom staničnom linijom se radi i na koji način ispitivana tvar može doći u kontakt s njome. Sadržaj seruma u mediju za uzgoj može promijeniti rezultat citotoksičnog ispitivanja zbog toga što neki sastojci seruma mogu reagirati s ispitivanom tvari i na taj način smanjiti njezinu biodostupnost stanicama (Fent,2001). Dokazana je podudarnost kod 80% rezultata (cito)toksičnih istraživanja provedenih primjenom različitih *in vitro* i *in vivo* testova (Fent, 2001), no, nadalje je potrebno optimirati *in vitro* testove kako bi dobiveni rezultati bili što bolji pokazatelji toksičnosti *in vivo*.

U *in vitro* testovima rezultat je najčešće prikazan kao % živih stanica u kulturi ili % preživljenja stanica, pa se takvi testovi često primjenjuju i za ispitivanje djelovanja raznih biljnih ekstrakata ili spojeva izoliranih iz biljaka. Osim toga, istraživanjima na raznim staničnim linijama, moguće je utvrditi i opisati mehanizam djelovanja ispitivane tvari na stanice, odnosno organizam.

In vivo i *in vitro* istraživanjima dokazano je da antocijani smanjuju proliferaciju tumorskih stanica, a njihovo antitumorsko djelovanje povezano je s antioksidacijskim kapacitetom antocijana te inhibitornim djelovanjem na enzim ciklooksigenazu, koji je ključni enzim u biosintetskom putu prostaglandina. Također, antitumorsko djelovanje antocijana zapaženo je u različitim fazama karcinogeneze (Lila, 2004). Tako je npr. primjenom MTT testa ispitan citotoksični učinak ekstrakata aronije, bazge i borovnice, koje su također bogate antocijanima, te je istražen njihov učinak na metaboličku aktivnost, stanični ciklus i staničnu proliferaciju IPEC–1 stanica. Najjači citotoksični učinak na rast navedene stanične linije imao je ekstrakt borovnice (LC_{50}=113,5 mg L^{-1}). Kao što je već spomenuto, učinak pojedinačnih spojeva i njihova antitumorska aktivnost ovisi o broju hidroksilnih i metilnih grupa vezanih na molekulu antocijanidina pa je delfinidin, koji ima 3 hidroksilne grupe, imao jaču antitumorsku aktivnost od cijanina (Kšonžeková i sur., 2015).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Komina grožđa

U radu se koristila komina grožđa sorte Plavac mali (berba 2012). Komina grožđa se podvrgnula postupku liofilizacije. Liofilizirani uzorci su se samljeli i takvi se koristili u ekstrakciji.

3.1.2. Kemikalije

- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- 2,2′-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 96% etilni alkohol (ethanol), Kefo, Ljubljana, Slovenija
- Amberlite XAD-16 , Rohm and Haas, France
- Betaine, 98%, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Deionizirana voda
- DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Tripan plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- DL- Malic acid, 99+%, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Kolin-klorid (≥ 97 %), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- L(-)-Proline, 99+%, Acros Organics, New Yersey, USA
- Limunska kiselina, Gram–mol d.o.o., Zagreb, RH
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH

- Natrijev hidrogenkarbonat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev klorid, NaCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], Promega, SAD

Sve kemikalije upotrijebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a voda korištena u sintezi ionskih tekućina i pripravu otopina bila je destilirana voda PBF-a.

3.1.3. Eutektična otapala

Za potrebe ovog eksperimenta, koristilo se 5 eutektičnih otopina navedenih u tablici 2 koje su se prethodno sintetizirale u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a.

Tablica 2. Eutektična otapala korištena u eksperimentu

Eutektično otapalo	**Kratica**
Kolin klorid:limunska kiselina	ChCit
Betain:jabučna kiselina	BMa
Kolin klorid:prolin:jabučna kiselina	ChProMa
Kolin klorid:jabučna kiselina	ChMa
Jabučna kiselina:glukoza	MaGlc

3.1.4. Otopine i puferi

- 2 % otopina HCl

37% HCl		27 mL
Destilirana voda	do	500 mL

- 96 % etanol s 0,1% HCl

37% HCl		0,27 mL
96 % etanol	do	100 mL

- 15 % $NaHSO_4$

$NaHSO_4$		15,0 g
Destilirana voda	do	100 mL

- Fosfatni pufer (0,2 M, pH=7)

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode)		39 mL
Dinatrijev hidrogenfosfat (5,687 g do 200 mL destilirane vode)		61 mL
Destilirana voda	do	200 mL

- Otopina AAPH (2,2′-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid)

AAPH		0,207 g
Fosfatni pufer (0,075 M)	do	5 mL

- Otopina fluoresceina

  Ishodna otopina 1: otopiti 15 mg fluoresceina u 100 mL fosfatnog pufera (0,075 M)
  Ishodna otopina 2: 100 μL ishodne otopine 1 nadopuniti s 10 mL fosfatnog pufera (0,075 M)
  Ishodna otopina 3: 50 μL ishodne otopine 2 nadopuniti s 50 mL fosfatnog pufera (0,075 M)

- PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid		8,0 g
Kalijev klorid		0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat		1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat		0,24 g
Destilirana voda	do	1000 mL

- 0,4% otopina tripan plavo

Boja tripan plavo	0,04 g
PBS pufer	10 mL

3.1.5. Stanične linije

3.1.5.1. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su dvije humane tumorske stanične linije HeLa i MCF-7, te jedna humana stanična linija HEK293T. Sve stanične linije dobivene su iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Prva humana stanična linija HeLa uspostavljena je 1952. i izolirana je iz tumora vrata maternice. Od tada se koristi kao biološki model u raznim istraživanjima. Dobar su *in vitro* model jer posjeduju osnovne značajke kao i normalne stanice (proizvode proteine, eksprimiraju i reguliraju gene, komuniciraju jedne s drugima i osjetljive su na infekcije). MCF-7 je stanična linija tumora dojke, a naziv joj potječe od *Michigan Cancer Foundation*-7 - instituta u Detroitu gdje je stanična linija i uspostavljena 1973. Pokazala se kao dobar *in vitro* model za istraživanje mehanizama tumorskog odgovora na hormonsku terapiju te kompleksnog odnosa između vezanja i biološke aktivnosti steroidnih hormona. HEK293T je

humana stanična linija epitelnih stanica bubrega fetusa. Koristi se za proizvodnju retrovirusa, praćenje ekspresije gena i proizvodnju proteina. Sve tri stanične linije su morfološki epitelne stanice i spadaju u skupinu adherentnih stanica. Uzgoj navedenih stanica provodi se u Petrijevim posudama za održavanje biomase stanica ili u pločama s jažicama - za postavljanje pojedinačnih pokusa ispitivanja biološke aktivnosti ekstrakata pokožice grožđa. Optimalna temperatura za uzgoj HeLa, MCF-7 i HEK293T stanica je 37 °C te atmosfera koju čini 95 % zraka i 5 % CO_2. Preporučeni medij za rast je Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS).

3.1.6. Oprema

- Centrifuga tip PLC-332, Tehnica Železnik, Slovenija
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Germany
- Hladnjak (4 ºC i -20 ºC), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-75 ºC), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Neubauer komorica za brojanje stanica
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Petrijeve posude za uzgoj stanica
- Staklena kolona: D=3,476 cm, H=13 cm

3.2. Metode rada

3.2.1. Sinteza eutektičnih otapala

Eutektična otapala sintetizirana su na način da je u tikvicu s okruglim dnom dodana proračunata količina komponenata prema određenim omjerima u tablici 3 te je dodano 30% vode. Tikvica sa smjesom odabranih spojeva stavljena je na elektromagnetsku miješalicu te je pri 80 °C miješana kroz 2-6 sati u zatvorenom sustavu sve dok nije nastala homogena, bezbojna i prozirna tekućina. Nakon toga je zatvorena parafilmom i čuvana na tamnom mjestu te kasnije korištena za pripremu ekstrakata.

Tablica 3. Molarni omjeri sintetiziranih eutektičnih otapala temeljenih na amonijevim solima ili organskoj kiselini te organskim kiselinama ili šećerima kao donorima vodikove veze.

Eutektično otapalo	Kratica	Molarni omjer
Kolin klorid:limunska kiselina	ChCit	2:1
Betain:jabučna kiselina	BMa	1:1
Kolin klorid:prolin:jabučna kiselina	ChProMa	1:1:1
Kolin klorid:jabučna kiselina	ChMa	1:1
Jabučna kiselina:glukoza	MaGlc	1:1

3.2.2. Priprema ekstrakata komine grožđa

Za pripremu ekstrakata se koristila komina grožđa koja je odvagana i usitnjena sjeckalicom (~ 100 mg po 6 puta). Odvaganoj količini komine dodano je 20 mL 70%-tnih DES-ova (ChCit, ChMa, ChProMa, BMa, MaGlc). Ekstrakcija je provođena na 60°C 60 minuta u ultrazvučnoj kupelji koja pospješuje razbijanje veza između antocijana i čvrstog nosača kako bi se olakšao proces difuzije antocijana u otapalo. Vakuum-filtracijom uz upotrebu mikrofiltera (0,22 μm) odvojena je izlužena komina iz ekstrakta (slika 9). MaGlc se prije filtracije razrijedila 3 puta vodom. Nakon filtracije, ekstrakti su čuvani na +4°C do upotrebe.



Slika 9. Ekstrakt nakon filtracije (vlastita fotografija)

3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana

Metoda za određivanje ukupnih antocijana temelji se na činjenici da se hidrogensulfitni ion veže na 2' položaju i prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Paralelni uzorak istovremeno se tretira destiliranom vodom. Spektrofotometrijski se određuje razlika apsorbancije u oba uzorka (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1966). Postupak određivanja: pripremljena je otopina uzorka u koju je dodano 100 µL uzorka, 100 µL etanola (96%) s 0,1% klorovodične kiseline i 2 mL 2 %-tne vodene otopine klorovodične kiseline. Otopini uzorka je u jednoj paraleli dodano 400 µL destilirane vode, a u drugoj 400 µL 15 %-tne otopine natrijevog hidrogensulfata. Nakon 15 minuta u obje otopine je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 520 nm. Rezultati se izražavaju kao mg antocijana po L uzorka:

$$A_c = 875 * (D_1 - D_2) \quad [1]$$

Gdje je: A_c – masena koncentracija antocijana u uzorku (mg L^{-1}), 875 – faktor preračunavanja, D_1 – apsorbancija uzorka s 400 µL destilirane vode, D_2 - apsorbancija uzorka s 400 µL 15 %-tne otopine natrijevog hidrogensulfata.

