

Biološki aktivne tvari iz sekundarnih sirovina

Pavlović, Mandica

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:694051>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Mandica Pavlović

**BIOLOŠKI UČINAK
FITOKEMIKALIJA IZ LJUSKE
ORAHA I KAKAOVOG ZRNA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo, te uz pomoć asistentice Ane Huđek-Turković, mag.ing.biotechn. Ovo istraživanje provedeno je u sklopu HRZZ projekta: „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ kojem je voditelj prof. dr. sc. Božidar Šantek.

Veliko hvala izvanrednoj mentorici, profesorici prof.dr.sc. Kseniji Durgo, za pruženu priliku za izradu ovog rada, na svim savjetima i kritikama te svemu što sam naučila tijekom njegove izrade. Hvala i asistentici mag.ing. Ani Huđek-Turković na nesebičnoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovoga rada. Vaša stručnost, ali prvenstveno ljudskost i dobra volja činile su mi vrijeme provedeno sa Vama u laboratoriju zaista prekrasnim.

Najveće hvala mojoj obitelji na ljubavi i bezuvjetnoj podršci kroz sve godine moga školovanja. Bez vas ne bih bila ovo što jesam. Ovaj rad posvećujem svojoj majci, najvećem borcu i mojem najvećem osloncu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI IZ SEKUNDARNIH SIROVINA

Mandica Pavlović, univ. bacc.ing. biotechn., 0058213644

Sažetak: U ovom se radu utvrdilo da li i pod kojim uvjetima ekstrakt ljuske oraha i kakaovog zrna, dobiveni iz agro industrijskog otpada, mogu utjecati na preživljenje i antioksidacijski status stanica probavnog sustava (tumorske epitelne stanice jetre (HepG2), želudca (AGS) i raka debelog crijeva (Caco-2)) te bakterijskih predstavnika humane mikrobiote (*Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus aureus*). Istražio se utjecaj ekstrakata na promjenu adhezije bakterija na stanice Caco-2 i Cal-27 i stvaranje biofilma bakterija. Dnevno preporučene koncentracije istraživanih ekstrakata pokazale su toksični i antioksidacijski učinak na stanice Caco-2 s time da su prisustvo polisaharida i dulje vrijeme izlaganja pospješili antioksidacijsko djelovanje ekstrakata. Dobiveni podaci ukazuju na antimikrobni karakter ekstrakata prema bakteriji *S. aureus* te na sposobnost ekstrakta da dovede do promjene u adheziji za epitelne stanice probavnog sustava. Polisaharidi su imali bitnu ulogu u formiranju biofilma; ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima povećao je formiranje biofilma bakterije *S. aureus*, dok je ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima smanjio formiranje biofilma bakterije *E. coli*.

Ključne riječi: ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna, antioksidacijski potencijal, adhezija bakterija, citotoksičnost, biofilm

Rad sadrži: 67 stranica, 36 slika, 13 tablica, 90 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Pomoć pri izradi: Ana Huđek-Turković, mag.ing.biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Reno Hrašćan (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. prof. dr. sc. Draženka Komes (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Marković (zamjenski član)

Datum obrane: 22. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Genetics of Microorganisms

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM SECONDARY RAW MATERIALS

Mandica Pavlović, univ. bacc.ing. biotechn., 0058213644

Abstract: In this paper, it was determined whether and under what conditions walnut shell and cocoa bean extract, obtained from agro-industrial waste, can influence the survival and antioxidant status of cells of the digestive system (tumor epithelial cells of the liver (HepG2), stomach (AGS) and colon cancer) intestines (Caco-2)) and bacterial representatives of the human microbiota (*Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus aureus*). The influence of the extracts on the change in bacterial adhesion to Caco-2 and Cal-27 cells and the formation of bacterial biofilms was investigated. The daily recommended concentrations of the researched extracts showed a toxic and antioxidant effect on Caco-2 cells, with the fact that the presence of polysaccharides and a longer exposure time enhanced the antioxidant activity of the extracts. The obtained data indicate the antimicrobial character of the extract against the bacterium *S. aureus* and the ability of the extract to lead to a change in adhesion for the epithelial cells of the digestive system. Polysaccharides played an important role in biofilm formation; walnut shell extract with polysaccharides increased biofilm formation of *S. aureus* bacteria, while cocoa bean shell extract with polysaccharides decreased biofilm formation of *E. coli* bacterium.

Keywords: walnut shell and cocoa bean extracts, antioxidant potential, bacterial adhesion, cytotoxicity, biofilm

Thesis contains: 67 pages, 36 figures, 13 tables, 90 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ksenija Durgo, Full professor

Technical support and assistance: MSc Ana Huđek-Turković, Assistant

Reviewers:

1. PhD. Reno Hrašćan, Full professor (president)
2. PhD. Ksenija Durgo, Full professor (mentor)
3. PhD. Draženka Komes, Full professor (member)
4. PhD. Ksenija Marković, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 22nd, 2022

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	ORAH.....	2
2.1.1	Ljuska oraha	2
2.2	KAKAOVAC	3
2.2.1	Ljuska kakaovog zrna.....	4
2.3	BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI LJUSKE PLODA ORAHA I KAKAOVCA.....	5
2.3.1	Polifenolni spojevi.....	6
2.3.1.1	<i>Polifenolni spojevi u ljusci oraha</i>	7
2.3.1.2	<i>Polifenolni spojevi u ljusci kakaova zrna</i>	9
2.3.2	Metilksantini.....	11
2.4	SLOBODNI RADIKALI (ROS) I OKSIDATIVNI STRES.....	12
2.5	MODELI ZA TOKSIKOLOŠKA ISTRAŽIVANJA	14
2.6	MIKROORGANIZMI	15
2.6.1	<i>Escherichia coli</i>	15
2.6.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	16
2.6.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.7	ADHEZIJA BAKTERIJA NA HUMANE STANICE	17
2.8	BIOFILM	17
3	EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1	MATERIJALI	19
3.1.1	Biljni materijal.....	19
3.1.2	Priprema i uzgoj humanih stanica	19
3.1.3	Radni mikroorganizmi.....	20
3.1.4	Otopine	20
3.1.5	Laboratorijski pribor.....	21
3.1.6	Aparature	22
3.1.7	Kemikalije	22
3.1.8	Hranjive podloge	23
3.2	METODE RADA.....	25
3.2.1	Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na humanim staničnim linijama	25
3.2.2	Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) 2',7'-diklorhidrofluorescin-diacetat (DCFH-DA) metodom.....	26

3.2.3	Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na bakterijskim kulturama.....	27
3.2.4	Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na promjenu adhezije bakterija za humane stanice	27
3.2.5	Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na formiranje biofilma	28
3.3	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	29
4	REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1	CITOTOKSIČNOST EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA HUMANE STANIČNE LINIJE	30
4.1.1	Citotoksičnost ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2	31
4.1.2	Citotoksičnost ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na humane stanične linije adenokarcinoma epitela želuca AGS	32
4.1.3	Citotoksičnost ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na humane stanične linije adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2	34
4.2	PROOKSIDATIVNI/ANTIOKSIDATIVNI UČINAK EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA HUMANE STANIČNE LINIJE.....	37
4.2.1	Prooksidativni učinak ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na HepG2 stanice.....	37
4.2.2	Prooksidativni učinak ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na AGS stanice.....	39
4.2.3	Prooksidativni učinak ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na Caco-2 stanice.....	40
4.3	CITOTOKSIČAN UČINAK EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA BAKTERIJSKE KULTURE <i>E. coli</i>, <i>L. fermentum</i> i <i>S. aureus</i>	43
4.4	UTJECAJ EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA ADHEZIJU BAKTERIJSKIH STANICA NA HUMANE STANIČNE LINIJE.....	46
4.4.1	Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterijskih stanica na tumorske epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2)	47
4.4.2	Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterijskih stanica na tumorske epitelne stanice jezika (Cal27)	50
4.5	UTJECAJ EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA FORMIRANJE BAKTERIJSKOG BIOFILMA	53
5	ZAKLJUČCI.....	57
6	LITERATURA.....	58

1 UVOD

U današnje vrijeme, znatno je porasla ekološka svijest, te posljedično i problematika vezana za zbrinjavanje otpada. Svake godine nastaju velike količine agro-industrijskog otpada, koji je bogat mnogim nutritivnim sastojcima. Primjer agro-industrijskog otpada su i ljuške oraha i kakaovog zrna, za koje su istraživanja dokazala da su iznimno bogata različitim biološki aktivnim tvarima. Biološki aktivne tvari su fitokemikalije koje imaju iznimnu antioksidativnu aktivnost, sposobnost inhibicije ili indukcije različitih enzima, odnosno inhibicije ili indukcije ekspresije gena, tj. često djeluju kao modulatori različitih metaboličkih procesa. Stoga, u određenim uvjetima mogu utjecati na sveukupno zdravlje i fiziologiju ljudskog organizma (Galanakis, 2017). Polifenoli i metilksantini su biološki aktivne tvari i karakteristične komponente ljuške oraha i kakaovog zrna. To čini sekundarne sirovine proizvodnje oraha i kakaovca, sirovinama sa velikim potencijalom za buduću implementaciju u produkciji različitih funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Na taj bi se način reducirala količina otpada, sačuvao okoliš, te povećao održivi razvoj prehrambene proizvodnje.

Iako kemijski sastav ekstrakata ljuške oraha i kakaovog zrna ukazuje na potencijalne blagotvorne učinke u ljudskom organizmu, prije upotrebe u svrhu, npr. oplemenjivanja hrane potrebno je utvrditi kakav je njihov učinak na stanične makromolekule i stanice u cjelini te kakav učinak spojevi prisutni u ekstraktima imaju na bakterije u ljudskom organizmu. Također, bitan parametar je i učinak smjese spojeva prisutnih u ekstraktima kakaa i oraha na promjenu adhezije humane mikroflore za receptore stanica.

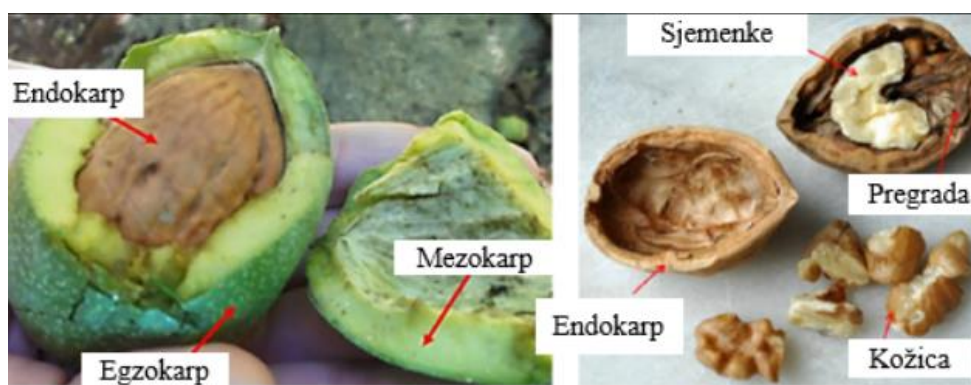
Radna hipoteza ovog rada je da ekstrakti ljuške oraha i kakaovog zrna smanjuju preživljenje ispitivanih patogenih bakterija, njihovo vezanje za humane stanice i formiranje biofilma, te da pokazuju antioksidacijsko djelovanje kada su u kontaktu sa stanicama gastrointestinalnog trakta.

Cilj rada je utvrditi da li i pod kojim uvjetima ekstrakt ljuške oraha i kakaovog zrna ima citotoksičan učinak na epitelne stanice gastrointestinalnog trakta – tumorske epitelne stanice jetre (HepG2), želudca (AGS) i debelog crijeva (Caco-2) te utjecaj na indukciju slobodnih radikala i potencijalno oksidacijsko djelovanje, na ovim stanicama. Istražit će se i utjecaj ekstrakata na predstavnike normalne mikrobiote čovjeka (*E. coli*, *L. fermentum*, *S. aureus*), promjenu adhezije bakterija na stanice Caco-2 i Cal-27 i stvaranje biofilma bakterija.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 ORAH

Stablo oraha pripada obitelji *Juglandaceae*. Najrasprostranjenije je stablo koje nosi orašaste plodove i uzgaja se u različitim dijelovima svijeta. Porijeklom je iz središnje Azije, a u Europi se počeo uzgajati već od 1000 godina prije Krista. Nakon toga, uzgoj stabla oraha jako se proširio, što mu je omogućila njegova dobra prilagodba u regijama s ekosustavima mediteranskog tipa. Nutritivna važnost oraha vezana je za njegov istoimeni plod. Plod oraha (slika 1) sastoji se od zelene, mesnate i glatke ljuske koja je nejestiva, a uklanjanjem te ljuske ostaje smeđa ljuska u kojoj se nalazi jezgra (sjemenka) obavijena tankom kožicom (Jahanban-Esfahlan i Amarowicz, 2018).



Slika 1. Dijelovi ploda oraha (prema Queiros i sur., 2019)

Godišnja proizvodnja oraha na svjetskoj razini premašuje 3,7 milijuna tona. Najveći proizvođač oraha je Kina, a ostali veliki proizvođači su Iran, SAD i Turska. Jezgre oraha koriste se kao hrana. Nutritivno su vrlo bogate višestruko nezasićenim masnim kiselinama (52-70 %), proteinima (12-24 %, koji su bogati esencijalnim masnim kiselinama), mineralima (1,5-3 %), flavonoidima i fenolnim kiselinama. Ostale biljne komponente, npr. lišće, kora, stabljika, drvenaste opne, cvjetovi, koriste se u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Queiros i sur., 2019).

2.1.1 Ljuska oraha

Budući da je lignocelulozne prirode, dominantne komponente u sastavu ljuske oraha su

lignin udjela 52,3 %, celuloza udjela 25,5 % i hemiceluloza udjela 22,2 % (Dermibas, 2005). Središnji je dio plod oraha, a morfološki predstavlja endokarp, koji čini i do 67% ukupne mase oraha. Procjenjuje se da preradom oraha, na godišnjoj razini, zaostaje oko 1,5 milijuna tona otpada u obliku smeđe čvrste ljuške. Većina toga otpada se odbacuje kao otpadni materijal ili se koristi kao gorivo za izgaranje, što rezultira onečišćavanjem okoliša. Radi tih ograničenja, intenzivno se istražuje alternativna primjena otpadnih ljušaka oraha. Predložene su različite metode za hidrolizu celuloza i hemiceluloza iz ljuške, za proizvodnju ugljikohidrata, koji su dobri izvori za proizvodnju bioetanol, za proizvodnju drvnog i aktivnog ugljena pirolizom, jer pri tome većinom nastaje plin vodik, i pirolinska kiselina. Sve se veća pozornost pridaje nastanku pirolinske kiseline, zato što najveći dio njezinih sastojaka čine fenoli te organske kiseline sa antioksidansima i antimikrobnim djelovanjem (Jahanban-Esfahlan i Amarowicz, 2018) (tablica 1).

Tablica 1. Sastav proizvoda pirolize ljuški oraha (prema Queiros i sur., 2019)

SASTOJAK	UDJEL SASTOJKA (%)
Ukupni ugljikohidrati	46,5
Ukupni lignin	21,3
2-oksopropanal	3
Hidroksiacetaldehid	4,5
Acetilna kiselina	7,4
3-hidroksipropanal	3,5
Furfural	1,4
4-hidroksi-5,6-dihidropiran-2-on	4,2
4-vinilguaikol	1,4
Siringol	1,2
2-hidroksimetil-5-hidroksi-2,3-dihidropiran-4-on	1,9
1,5-anhidro-arabinofunanoza	1,6
4-metilsiringol	1,3
4-vinilsiringol	1,9
1,6-anhidro- β , D-glukopiranoza	12,3
<i>Trans</i> -4-propenilsringol	1,5
Siringaldehid	1,3
<i>Trans</i> -sinapaldehid	1,6

2.2 KAKAOVAC

Prve plantaže kakaovca, oko 400 godina prije Krista, bile su u Meksiku i Gvatemali. Danas se, radi proizvodnje plodova, kakaovac sadi u mnogim tropskim afričkim i azijskim zemljama

(Sampeck, 2020). Plod kakaovca naziva se kakaovo zrno. Kakaova zrna ovalnog su oblika, a nalaze se unutar mahune (ploda) i obavijena su ljepljivom pulpom. Sastoje se od vanjske ljuske koja obavija dva kotiledona i malu klicu (slika 2).



Slika 2. Dijelovi ploda kakaovca i kakao zrna (prema Rojo-Poveda i sur., 2020)

Glavne zemlje proizvođači kakao zrna su: Obala Bjelokosti, Gana, Indonezija, Nigerija, Ekvador, Kamerun i Brazil, doprinoseći gotovo 90 % ukupne svjetske proizvodnje. Kakao zrno opće je poznato kao glavna sirovina za proizvodnju čokolade (Okiyama i sur., 2017). Kakao zrna u sebi sadrže veliku količinu masti (kakao maslaca u endospermu do 61%), taninskih tvari (oko 6%) i alkaloida (teobromin i kafein - do 2%). Također, bogata su i sljedećim ugljikohidratima: škrob, celuloza, pentozan, pektin, glukoza i fruktoza. Udio vode u kakao zrnu je u rasponu 5-7,5% (Goldoni, 1998).

2.2.1 Ljuska kakaovog zrna

Proizvodnja kaka stvara znatne količine otpada. Naime, samo se 10 % ukupne težine zrna kaka koristi za njegovu komercijalizaciju, dok se preostalih 90 % odbacuje kao otpad, odnosno kao nusproizvodi. Jedan od tih nusproizvoda je i ljuska kakaova zrna. Uzimajući u obzir udjel ljuske u zrnu i podatke o proizvodnji kakaova zrna, na globalnoj razini, prosječno se proizvede više od 700 000 tona ljuske godišnje, a od toga samo u Europi se proizvede više od 250 000 tona godišnje.

Generalno, zbog bogatog kemijskog sastava (tablica 2), sve se više istražuje potencijal korištenja ljuske kakaova zrna, posebno u prehrambenoj industriji (Rojo-Poveda i sur., 2020).

Tablica 2. Kemijski sastav ljuske kakaova zrna (*prema* Rojo-Poveda i sur., 2020)

SASTOJAK	KOLIČINA (g/100 g)	REFERENCA
Pepeo	5,96-11,42	Rojo-Poveda i sur., 2020
Proteini	10,30-27,40	
Masti	1,5-8,49	
Ugljikohidrati	7,85-70,25	
Vlakna	39,25-66,33	
Pektin	7,62-15,59	Vriesmann i sur., 2011
Minerali:		
Kalcij	0,23-0,44	Chung i sur., 2003
Magnezij	0,48-1,29	
Kalij	1,25-1,82	
Natrij	0,016-0,192	
Željezo	0,027-0,0805	
Bakar	0,0024-0,0066	
Selen	0,0002	
Kobalt	0,0001	
Cink	0,003-0,019	
Krom	0,0007-0,0049	
Mangan	0,0045	
Fosfor	0,58-1	
Bioaktivni spojevi:		
polifenoli	3,12-94,95*	Nsor-Atindana i sur., 2012
teobromin	0,39-1,83	Barbosa-Pereira i sur., 2018
kafein	0,04-0,42	

*izraženo kao ekvivalent galne kiseline

Naime, relativno visoke vrijednosti dijetalnih vlakana i fenolnih spojeva, impliciraju korištenja ovog nusproizvoda u proizvodnji konditorskih i pekarskih proizvoda te pripremi niskokaloričnih dijetetskih proizvoda. Najčešća je upotreba za proizvodnju hrane za životinje, no ne za sve, radi teobromina, koji bi mogao imati negativan učinak na neke od vrsta (Panak Balentić i sur., 2018). Također, ljuske kakaovca mogu se koristiti za proizvodnju bioplina, etanola, biofilamenata korištenih u 3D printanju mnogo predmeta koji se koriste u kućanstvu i biomedicini te kao adsorbens (Tran i sur., 2017).

2.3 BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI LJUSKE PLODA ORAHA I KAKAOVCA

Biološki aktivne tvari su fitokemikalije koje imaju iznimnu antioksidativnu aktivnost, sposobnost inhibicije ili indukcije različitih enzima, odnosno inhibicije ili indukcije ekspresije gena, tj. modulatori su metaboličkih procesa. Uključuju heterogenu klasu spojeva različitih

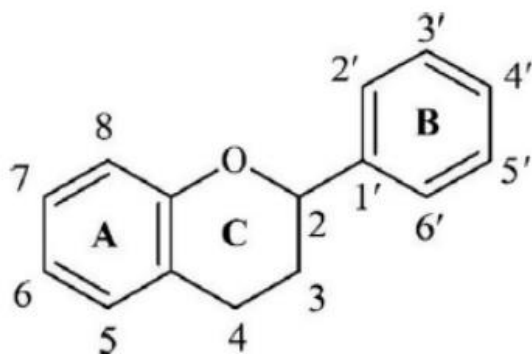
kemijskih struktura, koje su usko povezane sa mjestom djelovanja i učinkovitosti u sprečavanju oksidativnog stresa, gašenju slobodnih radikala te prevenciji nastanka različitih bolesti. Analogno tome, biološki aktivni spojevi pokazuju blagotvorne učinke na zdravlje i fiziologiju ljudskog organizma (Galanakis, 2017). Radi velike raznolikosti u strukturama i djelovanju biološki aktivnih tvari, postoji više načina klasifikacije. Jedna od najčešćih je, podjela na 6 podskupina: polifenole, karotenoide, tokoferole, fitosterole i organosumporne spojeve (Shirahigue i Ceccato-Antonini, 2020).

Ljuska oraha i kakaova zrna izrazito su bogate biološki aktivnim tvarima, pri čemu se ističu polifenolni spojevi i metilksantini.

2.3.1 Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi sekundarni su biljni metaboliti, koji biljkama daju mehaničku potporu, štite ju od UV-zračenja te, svojom bojom i mirisom, mogu privlačiti oprašivače ili odbijati biljojede. Strukturna karakteristika im je barem jedan aromatski prsten supstituiran hidroksilnom skupinom, no izuzev toga, vrlo su raznolika skupina bioaktivnih tvari. Polifenolni spojevi dijele se u dvije skupine: flavonoide i neflavonoide (Etienne-Selloum i sur. 2013).

Flavonoidi su najistraživanija skupina polifenola, a otkriveno ih je više od 4000. Opća strukturna formula im je C₆-C₃-C₆; A i B su aromatski prstenovi, a C povezan je s tri ugljikova atoma u oblik heterocikličkog prstena (slika 3). Većina flavonoida odgovorna je za boju voća, cvjetova i listova (Tsao, 2010).



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (prema Luna-Guevara i sur., 2018)

Gubitkom vode i zatvaranjem C prstena, nastaje flavan, a iz njega osnovni broj struktura

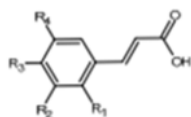
flavonoida: flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, izoflavoni i antocijanidini. Ti spojevi mogu biti metoksilirani, hidroksilirani, acilirani i glikozilirani. Također flavonoidi su skloni umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini) (Kazazić, 2004.).

