Priprava i ekotoksikološka karakterizacija prirodnih eutektičnih otapala

Fiolić, Iva

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:159:909030

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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, rujan 2016.

Iva Fiolić

628/MB

PRIPRAVA I EKOTOKSIKOLOŠKA KARAKTERIZACIJA PRIRODNIH EUTEKTIČNIH OTAPALA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr.sc. Kristine Radošević u sklopu HRZZ projekta br. 9550 „Zelena otapala za zelene tehnologije“.

Veliku zahvalnost želim izraziti svojoj mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević te izv. prof . dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković koje su mi omogućile opremu i materijale i svojim savjetima pomogle u izradi mog diplomskog rada, i što su uvijek imale strpljenja i vremena za moje brojne upite.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim prijateljima, posebno članovima PBF familije, i obitelji uz koje je moje studiranje bilo lakše i koji su uvijek bili uz mene.

Najveću zahvalu iskazujem svojim roditeljima koji su uz mene bili i u sretnim i u teškim trenucima i nikada nisu sumnjali u moje vrijednosti i sposobnosti.

Velika hvala svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Priprava i ekotoksikološka karakterizacija prirodnih eutektičnih otapala

Iva Fiolić, 628/MB

Sažetak: Prirodna eutektična otapala definiraju se kao smjese akceptora i donora vodikove veze čija temperatura tališta je mnogo niža od temperature tališta pojedinačnih komponenata smjese. Posjeduju slična fizikalno-kemijska svojstva kao tradicionalne ionske kapljevine, ali su mnogo jeftinija i ekološki prihvatljivija. Zbog mogućnosti priprave prirodnih eutektičnih otapala iz velikog broja različitih ishodnih tvari moguće je prilagoditi njihova svojstva željenoj primjeni. U ovom radu pripravljeno je osam eutektičnih otapala u različitim molarnim omjerima (kolin klorid: sorbitol, kolin klorid: ksilitol, limunska kiselina: prolin, limunska kiselina: glukoza, jabučna kiselina: glukoza, betain: glukoza, betain: jabučna kiselina: prolin, betain: jabučna kiselina:glukoza) i ispitan je njihov utjecaj na preživljenje HeLa i HEK293T humane stanične linije te je izmjeren antioksidacijski kapacitet pet otapala ORAC metodom. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da ispitana prirodna eutektična otapala nemaju inhibitorni učinak na stanične linije te posjeduju antioksidacijska svojstva.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, citotoksičnost, humane stanične linije, prirodna eutektična otapala

Rad sadrži: 41 stranica, 15 slika, 1 tablica, 56 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. Izv.prof. dr.sc. Ivana Kmetič
4. Izv. prof. dr.sc. Ksenija Durgo (zamjena)

Datum obrane: Rujan, 2016

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 and ecotoxicological characterization of natural deep eutectic solvent

Iva Fiolić, 628/MB

Abstract: Natural deep eutectic solvents are defined as mixture of acceptor and hydrogen bond donor whose melting temperature is much lower than the melting temperatureof the individual components of the mixture. They possess similar physical and chemical properties as traditional ionic liquids, but they are much cheaper and environmentally friendly. Due to the possibility of formation natural deep eutectic solvents from a wide range of individual compounds it is possible to adjust their properties to particular application. In this study, eight eutectic deep solvents were prepared in different molar ratios (choline chloride: sorbitol, choline chlorid: xylitol, citric acid: proline, citric acid: glucose, malic acid: glucose, betaine: glucose, betaine: malic acid: proline, betaine: malic acid: glucose) and examined their effect on survival of HeLa and HEK293T human cell lines. Also, the antioxidant capacity of five natural deep eutectic solvents was measured by ORAC method. Based on the results, we can conclude that examined natural deep eutectic solvents have no inhibitory effect on the cell lines and possess antioxidant properties.

Keywords: antioxidative capacity, cytotoxicity, human cell lines, natural deep eutectic solvents

Thesis contains: 41 pages, 15 figures, 1 table, 56 references

Original in: Croatian

Final work 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. Ivana Kmetič, Associate professor
4. PhD. Ksenija Durgo, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September, 2016

SADRŽAJ

1.UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Eutektična otapala 3

2.1.1. Prirodna eutektična otapala 4

2.1.2. Svojstva eutektičnih otapala 5

2.1.3. Primjena eutektičnih otapala 7

2.1.4. *In vitro* ispitivanje toksičnosti 10

2.1.4.1. Citotoksičnost DES 11

2.1.5. Antioksidacijska aktivnost prirodnih eutektičnih otapala 13

3. MATERIJALI I METODE 15

3.1. Materijali 15

3.1.1. Kemikalije 15

3.1.2. Otopine i puferi 16

3.1.3. Humane stanične linije 16

3.1.4. Uređaji i oprema 18

3.2. Metode rada 18

3.2.1. Priprava eutektičnih otapala 18

3.2.2. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala na HeLa i HEK293T stanične linije 19

3.2.2.1. Uzgoj i nacjepljivanje stanica 19

3.2.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan- plavo 20

3.2.2.3. Test citotoksičnosti 21

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom 22

3.3. Obrada podataka 24

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1. *In vitro* djelovanje NADES na HeLa i HEK293T stanične linije 26

4.1.1. *In vitro* djelovanje NADES baziranih na kolin kloridu na HeLa i HEK293T stanične linije 26

4.1.2. *In vitro* djelovanje NADES s organskim kiselinama na HeLa i HEK293T stanične linije 28

4.1.3. *In vitro* djelovanje NADES koji sadrže betain na HeLa i HEK293T stanične linije 30

4.2. Antioksidacijski kapacitet prirodnih eutektičnih otapala 32

5. ZAKLJUČCI 35

6. LITERATURA 36

1. UVOD

Gospodarski razvoj, napredak znanosti i tehnologije uzrokovao je narušavanje prirodnog okruženja i onečišćenje prirode. Grana kemije pod nazivom Zelena kemija bavi se pronalaženjem ravnoteže između primjene prirodnih resursa, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša. U današnje vrijeme sve se više istražuju, osmišljavaju i razvijaju kemijski proizvodi i procesi kojima se smanjuje uporaba i proizvodnja sastojaka opasnih po okoliš i zdravlje. Jedno od načela Zelene kemije je pronalaženje i ispitivanje novih alternativnih reakcijskih smjesa, netoksičnih i obnovljivih otapala kao što su voda, ionske kapljevine i superkritične tekućine. Tako su otkrivena eutektična otapala koja imaju potencijal kao zamjena za opasna organska otapala čija je uporaba široko rasprostranjena.

Ionske kapljevine (*eng.* Ionic Liquids, ILs) su organske soli s temperaturom tališta nižom od 100 °C. Postoje tzv. četiri generacije ionskih kapljevina, a eutektična otapala pripadaju četvrtoj generaciji ILs. Eutektična otapala (*eng.* Deep Eutectic Solvents, DES) su smjese koje se sastoje od 2 ili 3 jeftine i sigurne komponente koje međusobno stupaju u interakcije vodikovim vezama. Kao rezultat tih njihovih interakcija dobiva se otapalo čija je temperatura tališta (T_m) niža od temperature tališta induvidualnih komponenata smjese. Pojedinačne komponente, koje se koriste za sintezu DES-a, najčešće su primarni metaboliti poput aminokiselina, organskih kiselina, ugljikohidrata, derivata kolina i uree pa se zbog toga još nazivaju i prirodnim eutektičnim otapalima (*eng.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). Ono što karakterizira NADES su niska cijena, biodostupnost, biorazgradivoost, netoksičnost i mogućnost reciklacije te su upravo zbog navedenih svojstva sve češće predmet znanstvenih istraživanja. Zbog spomenute netoksičnosti i biorazgradivosti prirodnih spojeva koji se koriste kao ishodne tvari za sintezu eutektičnih otapala, ona su izuzeta od registracije prema REACH propisima, no dosadašnja znanstvena istraživanja pokazala su da ne može biti zanemaren singeristički efekt zbog kojeg toksičnost smjese može biti veća nego toksičnost induvidualnih komponenata. Prema tome, toksičnost NADES-a treba ispitati prije njihove šire primjene u industrijskom mjerilu stoga je ekotoksikološki profil eutektičnih otapala trenutno predmet istraživanja mnogih znanstvenika.

Kako bi zeleno otapalo bilo kvalificirano kao zeleni medij potrebno je zadovoljiti uvjete i provesti različita testiranja da se ujedno pokaže i njihova sigurna uporaba. Cilj ovog

rada bila je priprava i biološka karakterizacija osam NADES-a (kolin klorid: sorbitol, kolin klorid: ksilitol, limunska kiselina: prolin, limunska kiselina: glukoza, jabučna kiselina: glukoza, betain: glukoza, betain: jabučna kiselina: prolin, betain: jabučna kiselina:glukoza) i ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta pet NADES-a (limunska kiselina: glukoza, limunska kiselina: prolin, jabučna kiselina: glukoza, betain: jabučna kiselina: prolin, betain: jabučna kiselina: glukoza). Biološka karakterizacija, odnosno, ispitivanje citotoksičnosti provedeno je *in vitro* na humanim stanicama HeLa i HEK293T, dok je antioksidacijski kapacitet izmjeren metodom mjerenja kapaciteta apsorbancije kisikovih radikala (*eng*. Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC).

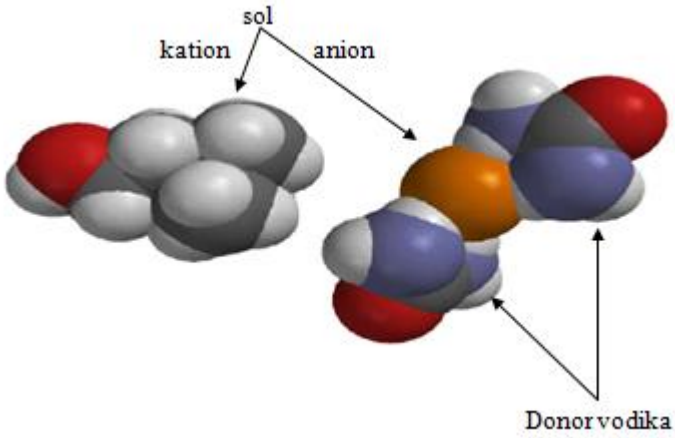
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Eutektična otapala

U posljednja dva desetljeća, eutektična otapala privukla su pažnju mnogih znanstvenika i objavljen je veliki broj istraživačkih radova u tom području. Ionska otapala su otopljene soli, tekućine na sobnoj temperaturi čiji veliki potencijal za primjenu proizlazi iz specifičnih karakteristika, pogotovo povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava kao što su viskoznost, gustoća, hidrofilnosti i topljivost (Paiva i sur., 2014). Iako su u znanstvenoj literaturi opisani brojni uspješni primjeri uporaba ionskih kapljevina u različitim procesima, ovi spojevi zbog visoke cijene i nedostatka podataka o njihovom utjecaju na ljude i okoliš,do sada nisu našli širu komercijalnu primjenu (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Danas su alternativa ionskim kapljevinama, eutektična otapala (DES) koja se smatraju četvrtom generacijom ionskih kapljevina, iako to zapravo nije u potpunosti točno i riječ je o dvije vrste alternativnih otapala.

Eutektična otapala su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika (HBD, eng. *Hydrogen Bonding Donor*) (Gorke i sur., 2010) gdje su komponente povezane jakim vodikovim vezama (slika 1). S obzirom da različite komponente mogu tvoriti eutektična otapala, postoje četiri tipa DES-a:

1) Metalna sol + organska sol
2) Hidrat metalne soli + organska sol
3) Organska sol + donor vodikove veze
4) Metalni klorid + donor vodikove veze



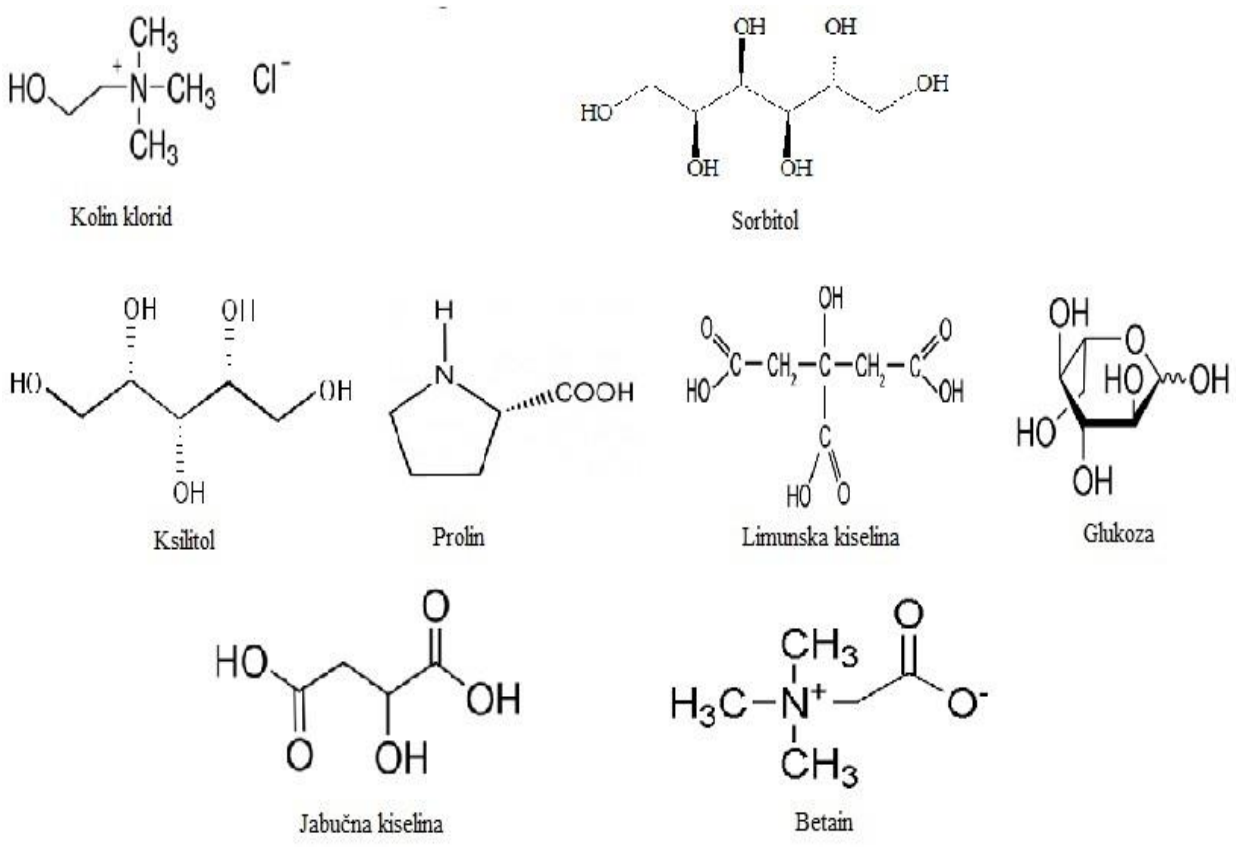
Slika 1. Struktura DES-a (Abbott i sur., 2004)

2.1.1. Prirodna eutektična otapala

Prirodna eutektična otapala (NADES) sastoje se od dva ili više prirodnih primarnih metabolita kao što su: aminokiseline, organske kiseline, šećeri, urea ili derivati kolina (Martins i sur., 2014). Broj kombinacija tih komponenti koji daju NADES je veliki. Različiti tipovi šećera i organskih kiselina mogu stvarati tekućine, kao na primjer, jabučna kiselina s limunskom kiselinom ili glukoza sa sorbitolm i jabučnom kiselinom. Postoji teorija da su NADES treći medij u živim organizmima te da omogućavaju preživljenje organizma koji se nalazi u nepovoljnim i teškim životnim uvjetima, kao npr. duga suša i smrzavanje (Kudlak i sur., 2015). Također, smatra se da u živim stanicama metaboliti koji su prisutni u visokim koncentracijama mogu formirati treći alternativni medij koji ima važnu ulogu u biosintezi, otapanju, spremanju i transportu metabolita (Choi i sur., 2011).