3.2.4. Adsorpcija i desorpcija antocijana na smoli Amberlite XAD – 16

Amberlite XAD-16 je neionski, aromatski, umrežen, hidrofobni polimer velike površine s porama > 50 Å. Služi kao nosač i adsorbira hidrofobne organske molekule male molekulske mase iz polarnog otapala. Smola se koristi u obradi otpadnih voda, separaciji plinova, za adsorpciju biološki aktivnih komponenata u farmaceutskoj industriji i dr. Polarnost i veličina pora kontrolirana je kopolimerizacijom prilikom sinteze polimera (Li i Chase,2010).

U ovom radu smola je korištena kao nosač u koloni (D=3,476 cm, H=13 cm). Na smolu su vezani NaCl i Na_2CO_3 kako bi se suzbile kontaminacije tokom transporta i rukovanja smolom pa je potreban predtretman. Kolona je punjena s 5 g smole Amberlite XAD-16 te je smola isprana s 42,5 mL (3 BV) deionizirane vode protokom 0,7 mL min^{-1} (3 BV h^{-1}), zatim s 42,5 mL (3 BV) 96%-tnog etanola protokom 1,425 mL min^{-1} (6 BV h^{-1}) pa opet deioniziranom vodom.

Radni volumen kolone (engl. *bed volume*, BV) računa se prema jednadžbi:

$$BV = r^2 * \pi * h \quad [2]$$

Gdje je: BV – radni volumen (mL), h – visina smole u koloni (cm), r – polumjer kolone (cm).

Nakon predtretmana nanešen je uzorak, kojem su se prethodno spektrofotometrijski odredili antocijani. Uzorak je stajao 30 min na smoli te je smola isprana s 42,5 mL deionizirane vode, a zatim su vezani antocijani eluirani sa smole s 30 mL 96%-tnog etanola. Sakupljane su frakcije po 5 mL te su spektrofotometrijski određeni ukupni antocijani prema metodi u poglavlju 3.2.3. u svakoj frakciji. Izgled smole prije i nakon vezanja antocijana prikazan je na slici 10.

Preračunata su i iskorištenja vezanja antocijana na smolu svih 5 ekstrakata prema formuli:

$$E = \frac{m_{EtOH}}{m_e} * 100 \qquad [3]$$

Gdje je: E – iskorištenje procesa (%), m_{EtOH} – masa antocijana u etanolnim frakcijama (mg), m_e- masa antocijana u ekstraktu (mg).



Slika 10. Smola prije i nakon vezanja antocijana (vlastita fotografija)

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip ORAC metode temelji se na inhibiciji peroksil radikala (ROO·**)** za koji se kao izvor koristi AAPH. Peroksil radikal oksidira fluorescein i stvara produkt bez fluorescencije (smanjenje inteziteta fluorescencije). Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala i oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije (Cao i sur., 1993).

3.2.5.1. Mjerenje ORAC vrijednosti

Mjerenje ORAC (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*) vrijednosti je provođeno kao što je opisano u Mazor Jolić i sur., 2011**.** Mjerenje je provođeno spektrofluorimetrijski pri temperaturi od 37 °C uz λeks.= 485 nm i λem.=520 nm. Antocijani u etanolu razrijeđeni su od 22-200 puta, ovisno o koncentraciji antocijana u ishodnoj otopini. Otopina za mjerenje od 3 mL pripremljena je dodatkom 2250 µL fluoresceina 0,04 µM, 375 µL uzorka te nakon termostatiranja od 30 min u vodenoj kupelji na 37 ˚C dodatkom 375 µL otopine AAPH (152 mM). Na kraju je mjerena promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu sve do spuštanja vrijednosti na nulu. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, za čije se mjerenje umjesto uzorka dodao fosfatni pufer (0,075 mol L^{-1}). Kao standard se koristio Trolox (25 µmol L^{-1}).

3.2.5.2. Izračun ORAC-vrijednosti

Relativna ORAC-vrijednost računa se prema formulama:

$$relativna\ ORAC - vrijednost = \left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}}\right) * k * \alpha * h \quad [4]$$

$$AUC = 0{,}5 + \left(\frac{R_2}{R_1}\right) + \left(\frac{R_3}{R_1}\right) + \cdots + \left(\frac{R_n}{R_1}\right) \quad [5]$$

Gdje je:

- Relativna ORAC-vrijednost (µmol Trolox ekvivalenta g^{-1} uzorka)
- AUC_U - antioksidacijski kapacitet uzorka
- AUC_{SP} - antioksidacijski kapacitet slijepe probe
- AUC_{TRX} - antioksidacijski kapacitet Troloxa
- k - faktor razrjeđenja
- a - molarna koncetracija Troloxa
- $h = \frac{V_{uzorka}}{m_{komine}}$ [6]

3.2.6. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti antocijana na HeLa, MCF-7 i HEK293T staničnim linijama

3.2.6.1. Uzgoj i nacjepljivanje stanica

Uzgoj je započeo odmrzavanjem HeLa, MCF-7 i HEK293T stanica koje su čuvane na -70 °C u mediju za smrzavanje. Ampula sa stanicama (1 mL), koje su bile zamrznute u koncentraciji od oko $1x10^7$ stanica mL^{-1} odmrznuta je naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 30 °C. Stanice su odcentrifugirane pri 1000 okretaja min^{-1} tijekom 3 minute. Supernatant je pažljivo uklonjen pipetom, a talog stanica je resuspendiran u mediju za uzgoj koji sadrži 10% FBS. Stanice su zatim prebačene u petrijevku koja je stavljena u inkubator s reguliranom atmosferom koja sadrži 95 % zraka i 5% CO_2 na temperaturu od 37 °C. Uzgoj u petrijevkama omogućava održavanje biomase stanica za potrebe postavljanja pojedinačnih eksperimenata. Stanice su svakodnevno promatrane pod inverznim mikroskopom i pasažirane su svaka 3-4 dana kako bi se održale u eksponencijalnoj fazi rasta jer su tada najvitalnije i najbolje za postavljanje pokusa. Morfologija stanica, njihovo opće stanje i brojnost praćena je pod inverznim mikroskopom. Tijekom uzgoja je također praćena i boja medija, jer nagla promjena boje često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi ili prerastanja podloge za uzgoj. Redovito prihranjivanje je važno da se nadomjeste komponente medija koje su se iscrpile i da se uklone proizvodi metabolizma kako bi se održao optimalan pH. Tokom rada u laboratoriju potrebno je održavati aseptične uvjete rada.

3.2.6.2. Određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo

Za određivanje broja stanica prihvaćenih za površinu petrijevke ili ploče s jažicama najprije je uklonjen hranjivi medij te je dodan 1 mL prethodno zagrijane otopine tripsina. Petrijevka je zatim vraćena u inkubator na 3-4 minute kako bi se stanice zbog djelovanja tripsina odvojile od površine. Djelovanje tripsina provjereno je pod inverznim mikroskopom, a kada su stanice zaokružene i odvojene od površine, resuspendirane su i korištene za utvrđivanje broja stanica u uzorku. Alikvot suspenzije stanica (10 µL) pomiješan je s 10 µL boje tripan plavo te je 10 µL nanijeto na Neubauer komoru za brojanje. Komora je podijeljena na 4 velika kvadrata. U svakom velikom kvadratu nalazi se 16 malih kvadratića. Stanice su brojane u svim kvadratima. Brojane su žive i mrtve stanice obojene plavo zbog oštećene membrane.

Koncentracija po mL suspenzije računa se prema:

$$\frac{broj\ stanica}{mL\ suspenzije} = broj\ stanica\ u\ 4\ velika\ kvadrata * 5000 \quad [7]$$

3.2.6.3. Određivanje biološke aktivnosti etanolnih eluata antocijana na HeLa, MCF-7 i HEK293T staničnim linijama primjenom MTS metode

Za potrebe svakog eksperimenta stanice su u eksponencijalnoj fazi rasta tripsinizirane, izbrojane uz dodatak boje tripan plavo te nacijepljene u ploče s 96 jažica (slika 11) u početnoj koncentraciji od $3*10^4$ stanica mL^{-1} i volumenu od 100 µL po jažici.

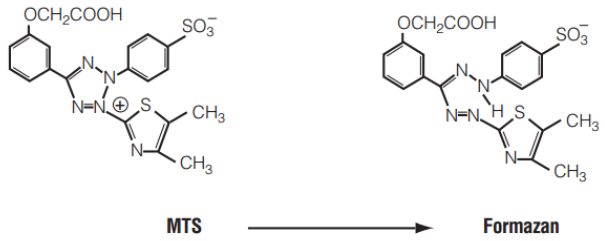


Slika 11. Nacjepljivanje stanica na ploču s 96 jažica (vlastita fotografija)

Nakon 24 h od nacjepljivanja, stanice su tretirane različitim volumenima etanolnih eluata izračunatim na temelju masenih koncentracija ukupnih antocijana u pojedinom eluatu prikazanim u tablici 6 tako da su koncentracije u jažici bile u rasponu 25-250 µg antocijana po mL. Navedeni raspon masenih koncentracija odabran je prema dostupnoj literaturi u kojoj je ispitivan učinak antocijana na kulturama stanica. Za svaku koncentraciju postavljene su četiri paralele. Stanice su inkubirane pri 37 °C tijekom 72 sata nakon čega je određen citotoksičan učinak primjenom MTS metode.

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima, zatim za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva te za određivanje antitijela koja inhibiraju rast. MTS

reagens se sastoji od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] i PES [phenazine ethosulfate]. PES poveća stabilnost reagensa. MTS se djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u stanicama reducira do formazana ljubičaste boje koji je otopljen u mediju te nije potrebno otapanje kristala formazana (slika 12). Pritom se NADPH ili NADH djelovanjem dehidrogenaze oksidira u $NADP^+$ ili NAD^+.