U drugu veliku skupinu polifenolnih spojeva, neflavonoida, pripadaju: fenolne kiseline, tanini, stilbeni i lignani (Shirahigue i Ceccato-Antonini, 2020). Fenolne kiseline dijele se na hidroksicimne i hidroksibenzojeve kiseline.

Udio hidroksibenzojeve kiseline u jestivim biljkama je relativno nizak. Izuzetak je određeno crveno voće, crvene rotkvice i luk.

Hidroksicinaminske kiseline (slika 4) su mnogo češće zastupljene, a sastoje se uglavnom od *p*-kumarinske, ferulinske, sinapinske i kofeinske kiseline (Manach i sur., 2004). Neflavonoidi jednostavnije su građe od flavonoida - za razliku od flavonoida, u svojoj strukturi, imaju samo jedan aromatski prsten (Ribéreau-Gayonet al., 2006).

HIDROKSICINAMINSKA KISELINA



Kafeinska kiselina $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$

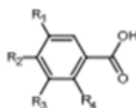
Ferulinska kiselina $R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$

p-kumarinska kiselina $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$

o-kumarinska kiselina $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$

Sinapinska kiselina $R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$

HIDROKSIBENZOJEVA KISELINA



2,3-dihidroksibenzojeva kiselina $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$

2-hidroksibenzojeva kiselina $R_1=R_2=R_3=H, R_4=OH$

4-hidroksibenzojeva kiselina $R_1=R_3=R_4=H, R_2=OH$

Galna kiselina $R_1=R_2=R_3=OH, R_4=H$

Gentizinska kiselina $R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$

Siringinska kiselina $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH, R_4=H$

Vanilinska kiselina $R_1=H, R_2=OH, R_3=OCH_3, R_4=H$

Slika 4. Tipovi hidroksicinaminskih i hidroksibenzojevih kiseline (prema Visioli, 2020)

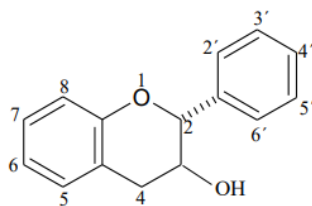
Dokazano je da konzumacija polifenola može igrati vitalnu ulogu u zdravlju, regulaciji metabolizma i tjelesne težine, kroničnih bolesti i poliferaciji stanica. Njihova protuupalna i antioksidativna svojstva mogu imati preventivne i/ili terapijske učinke na kardiovaskulane bolesti, neurodegenerativne bolesti, rak i pretilost (Cory i sur., 2018).

2.3.1.1 Polifenolni spojevi u ljusci oraha

Ljuska oraha bogata je fenolnim kiselinama: galna kiselina, kafeinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, *o*-kumarinska kiselina, vanilinska kiselina, ferulinska kiselina, siringinska kiselina (Sheng i sur., 2021).

Galna kiselina, u biljnom materijalu, nalazi se u obliku slobodne kiseline, estera i derivata katehina. Ima antimikrobnu aktivnost protiv patogenog kvasca *Candida albicans*, i patogenih bakterija kao što su: *Staphylococcus aureus*, *Erwinia carotovora* i *Corynebacterium accolans* (Karamać i sur., 2006). Također, antimikrobno djelovanje pokazuje i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, stoga se njeni esteri, tzv. parabeni, koriste kao aditivi u prehrambenoj industriji (Anton i sur, 2004). Specifičnost kafeinske kiseline je da inhibira oštećenja DNA molekule te indukciju mutagenih i kancerogenih N-nitrozo spojeva (Olthof i sur., 2001). Ferulinska kiselina u SAD-u i većini zemalja Europe dodaje se u hranu, kao smjesa antioksidansa odobrena od strane FDA, a u Japanu je dozvoljeno njeno korištenje kao prehrambeni aditiv (Ou i Kwok, 2004). Općenito, fenolne kiseline polifenolni su sastojci hrane, sa iznimnom antioksidativnom aktivnošću te služe kao prirodni konzervansi. 30% ukupnih polifenola unesenih hranom, otpada na fenolne kiseline, a one imaju važnu ulogu za ljudsko zdravlje (Razzaghi-Asl i sur., 2013).

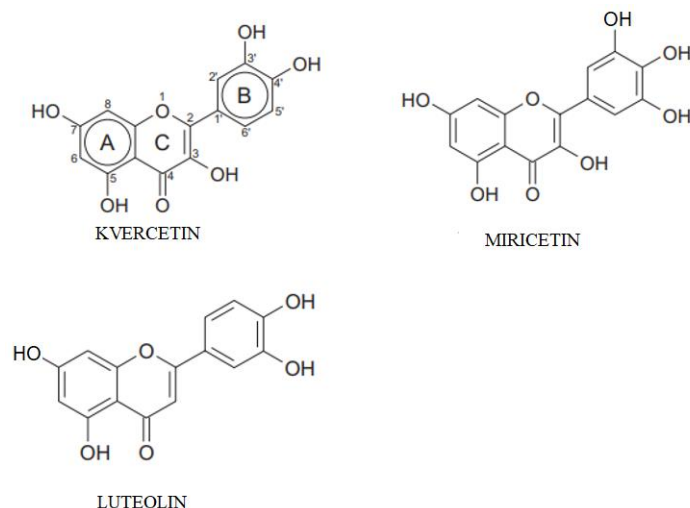
Također, bogata je i flavonoidima: miricitrinom, luteolinom, kvercetinom, eriodiktiolom i njegovim glikozidnim derivatima, katehinom i epikatehinom. Katehin i epikatehin (slika 5) glavni su predstavnici flavanola, miricetin i kvercetin flavonola (slika 6), eriodiktiol (slika 7) i njegovi glikozidni derivati su flavanoni te luteolin (slika 6), koji je flavon (Sheng i sur., 2021).



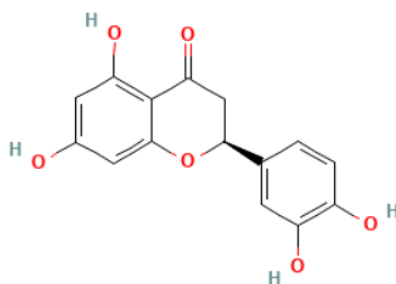
<i>Flavan-3-oli</i>	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-katehin	βOH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-epikatehin	αOH	OH	OH	OH	OH	-

Slika 5. Kemijska struktura katehina i epikatehina (Grbavac, 2017)

Katehini i epikatehini su fitotoksične tvari, koje se sintetiziraju u korijenju nekih biljaka, kako bi onemogućile naseljavanje drugih biljaka na tom teritoriju (Kazazić, 2004).



Slika 6. Kemijske strukture kvercetina, miricetina i luteolina (*prema* Durgo i sur., 2007)



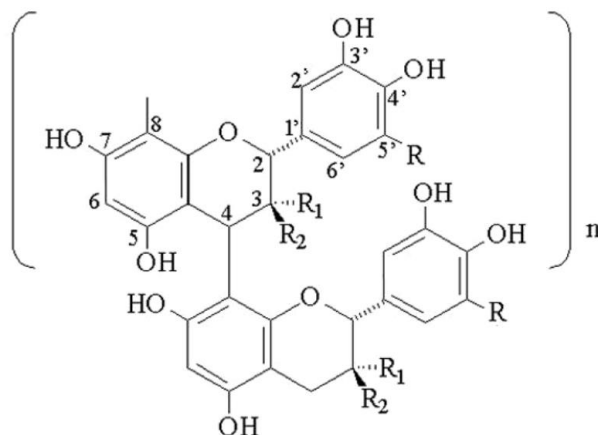
Slika 7. Kemijska struktura eriodiktiola (NCBI, 2022)

Generalno, sve flavonoide odlikuje izrazita antioksidacijska i antiradikalska aktivnost. Jačina tih njihovih aktivnosti ovisi o kemijskoj strukturi, odnosno važnu ulogu ima raspored dviju hidroksilnih skupina na prstenu B. Kvercetin, s o-dihidroksilnim rasporedom, ima najveću TEAC-vrijednost, tj. antioksidacijsku aktivnost. Također, moguće je i sinergijsko djelovanje antioksidacijskih djelovanja flavonoida. Dokazana su i antibakterijska, sedativna, antialergijska, antimutagena i antiviralna svojstva flavonoida (Kazazić, 2004).

2.3.1.2 Polifenolni spojevi u ljusci kakaova zrna

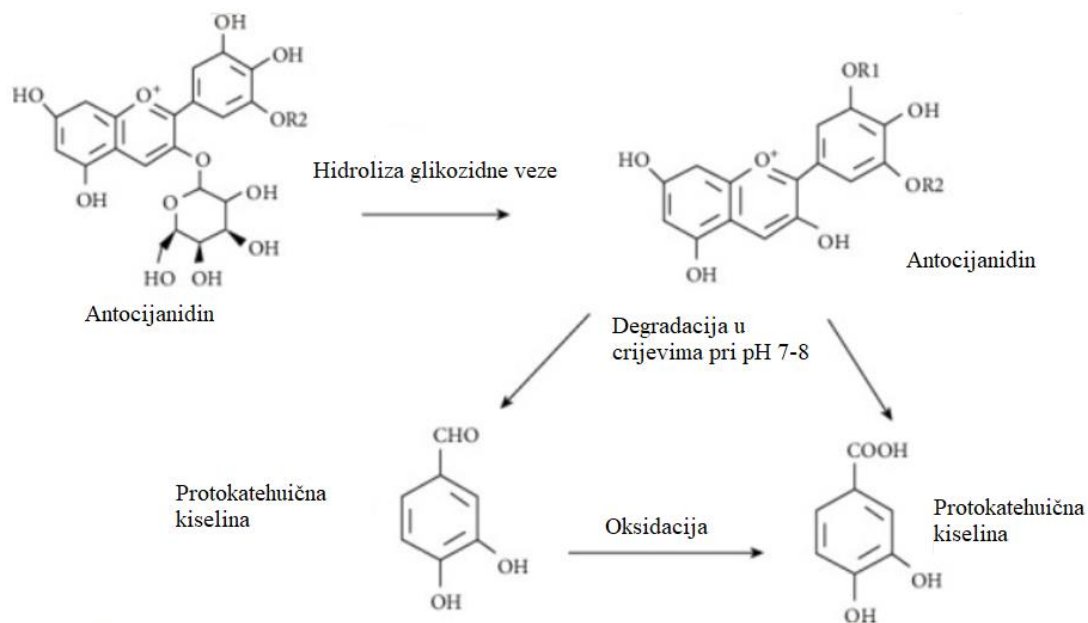
Glavni polifenolni spojevi koji se nalaze u ljusci kakaova zrna su flavanoli, koji uključuju katehine, epikatehine i procijanidine (Okiyama, 2017). Procijanidini ili kondenzirani tanini su oligomerni spojevi koji se sastoje od katehina i epikatehina. Ovi spojevi su sveprisutni u prirodi,

a dijele se na tip A i B, pri čemu se ova podjela odnosi na temelju različite povezanosti monomernih jedinica. Tip B specifičan je za kakaovo zrno, najčešće u obliku dimera i trimera (slika 8) (Hurst i sur., 2009).



Slika 8. Kemijska struktura proantocijanidina ($R=H$ – procijanidin: $R_1=H$ i $R_2=OH$ – katehin i $R_1=OH$ i $R_2=H$ - epikatehin) (Hurst i sur., 2009)

Nadalje, ljuska kakaova zrna sadrži i fenolne kiseline. Fenolne kiseline identificirane su kao protokatehnična kiselina. Protokatehnična kiselina je derivat hidroksibenzojeve kiseline (Barbosa-Pereira i sur., 2021). Protokatehnična kiselina i protokatehnični aldehid primarni su metaboliti kompleksnih antioksidativnih polifenola, antocijana i proantocijanidina (slika 9) (Zhang i sur., 2021).

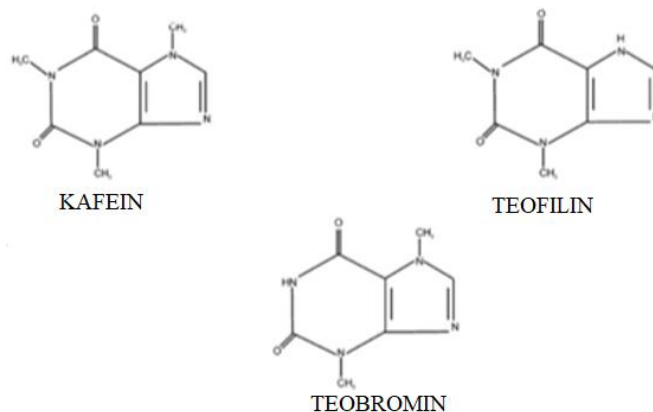


Slika 9. Kemijska struktura protokatehuične kiseline (prema Zhang i sur., 2021)

Živčane stanice u mozgu su metabolički aktivne i osjetljive na ozljede uzrokovane prekomjernim stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) ili oštećenjem antioksidativnog obrambenog sustava, što rezultira neurodegenerativim bolestima i poremećajima mozga. Antioksidativna, protuupalna svojstva te usporavanje starenja proučavana su u djelovanju protokatehuične kiseline na Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest (Zhang i sur., 2021).

2.3.2 Metilksantini

Metilksantini su skupina fitokemikalija dobivenih iz purinske baze ksantina. Nastaju sekundarnim metabolizmom biljaka. Uključeni su u svakodnevnu prehranu, jer se nalaze u kavi, čaju, energetskim pićima i čokoladi. Glavni predstavnici metilksantina su kafein, teofilin i teobromin (slika 10) (Monteiro, 2016).



Slika 10. Kemijske strukture kafeina, teofilina i teobromina (prema Jalil i Ismail, 2008)

Osim polifenolima, ljuska kaka je bogata kafeinom, teofilinom i teobrominom, s time da je teobromin najzastupljeniji. Istraživanja su pokazala da je teobromin odgovoran za aktivaciju hormonski osjetljivih lipaza, koje hidroliziraju triacilglicerole te se oslobađaju slobodne masne kiseline i glicerole iz masnog tkiva u plazmu. Stoga, teobromin može služiti u redukciji tjelesne težine. Primijećeni su i inhibirajući učinci teobromina na rast tumorskih stanica. On inhibira angiogenezu induciranu stanicama raka jajnika, inhibicijom proizvodnje vaskularnog endotelnog faktora rasta. Navedeni metilksantini imaju antioksidacijska svojstva (Jalil i Ismail, 2008).

2.4 SLOBODNI RADIKALI (ROS) I OKSIDATIVNI STRES

Slobodni radikali su bilo koje čestice koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Nespareni elektron(i) daju specifična kemijska svojstva ovim molekulama, npr. sposobnost oduzimanja elektrona drugim molekulama radi postizanja stabilnosti, jer su vrlo reaktivni i kratkog vijeka. Reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*, ROS) su male molekule nastale djelomičnom redukcijom molekularnog kisika (O_2), koji sudjeluje u ključnim biološkim procesima – staničnom disanju i aerobnom metabolizmu (Egea i sur., 2020). Naime, oksidativnom fosforilacijom, na molekulu kisika dodaju se četiri elektrona i četiri protona, tj. ona se reducira na dvije molekule vode. Ako molekula kisika umjesto četiri primi samo jedan elektron, nastaje superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$). Superoksidni anion visoko je reaktivna kisikova čestica koja teži primitku još tri elektrona i četiri protona, da nastane molekula vode. Međutim, u ovom procesu, nastaju reaktivne čestice poput: vodikovog peroksida (H_2O_2), peroksnitrita i

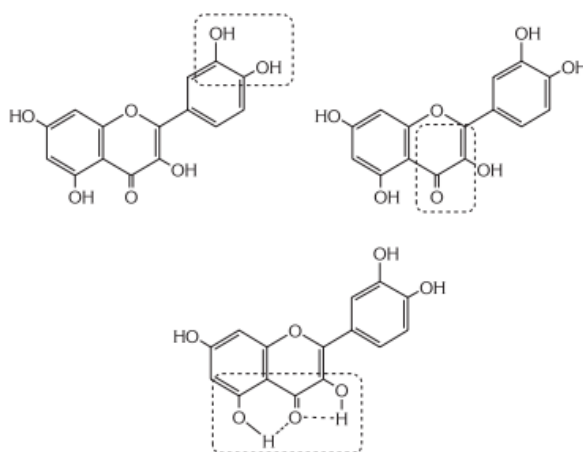
hidroksil radikala (OH^*). Navedene čestice uzrokuju oštećenja DNA molekule, proteina i lipida (Calderón-Montaño, 2011).

Oksidativni stres je oštećenje koje radikali i oksidansi uzrokuju na površinskim membranama i receptorima. U svakom organizmu postoji ravnoteža između oksidativnog stresa i antioksidativnog oporavka. Ukoliko izostane antioksidacijska zaštita protiv nastajućih slobodnih radikala, dolazi do oksidativnog stresa. Rezultat toga je razvoj procesa brojnih bolesti: astma, tumori, kardiovaskularne i gastrointestinalne bolesti, dijabetes, periodontalne bolesti i drugih upalnih procesa (Kazazić, 2004).

Razinu slobodnih radikala reguliraju endogeni enzimski (superoksid dimutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, peroksiredoksini...) i neenzimski (tripeptid glutation, vitamin C, vitamin E) antioksidacijski obrambeni sustavi kako bi se spriječilo njihovo nakupljanje i održala redoks homeostaza stanica (Bayir, 2005).

Nadalje, polifenoli poput flavonoida, isto imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost. Najvažniji način antioksidacijskog djelovanja je da djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala. To je moguće jer posjeduju strukturne skupine koje mogu „hvatati“ slobodne radikale:

- o-dihidroksilnu strukturu u B-prstenu koja daje stabilnost radikalima i omogućava delokalizaciju elektrona
- hidroksilne skupine na 3- i 5- položaju, koje omogućavaju vezu s keto-skupinom
- 2,3-dvostruku vezu u konjugaciji s 4-keto-skupinom, pa se elektroni B-prstena mogu delokalizirati (slika 11) (Kazazić, 2004).



Slika 11. Strukturne skupine flavonoida koje služe za hvatanje slobodnih radikala (Kazazić, 2004)

Na primjer, flavonoid miricitrin, u koncentracijama između 2,5 – 10 ug mL⁻¹, inhibira citotoksičnost akrilamida, a akrilamid utječe na indukciju reaktivnih kisikovih čestica u Caco-2 stanicama (Chen i sur., 2013).

Metilksantini, također, posjeduju antioksidacijska svojstva. Istraživanja su pokazala da kafein može suzbiti oštećenja kože uzrokovana UV-zračenjem i mehanički olakšati uklanjanje ili inhibiciju ROS-a, te tako zaštititi stanice kože od oksidativnog stresa izazvanog UV-zračenjem (Rodak, 2021).

2.5 MODELI ZA TOKSIKOLOŠKA ISTRAŽIVANJA

Toksikologija je znanost koja se bavi proučavanjem štetnih učinaka fizičkih ili kemijskih agenasa na žive organizme i ekosustav, uključujući prevenciju i ublažavanje istih (Grandjean, 2015). Toksikološka istraživanja mogu se provesti na tri načina:

1. *in vitro* istraživanja temelje se na izlaganju stanica, jednostaničnih organizama i substaničnih frakcija agensima
2. *in vivo* istraživanja podrazumijevaju apliciranje ksenobiotika na biljke ili životinje u kontroliranim uvjetima
3. istraživanja koja se provode na grupi ljudi (uz pisani pristanak pojedinaca), koji se izlažu nekoj kemikaliji (Timbrell, 2002).

In vitro testovi razvijeni su kako bi se smanjila upotreba životinjskih modela u medicinskim istraživanjima i precizirale metode u cilju poboljšanja kvalitete prikupljenih podataka. *In vitro* testovima na bakterijama, kvascima i stanicama sisavaca, određuje se genotoksičnost i detektira toksičnost koja može dovesti do razvoja tumora. Stanični modeli su najkorisniji za otkrivanje toksikoloških spojeva i za komparaciju različitih spojeva unutar skupina analoga. Ako rezultati na staničnim linijama pokazuju naznaku kancerogenosti, to može biti dovoljan razlog za zaustavljanje daljnjeg istraživanja određene kemikalije. Naravno, postoje i ograničenja *in vitro* testova, npr. korelacija u kancerogenosti u životinja i u *in vitro* testovima nije 100%, stoga se moraju provesti i testovi *in vivo*.

In vivo testovi, tj. testovi na životinjskim modelima, služe za određivanje NOAEL vrijednosti (engl. *No Observed Adverse Effect Level*), procjenu rizika i evaluaciju sigurnosti lijeka, kemikalije ili prehranbenog aditiva. Vrsta korištene životinje ovisi o vrsti testa koji se želi provesti, dostupnim podacima te financijskim i etičkim razmatranjima. Najčešće su to miševi i štakori. Rezultati *in vivo* testova ovise o vrsti kemikalije i zakonima zemlje u kojoj se

toksikološko istraživanje provodi.

Na koncu, slijede klinička istraživanja na pacijentima u tri faze. Prva faza služi za dobivanje informacija o naravi i metabolizmu lijeka, a druga i treća za dobivanje informacija o nuspojavama i učinkovitosti. Nakon toga, dobiveni rezultati uspoređuju se s kontrolnim grupama (Timbrell, 2002).

2.6 MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi su okom nevidljivi organizmi koje nalazimo posvuda u prirodi. Prema svojoj građi dijele se na bakterije, viruse, gljive i neke alge. Druga klasifikacija mikroorganizama je prema djelovanju, na temelju čega ih možemo podijeliti na patogene, nepatogene i uvjetno patogene. Patogeni izazivaju različite bolesti, uvjetno patogeni na nekim mjestima ljudskog organizma ne izazivaju smetnje, dok na drugima izazivaju bolesti te nepatogeni mikroorganizmi koji su bezopasni, i ponekad čak korisni u očuvanju zdravlja (Tajz, 2015). Mikroorganizmi žive i nastanjuju različite dijelove ljudskog organima te se te mikrobne zajednice nazivaju mikrobiotom. Mikrobiotu, koja je specifična po vrsti i udjelu različitih vrsta mikroorganizama, nalazimo na površini kože, usne šupljine, probavnog te spolnog sustava te njen sastav i stabilnost često utječe na opće zdravstveno stanje ljudi i životinja.

Bakterije su jednostanični organizmi koji se mogu klasificirati s obzirom na oblik, mogućnost kretanja i stvaranja spora. Po obliku razlikujemo okrugle, spiralne i štapičaste. S obzirom na način kretanja, mogu biti nepokretne ili pokretne zahvaljujući bičevima i trepetljikama. Neke bakterije u određenim uvjetima prelaze u metabolički inaktivni oblik, tzv. sporu. Također, različito podnose i uvjete okruženja u kojem se nalaze, npr. temperaturu (termofili, mezofili, psihrofilni, psihrotrofi), količinu kisika (aerobni, anaerobni, fakultativno anaerobni i fakultativno anaerobni) te dostupnost hranjivih tvari (HAH, 2018).