Prema podjeli eutektičnih otapala, NADES pripadaju trećem tipu gdje se kompleksiraju akceptor i donor vodika. Najčešći donori vodika su alkoholi, šećeri, kiseline, amini ili amidi, dok je kao akceptor vodika najzastupljenija organska sol kolin klorid. Kao što je prethodno rečeno donori vodika su primarni prirodni metaboliti, dok je kolin klorid kvarterna amonijev sol koja je jeftina i netoksična te se često koristi za pripravu eutektičnih otapala.

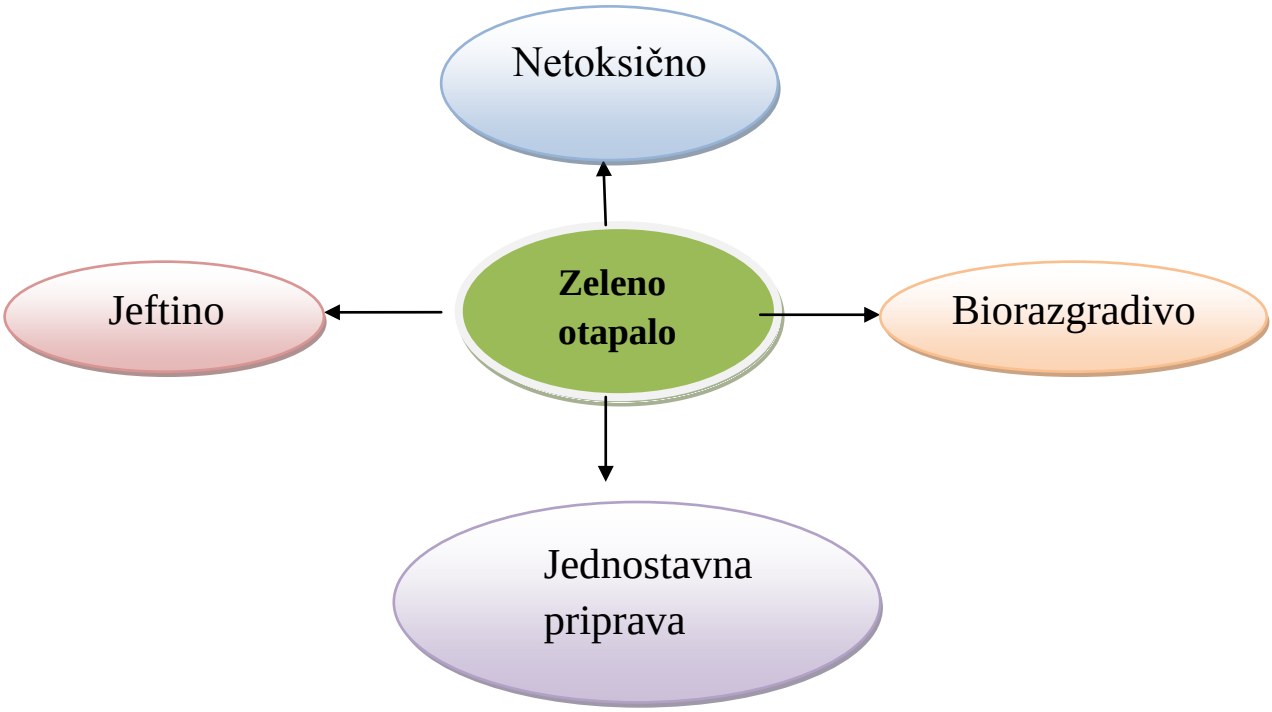
Strukture supstrata korištenih u ovom radu za sintezu prirodnih eutektičnih otapala prikazane su na slici 2.



Slika 2. Kemijske strukture različitih komponenata korištenih za sintezu eutektičnih otapala

2.1.2. Svojstva eutektičnih otapala

Gledajući s ekološke i tehnološke perspektive, DES-ovi su pogodniji od ionskih kapljevina jer su jeftiniji, jednostavnije se pripravljaju i visokog su stupnja čistoće, visoke razine biorazgradivosti i niske toksičnosti (Slika 3). Općenito, eutektična otapala su tekućine pri temperaturama nižim od 100 °C i posjeduju fizikalno-kemijska svojstva slična ionskim kapljevinama. Njihova fizikalno-kemijska svojstva mogu se prilagoditi pravilnim odabirom ishodnih komponenta te se tako može dizajnirati otapalo poželjnih svojstava za određenu primjenu. Osim fizikalno-kemijskih svojstava, promjenom struktura komponenti, mijenja se i toksikološki profil eutektičnog otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Smatra se da prilikom priprave DES-a ne nastaju nikakvi toksični i neželjeni produkti niti otpad. Kod priprave eutektičnih otapala potrebno je paziti na omjer ishodnih tvari kako bi nastale vodikove veze, a za uspješnu sintezu potrebno je dodati i određenu količinu vode koja se kasnije ukloni uparavanjem (Paiva i sur., 2014). Obzirom na činjenicu da kationi značajno utječu i doprinose toksičnosti otapala, kolin kao kationski ostatak amonijeve soli se smatra dobrim kandidatom za stvaranje prirodnih ionskih kapljevina i eutektičnih otapala (Bubalo i sur., 2014).



Slika 3. Poželjna svojstva eutektičnog otapala

Kada se govori o fizikalno-kemijskim svojstvima DES-ova u većini slučajeva, gustoća DES-a je veća od gustoće vode. Također, DES-ovi imaju veću gustoću od gustoće komponente koja je donor vodikove veze. Ta veća gustoća može biti rezultat jake vodikove veze između molekula, van der Waalsovih sila i elektrostatskih interakcija (Kudlak i sur., 2015). Na gustoću DES-a može se utjecati promjenom temperature. Povećanjem temperature povećava se molekularna aktivnost i pokretljivosti molekula pa se tako i poveća molarni volumen otopine što uzrokuje linearno smanjivanje gustoće (Hayyan i sur., 2012). Također na smanjenje gustoće DES-a utječe i molarni omjer organske soli i donora vodikove veze, kao i kemijska priroda donora vodikove veze. Viskoznost DES-ova je prilično velika što predstavlja jedan od najvećih nedostataka pri primjeni DES-ova (Zhang i sur., 2012), jer npr. zbog njihove visoke viskoznosti može biti problema u postupcima ekstrakcije (Dai i sur., 2013b). Razlog visoke viskoznosti je prisutnost vodikove veze između svake komponente što rezultira slabom mobilnosti molekula u DES-u. Na promjenu viskoznosti utječe se dodatkom vode jer se time oslabljuju vodikove veze, no mora se i paziti da postotak vode ne prijeđe 50 % jer se onda gubi struktura NADES-a. Promjenom temperature također utječemo na viskoznost koja se smanjuje povećanjem temperature. Električna vodljivost povezana je s viskoznošću i povećava se s porastom udjela soli (Kudlak i sur., 2015). Većina DES-ova ima

nisku električnu vodljivost, a kako se povećanjem temperature smanjuje viskoznost, tako se povećava električna vodljivost DES-a (Zhang i sur., 2012). Površinska napetost također je povezana s viskoznošću pošto ovisi o jakosti unutarmolekularnih interakcija koje su odgovorne za formiranje eutektičnih otapala. pH se mijenja promjenom temperature i ovisi o kemijskoj prirodi donora vodikove veze. Eutektična otapala koja sadrže kolin klorid i šećerne alkohole pokazuju neutralni pH, kao i DES-ovi koji sadrže glukozu i fruktozu (Hayyan i sur., 2013b), dok eutektična otapala koja sadrže organske kiseline imaju niski pH pa zbog toga i nepovoljniji učinak na stanice u *in vitro* kulturi (Radošević i sur., 2014).

U odnosu na ionske kapljevine, DES-ovi imaju značajne prednosti koje proizlaze iz njihove jednostavnije i brže sinteze, niske cijene, jer se većina DES-ova može dobiti iz lako dostupnih kemikalija i njihove niske toksičnosti, pogotovo onih DES-ova proizvedenih iz kolin klorida i obnovljivih izvora kemikalija. Značajne ekonomske i ekološke prednosti otvaraju nove mogućnosti za korištenje eutektičnih otapala u većem mjerilu. Također, važno je istaknuti da su ishodne komponente DES-ova potencijalno reaktivne kemikalije i da njihovo povezivanje vodikovom vezom ograničava njihovu reaktivnost i tako omogućava njihovo korištenje u mnogim područjima istraživanja (Zhang i sur., 2012) kako bi se otkrila njihova maksimalna reaktivnost i primjena.

2.1.3. Primjena eutektičnih otapala

Razvoj novih zelenih otapala jedan je od ključnih napredaka u zelenoj kemiji, s očekivanim velikim utjecajem na industrijske procese u kojima se koriste otapala. Svoju primjenu mogu naći u biokatalizi, ekstrakciji, elektrokemijskim istraživanjima, obnovi prirodnih biopolimera i mnogim drugima. Iako su objavljeni brojni primjeri primjene eutektičnih otapala, ona su i nadalje poprilična novost u domeni alternativnih otapala, a njihova primjena je manje zastupljena od primjene ionskih kapljevina (Radošević i sur., 2016). Iako ne mogu zamjeniti ionske kapljevine u svim područjima primjene, smatra se da će eutektična otapala zbog svoje niske cijene i povoljnijeg ekološkog profila u budućnosti biti zastupljenija u industrijskoj primjeni.

U području katalize i organske sinteze jasno je da će DES-ovi doprinijeti oblikovanju ekološki prihvatljivih procesa pogotovo zbog mogućnosti selekcioniranja produkta ekstrakcije provedene DES-om, podešavanja pH otapala, otapanja organski i anorganskih soli, ali i kompleksa izvedenih iz prijelaznih metala ili nanočestica (Zhang i sur., 2012). Također,

mnogo se očekuje od njihove primjene u području biotransformacija. Naime, mnogi enzimi su aktivni u DES-ovima, a jedan od njih je i lipaza B iz *Candida antartica*, koja pokazuje visoku aktivnost i stabilnost u DES-u baziranom na kolin kloridu (Paiva i sur., 2014). Zhao i sur. (2013) objavili su da proteaze, za koje je poznato da su manje stabilne u nevodenom mediju nego lipaze mogu također biti aktivne u otapalima kolin acetat: glicerol i kolin klorid: glicerol. Stoga, DES-ovi imaju potencijal za primjenu u biotransformacijama, što je dokazano reakcijom transesterifikacije N-acetil-L-fenilalanin etil estera s 1-propanolom (Laszlo i sur., 2005).

U području ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz različitih biljnih sirovina, učinkovitost DES kao otapala ovisi o njegovoj sposobnosti otapanja tvari. DES ima mogućnost doniranja i primanja protona i elektrona, koji im omogućuju formiranje vodikove veze i tako povećavaju njihov kapaciteta otapanja. Svojstva kao što su tekuće stanje na sobnoj temperaturi, viskoznost koja se lako može prilagoditi, stabilnost i sigurnost, sposobnost otapanja polarnih i nepolarnih metabolita omogućuje njihovu primjenu kao otapala za ekstrakciju prirodnih tvari. Dai i sur. (2013a), istraživali su ekstrakciju fenolnih tvari iz biljke šafranike, koristeći različite NADES-e (mliječna kiselina:glukoza, glukoza:kolin klorid, glukoza:fruktoza:saharoza) i rezultati su pokazali da NADES-i imaju veliku mogućnost ekstrakcije fenolnih spojeva što je povezano s vodikovim vezama između fenolnih spojeva i NADES-a. Pošto su NADES-i zelenija i sigurnija alternativna otapala od ionskih kapljevina, moguća je njihova primjena u ekstrakciji prirodnih spojeva za farmaceutsku namjenu.