Slika 12. Struktura tetrazolijeve soli MTS i njezin produkt formazan

Nakon perioda tretmana od 72 sata medij s ispitivanom tvari je uklonjen te je dodano 100 µL svježeg medija s otopinom MTS (10% v/v). Ploča je potom vraćena u inkubator i inkubirana je sljedeća 3-4 sata. Intenzitet razvijene boje određen je spektrofotometrijski primjenom čitača ploča pri valnoj duljini od 490 nm u odnosu na slijepu probu. Apsorbanca je proporcionalna broju živih stanica u mjerenoj jažici. Vijabilnost stanica je izražena kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica, za koje se preživljenje smatra 100 % prema izrazu:

$$preživljenje\ stanica = \frac{srednja\ vrijednost\ A490\ uzorka}{srednja\ vrijednost\ A490\ kontrole} * 100 \qquad [8]$$

3.2.7. Obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ($\bar{x}$) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \qquad [9]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}} \qquad [10]$$

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

Industrija se okreće zelenim i održivim tehnologijama. Jedan od procesa koji se nastoji voditi po principima zelene tehnologije je ekstrakcija i to na način da se organska otapala kao medij za ekstrakciju zamijene alternativnim netoksičnim i selektivnim otapalima. Posljednjih desetak godina provode se brojna istraživanja u tom području, a trenutno su u fokusu znanstvenog interesa eutektična otapala, koja se smatraju dobrom alternativom s velikim potencijalom primjene, ne samo u procesima ekstrakcije, već i u brojnim drugim (bio)tehnološkim procesima. S ciljem pronalaska najselektivnijeg otapala u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije sintetizirano je više od 10-tak eutektičnih otapala, različitih fizikalno – kemijskih svojstava. Sve tvari korištene za sintezu DES-a prirodne su, netoksične, dostupne i jeftine. Kolin klorid je jeftina, biorazgradiva i netoksična sol odobrena od strane Vijeća Europske agencije za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA). Betain je prirodno prisutan u ljudskom tijelu i u prirodi i nije štetan za okoliš pa je ispitan kao mogući supstrat za sintezu eutektičnog otapala kao zamjena za najčešće korišten kolin klorid (Fischer, 2015). Prolin je aminokiselina koja se uobičajeno koristi u biosintezi proteina te također nije štetna za okoliš. Jabučna i limunska kiselina imaju GRAS status (engl. *Generally Recognized as Safe*), dok je glukoza najvažniji i najjednostavniji šećer u metabolizmu. Unatoč neškodljivosti svih spojeva korištenih za sinezu DES-ova, ekotoksikološki profil svih otapala prethodno je ispitan kako bi se potvrdio kriterij netoksičnosti idealnog zelenog otapala. U ovom radu odabrano je pet eutektičnih otapala i primijenjeno za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa sorte Plavac mali. Ekstrakcija se provela u ultrazvučnoj kupelji u optimiranim uvjetima sa svrhom selekcije najpovoljnijeg DES-a za tu namjenu (Cvjetko Bubalo i sur.,2016). Rezultate analize prikazuje slika 13.

U pet pripravljenih ekstrakata primjenom eutektičnih otapala ChCit, ChMa, ChProMa, BMa, MaGlc, određena je koncentracija ukupnih antocijana. Potom su antocijani iz ekstrakata izolirani primjenom Amberlite XAD-16 smole na koju se antocijani adsorbiraju, a zatim desorbiraju etanolom. Neionska smola velikog je kapaciteta i određene veličine pora. Korištenje smole kao sredstva za izdvajanje jeftin je proces, a smolu je moguće i regenerirati. Svrha adsorpcije antocijana na smolu je koncentriranje antocijana i uklanjanje šećera i ostalih tvari (Buran i sur., 2014). Nakon izolacije antocijana na smoli ukupni antocijani su određeni u ekstraktu nakon nanošenja na kolonu, deioniziranoj vodi kojom je ispirana kolona te u etanolnim eluatima nakon desorpcije antocijana s kolone. U deioniziranoj vodi nisu prisutni antocijani što potvrđuje činjenicu da su antocijani uspješno vezani na kolonu, dok su u

etanolnim eluatima prisutni antocijani što znači da je etanol pogodno otapalo za desorpciju antocijana s kolone. Rezultati su prikazani kao postoci učinkovitosti adsorpcije u tablici 5. Također, spektrofluoremetrijskom metodom određen je antioksidacijski kapacitet (slika 14) etanolnih eluata te je ispitano njihovo *in vitro* djelovanje na trima humanim staničnim linijama HeLa, MCF-7 i HEK293T primjenom MTS kolorimetrijske metode (slike 15-19).

4.1. Odabir DES-ova za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa i optimalni uvjeti ekstrakcije

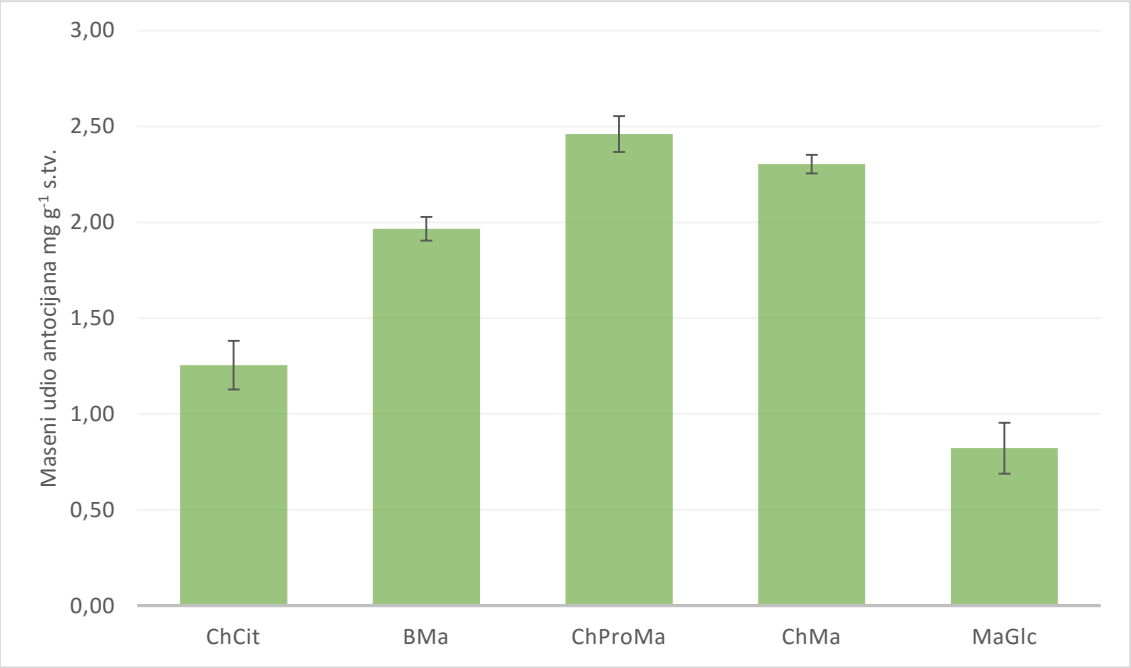
Struktura DES-ova određuje njihova fizikalno-kemijska svojstva koja znatno utječu na učinkovitost ekstrakcije (Paiva i sur., 2014; Kudlak i sur., 2015; Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Za ovaj rad odabrano je i sintetizirano 5 eutektičnih otapala (ChCit, ChMa, ChProMa, BMa, MaGlc) koja su ispitana kao otapala za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa. Prethodna istraživanja potvrdila su da je količina vode parametar koji utječe na uspješnost ekstrakcije te je utvrđeno da je optimalna količinu vode u DES-u prilikom izolacije polifenolnih komponenata iz biljaka od 20% (Wei i sur., 2015; Qi i sur.,2015), 25% (Cvjetko Bubalo i sur., 2016) do 30% (Nam i sur., 2015). Stoga su svi DES-ovi korišteni u ovom radu bili 70%-tni što osim uspješnosti ekstrakcije omogućava i lakšu manipulaciju DES-om zbog smanjenja viskoznosti. Viskoznost otapala još je jedan od bitnih parametara za ekstrakciju. Ukoliko je viskoznost manja, ekstrakcija je učinkovitija (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Qi i sur., 2015; Wei i sur., 2015). Najgušće otapalo korišteno u ovom radu bilo je MaGlc (1,331 g/cm^3) kojim je ekstrahirana najmanja količina ukupnih antocijana u odnosu na ostala četiri primijenjena DES-a (slika 13), što je u skladu sa spomenutom ovisnošću uspješnosti ekstrakcije o viskoznosti otapala.

Ostali parametri pri kojima je provođena ekstrakcija, kao što su temperatura i vrijeme prethodno su optimirani. Povišena temperatura ekstrakcije pogodna je zbog pada viskoznosti otapala i poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije te zbog smanjenja površinske napetosti što rezultira lakšim otapanjem antocijana u otapalu. S druge strane, previsoka temperatura može uzrokovati razgradnju antocijana te je optimalna temperatura od 50-65 °C (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Li i sur., 2015). Stoga su antocijani u ovom radu ekstrahirani pri 60°C. Provođenje ekstrakcije pomoću ultrazvuka povećava učinkovitost i skraćuje vrijeme ekstrakcije (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Ultrazvučno djelovanje na tekući medij povećava tlak čime se utječe na promjenu kinetičke energije i razbijanje unutarnje strukture komine grožđa. No, ultrazvučni valovi imaju i nedostatak - mogu uzrokovati promjene u kemijskoj strukturi tj. razgradnju antocijana i nastajanje slobodnih radikala. U radu Cvjetko Bubalo i sur. (2016) optimirani su uvjeti ekstrakcije i kao najbolji parametri za primjenu ultrazvučne kupelji za ekstrakciju

predloženo je 65 °C tijekom 50 min, u ovom radu ekstrakcija je provođena pri 60 °C, 60 min u ultrazvučnoj kupelji.