2.6.1 *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* je Gram-negativna bakterija štapičastog oblika. Klasificirana je kao član obitelji Enterobacteriaceae, unutar klase Gamaproteobacteria. U optimalnim uvjetima, generacijsko vrijeme iznosi 20 min. Bakterija *E. coli* je vrlo dobro proučena bakterija, te se koristi za proizvodnju različitih enzima i drugih industrijskih proizvoda (Jang i sur., 2017).

2.6.2 *Lactobacillus fermentum*

Bakterija *Lactobacillus fermentum* je Gram-pozitivna bakterija, koja pripada rodu *Lactobacillus*. Bakterije ovog roda, grupno se nazivaju bakterije mliječne kiseline. Bakterije mliječne kiseline najčešće su korišteni probiotici, koji imaju važnu ulogu u zaštiti domaćina od patogena, jačanju imunološkog sustava domaćina, poboljšanju probavljivosti hrane i smanjenju metaboličkih poremećaja. *L. fermentum* poboljšava imunološki odgovor domaćina te sprečava gastroenterostinalne infekcije i infekcije gornjih dišnih puteva. Nadalje, sojevi *L. fermentum* bakterije, mogu se primijeniti kao konzervansi hrane i kao alternativa antibioticima (Naghmouchi i sur., 2020).

Dokazano je da *L. fermentum* oslobađa površinski aktivne proteine, koje inhibiraju adheziju uropatogenih bakterija, npr. *Enterococcus faecalis* (Heinemann i sur., 2000). Također, istraživanja su pokazala da je soj bakterije *L. fermentum*, može preživjeti u različitim uvjetima, kao što su niske pH vrijednosti i izloženost žučnim solima u gastroenterostinalnom traktu, te je pokazao hidrofobnost. Razina adhezije soja *L. fermentum* na Caco-2 stanice adenokarcinoma debelog crijeva čovjeka iznosila je 8,5 %. Sve su ovo pokazatelji da je *L. fermentum* probiotička kultura, koja je dobar kandidat, za kontrolu gastrointestinalnih bolesti (Falah i sur., 2019).

2.6.3 *Staphylococcus aureus*

Bakterija *Staphylococcus aureus* je Gram-pozitivna bakterija, koja spada u otporne nesporogene bakterije, radi njene sposobnosti preživljavanja na visokim temperaturama, u sušenim uvjetima, pri ekstremnim pH vrijednostima, salinitetu, u prisustvu antibiotika i tretmana dezinfekcije. Nalazi se u nosnicama i na koži čovjeka (Topić i sur., 2021). Stafilocoki mogu uzrokovati mnogo različitih bolesti u ljudi i životinja. Patogeni stafilocoki često izazivaju hemolizu krvi, koagulaciju plazmi i proizvode mnogo ekstracelularnih enzima i toksina. Bolesti nastaju kao posljedica prodora bakterije u tkiva te proizvodnje toksina. Ti su toksini čest uzrok trovanja hranom. *S. aureus* je najpatogenija vrsta bakterija ovoga roda, a razlikuje se od ostalih vrsta po tome što proizvodi koagulazu (Brooks i sur., 2007). Koagulaza je ekstracelularni protein koji se veže za protrombin. Tako postaje enzimski aktivna te katalizira pretvorbu fibrinogena u fibrin. Zatim, nastali fibrin tvori „presvlaku“ oko stafilocoka, koji time postaje zaštićen od imunološkog sustava obrane domaćina (Ilić, 2009).

Adhezija je prvi korak u kolonizaciji *S. aureus* na sluz ljudskog crijeva. Istraživanja su

pokazala da su određene bakterije mliječne kiseline (*L. rhamanosus GG*, *L. lactis subsp. lactis...*), mogu utjecati na adheziju *S. aureus*, smanjujući vezanje ove bakterije za epitel za 39-44 % uslijed proizvodnje antimikrobnih tvari (Vusterlund i sur., 2006).

2.7 ADHEZIJA BAKTERIJA NA HUMANE STANICE

Kako bi nastanile ljudsko tijelo, bakterije su razvile različite načine vezanja. Njihovu adheziju na humane stanice omogućavaju pili i razni adhezini (Pizarro-Creda i Cossart, 2006). Većina bakterijskih patogena, na svojoj površini, ima duge filamentozne strukture poznate kao pili ili fimbrije. Ove strukture su često uključene u početnu adheziju bakterija na humane stanice tijekom kolonizacije. Pili u Gram-pozitivnim bakterijama nastaju kovalentnom polimerizacijom adhezivnih jedinica pilina (Telford i sur., 2006), dok pili u Gram-negativnim bakterijama obično nastaju nekovalentnom homopolimerizacijom proteina pilina. Dodatni pilini se mogu dodati vlaknima te često djeluju kao adhezivne stanice domaćina (Proft i Baker, 2009).

Osim pila i fimbrija, postoje i nepolimerne molekule adhezini, koji prepoznaju različite elemente na površini stanice domaćina, npr. komponente izvanstaničnog matriksa: kolagen, laminine, elastin, proteoglikan, hijaluron i glikoproteine (fibrinogen i fibronektin). Na membrani domaćina nalaze se receptori adhezije: integrini, kadherini, selektini i CEACAM receptori (engl. *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*). Adhezini bakterije *S. aureus* se vežu na fibronektin integrinskog receptora, okidajući unutarstanične signale (Pizarro-Creda i Cossart, 2006). Isto tako, neke bakterije, npr. *E. coli*, unosi vlastiti proteinski receptor u stanicu domaćina, koji se onda vezuje sa adhezinima na površini patogena (Wilson i sur., 2002). Adhezija bakterija na stanice može biti i rezultat elektrostatskih i hidrofobnih sila (Türi i sur., 1997). Biljni ekstrakti bogati polifenolima mogu utjecati na adheziju bakterija. Naime, dokazano je da se procijanidin veže na pile patogena, i tako inhibira njihovo vezanje na epitelne stanice mjehura (Suriyaprom i sur., 2022).

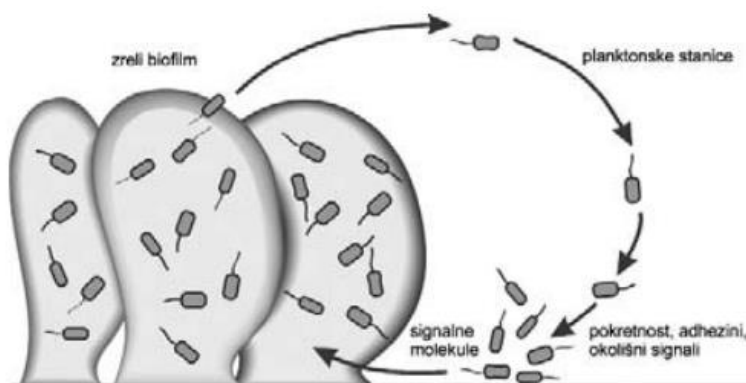
2.8 BIOFILM

Biofilm je zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, te uklopljene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera kojeg su same stvorile te ispoljavaju izmijenjen fenotip, zbog promijenjene brzine razmnožavanja i transkripcije gena koje ne uočavamo u planktonskih organizama (Vraneš i Leskovar, 2009).

Bakterijama život u obliku biofilma osigurava povoljniji okoliš uz stvaranje sluzavih i tankih slojeva, pomoću kojih lakše preživljavaju u nepovoljnim uvjetima (limitirani nutrijenti, temperaturni ekstremi) (Gašaj, 2020).

Nastanak biofilma odvija se u pet razvojnih stadija (slika 12):

1. Reverzibilno povezivanje mikroorganizama sa supstratom
2. Ireverzibilno povezivanje mikroorganizama sa supstratom, posredovano adhezinima na staničnoj stijenci bakterija
3. Stvaranje izvanstaničnog matriksa te povećanje i višeslojnost mikrokolonija
4. Disperzija (Vraneš i Leskovar, 2009).



Slika 12. Stvaranje biofilma (Vraneš i Leskovar, 2009)

Ključne karakteristike biofilm-infekcija su: perzistencija infekcije, rezistencija na antimikrobne lijekove i obranu imunološkog sustava domaćina (Vraneš i Leskovar, 2009).

Bakterije *S. aureus* i *E. coli* imaju svojstvo stvaranja biofilmova na različitim površinama (Song i sur., 2019).

Ekstrakti bogati bioaktivnim tvarima, poput polifenola, djeluju bakteriostatski za biofilm bakterija *E. coli* i *S. aureus*. Preciznije, stvaranje vodikova peroksida u njihovom prooksidativnom djelovanju, posreduje u inhibiciji rasta ovih bakterija, kao rezultat oksidativnog stresa (Taleb i sur., 2016).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Biljni materijal

Liofilizirani ekstrakti ljuške oraha i kakaovog zrna, sa i bez polisaharida, priređeni su u Laboratoriju za tehnologiju ugljikohidrata i konditorskih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ljuske oraha i kakovog zrna sakupljene su nakon izdvajanja jezgre. Prikupljeni uzorci sušeni su na zraku kroz 3 dana, nakon čega je uslijedilo usitnjavanje, a potom prosijavanje. Za ekstrakciju kao otapalo je korištena destilirana voda. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji na temperaturi od 100 °C kroz 20 min. Nakon ekstrakcije slijedi centrifugiranje na 9500 rpm kroz 15 min te filtracija. Iz pripremljenih ekstrakata precipitirani su polisaharidi dodatkom 4 x većeg volumena etanola (96 %) u ekstrakt. Ekstrakti s polisaharidima i bez polisaharida koncentrirani su pod vakuumom, nakon čega se podvrgavaju liofilizaciji (-47 °C, 24 h) kako bi se dobili ekstrakti u praškastom obliku.

Za provođenje eksperimenta, dobiveni liofilizati korišteni su za pripremu ishodišnih otopina ekstrakata koje su sadržavale 10 mg mL⁻¹ polifenola te su kasnije iz njih pripremljene radne otopine u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹ polifenola. Odabrani raspon koncentracija temelji se na preporučenom dnevnom unosu polifenola.

3.1.2 Priprema i uzgoj humanih stanica

U radu su korištene kontinuirane humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2, adenokarcinoma epitela želuca AGS, adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 i pločastog epitela karcinoma jezika Cal27. Ove stanične linije uzgajane su u monosloju u T-bocama u kompletiranom hranjivom mediju RPMI (engl. *Roswell Park Memorial Institute*, RPMI) s 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS). Kultivacija stanica odvijala se u inkubatoru pri temperaturi 37 °C i kontroliranom atmosferom CO₂ (5 %). Prije eksperimenta, stanice su nakon uzgoja prevedene u suspenziju pomoću 0,25 %-tne otopine tripsina. Uporabom Bürker-Türkove komorice, odredio se broj stanica u suspenziji te je podešena početna koncentracija stanica od 10⁵ stanica mL⁻¹.

3.1.3 Radni mikroorganizmi

Mikroorganizmi korišteni u ovome radu su bakterijski sojevi: *Escherichia coli*, *Lactobacillus fermentum* i *Staphylococcus aureus*, koji su dio Zbirke organizama Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. ovi bakterijski sojevi čuvani su na -80 °C, u MRS i LB tekućoj podlozi, uz dodatak 10 %-tnog glicerola. Neposredno prije eksperimenta, inokulirani su u svježe pripravljenu hranjivu podlogu i inkubirani preko noći pri optimalnoj temperaturi rasta.

3.1.4 Otopine

Tablica 3. Ishodišna otopina Neutral red boje ($\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$)

SASTOJAK	KOLIČINA
Neutral red boja	50 mg
Etanol	10 mL

Tablica 4. Radna otopina Neutral red boje ($\gamma = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$)

SASTOJAK	KOLIČINA
Ishodišna otopina Neutral red boje	0,1 mL
Medij za uzgoj stanica	9,9 mL

Tablica 5. Otopina za odbojavanje

SASTOJAK	KOLIČINA
Etanol	50 %
Voda	49%
Octena kiselina	1 %

Tablica 6. Triton X-100 (w = 0,01%)

SASTOJAK	KOLIČINA
Triton X-100	10 μL
Fosfatni pufer	10 mL

Tablica 7. Ishodišna otopina 2,7-diklorofluoresceindiacetata (DCHF-DA, $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$)

SASTOJAK	KOLIČINA
DCHF-DA	1,5 mg
DMSO	1,5 mL

Tablica 8. Radna otopina 2,7-diklorofluoresceindiacetata (DCHF-DA, $c = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$)

SASTOJAK	KOLIČINA
Ishodišna otopina DCHF-DA, $c = 2 \text{ mmol L}^{-1}$	0,025 mL
Fosfatni pufer	9,75 mL

Tablica 9. Sastav fosfatnog pufera (PBS)

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	8 g
KCl (bezvodni)	0,2 g
$(\text{Na}_2\text{HPO}_4) \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1,15 g
KH_2PO_4	0,2 g
Destilirana voda	1000 mL

3.1.5 Laboratorijski pribor

- Automatska propipeta
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf epruvete
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena
- Falcon epruvete
- Kivete za spektrofotometar
- Laboratorijske staklene čaše različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Marker za pisanje

- Menzure različnih volumena
- Mikrotitarske ploče s 24 i 96 jažica
- Nastavci za pipete
- Odmjerne tikvice različnih volumena
- Pamučna vata za pravljenje čepova
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Pokrovna stakalca
- Propipete
- Staklene epruvete
- Staklene pipete, 1-25 mL
- Stakleni lijevak
- Špatula
- T-boce

3.1.6 Aparature

- Analitička vaga 1712 Mp8 SilverEdition, *Sartorius, Velika Britanija*
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, *Tehtnica-Železniki, Slovenija*
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, *Forma Scientific, SAD*
- Komora za sterilni rad, *Iskra, Slovenija*
- Spektrofotometar, *Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambridge, Engleska*
- Svjetlosni mikroskop, *Carl Zeiss Jena, Njemačka*
- Vibromikser EV-102, *Tehtnica Železniki, Slovenija*
- Vodena kupelj, *Tehtnica Železniki, Slovenija*
- Zamrzivač: Ultralow temperature freezer, *New Brunswick Scientific, SAD*

3.1.7 Kemikalije

- 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), *Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka*
- 2,7-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA), *Sigma-Aldrich, Steinheim,*

Njemačka

- Agar, *Biolife, Italija*
- Amonijev klorid (NH₄Cl), *Alkaloid, Skopje, Makedonija*
- Bakto tripton, *Biolife, Italija*
- Destilirana voda
- Dimetil sulfoksid (DMSO), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Ekstrakt ljuske oraha i kakaovca, sa i bez polisaharida
- Etanol (96% (v/v)), *Lach-ner, s.r.o., Republika Češka*
- Glicerol, *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Ham's F-12 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH, Njemačka*
- Kalcijev klorid (CaCl₂), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), *Riedel-de Haën AG Seelze, Hannover, Njemačka*
- Kalijev klorid (KCl), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Kristal violet, boja, *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Kvašćev ekstrakt, *Biolife, Italija*
- Ledena octena kiselina (80% (v/v)), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Laktoza, *Kemika, Hrvatska*
- Magnezijev sulfat heptahidrat (MgSO₄ x 7H₂O), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- MRS Broth, *Biolife, Italija*
- Natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Natrijev klorid (NaCl), *Carlo Erba Reagents, Francuska*
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Feinchemie K.-H. Kallies KG, Njemačka*
- RPMI 1640 medij za uzgoj stanica, *Capricorn Scientific GmbH, Njemačka*
- Tiamin, *Fluka, Njemačka*
- Tripsin, *Capricorn Scientific, Njemačka*
- Triton X-100, *Acros Organics, SAD*

3.1.8 Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija korištene su kompletne LB i MRS hranjive podloge te selektivne

podloge, M9-minimalna podloga s laktozom za uzgoj bakterija *E. coli* i *S. aureus*, i MRS podloga sa nalidiksinskom kiselinom za uzgoj bakterija *L. fermentum*. Podloge su pripremljene prema uputama proizvođača (tablice 10, 11, 12) te su sterilizirane u autoklavu pri temperaturi 121°C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa u vremenu od 15 minuta. Također, provela se i sterilizacija otopina CaCl_2 , MgSO_4 i fosfatnog pufera (PBS) pri temperaturi 121°C i tlaku 01×10^5 Pa, 15 minuta.

Za pripremu krutih podloga dodano je 15 g L^{-1} agara.

Tablica 10. Sastav kompletne LB hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
Bakto-tripton	10 g
Kvašćev ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	1000 mL

Tablica 11. Sastav kompletne MRS hranjive podloge

SASTOJAK	KOLIČINA
MRS broth	27,6 g
Destilirana voda	1000 mL
Agar (za krute hranjive podloge)	15 g
Nalidiksinska kiselina 100 mg mL^{-1} (dodaje se nakon sterilizacije u ohlađenu otopinu, za selektivne krute hranjive podloge)	300 μL

Tablica 12. Sastav M9-minimalne podloge s laktozom

SASTOJAK	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
Agar	15 g
Destilirana voda	1000 mL
Dodano nakon sterilizacije:	
MgSO ₄ x 7H ₂ O (1M)	2 mL
CaCl ₂	100 μL
20 % laktoza	10 mL
Tiamin (2 mg mL ⁻¹)	1 mL

3.2 METODE RADA

3.2.1 Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na humanim staničnim linijama

Za određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna, sa i bez polisaharida, na humanim staničnim linijama HepG2, AGS i Caco-2 koristila se Neutral red metoda.

Neutral red je kationska boja koja može proći kroz membranu stanica te se akumulira u lizosomima vežući se elektrostatskim hidrofobnim vezama na anionske i/ili fosfatne grupe matriksa. Samo živa stanica provodi taj aktivni transport, stoga se primjenom Neutral red može odrediti aktivnost lizosoma tj. stanice. Metoda se provodi tako da nakon bojanja Neutral red bojom, slijedi ispiranje stanica kiselom otopinom etanola da boja izađe iz lizosoma. Nakon toga spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija pri 540 nm. Količina ekstrahirane boje proporcionalna je broju živih stanica (Repetto i sur, 2008).

Prethodno se uzgojene stanične linije u T-bocama, u inkubatoru, tripsiniziraju. Brojanjem stanica u Bürker-Türkovoj komorici se koncentracija stanica u suspenziji podešava na 10⁵ stanica mL⁻¹. Zatim se te suspenzije stanica nacijepe u mikrotitarske pločice sa 96 jažica te se

ostave u inkubatoru 24 h (da se pričvrste na površinu bunarića), prije tretmana ekstraktima. Ekstrakti ljuske oraha i kakaovca sa i bez polisaharida pripremljeni su otapanjem u mediju, u konačnoj koncentraciji 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹. Nakon uklanjanja medija, stanice su tretirane 1 i 2 sata sa po 100 µL svakog od koncentracije ekstrakata u tri paralele. Na kontrolne stanice dodano je 100 µL hranjivog medija umjesto ekstrakata.

Završetkom tretmana, uklonjen je hranjivi medij sa ekstraktima te je u svaku jažicu dodano 100 µL radne otopine Neutral red boje. Da bi se boja akumulirala u staničnim lizosomima, stanice se inkubiraju na 37 °C, 45 minuta. Nakon toga, ukloni se boja te se dodatno ispere dva puta sa 100 µL PBS pufera. Na koncu, dodano je 100 µL otopine za odbojavanje, a intenzitet obojenja određen je spektrofotometrijski pri 540 nm valne duljine. Preživljenje stanica izračunato je prema formuli [1]:

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{A_{540}(\text{ekstrakt})}{A_{540}(\text{kontrola})} \times 100 \quad [1]$$

A_{540} – vrijednost apsorbancije izmjerene pri valnoj duljini od 540 nm

3.2.2 Određivanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) 2',7'-diklorhidrofluorescindiacetat (DCFH-DA) metodom

Stanice neprestano stvaraju reaktivne vrste kisika (ROS) tijekom aerobnog metabolizma. Stanica je naoružana snažnim antioksidativnim obrambenim sustavom za borbu protiv prekomjerne proizvodnje ROS. Oksidativni stres nastaje u stanicama kada stvaranje ROS-a nadjača prirodnu antioksidativnu obranu stanica. 2'-7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH-DA) jedna je od najčešće korištenih tehnika za izravno mjerenje redoks stanja stanice (Eruslanov i Kusmartsev, 2010). DCFH-DA je nefluorescentna boja koja može difundirati kroz membranu stanica i tamo se hidrolizirati pomoću esteraza te u prisutstvu ROS-a i drugih peroksida prijeći u fluorescentnu molekulu 2',7'-diklorfluorescein (DCF) čija se fluorescencija mjeri pri 485 nm za ekscitaciju, tj. 530 nm za emisiju. Intenzitet fluorescencije je proporcionalan koncentraciji ROS-a u stanici (Kim i Xue, 2020; Rajneesh i sur., 2017).