U području medicine i farmacije, zanimljiva je primjena DES-ova kod transdermalnog sustava prijenosa lijekova. Transdermalna primjena lijekova znači da lijek ulazi u organizam preko kože, ali koristi adhezivni put pa se tako sporo apsorbira u tijelo. Lijekovi koji se primjenjuju u čvrstom stanju, a transformirani su primjenom DES-a u visoko koncentrirane smjese u tekućem stanju na sobnoj temperaturi, pokazuju značajno veći kapacitet za penetraciju kroz kožu. Primjeri takvog tipa lijekova su eutektične smjese ibuprofena, poznatog analgetika, te također terpeni i smjese propana i masnih kiselina (Karande i sur., 2009). Morrison i sur. (2009) testirali su DES-ove (kolin klorid:jabučna kiselina i kolin klorid:urea) kao otapala za spojeve: benzojeva kiselina, danazol, grizeofulvin, intrakonzol i AMG517, lijek koji je u klinčkoj fazi istraživanja. Rezultati su pokazali da je njihova topljivost u DES-u veća u odnosu na topljivost u vodi. Stoga se očekuje da će kombinacija NADES-a s bioaktivnim molekulama kao što su ibuprofen ili bademova kiselina te s

biorazgradivim prirodnim polimerima postati alternativa u proizvodnji lijekova te mnogim drugim biomedicinskim primjenama.

Eutektična otapala također imaju primjenu u proizvodnji biodizela. DES baziran na N,N-dietil etanol amonijevom kloridu (DEAC) i *p*-toluen sulfonskoj kiselini (PTSA) u molarnom omjeru 1:3 korišten je kao katalizator u transesterifikaciji masnih kiselina u proizvodnji biodizela (Hayyan i sur., 2013a). Također, smjesa kolin klorid:glicerol u molarnom omjeru 1:2 korištena je kao otapalo u enzimsko-kataličkoj reakciji kod proizvodnje biodizela iz sjemenki soje. Glavna prednost ove metode je visoka razina konverzije triglicerida, netoksičnost i niski troškovi otapala kao i biokompatibilnost s lipazama (Zhao i sur., 2013).

Osim u navedenim područjima, primjena eutektičnih otapala također je opisana u detekciji bakra, željeza i cinka u tkivu riba, pri čemu je korištena smjesa kolin klorida i oksalne kiseline kao otapalo. Takva metoda pokazala se učinkovitom, jednostavnom za pripremu, jeftinijom i bržom nego prijašnje metode. U kemiji materijala, ionske kapljevine mogu biti zamjenjene eutektičnim otapalima u ionotermalnim sintezama anorganskih materijala s različitim strukturama i teksturama. Uporaba DES-ova zabilježena je i u proizvodnji zeolita kao otapala i kao organskog predloška potrebnog u reakcijama sinteze. U području elektrokemije objavljeni su radovi vezani za ispitivanje DES-ova na bazi kolina cikličkom voltametrijom i amperometrijom.

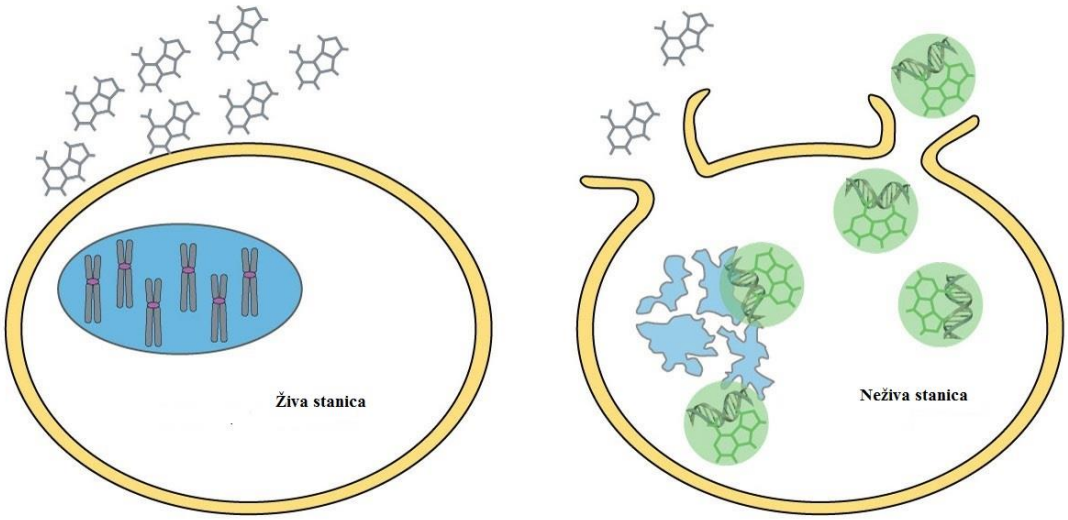
Novija istraživanja pokazuju da eutektična otapala mogu služiti kao medij za održavanje raznih organizama poput bakterija u nevodenom mediju (Gutierrez i sur., 2009), što je suprotno radu Hayyan i sur. (2013b) gdje je utvrđena toksičnost nekih DES-ova za bakterije i istaknuta njihova moguća namjena kao antimikrobnog sredstva. Uloga NADES-a u živih organizama opisana je i kod biljaka gdje su uključeni u sintezu i skladištenje raznih topivih, nevodenih metabolita u stanici, koji imaju ulogu u zaštiti biljaka u ekstremnim uvjetima. U takvim uvjetima dolazi do otapanja supstrata i enzima u NADES-u te je moguća njihova enzimska aktivnost nužna za preživljenje biljaka (Dai i sur., 2013b).

U konačnici, uglavnom netoksična i ekološki prihvatljiva prirodna eutektična otapala prikladna su za različite primjene od agroindustrije do prehrambene, kozmetičke, farmaceutske i kemijske industrije. Stoga je prije njihove šire i veće primjene, nužno i dalje provoditi ekotoksikološka ispitivanja novosintetiziranih otapala, kako bi dobiveni rezultati pridonjeli sigurnoj uporabi istih.

2.1.4. *In vitro* ispitivanje toksičnosti

Citotoksičnost nije specifični stanični mehanizam smrti, kao apoptoza ili nekroza, već je svojstvo neke tvari ili kemijskog sastojka iz npr. hrane, kozmetičkog i farmacutskog pripravka da ubije stanice. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti, tj. da li je neka tvar toksična za kulturu stanica, temelji se na određivanju broja živih stanica nakon određenog vremena tretmana ispitivanom tvari pri čemu se određuje IC_{50} ili EC_{50} vrijednost koja je definirana kao ona količina ispitivane tvari koja inhibira ili ima neki drugi učinak na 50 % populacije tretiranih u odnosu na kontrolne stanice. U toksičnim ispitivanjima, od velike je važnosti primjena *in vitro* testova toksičnosti jer omogućuje praćenje utjecaja ispitivane tvari na razini stanice i uvid u mehanizam djelovanja te tvari (Kniewald i sur., 2005). *In vitro* ispitivanja toksičnosti su poželjan pristup u području toksikologije jer predstavljaju ekonomičan i praktičan način rada, koji omogućava predviđanje toksičnost *in vivo* te barem u nekoj mjeri zamjenjuju *in vivo* određivanje toksičnosti, odnosno ispitivanja na životinjama. Stoga su neke od prednosti *in vitro* testiranja smanjenje broja pokusnih životinja, visoka standardizacija, kontrolirani uvjeti testiranja, kraće vrijeme provođenja testiranja i niža cijena. Dok su nedostaci nedovoljna ili potpuna metabolička aktivacija ispitivane tvari u staničnim sustavima zbog izmjenjenih svojstava stanica u kulturi te nedostatak validacije. Danas se mjerenje citotoksičnosti bazira na metodama u kojima se određujedolazi li do propusnosti stanične membrane i otpuštanja komponenti iz stanice u okolni medij (slika 4) ili ulazi li u stanicu s oštečenom membranom boja. Stanice koje su izložene citotoksičnom sredstvu reagiraju različito zato je važno kod ispitivanja citotoksičnosti primjeniti barem dvije metodološki različite metode, kako bi se sa sigurnošću mogao odrediti učinak neke tvari na stanice.

Jedan od najčešće korištenih testova je MTT metoda razvijena 1983g. To je jednostavan kolorimetrijski test za mjerenje proliferacije i preživljavanja stanica. Metoda je modificirana za mjerenje kemosenzibilnosti i citotoksičnosti na staničnim linijama, a bazira se na određivanju metaboličke aktivnosti mitohondrija mjerenjem redukcije supstrata, topljive žute tetrazolijeve soli u plavi netopljivi formazan. Osim MTT metode često se koriste i Neutral red test, LDH test, bojanje bojomkristal ljubičasto, test proliferacije stanica i smanjenje razine ATP-a (Fent, 2001).



Slika 4. Djelovanje toksične tvari na staničnu membranu i liza stanice (Anonymous 4, 2016)

In vitro testiranja provode se na staničnim linijama. One su dostupne od strane dvije najveće kolekcije kultura stanica: *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection Animal Cell Culture* (ECACC). Stanične linije su dobivene iz različitih izvora, a najčešće se koriste stanice sisavaca. Većina staničnih linija ovisna je o površini za rast i one se nazivaju adherentnima, dok su neke prilagođene za rast u suspenziji. Za uzgoj obje vrste stanica bitan je hranjivi medij, kojem se najčešće dodaje serum sisavaca, bogat različitim proteinima često neophodnim za rast i razvoj stanica u kulturi. Osim hranjivog medija, prilikom *in vitro* uzgoja stanica u kulturi potrebno je kontrolirati i fizikalno-kemijske parametre, koji moraju što više odgovarati *in vivo* uvjetima koje su stanice imale u organizmu iz kojeg su podrjetlom, kako bi se stanična linija što uspješnije održavala.

2.1.4.1. Citotoksičnost DES

Prema dosadašnjim znanstvenim istraživanjima NADES su netoksična, ekološkineškodljiva i biorazgradiva otapala (Abbot i sur., 2004; Jhong i sur., 2009; Wu i sur., 2012). No, ekotoksikološki profil NADES-a treba i dalje istraživati budući su neka njihova svojstva i dalje nepoznata ili još uvijek u procesu istraživanja kao npr. toksičnost i biorazgradivost. Posebnu pažnju kod istraživanja citotoksičnosti treba obratiti na mogući sinergistički efekt između sastojaka NADES-a, koji rezultira većom toksičnošću otapala nego što je toksičnost svake komponente pojedinačno (Hayyan i sur., 2013b).

U teoriji prednost je NADES-a u tome što su sintentizirani od prirodnih primarnih metabolita, koji su sami po sebi netoksični i neškodljivi, pa je pretpostavka da i tako dobivena otapala nisu štetna. Hayyan i sur. (2013a) istraživali su toksičnost tri DES-a koristeći larvu račića *Artemia salina* i dvije vrste bakterija, Gram pozitivne (*Bacillus subtilis i Staphylococcus aureus*) i Gram negativne (*Escherichia coli i Pseudomonas aeruginosa*). Toksičnost DES-ova spram larvi račića ovisi o sastavu, viskoznosti i koncentraciji DES-a. Učinak testiranih DES-ova na bakterije bio je jači te je pretpostavljena mogućnost njihove uporabe kao antimikrobne tvari budući su DES-ovi bazirani na fosfonijevom ionu i različitim HBD, npr.glicerin, etilen glikol i trietilen glikol, inhibirali rast navedenih bakterija. Takav učinak na bakterije je objašnjen delokalizacijom naboja u otapalu koja posljedično dovodi do pucanja stanične stijenke bakterija. NADES koji su bazirani na kolin kloridu i ranije spomenutim HBD (glicerin, etilen glikol i trietilen glikol), nisu citotoksični za Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, što ukazuje na povoljniji toksikološki profil NADES-a s obzirom na DES. Radošević i sur. (2014) testirali su tri DES-a bazirana na kolin kloridu *in vitro*na ribljoj i ljudskoj staničnoj liniji. Kolin klorid:glukoza i kolin klorid:glicerol pokazali su se netoksičnima na obje stanične linije, dok je kolin klorid:oksalna kiselina pokazala blagu citotoksičnost na obje stanične linije. U radu iste grupe autora (Radošević i sur., 2016) na ribljoj staničnoj liniji ispitani su NADES bazirani na kolin kloridu i organskim kiselinama (limunska i mliječna kiselina) te šećerima (fruktoza, manoza i ksiloza) koji nisu bili citotoksični, dok je otapalo kolin klorid:jabučna kiselina (2000 mg L^{-1}) imala najveći inibicijski učinak na preživljenje CCO stanične linije, ali prema trenutnoj klasifikaciji citotoksičnosti, i taj je NADES neškodljiv.

Paiva i sur. (2014) testirali su djelovanje jedanaest različitih DES-ova na L292 stanicama fibroblasta i usporedili ih s djelovanjem ionskih kapljevina. Dobiveni rezultati ne pokazuju jasnu povezanost između citotoksičnog djelovanja i sastava otapala, što ukazuje na potrebu daljnjih istraživanja. Pet različitih NADES-a testirano je na pet humanih tumorskih staničnih linija (PC3, A375, HepG2, HT29 i MCF-7) te jednoj normalnoj humanoj staničnoj liniji (OKF6) u radu Hayyan i sur. (2015). Testirani NADES inibiraju rast tumorskih stanica u određenoj dozi pa samim time nije potvrđena hipoteza da se NADES *a priori* mogu smatrati netoksičnim otapalima. Također, obzirom na dobivene rezultate istaknuta je njihova moguća primjena kao antitumorskih sredstava. Moguće objašnjenje je da vodikova veza između HBD i aniona soli ne utječe samo na fizikalna svojstva već i na kemijsku strukturu smjese. Odabir HBD značajno utječe na toksičnost odgovarajućeg NADES-a, jer te komponente, pojedinačno

u čistom stanju, denaturiraju proteine u živim stanicama i time mijenjaju aktivnost stanice što može rezultirati staničnom smrti (Hayyan i sur., 2015).

Obzirom na gore spomenute rezultate, koji su ponekad oprečni, nužna su daljnja istraživanja toksičnosti NADES-a na raznim organizmima uključujući gljive, alge, biljke, stanice sisavaca i životinje, kako bi se pouzdano odredilo jesu li NADES-i zaista zelena otapala i budućnost zelene kemije. Kako je razvoj novih zelenih otapala jedna od ključnih smjernica zelene kemije, a NADES se smatraju potencijalnim, za okoliš povoljnim otapalima, s mogućnošću niza primjena u kemijskoj i biotehnološkoj industriji, budući pravci u razvoju i istraživanju alternativnih otapala i NADES-a trebali bi biti fokusirani na sintezu otapala baziranih na netoksičnim supstratima, utvrđivanju osnovnih toksikoloških parametara na temelju standardiziranih biotestova, procjenjivanju interakcija s prisutnim zagađivačima i utvrđivanju citotoksičnosti na uobičajenim staničnim linijama sisavaca, zbog njihove moguće primjene u medicini i farmaciji.