4.2. Ukupni maseni udio antocijana u ekstraktima komine grožđa pripravljenim pomoću eutektičnih otapala

Kvantitativna metoda određivanja antocijana provodi se vezanjem hidrogensulfitnog iona na 2' položaj čime se prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Rezultati mjerenja ukupnih antocijana u pripremljenim ekstraktima komine grožđa izraženi su u mg antocijana po gramu suhe tvari (s.tv.) uzorka i prikazani su na slici 13.



Slika 13. Maseni udio ukupnih antocijana u ekstraktima komine grožđa *,**

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

** ChCit=ekstrakt pripravljen u eutektičnom otapalu kolin klorid:limunska kiselina, BMa=ekstrakt pripravljen u eutektičnom otapalu betain:jabučna kiselina, ChProMa=ekstrakt pripravljen u eutektičnom otapalu kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, ChMa=ekstrakt pripravljen u eutektičnom otapalu kolin klorid:jabučna kiselina, MaGlc=ekstrakt pripravljen u eutektičnom otapalu jabučna kiselina:glukoza.

Mjerenjem ukupnih antocijana u ekstraktima u DES-u zapaženo je da je najviše antocijana ekstrahirano kako slijedi:ChProMa>ChMa>BMa>ChCit>MaGlc. Rezultati na slici 13 pokazuju da je najveća količina antocijana ekstrahirana otapalom ChProMa (2,45± 0,093 mg g^{-1}), a najmanja količina s MaGlc (0,82169± 0,13258 mg g^{-1}). Od svih DES-ova korištenih za ekstrakciju najgušći je bio upravo MaGlc (1,331 g cm^{-3}) koji se pokazao najlošijim. Navedeni ekstrakt u MaGlc nije bilo moguće filtrati nakon ekstrakcije i odvojiti od komine, bez da se prethodno ne razrijedi vodom i to tri puta.

Topljivost antocijana u otapalu ovisi o polarnosti otapala. Polarnost antocijana definirana je brojem hidroksilnih grupa i stupnjem metilacije na B prstenu. Polarnost se mijenja redom delfinidin<cijanidin<petunidin<peonidin<malvidin (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Poznat je trend ekstrahiranja antocijana: polarniji antocijani ekstrahiraju se polarnijim DES-ovima tj. DES-ovima s većim udjelom vode, a manje polarni s manjom količinom vode u DES-u (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Ekstrakcija antocijana i ostalih polifenolnih komponenata omogućena je zbog stvaranja vodikovih veza između polifenolnih komponenata i komponenata DES-ova (Paiva i sur., 2014; Dai i sur., 2013b). Budući da se bioaktivni prirodni produkti u biljkama razlikuju u polarnosti, sintezom različitih DES-ova tj. odabirom komponenata u različitim molarnim omjerima može se optimirati njihova ekstrakcija (Jeong i sur., 2015). Antocijani su polarne molekule i razlika u učinkovitosti ekstrakcije može se pripisati razlikom u polarnosti DES-ova što će svakako biti predmet daljnjih istraživanja. Najpolarniji DES-ovi su bazirani na organskim kiselinama (44,81 kcal mol^{-1}), slijede aminokiseline i šećeri s polarnošću sličnom vodi (48,21 kcal mol^{-1}) dok su najmanje polarni DES-ovi sastavljeni od 2 šećera i poliakohola s polarnošću sličnom metanolu (51,89 kcal mol^{-1}).

Učinkovitost ekstrakcije antocijana kao i njihova stabilnost ovisi o pH vrijednosti otapala koji se koristi za tu namjenu. pH vrijednost DES-ova utječe na strukturu antocijana (slika 3), stoga su izmjerene pH vrijednosti korištenih DES-ova i prikazane u tablici 4.

Tablica 4. pH vrijednosti DES-ova korištenih za pripremu ekstrakata komine grožđa

Eutektično otapalo	pH vrijednost
ChCit	0,93
BMa	3,27
ChProMa	3,205
ChMa	0,67
MaGlc	0,494

Najkiseliji DES je ChMa (0,67), dok najveću pH vrijednost ima BMa (3,27). Obzirom da je poznato da se antocijani razgrađuju pri pH vrijednosti > 7 (Castañeda-Ovando i sur., 2009), pH vrijednost odabranih DES-ova neće nepovoljno utjecati na stabilnost antocijana. Svi odabrani DES-ovi imaju pH vrijednosti u kiselom području što ih čini pogodnim otapalima za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa.

4.2. Adsorpcija i desorpcija antocijana na smoli Amberlite XAD-16

Antocijani se u posljednje vrijeme razmatraju kao tvari koje bi mogle naći primjenu u farmaceutskoj industriji zbog njihove visoke antioksidativne aktivnosti te zapaženog antitumorskog i protuupalnog djelovanja. U tu svrhu, neophodno je pronaći dobru metodu izdvajanja i koncentriranja antocijana iz ekstrakata koji su pripremljeni izluživanjem antocijana iz biljaka. Do sada korištene metode izolacije i pročišćavanja antocijana su ionska izmjena, šaržna adsorpcija i adsorpcija na smoli, a usporedbom navedenih metoda adsorpcija na smoli pokazala se najprikladnijom jer je najjeftinija, visoke je učinkovitosti i jednostavne izvedbe (Ma i sur., 2015). Svrha adsorpcije na smoli je povećanje učinkovitosti izdvajanja spojeva od interesa uz smanjenje utroška vremena i energije potrebne za proces ekstrakcije. Stoga je upravo ta metoda izabrana za izolaciju antocijana iz ekstrakata komine grožđa pripravljenih pomoću eutektičnih otapala. Nakon što su pripremljeni ekstrakti s pet DES-ova i određeni ukupni antocijani u ekstraktima, odvagano je 5 g smole Amberlite XAD-16 i napunjeno u staklenu kolonu. Prema dostupnim literaturnim navodima smola je pripremljena za uporabu (Wei i sur., 2015; Qi i sur., 2015; Li i sur., 2015) tako što je prvo isprana s deioniziranom vodom pri protoku 0,7 mL min^{-1}, a zatim 96%-tnim etanolom pri protoku 1,425 mL min^{-1} te opet deioniziranom vodom. Takav predtretman smole potreban je jer je smola pakirana s vezanim solima koje sprječavaju kontaminacije. Protoci su određeni prema radnom volumenu kolone (BV) (opisano u poglavlju 3.2.4.). Na tako pripremljenu smolu nanešen je ekstrakt. Ekstrakt je stajao pola sata na koloni i nakon toga je pri protoku 0,7 mL min^{-1} propušten kroz kolonu. Nakon nanošenja uzorka, kolona je ispirana s 3 BV (42,5 mL) deionizirane vode kojom se ispiru polarni sastojci DES-a, koji se nisu vezali na smolu, a potom su antocijani desorbirani s kolone etanolom (Wei i sur., 2015). U prvim pokusima izolacije antocijana adsorpcijom na Amberlite XAD-16 smolu optimiran je proces eluacije etanolom pri čemu su sakupljane frakcije od po 5 mL. Tada je zapaženo da su antocijani uvijek desorbirani u trećoj i četvrtoj etanolnoj frakciji što je potvrđeno i spektrofotometrijskim određivanjem ukupnih antocijana metodom opisanom u poglavlju 3.2.3. Također, zbog obojenja koje daju antocijani i vizualno su bile vidljive razlike u pojedinim frakcijama. Na temelju provedenog optimiranja, izolacije antocijana su provođene s 30 mL etanola, a ne prvotnih 3 BV tj. 42,5 mL. Korištena smola se nakon upotrebe može regenerirati i ponovno koristiti.

Učinkovitost razdvajanja antocijana na smoli razlikuje se ovisno o DES-u koji je korišten za pripremu ekstrakta (tablica 5). Najveći postotak iskorištenja (E) procesa izolacije

antocijana iz ekstrakata u DES-u ostvaren je kod pročišćavanja ekstrakta pripremljenog s MaGlc (85,36%), dok se najmanje iskorištenje postignuto pri izolaciji antocijana iz ekstrakta pripremljenog s ChMa (69,09%). Na temelju svih vrijednosti iskorištenja prikazanih u tablici 5 može se zaključiti da se primjenom Amberlite XAD-16 smole mogu uspješno izolirati antocijani iz ekstrakata pripravljenih primjenom DES-a, iako sam postupak zahtjeva daljnje optimiranje. Najveće iskorištenje procesa izolacije antocijana postignuto je s onim ekstraktima koji su sadržavali najmanje ukupnih antocijana što nam ukazuje na limitirajući faktor kapaciteta kolone, koji vjerojatno nije bio dovoljan za one ekstrakte kod kojih je bilo najviše ukupnih antocijana. Stoga će se u daljnjem razvoju i optimizaciji izolacije antocijana iz ovako pripravljenih ekstrakata nastojati koristiti smole većeg kapaciteta, što će svakako biti predmet naših daljnjih istraživanja.

Tablica 5. Iskorištenje procesa izolacije antocijana iz ekstrakata komine grožđa pripremljenih pomoću eutektičnih otapala *,**

Eutektično otapalo	m_e [mg]	m_{EtOH}[mg]	E[%]
ChCit	1,58	1,23	77,84
BMa	1,09	0,76	69,72
ChProMa	0,47	0,35	74,47
ChMa	1,10	0,76	69,09
MaGlc	0,41	0,35	85,36

*m_e[mg] = masa antocijana u ekstraktima; m_{EtOH}[mg] = masa antocijana u etanolnim eluatima nakon desorpcije antocijana s kolone; E[%] = iskorištenje procesa
**ChCit= ekstrakt pripravljen u kolin-klorid:limunska kiselina, MaGlc=ekstrakt pripravljen u jabučna kiselina:glukoza, ChProMa= ekstrakt pripravljen u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, ChMa= ekstrakt pripravljen u kolin-klorid:jabučna kiselina, BMa= ekstrakt pripravljen u betain:jabučna kiselina.