100 µL stanične suspenzije koncentracije 10⁵ stanica mL⁻¹, nacijepi se na crnu mikrotitarsku ploču s 96 jažica te se inkubira 24 sata. Nakon toga dodaju se ekstrakti ljuske oraha i kakaova zrna sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014, 0,2 i 1 mg mL⁻¹. nakon tretmana od 1 i 2 sata pri 37°C, uklanja se medij sa ekstraktima te se stanice ispiru sa 100 µL

PBS pufera. Zatim, dodaje se 100 μL 50 μM otopine DCFH-DA i sve se skupa inkubira 30 minuta na 37°C. Također, paralelno je rađena i kontrola koja sadrži sve otopine, osim ekstrakata. Slijedi mjerenje fluorescencije. Indukcija slobodnih radikala (% u odnosu na kontrolu) izračunata je prema formuli [2]:

$$\text{Indukcija slobodnih radikala} = \frac{\frac{\text{intenzitet fluorescencije (ekstrakt)}}{\% \text{ preživljenja}}}{\frac{\text{intenzitet fluorescencije (kontrola)}}{100}} \quad [2]$$

3.2.3 Ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na bakterijskim kulturama

Ispitivane bakterijske kulture su uzgojene do eksponencijalne faze rasta u odgovarajućim tekućim hranjivim podlogama. U Eppendorf epruvete stavljeno je 200 μL određene bakterijske kulture te na to 200 μL ekstrakta ljuske oraha ili kakaovog zrna sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014 i 0,2 mg mL^{-1} . U kontrolu je umjesto ekstrakata dodano 200 μL odgovarajuće hranjive podloge. Smjesa je inkubirana u termostatu na 37°C, 1 sat. Nakon tretmana, napravljena su mikrorazrjeđenja te su na odgovarajuće hranjive podloge naciepljene bakterije razrijeđene u rasponu od deset do milijun puta. Ploče s naciepljenim bakterijama inkubirane su 24h na 37°C te je izbrojan broj poraslih kolonija (eng. CFU – *Colony-Forming Unit*). Postotak preživljenja bakterija izračunat je prema formuli [3]:

$$\text{Preživljenje bakterija (\%)} = \frac{\text{CFU/mL bakterijske suspenzije}}{\text{CFU/mL kontrole}} \times 100 \quad [3]$$

3.2.4 Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na promjenu adhezije bakterija za humane stanice

U mikrotitarske ploče sa 24 jažice naciepljeno je po 1 mL prethodno pripremljenih suspenzija Caco-2 i Cal27 staničnih linija te su uzgajane u inkubatoru na temperaturi 37°C i kontroliranom atmosferom (95% zraka i 5% CO_2). Nakon postizanja subkonfluentne kulture, ukloni se istrošeni medij pa se stanice tretiraju otopinama ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna sa i bez polisaharida u koncentracijama 0,014 i 0,2 mg mL^{-1} u trajanju od 2 sata (Caco-2) i 15 minuta (Cal27). U međuvremenu, prethodno uzgojene bakterije do eksponencijalnog rasta,

se isperu i resuspendiraju u mediju za uzgoj staničnih kultura optičke gustoće između 0,2 i 0,3 (OD_{600} , *optical density*). S humanih stanica se uklone ekstrakti, isperu se sa 0,5 mL PBS-a te se na njih dodaje 0,5 mL bakterijske suspenzije. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta na 37°C, u inkubatoru, nevezane bakterije se ispiru sa humanih stanica, te se adhezirane bakterije oslobađaju s epitela stanica dodavanjem 100 µL 0,01 % Triton X-100 otopine. Nakon petnaestominutne inkubacije, iz suspenzija se pripremaju odgovarajuća razrjeđenja te se na hranjive podloge naciepljuju bakterijske stanice razrijeđene u rasponu od deset do tisuću puta. Nakon inkubacije 24h na 37°C, prebroje se izrasle kolonije i izračuna postotak adhezije u odnosu na kontrolu, koja jedina nije bila tretirana ekstraktima, prema navedenoj formuli [4]:

$$\% \text{ adhezije bakterija} = \frac{\text{CFU (tretirane bakterije) / mL suspenzije}}{\text{CFU(kontrola) / mL kontrole}} \times 100 \quad [4]$$

3.2.5 Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na formiranje biofilma

Biofilmovi su zajednice mikroorganizama pričvršćenih na površine, koje se mogu naći u medicinskim, industrijskim i prirodnim okruženjima. Zapravo, život u biofilmu predstavlja prevladavajući način rasta mikroorganizama u većini okruženja. Test u mikrotitarskoj pločici pomoću kristal violet boje je često korišten za proučavanje bakterijskih biofilмова, pogotovo za procjenu ranog formiranja biofilma (O'Toole, 2011). Na osnovi količine boje koju stanice vežu za sebe, ispituje se stvaranje biofilma u stresnim uvjetima. Naime, kad su bakterijske stanice izložene stresu, teže stvaranju biofilma koji veže kristal violet boju pa je intenzitet boje manji nego kada je stres slabiji pa dolazi do većeg stvaranja biofilma pa je intenzitet obojenja veći (Traba i Liang, 2011).

Bakterije (*S. aureus*, *E. coli* i *L. fermentum*), prethodno nasađene u hranjive podloge da izrastu do eksponencijalne faze ($10^8 - 10^9$), potrebno je razrijediti 100 puta, jer u toj koncentraciji formiraju biofilm. 180 µL razrijeđene suspenzije bakterija dodati u mikrotitarsku pločicu od 96 jažica, te na sve, osim na kontrolu, dodati 20 µL otopine ekstrakata. Otopine ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna prethodno su pripremljene u odgovarajućim hranjivim podlogama u koncentracijama 0,014 i 0,2 mg mL⁻¹. Nakon što je pločica prekrivena parafilmom, stavljena je u inkubator na 37°C, 24 sata kako bi se stvorio biofilm.

Kvantifikacija biofilma provedena je kristal violet testom. Poslije inkubacije, tri puta se stanice isperu sa po 200 µL PBS-a te se fiksiraju na 60°C, 60 minuta. Slijedi bojanje s 0,06 %-

tnim kristal violetom otopljenim u vodi, tako da je se 50 μL doda u svaku jažicu i ostavi da odstoji 20 minuta. Ponovno slijedi ispiranje tri puta PBS-om i sušenje. Na koncu, dodaje se 200 μL 30 %-tne octene kiseline u svaku jažicu da bi se otopila boja vezana za adhezirane bakterije, a onda se mjeri intenzitet nastalog obojenja spektrofotometrijski na 570-630 nm. Postotak nastanka biofilma, u odnosu na kontrolu, na osnovi izmjerene apsorbancije, izračuna se prema formuli [5]:

$$\% \text{ nastanka biofilma} = \frac{A_{600} (\text{ekstrakt})}{A_{600} (\text{kontrola})} \times 100 \quad [5]$$

A_{600} – vrijednost apsorbancije izmjerene pri valnoj duljini od 600 nm

3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je u statističkom programu JASP 0.14.0 korištenjem ANOVA statističke analize sa Scheffe i Tukey *post hoc* testom usporedbe. Statistički značajna razlika između eksperimentalno dobivenih podataka određena je kriterijem p-vrijednost $<0,001$. Rezultati su grafički prikazani pomoću programa Microsoft Excel 2019.

4 REZULTATI I RASPRAVA

Učinak bioaktivnih komponenata iz ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna pri koncentracijama koje je realno očekivati da budu unesene u ljudski organizam, ispitan je na kontinuiranim staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2, adenokarcinoma epitela želuca AGS, adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2 i karcinoma epitela usne šupljine Cal27 te na bakterijama *S. aureus*, *E. coli* i *L. fermentum*.

Citotoksični i proliferativni učinak ekstrakta ljuske oraha i kakaovca na humanim staničnim linijama određen je Neutral red metodom, a antioksidacijski učinak DCFH-DA metodom. Stanice su izložene djelovanju ekstrakata u trajanju od 1 i 2 sata.

Citotoksični i proliferativni učinak ovih ekstrakata na bakterijske stanice, provedeno je pripremom mikrorazrjeđenja, prethodnotretiranih bakterijskih suspenzija 1 sat, te brojanjem poraslih kolonija nakon 24 sata uzgoja pri 37 °C, kako bi se izračunalo preživljenje tretiranih bakterija u odnosu na kontrolu.

Test adhezije napravljen je inkubiranjem humanih stanica s ekstraktima ljuske oraha i kakaovog zrna, Cal27 stanica 15 minuta i Caco-2 stanica 2 sata, zatim dodavanja bakterija. Nakon toga prave se mikrorazrjeđenja kako bi se nakon 24 sata rasta u termostatu na 37 °C izbrojale i izračunao postotak adhezije s obzirom na kontrolu.

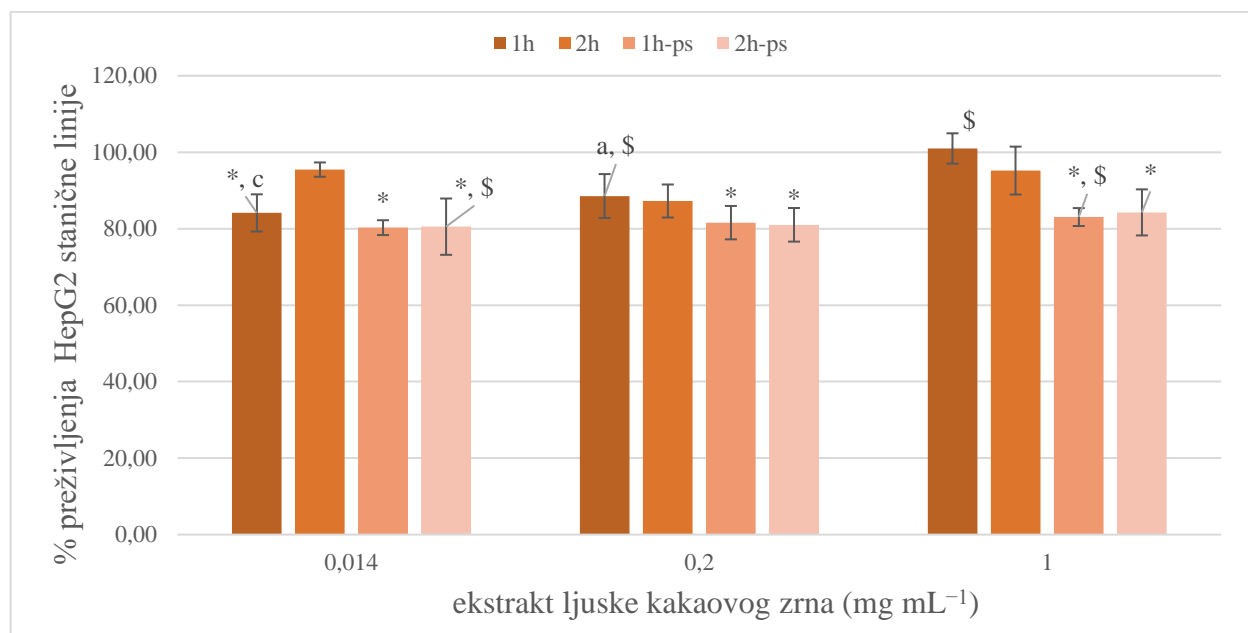
Kako su ekstrakti utjecali na formiranje bakterijskih biofilмова, istraživano je testom u mikrotitarskoj pločici pomoću kristal violet boje. Nakon inkubacije bakterijskih stanica s ekstraktima 24 sata, između ostalog, dodana je i boja kristal violet koja ima sposobnost vezivanja za biofilm. Octenom kiselinom se vezana boja oslobodila te mjerenjem apsorbancije može se odrediti nastanak biofilma s obzirom na kontrolne uzorke.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slikama 13 – 36.

4.1 CITOTOKSIČNOST EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA HUMANE STANIČNE LINIJE

Citotoksičnost ekstrakata ljuske oraha i kakaovca sa i bez polisaharida na humanim staničnim linija HepG2, AGS i Caco-2 određena je Neutral red metodom na temelju postotka preživljenja. Stanice su tretirane 1 i 2 sata, s različitim koncentracijama ekstrakata. Rezultati su grafički prikazani na slikama 13 – 18.

4.1.1 Citotoksičnost ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na humane stanične linije hepatocelularnog karcinoma jetre HepG2



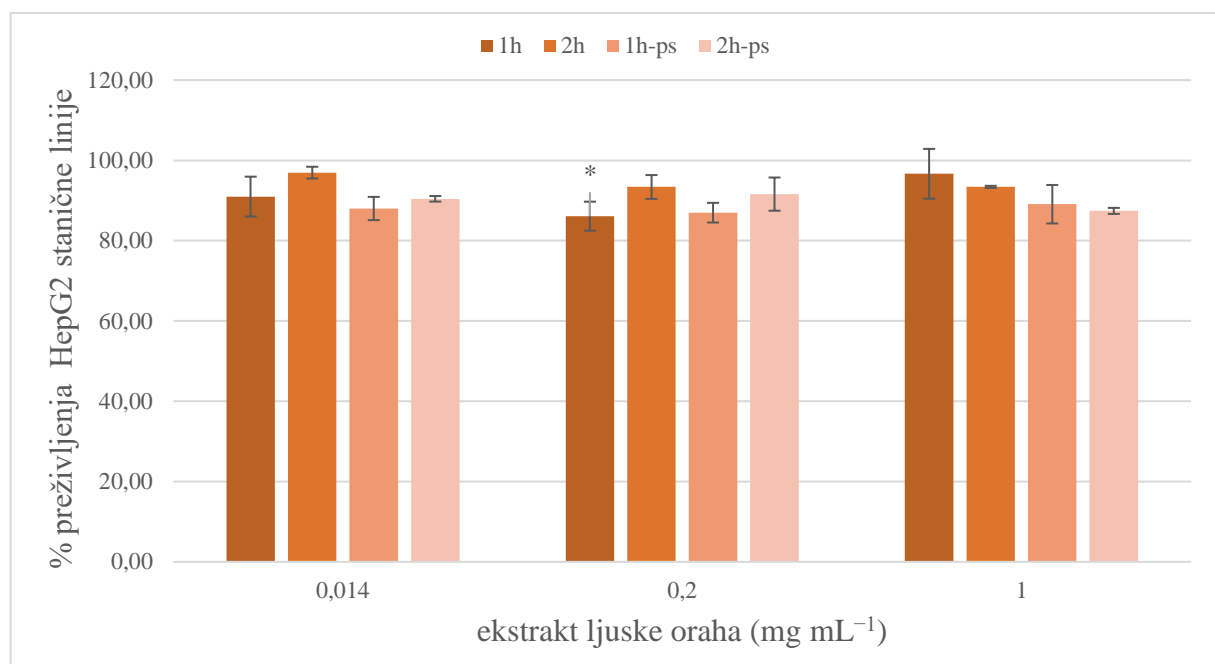
1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, \$ - statistički značajna razlika s obzirom na prisutnost polisaharida u ekstraktu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1 mg mL⁻¹

Slika 13. Prikaz postotka preživljenja HepG2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida u trajanju od 1 i 2 sata

Na slici 13 prikazani su rezultati koji pokazuju da ekstrakti ljuske kakaovog zrna bez polisaharida djeluju citotoksično na HepG2 staničnu liniju u svim koncentracijama, bez obzira na vrijeme tretmana. Također, citotoksičan učinak vidljiv je i u ekstraktu sa polisaharidima, koncentracije 0,014 mg mL⁻¹ u tretmanu trajanja 1 sat. Statistički značajna razlika vidljiva je u uzorcima sa polisaharidima, koncentracije 0,014 mg mL⁻¹ i 1 mg mL⁻¹ jednakog vremena tretmana (1 sat) - veća koncentracija pokazuje veći postotak preživljenja HepG2 stanične linije. Također, u uzorku koncentracije 0,2 mg mL⁻¹ i 1 mg mL⁻¹ vidljiva je statistički značajna razlika s obzirom na prisutnost polisaharida u ekstraktu.

Iz priloženih rezultata vidljivo je da uzorci bez polisaharida djeluju blago toksično na HepG2 staničnu liniju u cijelom koncentracijskom rasponu te vrijeme tretmana ne utječe na toksičnost. Studija Baharum i sur. (2014) pokazala je da ekstrakti ljuske kakaovog zrna imaju citotoksičan učinak na tumorske stanice HepG2 (pri koncentraciji 0,071 i 0,068 mg mL⁻¹), ali ne i na

normalne humane stanice.



1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

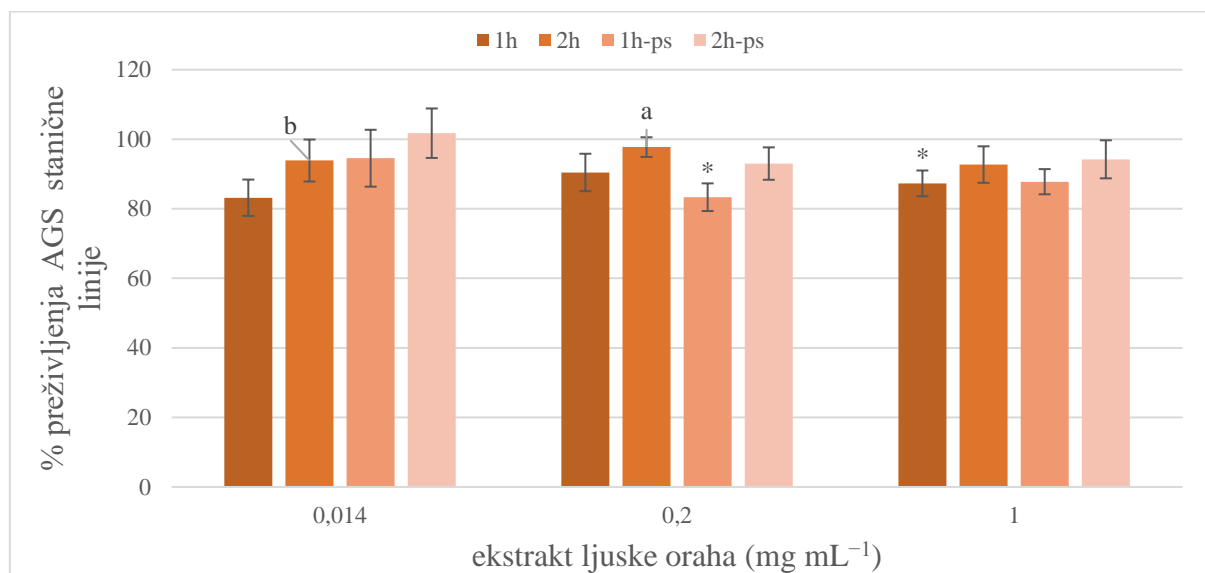
Slika 14. Prikaz postotka preživljenja HepG2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata lješke oraha sa i bez polisaharida u trajanju od 1 i 2 sata

Iz slike 14 vidljivo je da citotoksičan učinak istraživani uzorci imaju na staničnoj liniji HepG2 pri koncentraciji polifenola u ekstraktu 0,2 mg mL⁻¹ sa polisaharidima i tretmanom 1 sat.

Iz priloženog se vidi da ekstrakt lješke oraha nema toksični učinak.

Cheng i sur. (2017) su također u svom eksperimentu tretirali HepG2 staničnu liniju ekstraktom lješke oraha koja je rezultirala citotoksičnim efektom pri koncentraciji 0,064 mg mL⁻¹, pri čemu je došlo do indukcije apoptoze.

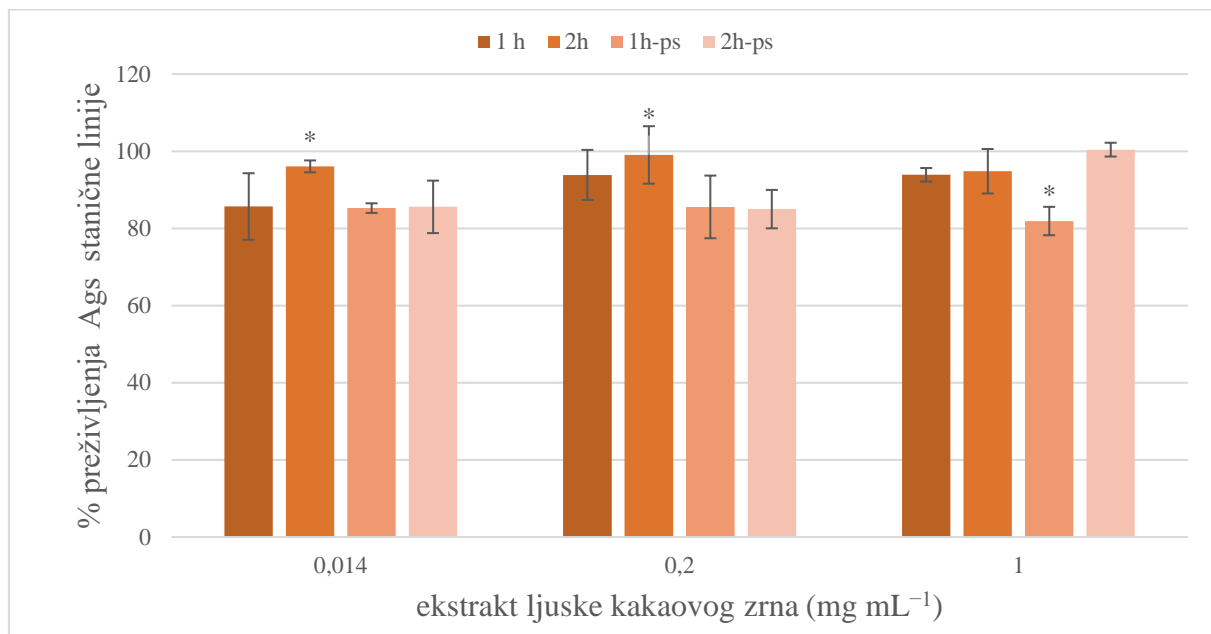
4.1.2 Citotoksičnost ekstrakata lješke oraha i kakaovog zrna na humane stanične linije adenokarcinoma epitela želuca AGS



1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; ; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; b – statistički značajna koncentracija u odnosu na koncentraciju 0,2 mg mL⁻¹

Slika 15. Prikaz postotka preživljenja AGS stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata lješke oraha sa i bez polisaharida u trajanju od 1 i 2 sata

Na slici 15, vidljiva je statistički značajna razlika između uzoraka tretiranih ekstraktom lješke oraha sa polisaharidima, tretiranih 2 sata u odnosu na koncentracije 0,014 i 0,2 mg mL⁻¹. Naime, tretman većom koncentracijom pokazuje veći postotak preživljenja AGS stanične linije. Citotoksičan učinak vidljiv je u uzorku bez polisaharida, tretiranih 1 sat, koncentracijom polifenola 0,2 mg mL⁻¹ te u uzorku sa polisaharidima, tretiranih 1 sat, koncentracijom 1 mg mL⁻¹. Iz slike 15, vidljivo je da ekstrakt lješke oraha nema toksično djelovanje na stanice želuca.



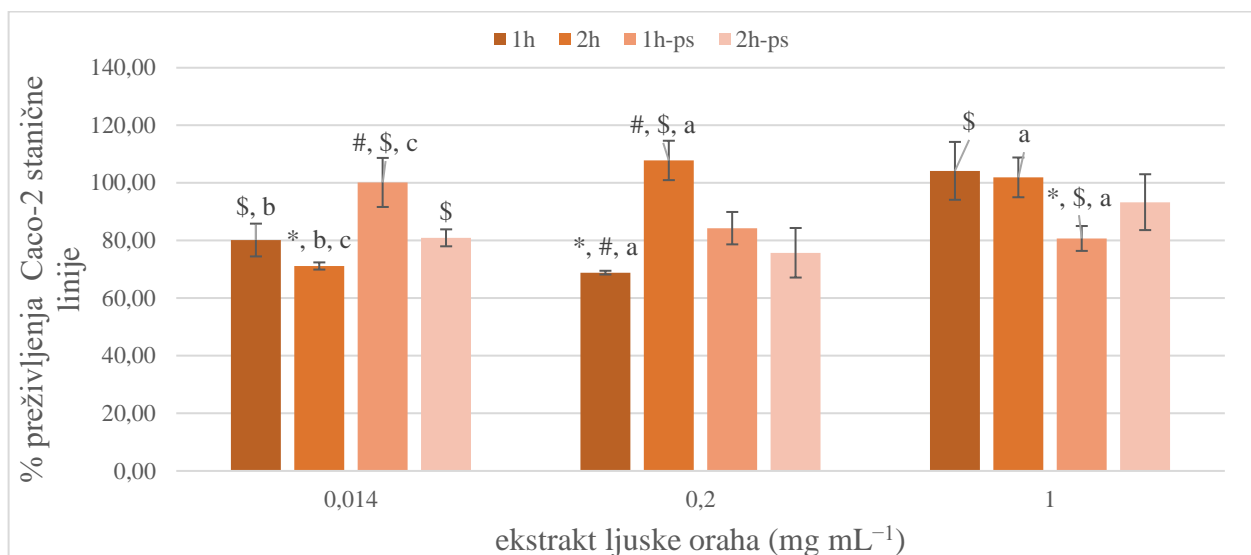
1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu

Slika 16. Prikaz postotka preživljenja AGS stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata ljuške kakaovog zrna sa i bez polisaharida u trajanju od 1 i 2 sata

Na grafičkom prikazu, slika 16, vidljiv je citotoksičan učinak ekstrakata ljuške kakovog zrna na AGS staničnu liniju, sa polisaharidima i tretmanom trajanja 2 sata pri koncentraciji polifenola 0,014 te u uzorku bez polisaharida, tretiranom 1 sat koncentracijom polifenola u ekstraktu 1 mg mL⁻¹. Sveukupni trend vidljiv iz slike 16 ne upućuje na toksično djelovanje ekstrakta ljuške kakaovog zrna.