2.1.5. Antioksidacijska aktivnost prirodnih eutektičnih otapala

Antioksidansi su tvari koje imaju svojstvo da doniraju elektron slobodnim radikalima, oksidiraju se i na taj način neutraliziraju reaktivne tvari bez utjecaja na fiziološke funkcije organizma, a da pri tome sami ne postanu nestabilni. Antioksidansi su raznorodna skupina molekula koje, ako su prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama oksidativnog supstrata, značajno usporavaju ili u potpunosti sprječavaju oksidaciju tog supstrata te utječu na odnos reduciranog i oksidiranog stanja neke molekule u biološkim sustavima. Antioksidansi nastaju u stanici no najčešće se u organizam unose hranom ili u obliku vitaminskih i sličnih dodataka prehrani. Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa je stupanje u reakciju sa slobodnim radikalima, pri čemu smanjuju njihovu reaktivnost ili ih u potpunosti deaktiviraju te tako posljedično imaju niz povoljnih učinaka na zdravlje organizma: usporavaju starenje, snižavaju razinu kolesterola, smanjuju rizik nastanka raka, pomažu suzbijanju razvoja tumora, štite srce i krvne žile, pomažu kod kroničnih plućnih bolesti, itd.

Neki od spojeva koji su deklarirani kao antioksidansi i imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje su: limunska kiselina, jabučna kiselina, prolin, betain i različite skupine fenolnih spojeva. Kako se spomenuti spojevi primjenuju kao ishodne komponente za sintezu

NADES-a nedavno se krenulo s ispitivanjima imaju li možda prirodna eutektična otapala antioksidativnu aktivnost. Za sada su jedino Hayyan i sur. (2015) objavili rezultate takvog istraživanja. Metodom ORAC *(Oxygen Radical Absorbance Capacity*) analizirali su četiri NADES-a bazirana na kolin kloridu i glicerinu, etilen glikolu, trietilen glikolu i urei kao HDB-ima, no testiranim NADES-i određena je niska antioksidacijska vrijednost. Navedena metoda primjenjena je u ovom radu za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti pet sintetiziranih NADES-a što će svakako pridonjeti sveokupnom znanju o biološkim učincima tih otapala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- 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
- Betain, Sigma- Aldrich, St.Louis, SAD
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, Kemika, Zagreb, RH
- Jabučna kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Kolin-klorid (≥ 97 %), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ksilitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Limunska kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium], Promega, SAD
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- PBS pufer, PBF, Zagreb, RH
- Prolin, Kemika, Zagreb, RH
- Sorbitol, Sigma- Aldrich, St.Louis, SAD
- Tripan- plavo, Signa-Aldrich, St.Louis, SAD
- Tripsin-EDTA (0,25%), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Sve kemikalije upotrijebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a voda korištena za sintezu eutektičnih otapala i pripravu otopina bila je destilirana voda PBF-a.

3.1.2. Otopine i puferi

- 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	do 10 mL

- Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom

Fosfatni pufer

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (6,242 g do 200 mL destilirane vode)

Dinatrijev hidrogenfosfat (5,87 g do 200 mL destilirane vode)

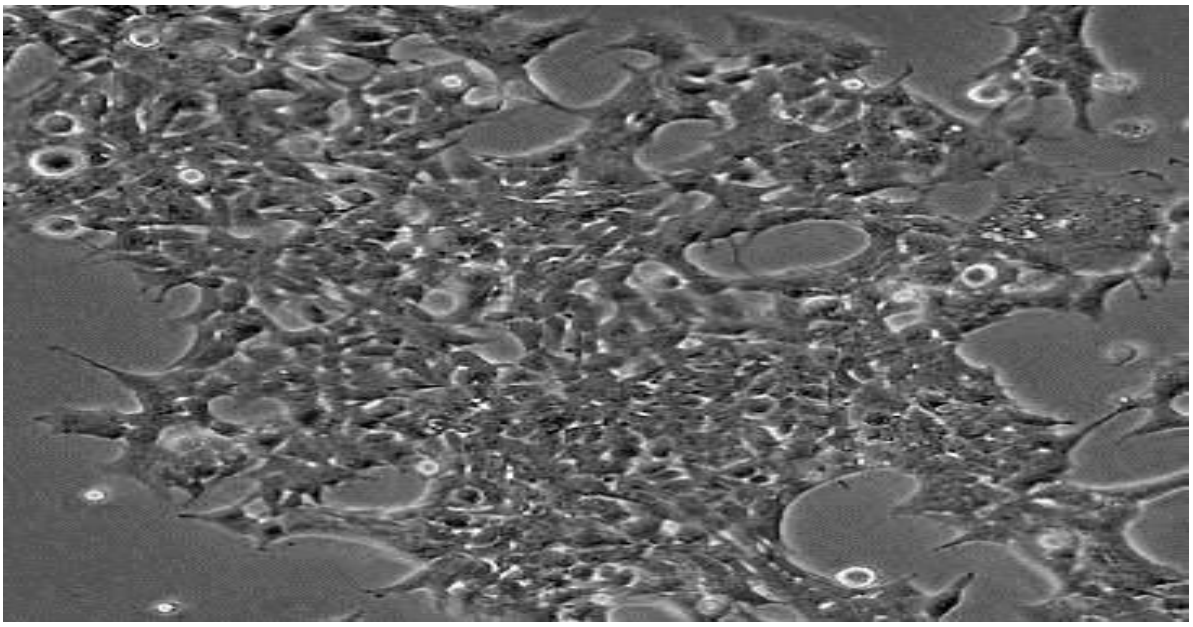
Destilirana voda

Otopina fluoresceina

Otopina AAPH

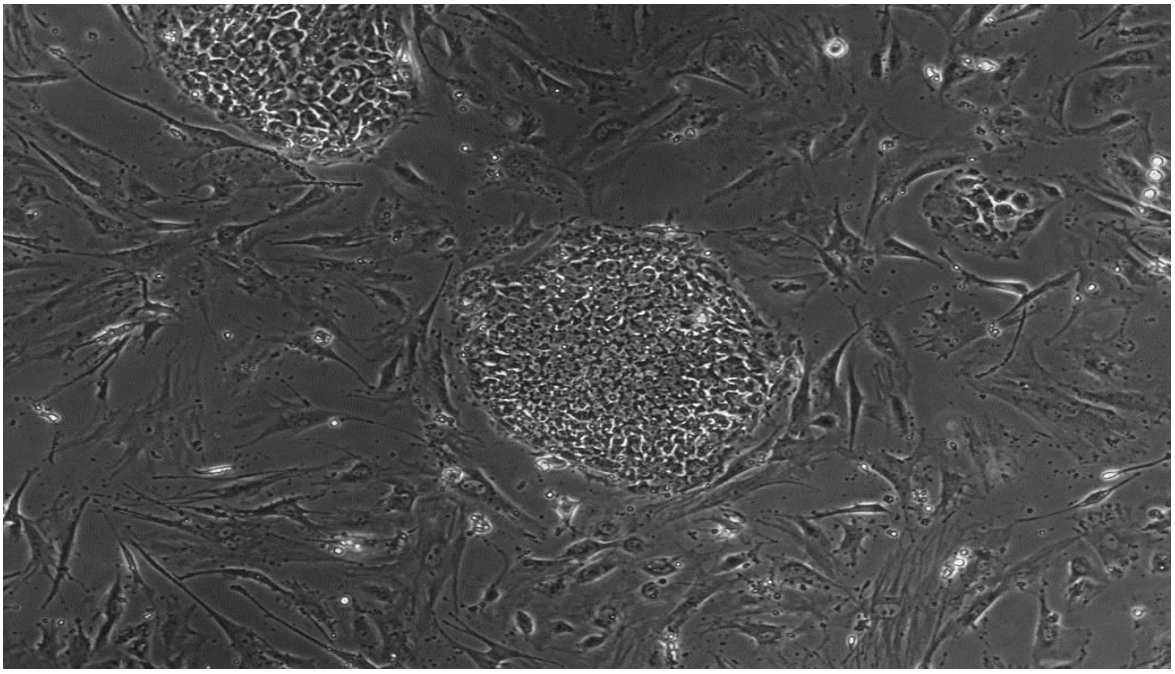
3.1.3. Humane stanične linije

Stanične linije korištene u ovom radu su HEK293T i HeLa dobivene iz *American Type Culture Collection* (ATCC) banke stanica. HEK293T stanice (slika 5) su epitelne stanice dobivene iz humanih embrionalnih stanica bubrega transformacijom s DNA adenovirusa. Stanična linija je prvi put kultivirana u Nizozemskoj i to zahvaljujući znanstveniku Frank Grahamu kojemu je to bio 293. eksperiment, odakle i broj u nazivu stanične linije. Sadrže SV40 T-antigen koji povećava titar replikacije, kada se koristi za proizvodnju retrovirusa, a osim toga koristi se i za proizvodnji proteina. Također zbog svoje visoke razine transfekcije često se koristi u biološkim, farmaceutskim i medicinskim istraživanjima.



Slika 5. HEK293T stanična linija (Anonymous 1, 2016)

HeLa stanična linija (slika 6) je prva uspostavljena humana tumorska stanična linija, a izolirana je iz adenokarcinoma vrata maternice. Stanice su uzete nakon smrti pacijentice Henriete Lacks, odakle potječe i njihov naziv. Danas se koriste u istraživanju AIDS-a, tumora, toksičnih sastojaka, genetičkom mapiranju, RNA markerima i mnogim drugima stoga su najčešće korištene stanice u znanstvenim istraživanjima.



Slika 6. HeLa stanična linija (Anonymous 2, 2016)

3.1.4. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka
- Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australia
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija
- Laboratorijski pribor (laboratorijske čaše, ljevci, pipete, nastavci za pipete,epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)
- Magnetske miješalice s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke
- Neubauerova komorica za brojanje stanica
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- T-boce od 25 cm^2, Corning, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprava eutektičnih otapala

Eutektična otapala pripravljena su na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije. Pripravljeno je osam DES-ova različitihmolarnih omjera (Tablica 1) s volumnim udjelom vode 10 %. Sinteza eutektičnih otapala započinje vaganjem potrebnih kemikalija, koje zatim prenesemo u tikvicu s okruglim dnom te pipetom dodamo potrebni volumen vode, ovisi o kojem udjelu vode se radi. Reakcijska smjesa se zatim stavi na magnetnu mješalicu s grijačem te dodamo magnet kako bi se miješanje odvijalo konstantno. Podesimo temperaturu na 40-60 °C, a reakcija se zaustavlja kada se dobije bistro i tekuće otapalo.

Tablica 1. Pregled eutektičnih otapala korištenih u radu

BROJ	NAZIV OTAPALA	KRATICA	OMJER
1.	Kolin klorid: sorbitol	Ch:Sor	2:3
2.	Kolin klorid: ksilitol	Ch:Xyol	5:2
3.	Prolin: limunska kiselina	Pro:Cit	1:1
4.	Limunska kiselina: glukoza	Cit:Glc	1:1
5.	Jabučna kiselina: glukoza	Mal:Glc	1:1
6.	Betain: glukoza	B:Glc	5:2
7.	Betain: jabučna kiselina: prolin	B:Mal:Pro	1:1:1
8.	Betain: jabučna kiselina: glukoza	B:Mal: Glc	1:1:1

3.2.2. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala na HeLa i HEK293T staničnim linijama

3.2.2.1.Uzgoj i nacjepljivanje stanica

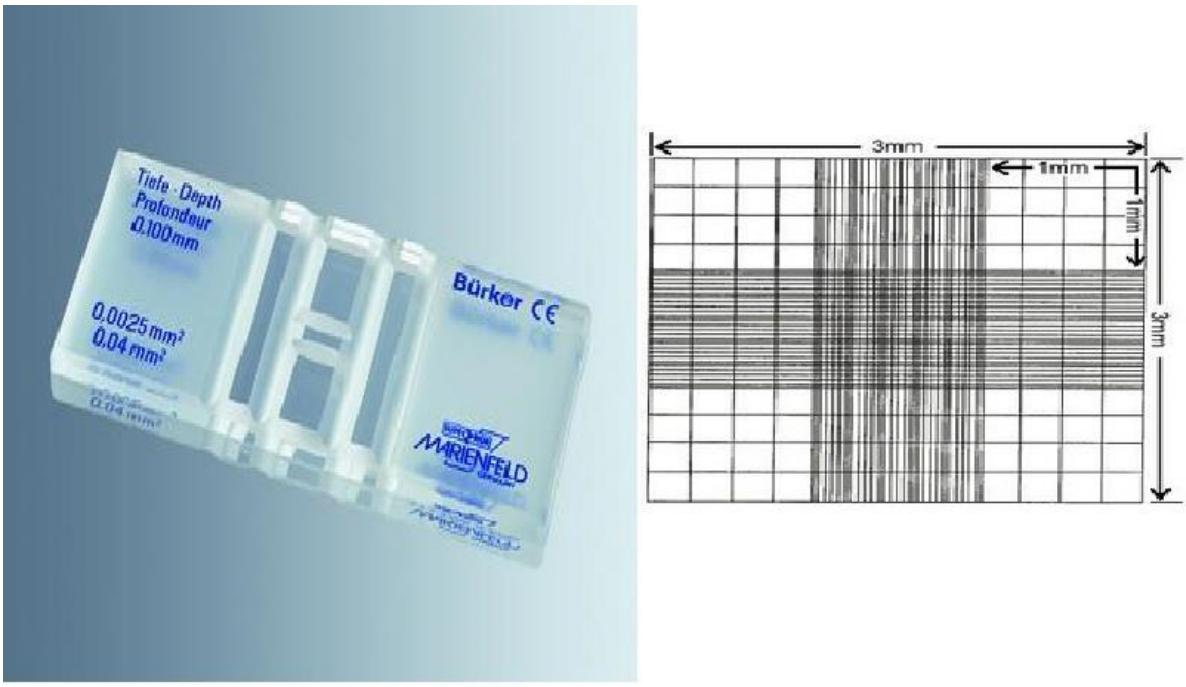
Tijekom rada u laboratoriju potrebno je primjenjivati sterline tehnike rada i održavati aseptične uvjete da ne dođe do neželjenih kontaminacije mikroorganizmima.