Općenito, antocijani se vežu na smolu zbog sličnosti u polarnosti antocijana i smole, a kapacitet desorpcije također ovisi o polarnosti otapala kojim se vrši desorpcija s kolone (Chen i sur., 2016). Polarnost same smole ovisi o monomerima korištenima za njenu sintezu ili kemijskom tretmanu polimera tijekom polimerizacije. Na stupanj iskorištenja procesa, osim polarnosti smole utječe i vrsta smole, njena aktivna površina i veličina pora. U radu Li i sur. (2010) testirano je više različitih smola pri čemu je XAD–7 imala najveći kapacitet za vezanje polifenola (239 mg g^{-1} smole), dok je najmanji utvrđen upravo za XAD-16 (16 mg g^{-1} smole). Mali kapacitet adsorpcije povezan je s malim porama i malom aktivnom površinom smole. Međutim, kapacitet adsorpcije i desorpcije obrnuto je proporcionalan, tj. ako je kapacitet adsorpcije veći, kapacitet desorpcije je manji, i obrnuto. Općenito, procesi adsorpcije i desorpcije su spontani i egzotermni tj. ovise prvenstveno o fizikalnim parametrima, a ne o

kemijskim (Chen i sur., 2016). U radu Chen i sur. (2016) utvrđeno je da Amberlite XAD-7HP smola ima najbolju učinkovitost adsorpcije/desorpcije antocijana. Adsorpcija polifenola na smolu vjerojatno ovisi i o pH vrijednosti ekstrakta, no to je potrebno pomnije istražiti budući da su Silva i sur. (2007) utvrdili da pH vrijednost ne utječe na vezanje, dok su Huang i sur. (2009) naveli optimalnu pH vrijednost za adsorpciju polifenola na smolu. Prema Li i sur. (2010) promjena pH vrijednosti utječe na vezanje polifenola na aktivnu površinu smole te je utvrđeno da se pri pH vrijednostima većim od 5 sposobnost adsorpcije polifenola smanjuje. Promjena pH vrijednosti može utjecati na interakcije između polifenola i aktivne površine smole. Na primjeru flavonoida objašnjeno je da polifenolne hidroksilne grupe kod određene pH vrijednosti disociraju na anione i sa smolom tvore vodikove veze (Li i sur., 2010). Iako su osnovni principi rada sa smolom, vezanja antocijana na smolu ovisno o kapacitetu smole, te parametri o kojima ovisi eluacija antocijana poznati, potrebna su daljnja istraživanja. Nužno je optimirati proces i ispitati kinetiku vezanja, iako je u dosadašnjim istraživanjima utvrđeno da je izoterma koja najbolje opisuje proces vezanja antocijana na smolu Langmuirova izoterma (Chen i sur., 2016).

Osim što je za izolaciju antocijana iz ekstrakta komine grožđa pripravljenih pomoću eutektičnih otapala potrebno koristiti smolu s većim kapacitetom vezanja kao što je XAD-7, za razvoj zelene ekstrakcije i održivost takvog procesa u ekološkom i ekonomskom smislu, potrebno je ispitati mogućnost regeneracije DES-ova nakon ispiranja s kolone te mogućnost njihove ponovne uporabe u procesu ekstrakcije. Do sada je objavljeno samo jedno istraživanje usmjereno k reciklaciji DES-a nakon ekstrakcije biološki aktivnih spojeva (Jeong i sur., 2015). U navedenom istraživanju postignuti su obećavajući rezultati, odnosno postotak reciklacije koja je provedena tri puta iznosio je 92%, 85% i 83%. Reciklacija DES-a provedena je tako da je nakon nanošenja na kolonu DES ispran s vodom, a voda je potom uklonjena liofilizacijom. Dobiveni DES je rehidratiran i korišten za ponovnu ekstrakciju. Rezultatima Jeong i sur. (2015) utvrđeno je da DES može biti recikliran najmanje tri puta s velikom učinkovitošću regeneracije i mogućnošću ponovne ekstrakcije. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se proširila znanja o reciklaciji i ponovnom korištenju eutektičnih otapala za ekstrakciju i izolaciju antocijana. Takva istraživanja su od iznimnog značaja, osobito ako se razmatra mogućnost industrijske primjene, jer bi reciklacijom DES-a bio ispunjen još jedan kriterij idealnog zelenog otapala.

4.4. Biološka aktivnost ukupnih antocijana u etanolnim eluatima

Nakon izolacije, adsorpcije i eluacije antocijana sa smole, određena je masena koncentracija ukupnih antocijana u etanolnim eluatima spektrofotometrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.2.3., a rezultati su prikazani u tablici 6. Vidljive su razlike u koncentraciji ukupnih antocijana u etanolinim eluatima, te da slijed količine ukupnih antocijana nije isti kao onaj određen za ekstrakte u DES-u (slika 13), što možemo povezati s različitim postotkom iskorištenja procesa izolacije te već spomenutim problemom kapaciteta kolone.

Tablica 6. Masene koncentracije antocijana u etanolnim eluatima *,**

Etanolni eluat	Masena koncentracija antocijana [mg mL^{-1}]
ChCit	40,979
BMa	53,813
ChProMa	8,458
ChMa	25,083
MaGlc	11,958

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

**ChCit= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u kolin klorid:limunska kiselina, BMa= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u betain:jabučna kiselina, ChProMa= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, ChMa= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u kolin klorid:jabučna kiselina, MaGlc= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u jabučna kiselina:glukoza

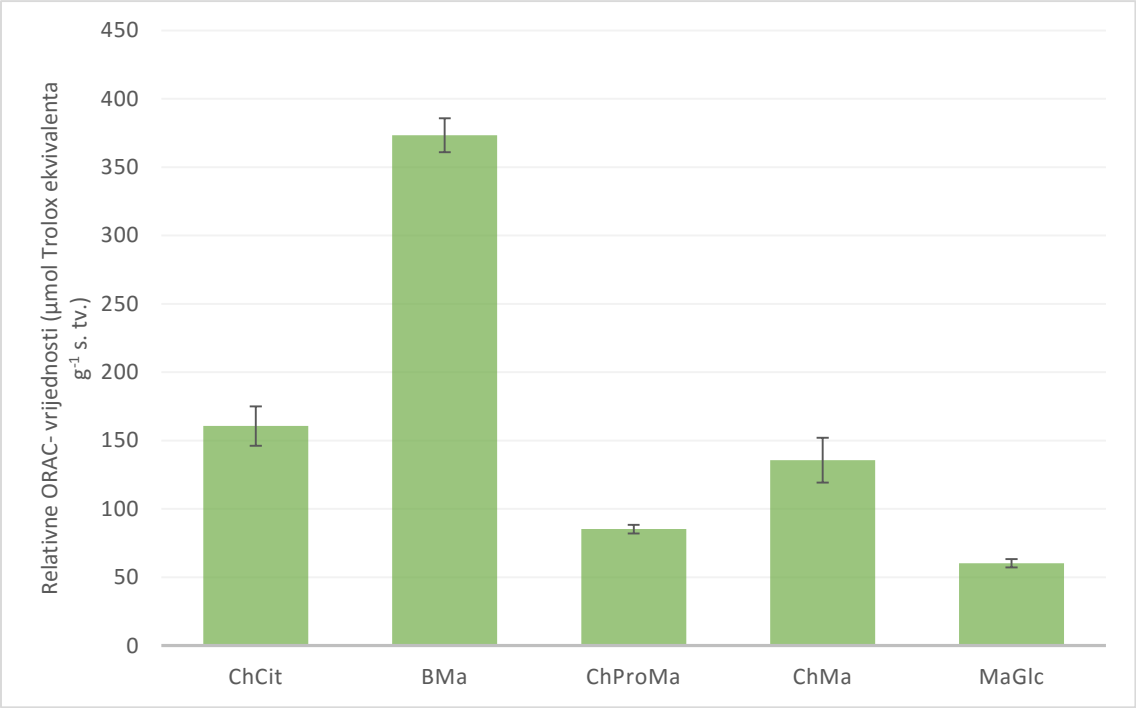
Biološka aktivnost antocijana i njihov mehanizam djelovanja poznat je iz literature (Hou i sur., 2003; Kong i sur.,2003; Miguel i sur., 2011). Kako bi se potvrdila biološka aktivnost antocijana u etanolnim eluatima određen je njihov antioksidacijski kapacitet primjenom ORAC metode i ispitana je biološka učinkovitost na tri humane stanične linije, od kojih su dvije tumorske HeLa i MCF-7, a treća je podrijetlom iz zdravog tkiva HEK293T.

4.4.1. Antioksidacijski kapacitet antocijana u etanolnim eluatima

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta prirodnih spojeva u hrani i biološkim sustavima danas postoji niz standardiziranih metoda, koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja antioksidansa, poput uklanjanja ili inhibicije slobodnih radikala ili keliranja metalnih iona, koji bi u suprotnom doveli do nastajanja slobodnih radikala. U ovom radu korištena je ORAC metoda, koja se smatra jednom od najboljih metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta. Prednosti ove metode su što se odvija u području fiziološkog pH

i pri temperaturi od 37 °C te se koristi peroksil radikal s redoks potencijalom i reakcijskim mehanizmom sličnom onome kakav se odvija u našem organizmu.

ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet (AUC) izoliranih antocijana u etanolnim eluatima. Rezultati analize odnosno pripadajuće ORAC vrijednosti, izražene u ekvivalentima Troloxa tj. kao μmol TE g^{-1} s.tv., prikazani su na slici 14.



Slika 14. Relativne ORAC-vrijednosti za analizirane etanolne eluate antocijana * ,**

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

**ChCit= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u kolin klorid:limunska kiselina, BMa= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u betain:jabučna kiselina, ChProMa= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, ChMa= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u kolin-klorid:jabučna kiselina, MaGlc= etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog u DES-u jabučna kiselina:glukoza.