Koncentracija proantocijanidina u polifenolnim ekstraktima, poput ekstrakata ljuške oraha i kakaovog zrna, pokazuje značajnu korelaciju s citotoksičnošću prema staničnim linijama adenokarcinoma želuca AGS (Navarro i sur., 2017).

4.1.3 Citotoksičnost ekstrakata ljuške oraha i kakaovog zrna na humane stanične linije adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2

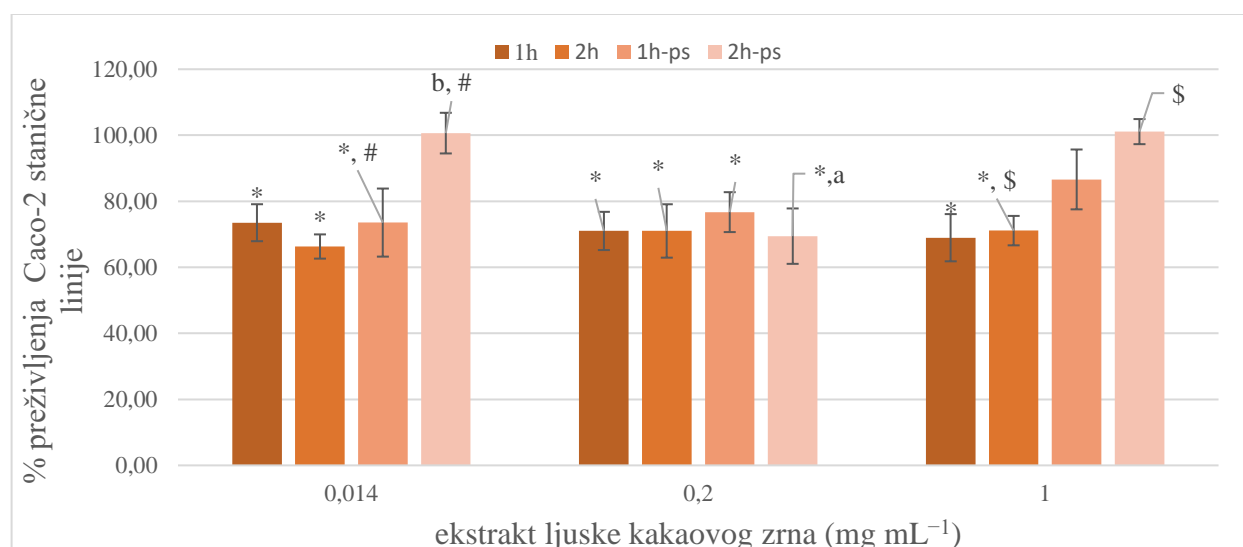


1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; \$ - statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu; # - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana ekstraktom; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; b – statistički značajna koncentracija u odnosu na koncentraciju 0,2 mg mL⁻¹; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1 mg mL⁻¹

Slika 17. Prikaz postotka preživljenja Caco-2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata ljuske oraha sa i bez polisaharida u trajanju od 1 i 2 sata

Citotoksičan učinak ekstrakata sa polisaharidima vidljiv je pri koncentraciji polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u tretmanu trajanja 2 sata, te pri koncentraciji 0,2 mg mL⁻¹ u tretmanu trajanja 1 sat (slika 17). Također, na Caco-2 staničnu liniju je citotoksično djelovao ekstrakt bez polisaharida, koncentracije 1 mg mL⁻¹ nakon tretmana od 2 sata. Pri koncentraciji polifenola 0,014 mg mL⁻¹ statistički značajnu razliku između uzoraka prisutnost polisaharida u uzorcima tretiranim 1 sat. Naime, veće je preživljenje stanične linije tretirane uzorkom bez polisaharida. Isto tako, pri istoj koncentraciji polifenola u ekstraktima bez polisaharida vidljiva je statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretiranja – duži tretman pokazuje manji postotak preživljenja. Caco-2 linija tretirana ekstraktom sa polisaharidima, koncentracije polifenola 0,014 mg mL⁻¹, 2 sata, pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na koncentracije 0,2 i 1 mg mL⁻¹, odnosno identični uvjeti tretmana, ali veća koncentracija polifenola u uzorku rezultira većim postotkom preživljenja. Statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida vidljiva je u uzorcima tretiranih ekstraktima s koncentracijom polisaharida 0,2 mg mL⁻¹ (2 sata) i 1 mg mL⁻¹ (1 sat), gdje prisutnost polisaharida znači i veći postotak preživljenja Caco-2 humanih stanica. Ekstrakt ljuske oraha pokazuje toksični učinak na stanice adenokarcinoma debelog crijeva neovisno o prisustvu polisaharida. Tako dnevno preporučene koncentracije

pokazuju blago toksični učinak tijekom jednog i dva sata tretmana.



1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; \$ - statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu; # - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana ekstraktom; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; b – statistički značajna koncentracija u odnosu na koncentraciju 0,2 mg mL⁻¹

Slika 18. Prikaz postotka preživljenja Caco-2 stanica u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata ljuške kakaovog zrna sa i bez polisaharida u trajanju od 1 i 2 sata

Rezultati pokazuju da ekstrakt ljuške kakovog zrna sa polisaharidima djeluje citotoksično na Caco-2 staničnu liniju u svim koncentracijama polifenola te u oba vremenska perioda tretmana (slika 18). Također, vidljiv je i u uzorcima tretiranim 1 sat ekstraktom bez polisaharida, koncentracije polifenola 0,014 i 0,2 mg mL⁻¹ te u uzorku tretiranom 2 sata, ekstraktom bez polisaharida koncentracije polifenola 0,2 mg mL⁻¹. Statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana (1 i 2 sata), vidljiva je pri koncentraciji polifenola u ekstraktu 0,014 mg mL⁻¹ bez polisaharida – tretman od 2 sata pokazuje veći postotak preživljenja Caco-2 stanične linije od tretmana trajanja 1 sat. u uzorcima tretiranim 2 sata, ekstraktom ljuške kakovog zrna bez polisaharida vidljiva je statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 i 0,2 mg mL⁻¹. Naime, tretman manjom koncentracijom rezultira većim postotkom preživljenja ove stanične linije.

Caco-2 stanična linija tretirana ekstraktom koncentracije polisaharida 1 mg mL⁻¹, trajanja 1 sat, pokazuje statistički značajnu razliku s obzirom na prisutnost polisaharida u uzorku. Prisutnost polisaharida doprinijela je znatno većem postotku preživljenja stanica.

Ekstrakt ljuske kakaovog zrna djeluje toksično na stanice adenokarcinoma debelog crijeva s time da su puno toksičniji uzorci koji sadrže polisaharide. Vrijeme tretmana na utječe na toksičnost.

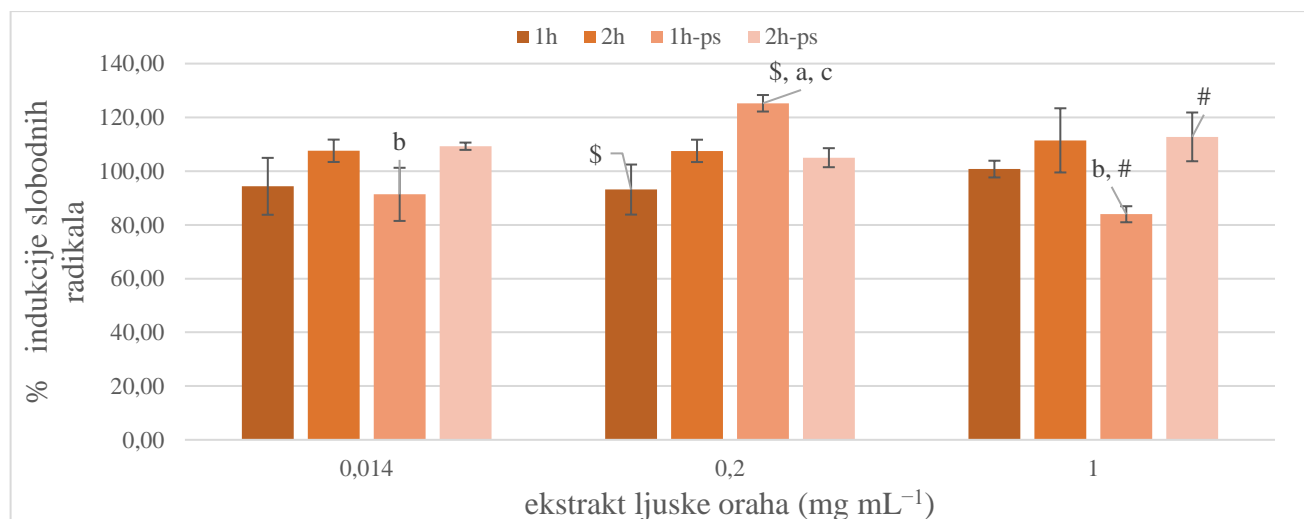
Ekstrakt manuka meda bogat fenolnim spojevima kao što su kafeinska kiselina, galna kiselina, luteolin, kvarcetin i kampferol, pokazao je antiproliferativni i citotoksični učinak na tumorske stanice raka debelog crijeva pri koncentracijama 0-50 mg mL⁻¹ (Okafor i sur., 2021).

Za razliku od ekstrakata bez polisaharida, tretman humanih stanica HepG2 i AGS ekstraktima s polisaharidima rezultira većim postotkom preživljenja, no to nije slučaj i kod Caco-2 stanica.

4.2 PROOKSIDATIVNI/ANTIOKSIDATIVNI UČINAK EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA HUMANE STANIČNE LINIJE

Prooksidativni učinak ekstrakata ljuske oraha i kakaovca sa i bez polisaharida na humanim staničnim linijama HepG2, AGS i Caco-2 određen je DCFH-DA metodom. Vremensko trajanje tretmana iznosilo je 1 i 2 sata. Rezultati su grafički prikazani na slikama 19-24.

4.2.1 Prooksidativni učinak ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na HepG2 stanice

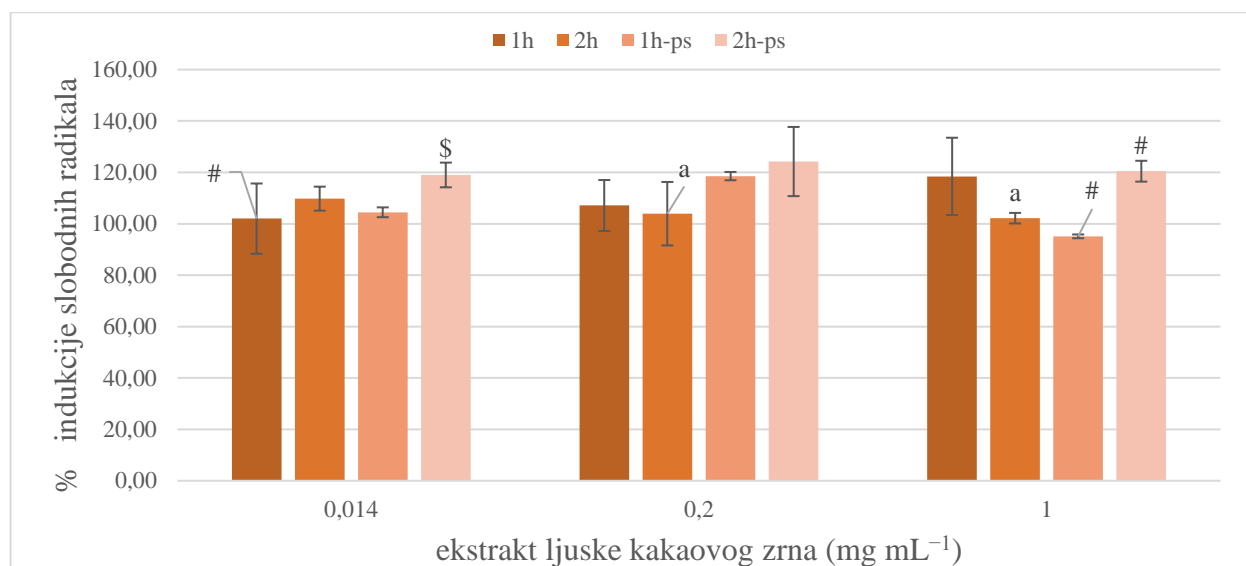


1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; \$ - statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu; # - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana ekstraktom; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,2 mg mL⁻¹; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1 mg mL⁻¹

Slika 19. Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana 1 i 2 sata različitim koncentracijama ekstrakata ljuske oraha sa i bez polisaharida

Iz slike 19 se može iščitati da ekstrakti ljuske oraha sa i bez polisaharida u svim istraživanim koncentracijama polifenola ne pokazuju prooksidativno djelovanje na staničnu liniju HepG2.

Statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu ljuske oraha koncentracije polifenola $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, tretmana 1 sat, jer je u uzorku sa polisaharidima prilično manji postotak indukcije slobodnih radikala, nego u onome bez polisaharida. Također, u uzorcima tretiranim 1 sat, ekstraktom bez polisaharida, vidi se statistički značajna razlika s obzirom na koncentraciju polifenola u ekstraktu. Naime, tretman koncentracijom polifenola $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ pokazuje najveći postotak indukcije slobodnih radikala u HepG2 staničnoj liniji. U uzorcima tretiranim ekstraktom ljuske oraha koncentracije polifenola 1 mg mL^{-1} bez polisaharida, statistički se značajno razlikuju u odnosu na vrijeme trajanja tretmana ekstraktom – duljim tretmanom povećan je postotak indukcije slobodnih radikala.



1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bezpolisaharida; \$ - statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu; # - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana ekstraktom; ; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$

Slika 20. Indukcija slobodnih radikala stanične linije HepG2 nakon tretmana 1 i 2 sata različitim koncentracijama ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida

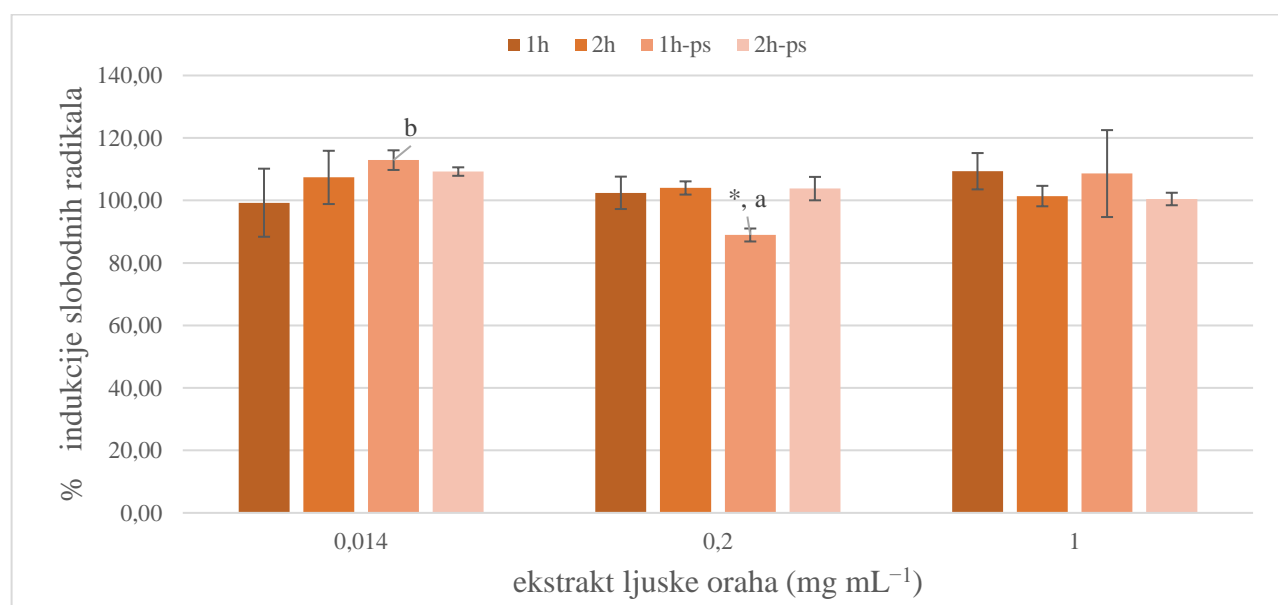
Iz rezultata prikazanih na slici 20 je vidljivo da ekstrakti ljuske kakovog zrna sa i bez polisaharida ne uzrokuju indukciju slobodnih radikala na staničnu liniju HepG2.

U uzorcima tretiranim ekstraktom sa polisaharidima, koncentracije polifenola $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$

mL^{-1} , statistički se značajno razlikuju u odnosu na vrijeme tretiranja stanične linije – tretmanom od 2 sata znatno je povećan postotak indukcije slobodnih radikala, dok kod uzoraka tretiranih ekstraktom iste koncentracije polifenola u trajanju od 2 sata, vidi se statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost odnosno odsutnost polisaharida. Stanična linija tretirana ekstraktom sa polisaharidima pokazuje veći postotak indukcije slobodnih radikala. S obzirom na vrijeme tretiranja HepG2 stanica, razlikuju se i uzorci tretirani ekstraktom bez polisaharida koncentracije 1 mg mL^{-1} , gdje dulji tretman rezultira većom indukcijom slobodnih radikala u stanicama.

Ovi se rezultati mogu povezati s rezultatima dobivenim u istraživanju D'Angelo i sur. (2017), koji su tretirali stanice raka dojke sa polifenolnim ekstraktom jabuke *Annurca* bogat katehinom. Taj je ekstrakt imao je snažan prooksidacijski učinak koji se povezuje s proapoptotičkom funkcijom polifenolnih spojeva na različitim tipovima tumorskih stanica.

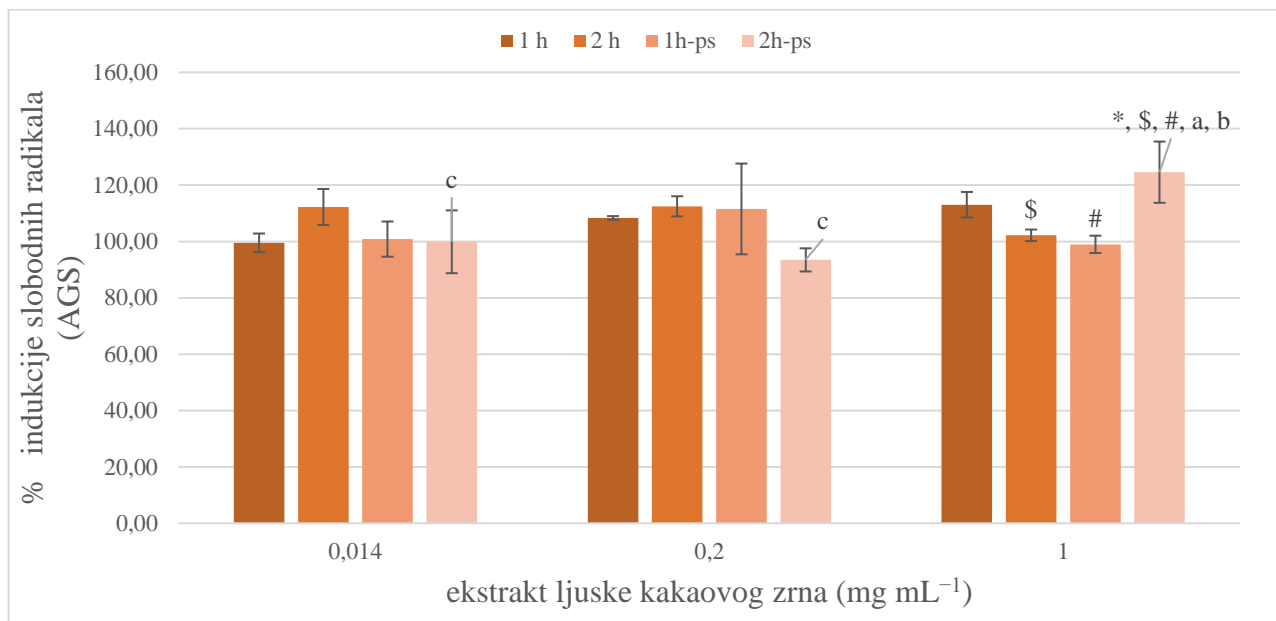
4.2.2 Prooksidativni učinak ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na AGS stanice



1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; ; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$

Slika 21. Indukcija slobodnih radikala stanične linije AGS nakon tretmana 1 i 2 sata različitim koncentracijama ekstrakata ljuske oraha sa i bez polisaharida

Ekstrakti ljuske oraha sa i bez polisaharida svih koncentracija nemaju prooksidativno djelovanje na staničnu liniju AGS (slika 21). Iznimka je ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida koncentracije polifenola $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, koji ima antioksidativno djelovanje.