HEK293T i Hela stanice održavane su u Petrijevim posudicama za potrebe umnožavanja biomase i postavljanje pojedinačnih pokusa u DMEM uz dodatak 5 % (v/v) FBS-a te su uzgajane u inkubatoru s 5 % CO_2 pri 37 °C i vlažnoj atmosferi. Morfologija, opće stanje i brojnost stanica provjerava se svakodnevno pod inverznim mikroskopom. Pošto stanice eksponencijalno rastu potrebno ih je pasažirati otprilike svaka četiri dana kako ne bi došlo do kontaktne inhibicije i ulaska stanica u stacionarnu fazu rasta. Stanične linije korištene u ovom radu su adherentne te je potrebno koristiti enzim tripsin kako bi se stanice odvojile od podloge za rast kako bi s njima mogli manipulirati. Nakon što se stanice odvoje djelovanjem tripsina, izbroji se ukupan broj stanica metodom tripan-plavo.

3.2.2.2.Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Boja tripan-plavo omogućuje razlikovanje mrtvih stanica od živih, koje ostaju neobojene. Prvo se ukloni hranjivi medij te se doda ugrijani tripsin koji djeluje tako da odvoji stanice od površine za rast. Reakcija traje oko 4 minute u inkubatoru. Nakon toga se pod inverznim mikroskopom provjerijesu li se stanice u potpunosti odvojile. Stanice pričvršćene za površinu su nepravilnog, romboidnog ili izduljenog oblika, dok su stanice odvojene od podloge za rast pravilnog kružnog oblika. Slijedi dodavanje hranjivog medija sa serumom da se spriječi daljnje djelovanje tripsina te da se stanice resuspendiraju, a potom se uzima 10 µL alikvota suspenzije stanica i pomiješa se s 10 µL boje tripan plavo. 10 µL takve suspenzije nanese se na Neubauerovu komoricu za brojanje stanica. Komorica je podjeljena na 4 velika kvadrata, a u svakom velikom kvadratu nalazi se 16 malih kvadratića u kojima se broje stanica (slika 7). Broj stanica u mL suspenzije izračuna se prema formuli:

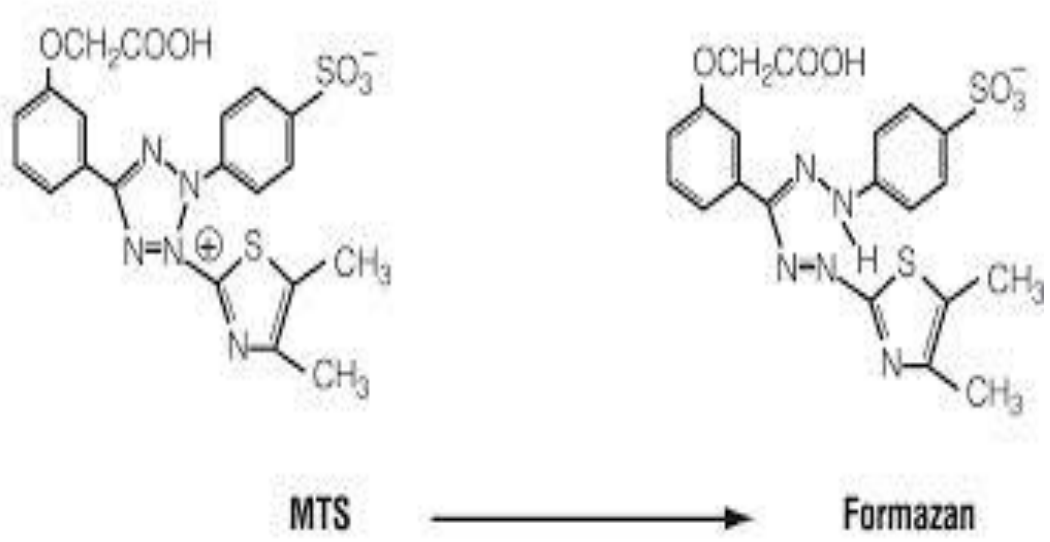
Broj stanica mL^{-1} suspenzije= broj stanica izbrojenih u 4 kvadrata x 5000



Slika 7. Neubaerova komorica za brojanje stanica (Anonymous 3, 2016).

3.2.2.3.Test citotoksičnosti

Kolorimetrijski The Cell Titer 96®AQueous One Solution test stanične proliferacije (Promega, SAD) je modificirana MTT metoda (Mosmann, 1983). MTT test se bazira na prevođenju žute tetrazolijeve soli (MTT ili 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u ljubičasto obojene kristale formazana koji su topivi u organskim otapalima. Nakon otapanja formazana, intenzitet nastale boje određuje se spektrofotometrijski. Reagens koji se koristi u The Cell Titer 96®AQueous One Solution testu stanične proliferacije sadrži novi tetrazolijev spoj (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij,MTS) i elektron-kondenzacijski reagens (fenazin etosulfat, PES). Prednost MTS testa je da je nastali produkt formazna (slika 8) topiv u mediju za uzgoj stanica te se rezultat može očitavati odmah, bez koraka otapanja formazana u organskom otapalu. Intenzitet nastalog obojenja mjeri se spektofotometrijski i izravno je proporcionalan broju živih stanica u kulturi.



Slika 8. Redukcija topljivog MTS u formazan (Anonymous 5, 2012)

Ispitivanje citotoksičnosti pripravljenih NADES-ova na HEK293T i HeLa stanicama započinje nacijepljivanjem ploče s 96 jažica. Za svaku staničnu liniju u svaku jažicu nacijepljeno je po 100 μL suspenzije stanica u početnoj koncentraciji od 3 x 10^4 stanica mL^{-1} za HeLa stanice i 2 x 10^4 stanica mL^{-1} za HEK293T stanice zbog različite brzine rasta. Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i porasle, tj. 24 sata nakon nacijepljivanja, tretirane su s

10 μL ishodnih otopina različitih koncentracija NADES-a te su stavljene na inkubaciju narednih 72 h. Ishodne otopine NADES-a pripremljene su u deioniziranoj vodi, sterilizirane su filtracijom kroz 0,22 μm filter te su razrijeđene u mediju za uzgoj stanica kako bi koncentracije u jažicama bile 500 mg L^{-1}, 1000 mg L^{-1} i 2000 mg L^{-1}. Nakon 72 sata tretmana, 10 μL Cell Titer 96®otopine reagensa dodano je u svaku jažicu te su stanice stavljene na inkubaciju 4 sata, a zatim se mjeri apsorbancija na 490 nm u mikrotitarskom čitaču. Kao kontrola korištene su netretirane stanice i stanice tretirane vodom koja je korištena za pripravu ishodnih otopina. Eksperimenti su provedeni dva puta za svaku staničnu liniju s četiri paralele za svaku koncentraciju i podaci su izraženi kao prosjek ± SD. Postotak preživljenja stanica izražen je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip ORAC metode temelji se na inhibiciji peroksil radikala (ROO·**)** za koji se kao izvor koristi AAPH (2,2' – azobis (2- metilpropionamid)-dihidroklorid). Peroksil radikal oksidira fluorescein i stvara produkt bez fluorescencije, što vidimo kao smanjenje inteziteta fluorescencije. Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala tj. oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije. U ovom radu antioksidacijski kapacitet pripravljenih NADES određen je ORAC metodom opisanoj u radu Ninfali i sur. (2005).

Priprema otopina

1) Priprema 0,2 mol L^{-1} otopine fosfatnog pufera:

U odmjernu tikvicu od 200 mL doda se 39 mL otopine NaH_2PO_4 x $2H_2O$ (6,242 g u 200 mL destilirane vode) i 61 mL otopine Na_2HPO_4 (5,687 g u 200 mL destilirane vode), te se destiliranom vodom nadopuni do 200 mL.

2) Priprema 0,075 mol L^{-1} otopine fosfatnog pufera:

U odmjernu tikvicu od 200 mL doda se 75 mL 0,2 mol L^{-1} fosfatnog pufera te se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Svježa otopina se priprema svaki dan.

3) Priprema otopine fluoresceina:

Za matičnu otopinu 1 otopi se 15 mg fluoresceina u 100 mL 0,075 mol L^{-1} otopine fosfatnog pufera. Potom 100 µL matične otopine 1 razrijedimo s 10 mL 0,075 mol L^{-1} otopine fosfatnog pufera da bi dobili matičnu otopinu 2, te iz te otopine uzimamo 100 µL i razrijedimo s 50 mL 0,075 mol L^{-1} otopine fosfatnog pufera da bi dobili matičnu otopinu 3 koju koristimo kod mjerenja.

4) Priprema otopine AAPH:

0,207 g AAPH se otopi u 5 mL 0,075 mol L^{-1} otopine fosfatnog pufera.

Mjerenje ORACvrijednosti

Mjerenje se provodi spektrofluorimetrijski pri temperaturi od 37 °C uz $\lambda_{eks.}$= 485 nm i $\lambda_{em.}$= 520 nm. U kivetu za mjerenje doda se 2,250 mL fluoresceina i 0,375 mL uzorka. Otopine se termostatiraju kroz 30 min pri 37 ˚C u vodenoj kupelji. Nakon 30 min dodaje se 0,375 mL otopine AAPH te se mjeri promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu kroz pola sata tj. dok fluorescencija ne padne na nulu. Na isti način pripravi se i slijepa proba, za čije se mjerenje umjesto uzorka rabi 0,075 mol L^{-1} fosfatni pufer. Kao standard se koristi Trolox. Iz osnovne otopine Trolox-a (500 µmol L^{-1}) pripremi se razrijeđenje koncentracije 25 µmol L^{-1} koje se koristi kod mjerenja.

Izračun ORAC vrijednosti

ORAC-vrijednosti računaju se prema formulama:

Relativna ORAC vrijednost = $\left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}}\right)$ x a x h [µmoL Trolox ekvivalent g^{-1} uzorka]

$AUC = 0{,}5+(R_2/R_1)+(R_3/R_1)+.....+(R_n+R_1)$

pri čemu je:

- AUC_U = antioksidacijski kapacitet uzorka

- AUC_{SP} = antioksidacijski kapacitet slijepe probe
- AUC_{TRX} = antioksidacijski kapacitet Trolox-a
- a = molarna koncetracija Troloxa
- h = $\frac{V}{g\ (uzorak)}$

3.3. Obrada podataka

Sva mjerenja su provedena u paralelama, tako da su rezultati prikazani kao prosječne vrijednosti iskazane zajedno sa standardnom devijacijom (± SD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripravljeno je osam NADES (kolin klorid:sorbitol, kolin klorid:ksilitol, limunska kiselina:prolin, limunska kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza, betain:glukoza, betain:jabučna kiselina:prolin, betain:jabučna kiselina:glukoza) u različitim omjerima s različitim udjelima vode (10 %, 30 % i 50 %) koji su prikazani u tablici 1. te je provedeno ispitivanje njihove *in vitro* citotoksičnosti i određen je njihov antioksidacijski kapacitet. Citotoksičnost se provodi po Pravilniku Europske Unije temeljen na REACH (eng. *Registration, Evaluation and Authorization of Chemical Substances*) pravilniku koji naglašava uporabu *in vitro* testova kao alternative *in vivo* testovima na pokusnim životinjama s ciljem smanjenja broja laboratorijskih životinja za ispitivanje. Takvi testovi obuhvaćaju stanične kulture, stanične linije, kulture organa i dijelove tkiva. Citotoksičnost se može odrediti i mjerenjem stanične smrti, preživljavanja i funkcionalnosti stanica. Metoda koja je korištena u ovom radu je kolorimetrijski The Cell Titer 96®AQueous One Solution test stanične proliferacije na humanim stanicama HeLa i HEK293T (slika 4 i 5). Također je izmjeren antioksidacijski kapacitet pet NADES-a (limunska kiselina:glukoza, limunska kiselina:prolin, jabučna kiselina:glukoza, betain:jabučna kiselina:prolin, betain:jabučna kiselina:glukoza).

NADES su pripravljeni pri temperaturi od 60 °C, a kod eutektičnih otapala koja sadrže glukozu (limunska kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza, betain:glukoza, betain:jabučna kiselina:glukoza) tijekom sinteze primjećena je svijetlo smeđa boja zbog karamelizacije šećera pa se zbog toga njihova priprava provodila na temperaturi od 40 °C, što je u skladu sa zapažanjima Hayyan i sur. (2012).

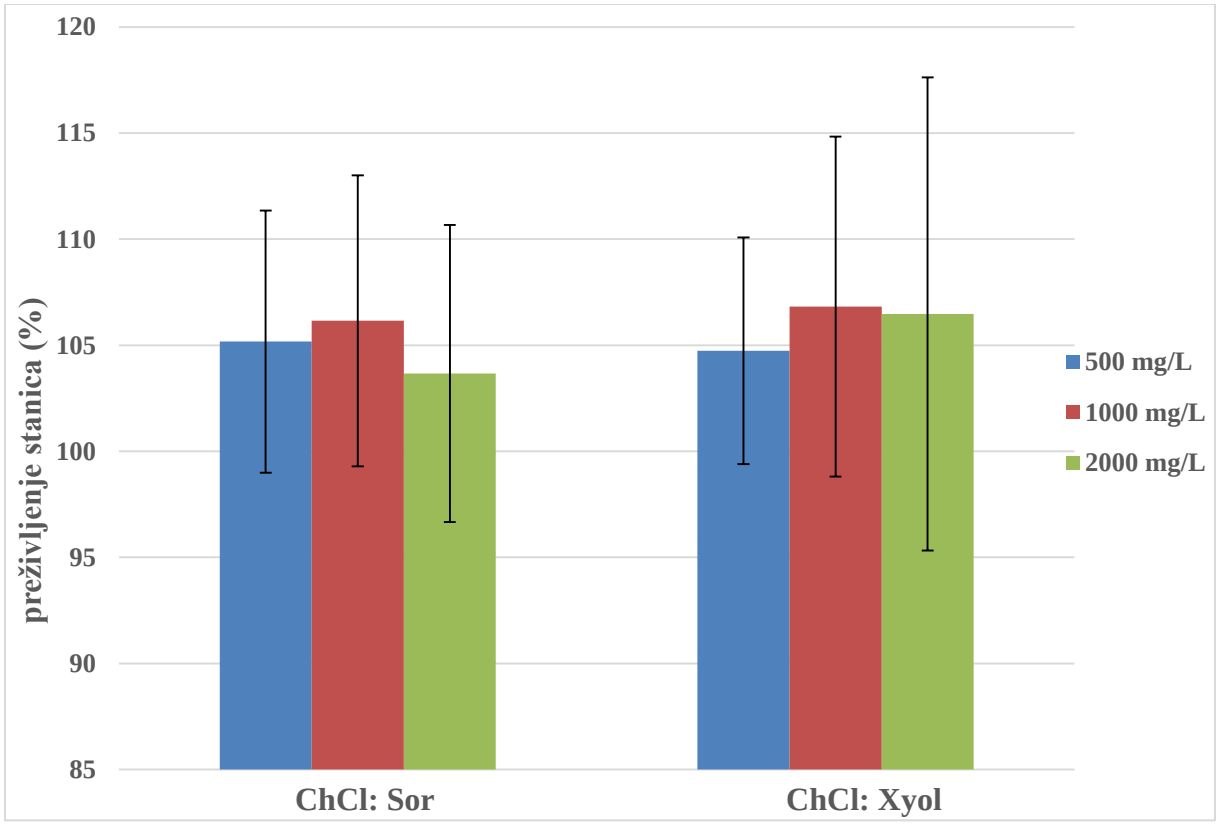
Vrijeme potrebno za sintezu tekućeg otapala iz krutih komponenta različito je ovisno o vrsti ishodnih tvari te udjelu vode u NADES-u. Za pripravu otapala s udjelom vode 50 % bilo je potrebno u prosjeku sat-sat i pol, dok je za one s najmanjim udjelom vode (10 %) bilo potrebno dulje vrijeme, dva-tri sata. Slično je zaključeno u istraživanju Dai i sur. (2013b) koji su pokazali da dodatak male količine vode u reakcijsku smjesu utječe na smanjenje vremena i temperature priprave. Međutim, treba imati na umu da dodatkom veće količine vode tj. više od 50 % dolazi do pucanja nastalih vodikovih veza čime se mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva, ali i struktura NADES-a, koja se gubi jer se povećava broj slobodnih molekula.

4.1. *In vitro* djelovanje NADES-a na HeLa i HEK293T stanične linije

Učinak NADES-a, koje sam pripravila u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na PBF-u s 10, 30 i 50 % vode , ispitan je na dvije stanične linije (HeLa i HEK293T) primjenom kolorimetrijskog The Cell Titer 96®AQueous One Solution testa. Stanice su tretirane različitim koncentracijama NADES-ate je njihova koncentracija u jažicama bila 500 mg L^{-1}, 1000 mg L^{-1} i 2000 mg L^{-1}, a rezultati su dobiveni spektrofotometrijskim očitavanjem na čitaču ploča te izraženi kao preživljenje stanica, odnosno kao postotak tretiranih stanica u odnosu na netretirane stanice.

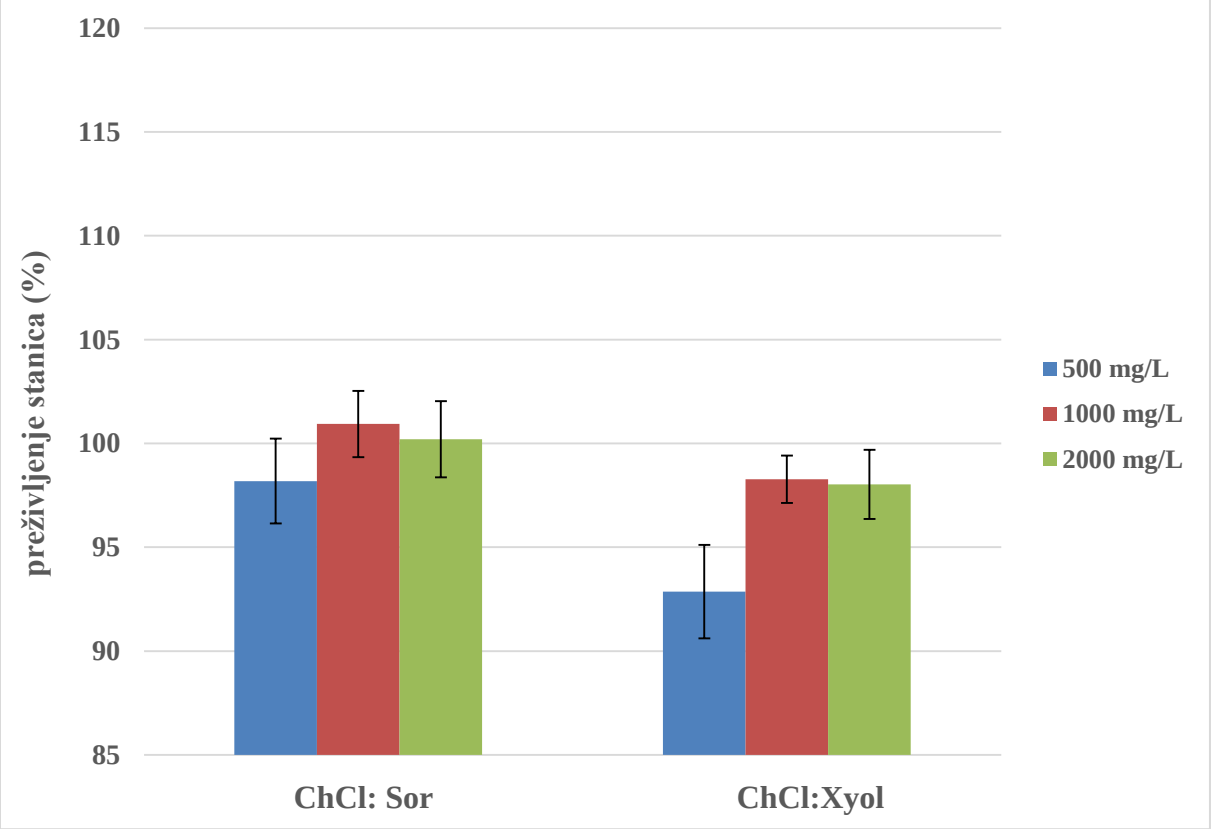
4.1.1. *In vitro* djelovanje NADES-a baziranih na kolin kloridu na HeLa i HEK293T stanice

Jedan od najpoznatijih sastojaka korištenih za pripravu eutektičnih otapala je kolin klorid zbog svoje niske cijene, biorazgradivosti i netoksičnosti. U ovom radu su ispitana dva eutektična otapala koja sadrže kolin klorid i dva šećerna alkohola, kolin klorid:sorbitol (ChCl:Sor) i kolin klorid:ksilitol (ChCl:Xyol) što je prikazano na slikama 9 i 10.



Slika 9. Učinak eutektičnih otapala baziranih na kolin kloridu na rast HeLa stanica

Iz rezultata prikazanih na slici 9. vidljivo je da eutektična otapala bazirana na kolin kloridu kao kationu ne djeluju toksično na HeLa staničnu liniju te niti u jednoj koncentraciji nije zapažena inhibicija rasta stanica.

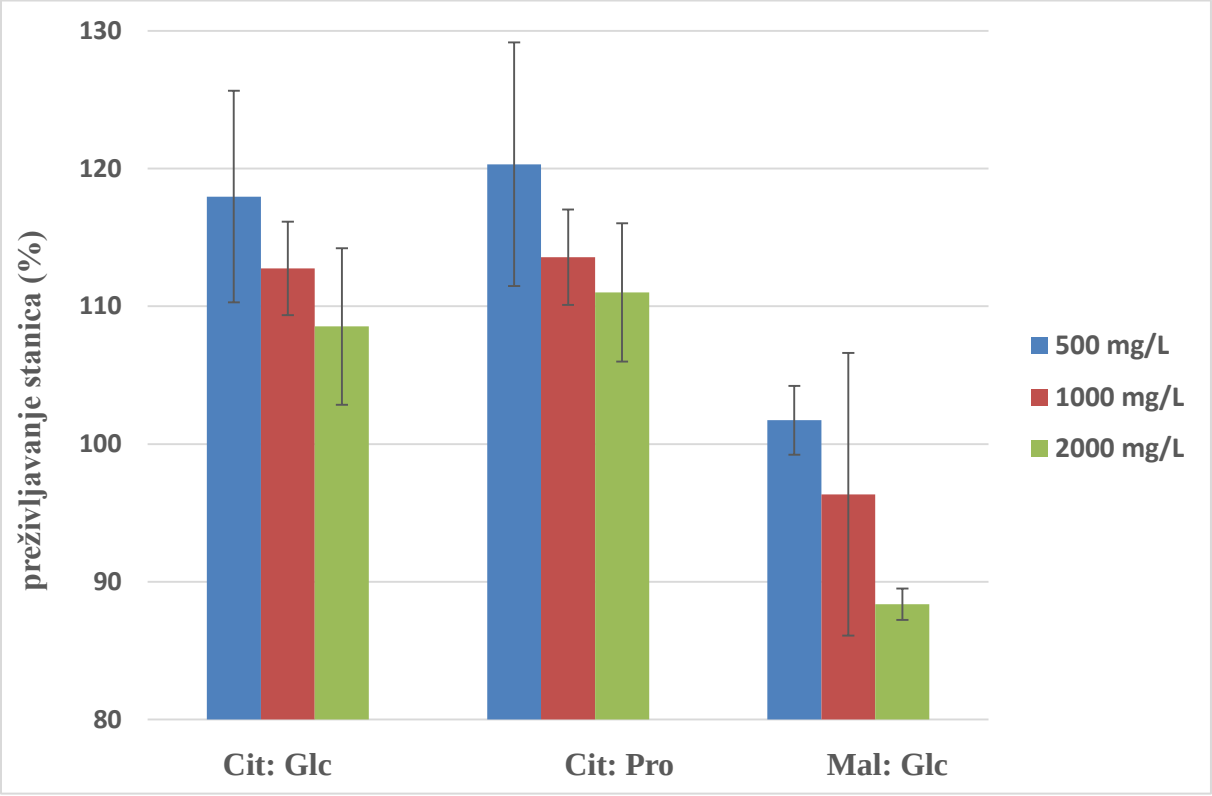


Slika 10. Učinak eutektičnih otapala baziranih na kolin kloridu na rast HEK293T stanica

Kao što testirani NADES ne djeluju toksično na HeLa staničnu liniju, isto tako ne djeluju toksično niti na HEK293T staničnu liniju, što je i prikazano na slici 10, te možemo zaključiti da prirodna eutektična otapala koja sadrže kolin klorid i šećerne alkohole ksilitol i sorbitol nemaju negativan učinak na rast HeLa i HEK293T stanica i nisu citotoksična pri ispitanim koncentracijama. Radošević i sur. (2014) testirali su eutektično otapalo kolin klorid:glicerol *in vitro* na CCO i MCF-7 stanicama koje je također klasificirano kao otapalo niske citotoksičnosti. Također, Hayyan i sur. (2013a, 2013b) su u svom radu objavili da su eutektična otapala bazirana na kolin kloridu netoksična za bakterije, a Wen i sur. (2015) i Ventura i sur. (2014) objavili su da toksičnost kolinijevih DES-ova ovisi o anionu. Samim time, dobiveni rezultati u ovom radu slažu se s rezultatima objavljenih istraživanja.

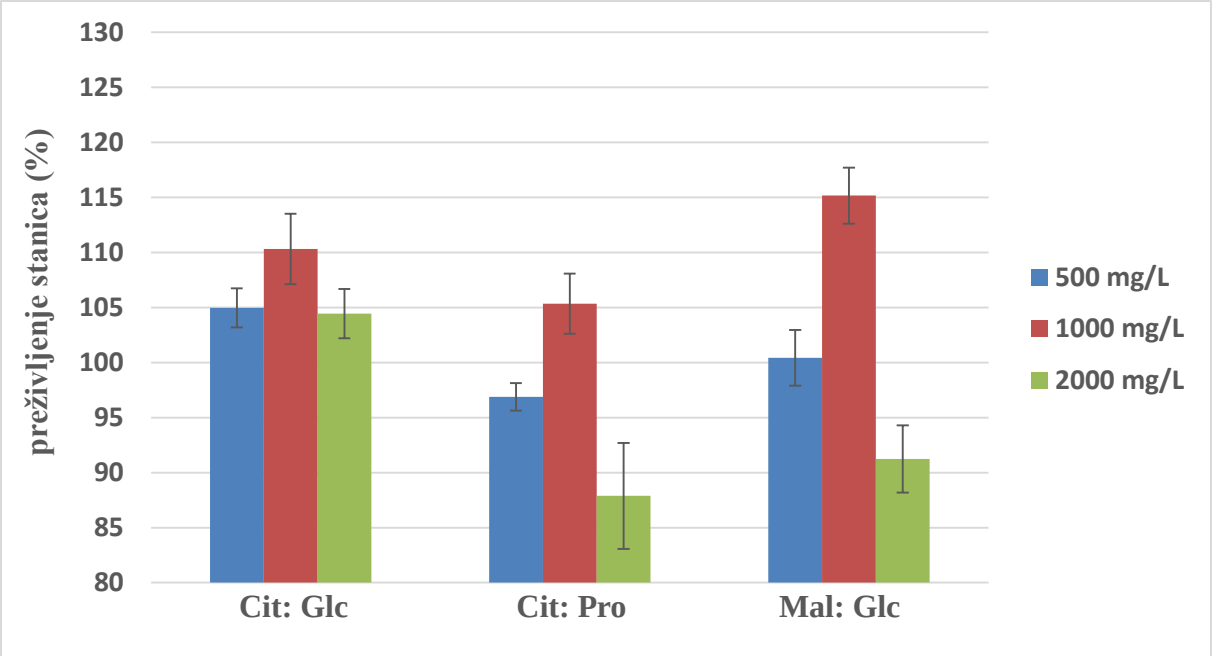
4.1.2. *In vitro* djelovanje NADES-as organskim kiselinama na HeLa i HEK293T stanice

Učinak eutektičnih otapala kojakao HBD imaju organskekiseline (jabučna i limunska kiselina) teneesencijalnu aminokiselinu prolin i šećer glukozu, ispitan je na staničnim linijama HeLa i HEK293T. Prilikom ispitivanja navedenih NADES-a zapaženo je da je dodatkom otapala limunska kiselina:glukoza, limunska kiselina:prolin i jabučna kiselina:glukoza, došlo do promjene boje medija u jažici. Promjena boje iz ružičaste u žutu uzrokovana je promjenom pH vrijednosti medija za uzgoj stanica, a pri koncentraciji 2000 mg L^{-1} je ona bila najizraženija. Zhao i sur. (2013) objavili su kako NADES-i s organskim kiselinama imaju niski pH (<6,5), a optimalni pH za rast stanica je7,0-7,4. Iako je došlo do promjene pH medija, to se nije nepovoljno odrazilo na rast stanica. Na slikama 11 i 12 prikazan je učinak različitih koncentracija (500 mg L^{-1}, 1000 mg L^{-1} i 2000 mg L^{-1}) navedenih otapala.



Slika 11. Učinak eutektičnih otapala s organskim kiselinama kao HBD na rast HeLa stanica

Iz rezultata prikazanih na slici 11 vidljivo je da eutektična otapala s organskim kiselinama kao HBD-ima ne djeluju toksično na HeLa staničnu liniju te niti u jednoj koncentraciji nije zapažena značajna inhibicija rasta stanica, najveći postotak inhibicije (~12 %) zapažen je pri djelovanju Mal:Glu (2000 mg L^{-1}), bez obzira na zapaženu blagu promjenu pH medija za uzgoj.

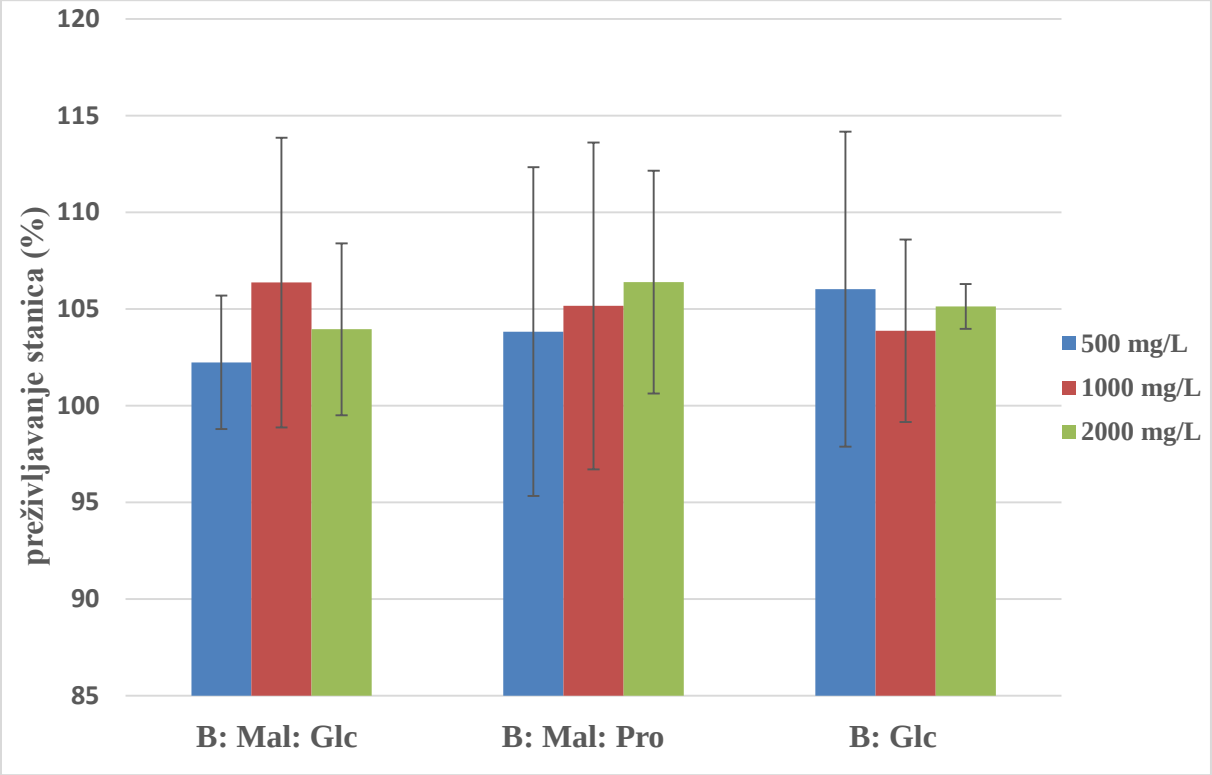


Slika 12. Učinak eutektičnih otapala s organskim kiselinama kao HBD na rast HEK293T stanica

Na slici 12 može se vidjeti da nije zapažen negativni učink na rast HEK293T stanica, kao niti kod HeLa stanica. Najniža vrijednost preživljenja HEK293T stanica je 87,88 % kada su one tretirane najvećom koncentracijom otapala limunska kiselina:prolin. To je slično rezultatima iz rada Radošević i sur. (2014) gdje je eutektično otapalo kolin klorid:oksalna kiselina pokazala umjerenu toksičnost prema CCO stanicama te je zaključeno da eutektično otapalo zbog prisutnosti organske kiseline ima lošiji ekotoksikološki profil nego ostali testirani DES-ovi. Također,Paiva i sur. (2014) testirali su 11 NADES-a i oni koji su u svom sastavu imali tartarsku i limunsku kiselinu pokazali su se kao najnepovoljniji za rast stanica. U našem radu nije došlo do drastičnog pada preživljenja stanica, tako se može zaključiti da ovi NADES-iu ispitanim koncentracijama nemaju toksični učinak. Iako, treba istaknuti da je nužno nadalje ispitivati NADES-e s organskim kiselinama kao HBD-ima budući da su i drugi autori zapazili njihovu veću citotoksičnost nego kod onih sa šećerima kao HBD-ima (Dai i sur., 2013b; Hayyan i sur., 2016).

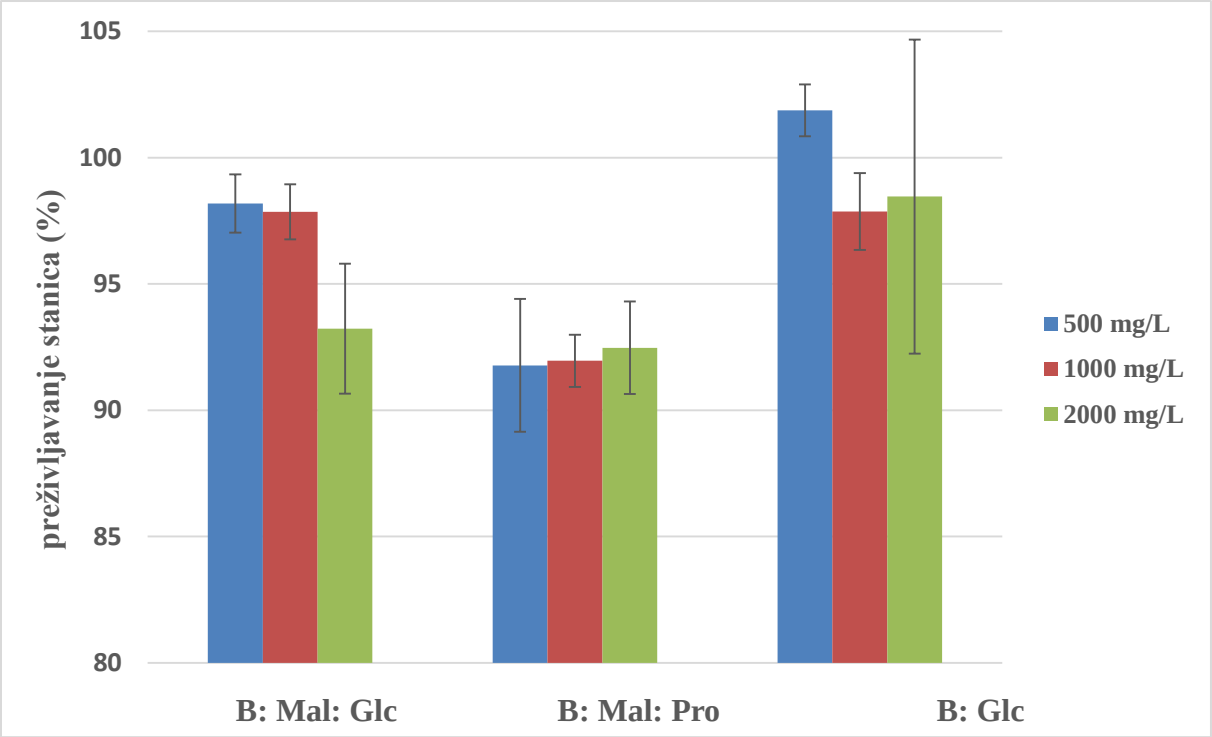
4.1.3. *In vitro* djelovanje NADES-a koji sadrže betain na HeLa i HEK293T stanice

Učinak eutektičnih otapala koji sadrže betain (betain:jabučna kiselina:glukoza ,betain:jabučna kiselina:prolin, betain:glukoza), ispitan je na staničnim linijama HeLa i HEK293T te prikazan na slikama 13 i 14. Betain, također poznat i kao trimetilglicin (TMG) tercijarni je amin koji se nalazi u većini živih organizama. Kod životinja je bitan zbog procesa transmetilacije pošto one ne mogu samostalno sintentizirati metilne grupe. Dakle, betain kao donor metilne skupine može djelomično zamjeniti kolin i metionin u hrani.



Slika 13. Učinak eutektičnih otapala koji sadrže betain na rast HeLa stanica

Iz rezultata prikazanih na slici 13 vidljivo je da niti eutektična otapala, koja sadrže betain, ne djeluju toksično na HeLa stanice, jer niti pri jednoj ispitanoj koncentraciji nije zapažena inhibicija rasta stanica.



Slika 14. Učinak eutektičnih otapala koji sadrže betain, na rast HEK293T stanica

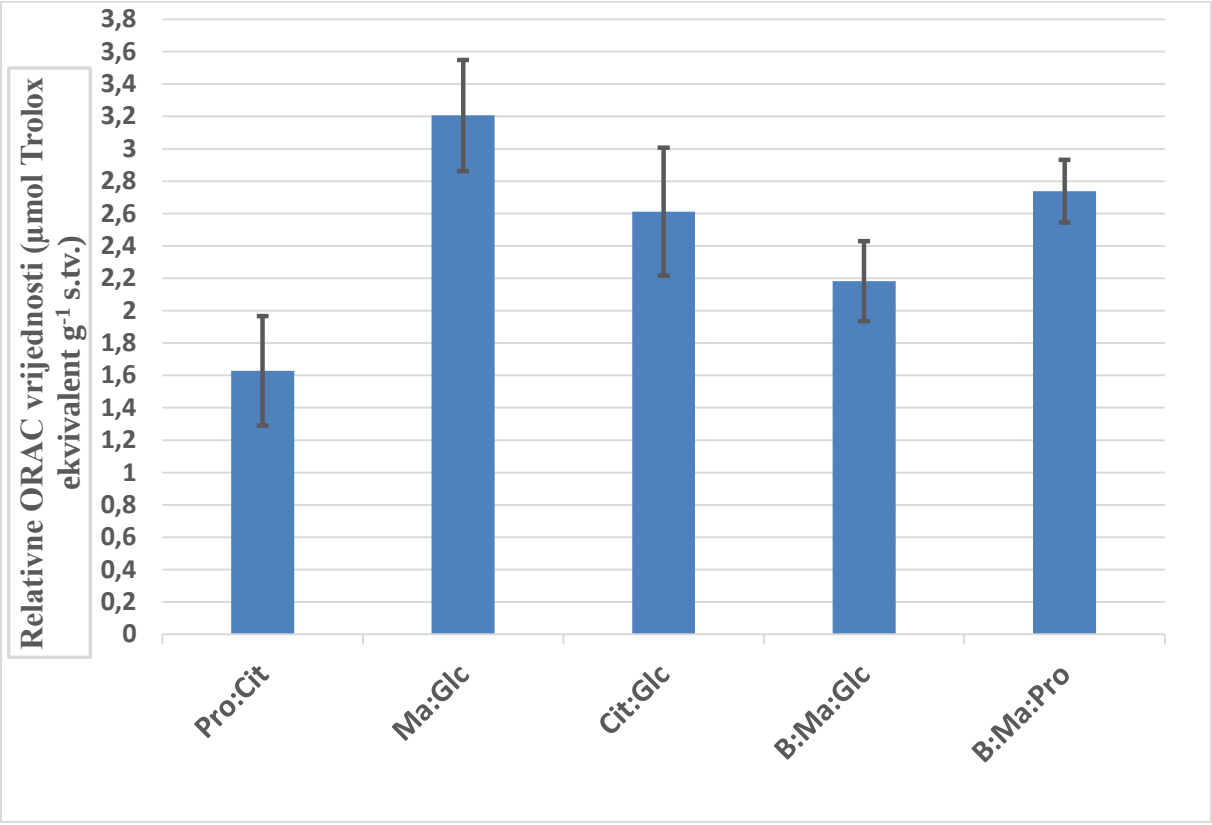
Na slici 14 prikazani su rezultati koji prikazuju preživljenje HEK293T stanica tretiranih NADES-ima koji sadrže betain. Obzirom na prikazano, može se zaključiti da navedena otapala nisu nepovoljna kako za HEK293T tako i za HeLa stanice.

Prema rezultatima prikazanim na slikama 9, 10, 11, 12, 13 i 14 vidljivo je da niti jedan od testiranih NADES-a nije niti pri najvećoj ispitanoj koncentraciji (2000 mg L^{-1}) uzrokovao 50 % inhibicije rasta stanica. Stoga se može zaključiti da su EC_{50} vrijednosti veće od 2000 mg L^{-1}. Radošević i sur. (2014) testirali su NADES bazirane na kolin kloridu na CCO i MCF-7 staničnim linijama. Njihovi rezultati su pokazali da kolin klorid:oksalna kiselina ima umjerenu toksičnost (EC_{50}vrijednost < 5mM) dok NADES-i s glukozom i glicerolom kao HDB imaju EC_{50} vrijednost > 10 mM, odnosno klasificirani su kao nisko citotoksična otapala. Obzirom na sve navedeno, različita (prirodna) eutektična otapala mogu ili ne moraju biti citotoksična pri ispitivanju njihovog učinka na različitim staničnim linijama, što prvenstveno ovisi o prirodi samih otapala i njihovom sastavu.

4.2.Antioksidacijski kapacitet prirodnih eutektičkih otapala

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta prirodnih spojeva i bioloških sustava postoji niz standardiziranih metoda, a u ovom radu za određivanje antioksidacijskog kapaciteta pet NADES-a korištena je ORAC metoda. Metoda je bazirana na praćenju inhibicije djelovanja slobodnog radikala AAPH (2,2′-azobis-(2-metilpropionamid)-dihidroklorid) na fluorescentni spoj fluorescein. Prednosti metode su što se reakcija odvija pri pH vrijednosti u području fiziološkog pH i temperaturi 37°C te se kao supstrat koristi peroksil radikal s redoks potencijalom i reakcijskim mehanizmom sličnim onom kakav se odvija u našem organizmu.

ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet pet NADES (limunska kiselina:glukoza, limunska kiselina:prolin, jabučna kiselina:glukoza, betain:jabučna kiselina:prolin, betain:jabučna kiselina:glukoza). Rezultati se izražavaju u ekvivalentima Troloxa (TE, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), tj. kao μmol TE g^{-1} s.tv. Rezultati analize antioksidacijskog kapaciteta NADES-a izraženi su kao srednja vrijednost ± SD (n =3) te su prikazani na slici 15.



Slika 15. Relativne ORAC vrijednosti za NADES

Određene i izračunate relativne ORAC vrijednosti za pet analiziranih NADES se međusobno razlikuju. Među ispitanim otapalima najveći antioksidacijski kapacitet tj. najveću ORAC vrijednost ima jabučna kiselina:glukoza (3,20 ± 0,34 μmol TE g^{-1}s.tv.), a prate ga otapala betain:jabučna kiselina:prolin>limunska kiselina:glukoza>betain:jabučna kiselina:glukoza>limunska kiselina:prolin s najnižom izmjerenom ORAC vrijednošću (1,63 ± 0,33 μmol TE g^{-1}s.tv.). Navedeni rezultati pokazuju da testirani NADES-i imaju određenu, ali relativno malu, antioksidacijsku aktivnost, što se razlikuje od zapažanja Hayyan i sur. (2015), koji su pokazali da NADES koji u sastavu imaju kolin klorid i HBD-e kao što su glicerin, etilen glikol, trietilen glikol i urea ne pokazuju nikakvu antioksidacijsku aktivnost. S obzirom na sastav NADES vidi se da najmanju antioksidacijsku aktivnost imaju NADES-i koji sadrže limunsku kiselinu (Pro:Cit), za razliku od ostalih koji sadrže jabučnu kiselinu, te se može zaključiti da NADES-i s organskim kiselinama kao HDB-ima imaju antioksidacijski potencijal zbog ishodnih komponenti koje u čistom stanju posjeduju antioksidacijsko svojstvo (npr. limunska i jabučna kiselina). Iako Triantis i sur. (2001) nisu mjerili antioksidacijsku aktivnost NADES, vidi se poveznica između njihovih i naših rezultata. Oni su na temelju rezultata PSCL (*photo-storage chemiluminescene*) metode pokazali da aditiv jabučna kiselina (E296) ima puno veću antioksidacijsku aktivnost od limunske kiseline (E330) što ide u prilog gore spomenutom zaključku.

Limunska kiselina je prirodni antioksidans, sredstvo za zakiseljavanje i reguliranje kiselosti, sredstvo za kompleksiranje. Prirodno se nalazi u mnogim vrstama voća. Pojačava antioksidacijske učinke drugih aditiva.Također, limunska kiselina djeluje kao antioksidacijski sinergist, jer uklanjaja ione metala koji kataliziraju reakcije oksidacije i utječu na povećanje aktivnosti fenolnih antioksidansa, te se može koristiti kao sredstvo za uklanjanje radioaktivnih čestica. Prirodno sredstvo za reguliranje kiselosti predstavlja i jabučna kiselina koja je hidroksidikarboksilna kiselina prisutna u kiselom voću. Također, ona se nalazi u svakoj živoj stanici, jer je međuprodukt ciklusa limunske kiseline koji se kao dio stanične respiracije zbiva u mitohondrijima. Primjenjuje se kao sredstvo za keliranje zbog čega uspješno štiti tkivo jetre od štetnog učinka $AlCl_3$, inhibira aktivnost mnogih enzima kao npr. polifenoloksidaze (sprječava posmeđivanje voća). Prolin je netoksična aminokiselina, netoksična je te je važan sastojak kolagena, proteina koji poput ljepila drži sve stanice i tkiva zajedno. To je protein koji nalazimo u gotovo svim tkivima, kostima, hrskavicama, krvnim žilama i dr. stoga je prolin koristan u procesu zacjeljivanja rana. Ozden i sur. (2009) dokazali su da prolin ima izravnu ulogu u oporavku tijekom oksidativnog stresa u lišću vinove loze. Direktno djelujena enzimski sustav, lipidnu peroksidaciju i propuštanje elektrolita. Betain također ima

ulogu u biljnim stanicama, gdje potpomaže antioksidacijsku obranu od oksidacijskog stresa nastalog nakupljanjem Cd u stanicama. Alirezaei i sur. (2015) pokazali su da betain ima potencijal kao antioksidans za sprječavanje oksidacijskog oštećenja u tkivu mozga štakora. Zbog svega navedenog, može se pretpostaviti da NADES-i koji u svom sastavu imaju spomenute spojeve imaju određeni, veći ili manji, antioksidacijski kapacitet.

Rajan i sur. (2015) u svom radu dokazali su da sirovi ekstrakt đumbira u NADES-u ima antioksidacijska svojstva. NADES se pokazao kao djelotvorno otapalo za uzgoj bioloških farmakofora različitih polariteta, tj. dio molekule odgovorne za farmakološko djelovanje. S obzirom na to da se navedene komponente (limunska i jabučna kiselina, prolin i betain) mogu primjenjivati kao antioksidacijska sredstva te na dobivene rezultate o antioksidacijskim svojstvima NADES-a može se očekivati da će daljnja istraživanja na staničnim kulturama pokazati neku vrstu biološke aktivnosti prirodnih eutektičnih otapala.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Primarni metaboliti kao što su kolin klorid, sorbitol, ksilitol, limunska kiselina, jabučna kiselina, prolin, betain i glukoza u točno odgovarajućim uvjetima i omjerima s različitim udjelom vode uspješno tvore stabilne NADES-e.

2. Osam pripravljenih NADES-a ispitani su primjenom MTS metode i određen je njihov učinak na rast HeLa i HEK293T stanica u kulturi. U rasponu koncentracija (500 mg L^{-1} – 2000 mg L^{-1}) niti jedan od osam NADES-a nema značajniji negativan utjecaj na rast i preživljenje HeLa i HEK29T stanica.

3. EC_{50} vrijednost ispitanih NADES-a veća je od 2000 mg L^{-1} stoga posjeduju nisku citotoksičnost.

4. ORAC metodom određena je antioksidacijska aktivnost za pet od osam sintetiziranih NADES-a, koji pokazuju nisku antioksidacijsku aktivnost..

5. Obzirom na pokazana svojstva NADES-a koji su netoksični za obje stanične linije i posjeduju antioksidacijsku aktivnost, ispitana otapala predstavljaju obećavajuću alternativu za organska otapala u raznim tehnološkim procesima.

6. LITERATURA

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

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* **1**, 70–71.

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. (2004) Deep eutectic solvents formed betweencholine chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* ***126,*** *9142*–9147.

Anonymous 1 (2016) <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx?geo_country=hr /> Pristupljeno 08. srpnja 2016.

Anonymous 2 (2012) <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-3249.aspx?geo_country=hr /> Pristupljeno 15. srpnja 2016.

Anonymous 3 (2016) < http://www.mtg-de.com/442-72-neubauer-improved-counting-chamber/> Pristupljeno 18.srpnja 2016.

Anonymous 4 (2016) <https://worldwide.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/cytotoxicity-assays/real-time-cytotoxicity-assay/ > Pristupljeno 15. kolovoza 2016

Anonymous5 (2012) <http://www.promega.co.jp/jp/jp_tech/FAQs/Q&A_CellTiter 96AQone.html/>Pristupljeno 16.kolovoza 2016.

Alirezaei, M., Khoshdel, Z., Dezfoulian, O., Rashidipour, M., Taqhadosi, V. (2015)Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *J Physiol Sci*. **65**, doi: 10.1007/s12576-015-0360-0

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. (2011) Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol.* **156,** 1701-1705.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, Vorkapić-Furač, F., J., Gaurina Srček, V. (2014) Ionske kapljevine- razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem. Ind*. **63**, 163-171.

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. *Ecotox. Environ. Safe*. **99,** 1–12.

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.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* **187**, 14-19.

Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech*. **115**, 379-385.

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.

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

Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., del Monte F. (2009) Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures. *Langmuir* **25,** 5509-5515.

Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y. M., Hashim, M. A. (2012) Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochim. Acta* **541,** 70-75.

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

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

Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Wahaibi, T., Hashim, M. A. (2013c) Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *J. Mol. Liq*. **178**, 137-141.

Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A. (2015) In Vitro and In Vivo Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLoS ONE* **10,** e0117934. doi:10.1371/journal.pone.0117934

Hayyan, M., Mbous, Y.P., Hayyan, A., Looi, C.Y., Wong, W.F., Salleh, Z., Mohd-Ali, O., (2016) Natural deep eutetic solvents: cytotoxic profile. *SpringerPlus* DOI 10.1186/s40064-016-2575-9

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

Islam, M. M., Hoque M. A., Okuma E., Banu, M. N, Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Murata, Y. (2009) Exogenous proline and glycine betaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* **166**, 1587-1597.

Jhong, H.-R., Wong, D.-S.-H., Wan, C.-C., Wanf, Y.-Y., Wei, T.-C. (2009) A novel deep eutetic solvents- based ionic liquid used as electrolyte for dye- sensitized solar cells. *Electrochem. Commun*, **11**, 209-211.

Juneidi, I., Hayyan, M., Ali, O.M. (2016) Toxicity profile of choline chloride-based deep eutetic solvents for funghi and *Cyprinus caprio* fish. *Environ. Sci. Pollut. Res.***23**, 7648–7659.

Karande, P., Mitragotri, S. (2009) Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochimic Biophys Acta* doi: 1788:2362-2373

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing and xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. **56**, 195-204.

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.

Laszlo, J.A., Compton, D.L. (2005) Enzymatic glycerolysis and transesterification of vegetable oil for enhanced production of feruloylated glycerols. *Chem Soc*, 83: 765. doi: 10.1007/s11746-006-5012-3

Martins, M., Aroso, I.M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014) Enhanced Performance of Supercritical Fluid Foaming of Natural- Based Polymers by Deep Eutetic Solvents. *AIChE J.* **60**, 3701–3706.

Maugeri, Z., de María, P. D. (2012) Novel choline-chloride-based deep-eutectic solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. *RSC Adv.* **2**, 421–425.

Miret, S., Groene, E., Klaffke, W. (2006) Comparasion of In vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *Jour. Biomol. Screen.* **11,** 184-193.

Morais, P., Goncalves, F., Coutinho, J.A.P., Venutra, S.P.M. (2015) On the ecotoxicity of cholinium-based deep eutetic solvents. *ACS Sustainable Chem. Eng.***3**, 3398–3404.

Morrison, H.G., Sun, C.C., Neervannan, S. (2009) Characterization of thermal behaviour of deep eutetic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Internat. JPharma.***378**, 136-139

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

Mouratoglou, E., Malliou, V., Makris, D. P. (2016) Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass. *Waste Biomass Valor.* 1-11. doi 10.1007/s12649-016-9539-8

Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M. (2005) Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Methods Enzymol.* **93,** 257-266.

Ozden, M., Demirel, U., Kahraman, A., (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine exposed to oxidative stressby H_2O_2. *Sci Horticul.* **119**, doi: 10.1016/j.scienta.2008.07.031

Paiva, A., 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.

Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2014) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46-53.

Radošević, K., Železnjak, J., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I., Slivac, I., Gaurina Srček, V. (2016) Comparative in vitro study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. *Ecotox. Environ. Safe.* **131**, 30-36.

Rajan, M., Prabhavathy, A., Ramesh, U. (2015)Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for Zingiber officinale Roscoe: The Study of Chemical Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities. *Natur. Prod. Journal*. **5**, 3-13. doi: 10.2174/2210315505011504140947l9

Ruß, C., König, B. (2012) Low melting mixtures in organic synthesis–an alternative to ionic liquids? *Green Chem.* **14**, 2969-2982.

Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082.

Tang, X., Liu, J., Dong, W., Li, P., Li, L., Lin, C., Zheng, Y., Hou, J., Li, D. (2013) The Cardioprotective Effects of Citric Acid and L-Malic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, Article ID 820695, http://dx.doi.org/10.1155/2013/820695

Triantis, T., Papadopoulos, K., Dimotikali, D., Nikokavouras, J. (2001) Evaluation of food antioxidant activity by photostorage chemiluminescence. *Anal. Chim Acta.* **2**, 263-268.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998) Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J.Agric. Food Chem*. **46**, 4113-4117.

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

Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41,** 7108-7146.

Zhao, H., Zhang, C., Crittle, T. D. (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **85,** 243−247.

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

Wu, S.-H., Caparanga, A.R., Leron, R.B., Li, M.-H. (2012) Vapor pressure of aqueous choline chloride- based deep eutetic solvents (ethaline, glyceline, maline and reline) at 30-70 °C. *Thermochim. Acta.***544**, 1-5.