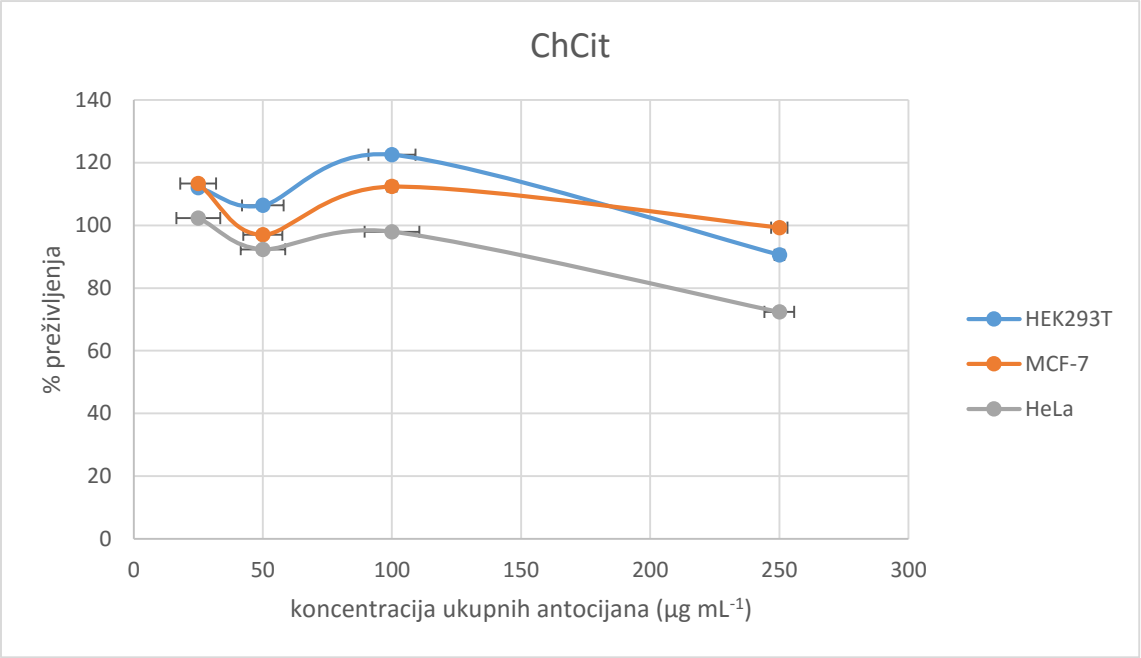
Iz slike 14 vidljivo je da su ORAC vrijednosti određene za etanolne eluate antocijana u širokom rasponu od 60,22614 do 373,39199 μmol Troloxa po gramu suhe tvari, pri čemu je najveća ORAC vrijednost određena za BMa pa zatim kako slijedi ChCit>ChMa>ChProMa>MaGlc. ORAC vrijednosti određene za etanolne eluate u skladu su s koncentracijom ukupnih antocijana (tablica 6), odnosno što je veća količina ukupnih antocijana veći je i antioksidacijski kapacitet etanolnih eluata. Miguel (2011) je dokazao da antioksidativna aktivnost antocijana ovisi o broju hidroksilnih grupa antocijana te da se vezanjem antocijana sa šećerima povećava njihova otpornost prema oksidaciji.

Također, ukazuje na činjenicu da antioksidacijski kapacitet ovisi o stabilnosti antocijana stoga je nužno u daljnjim istraživanjima ispitati stabilnost antocijana u etanolnim eluatima.

4.4.2. Učinak etanolnih eluata antocijana na MCF-7, HeLa i HEK293T stanične linije

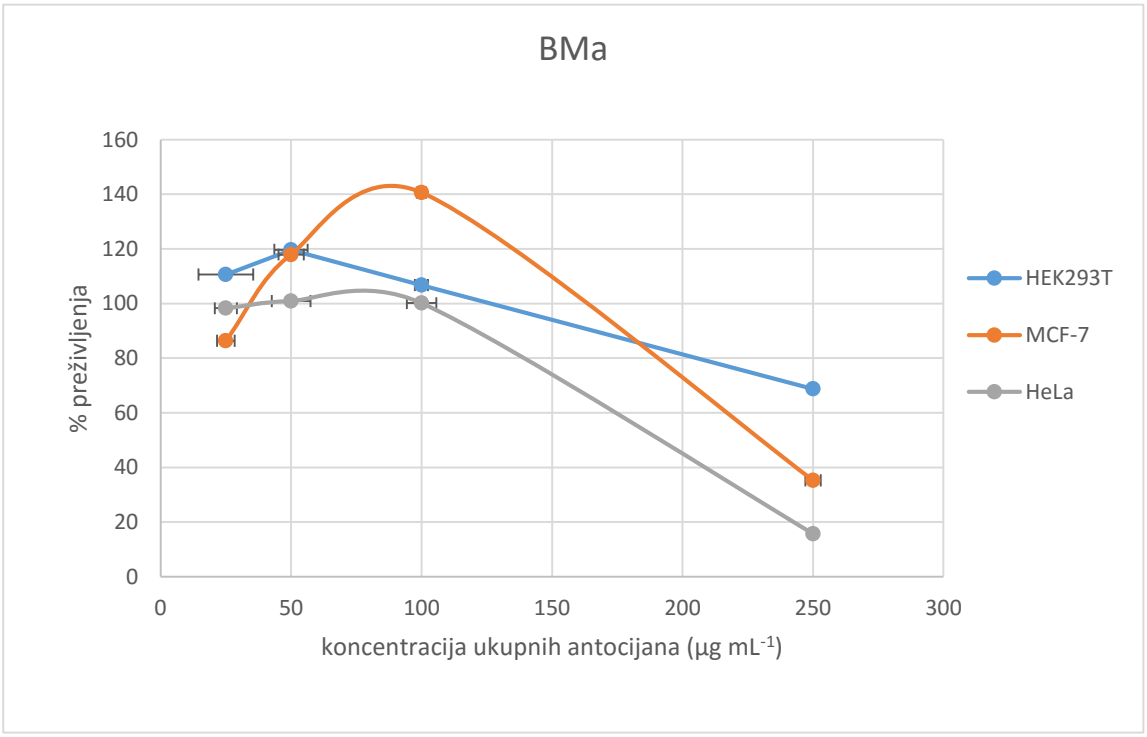
In vitro testovi služe kao preliminarni testovi za ispitivanje biološke aktivnosti spojeva koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi (prirodne komponente ili ekstrakti). Tako dobiveni rezultati mogu dati smjernice za daljnja *in vivo* istraživanja te omogućavaju bolje planiranje eksperimenta i korištenje manjeg broja laboratorijskih životinja. EU regulativa REACH (EC 1907/2006; engl. *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances*) ističe važnost primjene *in vitro* modela, budući da ovaj pristup smanjuje primjenu laboratorijskih životinja u toksikološkim ispitivanjima. Primjena kulture životinjskih stanica u praćenju toksičnih učinaka različitih kemikalija predstavlja alternativni pristup u znanostima o okolišu; metoda je jednostavna, brza i jeftina. Kod provođenja *in vitro* testova toksičnosti, najčešće se određuje bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu.

S obzirom da niz epidemioloških i znanstvenih istraživanja ukazuju na pozitivne zdravstvene učinke antocijana, u ovom radu provedeno je ispitivanje djelovanja izoliranih antocijana u etanolnim eluatima na rast dvije tumorske humane stanične linije HeLa i MCF-7 te normalnu staničnu liniju HEK293T. Stanice su izložene djelovanju navedenih eluata u rasponu koncentracija od 25 $\mu g\ mL^{-1}$ do 250 $\mu g\ mL^{-1}$ tijekom 72 sata. Postotak preživljenja tretiranih stanica određen je primjenom MTS metode i izražen u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Prema našim saznanjima u dostupnoj znanstvenoj literaturi još nisu ispitani i objavljeni rezultati *in vitro* učinka izoliranih antocijana primjenom smole. Pretpostavili smo da će učinak etanolnih eluata biti u korelaciji s koncentracijom ukupnih antocijana u pojedinom uzorku. Rezultati testova citotoksičnosti na MCF-7, HeLa i HEK293T stanicama prikazani su na slikama 15-19.



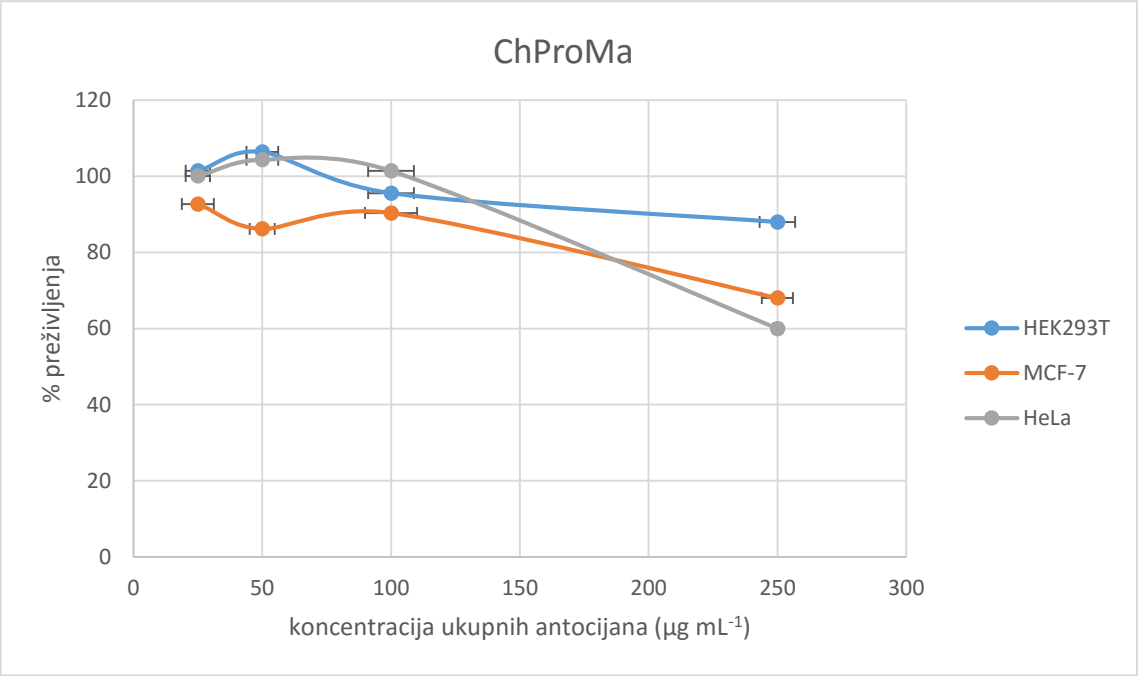
Slika 15. Učinak etanolnog eluata antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu ChCit na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanicama

Na temelju rezultata prikazanih na slici 15 može se uočiti da etanolni eluat antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu ChCit ima inhibitoran učinak na proliferaciju HeLa stanica. Na stanice HEK293T i MCF-7 niti pri najvećoj koncentraciji od 250 µg mL^{-1} nema citotoksičnog učinka.