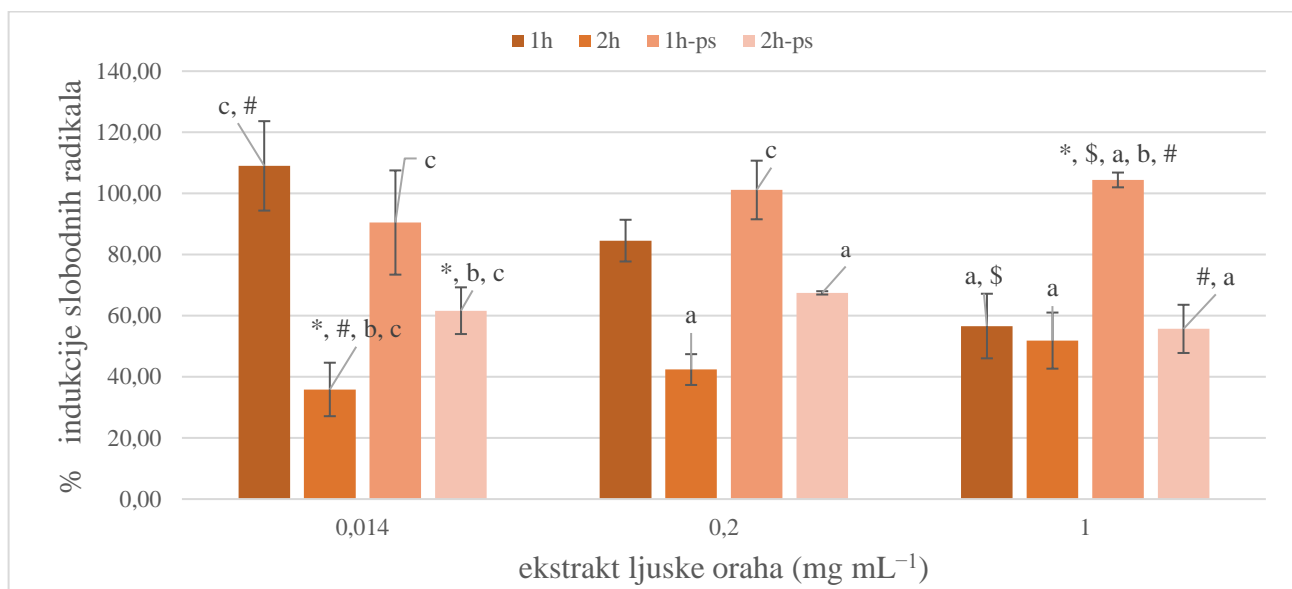


1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; \$ - statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu; # - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana ekstraktom; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,2 mg mL⁻¹; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1 mg mL⁻¹

Slika 22. Indukcija slobodnih radikala stanične linije AGS nakon tretmana 1 i 2 sata različitim koncentracijama ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida

Iz rezultata (slika 22) je vidljivo da ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida koncentracije 1 mg mL⁻¹ ima antioksidativno djelovanje. Uzorci tretirani ekstraktom bez polisaharida i tretirani 2 sata, statistički se značajno razlikuju u odnosu na koncentraciju polifenola u ekstraktu. Naime, pri najvećoj koncentraciji polifenola najveći je i postotak indukcije slobodnih radikala. Također, pri toj koncentraciji, statističku značajnu razliku ima i prisutnost polisaharida u uzorcima tretiranim 2 sata – uzorak bez polisaharida pokazuje veći postotak indukcije slobodnih radikala te duljina tretmana u uzorcima bez polisaharida, gdje tretman ekstraktom koncentracije 1 mg mL⁻¹ 2 sata rezultira većom indukcijom slobodnih radikala u AGS stanicama.

4.2.3 Prooksidativni učinak ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na Caco-2 stanice

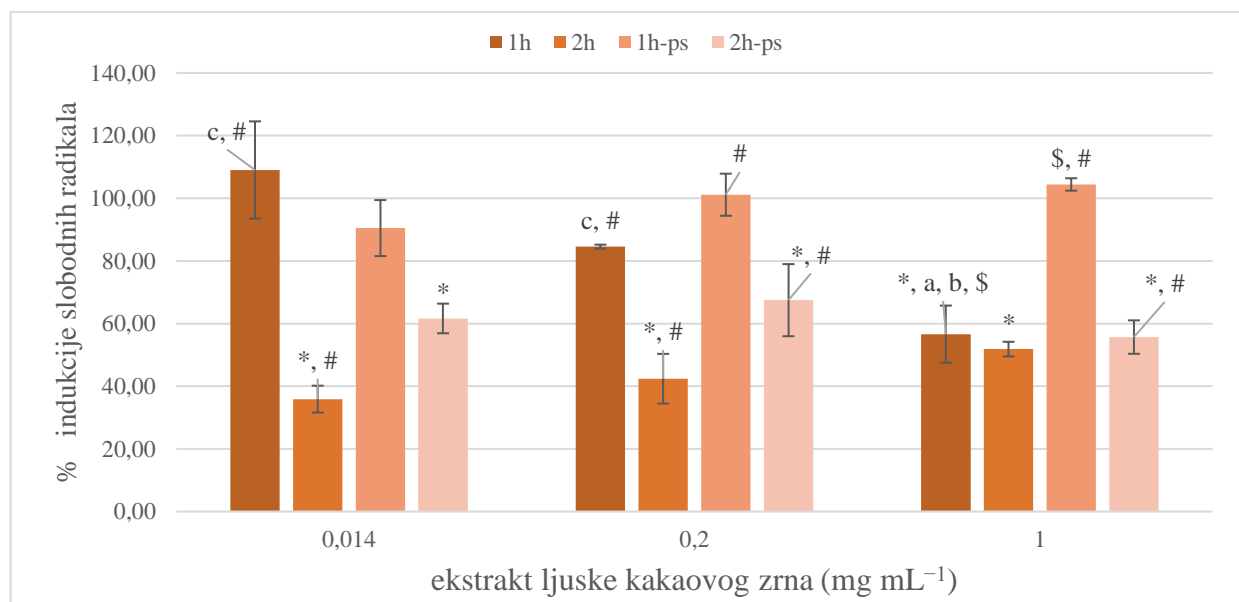


1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; \$ - statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu; # - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana ekstraktom; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,2 mg mL⁻¹; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1 mg mL⁻¹

Slika 23. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon tretmana 1 i 2 sata različitim koncentracijama ekstrakata ljuske oraha sa i bez polisaharida

Iz rezultata (slika 23) je vidljivo da ekstrakti ljuske oraha pokazuju antioksidativno djelovanje pri koncentracijama 0,014 mg mL⁻¹ (sa i bez polisaharida, tretman 2 h) i 1 mg mL⁻¹ (bez polisaharida, tretman 1 h). Postotak indukcije slobodnih radikala izuzetno je visok u uzorku ekstrakta sa polisaharidima, koncentracije polifenola 0,014 mg mL⁻¹, tretmana 1 sat u odnosu na uzorak tretiran ekstraktom sa koncentracijom polifenola 1 mg mL⁻¹. Statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu vidljiva je u ekstraktu koncentracije polifenola 1 mg mL⁻¹ (1h), gdje je postotak indukcije slobodnih radikala značajno veći u uzorku bez polisaharida. Također, pri koncentraciji 1 mg mL⁻¹, ekstrakta bez polisaharida, statistički značajna razlika je i u odnosu na vrijeme tretmana – tretman od 1 sata pokazuje veći postotak indukcije slobodnih radikala stanične linije Caco-2, nego tretman od 2 sata. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da prisustvo polisaharida ima bitnu ulogu u antioksidacijskom djelovanju; polisaharidi su pospješili vezanje slobodnih radikala pa je tako najučinkovitije antioksidacijsko djelovanje primjećeno u stanicama koje su tretirane sa uzorcima s polisaharidima. Kako je već napomenuto, vrijeme tretmana isto ima bitnu ulogu u antioksidacijskom djelovanju; dulje vrijeme izlaganja doprinosi izraženijem antioksidacijskom djelovanju.

Dobiveni rezultati gdje prisutstvo polisaharida u ekstraktu utječe na antioksidacijsko djelovanje, može se potkrijepiti istraživanjem Mohanta i sur. (2022) u kojem je dokazano da polisaharidi (često modificirani, obogaćeni metalnim ionima, konjugirani i sl.) mogu djelovati kao antioksidansi različitim mehanizmima, npr. uklanjanjem hidroksidnih i superoksidnih radikala.



1,2 h – vrijeme trajanja tretmana ekstraktom sa polisaharidima; 1,2h-ps - vrijeme trajanja tretmana ekstraktom bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; \$ - statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u ekstraktu; # - statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme tretmana ekstraktom; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,014 mg mL⁻¹; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,2 mg mL⁻¹; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 1 mg mL⁻¹

Slika 24. Indukcija slobodnih radikala stanične linije Caco-2 nakon tretmana 1 i 2 sata različitim koncentracijama ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida

Iz slike 24 se može iščitati da ekstrakti ljuske kakaovog zrna u svim koncentracijama imaju antioksidativno djelovanje na staničnu liniju Caco-2. Najjače antioksidacijsko djelovanje vidljivo je pri svim koncentracijama polifenola kod tretmana stanica trajanja 2 sata s ekstraktom sa polisaharidima.

Da ekstrakti bogati fenolnim spojevima imaju antioksidativno djelovanje na Caco-2 stanice rezultatima su potvrdili i Wu i sur., koji su tretirali Caco-2 staničnu liniju ekstraktima flavona dobivenih iz stabljike i lista biljke *Labisia pumila*. Naime, flavoni mogu proći kroz staničnu membranu i djelovati kao hvatači slobodnih radikala.

Također, na slici 24, je vidljivo da uzorci tretirani ekstraktom sa polisaharidima 1 sat,

pokazuju statistički značajnu razliku s obzirom na koncentraciju polifenola – 1 mg mL⁻¹ koncentracija pokazuje malen postotak indukcije slobodnih radikala, dok najniža koncentracija 0,014 pokazuje izrazito visok postotak indukcije slobodnih radikala. Statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme izražena je pri koncentraciji polifenola 0,2 mg mL⁻¹, gdje dulje vrijeme tretiranja (2 sata) znači antioksidacijsku aktivnost, za razliku od tretmana trajanja 1 sat. Isto je vidljivo i pri koncentracijama 0,014 mg mL⁻¹ ekstrakta sa polisaharidima i koncentracijama 1 mg mL⁻¹ ekstrakta bez polisaharida.

Ponovno, prisustvo polisaharida se pokazalo ključnim za antioksidacijsko djelovanje; polisaharidi su smanjili broj slobodnih radikala te je najučinkovitije antioksidacijsko djelovanje primjećeno u stanicama koje su tretirane sa uzorcima s polisaharidima. Dulje vrijeme izlaganja doprinosi izraženijem antioksidacijskom djelovanju.

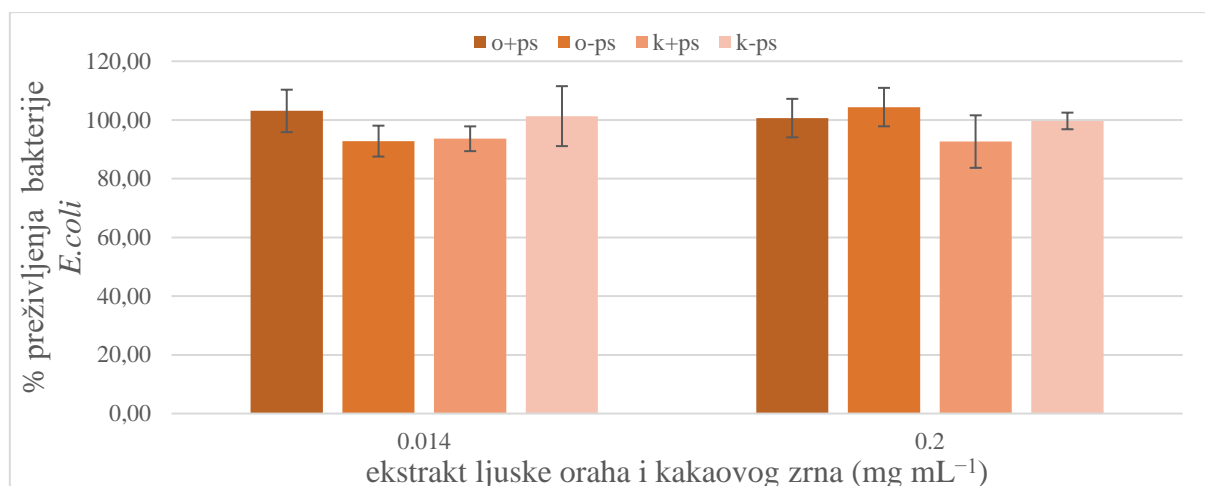
4.3 CITOTOKSIČAN UČINAK EKSTRAKATA LJUSKE PORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA BAKTERIJSKE KULTURE *E. COLI*, *L. FERMENTUM* I *S. AUREUS*

Pomoću izrađenih krivulja rasta bakterijskih kultura *E. coli*, *L. fermentum* i *S. aureus*, određeni su vrhunci eksponencijalne faze (tablica 12). Ta su vremena uzgoja korištena za ispitivanje citotoksičnosti ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na prethodno spomenute bakterijske kulture.

Tablica 13. Prikaz vrhunca rasta bakterija određenog prema krivuljama rasta

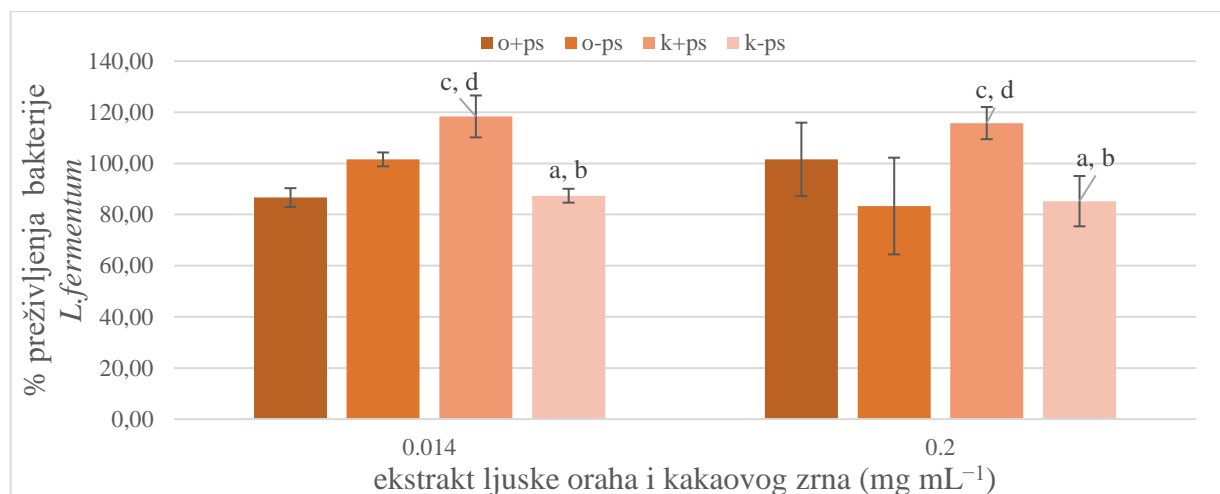
BAKTERIJA	VRHUNAC RASTA
<i>Escherichia coli</i>	22 h
<i>Lactobacillus fermentum</i>	18 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	22 h

Rezultati dobiveni ovim eksperimentom su prikazani u obliku grafičkog prikaza (slike 25–27) te prikazuju da ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna nemaju citotoksičan učinak na bakterije *E. coli* i *L. fermentum*, za razliku od citotoksičnog djelovanja kojeg pokazuju prema bakterijama *S. aureus*.



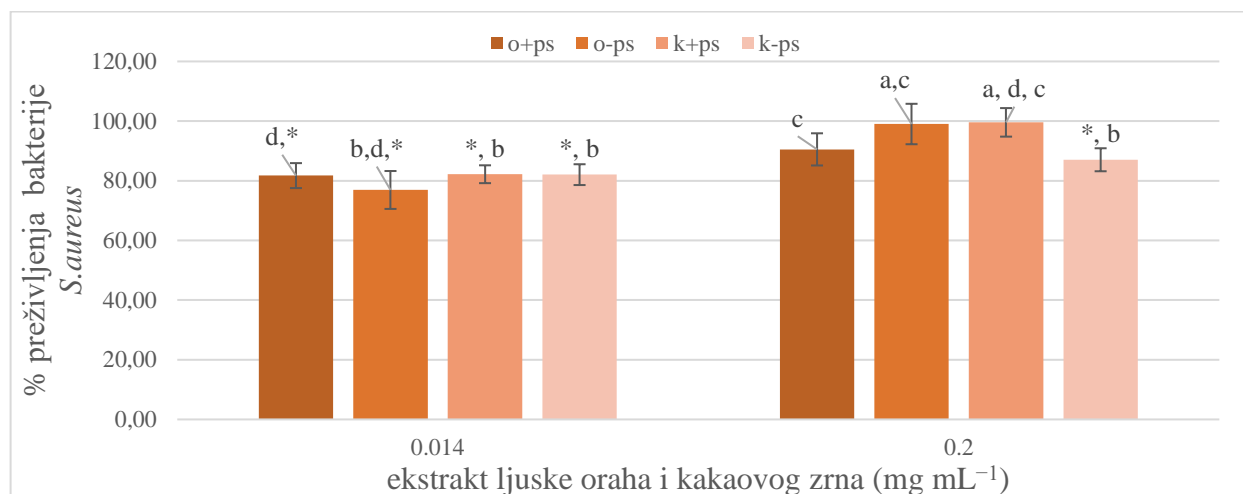
o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 25. Prikaz postotka preživljenja bakterijske kulture *E. coli* u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida



o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 26. Prikaz postotka preživljenja bakterijske kulture *L. fermentum* u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida



o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 27. Prikaz postotka preživljenja bakterijske kulture *S. aureus* u ovisnosti o tretmanu različitim koncentracijama ekstrakata ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida

Ekstrakt ljuske oraha i kakaovog zrna imali su najslabiji antimikrobni potencijal na bakteriju *E. coli*. Neyestani i sur. (2007) su istraživali polifenolne komponente u ekstraktima crnog i zelenog čaja. Polifenolni profil čajeva sličan je sastavu ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna korištenih u ovome radu, budući da sadrže galnu kiselinu, epigalokatehin i njegove derivate. Njihovo je istraživanje korištenjem metode difuzije na pločama, pokazalo je da ekstrakti imaju citotoksično djelovanje na bakteriju *E. coli*, no oni su koristili znatno veće koncentracije polifenola u ekstraktima (25 mg mL⁻¹) i vrijeme tretmana (5-7 sati).

Polifenolni ekstrakti biljaka sa područja srednjeg istoka (*Rosemarinus officinalis*), pri koncentracijama 0,05-0,2 mg mL⁻¹, pokazali su antibakterijski učinak prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus*, s time da je puno veća zona inhibicije kod bakterija *S. aureus* (Gan i sur., 2019). Slično je vidljivo i u rezultatima ovoga rada gdje je najveći citotoksični učinak ekstrakata vidljiv na bakteriji *S. aureus*, osobito kod tretmana s ekstraktom ljuske oraha.

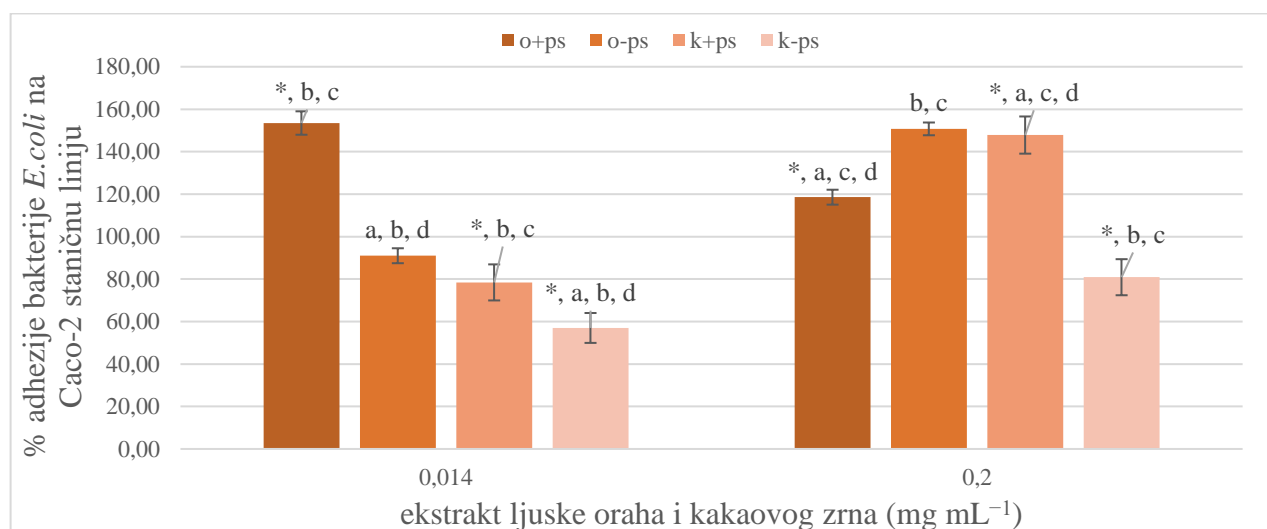
Ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna ne pokazuju citotoksičan učinak na bakterije *L. fermentum*, statistički značajna razlika u odnosu na prisutnost polisaharida u uzorcima tretiranim ekstraktom ljuske kakaovog zrna. Naime, veći postotak preživljenja bakterije *L. fermentum* je

uzorak tretiran ekstraktom sa polisaharidima. Bakterije mliječne kiseline proizvode egzopolisaharide koji posjeduju veliki sadržaj vode što pridonosi zaštiti same bakterije (Donot i sur., 2012). Iz svega prikazanog, vidljivo je da ekstrakti ljuske oraha i kakaovg zrna neovisno o koncentraciji pokazuju toksično djelovanje na bakteriju *S. aureus*.

4.4 UTJECAJ EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA ADHEZIJU BAKTERIJSKIH STANICA NA HUMANE STANIČNE LINIJE

Za ispitivanje utjecaja ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na promjenu adhezije bakterija za kontinuirane humane stanične linije Caco-2 i Cal27, odabrane su tri bakterijske kulture: *S. aureus*, *E. coli* i *L. fermentum*. Odabrane stanične linije inkubirane su 15 minuta (Cal27) i 2 sata (Caco-2) ekstraktom ljuske oraha i kakaovca sa i bez polisaharida, koncentracije 0,014 i 0,2 mg mL⁻¹, a potom bakterijskom suspenzijom u trajanju od 30 minuta. Nakon tretmana bakterije su nacijepljene na odgovarajuće krute hranjive podloge. Porasle kolonije su izbrojane, a postotak adhezije bakterija na humane stanice izražen je u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani na slikama 28–33.

4.4.1 Utjecaj ekstrakata ljske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterijskih stanica na tumorske epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2)



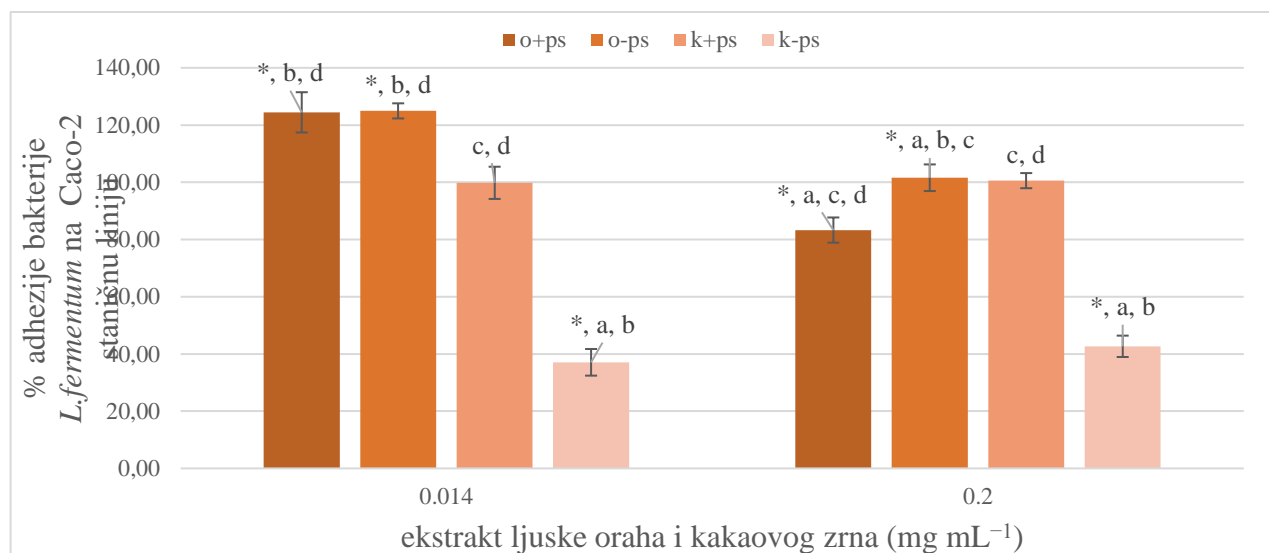
o+ps – ekstrakt ljske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 28. Prikaz utjecaja ekstrakata ljske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterije *E. coli* na Caco-2 staničnu liniju

Na grafičkom je prikazu (slika 28) vidljivo kako ekstrakti ljske oraha sa polisaharidima povećavaju postotak adhezije bakterije *E. coli* na Caco-2 staničnu liniju. Obje koncentracije polifenola u ekstraktu ljske oraha bez polisaharida nemaju utjecaja na adheziju bakterija. Što se tiče ekstrakta ljske kakaovog zrna, u uzorcima bez polisaharida pri objema koncentracijama polifenola u ekstraktima, dolazi do pada postotka adhezije bakterije *E. coli* na stanice. Dok je statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju vidljiva u uzorcima sa polisaharidima; pri koncentraciji 0,014 mg mL⁻¹ je smanjen postotak adhezije bakterije *E. coli* na humane stanične linije, za razliku od koncentracije 0,2 mg mL⁻¹ gdje dolazi do značajnog porasta postotka adhezije bakterije. Sumarno, povećanjem koncentracije ekstrakta ljske oraha bez polisaharida i ekstrakta ljske kakaovog zrna s polisaharidima povećava se i adhezija bakterije *E. coli*. Ekstrakt ljske oraha s polisaharidima povećava adheziju bakterije za epitel adenokarcinoma

epitela crijeva.

Shil i Chichger (2021) proučavali su kako dodatak umjetnih zaslađivača utječe na promjenu adhezije bakterije *E. coli* na Caco-2 stanice. Ustanovili su da dodatak ugljikohidrata utječe na veću adheziju bakterije *E. coli* na ove humane stanice, i na koncu potiču stvaranje biofilma. Stoga, veći je postotak adhezije bakterije *E. coli* na Caco-2 stanice tretirane ekstraktima sa polisaharidima, nego bez polisaharida (Slika 28).



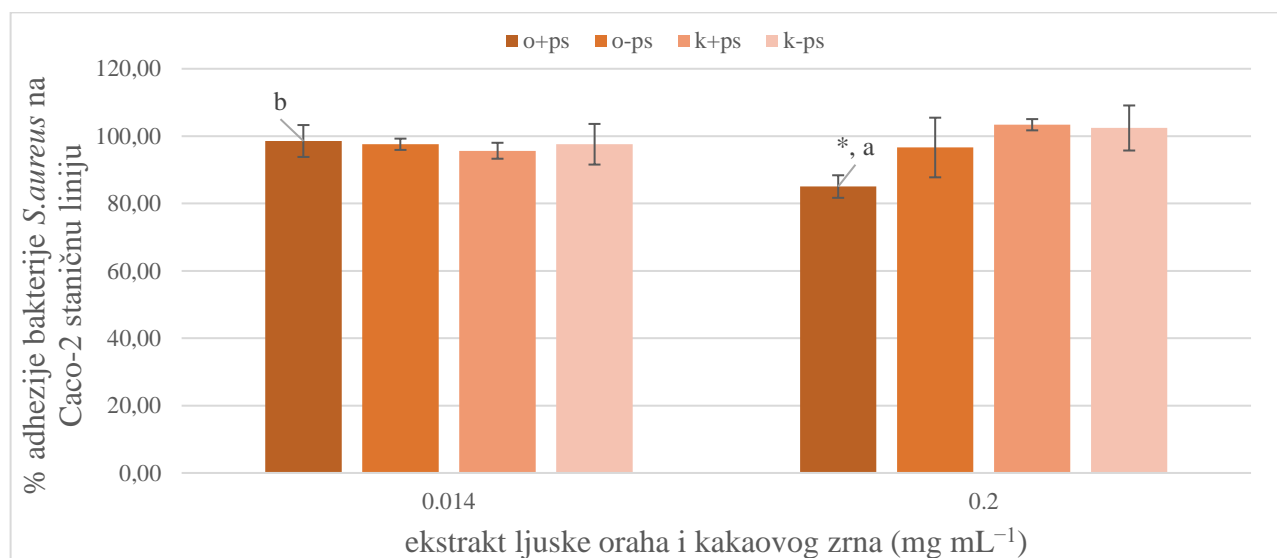
o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 29. Prikaz utjecaja ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterije *L. fermentum* na Caco-2 staničnu liniju

Iz rezultata je vidljivo da ekstrakti ljuske oraha bez polisaharida povećavaju, dok ekstrakti ljuske kakaovog zrna bez polisaharida smanjuju postotak adhezije bakterije *L. fermentum* na Caco-2 staničnu liniju. Ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima pri koncentraciji 0,014 mg mL⁻¹ povećava postotak adhezije, dok pri koncentraciji 0,2 mg mL⁻¹ smanjuje postotak adhezije bakterije *L. fermentum* na humane stanice. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima pri objema koncentracijama polifenola nemaju utjecaja na adheziju, ali se statistički značajno razlikuju s obzirom na uzorke bez polisaharida koji smanjuju postotak

adhezije bakterije *L. fermentum*. Corbet i Roberts (2009) zaključili su da polisaharidi mogu djelovati kao adhezini i tako povećavati adheziju na humane stanice, što je slučaj kod tretmana ekstraktom kakaovog zrna bez polisaharida drastično smanjuje adheziju bakterije *L. fermentum* na Caco-2 stanice, za razliku od uzorka sa polisaharidima (slika 29). Sveukupno gledano, istraživani ekstrakti značajno ne pospješuju adheziju bakterija *L. fermentum*.

Polifenolni spojevi imaju prebiotički učinak na probiotičke bakterije poput *L. fermentum*, naime oni imaju sposobnost utjecati na njihov rast i adheziju na stanice gastrointestinalnog trakta (Plamada i Cristian Vodnar, 2021).



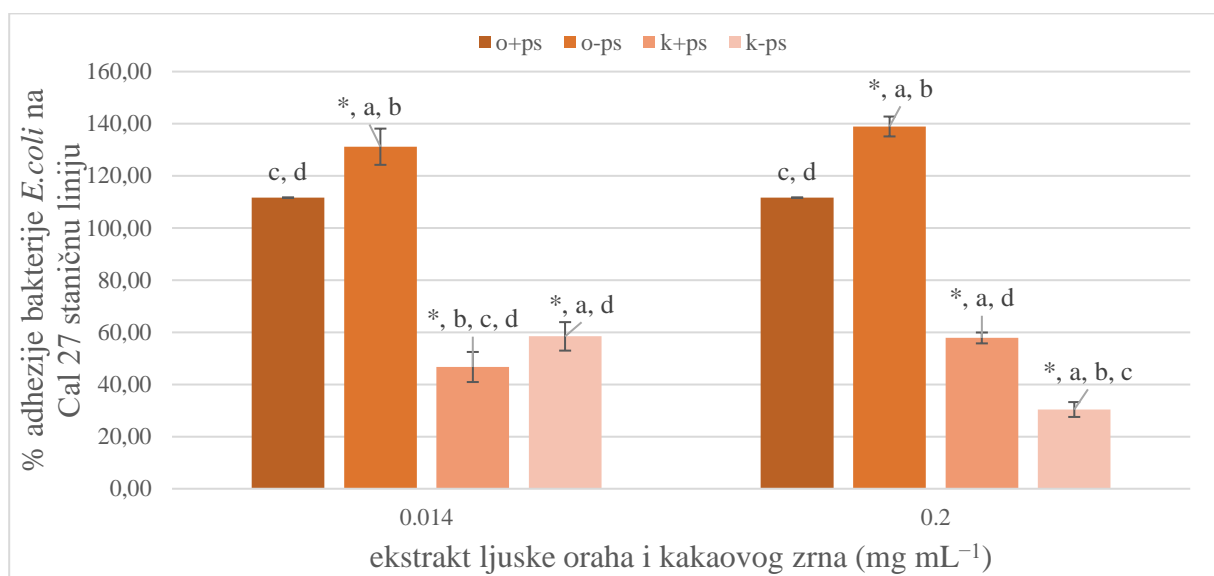
o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 30. Prikaz utjecaja ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterije *S. aureus* na Caco-2 staničnu liniju

Iz rezultata (slika 30) je vidljivo da ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna nemaju utjecaja na adheziju bakterije *S. aureus* na Caco-2 staničnu liniju. Iznimka je ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima koji pri koncentraciji polifenola 0,2 mg mL⁻¹ smanjuje postotak adhezije, te se statistički značajno razlikuje s identično tretiranim uzorkom s manjom koncentracijom polifenola u ekstraktu. Istraživani ekstrakti ne utječu na adheziju bakterije *S. aureus*.

Fenolne kiseline poput galne i elaginske kiseline te flavonoidi poput kvercetina i luteolina, koji su glavni polifenolni čimbenici ljuske oraha, snažni su inhibitori adhezije patogena *S. aureus* na humane stanice (Takó i sur., 2020).

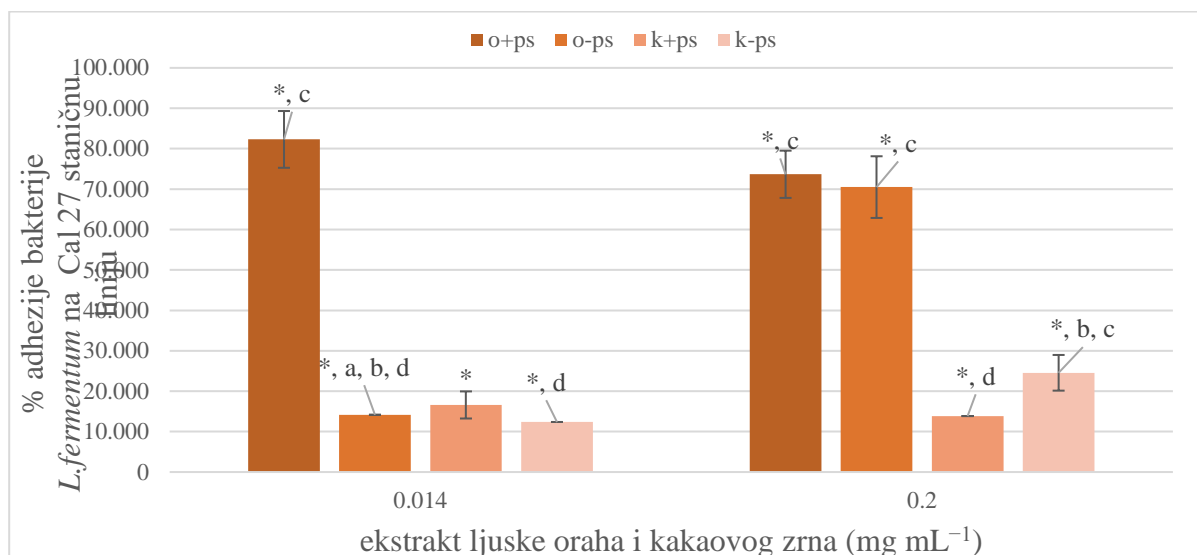
4.4.2 Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterijskih stanica na tumorske epitelne stanice jezika (Cal27)



o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 31. Prikaz utjecaja ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterije *E. coli* na Cal27 staničnu liniju

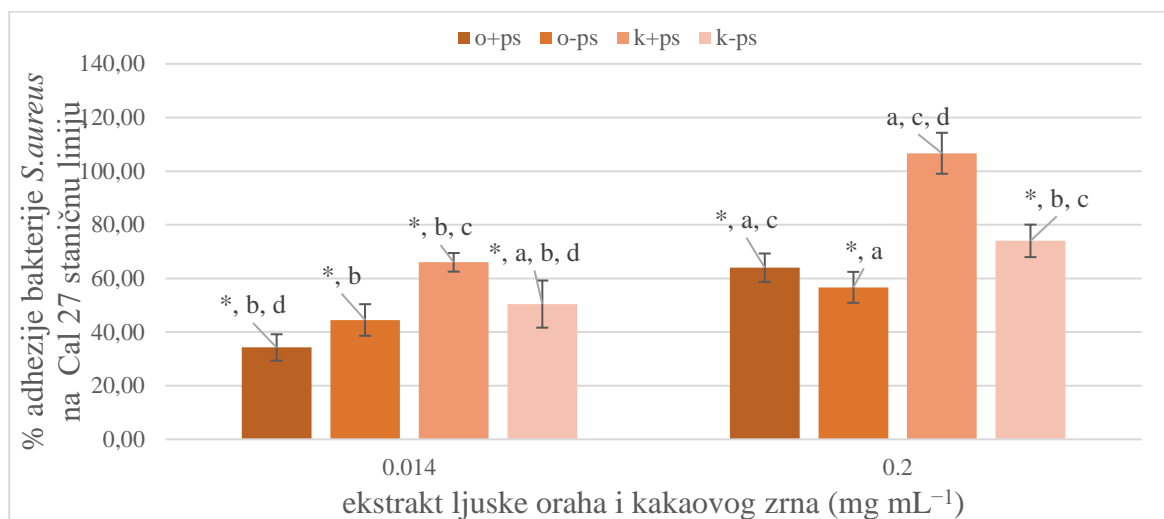
Iz slike 31 je vidljivo da ekstrakti ljuske kakaovog zrna sa i bez polisaharida djeluju na smanjenje postotka adhezije bakterije *E. coli* na Cal27 staničnu liniju. Ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima nema utjecaja na adheziju, a bez polisaharida povećava postotak adhezije bakterije *E. coli* na humane stanice. Općenito gledano, ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida pospješuje adheziju bakterije *E. coli* za epitel usne šupljine, dok ekstrakt ljuske kakaovog zrna, neovisno o koncentraciji i prisustvu polisaharida, značajno smanjuje vezanje ove bakterije za epitel usne šupljine.



o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 32. Prikaz utjecaja ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterije *L. fermentum* na Cal27 staničnu liniju

Ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna smanjuju postotak adhezije bakterije *L. fermentum* na Cal27 stanice (slika 32). Drastično smanjenje postotka adhezije vidljivo je u tretmanu s ekstraktom ljuske kakaovog zrna u objema koncentracijama polifenola, te u ekstraktu ljuske oraha bez polisaharida pri koncentraciji polifenola 0,014 mg mL⁻¹.



o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

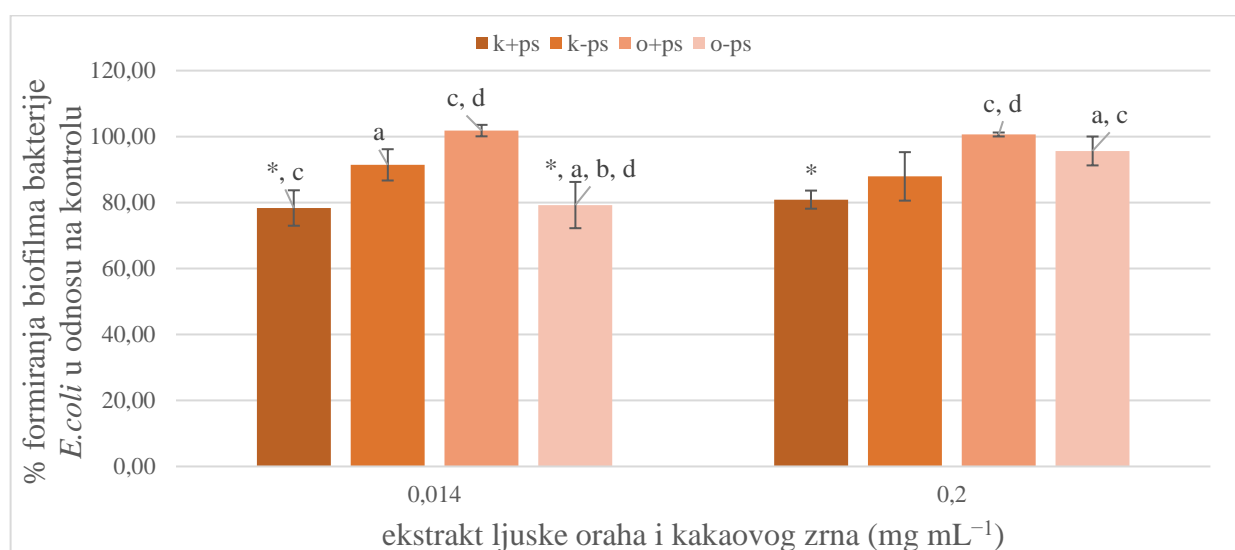
Slika 33. Prikaz utjecaja ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna na adheziju bakterije *S. aureus* na Cal27 staničnu liniju

Iz rezultata (slika 33) je vidljivo da ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna djeluju tako da smanjuju adheziju bakterije *S. aureus* na Cal27 staničnu liniju. Iznimka je djelovanje ekstrakta ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima koncentracije polifenola 0,2 mg mL⁻¹, gdje taj ekstrakt ne utječe na adheziju, dok pri nižoj koncentraciji ima utjecaj na smanjenje adhezije ove bakterije.

Mnogo proizvoda biljnog porijekla imaju anti-adhezivna svojstva prema kliničkim patogenima što ih čini poželjnim antimikrobnim sredstvima. Mnoge *in vitro* studije su dokazale da su upravo polifenoli glavne antimikrobne komponente biljnih ekstrakata, koje uzrokuju promjene adhezijskih svojstava patogenih bakterija te tako sprečavaju formiranje biofilma (Makarewicz i sur., 2021). Za adheziju bakterija na površinu humanih stanica, važna je specifična interakcija adhezin-receptor, pri čemu neka tvar da bi interferirala treba biti analogna ili adhezinu ili receptoru, npr. fenolne kiseline (klorogenska kiselina) imaju ulogu u regulaciji međustanične komunikacije te tako inhibira adheziju i stvaranje biofilma. Također, biljni ekstrakti obično pokazuju jače antimikrobno djelovanje od zasebnih bioaktivnih komponenata, radi kumulativnog učinka raznih antimikrobnih mehanizama u ekstraktima (Gato i sur, 2020).

4.5 UTJECAJ EKSTRAKATA LJUSKE ORAHA I KAKAOVOG ZRNA NA FORMIRANJE BAKTERIJSKOG BIOFILMA

Utjecaj ekstrakata ljuske oraha i kakaovog zrna sa i bez polisaharida na formiranje biofilma bakterija *E. coli*, *L. fermentum* i *S. aureus*, ispitivao se na način da su se prethodno navedene bakterije tretirale ekstraktima ljuske oraha i kakaovog zrna sa i bez polisaharida, s koncentracijama polifenola 0,014 i 0,2 mg mL⁻¹. Nakon inkubacije, dodana je kristal violet boja koja ima sposobnost vezanja na bakterije vezane u biofilmu. Dodavanjem octene kiseline, ta se boja oslobađa te je spektrofotometrijski moguće odrediti apsorbanciju, odnosno postotak nastanka bakterijskog biofilma. Rezultati su grafički prikazani na slikama 34-36.



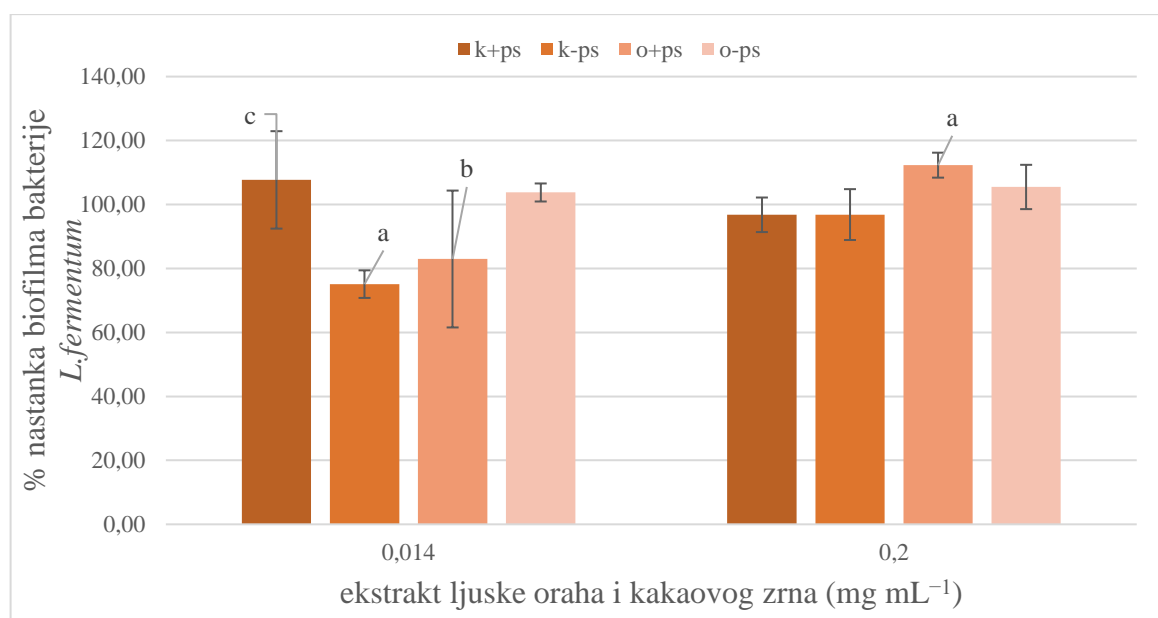
o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 34. Prikaz utjecaja ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na formiranje biofilma bakterije *E. coli*

Na slici 34 je prikazano kako ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima smanjuje postotak formiranja biofilma bakterije *E. coli*, za razliku od uzoraka bez polisaharida koji nemaju utjecaja na formaciju biofilma. Ekstrakt ljuske oraha nema utjecaja na formaciju biofilma ove bakterije, osim u uzorku bez polisaharida s koncentracijom polifenola 0,014 mg

mL^{-1} , gdje je vidljivo smanjenje formiranja biofilma bakterije *E. coli*.