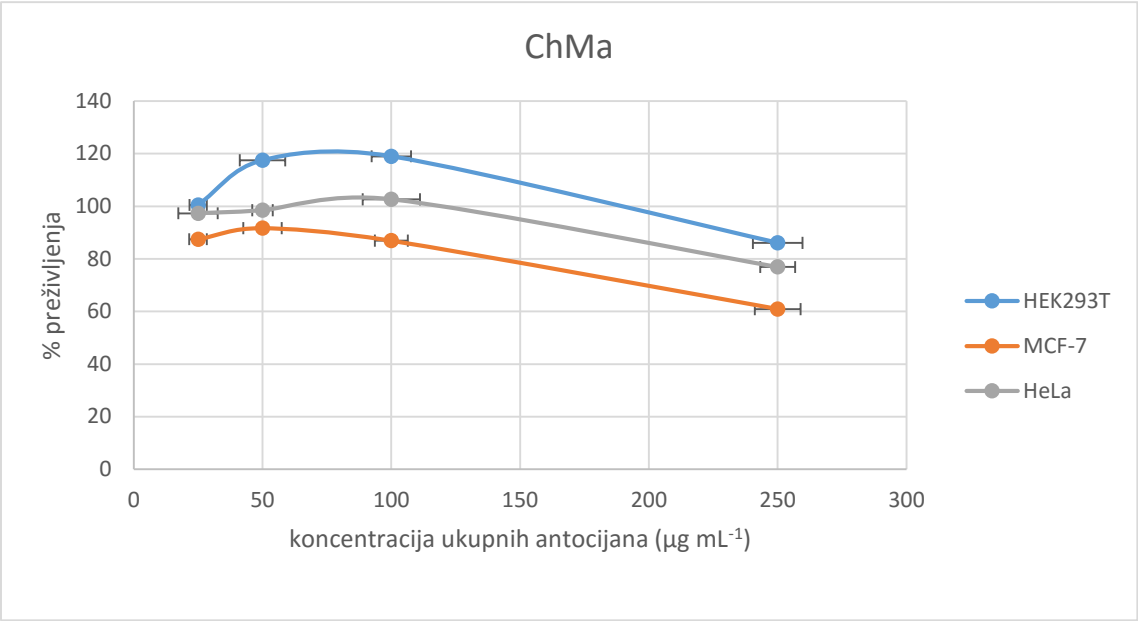
Slika 16. Učinak etanolnog eluata antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu BMa na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanice

Iz rezultata prikazanih na slici 16 vidljivo je da etanolni eluat antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu BMa ima jaki citotoksični učinak na proliferaciju sve 3 stanične linije te da je taj učinak ovisan o koncentraciji. Pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (250 μg mL^{-1}) postotak preživljenja HEK293T stanica je veći nego za MCF-7 i HeLa stanice.



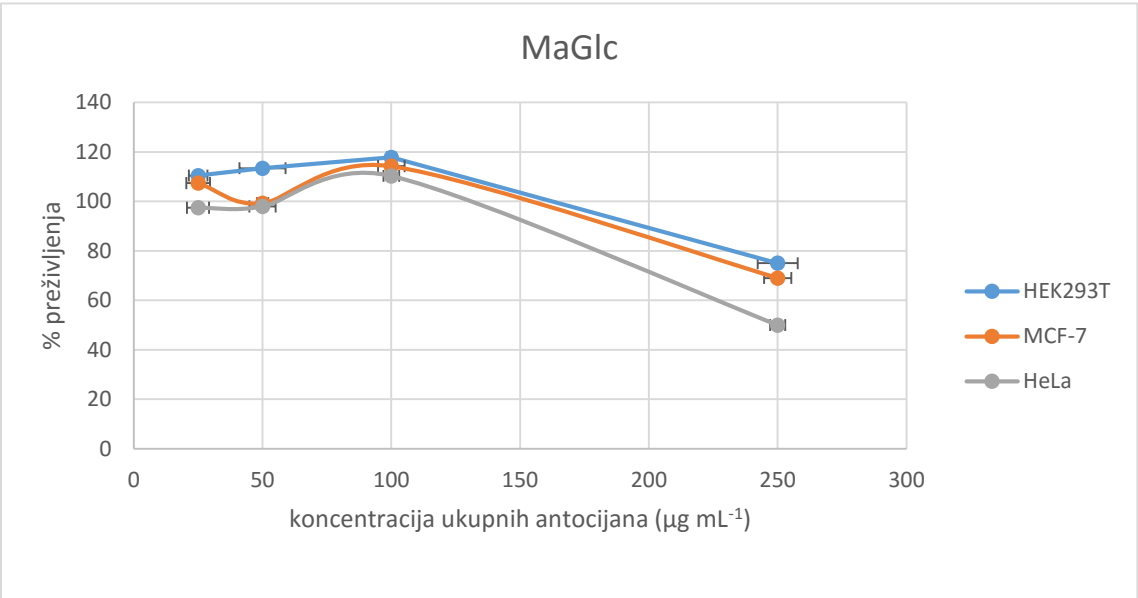
Slika 17. Učinak etanolnog eluata antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu ChProMa na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanice

Na temelju rezultata prikazanih na slici 17 može se uočiti da etanolni eluat antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu ChProMa ima sličan učinak na rast HEK293T, MCF-7 i HeLa stanica, a najveći postotak inhibicije zapažen je kod HeLa stanica tretiranih s koncentracijom 250 μg mL^{-1}.



Slika 18. Učinak etanolnog eluata antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu ChMa na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanice

Na temelju rezultata prikazanih na slici 18 može se uočiti da je kod etanolnog eluata antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa, pripravljenog u eutektičnom otapalu ChMa, najveći postotak preživljenja pri svim ispitanim koncentracijama vidljiv kod HEK293T stanica u odnosu na preostale dvije tumorske stanične linije, što je svakako dobar i zanimljiv rezultat u smislu antitumorskog djelovanja antocijana.



Slika 19. Učinak etanolnog eluata antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu MaGlc na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanicama

Na temelju rezultata prikazanih na slici 19 može se uočiti da etanolni eluat antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu MaGlc ima sličan učinak i ovisnost o primijenjenoj koncentraciji kod sve tri stanične linije, s time da su se i ovdje HeLa stanice pokazale najosjetljivijima.

Na slikama 15-19 prikazan je učinak izoliranih antocijana u etanolnim eluatima na HEK293T, MCF-7 i HeLa stanicama. Kod većine etanolnih eluata možemo zapaziti pojavu kemijske hormeze, fenomena kojeg karakterizira stimulatorno djelovanje pri niskim dozama ispitivane tvari, odnosno inhibitorno djelovanje pri višim koncentracijama ispitane tvari (Calabrese i Baldwin, 2003). Zapaženo inhibitorno djelovanje antocijana pri višim koncentracijama ovisno je o koncentraciji, odnosno veći je postotak inhibicije što je koncentracija veća. Svi etanolni eluati pri najvećoj koncentraciji (250 μg mL^{-1}) su rezultirali većim postotkom preživljenja HEK293T stanica nego MCF-7 i HeLa stanica, što je pozitivan rezultat obzirom na pretpostavljenu i u literaturi opisanu antitumorsku aktivnost antocijana (Hou i sur., 2003; Kong i sur.,2003; Miguel i sur., 2011). U ovom radu najosjetljivijom se pokazala HeLa stanična linija. Sveukupno, najjači citotoksični učinak na sve tri stanične linije zapažen je pri tretmanu etanolnim eluatom antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu BMa (250 μg mL^{-1}) gdje je inhibicija rasta iznosila oko 85% na HeLa, 65% na MCF-7 i 30% na HEK293T stanicama (slika 16).

Biološka aktivnost antocijana opisana je u literaturi te su poznati mehanizmi njihovog protuupalnog, antioksidativnog i antitumorskog djelovanja u kojima su kao modelni sustavi korištene transformirane ili tumorske stanične linije (Kšonžekova i sur., 2015). Dokazano je da antocijani iz crvenog vina inhibiraju rast HCT-15 stanica raka debelog crijeva i AGS stanica raka želuca. Osim toga, dokazano je i da antocijani imaju protektivni učinak na ugljikovim tetrakloridom inducirano oštećenje jetre štakora (Kong i sur., 2003). Antocijani kao prirodni antioksidansi pokazali su se korisnima i u kontroliranju oksidativnog stresa tijekom komplikacija u trudnoći (Kong i sur., 2003). Dosadašnja istraživanja biološke aktivnosti antocijana provedena su s ekstraktima bogatim antocijanima ili hranom bogatom antocijanima, ali biološki učinak izoliranih antocijana nije do sada opisan, stoga su rezultati prikazani u ovom radu, a koji su u skladu s literaturnim navodima o inhibitornom učinku antocijana na rast tumorskih stanica, vrijedni.

U daljnjim istraživanjima, potrebno je identificirati i kvantificirati profil antocijana u svakom etanolnom eluatu pomoću vanjskog standarda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, kako bi se dobiveni rezultati mogli bolje objasniti i vidjeti kako na biološku aktivnost dobivenih i ispitanih etanolnih eluata utječe kvantitativni i kvalitativni sastav prisutnih antocijana. Također, pri optimiranju izolacije antocijana na makroporoznoj smoli trebalo bi otpariti etanol, kako bi dobili koncentriranije otopine te spriječili moguću razgradnju antocijana u etanolu.

U ovom radu prikazani su preliminarni rezultati ekstrakcije antocijana pomoću pet eutektičnih otapala, izolacije antocijana na Amberlite XAD-16 smoli te njihove biološke aktivnosti na trima staničnim linijama. Obzirom na rezultate prikazane u ovom radu smatramo da će daljnja optimizacija ekstrakcije spojeva iz komine grožđa primjenom eutektičnih otapala, izolacija antocijana na smoli i istraživanja njihove biološke aktivnosti primjenom *in vitro* metoda pridonijeti razvoju moguće primjene u ljudi, što će svakako biti predmet daljnjih istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Uspješno je sintetizirano pet eutektičnih otapala koja su primijenjena za ekstrakciju antocijana iz komine grožđa. U pripremljenim ekstraktima određena je ukupna koncentracija antocijana te se prema tome najučinkovitijim DES-om za ekstrakciju antocijana pokazalo otapalo kolin klorid:prolin:jabučna kiselina. Iz svih pripravljenih ekstrakata izolirani su antocijani primjenom makroporozne smole Amberlite XAD-16 uz iskorištenja procesa od 68,89% do 85,23%.
2. Određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom pokazano je da je antioksidacijski kapacitet etanolnih eluata izoliranih antocijana u korelaciji s ukupnim antocijanima te da je ORAC vrijednost veća što je je više antocijana u etanolnom eluatu. Etanolni eluat antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenog u eutektičnom otapalu betain:jabučna kiselina ima najvišu ORAC vrijednost i najveću masenu koncentraciju antocijana.
3. MTS metodom ispitan je *in vitro* učinak etanolnih eluata antocijana izoliranih iz ekstrakta komine grožđa pripravljenih primjenom eutektičnih otapala. Najjači učinak na proliferaciju HeLa, MCF-7 i HEK293T stanica imao je etanolni eluat izoliranih antocijana iz ekstrakta pripravljenog pomoću eutektičnog otapala betain:jabučna kiselina pri najvećoj ispitanoj koncentraciji antocijana (250 $\mu g\ mL^{-1}$).
4. Preživljenje stanica tretiranih etanolnim eluatima najveće je kod HEK293T stanica, u odnosu na humane tumorske stanične linije HeLa i MCF-7, što ukazuje na antitumorski učinak izoliranih antocijana.

6. LITERATURA

Anonymous (2005) Choline chloride (Screening Information Data Set - SIDs), <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/67481.pdf>. Pristupljeno 20 travnja, 2016.

Antoniolli, A., Piccoli, P., Fontana, A. R., Bottini, R. (2015) Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem.* **78**, 172-178.

Borenfreund, E., Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **24**, 119-124.

Buran, T. J., Sandhu, A. K., Li, Z., Rock, C. R., Yang, W. W., Gu, L. (2014) Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *J. Food. Eng.* **128**, 167-173.

Calabrese, E. J., Baldwin, L. A. (2002) Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* **7**, 331-337.

Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 303-311.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*. **113**, 859–871.

Chen, Y., Zhang, W., Zhao, T., Li, F., Zhang, M., Li, J., Zou , Y., Wang, W., Cobbina, S. J., Wu, X., Yang, L. (2016) Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry. *Food Chem.* **194**, 712-722.

Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.* **200**, 159-166.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **99**, 1–12.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green Solvents for Green Technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631-1639.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61-68.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013b) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem*. **85**, 6272− 6278.

EFSA (2011) Scientific Opinion on safety and efficacy of choline chloride as a feed additive for all animal species. EFSA - European Food Safety Authority, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2353>. Pristupljeno 25. ožujka 2016.

Ekwall, B. (1995) The basal cytotoxicity concept. U: Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences (Goldberg, A., van Zupthen, L., ured.). The World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Research, Testing **11**. Mary Ann Libert, New York, str. 721-725.

Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessement of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and enviromental samples. *Toxicol. in Vitro* **15**, 477-488.

Ferri, M., Bin, S., Vallini, V., Fava, F., Michelini, E., Roda, A., Minnucci, G., Bucchi, G., Tassoni, A. (2015) Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *New Biotechnol.* **33**, 338-344.

Fischer, V. (2015) Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents and Low-Melting Mixtures, Doktorska disertacija, University of Regensburg.

Fontana, A. R., Antoniolli, A., Bottini, R. (2016) Development of a high-performance liquid chromatography method based on a core–shell column approach for the rapid determination of multiclass polyphenols in grape pomaces. *Food Chem.* **192**, 1-8.

Georgiev, V., Ananga, A., Tsolova, V. (2014) Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients* **6**, 391-415.

Gorke, J. T. (2010) Application of deep eutectic solvents and ionic liquids to hydrolase-catalyzed reactions, Doktorska disertacija, University of Minnesota.

Gouveia, W., Jorge, T. F., Martins, S., Meireles, M., Carolino, M., Cruz, C., Almeida, T. V., Araújo, M. E. M. (2014) Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere* **104**, 51–56.

Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193– 2195.

Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E. S. (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455-459.

Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A. (2015,13. veljače) *In vitro* and *in vivo* toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PLoS ONE* **10**(2), e0117934. doi:10.1371/journal.pone.0117934

Hou, D. X. (2003) Potential Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Anthocyanins. *Curr. Mol. Med.* **3**, 149-159.

Hou, X. D., Liu, Q. P., Smith, T. J., Li, N., Zong, M. H. (2013, 15. ožujka) Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Cholinium Amino Acids Ionic Liquids. *PLoS ONE* **8**(3), e59145. doi:10.1371/journal.pone.0059145

Huang, J., Huang, K., Liu, S. (2009) Tertiary amino groups modified macroporous crosslinked poly(styrene-*co*-divinylbenzene) and its oxidized adsorbent: Synthesis, characterization, and adsorption behavior. *J. Hazard. Mater.* **162**, 771-776.

Jaganath, I. B., Crozier A. (2010) Dietary flavonoids and phenolic compounds. U: Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology [online] (Fraga, C. G., ured.), John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, str. 1 – 51, <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470531789.html>. Pristupljeno 3. travnja 2016.

Jeong, K. M., Lee, M. S., Nam, M. W., Zhao, J., Jin, Y., Lee, D. K., Kwon, S. W., Jeong, J. H., Lee, J. (2015) Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media. *J. Chromatogr. A* **1424**, 10-17.

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A. (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 4360-4367.

Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-933.

Kšonžeková, P., Mariychuk, R., Eliašová, A., Mudronová, D., Csank, T., Király, J., Marcincáková, J., Pistl, J., Tkáciková, L. (2015) *In vitro* study of biological activities of anthocyanin-rich berry extracts on porcine intestinal epithelial cells. *J Sci Food Agric* [online] **96,** 1093–1100. Wiley Online Library, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.7181/abstract>. Pristupljeno 15. ožujka 2016.

Kudłak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11975 – 11992.

Li, J., Chase, H. A. (2010) Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat. Prod. Rep.* [online] **27**, 1493-1510. doi: 10.1039/c0np00015a

Li, J., Han, Z., Zou, Y., Yu, B. (2015) Efficient extraction of major catechins in *Camellia sinensis* leaves using green choline chloride-based deep eutectic solvents. *RSC Adv.* [online] **5**, 93937-93944. doi: 10.1039/C5RA15830C

Lila, M. A. (2004) Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *J. Biomed. Biotechnol*. **5**, 306-313.

Ma, T., Hu, N., Ding, C., Zhang, Q., Li, W., Suo, Y., Wang, H., Bai, B., Ding, C. (2015) *In vitro* and *in vivo* biological activities of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. Fruits. *Food Chem.* **194**, 296-303.

Matzke, M., Stolte, S., Thiele, K., Juffernholz, T., Arning, J., Ranke, J., Welz-Biermann, U., Jastorff, B. (2007) The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. *Green Chemm*. **9**, 1198-1207.

Mazor Jolić S., Radojčić Redovniković, I., Marković, K., Ivanec Šipušić, Đ., Delonga, K. (2011) Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46**, 1793-1800.

McDougall, G. J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. (2005) Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *J. Agric. Food Chem*. **53**, 5896-5904.

Miguel, M. G. (2011) Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *J. App. Pharm.* [online] **01**, 7-15. < http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/117_pdf.pdf >. Pristupljeno 15. ožujka 2016.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* **65,** 55-63.

Murati, T., Šimić, B., Kniewald, J., Kmetič, I. (2013) Endocrine Disruptors and Animal-Free Toxicology. U: Annual of the Croatian Academy of Engineering 2013, (Kniewald, Z., ured.), str. 103-116.

Nam, M. W., Zhao, J., Lee, M. S., Jeong, J. H., Lee J. (2015). Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Green Chem.* **17**, 1718-1727.

Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents − Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem. Eng*. **2**, 1063–1071.

Prior R. L., Wu X. (2006) Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Rad.Res*. **40,** 1014-1028.

Qi, X. L., Peng, X., Huamg, Y. Y., Li, L., Wei, Z. F., Zu, Y. G., Fu, Y. J. (2015) Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment. *Ind. Crop. Prod.* **70**, 142-148.

Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.*, **112**, 46-53.

Ramirez-Tortosa C., Andersen O. M., Gardner P. T., Morrice P. C., Wood S. G., Duthie S. J., Collins A. R., Duthie G. G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radical Biol. Med.* **31**, 1033-1037.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal. Paris.* **48,** 188-196.

Rockenbach, I. I., Gonzaga, L. V., Rizelio, V. M., Schmidt Gonçalves, A. E. S., Genovese, M. I., Fett, R. (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res. Int.* **44**, 897-901.

Silva, E. M., Pompeu, D. R., Larondelle, Y., Rogez H. (2007) Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology. *Sep. Purif. Technol.* **53**, 274-280.

Tang, B., Zhang, H., Row, K. H. (2015) Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J. Sep. Sci.* **38**, 1053-1064.

Tsuda T., Shiga K., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T. (1996) Inibhition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol* **52**, 1033-1039.

Ventura, S. P. M., Silva, F. A., Gonçalves, A. M. M., Pereira, J. L., Gonçalves, F., Coutinho, J. A. P.,(2014) Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotox. Environ. Safe.* **102**, 48–54.

Wei, Z. F., Wang, X. Q., Peng, X. Wang, W., Zhao, C. J., Zu, Y. G., Fu, Y. J. (2015) Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*. *Ind. Crop. Pro.* **63**, 175-181.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 622-646.