Carraro i sur., (2014) proučavali su kako ekstrakti sekundarnih sirovina proizvodnje maslina, koji su bogati polifenolima, utječu na formaciju biofilma bakterije *E. coli*. Formiranje biofilma bakterije *E. coli* uključuje različite čimbenike kao što su fimbrije, egzopolisaharidi, kolanična kiselina, poli-N-acetil glukozamin, signalni proteini i molekule (indol, poliamin), a aktivacija njihove ekspresije ovisi o okolišu bakterijske stanice. Polifenoli iz ekstrakta imaju depresivni učinak na ekspresiju nekoliko gena uključenih u sintezi fimbrija i egzopolisaharida te remete membranski transportni sustav poliamina oštećujući staničnu stijenkku bakterije. Stoga, i rezultat njihova istraživanja je pokazao da polifenolima bogati spojevi utječu na smanjenje nastanka biofilma bakterije *E. coli*.

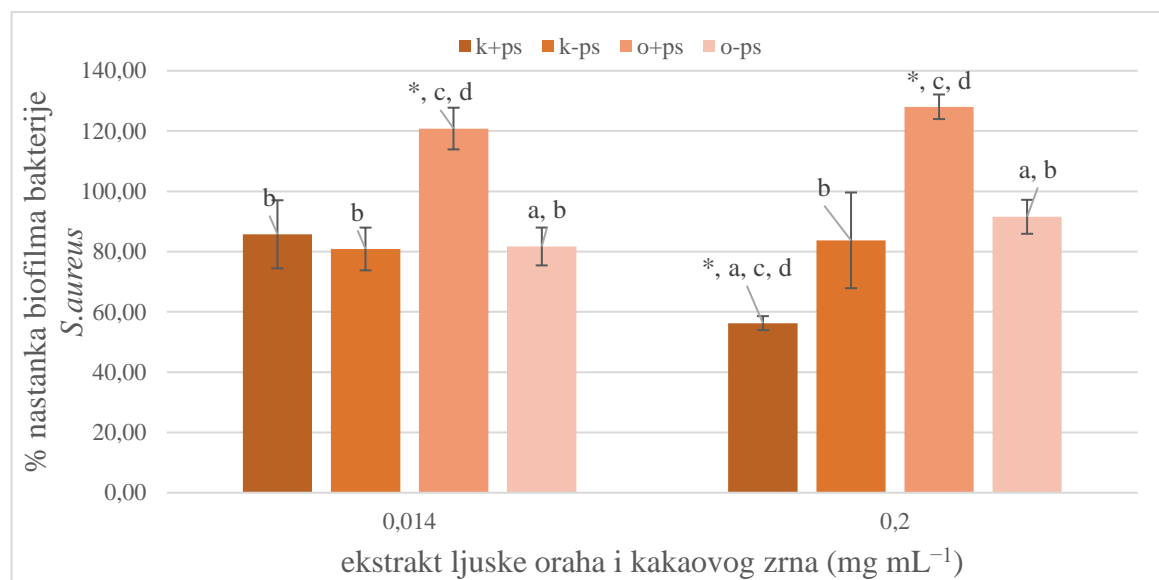


o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,014 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola 0,2 mg mL⁻¹ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 35. Prikaz utjecaja ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na formiranje biofilma bakterije *L. fermentum*

Iz rezultata (slika 35) se vidi da ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna nemaju utjecaja na formiranje biofilma bakterije *L. fermentum*. Statistički značajno se razlikuju rezultati

tretmana ekstraktom ljuske kakaovog zrna bez polisaharida u odnosu na koncentraciju polifenola u ekstraktu. Naime, manja koncentracija polifenola pokazuje manji postotak nastanka biofilma bakterije *L. fermentum* za 20-ak posto, od bakterija tretiranih ekstraktom koncentracije polifenola $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$.



o+ps – ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima; o-ps – ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida; k+ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima; k-ps – ekstrakt ljuske kakaovog zrna bez polisaharida; * - statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu; a – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ u ekstraktu sa polisaharidima; b – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ u ekstraktu sa polisaharidima; c – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola $0,014 \text{ mg mL}^{-1}$ u ekstraktu bez polisaharida; d – statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju polifenola $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ u ekstraktu bez polisaharida

Slika 36. Prikaz utjecaja ekstrakta ljuske oraha i kakaovog zrna na formiranje biofilma bakterije *S. aureus*

Iz slike 36 je vidljivo da ekstrakti ljuske oraha sa polisaharidima pri objema koncentracijama polifenola povećavaju postotak formiranja biofilma bakterije *S. aureus*, dok u uzorcima bez polisaharida nemaju utjecaja na njegov nastanak. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna nemaju utjecaja na formiranje biofilma ove bakterije, osim u uzroku bez polisaharida koncentracije $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, kada ima utjecaj na prilično smanjenje postotka formiranja biofilma bakterije *S. aureus*.

Da pri većoj koncentraciji polifenola u ekstraktu ljuske kakaovog zrna dolazi do značajnijeg smanjenja postotka nastanka bakterijskog biofilma, potvrdilo je i istraživanje Yuanita i sur. (2017). Flavon iz ekstrakta ljuske kakaovog zrna djeluje kao inhibitor stvaranja

biofilma bakterije *E. faecalis* tako što ometa interakciju između acil-homoserin laktona i njegovog receptora. Acil-homoserin lakton je signalna molekula koju koriste Gram-pozitivne bakterije, poput *S. aureus*, za međusobnu komunikaciju (engl. *Quorum sensing*).

Tretman ekstraktom ljuske oraha sa polisaharidima, iz rezultata, vidljiv je značajan porast postotka nastanka biofilma bakterije *S. aureus*, za razliku uzorka tretiranog ekstraktom ljuske oraha bez polisaharida. Li i sur. (2021) svojim su istraživanjem dokazali da dodatak biljnih polisaharida potiče formiranje biofilma Gram-pozitivne bakterije *B. thuringiensis*, jer služe kao početni izvor ugljika za stvaranje ekstracelularnog matriksa sojeva i indukciju stvaranja biofilma.

5 ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog eksperimentalnog rada i dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. Dnevno preporučene koncentracije ekstrakta ljuske oraha pokazuju toksični učinak na stanice adenokarcinoma debelog crijeva neovisno o prisustvu polisaharida. Polisaharidi prisutni u ekstraktu ljuske kakaovog zrna povećavaju toksičnost ekstrakta na stanice adenokarcinoma debelog crijeva.
2. Oba ekstrakta su pokazala antioksidacijski učinak na staničnu liniju Caco-2. Prisustvo polisaharida i dulje vrijeme izlaganja su pospješili antioksidacijsko djelovanje ekstrakata na stanice Caco-2.
3. Ekstrakti ljuske oraha i kakaovog zrna pokazuju antimikrobni učinak na bakteriju *S. aureus*.
4. Ekstrakti ljuske oraha sa polisaharidima povećavaju postotak adhezije bakterije *E. coli*, također ekstrakti ljuske oraha povećavaju postotak adhezije bakterije *L. fermentum* na Caco-2 staničnu liniju. Ekstrakti ljuske kakaovog zrna bez polisaharida smanjuju adheziju *L. fermentum* za epitel Caco-2 stanica.
5. Ekstrakt ljuske oraha bez polisaharida pospješuje adheziju bakterije *E. coli* za epitel usne šupljine, dok ekstrakt ljuske kakaovog zrna, neovisno o koncentraciji i prisustvu polisaharida, značajno smanjuje vezanje ove bakterije za epitel usne šupljine.
6. Oba istraživana ekstrakta smanjuju postotak adhezije bakterije *L. fermentum* i *S. aureus* za epitel Cal27 stanica.
7. Ekstrakt ljuske oraha sa polisaharidima povećava formiranje biofilma bakterije *S. aureus*, dok ekstrakt ljuske kakaovog zrna sa polisaharidima smanjuje postotak formiranja biofilma bakterije *E. coli*.

6 LITERATURA

Anton R, Barlow S, Boskou D, Castle L, Crebelli R, Dekant W, i sur. (2004) Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission related to para hydroxybenzoates (E 214-219). *The EFSA Journal* **83**, 1-26. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.83de>

Baharum Z, Akim AM, Hin Taufiq-Yap Y, Hamid RA, Kasran R (2014) molecules In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of Theobroma cacao. *Molecules* **19**, 18317–18331. <https://doi.org/10.3390/molecules191118317>

Barbosa-Pereira L, Belviso S, Ferrocino I, Rojo-Poveda O, Zeppa G (2021) Characterization and Classification of Cocoa Bean Shells from Different Regions of Venezuela Using HPLC-PDA-MS/MS and Spectrophotometric Techniques Coupled to Chemometric Analysis Characterization and Classification of Cocoa Bean Shells from Different Regions of Venezuela Using HPLC-PDA-MS/MS and Spectrophotometric Techniques. <https://doi.org/10.3390/foods10081791>

Barbosa-Pereira L, Guglielmetti A, Zeppa G (2018) Pulsed electric field assisted extraction of bioactive compounds from cocoa bean shell and coffee silverskin. *Food Bioproc. Tech* **11**, 818 – 835. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2045-6>

Bayir H (2005) Reactive oxygen species. *Critical care medicine* **33**, 498-501. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000186787.64500.12>

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA (2007) Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology, 24. izd., McGraw-Hill Professional, str. 197-233.

Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M (2011) A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry* **11**, 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>

Carraro L, Fasolato L, Montemurro F, Martino ME, Balzan S, Servili M, i sur. (2014)

Polyphenols from olive mill waste affect biofilm formation and motility in *Escherichia coli* K-12. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12119>

Chen W, Feng L, Shen Y, Su H, Li Y, Zhuang J, i sur. (2013) Myricitrin inhibits acrylamide-mediated cytotoxicity in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress. *BioMed research international* **2013**, 724-183. <https://doi.org/10.1155/2013/724183>

Cheng ZY, Yao GD, Guo R, Huang XX, Song SJ (2017) Phenylpropanoids from *Juglans mandshurica* exhibit cytotoxicities on liver cancer cell lines through apoptosis induction. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **27**, 597–601. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.005>

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology* **66**, 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>

Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J (2018) The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in nutrition* **5**, 87. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>

Dermibas A (2005) Estimating of Structural Composition of Wood and Non-Wood Biomass Samples. *Energy Sources* **8**, 761-767. <https://doi.org/10.1080/00908310490450971>

Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galindo S. (2012) Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr Polym.* **87**, 951- 962.

D'Angelo S, Martino E, Ilisso CP, Bagarolo ML, Porcelli M, Cacciapuoti G. (2017) Pro-oxidant and pro-apoptotic activity of polyphenol extract from Annurca apple and its underlying mechanisms in human breast cancer cells. *International journal of oncology* **51**, 939–948. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4088>

Durgo K, Vuković L, Rusak G, Osmak M, Franekić Čolić J (2007) Utjecaj flavonoida na razinu glutationa, peroksidaciju lipida i ekspresiju citokroma P450 CYP1A1 u staničnim linijama karcinoma grkljana. *Food Technology and Biotechnology* **45**, 69-79.

<https://hrcak.srce.hr/30439>

Egea G, Jiménez-Altayó F, Campuzano V (2020) Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathogenesis and Progression of Genetic Diseases of the Connective Tissue. *Antioxidants* **9**, 1013. <https://doi.org/10.3390/antiox9101013>

Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in molecular biology* **594**, 57–72. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4

Etienne-Selloum N, Dandache I, Sharif T, Auger C, Schini-Kerth VB (2013) Polyphenolic compounds targeting p53-family tumor suppressors: Current progress and challenges, 1. izd., IntechOpen, London, str. 129–167.

Falah F, Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Moradi S, Mortazavi SA i sur. (2019) Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microbial pathogenesis* **131**, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.006>

Galanakis CM (2017) Nutraceutical and Functional Food Components Effects of Innovative Processing Techniques, 1. izd., Academic Press, str. 1-14.

Gan RY, Mavumengwana V, Abdel-Massih RM, Othman L, Sleiman A (2019) Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Front Microbiol* **1**, 911. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00911>

Gašaj A (2020) Utjecaj okolišnih faktora na stvaranje biofilma legionela u morskoj vodi (diplomski rad), Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.

Goldoni L (1998) Tehnologija konditorskih proizvoda, I dio Kakao proizvodi i proizvodi slični čokoladi, 1. izd., Nakladnik, Zagreb.

Grandjean P (2015) Toxicology research for precautionary decision-making and the role of Human & Experimental Toxicology. *Human & experimental toxicology* **34**, 1231–1237. <https://doi.org/10.1177/0960327115601762>

Grbavac M (2017) Sinergijski antioksidacijski učinak flavan-3-ola (završni rad), Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

HAH (2018) Hrvatska agencija za hranu, Biološke opasnosti u hrani. <https://www.hah.hr/potrosacki-kutak/bioloske-opasnosti-u-hrani/> Pristupljeno 31. svibnja 2022.

Heinemann C, van Hylckama Vlieg JE, Janssen DB, Busscher HJ, van der Mei HC, Reid G (2000) Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS microbiology letters* **190**, 177–180. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09282.x>

Hurst WJ, Stanley B, Glinski JA, Davey M, Payne MJ, Stuart DA (2009) Characterization of primary standards for use in the HPLC analysis of the procyanidin content of cocoa and chocolate containing products. *Molecules* **14**, 4136–4146. <https://doi.org/10.3390/molecules14104136>

Ilić J (2009) Patogenost bakterija iz roda *Staphylococcus* (završni rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Jahanban-Esfahlan A, Amarowicz R (2018) Walnut (*Juglans regia* L.) shell pyroligneous acid: chemical constituents and functional applications. *RSC Adv* **8**, 22376 –22391. <https://doi.org/10.1039/C8RA03684E>

Jalil AM, Ismail A (2008) Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health?. *Molecules* **13**, 2190–2219. <https://doi.org/10.3390/molecules13092190>

Jang J, Hur HG, Sadowsky, MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of applied microbiology* **123**, 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>

Johnson JR, Stell AL (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of infectious diseases* **181**, 261–272. <https://doi.org/10.1086/315217>

Karamać M, Kosinska A, Pegg RB (2006) Content of Gallic acid in selected plant extracts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **56**, 55-58.

Kazazić, PS (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**, 279-290. <https://hrcaj.srce.hr/257>

Kim, H., Xue, X. (2020) Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *J Vis Exp* **160**, 1-2. <https://www.jove.com/t/60682>

Li M, Shu C, Ke W, Li X, Yu Y, Guan X, i sur. (2021) Plant Polysaccharides Modulate Biofilm Formation and Insecticidal Activities of *Bacillus thuringiensis* Strains. *Front Microbiol* **12**, 2-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676146>

Luna-Guevara ML, Luna-Guevara JJ, Hernandez-Carranza P, Ruiz-Espinosa H, Ochoa-Velasco CE (2018) Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. *Studies in Natural Products Chemistry* **59**, 79 – 108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7>

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

Mohanta B, Sen DJ, Mahanti B, Nayak AK (2022) Antioxidant potential of herbal polysaccharides: An overview on recent researches. *Sensors Int* **3**, 100-158. <https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2022.100158>

Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM (2016) Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules* **21**, 974. <https://doi.org/10.3390/molecules21080974>

Naghmouchi K, Belguesmia Y, Bendali F, Spano G, Seal BS, Drider D (2020) *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical reviews in food science and nutrition* **60**, 3387–3399. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688250>

Navarro M, Zamora W, Quesada S, Azofeifa G, Alvarado D, Monagas M (2017) Fractioning of Proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa*. Composition and Structure-Bioactivity Relationship. *Antioxidants* **6**, 60. <https://doi.org/10.3390/antiox6030060>

NCBI (2022) Eriodictiol. NCBI-Nacional Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eriodictiol>. Pristupljeno 14. srpnja 2022.

Neyestani TR, Khalaji N, Gharavi A (2007) Selective microbiologic effects of tea extract on certain antibiotics against *Escherichia coli* in vitro. *J Altern Complement Med* **13**, 1119–1124. <https://doi.org/10.1089/acm.2007.7033>

Nsor-Atindana J, Zhong F, Mothibe KJ, Bangoura ML, Lagnika C (2012) Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) Bean Shells. *Pak. J. Nutr* **11**, 672 - 677. <https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2012.672.677>

Okiyama DCG, Navarro SLB, Rodrigues CEC (2017) Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends Food Sci. Technol* **63**, 103 - 112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.007>

Okafor J, Rautenbauch F, Meyer M, Le Roes-Hill M, Harris T, Jideani VA (2021) Phenolic content, antioxidant, cytotoxic and antiproliferative effects of fractions of *Vigna subterraenea* (L.) verde from Mpumalanga. *Heliyon* **7**, 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08397>

Olthof MR, Hollman PC, Katan MB (2000) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of nutrition.* **131**, 66-71. <https://doi.org/10.1093/jn/131.1.66>

O'Toole GA (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments* **47**, 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>

Ou S, Kwok KC (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**,1261–1269.<https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>

Pizarro-Cerdá J, Cossart P (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**, 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>

Plamada D, Cristian Vodnar D (2021) Polyphenols-Gut Microbiota Interrelationship: A Transition to a New Generation of Prebiotics. *Nutrients* **14**, 137. <https://doi.org/10.3390/nu14010137>

Proft T, Baker EN (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cellular and molecular life sciences* **66**, 613–635. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8477-4>

Queiros C, Cardoso S, Lourenco A, Ferreira J, Miranda I, Lourenço M i sur. (2019) Characterization of walnut, almond, and pine nut shells regarding chemical composition and extract composition. *Biomass Convers. Bior.* **10**, 175 - 188.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s13399-019-00424-2>

Rajneesh, Pathak J, Chatterjee A, Singh SP, Sinha RP (2017) Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). *Bio-protocol* **7**, 25-45.

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2545>

Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F, Firuzi O (2013) Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry* **20**, 4436-4450. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990141>

Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125-1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2006) Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments, 2. izd., Wiley.

Robina A, Jurina K, Kozáčinski L (2018) Nalaz bakterije Escherichia coli u mesnim pripravcima. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu* **20**, 396-399.

<https://doi.org/10.31727/m.20.5.4>

Rodak K, Kokot I, Kratz EM (2021) Caffeine as a Factor Influencing the Functioning of the Human Body-Friend or Foe? *Nutrients* **13**, 3088. <https://doi.org/10.3390/nu13093088>

Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Zeppa G, Stevigny C (2020) Cocoa Bean ShellA By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential. *Nutrients* **12**, 1123 - 1152. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>

Tsao R (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>

Sampeck KE (2020) Cacao biology: chocolate a superfood. <https://revista.drclas.harvard.edu/book/cacao-biology-chocolate-superfood-0>. Pristupljeno 13. srpnja 2022.

Sheng F, Hu B, Jin Q, Wang J, Wu C, Luo Z (2021) The Analysis of Phenolic Compounds in Walnut Husk and Pellicle by UPLC-Q-Orbitrap HRMS and HPLC. *Molecules* **26**, 3013. <https://doi.org/10.3390/molecules26103013>

Shirahigue LD, Ceccato-Antonini SR (2020) Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. *Cienc. Rural* **50**, 1 - 18. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190857>

Shil A, Chichger H (2021) Artificial Sweeteners Negatively Regulate Pathogenic Characteristics of Two Model Gut Bacteria, E. coli and E. faecalis. *International journal of molecular sciences* **22**, 5228. <https://doi.org/10.3390/ijms22105228>

Song YJ, Yu HH, Kim YJ, Lee NK, Paik HD (2019) Anti-Biofilm Activity of Grapefruit Seed Extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of microbiology and biotechnology* **29**, 1177–1183. <https://doi.org/10.1041/jmb.1905.05022>

Suriyaprom, S., Mosoni, P., Leroy, S., Kaewkod, T., Desvaux, M., Tragoolpua, Y. (2022) Antioxidants of Fruit Extracts as Antimicrobial Agents against Pathogenic Bacteria. *Antioxidants* **11**, 602. <https://doi.org/10.3390/antiox11030602>

Tajz L (2015) Osnovni parametri uzgoja i rasta mikroorganizama (završni rad) Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Osijeku, Osijek.

Taleb H, Maddocks SE, Morris RK, Kanekanian, AD (2016) The Antibacterial Activity of Date Syrup Polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. *Frontiers in microbiology* **7**, 198. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00198>

Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, Rappuoli R, Grandi G (2006) Pili in gram-positive pathogens. *Nature reviews. Microbiology* **4**, 509–519. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1443>

Timbrell, J (2002) Introduction to Toxicology, 3.Izd., Taylor & Francis, London, str.163-179.

Topić N, Cenov A, Jozić S, Glad M, Mance D, Lušić D, Vukić Lušić D (2021) Staphylococcus aureus—An Additional Parameter of Bathing Water Quality for Crowded Urban Beaches. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **18**, 5234. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105234>

Traba C, Liang JF (2011) Susceptibility of Staphylococcus aureus biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling* **27**, 763–772. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.602188>

Tran TN, Bayer IS, Heredia-Guerrero JA, Frugone M, Lagomarsino M, Maggio F, Athanassiou A (2017) Cocoa Shell Waste Biofilaments for 3D Printing Applications. *Macromolecular Materials and Engineering* **302**, 170 - 180. <https://doi.org/10.1002/mame.201700219>

Türi M, Türi E, Kõljalg S, Mikelsaar M (1997) Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of Escherichia coli strains of different origin. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **105**, 956–962.

Vesterlund S, Karp M, Salminen S, Ouwehand AC (2006) Staphylococcus aureus adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology* **152**, 1819–1826. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28522-0>

Visioli F, Panaite S, Tomé Carneiro J (2020) Wine's Phenolic Compounds and Health:

A Pythagorean View. *Molecules* **25**, 3. <https://doi.org/10.3390/molecules25184105>

Vraneš J, Leskovar V (2009) Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija // *Medicinski glasnik Ljekarske komore Zeni?-dobojskog kantona* **6**, 147-165.

Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA (2002) Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate medical journal* **78** 216-224. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.918.216>

Wu H, Xi H, Lai F, Ma J, Chen W, Liu H (2019) Cellular antioxidant activity and Caco-2 cell uptake characteristics of flavone extracts from *Labisia pumila*. *Food Science Technology* **54**, 536-549. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13968>

Yuanita T, Putri DV, Rukmo M, Zubaidah N, Wahjuningrum AD, Kunarti S (2017) Antibiofilm Power of Cocoa Bean Pod Husk Extract (Theobroma Cacao) Against Enterococcus Faecalis Bacteria (In Vitro). U: International Medical Device and Technology Conference, 129-131.

Zhang S, Gai Z, Gui T, Chen J, Chen Q, Li Y (2021) Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde: Old Wine in a New Bottle. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2021**, 2-11. <https://doi.org/10.1155/2021/6139308>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis