

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ivona Karaula i Emma Karolina Vasung

Inovativni pristupi u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka: racionalnim dizajnom do visokovrijednih ekstrakata brokule u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marine Cvjetko Bubalo te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Biološki aktivni spojevi u biljkama	1
1.1.1. Definicija i podjela sekundarnih metabolita.....	1
1.1.1.1. Polifenoli	4
1.1.1.2. Glukozinolati	5
1.1.2. Brokula kao izvor biološki aktivnih spojeva.....	7
1.1.3. Tradicionalni i suvremeni pristupi u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva.....	9
1.2. Zelena otapala	11
1.2.1. Zelena otapala u kontekstu zelene kemije	12
1.2.2. Tipovi zelenih otapala	13
1.2.3. Niskotemperaturna eutektička otapala	15
1.2.4. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala i njihova primjena u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka.....	18
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	20
2.1. Opći i specifični ciljevi	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Materijali	21
3.1.1. Uzorci brokule.....	21
3.1.2. Kemikalije	21
3.1.3. Otopine i puferi	22
3.1.4. Stanične linije.....	24
3.1.5. Oprema i uređaji	24
3.2. Metode	25
3.2.1. Računalno predviđanje topljivosti polifenola i glukozinolata u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.....	25
3.2.2. Priprema i karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala	28
3.2.2.1. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	28
3.2.2.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	28
3.2.3. Ekstrakcija polifenola i glukozinolata iz brokule	29
3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom.....	29
3.2.5. Praćenje stabilnosti polifenola.....	31
3.2.6. Određivanje pojedinačnih alifatskih i indolnih glukozinolata	31
3.2.6.1. Ekstrakcija ukupnih glukozinolata iz brokule	31

3.2.6.2. Desulfatacija pripremljenih ekstrakata pomoću enzima sulfataze	31
3.2.6.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti desulfoglukozinolata.....	32
3.2.7. Praćenje stabilnosti alifatskih i indolnih glukozinolata.....	33
3.2.8. Određivanje antioksidativnog kapaciteta primjenom ORAC metode.....	33
3.2.9. Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata brokule na staničnim linijama HaCaT i HeLa	34
3.2.9.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	35
3.2.9.2. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom	35
3.2.10. Statistička obrada podataka.....	36
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	37
4.1. Računalni probir prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ekstrakciju polifenola i glukozinolata	38
4.2. Priprema i karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	44
4.3. Priprema i karakterizacija ekstrakata brokule primjenom prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	45
4.3.1. Sadržaj i stabilnost polifenola.....	46
4.3.2. Sadržaj i stabilnost glukozinolata	48
4.3.3. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata.....	52
4.3.4. Učinak ekstrakta brokule u B:Glc _{1:1} na proliferaciju humanih stanica	53
4.4. Procjena održivosti postupka pripreme ekstrakta brokule primjenom prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala	54
5. ZAKLJUČCI.....	62
6. LITERATURA	32
7. Sažetak	72
8. Summary.....	73

1. UVOD

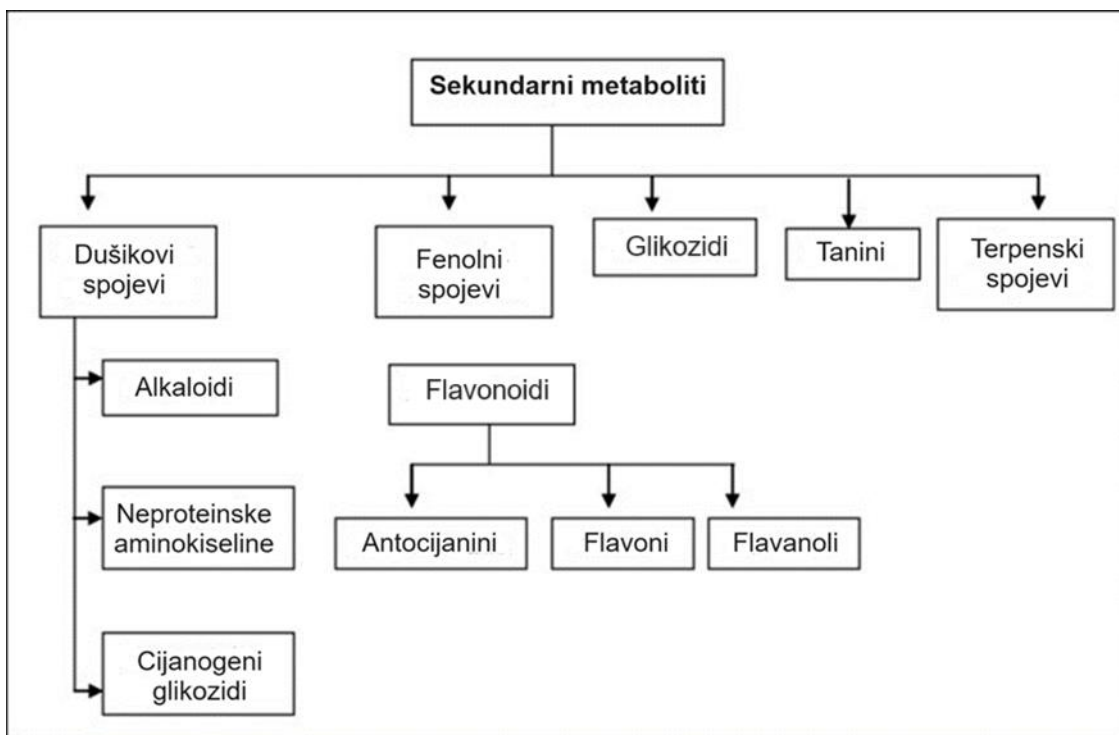
1.1 Biološki aktivni spojevi u biljkama

Značaj biljaka u ljudskoj prehrani i liječenju različitih stanja i bolesti prepoznat je još od antičkih vremena, no tek su tijekom 20. i 21. stoljeća, kroz brojna istraživanja, identificirani različiti biološki aktivni spojevi u biljkama uz potvrdu brojnih zdravstvenih blagodati. Širok raspon bioloških aktivnosti ovih komponenti uključuje antioksidativno, antimikrobno, antikancerogeno i protuupalno djelovanje, ali i brojna druga. Danas se biološki aktivni spojevi, u obliku biljnih ekstrakata odnosno čistih spojeva dobivenih sintetskim ili polusintetskim postupcima, široko primjenjuju u prehrambenoj, farmaceutskoj te brojnim drugim industrijama (Azmir i sur., 2013). Ekstrakcija vodom ili organskim otapalima najčešće je prvi korak u izolaciji biološki aktivnih spojeva kojim se postiže njihovo koncentriranje i odvajanje od balastnih tvari, a u novije vrijeme sve se više istražuju postupci koji uključuju primjenu alternativnih izvora energije odnosno inovativnih zelenih otapala (Kyriakoudi i sur., 2024).

1.1.1. Definicija i podjela sekundarnih metabolita

Biološki aktivni spojevi u biljkama mogu se definirati kao sekundarni metaboliti koji izazivaju farmakološke ili toksikološke učinke kod ljudi i životinja, a njihova kemijska priroda i sastav variraju među biljnim vrstama. Sekundarni metaboliti proizvodi su tzv. sporednih metaboličkih puteva u biljkama te nisu izravno uključeni u osnovne životne procese, poput rasta, razvoja i razmnožavanja. Iako nisu ključne za osnovne fiziološke funkcije, od iznimne su važnosti za preživljavanje biljaka, uključujući zaštitu od nametnika, otpornost na bolesti, privlačenje kukaca te za oplodnju ili signalizaciju. Primjerice, flavonoidi štite biljku od slobodnih radikala nastalih tijekom fotosinteze, hlapljivi terpenoidi proizvode mirise koji privlače kukce oprašivače, a za alkaloida je poznato da odbijaju napade insekata (fitoaleksini). Za neke je skupine sekundarnih metabolita dokazano i da djeluju kao ključne molekule u staničnoj signalizaciji (Twajj i Hasan, 2022). Sposobnost proizvodnje ovakvih spojeva karakteristična je za većinu biljaka, uključujući i biljke za prehranu ljudi i životinja, a na njihov sadržaj u biljkama utječu genetički, okolišni i agronomski čimbenici (Neugart i sur., 2018).

Bioaktivni spojevi u biljkama klasificiraju se prema različitim kriterijima. Uobičajeno, sekundarni metaboliti klasificiraju se prema kemijskoj strukturi u pet velikih skupina: dušikovi spojevi, fenolni spojevi, glikozidi, tanini i terpeni spojevi (Slika 1).



Slika 1. Klasifikacija sekundarnih biljnih metabolita (prema Das i Gezici, 2018)

Dušikovi spojevi uključuju alkaloide, neproteinske aminokiseline i cijanogene glikozide. Alkaloidi, derivati aminokiselina, heterociklički su spojevi ugljika koji sadrže najmanje jedan atom dušika unutar ili izvan prstena. Upotreba biljaka koje sadrže alkaloide kao boja, začina, lijekova ili otrova datira gotovo do početka civilizacije, a poznati su po svom karakterističnom gorkom okusu (Jain i sur., 2019). Različite skupine alkaloida karakterizira širok spektar djelovanja. Tropanski alkaloidi imaju antikolinergičku aktivnost (antagonisti su muskarinskih receptora) i koriste se za smanjenje grčeva glatkih mišića, hipersekrecije i bola. Visoke koncentracije pronađene su u biljnim porodicama *Solanaceae* i *Erythroxylaceae* (Kohnen-Johannsen i Kayser, 2019). Izokinolinski alkaloidi su izuzetno velika skupina alkaloida koja se većinom javlja u višim biljkama, poput biljaka iz porodica *Papaveraceae* i *Berberidaceae*, a njihovi najznačajniji učinci su ublažavanje boli te inhibicija rasta tumorskih, kao i bakterijskih stanica (Dey i sur., 2020). Nadalje, pirozolidinske alkaloidne karakterizira hepatotoksičnost nakon bioaktivacije, a posebno su prisutni u porodici *Asteraceae*, dok su metilksantinski alkaloidi, prisutni u biljkama *Coffea arabica* (kava) i *Theobroma cacao* (kakao), značajni po tome što se u različitom stupnju vežu na adenzinske receptore i izazivaju neurološke učinke kod ljudi i životinja (Karuppagounder i sur., 2021). Pseudoalkaloidi nisu derivati aminokiselina, no poput pravih alkaloida sadrže heterociklički prsten s dušikom te pokazuju slična kemijska svojstva. Neke skupine pseudoalkaloida dokazano djeluju na središnji živčani sustav te prijenos iona i rad srca, a pronađeni su u raznolikim biljnim vrstama, uključujući primjerice one iz porodice *Solanaceae* (Chowanski i sur., 2016). Biljni proteini i peptidi vrlo su značajni u

prehrani ljudi i životinja. Posebno su važni bioaktivni biljni proteini i peptidi, koji obično nisu hidrolizirani u probavnom traktu. Mnogi od njih se u svom početnom obliku apsorbiraju i ostvaruju specifično djelovanje u organizmu. Ovakve proteine i peptide posebno proizvode biljke iz porodice *Euphorbiaceae*. Nепroteinske aminokiseline predstavljaju rezervoar organskog dušika u biljkama. Osim toga, igraju važne uloge u signalizaciji te u odgovoru na stres (Vranova i sur., 2011).

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji sadrže fenolnu skupinu, odnosno benzenski prsten s najmanje jednom hidroksilnom (-OH) skupinom. Najrašireniju skupinu fenolnih spojeva čine flavonoidi. Flavonoidi su fenolni spojevi koji se sastoje od dva fenilna prstena s jednim ili više hidroksilnih supstituenata. Proantocijanidini su oligomeri flavonoida te se zajedno s njima mogu pojavljivati kao glikozidi. Fenolne grupe ovih spojeva uključene su u opći antioksidativni učinak, a drugi učinci mogu biti različiti. Primjerice, neke strukture karakteristične su za smanjenje upale ili prevenciju raka. Flavonoidi i proantocijanidini pojavljuju se u velikom broju biljnih porodica kao prirodni pigmenti. Polifenoli su prirodni spojevi široko rasprostranjeni u raznim biljnim vrstama, a njihova kemijska struktura uključuje najmanje dva fenilna prstena s jednim ili više hidroksilnih supstituenata. Ova složena struktura omogućava polifenolima da djeluju kao snažni antioksidansi, što je od velike važnosti za zaštitu biljaka od oksidativnog stresa. Osim toga, dokazani su i njihovi brojni pozitivni učinci na ljudsko zdravlje (Fraga i sur., 2019).

Glikozidi su spojevi koji se sastoje od različitih vrsta sekundarnih metabolita povezanih s mono- ili oligosaharidom ili s uronskom kiselinom. Dio koji čini saharid ili uronska kiselina naziva se glikon ili šećerni dio, a drugi dio aglikon ili nešećerni dio. Glikonski i aglikonski dio povezani su glikozidnom vezom. Za glikozide je najčešće karakteristična hidroliza u debelom crijevu čovjeka. Glavne skupine glikozida su srčani glikozidi, cijanogeni glikozidi, glukozinolati, saponini i antrakinonski glikozidi. Srčani glikozidi su spojevi za čije je aglikone karakteristična steroidna struktura. Djeluju inhibirajući Na^+/K^+ -ATP-azne pumpe (Schneider i sur., 2017), što rezultira povećanom kontraktilnošću srca te smanjenom frekvencijom otkucaja. Srčani glikozidi prisutni su u biljnim porodicama *Scrophulariaceae* te *Convallariaceae*. Cijanogeni glikozidi se sastoje od aglikona tipa α -hidroksinitrila i šećernog dijela (najčešće D-glukoze). Zbog cijanidne skupine koju sadrže (-CN), najčešće ih se ne svrstava među uobičajene glikozide. Umjesto toga, pripadaju skupini dušikovih spojeva u biljkama, a karakteristični su po oslobađanju toksičnog vodikovog cijanida koji u visokim dozama može biti smrtonosan. Ovi spojevi posebno su prisutni u vrstama porodice *Rosaceae* (Vetter, 2000). Saponini, glikozidi široko rasprostranjeni u carstvu biljaka, uključuju raznoliku skupinu spojeva karakteriziranih strukturom koja sadrži steroidni ili triterpenoidni aglikon i jedan ili više šećernih lanaca. Saponinski glikozidi su velike molekule s hidrofilnim glikonom i hidrofobnim aglikonom, što im daje emulgirajuća svojstva te se mogu koristiti kao deterdženti, a pokazuju i imunomodulirajuće

te antineoplastične učinke. Prisutni su u različitim biljnim porodicama, među kojima se može istaknuti *Liliaceae* (Özlem i Mazza, 2007).

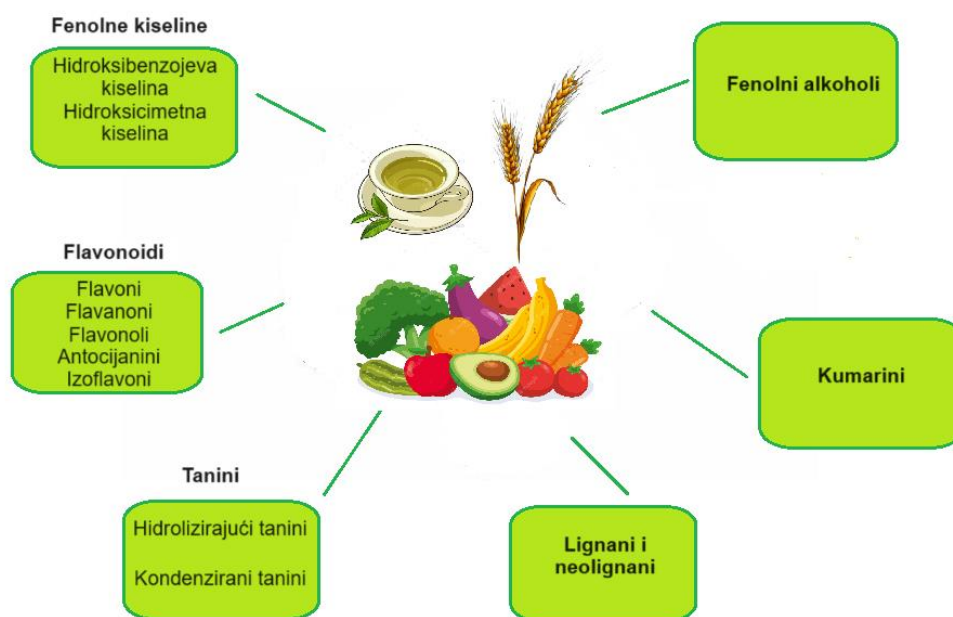
Tanini pripadaju grupi polifenolnih spojeva, a dijele se na kondenzirane i hidrolizabilne. Obje vrste tanina imaju većinu zajedničkih svojstava, ali su hidrolizabilni tanini manje stabilni i imaju veći potencijal za izazivanje toksičnosti. Veći tanini koriste se kao adstringenti u slučajevima krvarenja kože, pojave upalnih procesa i akni. Tanini su široko rasprostranjeni u brojnim biljnim porodicama, od kojih se ističe *Fagaceae* (Wang i sur., 2016).

Terpenoidi su prirodni lipofilni spojevi koji spadaju u skupinu terpenskih spojeva. Njihova se struktura sastoji od različitog broja izoprenskih jedinica. Od posebnog su značaja njihovi antineoplastični, antibakterijski i antivirusni učinci. Pronađeni su u različitim biljnim porodicama, uključujući *Lamiaceae* (porodica majčine dušice) (Bendif i sur., 2021). Smole također spadaju u grupu terpenskih spojeva, a predstavljaju široko rasprostranjenu grupu sekundarnih metabolita te obično uključuju i hlapljive i nehlapljive spojeve. Najpoznatije su smole koje luče drvene strukture, ali prisutne su i kod zeljastih biljaka. Za većinu smola karakteristična su antimikrobna svojstva i mogućnost zacjeljivanja rana (Khan i Kumar, 2016).

1.1.1.1. Polifenoli

Polifenoli su prirodni spojevi zastupljeni u brojnim biljnim vrstama. Njihovu strukturu karakteriziraju najmanje dva fenilna prstena s jednim ili više hidroksilnih supstituenata. S obzirom da imaju značajnu ulogu u rastu i razvoju te obrambenim mehanizmima biljaka, ubrajaju se među najvažnije sekundarne biljne metabolite. Od iznimnog su značaja njihova antioksidativna svojstva kao i sposobnost keliranja iona teških metala. Pronađeni su u voću, povrću, zelenom čaju i cjelovitim žitaricama. Temeljem njihove kemijske strukture i složenosti (tj. broja fenolnih prstena i supstituirajućih skupina), polifenoli se općenito klasificiraju u flavonoide i ne-flavonoide (Neveu i sur., 2010). Glavne skupine ne-flavonoidnih spojeva čine fenolne kiseline (hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina), tanini (hidrolizirajući i kondenzirani tanini – proantocijanini), lignani i neolignani, kumarini te fenolni alkoholi (Singla i sur., 2019).

Obzirom na veliku brojnost i bogatu strukturnu raznolikost, flavonoidi predstavljaju najznačajniju heterogenu skupinu fenolnih spojeva. Naime, u različitim biljkama identificirano je preko 9000 flavonoidnih komponenti. Osnovnu strukturu flavonoida čine dva benzenska prstena (A i B) koja su povezana jednim heterocikličkim furanskim ili piranskim prstenom (C), što se često opisuje kao C6-C3-C6 sustav. Strukturna raznolikost flavonoidnih molekula proizlazi iz razlika u obliku hidroksilacije i oksidacijskom stanju, što rezultira širokim spektrom spojeva: flavanoli, antocijanidini, antocijanini, izoflavoni, flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli i dr. (Singla i sur., 2019).



Slika 2. Fenolni spojevi prisutni u različitim biljnim vrstama (prema Singla i sur., 2019)

Posljednjih godina, posebna je pozornost posvećena istraživanju zdravstvenih koristi polifenola. Na koncentraciju polifenola u biljkama i drugim prehrambenim proizvodima utječu brojni okolišni čimbenici uključujući izloženost suncu, količine oborina, prinos plodova i dr., kao i biokemijski čimbenici u koje spadaju stupanj zrelosti te metoda termičke obrade odnosno kulinarske pripreme. Dokazano je kako redovita konzumacija hrane bogate polifenolima može pomoći u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, poremećaja jetre, pretilosti i dijabetesa (Rasouli i sur., 2017).

1.1.1.2. Glukozinolati

Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti čiju osnovnu strukturu čini β -D-tioglukozna skupina povezana sa sulfoniranom aldoksimskom jedinicom i varijabilnim aminokiselinskim bočnim lancem. Njihovi aglikoni potječu od aminokiselina. Za ove spojeve karakteristično je da sadrže sumpor. Glukozinolati su posebno karakteristični za biljke iz porodice *Brassicaceae*, a na temelju strukture aminokiselinskih prekursora, glukozinolati se mogu podijeliti u sljedeće skupine: (a) alifatski glukozinolati izvedeni iz metionina, izoleucina, leucina ili valina, (b) aromatski glukozinolati izvedeni iz fenilalanina ili tirozina te (c) indolni glukozinolati izvedeni iz triptofana (Radojčić Redovniković i sur., 2008).

U prirodi je identificirano više od 130 različitih glukozinolata, a njihova strukturalna raznolikost najčešće je posljedica širokog raspona sekundarnih modifikacija, uključujući oksidaciju, desaturaciju, hidroksilaciju, metoksilaciju, sulfataciju i glukozilaciju (Halkier i

Gershenzon, 2006; Wittstock i Halkier, 2002). Glukozinolati čine jednu od najvažnijih skupina sekundarnih biljnih metabolita prilikom interakcije biljaka i insekata, predstavljajući klasičan primjer biljnih obrambenih mehanizama protiv biljojeda (Hopkins i sur., 2009). Glukozinolati se mogu hidrolizirati kako bi se proizveli izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, goitrini i epitionitrili u prisutnosti biotičkih ili abiotičkih aktivatora (Bones i Rossiter, 2006). Obzirom da su stabilni spojevi, hidroliza glukozinolata odvija se enzimskim reakcijama. Enzim koji katalizira reakcije hidrolize naziva se mirozinaza, a smještena je u specifičnim vakuolama biljnih stanica nazvanim mirozinska tijela. Tijekom obrade biljaka ili transformacije u gastrointestinalnom sustavu prilikom probave, razgradnja biljnih tkiva omogućuje oslobađanje glukozinolata i mirozinaze (Bones i Rossiter, 2006). Zatim, enzim katalizira hidrolizu tioglukozida, proizvodeći glukozu i nestabilni aglikon poznat kao tihidroksimat-O-sulfonat, koji spontano prelazi u ITC, nitrite, tiocijanate, epinitrile i oksazolidin-2-tione, ovisno o fizikalno-kemijskim uvjetima medija. Od iznimnog je značaja enzimska konverzija glukorafanina u sulforafan. Naime, sulforafan je dugo vremena poznat po blagotvornim učincima na zdravlje, a dokazana je i njegova uloga u mehanizmima zaštite stanica od raka (Bulgakov i sur., 2016; Calmes i sur., 2015).

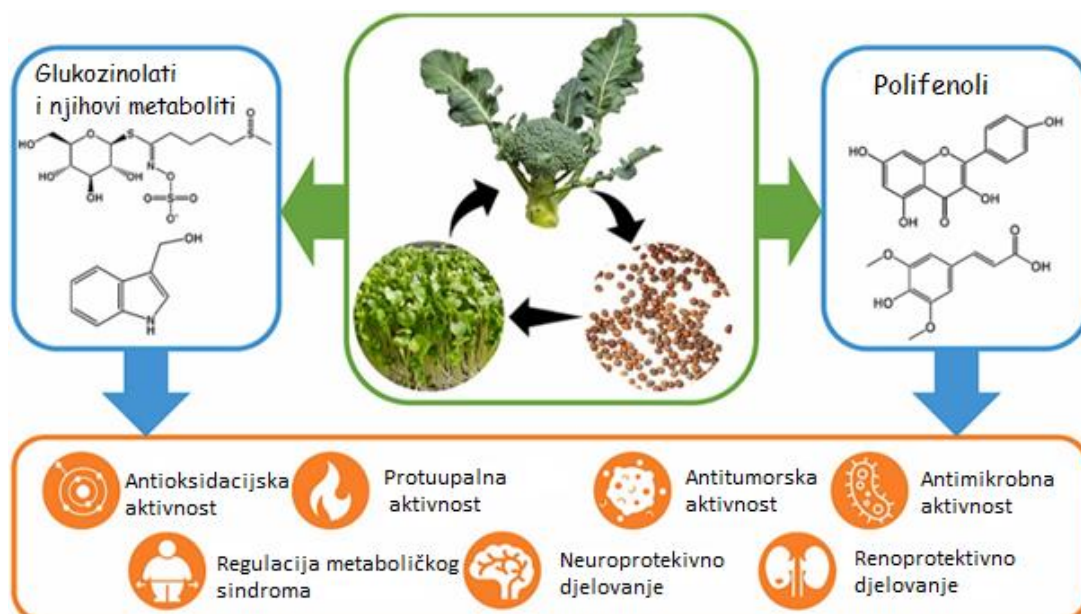
Već su znanstvena istraživanja iz prošlog stoljeća ukazala na povezanost između konzumacije biljaka iz porodice *Brassicaceae* i prevencije određenih vrsta raka, a dokazana je i njihova uloga u smanjenju rizika od više vrsta bolesti, poput dijabetesa, kardiovaskularnih poremećaja, bakterijskih infekcija i drugih disfunkcija uzrokovanih oksidativnim stresom (Dinkova-Kostova i Kostov, 2012). Postoje dokazi koji ukazuju na to da glukozinolati i njihovi produkti hidrolize imaju antifungalnu aktivnost u biljkama (Ishida i sur., 2014; Wittstock i Halkier 2002). Naime, uslijed gljivične infekcije vrste *B. napus*, mjerenja su detektirala povećanu razinu glukozinolata. Također, razina ekspresije enzima uključenih u biosintezu glukozinolata bila je povećana prilikom inokulacije listova modelne biljke *A. thaliana* s nekrotrofnim patogenom *Sclerotinia sclerotiorum* (Ishida i sur., 2014; Stotz i sur., 2011). Osim toga, dokazano je da glukozinolati i njihovi derivati, prvenstveno izotiocijanati, mogu djelovati kao antimikrobni agensi protiv patogenih bakterija (Sotelo i sur., 2015; Aires i sur., 2009). Istraživanje koje su proveli Aires i suradnici (2009) pokazalo je kako izotiocijanati dobiveni iz aromatičnih glukozinolata obično imaju veću baktericidnu aktivnost od onih dobivenih iz alifatskih glukozinolata. Provedeni eksperimenti ukazuju na mogućnost široke uporabe razgradnih produkata glukozinolata. Posebno se proučava njihova uporaba u poljoprivredi, gdje bi mogli djelovati kao alternativni izvor za kontrolu rasta fitopatogenih bakterija i gljivica. Na taj način smanjili bi se značajni gubici produktivnosti usjeva, kao i prijeko potrebnih ekonomskih sredstava (Rodrigues i Rosa, 1999).

1.1.2. Brokula kao izvor biološki aktivnih spojeva

Brokula (*Brassica oleracea var. Italica*) je zeljasta biljka iz porodice *Brassicaceae*, poznata i kao krstašica (*Cruciferae*), s niskom energetsom hranjivom vrijednošću, ali visokom nutritivnom vrijednošću zahvaljujući sadržaju vlakana, kalija, folata te vitamina C i K (Baladia i sur., 2024). Naziv "brokula" izveden je od talijanskog "broccolo", što označava cvjetni vrh. Brokula je porijeklom iz istočnog Sredozemlja, a uvezena je u Ameriku i Englesku u 17. stoljeću te u Kinu u 20. stoljeću (Li i sur., 2019).

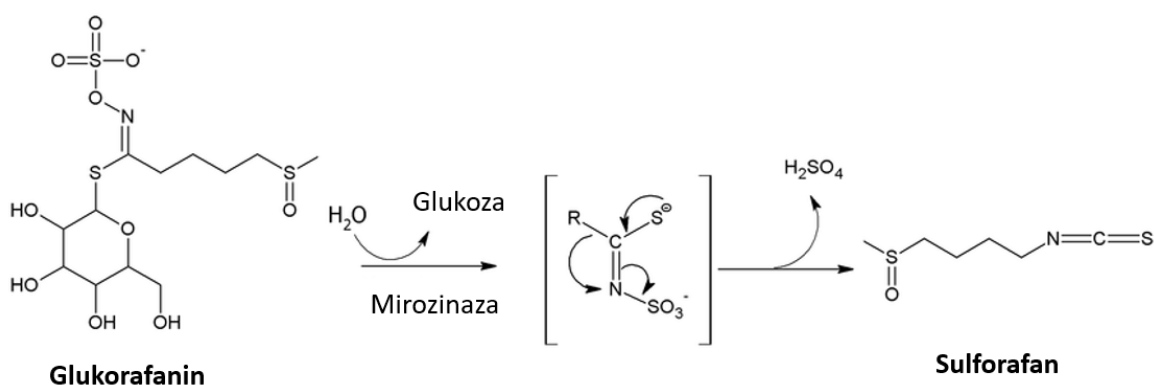
Brokula je odličan izvor netopljivih prehrambenih vlakana, minerala (Ca, Fe, Mg, K, Na, Se), vitamina (A, C, E, K i B skupine) i različitih sekundarnih metabolita kao što su glukozinolati, fenoli (flavonoidi, derivati hidroksicimne kiseline), klorofil te karotenoidi (β -karoten, zeaksantin). Od svih navedenih biološki aktivnih sastojaka brokule, najviše se ističu glukozinolati, zatim flavonoidi i vitamin C (Latte i sur., 2011).

Klice brokule smatraju se funkcionalnom hranom upravo zbog visokog sadržaja glukozinolata, fenola i navedenih vitamina. Posljednjih godina bioaktivni spojevi brokule, kao što su glukozinolati i njihovi produkti razgradnje sve se više istražuju. Blagotvorni učinci brokule i proizvoda dobivenih od nje prikazani na Slici 3 (npr. antioksidacijski, protuupalni, antitumorski, antimikrobni, regulacija metaboličkog sindroma i neuroprotekcija) dokazani su brojnim istraživanjima (Gigliotti i sur., 2020; Xu i sur., 2020; Lee i sur., 2018). Nedavno su klinička ispitivanja pokazala da brokula može doprinijeti i u prevenciji teških simptoma COVID-19 (Bousquet i sur., 2021.).



Slika 3. Blagotvorni učinci brokule i njenih proizvoda (prema Li i sur., 2022)

Jedan od spojeva koji brokulu čini funkcionalnom hranom je izotiocijanat sulforafan. Glukozinolati su velika skupina sekundarnih metabolita biljaka koji u svojoj strukturi imaju sumpor, a koji se pojavljuju u vrstama iz porodice *Brassicaceae*. Poznato je da glukozinolati imaju antitumorska svojstva i smanjuju rizik od nastanka tumora u raznim tkivima kao što su gušterača, mjehur, jetra te tanko i debelo crijevo (Chaudhary i sur., 2012). Zanimljivo je da se sulforafan zapravo ne nalazi u sastavu brokule već nastaje u reakciji hidrolize glukorafanina (Slika 4). Hidroliza glukorafanina u njegov aglikonski produkt sulforafan zahtijeva aktivnost enzima mirozinaze koji se oslobađa iz biljke tijekom konzumiranja i drugih enzima mirozinaza prisutnih u našim crijevima (Clarke i sur., 2008).



Slika 4. Hidroliza glukorafanina u sulforafan pomoću enzima mirozinaze (prema Ul-Haq i sur., 2021)

Sulforafan pokazuje antioksidativno djelovanje jer reagira sa slobodnim radikalima te inducira nuklearni faktor eritroida 2 (Nrf2). Nrf2 je transkripcijski faktor koji pozitivno regulira gene povezane s proizvodnjom antioksidativnih proteina ključnih za neutralizaciju oštećenja nastalih oksidativnim stresom (Nguyen i sur., 2009). Ovaj glukozinolat pokazuje i mehanizme djelovanja pomoću kojih sprječava inicijaciju raka i inhibira njegovo napredovanje. Prvo, sulforafan blokira inicijaciju raka inhibirajući enzime faze 1 koji pretvaraju prokarcinogene u konačne karcinogene. Sulforafan može modulirati metabolizam faze 1 izravnim interakcijama s enzimima citokroma P450 (CYP) ili reguliranjem razine njihovih transkripata unutar stanice. Također, inducira enzime faze 2 koji detoksificiraju ksenobiotike i olakšavaju njihovo izlučivanje iz organizma (Clarke i sur., 2008). Uz navedene mehanizme, sulforafan također blokira prijelaz iz G2 faze u M fazu staničnog ciklusa fosforilacijom CDK1 putem kinaza Wee1 i MYT1 te smanjuje razine proteina ciklina B1, Cdc25B i Cdc25C koji su potrebni za odvijanje staničnog ciklusa (Clarke i sur., 2008).

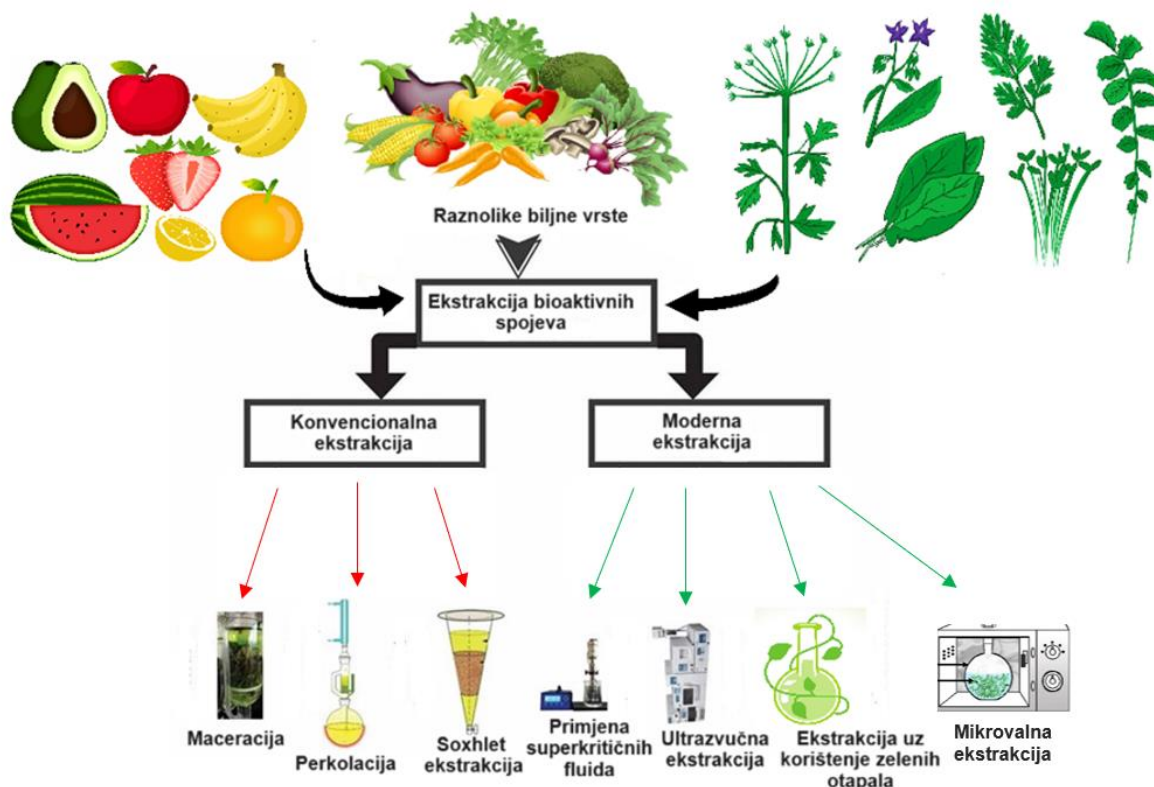
Uz antioksidacijsko i antitumorsko djelovanje sulforafan pozitivno utječe i na imunološki sustav povećavajući broj leukocita i sintezu antitijela te stimulirajući proizvodnju stanica u koštanoj srži. Djeluje bakteriostatski na određene sojeve bakterije *Helicobacter pylori* te na taj

način pomaže u zaštiti od peptičkog ulkusa i smanjuje rizik od razvoja tumora. Sulforafan doprinosi i obnavljanju stanica kože na način da u epidermisu potiče ekspresiju gena koji kodiraju za strukturni protein keratin (Dinkova-Kostova i Kostov, 2012).

1.1.3. Tradicionalni i suvremeni pristupi u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva

Biološki aktivne spojeve potrebno je izdvojiti iz biljnog materijala u svrhu njihove karakterizacije i potencijalne daljnje upotrebe. Tradicionalni pristupi uključuju primjenu utvrđenih metoda kao što su maceracija, parna ili hidro-destilacija, prešanje, dekokcija, infuzija, perkolacija i Soxhlet ekstrakcija, nakon čega, po potrebi, slijede kemijski tretmani za izolaciju željenih spojeva. Uspješna ekstrakcija brojnih biološki aktivnih spojeva iz biljaka zahtjeva korištenje otapala različitih polarnosti (Wong i Kitts, 2006). Najčešće se koriste metanol, *n*-heksan i etanol. Unatoč efikasnosti procesa, korištenje navedenih otapala pokazuje brojne nedostatke. Metanol je zapaljiv i štetan spoj koji u laboratoriju ili industrijskom pogonu može izazvati požar, a ukoliko veće količine dospiju u okoliš, vrlo lako može doći do kontaminacije vodenih područja i narušavanja ravnoteže flore i faune. Kod ljudi djeluje toksično na živčani sustav, a u težim slučajevima može uzrokovati sljepoću, narkozu i smrt (Moon, 2017). *n*-Heksan je također toksičan i zapaljiv spoj, a poznat je i kao velik onečišćivač zraka. Kod ljudi može uzrokovati neurološke probleme, uključujući značajno smanjene brzine provodljivosti živaca (Huang, 2008). Etanol je puno sigurniji u usporedbi s navedenim spojevima. Međutim, problem koji se javlja prilikom korištenja etanola predstavljaju visoki troškovi financijskih i prirodnih resursa. Negativan utjecaj na kvalitetu zraka također je povezan s povećanom proizvodnjom etanola (Hahn i Cecot, 2009). Osim toga, konvencionalni procesi ekstrakcije pokazali su se dugotrajnima i energetski zahtjevnima, a često rezultiraju i niskim prinosima (Rasul i sur., 2018).

Zbog svega gore navedenog, u novije se vrijeme javila potreba za razvojem sigurnijih i učinkovitijih tehnika ekstrakcije koje uravnotežuju ekološke, društvene i ekonomske zahtjeve. Sukladno tome, traga se za novim pristupima kojima bi se uspješno očuvala biološka aktivnost željenih spojeva, a da se pritom smanji štetan učinak cijelog procesa na ljude i okoliš. Jedan od takvih pristupa uključuje primjenu alternativnih izvora energije, poput mikrovalnog zračenja i ultrazvuka, odnosno primjenu alternativnih ekološki prihvatljivih otapala (Slika 5) (Kyriakoudi i sur., 2024).



Slika 5. Razvoj zelenih metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljaka (prema Kyriakoudi i sur., 2024)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (*engl.* Microwave-Assisted Extraction, MAE) predstavlja jednu od najpoznatijih novih metoda u industrijskim procesima. Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi smješteni između radiofrekvencijskog raspona na nižoj frekvenciji i infracrvenog područja na višoj frekvenciji u elektromagnetskom spektru, unutar frekvencijskog opsega od 300 MHz do 300 GHz (Routray i Orsat, 2012). Glavni cilj korištenja MAE je ekonomičnije zagrijavanje otapala i ekstrakcija antioksidansa iz biljaka uz manju količinu otapala (Ballard i sur., 2010), a primjena ove metode rezultira visokim iskorištenjem i čistoćom ekstrahiranih spojeva (Kapooore i sur., 2018). Među glavnim prednostima MAE svakako se ističe i kraće vrijeme ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim metodama.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (*engl.* Ultrasound-Assisted Extraction, UAE) korištena je u raznim primjenama tehnologije prerade hrane za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala (Williams i sur., 2004). Zanimljivo je kako se, ovisno o primijenjenoj snazi ultrazvuka, mogu postići različiti efekti. Pri niskim intenzitetima uglavnom dolazi do utjecaja na vanjsku otpornost prijenosu mase, dok struktura proizvoda obično ostaje nepromijenjena. Srednje razine intenziteta mogu utjecati na strukturu proizvoda, što povećava utjecaj i na unutarnju otpornost prijenosa mase. Tek daljnjim povećanjem ultrazvučne snage može doći do razgradnje stanica (Esclapez i sur., 2011). Glavna prednost ove metode je mogućnost

korištenja širokog raspona otapala. Barbero i sur. (2008) sugerirali su upotrebu ultrazvuka u različitim industrijama zbog njegovih pozitivnih učinaka u ekstrakciji kapsaicinoida iz ljutih papričica. Struktura željenih spojeva ostaje očuvana, a vrijeme procesa kraće je u odnosu na konvencionalne ekstrakcije.

Zelena otapala za primjenu u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva prvenstveno bi trebala karakterizirati fizikalna i kemijska stabilnost, niska hlapljivost i jednostavnost uporabe, kao i mogućnost recikliranja što bi omogućilo korištenje u novim procesima. Osim toga, potrebno je razmotriti konkurentnost otapala u cijeni i učinkovitosti (Häckl i Kunz, 2018). Među najpoznatijim zelenim otapalima, svakako je bitno istaknuti ionske kapljevine te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora poput glicerola i niskotemperaturnih eutektičkih otapala, kao i superkritične fluide, od kojih se posebno ističe superkritični CO₂ koji se vrlo često koristi kao zamjena za različita organska otapala. Ova alternativna otapala, detaljnije opisana u poglavlju 1.2. *Zelena otapala*, pobuđuju sve veći interes akademske zajednice, što potvrđuje i značajan porast publikacija tijekom posljednjeg desetljeća.

1.2. Zelena otapala

U mnogim industrijskim procesima, velike količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala koriste se u različitim reakcijskim sustavima zbog njihove ključne uloge u otapanju krutih tvari, prijenosu tvari i topline te pročišćavanju produkata. Ova praksa neizbježno pridonosi sve većem zagađenju okoliša, što postaje značajan globalni problem posljednjih godina. Procjenjuje se da organska otapala čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih emisija hlapljivih organskih spojeva. Također, većina konvencionalnih organskih otapala je toksična, zapaljiva i korozivna, a njihovo recikliranje povezano je s energetski zahtjevnom destilacijom uz unakrsnu kontaminaciju te znatne gubitke. Sukladno tome, rastuće područje istraživanja u razvoju zelenih tehnologija posvećeno je dizajniranju novih, ekološki prihvatljivih i podesivih otapala čija bi uporaba zadovoljila i tehnološke i ekonomske zahtjeve (Cvjetko Bubalo i sur., 2015 i 2018).

1.2.1. Zelena otapala u kontekstu zelene kemije

Anastas i Warner su 1998. godine predložili 12 principa zelene kemije, prikazanih u Tablici 1, koji su zamišljeni kao početna smjernica prilikom razvoja ekoloških kemikalija i procesa kojom se nastoji smanjiti ili eliminirati uporaba štetnih otapala, reagensa i proizvoda koji zagađuju okoliš (Anastas i Warner, 1998). Cilj zelene kemije je postizanje ekoloških i ekonomskih prednosti putem različitih pristupa, uključujući biokatalizu, upotrebu obnovljivih sirovina, povećanje ekonomske učinkovitosti, korištenje alternativnih uvjeta reakcije poput ultrazvuka i mikrovalova, te zamjenu konvencionalnih otapala manje opasnim zelenim otapalima. Ovaj pristup ne samo da smanjuje štetan utjecaj na okoliš, već i potiče održivost i ekonomsku isplativost u industriji.

Tablica 1. 12 principa zelene kemije (prema Anastas i Warner, 1998)

1.	Bolje je spriječiti nastanak otpada nego ga sanirati nakon što je nastao.
2.	Proces sinteze treba osmisliti tako da je u konačni proizvod uključena maksimalna količina ulazne sirovine.
3.	Ukoliko je moguće, postupak sinteze treba osmisliti s ciljem smanjena upotrebe spojeva štetnih za ljudsko zdravlje i okoliš.
4.	Kemijske produkte treba osmisliti tako da budu učinkoviti s minimalnom toksičnošću.
5.	Upotrebu pomoćnih sredstava (otapala, sredstva za separaciju) treba svesti na minimum te kad god je moguće koristiti neškodljiva.
6.	Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
7.	Upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo.
8.	Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (zaštitne skupine, privremena modifikacija)
9.	Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama.
10.	Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja.
11.	Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.
12.	U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

Jedan od učinkovitih načina za postizanje zelenijih procesa je zamjena opasnih i neučinkovitih otapala onima sigurnijim i učinkovitijim. Načela zelene kemije ističu da bi idealno otapalo trebalo biti kemijski i fizički stabilno, nezapaljivo, male hlapljivosti, s povoljnim ekološkim otiskom, jednostavno za uporabu te jednostavno za recikliranje s mogućnošću ponovne uporabe kao što je prikazano na Slici 6 (Radojčić Redovniković, 2020).



Slika 6. Karakteristike idealnog otapala prema načelima zelene kemije
(prema Radojčić Redovniković, 2020)

Konvencionalno otapalo koje zadovoljava gore spomenute kriterije jest voda. Voda se stoljećima koristila za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva različitim procesima i postupcima: maceracijom, dekokcijom, infuzijom i perkolacijom, no poznato je da je loše otapalo za nepolarne ili neke semipolarne spojeve (Chemat i sur., 2019). Također, uz procese koji uključuju vodu vežu se visoki energetske zahtjevi za njeno uklanjanje po završetku procesa te stoga ograničavaju njezinu primjenu u industriji. Obzirom na prethodno navedena razmatranja, u fokusu istraživanja su različita ekološki prihvatljiva, prilagodljiva i pametna otapala koja se razvijaju kao zamjena za štetna organska otapala. Među njima se ističu ionske kapljevine, superkritični i subkritični fluidi te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora, detaljnije opisani u sljedećem poglavlju, kao najperspektivniji u području razvoja novih, ekološki prihvatljivijih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

1.2.2. Tipovi zelenih otapala

Ionske kapljevine predstavljaju važnu skupinu zelenih otapala. Za razliku od klasičnih otapala, ionske kapljevine nisu građene od molekula, već od iona. Karakteristike koje ih čine privlačnima, kako s tehnološkog tako i s ekološkog gledišta, uključuju nisku hlapljivost, nezapaljivost te toplinsku, kemijsku i elektrokemijsku stabilnost (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Definiraju se kao skupina nemolekularnih otapala pripremljenih kombinacijom organskih kationa i organskih ili anorganskih aniona koji se tale ispod 100 °C (Tang i sur., 2012). Kationi u ionskim kapljevina su različito supstituirane organske molekule niske simetrije koje sadrže pozitivno nabijen atom dušika, sumpora ili fosfora (npr. *N*, *N'*-dialkilimidazolijev, *N*-alkilpiridinijev, *N*-akilmorfonijev, *N,N'*-diakilpirazolijev, akilamonijev, akil-fosfonijev, alkilsulfonijev i tiazolijev kation). Tipični anioni su halogenidi, tetrafluorborat, heksafluorofosfat, nitrat, sulfat, alkilsulfati, alkilsulfonati i trifluoracetat (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Ovisno o vrsti aniona i duljini alkilnog lanca kationa, ionske kapljevine mogu biti hidrofilne ili hidrofobne. Primjera radi, ionske tekućine s anionima poput halogenida ([Cl], [Br], [I]) i acetata [CH₃COO] su hidrofilne, dok su one s tetrafluorboratnim [BF₄] i heksafluorofosfatnim [PF₆] anionom hidrofobne (Ajam, 2005). Jedna od najznačajnijih karakteristika ionskih kapljevina je mogućnost modifikacije njihove strukture te posljedično i njihovih fizikalno-kemijskih svojstava. Modifikacijama strukture ovih otapala može se utjecati na talište, topljivost određenih komponenti, kiselost, hidrofobnost, gustoću, viskoznost, topljivost u vodi i organskim otapalima i ekstrakcijski kapacitet te tako izravno utjecati na uspješnost primjene ionske kapljevine. Upravo zbog toga ova otapala su prepoznata kao zelena „dizajnerska“ otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

Sljedeća skupina zelenih otapala podrazumijeva superkritične fluide. Najčešće korišteni superkritični fluid je ugljikov dioksid (CO₂) zbog svojih niskih kritičkih konstanti ($T_c = 31,1$ °C, $P_c = 7,38$ MPa) kao i netoksičnosti, nije eksplozivan, lako je dostupan te se lako uklanja iz proizvoda (Damjanović i sur., 2005). Ovaj se plin koristi kao zamjena za toksične freone i određena organska otapala. Pri sobnoj temperaturi CO₂ je u plinovitom stanju što omogućuje jednostavno pročišćavanje analita i osigurava analite bez otapala. Uz to CO₂ je mala linearna molekula te stoga brže difundira od konvencionalnih tekućih otapala. CO₂ je općenito prepoznat kao sigurno otapalo (*engl.* Generally Regarded as Safe, GRAS), tako da su proizvodi ekstrahirani s ovim otapalom sigurni za ljudsko zdravlje (Rutkowska i Stolyhwo, 2009). Nadalje, obzirom na sve veće zabrinutosti oko globalnog zagrijavanja i emisije stakleničkih plinova, još jedna prednost potencijalnih velikih postrojenja za superkritičnu obradu CO₂ bila bi hvatanje i stvaranje novih namjena za CO₂ koji generiraju druge industrije umjesto ispuštanja u atmosferu (Temelli, 2009). Međutim CO₂ pokazuje i neke nedostatke, primjerice, nije pogodno otapalo za spojeve velike molekulske mase i polarne spojeve. Niska polarizacija superkritičnog CO₂ može se poboljšati uporabom polarnih modifikatora (ko-otapala, uglavnom etanola i metanola) te se na taj način poveća i njegova moć otapanja prema analitu od interesa. Primjerice, dodavanje do 10 % metanola u CO₂ omogućuje ekstrakciju polarnih analita (Herrero i sur., 2010). Primjene superkritičnog fluida CO₂ prema Cvjetko Bubalo i sur. (2015), uključuju prehrambenu industriju (npr. kava, čaj, začini, arome, antioksidansi, ulja iz sjemenki), nutraceutike i farmaceutike (npr. karotenoidi, likopen,

astaksantin, steroli), kozmetiku (npr. aktivni sastojci, mirisi), kemijske reakcije (npr. polimerizacija, hidrogenizacija, uništavanje toksičnih tvari), obradu materijala (npr. mikroinkapsulacija, bojanje, kristalizacija, formiranje čestica), čišćenje (npr. kemijsko čišćenje, rekultivacija tla), te posebne primjene (npr. separacija membranama, sterilizacija, ekstrakcija tankih filmova).

Posljednja skupina zelenih otapala, detaljnije opisana u poglavlju 1.2.3. *Niskotemperaturna eutektička otapala*, otapala su dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora poput glicerola, šećera i organskih kiselina. Ova otapala, zahvaljujući svojim jedinstvenim fizikalno-kemijskim svojstvima, ekološkoj prihvatljivosti, pristupačnoj cijeni i mogućnosti prilagodbe za specifične primjene, predstavljaju jedinstvena otapala s velikim potencijalom za primjenu u kemijskoj i procesnoj tehnologiji, biotehnologiji, prehrambenoj tehnologiji, farmaceutskoj industriji i biomedicini (Radović i sur., 2021).

1.2.3. Niskotemperaturna eutektička otapala

Eutektičke smjese su homogene smjese tvari koje se tale na temperaturi koja je niža od tališta bilo kojeg od pojedinačnih sastojaka smjese i poznate su više od jednog stoljeća (Radović i sur., 2021). Međutim, Abbott i sur. (2004) izvijestili su o smjesama kvaternih amonijevih soli s amidima, npr. kolin-klorid ($T_f = 302\text{ °C}$) i uree ($T_f = 133\text{ °C}$) u molarnom omjeru 1:2, s značajnim ("dubokim") smanjenjem temperature faznog prijelaza kruto-tekuće od one koja se očekuje za idealnu smjesu te su posljedično smjese ostale tekuće čak i na sobnoj temperaturi. Ova izvanredna otkrića poteknula su Abbottovu grupu da definiraju novu klasu takvih smjesa: niskotemperaturna eutektička otapala (*engl.* Deep Eutectic Solvents, DES). Takvo značajno sniženje tališta pripisuje se delokalizaciji naboja zbog stvaranja jakih međumolekulskih interakcija (npr. vodikove, ionske i van der Waalsove veze) u određenom rasponu omjera komponenti.

Opća formula DES-ova je Cat^+X^-zY , pri čemu X označava Lewisovu bazu, odnosno halogenid, a Cat^+ amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation. Cat^+X^- čine akceptor vodikove veze, dok donor vodikove veze, koji može biti Lewisova ili Brønstedova kiselina (Y), stvara "kompleks" s X^- . U glavnoj formuli, z označava broj molekula Y (Radović i sur., 2021). DES-ovi se obično klasificiraju u četiri vrste čija je opća formula opisana u Tablici 2. Otapala tipa I sadrže kvaterne amonijeve soli te halogenide metala (poput Zn, Sn, Fe), a otapala tipa II karakteriziraju kvaterne amonijeve soli s hidriranim metalnim halogenidima. S druge strane, otapala tipa III uključuju spojeve kvaternih soli i donora vodikovih veza poput kiselina, amida i alkohola, a skupinu IV čine halogenidi metala i donori vodikovih veza poput amida i alkohola (Smith i sur., 2014).

Tablica 2. Tipovi DES-ova i njihove opće formule (prema Smith i sur., 2014)

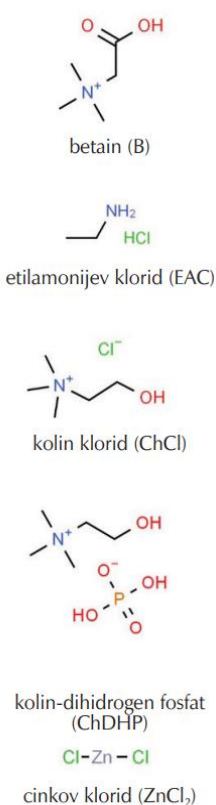
Vrste	Opća formula	Pojašnjenje kratica
Tip I	$\text{Cat}^+ \text{X}^- z\text{MCl}_x$	$M = \text{Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In}$
Tip II	$\text{Cat}^+ \text{X}^- z\text{MCl}_x \cdot y\text{H}_2\text{O}$	$M = \text{Cr, Co, Cu, Ni, Fe}$
Tip III	$\text{Cat}^+ \text{X}^- z\text{RZ}$	$Z = \text{CONH}_2, \text{COOH, OH}$
Tip IV	$\text{MCl}_x + \text{RZ} = \text{MCl}_{x-1} + \cdot\text{RZ} + \text{MCl}_{x+1}$	$M = \text{Al, Zn}; Z = \text{CONH}_2, \text{OH}$

Nedavno je u opću klasifikaciju dodana i peta vrsta DES-ova koja uključuje sve DES-ove sastavljene isključivo od neionskih, molekularnih akceptora vodikove veze (npr. tercijarni amini) i donora vodikove veze (npr. alkoholi, kiseline, amini, ciklički i linearni terpeni) (Abranches i sur., 2019). Većina prijavljenih DES-ova su tipa III i V s kvaternim amonijevim solima poput kolin klorida ili metilamin betaina kao jeftinim, lako dostupnim i netoksičnim akceptorima vodikove veze, te šećerima (npr. glukoza, ksiloza i saharoza), poliolima (npr. ksilitol, sorbitol, etilen-glikol i glicerol), amidima (npr. urea) i organskim kiselinama (npr. mliječna kiselina i jabučna kiselina) kao neutralnim donorima vodikove veze (Kyriakoudi i sur., 2024). Uz navedene, postoje i drugi spojevi koji se koriste za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala te su prikazani na Slici 7 (Radović i sur., 2021).

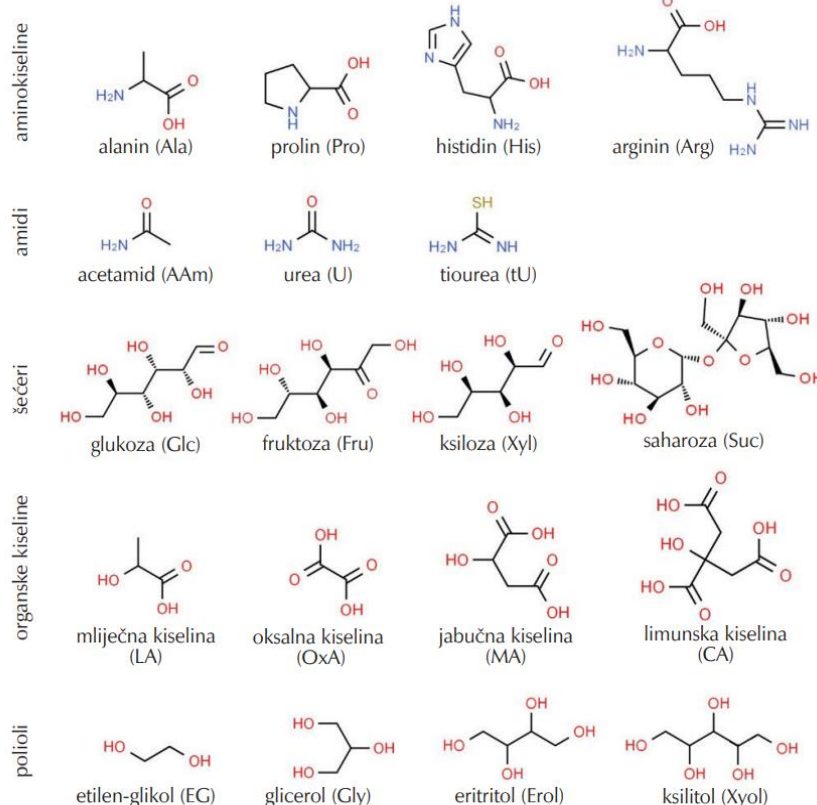
Osim toga, uz opisane donore i akceptore vodikove veze, voda se često koristi kao komponenta DES-a, jer je pokazano da ima ključnu ulogu u formiranju DES-ova modificirajući fizikalno-kemijska svojstva odgovarajuće DES supramolekularne mreže, čime se smanjuje talište, viskoznost i gustoća otapala, što je izuzetno važno za primjenu (Zhang i sur., 2012). Međutim, udio vode ne smije biti previsok jer može razbiti supramolekularni kompleks donor-akceptor vodikove veze, što bi u konačnici rezultiralo vodenom otopinom pojedinih komponenata otapala zbog gubitka mreže vodikovih veza među njima (Radović i sur., 2021).

Pored tradicionalne klasifikacije DES-ova, ova otapala su također kategorizirana u posebne podskupine prema podrijetlu njihovih sastojaka ili njihovoj namjeni. Prema tome mogu se podijeliti na prirodne i terapijske DES-ove (Kyriakoudi i sur., 2024).

Akceptori vodikove veze



Donori vodikove veze



Slika 7. Spojevi koji se koriste za pripravu DES-ova (Radović i sur., 2021)

Prirodni se DES-ovi (*engl.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES), detaljnije opisani u poglavlju 1.2.4., sastoje samo od spojeva koji se javljaju u prirodi (stanični metaboliti) kao što su polioli, šećeri, organske kiseline, aminokiseline i masne kiseline, pa se pretpostavlja da su niske toksičnosti, što je za većinu dosad pripremljenih NADES-a i dokazano (Martinez i sur., 2022). Općenito, prirodno porijeklo NADES-a omogućuje stvaranje okruženja koje je slično prirodnom okolišu za razne biomolekule, poput sekundarnih biljnih metabolita, proteina i enzima, čime je omogućeno očuvanje njihovog biološkog identiteta i funkcionalnosti. Upravo zbog toga, ova otapala uspješno se primjenjuju u područjima kao što su ekstrakcija biljnih metabolita, biokataliza, tehnologija formulacije proizvoda i biomedicinske primjene (Liu i sur., 2018).

Druga podskupina DES-ova su terapijska niskotemperaturna eutektička otapala (*engl.* Therapeutic Deep Eutectic Solvents, THEDES) koja se definiraju kao eutektički sustav u kojem je jedna od komponenti aktivni farmaceutski sastojak (*engl.* Active Pharmaceutical Ingredient, API) ili sustav u kojem je API disperziran (Duarte i sur., 2017). U takvom otapalu, sve jedinice otapala, povezane vodikovim ili ionskim vezama, tvore niskotemperaturnu strukturu eutektičkog otapala, čime se može poboljšati topljivost API-ja, bioraspoloživost i kontrolirano oslobađanje aktivne tvari (Oliveipaivachra i sur., 2021).

U Tablici 3 prikazana su glavna svojstva ranije spomenutih ionskih kapljevin i (NA)DES-a. Može se uočiti da je glavna razlika između IL-a i (NA)DES-a vrsta međumolekulske interakcije koja ih karakterizira. Dok su u ionskim kapljevinama međumolekulske interakcije ionske veze, u (NA)DES-ima su vodikove veze. Još jedna važna razlika je ta što su, za razliku od ionskih kapljevin, (NA)DES-i općenito netoksični (Chemat i sur., 2019).

Tablica 3. Usporedno prikazana svojstva ionskih kapljevin i (NA)DES-a (Chemat i sur., 2019)

SVOJSTVA	Ionske kapljevine	(NA)DES-i
Međumolekulske interakcije	Ionske veze	Vodikova veza
Talište	Ispod 100 °C	
Tlak pare	Nizak	
Viskoznost	Visoka viskoznost, pozitivna korelacija s temperaturom	
Sposobnost otapanja	Širok raspon polarnih i nepolarnih molekula	
Citotoksičnosti	Umjerena do visoka	Općenito netoksični

1.2.4. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala i njihova primjena u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka

Kao što je već spomenuto, jedna od važnih podgrupa DES-ova su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, tzv. NADES-i, koja u potpunosti ispunjavaju kriterije idealnog otapala prema zelenoj kemiji (Paiva i sur., 2014). Ova otapala se dobivaju od prirodnih spojeva, prvenstveno primarnih metabolita kao što su šećeri, aminokiseline i alkoholi. Njihova sve veća uporaba proizašla je iz njihovog sastava koji sadrži prirodne komponente, ekološku prihvatljivost i ekonomičnost u odnosu na konvencionalna organska otapala. Osim toga, ova otapala omogućuju jednostavne metode pripreme uz niske troškove te bez stvaranja otpada. NADES-i ne samo da pružaju izvrsnu topljivost biološki aktivnih tvari, već također stabiliziraju širok spektar biomolekula, uključujući enzime, proteine i nukleinske kiseline (Choi i sur., 2011).

Istraživanja su pokazala da NADES, posebno uz pomoć ultrazvučne ili mikrovalne ekstrakcije, poboljšavaju učinkovitost ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim otapalima, ali i značajno povećavaju stabilnost ekstrahiranih spojeva. Na primjer, Dai i sur. (2014) su pokazali da NADES može zaštititi kurkumin i kartamin od fotodegradacije i toplinske degradacije učinkovitije od konvencionalnih otapala poput metanola. Ova povećana stabilnost pripisuje se molekularnim interakcijama između komponenti NADES-a i ekstrahiranih spojeva,

koji ih štite od štetnih učinaka topline, svjetlosti i vremena, čime se čuva njihova bioaktivnost i produljuje njihov rok trajanja. Dodatno, utvrđeno je da NADES-i koji se sastoje od organskih kiselina i šećera održavaju bolja antioksidativna svojstva u kurkuminoidima u usporedbi s konvencionalnim organskim otapalima (Liu i sur., 2019). Uz to, NADES-i koji sadrže organske kiseline pokazuju i antimikrobne učinke, vjerojatno zbog niskog pH. Upravo zbog toga NADES-i bi mogli biti potencijalni farmaceutski nosači u antradoimikrobnim tretmanima kroničnih lokalnih infekcija. (Wikene i sur., 2017; Zhao i sur., 2015).

Toksičnost NADES-a određuje njegovu primjenu u hrani. Radošević i sur. (2015) procijenili su *in vitro* toksičnost odnosno fitotoksičnost NADES-a koristeći humane stanične linije, staničnu liniju riba te klice pšenice. Njihovi rezultati su pokazali da tri NADES-a na bazi kolin-klorida imaju nisku citotoksičnost i ne inhibiraju klijanje sjemena pšenice. Također, Mitar i sur. (2019) testirali su toksičnosti ovih otapala na ljudskim staničnim linijama te se pokazalo da čak i pri najvećoj koncentraciji (2000 mg L⁻¹), NADES-i nisu inhibirali rast humanih HEK-293T, HeLa i McF-7 stanica.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

2.1. Opći i specifični ciljevi

Zahvaljujući značajnom udjelu biološki aktivnih spojeva, brokula je okarakterizirana kao biljka s višestrukim pozitivnim učincima na zdravlje. Među brojnim bioaktivnim spojevima, svojim su se djelovanjem svakako istaknuli polifenolni spojevi te glukozinolati, koji su velikim dijelom zaslužni za svrstavanje brokule u skupinu funkcionalne hrane. Posebno je važno istaknuti djelovanje razgradnih produkata glukozinolata u prevenciji raka i kardiovaskularnih bolesti (Thomas i sur., 2018). Pored glukozinolata, različite grupe fenolnih spojeva prisutnih u brokuli imaju dokazana antioksidativna, antitumorska i vazodilatacijska svojstva (Bachiega i sur., 2016).

Obzirom na brojne nedostatke i opasnosti konvencionalnih metoda ekstrakcije, novi trendovi u ekstrakciji vrijednih biljnih metabolita iz brokule, ali i iz biljaka općenito, uglavnom su usmjereni na dobivanje visokokvalitetnih ekstrakata s poboljšanom biološkom aktivnošću i dugim rokom trajanja, uz nastojanje minimiziranja upotrebe štetnih otapala tijekom pripreve ekstrakta (Kyriakoudi i sur., 2024). Upotreba prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (*engl.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES), kao nove klase zelenih otapala s izuzetnom strukturnom fleksibilnošću, pruža priliku za dizajn otapala kako bi se zadovoljili zahtjevi prehrambene i kozmetičke industrije u proizvodnji visokovrijednih istinski prirodnih te sigurnih biljnih ekstrakata (Rente i sur., 2022). Međutim, eksperimentalni odabir odgovarajućeg NADES-a, između gotovo neograničenog broja ovih otapala, dugotrajan je i skup proces. Stoga, kako bi se ubrao postupak probira NADES-a, u posljednje se vrijeme teži racionalnom dizajnu ovih otapala primjenom računalnih metoda (Panić i sur., 2021a).

Primjena NADES-a u ekstrakciji polifenola u posljednje se vrijeme intenzivno proučava te je, pored uspješnosti ekstrakcije, dokazana i uloga NADES-a u očuvanju biološke aktivnosti ovih spojeva (Rente i sur., 2022). S druge strane, potencijal NADES-a u ekstrakciji glukozinolata je u potpunosti neistražen. Stoga, opći cilj ovog znanstvenog rada jest uspostaviti održivu pripremu visokovrijednog i stabilnog tekućeg ekstrakata brokule u NADES-u bogatog polifenolima i glukozinolatima, a koji se može izravno primijeniti u prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji, bez dodatnih koraka pročišćavanja. U tu svrhu definirani su sljedeći specifični ciljevi: (1) primjenom računalne metode racionalno suziti broj kandidata NADES-a, (2) pripremiti i okarakterizirati odabrane NADES-e te ih primijeniti u ekstrakciji polifenola i glukozinolata iz brokule, (3) odrediti sadržaj polifenola i glukozinolata u ekstraktu te pratiti njihovu stabilnost tijekom skladištenja ekstrakata na sobnoj temperaturi odnosno u hladnjaku, (4) okarakterizirati dobivene ekstrakte u kontekstu biološke aktivnosti, (5) procijeniti održivost ekstrakcije pomoću NADES-a. Zaključno, rezultati dobiveni u ovom radu postaviti će temelj racionalnom dizajnu inovativnih i visokovrijednih biljnih ekstrakata brokule temeljenih na NADES-ima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci brokule

Pri izradi ovog rada korištena je liofilizirana i mljevena brokula kupljena na lokalnoj tržnici te je čuvana na sobnoj temperaturi od 25 °C prije upotrebe.

3.1.2. Kemikalije

- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- 2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Anionski izmjenjivač na bazi dietilaminoetila (*Fast DEAE Sepharose CL-6B*), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Betain, 98 %, p.a. Sigma-Aldrich. St. Louis, SAD
- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Etanol, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, RH
- Fetalni teleći serum, FBS (eng. Fetal Bovine Serum), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Imidazol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Jabučna kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Mravlja kiselina, Kemika, Zagreb, RH

- Natrijev acetat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb, RH
- Natrijev karbonat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- *Nile red* solvatokromna proba, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Octena kiselina, Kemika, Zagreb, RH
- Reagens za staničnu vijabilnost , The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega, SAD
- Saharozna, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sinigrin, Extrasynthese, Lyon, Francuska
- Sulfataza (iz *Helix palatia*), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tripan- plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Tripsin, 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija

3.1.3. Otopine i puferi

- Folin-Ciocalteu reagens
FC reagens 10 mL
Destilirana voda do 100 mL
- Acetatni pufer (0,02 M)
Ishodna otopina 1:
Octena kiselina (0,2 M) 82 mL
Natrijev acetat (0,2 M) 18 mL
Ishodna otopina 2:
Ishodna otopina 1 5 mL
Destilirana voda 45 mL
- Otopina natrijevog karbonata
Na₂CO₃ 7,5 g
Destilirana voda do 100 mL
- Otopina imidazol-formijata (6 M)
Imidazol 20,4 g
Mravlja kiselina 28,25 mL
Destilirana voda do 50 mL

- Otopina sinigrina

Sinigrin	10,38 mg
Destilirana voda	do 10 mL

- Otopina sulfataze

Sulfataza	75 mg
40 %-tni etanol	do 10 mL

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

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

- Fosfatni pufer (0,075 M)

Fosfatni pufer (0,2 M)	37,5 mL
Destilirana voda	100 mL

- Otopina fluoresceina

<u>Ishodna otopina 1:</u>	
Fluorescein	15 mg
Fosfatni pufer (0,075 M)	100 mL
<u>Ishodna otopina 2:</u>	
Ishodna otopina 1	100 µL
Fosfatni pufer (0,075 M)	10 mL
<u>Ishodna otopina 3:</u>	
Ishodna otopina 2	25 µL
Fosfatni pufer (0,075 M)	25 mL

- Otopina Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina)

<u>Ishodna otopina 1:</u>	
Trolox	6,25 mg
Fosfatni pufer (0,075 M)	10 mL
<u>Ishodna otopina 2:</u>	
Ishodna otopina 1	1,6 mL
Fosfatni pufer (0,075 M)	8,4 mL
<u>Konačna otopina Trolox:</u>	
Ishodna otopina 2	10 mL
Fosfatni pufer (0,075 M)	do 50 mL

• PBS pufer (pH=7,4)	
Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Sve kemikalije i otapala korišteni u ovom radu bili su analitičke čistoće.

3.1.4. Stanične linije

U ovom radu korištene su humane stanične linije HeLa i HaCaT. HeLa stanična linija dobivena je iz američke banke stanica, ATCC (*engl.* American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, SAD), dok je HaCaT stanična linija kupljena od radne banke stanica CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Njemačka).

Stanična linija HeLa je prva humana kultura stanica malignog tumora, izolirana 1950-ih iz adenokarcinoma vrata maternice pacijentice Henriette Lacks. Zahvaljujući mogućnosti neprekidne diobe, ova stanična linija izvrstan je materijal za ispitivanje utjecaja različitih terapeutika i otapala na ljudske stanice, kao i za brojna druga biomedicinska istraživanja.

HaCaT linija predstavlja humanu kulturu spontano imortaliziranih keratinocita; stanica izoliranih iz kože odrasle osobe. Ove stanice imaju važnu ulogu u zacjeljivanju rana i obrani kože od štetnih vanjskih utjecaja. Zahvaljujući tome, koriste se u istraživanjima stanične diferencijacije kao i u brojnim imunološkim testiranjima.

3.1.5. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, Sartorius, Entris, Njemačka
- Čitač ploča, Tecan Sunrise, Švicarska
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- Fuchs-Rosenthalova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright-Line, Njemačka
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- HPLC, Agilent1200 Series, Agilent Technologies, SAD
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka
- Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (epruvete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, pipete, nastavci za pipete, lijevak, *Eppendorf* kivete, *Falcon* tube, Büchnerov lijevak)
- Orbitalni homogenizator/inkubator, Biosan, Latvija
- Piknometar, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Hrvatska
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Računalni program BOVIA COSMOtherm 2020, Verzija 20.0.0 (Revision 5273M), Dessault Systems, Izrael
- Računalni program TmoleX, Verzija 4.5, COSMOlogic GmbH & Co, Izrael
- Rotacijski viskozimetar, Anton Paar QC 300, Anton Paar, Austrija
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- T-boce od 25 cm², Corning, SAD
- Ultrazvučna kupelj GRANT WUB5, Grant Instruments, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Univerzalan uređaj za mjerenje pH, mV/ORP i iona, Mettler Toledo/S220, SAD
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYSTM 10S, ThermoFisher Scientific, SAD

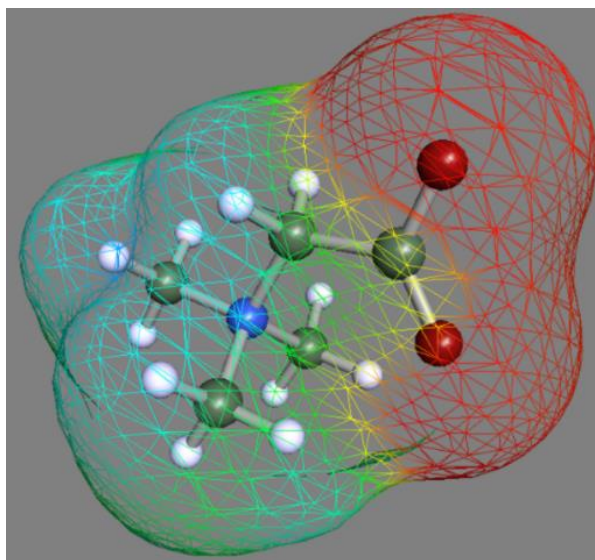
3.2. Metode

3.2.1. Računalno predviđanje topljivosti polifenola i glukozinolata u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Optimalna gustoća naboja i geometrija pojedinačnih molekula (kvercetin, ferulinska kiselina, glukorafanin i sve komponente NADES-a) izračunata je pomoću računalnog programskog paketa TURBOMOLE (TmoleX). 3D struktura svih molekula preuzeta je iz *PubChem* baze podataka (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) te zatim ručno unesena u SDF formatu (*engl.* Spatial Data File, SDF). Računalnim optimiranjem gustoće naboja i geometrije određena je geometrija molekula u kojoj njihova struktura ima najmanju energiju (Slika 8). Nakon geometrijskog i energetskog optimiranja molekula, izračunati podaci pohranjeni su u COSMO datoteke kako bi se olakšao termodinamički proračun u programskom paketu COSMOthermX.

Model COSMO-RS (*engl.* Conductor-like Screening Model for Real Solvents) primjenjuje se za računalno predviđanje eutektičke točke otapala i topljivosti komponenata u eutektičnom otapalu. Zahvaljujući računalnom predviđanju topljivosti komponenata u otapalu smanjena je količina eksperimentalnog rada kao i potrošnja materijala i kemikalija. Za računalno predviđanje topljivosti supstrata u NADES-ima odabrana su dva polifenola – kvercetin i ferulinska kiselina te glukozinolat glukorafanin. Za primjenu modela COSMO-RS potrebno je

prvo izraditi σ -profile, što uključuje izračune optimalne geometrije molekula, te raspodjelu volumena i površinskog električnog naboja. Ovaj proces se provodi korištenjem COSMO modela i softvera BIOVIA TmoleX19 verzija 2021 (Dassault Systèmes, Paris, Francuska). Nakon toga, koristeći softverski paket COSMOtherm verzija 20.0.0. (Dassault Systèmes, Paris, Francuska), iz σ -profila se određuju σ -potencijali komponenti ili njihovih smjesa te odgovarajući kemijski potencijali (Panić i sur., 2021a). Zatim se metode fizikalne kemije i kemijsko-inženjerske termodinamike koriste za izračunavanje izvedenih termodinamičkih svojstava supstrata i otapala, kao što su koeficijent aktivnosti, koeficijent raspodjele, topljivost ključnih komponenti u NADES-u, ravnotežni tlak para ili fazni dijagrami, temeljeni na disperzijskim međudjelovanjima i vodikovim vezama između otapala i otopljenih tvari (Palmelund i sur., 2019).



Slika 8. Geometrijsko i energetska optimiranje molekule betaina (vlastita slika)
(Ukupna energija = -402,5367431700).

Kako bi se odredila topljivost spoja prvo je potrebno unijeti .cosmo datoteke spojeva koje želimo ispitati i komponentata koje čine NADES. Zatim se u sekciji *Activity Coefficient* odabire temperatura pri kojoj se ispituje topljivost te sastav smjese, odnosno množinski udjeli [mol mol^{-1}] akceptora vodikove veze, donora vodikove veze te spoja od interesa koji u sumi moraju biti jednaki 1.

Topljivost spoja u određenom otapalu obrnuto je proporcionalna njegovom koeficijentu aktivnosti u sustavu. Logaritam koeficijenta aktivnosti pri beskonačnom razrjeđenju ($\ln(\gamma)$) pruža uvid o topljivosti spoja u ispitivanom otapalu. $\ln(\gamma)$ vrijednost manja od 1 podrazumijeva da spoj posjeduje dobru topljivost, dok $\ln(\gamma)$ vrijednost veća od 1 znači da je spoj slabo topljiv u promatranom otapalu (Wojeicchowski i sur., 2020; Klamt i sur., 1998). Topljivost polifenola i glukozinolata ispitana je u 71 različitih NADES-a koji su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. NADES-i za ispitivanje topljivosti kvercetina, ferulinske kiseline i glukorafanina pomoću modela COSMOtherm

NADES	Molarni omjer	NADES	Molarni omjer	NADES	Molarni omjer
B:CA	1:1	ChCl:Pro:Ma	1:1:1	Ma:Glc:Gly	1:1
B:Glc	5:2	ChCl:Suc	2:1	Ma:Sor:Gly	1:1:1
B:Glc	1:1	ChCl:Sol	1:1	Ma:Suc	1:1:2
B:Gly	1:2	ChCl:Sol	2:3	Pro:Fru:Gly	2:1
B:OxA:Gly	1:2:1	ChCl:Sol	1:1	Pro:Ma	1:1:1
B:Ma	1:1	ChCl:U	1:2	Suc:EG	1:1
B:Ma:Glc	1:1:1	ChCl:U:EG	1:2:2	Suc:Glc:Fru	1:2
B:Ma:Pro	1:1:1	ChCl:U:Gly	1:2:2	Suc:Glc:U	1:1:1
B:EG	1:2	ChCl:Xyl	2:1	Sor:EG	1:1:2
B:Arg	1:1	ChCl:Xyol	5:2	Sol:EG	1:2
B:His	1:1	CA:Fru	1:1	Xyl:EG	1:2
B:Lys	1:1	CA:Glc	1:1	Me:Cam	1:1
B:Xyl	1:1	CA:Glc:Gly	1:1:1	Me:Cam	4:1
B:Suc	4:1	CA:Sol	2:3	Me:EU	1:1
ChCl:CA	2:1	CA:Suc	1:1	Me:PA	1:1
ChCl:CA	1:1	Fru:EG	1:2	Me:SA	4:1
ChCl:EG	1:2	Fru:Glc:U	1:1:2	Me:C8	1:1
ChCl:Fru	1:1	Glc:EG	1:2	Me:C10	1:1
ChCl:Glc	2:1	Glc:Fru	1:1	Me:C18:2	1:1
ChCl:Glc	1:1	Glc:Fru:EG	1:1:2	Me:Ty	3:2
ChCl:Gly	1:2	Gly:Glc	2:1	Ty:C8	1:3
ChCl:Ma	1:1	Ma:Fru	2:1	Ty:C10	1:1
ChCl:Mal	4:1	Ma:Fru:Gly	1:1	Ty:Cou	3:2
ChCl:OxA	1:1	Ma:Glc	1:1:1		

Arg: arginin, B: betain, C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, CA: limunska kiselina, Cam: kamfor, ChCl: kolin klorid, Cou: kumarin, EG: etilen glikol, EU: eukaliptol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, His: histidin, Lys: lizin, Ma: jabučna kiselina, Me: mentol, OxA: oksalna kiselina, PA: perilna kiselina, Pro: prolin, SA: salicilna kiselina, Suc: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, Ty: timol, U: urea, Xyl: ksiloza, Xyol: ksilitol.

3.2.2. Priprema i karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

3.2.2.1. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

NADES-i su pripremljeni miješanjem dviju komponenti u specifičnom molarnom omjeru (Tablica 5). Prema tom omjeru izračuna se masa komponenata otapala te masa vode tako da odgovara masenom udjelu vode od 30 % (w/w). Komponente otapala i voda se odvažu te pomiješaju u plastičnoj *Falcon* tubi ($V = 50$ mL) te se smjesa homogenizira miješanjem u orbitalnom homogenizatoru pri temperaturi od 60 °C sve dok ne nastane tekuća, viskozna, homogena i prozirna smjesa. Pripremljena otapala se čuvaju zatvorena na sobnoj temperaturi do upotrebe.

Tablica 5. Molarni omjeri pripremljenih NADES-a te udio vode u istima

NADES	Kratika	Molarni omjer	Udio vode (%)
Betain:glukoza	B:Glc _{1:1}	1:1	30
Betain:glukoza	B:Glc _{5:2}	5:2	
Betain:saharoza	B:Suc	4:1	
Betain:glicerol	B:Gly	1:2	
Betain:jabučna kiselina	B:MA	1:1	

3.2.2.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Ispitivani parametri karakterizacije NADES-a obuhvaćali su mjerenje viskoznosti, gustoće, pH vrijednosti i polarnosti otapala na sobnoj temperaturi od 25 °C.

Mjerenje viskoznosti pripremljenih otapala

Viskoznost prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala izmjerena je pomoću rotacijskog viskozimetra Anton Paar QC 300 (Anton Paar, Graz, Austrija). Nastavak uređaja za mjerenje napuni se otapalom te se pokreće mjerenje odabirom željenih postavka rada i uputa prikazanih na ekranu uređaja. Za svaki uzorak provedena su 3 paralelna mjerenja, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost.

Mjerenje gustoće pripremljenih otapala

Gustoća NADES-a izmjerena je pomoću piknometra, instrumenta koji služi za precizno određivanje gustoće tekućina. Metoda se temelji na Archimedovom principu i uključuje mjerenje mase tekućine u piknometru, a potom preračunavanje gustoće na temelju poznatog

volumena piknometra. U piknometar je dodano otprilike 2 mL svakog otapala. Zatvaranjem piknometra, višak tekućine izlazi van, omogućujući točno određeni volumen otapala. Masa piknometra s otapalom zatim je izmjerena na preciznoj vagi. Oduzimanjem mase praznog piknometra od ukupne mase dobivena je masa određenog NADES-a. Gustoća NADES-a je izračunata pomoću mase otapala i poznatog volumena piknometra.

Mjerenje pH vrijednosti pripremljenih otapala

Vrijednost pH NADES-a određena je pomoću unaprijed kalibriranog univerzalnog uređaja za mjerenje pH modela Mettler Toledo/S220. Mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi od 25 °C uranjanjem elektrode u otapalo te očitavanjem vrijednosti prikazanih na ekranu uređaja nakon stabilizacije vrijednosti.

Određivanje polarnosti pripremljenih otapala

Polarnost pripremljenih NADES-a određena je pomoću solvatokromne probe *Nile red*. Crvena stock otopina koncentracije 1,0 g L⁻¹ pripremljena je u etanolu i pohranjena na 4 °C. Uzorci za spektrofotometar su pripremljeni u *Eppendorf* kivetama od 2 mL prema slijedećem; 1,5 mL uzorka (NADES-a) pomiješano je sa 0,5 mL 100x razrijeđene matične otopine *Nile reda*. Zatim je u kivete dodano 800 µl tako pripremljenog uzorka te je apsorbancija uzoraka i slijepe probe (destilirana voda) mjerena u rasponu od 340 - 800 nm primjenom spektrofotometra.

3.2.3. Ekstrakcija polifenola i glukozinolata iz brokule

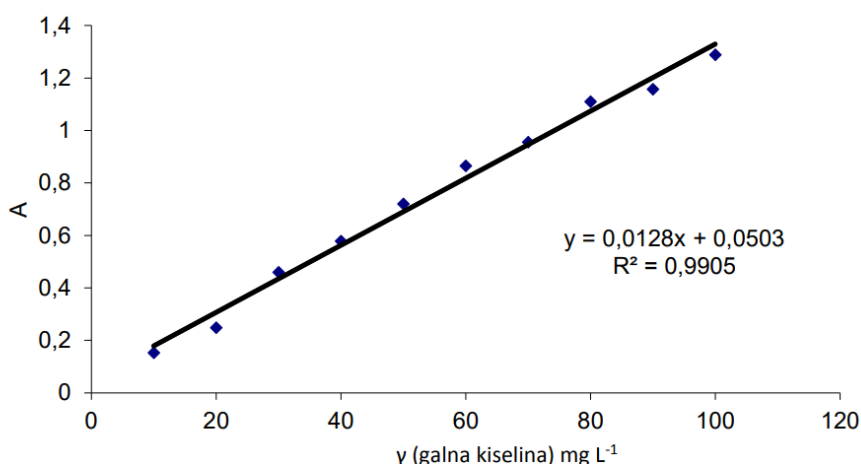
U plastične *Falcon* tube odvaži se 1 g brokule i doda se 10 mL unaprijed pripremljenog NADES-a (NADES-i navedeni u Tablici 5). Smjesa se zatim termostatira na 75 °C tijekom 10 minuta kako bi se inaktivirala sulfataza. Ekstrakcija se provodi u ultrazvučnoj kupelji tijekom 15 minuta pri 25 °C. Svakih 5 minuta otopine su vađene iz kupelji i kratko homogenizirane na vrtložnom homogenizatoru kako bi se osigurala homogenost i poboljšala učinkovitost ekstrakcije. Na kraju je provedena vakuum filtracija preko Büchnerovog lijevka, pri čemu je talog odbačen, a filtrat pohranjen za daljnju analizu. Opisani postupak na isti je način proveden i s referentim otapalom 70 %-tnim etanolom (v/v).

3.2.4. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom

Folin–Ciocalteu metoda najčešće je korištena metoda za određivanje ukupnih polifenolnih spojeva, a temelji se na redukciji Folin-Ciocalteu (FC) reagensa u prisutnosti polifenola. FC reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline koje se pri oksidaciji polifenola

reduciraju u plavo obojeni volframov i molibdenov oksid u lužnatom mediju. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku, a određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 760 nm (Geremu i sur., 2016).

Pripremljeni ekstrakti brokule razrijede se 20 puta s destiliranom vodom. Zatim se u staklene epruvete otpipetira 250 μL ekstrakta i 1,25 mL 10x razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa. Slijepa proba priprema se na isti način, ali umjesto ekstrakta dodaje se otapalo u kojemu je provedena ekstrakcija. Uzorci se nakon toga vorteksiraju i inkubiraju 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije doda se 1 mL otopine natrijevog karbonata (75 g L^{-1}). Uzorci se vorteksiraju i zatim inkubiraju u vodenoj kupelji na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 minuta. Reakcija se naglo prekida stavljanjem uzoraka u ledenu kupelj, nakon čega se apsorbancija mjeri na valnoj duljini od 760 nm koristeći UV/VIS-spektrofotometar (Ainsworth i Gillespie, 2007). Mjerenja se provode u tri paralele. Koncentracija ukupnih polifenola računa se kao ekvivalent galne kiseline pomoću baždarnog dijagrama (Slika 9). Rezultati mjerenja izražavaju se kao mg polifenola po gramu suhe tvari brokule.



Slika 9. Baždarni dijagram ovisnosti koncentracije galne kiseline o apsorbanciji

Izračun se provodi na slijedeći način:

$$Y = ax + b \quad [1]$$

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

gdje je:

Y – apsorbancija pri 760 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

3.2.5. Praćenje stabilnosti polifenola

Za potrebe ispitivanja stabilnosti dobiveni ekstrakti brokule inkubirani su tijekom 28 dana na sobnoj temperaturi od 25 °C te na temperaturi od 4 °C u hladnjaku. Analiza stabilnosti polifenola provedena je u NADES-ima i referentom otapalu etanolu mjerenjem promjene koncentracije ukupnih polifenola Folin–Ciocalteu metodom opisanom u poglavlju 3.2.4. *Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom*

3.2.6. Određivanje pojedinačnih alifatskih i indolnih glukozinolata

Određivanje glukozinolata provedeno je prema međunarodnoj standardnoj ISO metodi (ISO 10633-1, 1995).

3.2.6.1. Ekstrakcija ukupnih glukozinolata iz brokule

U epruvete je odvagana usitnjena brokula (1 g) te je u svaku od pet epruveta dodan odgovarajući NADES (10 mL). Osim toga, u dvije epruvete je umjesto NADES-a dodano 10 mL etanola (70 %, v/v). Sadržaj svake epruvete homogeniziran je pomoću vorteksa, nakon čega su epruvete uronjene u prethodno termostatiranu vodenu kupelj na 75 °C. Inkubacija u vodenoj kupelji trajala je 10 minuta, te su potom epruvete prebačene u ultrazvučnu kupelj. Inkubacija u ultrazvučnoj kupelji provodila se na 30 °C i ukupno je trajala 15 minuta. Sadržaji epruveta su svakih 5 minuta homogenizirani pomoću vorteksa. Ekstrakti su potom odvojeni vakuum filtracijom. Za daljnju analizu glukozinolata, po 250 µL svakog ekstrakta pomiješano je sa 750 µL otopine sinigrina. Uzorci su do daljnje analize čuvani na -20 °C.

3.2.6.2. Desulfatacija pripremljenih ekstrakata pomoću enzima sulfataze

Postupak desulfatacije pripremljenih ekstrakata proveden je uz korištenje već gotovih kolona za desulfataciju. Na kolonu je prvo dodano 0,7 mL ionskog izmjenjivača *Fast DEAE Sepharose CL-6B* te 2 mL otopine imidazol-formijata. Nakon što je sav imidazol-formijat iskapao, na kolonu je dva puta dodano po 1 mL destilirane vode. Kada je iskapala i voda, na svaku je kolonu dodan 1 mL odgovarajućeg ekstrakta te dva puta po 1 mL acetatnog pufera (0,02 M). Nakon što je iskapao sav pufer, dodano je 100 µL sulfataze, enzima koji prevodi glukozinolate u desulfatirani oblik. Sulfataza je ostavljena da djeluje 18 sati pri sobnoj temperaturi. Elucija je provedena s 1,5 mL destilirane vode, a eluati su se hvatali u nove, čiste epruvete. Dobiveni se eluat analizira tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

3.2.6.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti desulfoglukozinolata

Kromatografski uvjeti:

Kromatografska kolona: Supelcosil 15cm x 4,6 mm i.d., 5 μ m

Pokretna faza: A - deionizirana voda B - acetonitril ($\gamma= 0,20$) u deioniziranoj vodi

Protok: 1,0 mL min⁻¹

Eluiranje: gradijentno, 0-1 min 100% otapala A 1 - 20 min linearna promjena gradijenta do 100% B 20-25 min linearna promjena gradijenta do 100 % A 25 - 30 min uravnoteženje kolone, 100 % A

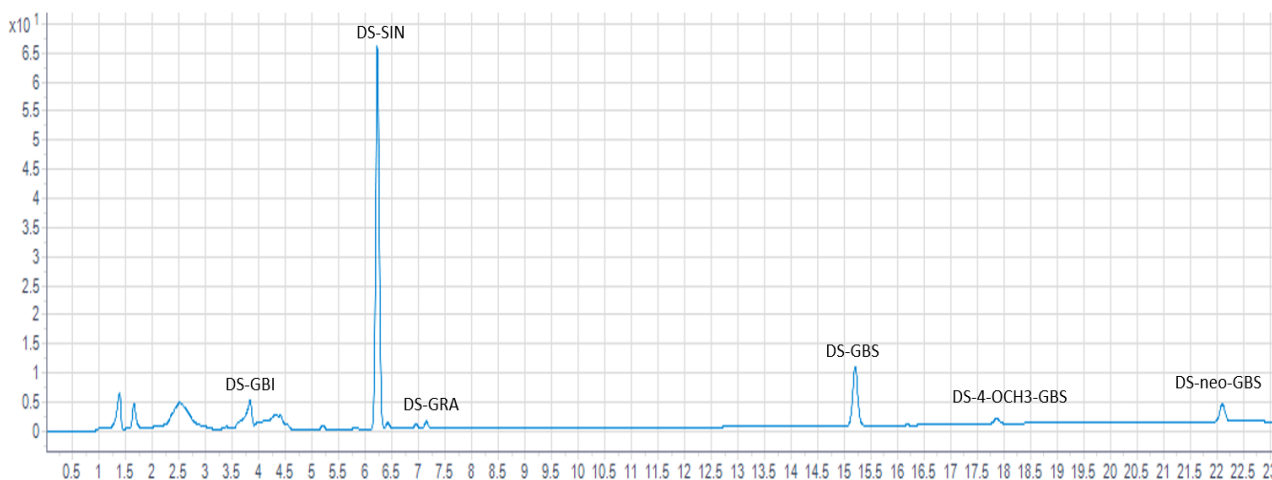
Detekcija: UV, $\lambda=229$ nm

Temperatura kolone: 30 °C

Vrijeme trajanja analize: 30 min

Prema primijenjenoj metodi desulfoglukozinolati se s kolone eliminiraju u nizu padajuće polarnosti.

Identifikacija desulfoglukozinolata provedena je prema redoslijedu izlaženja pikova s kromatografske kolone (Tablica 6) te je potvrđena UV spektrima. Tipičan kromatogram desulfoglukozinolata brokule prikazan je na Slici 10.



Slika 10. Kromatogram desulfoglukozinolata etanolnog ekstrakta brokule (EtOH)

Kromatografski uvjeti: kolona: Supelcosil 15 cm x 4,6 mm i.d., 5 μ m; pokretna faza: A-voda, B-20 %-tni acetonitril; gradijentno eluiranje protok: 1,0 mL min⁻¹; detekcija: UV, $\lambda=229$ nm.

DS-GBI = desulfoglukoiberin, DS-SIN = desulfosinigrin, DS-GRA = desulfoglukorafanin, DS-GBS = desulfoglukobrasicin, DS-4-OCH3-GBS = desulfo-metoksiglukobrasicin, DS-neo-GBS = desulfo-neo-glukobrasicin

Tablica 6. Redoslijed eluiranja desulfoglukozinolata (DSGSL) s kromatografske kolone i faktori preračunavanja

Redoslijed eluiranja	Desulfoglukozinolat	Faktor preračunavanja
1	Desulfoglukoiberin (DS-GBI)	1,07
2	Desulfosinigrin (DS-SIN)	1,00
3	Desulfoglukorafanin (DS-GRA)	1,07
4	Desulfoglukobrasicin (DS-GBS)	0,29
5	Desulfo-metoksiglukobrasicin (DS-4-OCH3-GBS)	0,25
6	Desulfo- <i>neo</i> -glukobrasicin (DS- <i>neo</i> -GBS)	0,20

Kvantifikacija pojedinačnih glukozinolata provodi se metodom unutarnjeg standarda. Udio pojedinih glukozinolata u ekstraktu brokule računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$GLS = \frac{A_g}{A_s} \times \frac{n}{m} \times Kg \text{ } [\mu\text{mol g svježe tvari brokule}] \quad [3]$$

gdje je:

A_g - površina pika pojedinog desulfoglukozinolata

A_s - površina pika desulfatiranog unutarnjeg standarda, sinigrina

n - množina unutarnjeg standarda (μmol)

m - masa analiziranog uzorka (g)

Kg - faktor odnosa apsorbancije pojedinog desulfoglukozinolata prema apsorbanciji desulfatiranog unutarnjeg standarda; različit za svaki glukozinolat

3.2.7. Praćenje stabilnosti alifatskih i indolnih glukozinolata

Za potrebe ispitivanja stabilnosti dobiveni ekstrakti brokule inkubirani su tijekom 28 dana na sobnoj temperaturi od 25 °C te na temperaturi od 4 °C u hladnjaku. Analiza stabilnosti glukozinolata provedena je u NADES-ima i referentom otapalu etanolu mjerenjem promjene koncentracije alifatskih i indolnih glukozinolata metodom opisanom u poglavlju 3.2.6. *Određivanje pojedinačnih alifatskih i indolnih glukozinolata.*

3.2.8. Određivanje antioksidativnog kapaciteta primjenom ORAC metode

ORAC (*engl.* Oxygen Radical Absorbance Capacity) metoda temelji se na stvaranju slobodnih radikala, pri čemu kao izvor služi AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorid). Peroksil radikali ($\text{ROO}\cdot$) oksidiraju fluorescein što dovodi do smanjenja fluorescence čija se vrijednost mjeri spektrofotometrijski. Kao standard koristi se Trolox (6-

hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina; u vodi topiv analog vitamina E) za kojeg je dokazano da ima jako antioksidacijsko djelovanje (Giordano i sur., 2020).

Uzorci za mjerenje pripremljeni su na sljedeći način: u epruvetu je dodano 2,250 mL otopine fluoresceina te 0,375 mL uzorka prethodno razrijeđenog 100 puta. Otopine su potom termostatirane na 37 °C tijekom 30 minuta. Nakon toga, sadržaj svake epruvete pretočen je u posebnu kivetu za mjerenje te je dodano 0,375 mL otopine AAPH. Mjerenje se provodilo pomoću fluorescentnog spektrofotometra na temperaturi od 37 °C tijekom 30 minuta. Tijekom svake minute mjerena je promjena intenziteta fluorescencije pri $\lambda_{\text{eks}} = 485 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$. Prilikom pripreve slijepe probe, umjesto uzorka dodano je 0,375 mL fosfatnog pufera (0,075 M). Na isti način određena je ORAC vrijednost standarda, otopine Troloxa koncentracije $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ koja je dobivena iz matične otopine koncentracije $2,497 \times 10^3 \mu\text{mol L}^{-1}$.

ORAC-vrijednosti računaju se prema formulama:

$$\text{Relativna ORAC-vrijednost} = \left(\frac{AUCU - AUCSP}{AUCTRX - AUCSP} \right) \times k \times a \times h \quad [\mu\text{mol Trolox ekvivalent g}^{-1} \text{ uzorka}] \quad [4]$$
$$AUC = 0,5 + (R2/R1) + (R3/R1) + \dots + (Rn/R1)$$

Pri čemu je:

AUCU = antioksidacijski kapacitet uzorka

AUCSP = antioksidacijski kapacitet slijepe probe

AUCTRX = antioksidacijski kapacitet Troloxa

k = faktor razrjeđenja

a = molarna koncentracija Troloxa

$$h = \frac{V(\text{ekstrakta})}{g(\text{uzorka})}$$

3.2.9. Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata brokule na staničnim linijama

HaCaT i HeLa

Za potrebe umožavanja biomase stanica i postavljanja pojedinačnih pokusa, stanične linije HaCaT i HeLa održavane su u T-bocama. Svaka 3-4 dana stanice su pasažirane kako bi se održale u eksponencijalnoj fazi rasta. Svakodnevno su promatrane inverznim mikroskopom, pri čemu je praćeno prihvaćanje za podlogu, brojnost stanica te njihova morfološka svojstva. Prije postavljanja pokusa stanice su tretirane tripsinom kako bi se odvojile od podloge. Potom je metodom tripan-plavo određen ukupan broj stanica te je izračunat volumen suspenzije stanica potreban za naciepljivanje ploče s 96 jažica za svaku staničnu liniju. U svaku jažicu na ploči s 96 jažica naciepljeno je po 100 μL suspenzije stanica. Obje stanične linije naciepljene su u početnoj koncentraciji 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon 24 sata, stanice su tretirane ekstraktima

brokule u odabranom DES-u u volumnim udjelima: 0,5, 1,25, 2,5 i 5 (v/v). Za svaki su pokus postavljene 3 paralele. Nakon tretmana koji je trajao 72 sata, primjenom kolorimetrijske MTS metode određena je vijabilnost stanica koja je izražena kao postotak preživljenja u odnosu na kontrolne stanice.

3.2.9.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Prilikom određivanja broja stanica bojom tripan-plavo (0,4 % m/v), najprije je uklonjen medij te je površina za uzgoj isprana sterilnim PBS puferom, nakon čega je dodano 100 μL tripsina. Stanice su vraćene u inkubator na otprilike 5 minuta kako bi se uslijed djelovanja tripsina uspješno odvojile od podloge. Odvajanje stanica od podloge praćeno je inverznim mikroskopom. Tako dobivena suspenzija stanica resuspendirana je te je alikvot od 20 μL pomiješan s 20 μL boje tripan-plavo. Zbog oštećenja membrane, ova boja mrtve stanice boji plavo te je omogućeno njihovo razlikovanje od živih stanica. Potom je 20 μL tako pripremljene suspenzije nanoseno u Neubauer-ovu komoricu za brojanje i stanice su izbrojane u 4 kvadrata. Za svaki uzorak određen je broj stanica u najmanje tri paralelne probe.

Broj stanica po mL suspenzije izračunat je iz izraza:

$$\text{Br. stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = (\text{zbroj izbrojenih stanica u 4 kvadratića}) \times 5000 \quad [5]$$

3.2.9.2. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom

MTS test odnosno The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je kolorimetrijska metoda koja se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o nutrijentima, faktorima rasta, citokinima i mitogenima. Osim toga, koristi se i za analizu djelovanja citotoksičnih i citostatičkih spojeva te za određivanje protutijela koja inhibiraju rast stanica. Tetrazolijeva sol MTS-a [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol] se djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza reducira do formazana ljubičaste boje koji je otopljen u mediju. Što je veći broj živih stanica, aktivnost mitohondrijskih dehidrogenaza u uzorku bit će izraženija. Intenzitet aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza proporcionalan je povećanju intenziteta boje koje daje obojeni produkt formazan, iz čega je moguće odrediti broj živih stanica u kulturi. Stanice su tretirane različitim koncentracijama ekstrakata brokule tijekom 72 sata, nakon čega je u svaku jažicu dodano 10 μL MTS reagensa. Ploče su vraćene na inkubaciju u trajanju 3 - 4 h, a potom su kratko (30 s) stavljene na tresilicu. Intenzitet razvijene boje u odnosu na slijepu probu određuje se spektrofotometrijski pri 492 nm primjenom čitača ploča. Preživljenje stanica izražava se kao postotak omjera apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica i računa se prema izrazu:

$$\text{Postotak preživljenja stanica} = [\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ (uzorka)} / \text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ (kontrola)}] \times 100 \quad [6]$$

3.2.10. Statistička obrada podataka

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [7]$$

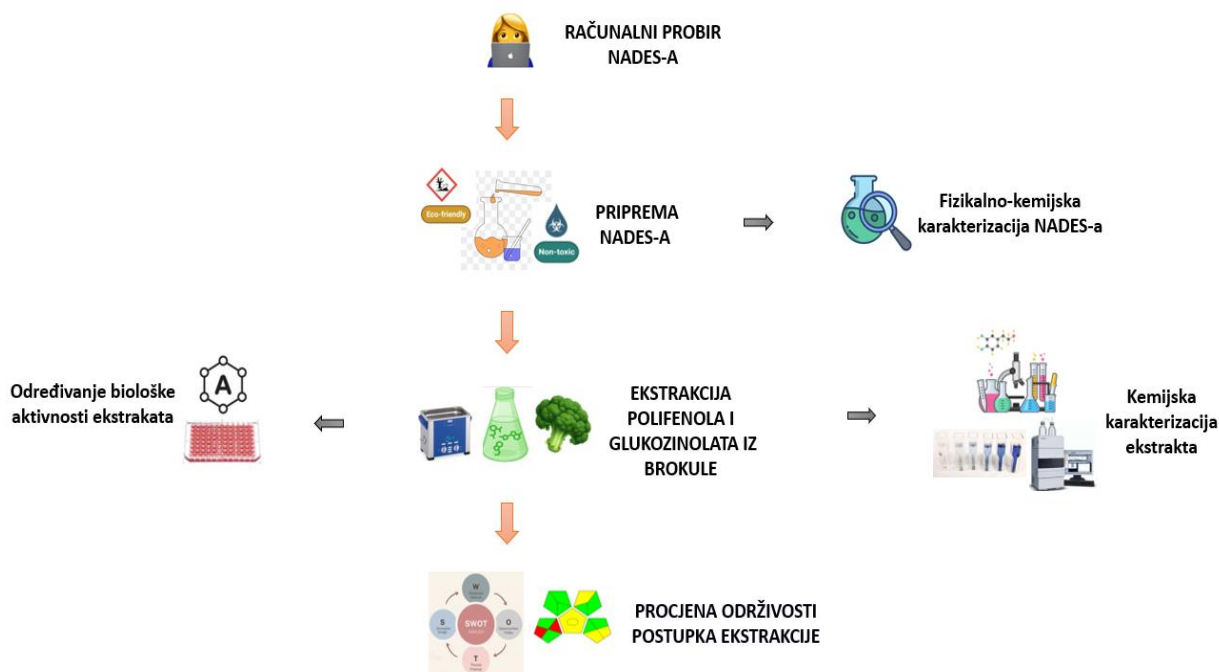
S pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S.D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [8]$$

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovog rada istražena je mogućnost primjene NADES-a u ekstrakciji polifenola i glukozinolata iz brokule u cilju razvoja biološki aktivnih i stabilnih tekućih ekstrakata dobivenih održivim i ekonomičnim postupkom. U tu svrhu, prvo je računalnim probirom sužen broj kandidata NADES-a kako bi se smanjio broj potrebnih eksperimenata te osigurala ušteda potrebnih kemikalija. Potom su odabrani NADES-i, u kojima je topljivost željenih komponenti bila najveća, primijenjeni za ekstrakciju polifenola i glukozinolata. Dobivenim ekstraktima određen je sadržaj ukupnih polifenola i profil glukozinolata te antioksidativna aktivnost, nakon čega je praćena stabilnost ovih spojeva tijekom skladištenja ekstrakata na sobnoj temperaturi odnosno u hladnjaku na 4 °C. Ekstrakt u NADES-u, koji je pokazao najveću antioksidativnu aktivnost, odabran je za ispitivanje biološkog učinka na ljudskim stanicama kože (stanična linija HaCaT) te tumorskim stanicama (stanična linija HeLa). Nadalje, koristeći parametre zelene kemije i kompleksni indeks ekološke prihvatljivosti analitičke procedure, procijenjena je ekološka održivost te isplativnost provedene ekstrakcije pomoću NADES-a. Na poslijetku, S.W.O.T. analizom procjeni su unutarnji i vanjski čimbenici koji mogu utjecati na održivost proučavanog postupka. Shema istraživanja prikazana je na Slici 11.

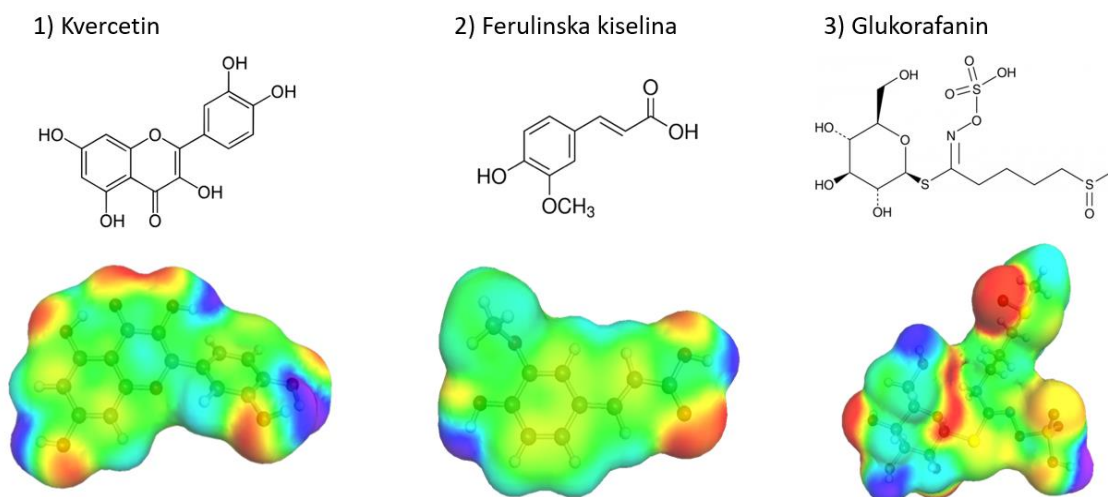


Slika 11. Shema provedenog istraživanja

4.1. Računalni probir prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ekstrakciju polifenola i glukozinolata

Jedna od ključnih prednosti korištenja NADES-a u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva je njihova kemijska raznolikost i prilagodljivost. Naime, variranjem komponenti (donora i akceptora vodikove veze) te finim podešavanjem sadržaja vode, NADES-i se mogu prilagoditi specifičnim potrebama određenog procesa. Prvotno se procjenjivalo da postoji oko 10^6 mogućih strukturnih varijacija NADES-a, ali s kontinuiranim izvještajima o novim komponentama, višekomponentnim NADES-ima i različitim mogućim molarnim omjerima (uključujući i vodu kao komponentu NADES-a), broj mogućih strukturnih kombinacija danas se procjenjuje neograničenim (Panić i sur., 2021b). Ovaj veliki kemijski prostor nudi izvanredan potencijal za dizajn otapala, ali istovremeno postavlja značajan izazov: kako identificirati "idealni" NADES koji ispunjava različite kriterije za ekstrakciju neke biološki aktivne komponente?

Odabir odgovarajućeg NADES-a za ovu svrhu tradicionalnim eksperimentalnim metodama pokušaja i pogreške dugotrajan je i skup proces. Kako bi se prevladale poteškoće eksperimentalnih metoda, u posljednje se vrijeme koriste računalne metode odabira najboljeg otapala. Trenutno se COSMO-RS smatra jednom od najpreciznijih *ab initio* računalnih metoda dostupnih za rangiranje otapala (Klamt i sur., 1998). Iako ova metoda nije izvorno razvijena za NADES-e, već za organska otapala, moguće je izraditi vlastitu bazu podataka o ovim otapalima te ju koristiti za procjenu njihovih termodinamičkih parametara otapala i topljivost određenih molekula u istima. Takva baza podataka izrađena je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet te je korištena u ovom radu u svrhu procjene topljivosti polifenola i glukozinolata u 71 različitim NADES-a prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1. *Računalno predviđanje topljivosti polifenola i glukozinolata u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima*. Obzirom da su polifenoli odnosno glukozinolati skupine raznovrsnih spojeva, za procjenu topljivosti uzeti su u obzir u brokuli najzastupljeniji polifenoli, kvercetin i ferulinska kiselina, te najznačajniji predstavnik glukozinolata u brokuli, glukorafanin. Na Slici 12 prikazane su strukture i optimirane molekule (.cosmo) kvercetina, ferulinske kiseline i glukorafanina korištene kao ulazni parametri za računalne simulacije.



Slika 12. Strukture kvercetina, ferulinske kiseline i glukorafanina koje služe kao ulazni parametri za COSMOtherm proračune

Dobiveni logaritmi koeficijenta aktivnosti pri beskonačnom razrjeđenju ($\ln(\gamma)$) kvercetina i ferulinske kiseline, koji su mjera topljivosti određene molekule u otapalu, prikazani su u Tablicama 7 i 8, a glukorafanina u Tablicama 9 i 10. Izlazni parametar COSMOtherm procjene topljivosti je logaritam koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$, koji govori o topljivosti ispitivanog spoja u odabranom otapalu. Manji koeficijent aktivnosti znači veću topljivost ispitivane molekule u promatranom otapalu. Priložena skala Tablicama 7 - 10 pokazuje da u svrhu potrage za otapalom koje može najbolje otopiti željeni spoj treba težiti vrijednostima u području hladnijih boja odnosno rasponu $[-\infty ; 0]$ (Panić i sur., 2021a).

Prema podacima prikazanim u Tablicama 7 - 10 vidljivo je da su hidrofilni NADES-i prikladniji za otapanje odabranih polifenola i glukozinolata od hidrofobnih NADES-a. To je u skladu s očekivanjima obzirom na strukturu odabranih molekula koje sadrže polarne regije (Slika 12). Nadalje, najveću topljivost u polarnim NADES-ima pokazuje kvercetin, zbog dodatnih hidroksilnih skupina koje mu povećavaju polarnost, dok ferulinska kiselina i glukorafanin imaju nešto manju topljivost. Za sve odabrane polifenole i glukozinolate vidljiv je trend smanjivanja topljivosti s povećanjem udjela vode, što odgovara dostupnoj literaturi (Panić i sur., 2021a). Zaključno, za ekstrakciju polifenola i glukozinolata odabrana su otapala koja sadrže betain u kombinaciji s glukozom, saharozom, glicerolom odnosno jabučnom kiselinom s masenim udjelom vode od 30 % (w/w) (Tablica 11) te su pripremljena i korištena u nastavku istraživanja.

Tablica 7. Prikaz $\ln(\gamma)$ vrijednosti kvercetina i ferulinske kiseline u ispitanim hidrofilnim NADES-ima na bazi betaina i kolin-klorida

			udio vode % (w/w)					
			10	30	50	10	30	50
Hidrofilni DES		Molarni omjer	kvercetin			ferulinska kiselina		
1	B:CA	1:1						
2	B:Glc	5:2						
3	B:Glc	1:1						
4	B:Gly	1:2						
5	B:OxA:Gly	1:2:1						
6	B:Ma	1:1						
7	B:Ma:Glc	1:1:1						
8	B:Ma:Pro	1:1:1						
9	B:EG	1:2						
10	B:Arg	1:1						
11	B:His	1:1						
12	B:Lys	1:1						
13	B:Xyl	1:1						
14	B:Suc	4:1						
15	ChCl:CA	2:1						
16	ChCl:CA	1:1						
17	ChCl:EG	1:2						
18	ChCl:Fru	1:1						
19	ChCl:Glc	2:1						
20	ChCl:Glc	1:1						
21	ChCl:Gly	1:2						
22	ChCl:Ma	1:1						
23	ChCl:Ma	4:1						
24	ChCl:OxA	1:1						
25	ChCl:Pro:Ma	1:1:1						
26	ChCl:Suc	2:1						
27	ChCl:Sol	1:1						
28	ChCl:Sol	2:3						
29	ChCl:Sor	1:1						
30	ChCl:U	1:2						
31	ChCl:U:EG	1:2:2						
32	ChCl:U:Gly	1:2:2						
33	ChCl:Xyl	2:1						
34	ChCl:Xyol	5:2						

Skala $\ln(\gamma)$ vrijednosti	
	>2
	0 - 2
	-3 - 0
	-6 - (-3)
	-10 - (-6)
	< -10

Arg: arginin, B: betain, CA: limunska kiselina, ChCl: kolin klorid, EG: etilen glikol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, His: histidin, Lys: lizin, Ma: jabučna kiselina, OxA: oksalna kiselina, Pro: prolin, Suc: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, U: urea, Xyl: ksiloza, Xyol: ksilitol.

Tablica 8. Prikaz $\ln(\gamma)$ vrijednosti kvercetina i ferulinske kiseline u ispitanim hidrofilnim NADES-ima na bazi organskih kiselina i šećera te u hidrofobnim NADES-ima

			udio vode % (w/w)					
			10	30	50	10	30	50
Hidrofilni DES		Molarni omjer	kvercetin			ferulinska kiselina		
35	CA:Fru	1:1						
36	CA:Glc	1:1						
37	CA:Glc:Gly	1:1:1						
38	CA:Sor	2:3						
39	CA:Suc	1:1						
40	Fru:EG	1:2						
41	Fru:Glc:U	1:1:2						
42	Glc:EG	1:2						
43	Glc:Fru	1:1						
44	Glc:Fru:EG	1:1:2						
45	Gly:Glc	2:1						
46	Ma:Fru	2:1						
47	Ma:Fru:Gly	1:1						
48	Ma:Glc	1:1:1						
49	Ma:Glc:Gly	1:1						
50	Ma:Sor:Gly	1:1:1						
51	Ma:Suc	1:1:2						
52	Pro:Fru:Gly	2:1						
53	Pro:Ma	1:1:1						
54	Suc:EG	1:1						
55	Suc:Glc:Fru	1:2						
56	Suc:Glc:U	1:1:1						
57	Sor:EG	1:1:2						
58	Sol:EG	1:2						
59	Xyl:EG	1:2						
Hidrofobni DES		Molarni omjer	kvercetin			ferulinska kiselina		
60	Me:Cam	1:1						
61	Me:Cam	4:1						
62	Me:EU	1:1						
63	Me:PA	1:1						
64	Me:SA	4:1						
65	Me:C8	1:1						
66	Me:C10	1:1						
67	Me:C18:3	1:1						
68	Me:Ty	3:2						
69	Ty:C8	1:3						
70	Ty:C10	1:1						
71	Ty:Cou	3:2						

Skala $\ln(\gamma)$ vrijednosti	
	>2
	0 - 2
	-3 - 0
	-6 - (-3)
	-10 - (-6)
	< -10

C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, CA: limunska kiselina, Cam: kamfor, Cou: kumarin, EG: etilen glikol, EU: eukaliptol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, Ma: jabučna kiselina, Me: mentol, PA: perilna kiselina, Pro: prolin, SA: salicilna kiselina, Suc: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, Ty: timol, U: urea, Xyl: ksiloza.

Tablica 9. Prikaz $\ln(\gamma)$ vrijednosti glukorafanina u ispitanim prirodnim hidrofilnim NADES-ima na bazi betaina i kolin klorida

		Molarni omjer	udio vode % (w/w)		
			10	30	50
Hidrofilni DES			Glukorafanin		
1	B:CA	1:1			
2	B:Glc	1:1			
3	B:Gly	1:2			
4	B:OxA:Gly	1:2:1			
5	B:Ma	1:1			
6	B:Ma:Glc	1:1:1			
7	B:Ma:Pro	1:1:1			
8	B:EG	1:2			
9	B:Arg	1:1			
10	B:His	1:1			
11	B:Lys	1:1			
12	B:Xyl	1:1			
13	B:Suc	4:1			
14	ChCl:CA	2:1			
15	ChCl:CA	1:1			
16	ChCl:EG	1:2			
17	ChCl:Fru	1:1			
18	ChCl:Glc	2:1			
19	ChCl:Glc	1:1			
20	ChCl:Gly	1:2			
21	ChCl:Ma	1:1			
22	ChCl:Ma	4:1			
23	ChCl:OxA	1:1			
24	ChCl:Pro:Ma	1:1:1			
25	ChCl:Suc	2:1			
26	ChCl:Sol	1:1			
27	ChCl:Sol	2:3			
28	ChCl:Sor	1:1			
29	ChCl:U	1:2			
30	ChCl:U:EG	1:2:2			
31	ChCl:U:Gly	1:2:2			
32	ChCl:Xyl	2:1			
33	ChCl:Xyol	5:2			

Skala $\ln(\gamma)$ vrijednosti	
	>2
	0 - 2
	-3 - 0
	-6 - (-3)
	-10 - (-6)
	< -10

Arg: arginin, B: betain, CA: limunska kiselina, ChCl: kolin klorid, EG: etilen glikol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, His: histidin, Lys: lizin, Ma: jabučna kiselina, OxA: oksalna kiselina, Pro: prolin, Suc: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, U: urea, Xyl: ksiloza, Xyol: ksilitol.

Tablica 10. Prikaz $\ln(\gamma)$ vrijednosti glukorafanina u ispitanim prirodnim hidrofilnim NADES-ima na bazi organskih kiselina i šećera te u hidrofobnim NADES-ima

			udio vode % (w/w)		
			10	30	50
Hidrofilni DES		Molarni omjer	Glukorafanin		
34	CA:Fru	1:1			
35	CA:Glc	1:1			
36	CA:Glc:Gly	1:1:1			
37	CA:Sor	2:3			
38	CA:Suc	1:1			
39	Fru:EG	1:2			
40	Fru:Glc:U	1:1:2			
41	Glc:EG	1:2			
42	Glc:Fru	1:1			
43	Glc:Fru:EG	1:1:2			
44	Gly:Glc	2:1			
45	Ma:Fru	1:1			
46	Ma:Fru:Gly	1:1:1			
47	Ma:Glc	1:1			
48	Ma:Glc:Gly	1:1:1			
49	Ma:Sor:Gly	1:1:2			
50	Ma:Suc	2:1			
51	Pro:Fru:Gly	1:1:1			
52	Pro:Ma	1:1			
53	Suc:EG	1:2			
54	Suc:Glc:Fru	1:1:1			
55	Suc:Glc:U	1:1:2			
56	Sor:EG	1:2			
57	Sol:EG	1:2			
58	Xyl:EG	1:2			
Hidrofobni DES		Molarni omjer	Glukorafanin		
59	Me:Cam	1:1			
60	Me:Cam	4:1			
61	Me:EU	1:1			
62	Me:PA	1:1			
63	Me:SA	4:1			
64	Me:C8	1:1			
65	Me:C10	1:1			
66	Me:C18:2	1:1			
67	Me:Ty	3:2			
68	Ty:C8	1:3			
69	Ty:C10	1:1			
70	Ty:Cou	3:2			

Skala $\ln(\gamma)$ vrijednosti	
	>2
	0 - 2
	-3 - 0
	-6 - (-3)
	-10 - (-6)
	< -10

C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, CA: limunska kiselina, Cam: kamfor, Cou: kumarin, EG: etilen glikol, EU: eukaliptol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, Ma: jabučna kiselina, Me: mentol, PA: perilna kiselina, Pro: prolin, SA: salicilna kiselina, Suc: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, Ty: timol, U: urea, Xyl: ksiloza

4.2. Priprema i karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

NADES-i odabrani na temelju računalnog probira, pripremljeni su i fizikalno-kemijski okarakterizirani prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2. *Priprema i karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala* (Tablica 11). Postupak pripreme NADES-a odlikuje se potpunim iskorištenjem bez stvaranja otpada (sve komponente dodane za pripravu „ugrađuju“ se u otapalo). Također, lako dostupne, biorazgradive i relativno jeftine sirovine ističu ekološku prihvatljivost i ekonomsku održivost pripreme ovih otapala (Yang, 2018).

Tablica 11. Fizikalno-kemijske karakteristike pripremljenih NADES-a

NADES	Molarni omjeri	Viskoznost [mPa·s]	Gustoća [g cm ⁻³]	pH	Polarnost [kcal mol ⁻¹]
B:Glc _{1:1}	1:1	71,49	1,20	7,24	49,21
B:Glc _{5:2}	5:2	53,45	1,20	7,85	49,90
B:Suc	4:1	54,13	1,19	7,71	49,90
B:Gly	1:2	25,70	1,17	7,03	49,72
B:MA	1:1	61,18	1,24	3,24	49,21
EtOH	-	1,20*	0,87	6,10	51,06

B: betain, Glc: glukoza, Suc: saharoza, Gly: glicerol, MA: jabučna kiselina, EtOH: 70 %-tni etanol

* PanReac AppliChem (2024)

Obzirom da su viskoznost i gustoća otapala izrazito važni za rukovanje otapalom, pogotovo u industrijskom mjerilu (Aten, 1996), pripremljenim NADES-ima određena su ova dva fizikalna svojstva, a vrijednosti prikazane u Tablici 11. Viskoznosti pripremljenih NADES-a kreću se u rasponu od 25,70 mPa·s do 71,49 mPa·s. Usporedbom rezultata može se zaključiti da sva pripremljena otapala imaju znatno veće vrijednosti viskoznosti od one za vodu (1,00 mPa·s) (Stanley i sur., 2002) odnosno referentno otapalo etanol (70 %-tna otopina u vodi, v/v) (1,20 mPa·s) (PanReac AppliChem, 2024). Ovi rezultati u skladu su s očekivanjima obzirom da je jedna od karakteristika NADES-a visoka vrijednost viskoznosti (Chemat i sur., 2019). Najveću vrijednost viskoznosti ima B:Glc_{1:1} (71,49 mPa·s), dok najmanju vrijednost pokazuje B:Gly (25,70 mPa·s). Na temelju rezultata iz tablice također se može primijetiti da NADES-i na bazi šećera (glukoza i saharoza) pokazuju slične visoke vrijednosti viskoznosti. Nadalje, B:MA također pokazuje veliku vrijednost viskoznosti koja iznosi 61,18 mPa·s. Ovakvi rezultati, odnosno dobivene vrijednosti viskoznosti NADES-a mogu biti ograničavajući faktor u primjeni

ovih otapala u industriji. Međutim, viskoznost otapala može se smanjiti povećanjem masenog udjela vode kao i povećanjem temperature (Rente i sur., 2022). Nadalje, vrijednosti gustoće pripremljenih NADES-a kreću se u manjem rasponu od $1,17 \text{ g cm}^{-3}$ do $1,24 \text{ g cm}^{-3}$, znatno veće od gustoće vode ($1,00 \text{ g cm}^{-3}$) i referentnog otapala ($0,87 \text{ g cm}^{-3}$). Najmanju vrijednost gustoće koja iznosi $1,17 \text{ g cm}^{-3}$, ima NADES koji pokazuje i najmanju vrijednost viskoznosti, a to je B:Gly. Ovi podaci sugeriraju da glicerol, kao donor vodikove veze, doprinosi smanjenju gustoće i viskoznosti u odnosu na druge donore poput šećera ili kiselina.

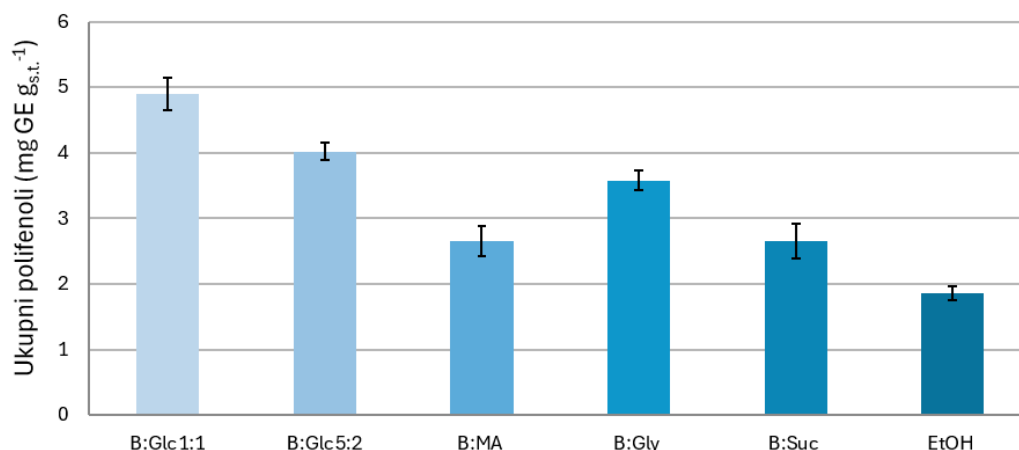
Kemijska svojstva otapala, poput pH i polarnosti, određuju topljivost i stabilnost otopljene komponente u otapalu (Singh i sur., 2021) te su stoga izmjerene za pripravljena otapala. Izmjerene pH vrijednosti većine NADES-a kreću se u neutralnom području (7,03 - 7,85). Veće odstupanje izmjereno je jedino kod B:MA, čija pH vrijednost iznosi 3,24. Budući da na pH vrijednost NADES-a najveći utjecaj imaju ishodne komponente otapala, za očekivati je da se pH vrijednost NADES koji sadrži organsku kiselinu nalazi u kiselom području. Nadalje, vrijednosti molarne tranzicijske energije (E_{NR}), mjere polarnosti otapala, ispitivanih NADES-a kreću se u rasponu $49,21 - 49,90 \text{ kcal mol}^{-1}$ pri čemu otapala s nižom vrijednosti ukazuju na veću polarnost. Također, svi NADES-i su polarniji od referentnog otapala s izmjerenom E_{NR} od $51,06 \text{ kcal mol}^{-1}$. Najmanja E_{NR} vrijednost izmjerena je za B:MA te iznosi $49,21 \text{ kcal mol}^{-1}$, što ukazuje na najveću polarnost. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem kojeg su proveli Dai i sur. (2013), kada su okarakterizirali fizikalno-kemijska svojstva 13 najčešće korištenih NADES-a. Zaključili su kako upravo NADES-e temeljene na organskim kiselinama karakterizira najveća polarnost, dok su manje polarni oni NADES-i u čijem se sastavu nalaze šećeri i polioli.

4.3. Priprava i karakterizacija ekstrakata brokule primjenom prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Ekstrakcija polifenola i glukozinolata provedena je korištenjem pripremljenih NADES-a: B:Glc_{1:1}, B:Glc_{5:2}, B:Suc, B:Gly i B:MA (Tablica 5). Odvaganim uzorcima brokule dodan je odgovarajući, unaprijed pripremljeni NADES te su navedeni spojevi ekstrahirani prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3. *Ekstrakcija polifenola i glukozinolata iz brokule*. U dobivenim ekstraktima određen je sadržaj i stabilnost polifenola i glukozinolata. Pored toga, ekstraktima je određen i antioksidacijski kapacitet te je ispitana biološka aktivnost odabranog ekstrakata brokule na staničnim linijama HaCaT i HeLa.

4.3.1. Sadržaj i stabilnost polifenola

Ukupni polifenoli u ekstraktima brokule određeni su primjenom Folin-Ciocalteu reagensa, prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.4. *Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom*. Rezultati mjerenja izraženi su kao ekvivalent galne kiseline (mg GE g^{-1} s.t.) i prikazani na Slici 13.



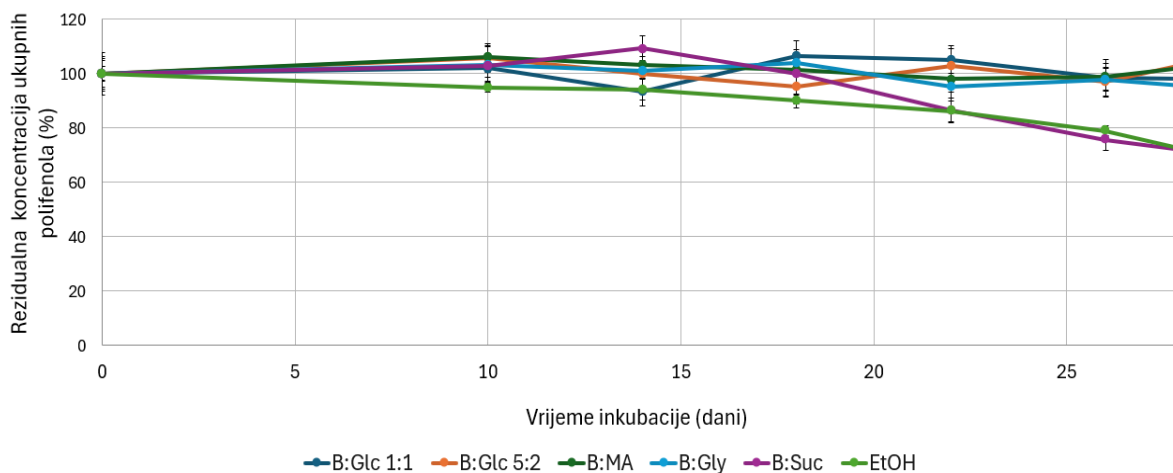
Slika 13. Maseni udio ukupnih polifenola u ekstraktima brokule izraženi kao ekvivalent galne kiseline

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$), s.t. = suha tvar

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2), B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)

Rezultati mjerenja ukazuju na najveći udio polifenola u ekstraktu pripremljenom korištenjem NADES-a na bazi glukoze, pri čemu je za ekstrakt pripremljen pomoću B:Glc_{1:1} ($4,90 \text{ mg GE g}^{-1}$ s.t.) izmjerena više nego dvostruko veća količina polifenola u odnosu na referentno otapalo ($1,86 \text{ mg GE g}^{-1}$ s.t.). Ostali NADES-i također su bili uspješni u ekstrakciji polifenola sa rasponom vrijednosti između 2,5 i 4,0 mg GE g^{-1} s.t. Dobiveni rezultati potvrđuju učinkovitost modela COSMO-RS za predviđanje topljivosti polifenolnih spojeva te su u skladu s istraživanjem koje su proveli Ianni i sur. (2023), a koji su potvrdili veću učinkovitost ekstrakcije polifenola korištenjem NADES-a u usporedbi s konvencionalnim organskim otapalima. Nadalje, nije uočena ovisnost fizikalno-kemijskih svojstava otapala o uspješnosti ekstrakcije polifenola iz brokule te je potrebno provesti daljnja istraživanja vezana uz razumijevanje mehanizama topljivosti ovih spojeva u NADES-ima.

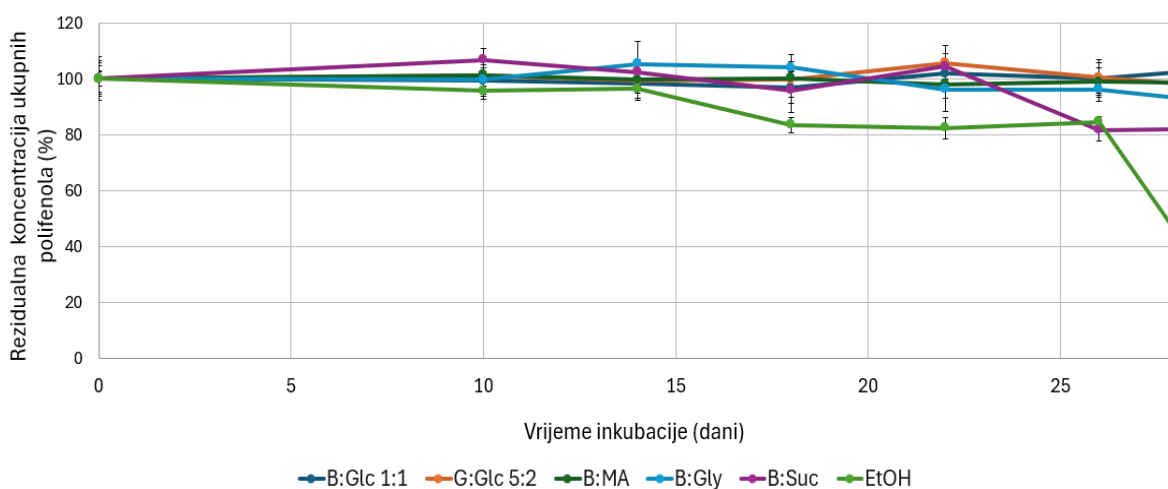
U pripremljenim ekstraktima, skladištenim na sobnoj temperaturi ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) odnosno u hladnjaku ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) tijekom 28 dana, prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.5. *Praćenje stabilnosti polifenola* praćena je stabilnost polifenola, a rezultati su prikazani na Slikama 14 i 15.



Slika 14. Rezidualna koncentracija polifenola u ekstraktima brokule skladištenim tijekom 28 dana pri 4 °C, izražena kao omjer koncentracije polifenola u ekstraktu nakon inkubacije i inicijalne koncentracije polifenola u ekstraktu

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$)

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)



Slika 15. Rezidualna koncentracija polifenola u ekstraktima brokule skladištenim tijekom 28 dana pri 25 °C, izražena kao omjer koncentracije polifenola u ekstraktu nakon inkubacije i inicijalne koncentracije polifenola u ekstraktu

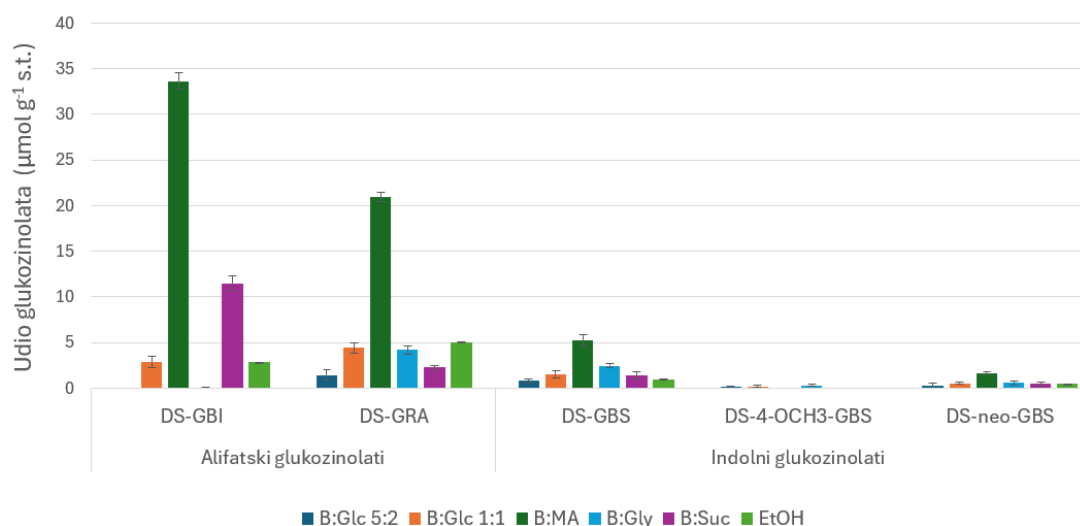
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$)

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)

Mjerenje stabilnosti pri obje je temperature pokazalo sličan trend rezidualne koncentracije ukupnih polifenola u ekstraktima pripremljenim u odabranim NADES-ima tijekom vremena. Iz grafičkih prikaza vidljivih na Slikama 14 i 15, može se zaključiti da su B:Glc_{5:2}, B:Glc_{1:1}, B:Gly te B:MA iznimno dobri stabilizatori polifenolnih spojeva (rezidualna koncentracija ukupnih polifenola > 90 %), a najveća rezidualna koncentracija polifenola održana je u ekstraktima pripremljenima u B:Glc_{5:2}. Očekivano, referentno otapalo etanol nije se pokazalo dobrim stabilizatorom, bilježeći značajan pad rezidualne koncentracije polifenola (72 % početne koncentracije pri 4 °C te 45 % na sobnoj temperaturi). Za usporedbu, u istraživanju koje su proveli Dai i sur. (2016) također je dokazana veća stabilnost polifenola cijanidina u ispitanim NADES-ima nego u zakiseljenom etanolu.

4.3.2. Sadržaj i stabilnost glukozinolata

Alifatski i indolni glukozinolati su u pripremljenim ekstraktima analizirani HPLC-om (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.6. *Određivanje pojedinačnih alifatskih i indolnih glukozinolata*). Komercijalno dostupan glukozinolat sinigrin korišten je kao unutarnji standard, a faktori preračunavanja prikazani su prethodno u Tablici 6. Identifikacija razdvojenih pikova desulfoglukozinolata izvršena je na temelju redoslijeda njihovog eluiranja s kromatografske kolone, a dodatno je potvrđena usporedbom UV spektara. Rezultati kvantitativne analize ekstrakata brokule prikazani su na Slici 16.



Slika 16. Grafički prikaz pojedinačnih alifatskih i indolnih glukozinolata u ekstraktima brokule

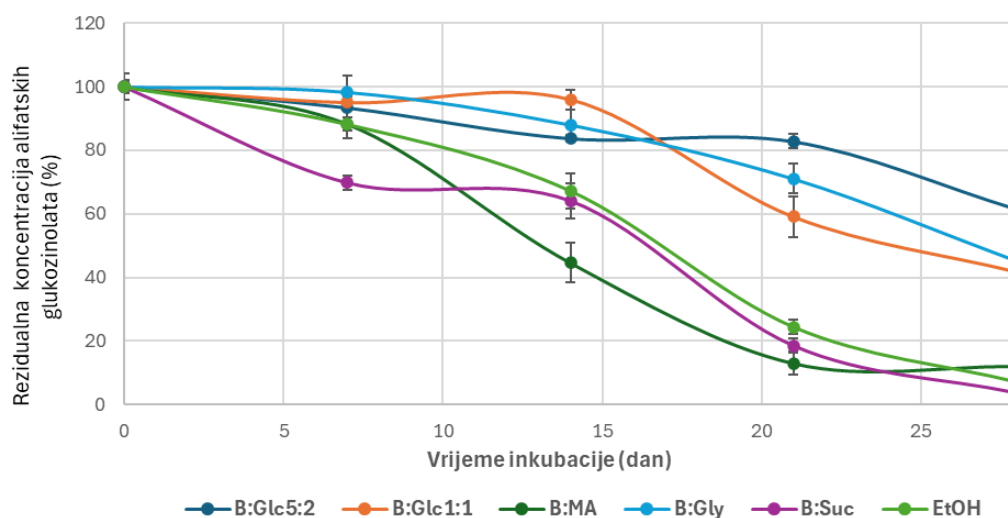
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. ($n=3$), s.t. = suha tvar

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)

DS-GBI = desulfoglukoiberin, DS-GRA = desulfoglukorafanin, DS-GBS = desulfoglukobrasicin, DS-4-OCH3-GBS = desulfometoksiglukobrasicin, DS-neo-GBS = desulfo-neo-glukobrasicin

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da su u brokuli alifatski glukozinolati zastupljeniji u odnosu na indolne glukozinolati. Kada su u pitanju alifatski glukozinolati (DS-GBI i DS-GRA), B:MA ekstrakt ističe se s najvećom koncentracijom ovih glukozinolata ($33,67 \mu\text{mol g}^{-1}$ s.t. i $20,95 \mu\text{mol g}^{-1}$ s.t.). Ekstrakti u ostalim NADES-i pokazuju vrijednosti slične onima izmjenjenim u referentnom otapalu ($2,87 \mu\text{mol g}^{-1}$ s.t. za DS-GBI i $5,04 \mu\text{mol g}^{-1}$ s.t. za DS-GRA). B:MA ekstrakt također pokazuje najveću koncentraciju indolnih glukozinolata ($6,88 \mu\text{mol g}^{-1}$ s.t.), dok ostali ekstrakti u NADES-ima i referentom otapalu pokazuju niže koncentracije indolnih glukozinolata. Kao i kod polifenola, dobiveni rezultati ukazuju na učinkovitost modela COSMO-RS u predviđanju topljivosti glukorafanina te na izostanak jasne korelacije između fizikalno-kemijskih karakteristika NADES-a i njihova kapaciteta za ekstrakciju glukozinolata.

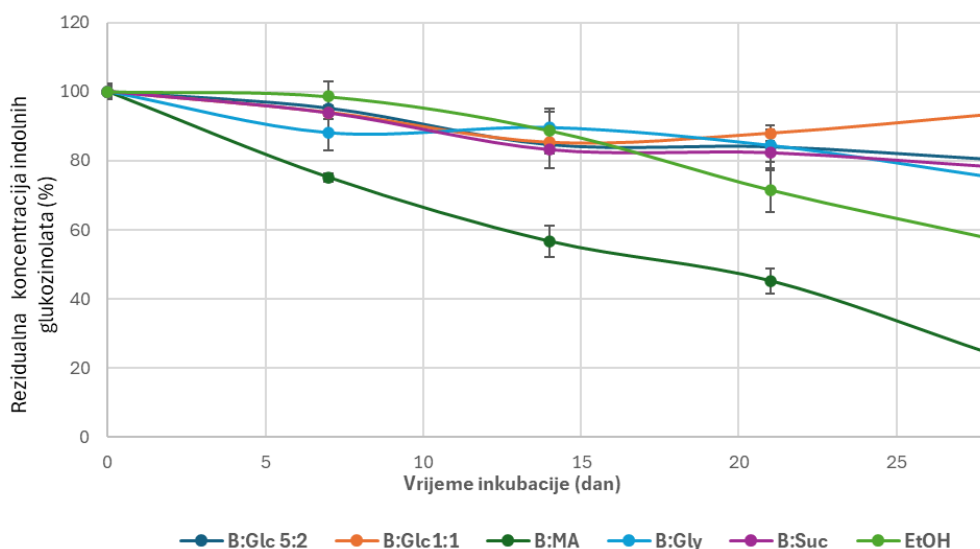
Nadalje, za potrebe ispitivanja stabilnosti, ekstrakti brokule su skladišteni na sobnoj temperaturi ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) odnosno u hladnjaku ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) tijekom 28 dana te je praćena koncentracija alifatskih i indolnih glukozinolata (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.7. *Praćenje stabilnosti alifatskih i indolnih glukozinolata*), a rezultati su prikazani na Slikama 17 – 20.



Slika 17. Rezidualna koncentracija alifatskih glukozinolata u ekstraktima brokule skladištenih tijekom 28 dana pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$, izražena kao omjer koncentracije glukozinolata u ekstraktu nakon inkubacije i inicijalne koncentracije glukozinolata u ekstraktu

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$)

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)



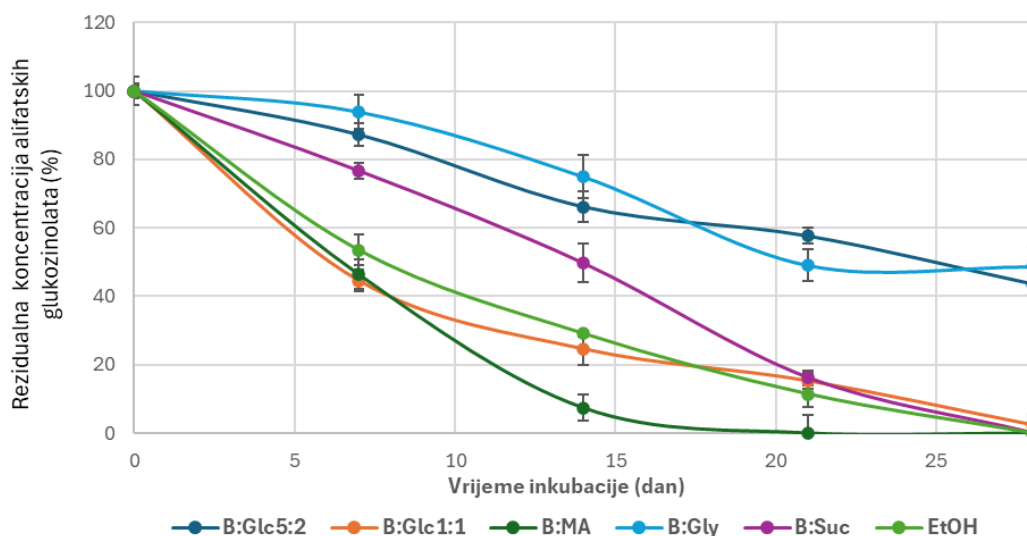
Slika 18. Rezidualna koncentracija indolnih glukozinolata u ekstraktima brokule skladištenih tijekom 28 dana pri 4 °C, izražena kao omjer koncentracije glukozinolata u ekstraktu nakon inkubacije i inicijalne koncentracije glukozinolata u ekstraktu

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$)

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharoza, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)

Mjerenje stabilnost alifatskih i indolnih glukozinolata pri 4 °C pokazuje sličan trend rezidualne koncentracije u pripremljenim ekstraktima tijekom vremena. Alifatski glukozinolati najstabilniji su u ekstraktu u B:Glc_{5:2}, gdje relativna koncentracija ovih glukozinolata nakon 28 dana iznosi 62 % početne vrijednosti. Za usporedbu, u istom se periodu u referentnom otapalu koncentracija alifatskih glukozinolata smanjila na 7 % početne koncentracije. U ekstraktima u B:Gly i B:Glc_{1:1} također je zabilježena dobra stabilnost alifatskih glukozinolata. Suprotno tome, u ekstraktima u B:Suc, B:MA zabilježena je značajnu degradacija glukozinolata, slična onoj etanolnom ekstraktu.

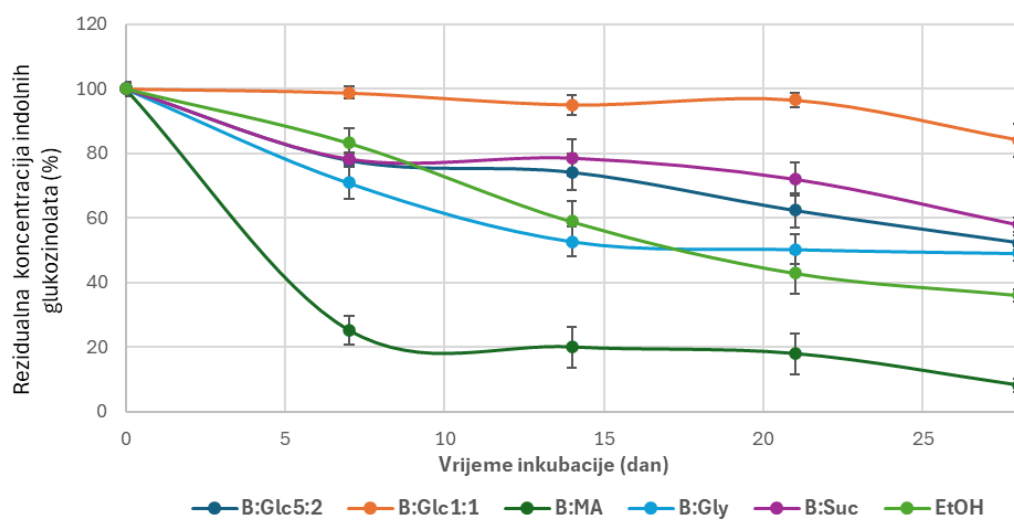
Kod indolnih glukozinolata vidljiva je bolja stabilnost pri 4 °C u usporedbi s alifatskim glukozinolatima. Najbolja stabilnost indolnih glukozinolata zabilježena je u ekstraktu u B:Glc_{1:1}, kod kojeg koncentracija nakon 28 dana iznosi čak 93 % početne vrijednosti. Za usporedbu, u istom se periodu u referentnom otapalu koncentracija indolnih glukozinolata smanjila na 57 % početne koncentracije. U ekstraktima u B:Glc_{5:2}, B:Suc i B:Gly također je zabilježena dobra stabilnost indolnih glukozinolata (gotovo 80 % početne vrijednosti). Najznačajniji pad koncentracije zabilježen je u ekstraktu u B:MA.



Slika 19. Rezidualna koncentracija alifatskih glukozinolata u ekstraktima brokule skladištenih tijekom 28 dana pri 25 °C, izražena kao omjer koncentracije glukozinolata u ekstraktu nakon inkubacije i inicijalne koncentracije glukozinolata u ekstraktu

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$), s.t. = suha tvar

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)



Slika 20. Rezidualna koncentracija indolnih glukozinolata u ekstraktima brokule skladištenih tijekom 28 dana pri 25 °C, izražena kao omjer koncentracije glukozinolata u ekstraktu nakon inkubacije i inicijalne koncentracije glukozinolata u ekstraktu

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$), s.t. = suha tvar

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)

Mjerenje stabilnost alifatskih i indolnih glukozinolata pri 25 °C pokazuje sličan trend rezidualne koncentracije u pripremljenim ekstraktima tijekom vremena. Najbolja stabilnost alifatskih glukozinolata vidljiva je u B:Glc_{5:2} i B:Gly ekstraktima (44 i 48 % početne vrijednosti). Ostali ekstrakti bilježe potpunu degradaciju alifatskih glukozinolata nakon 28 dana.

Kod indolnih glukozinolata, jednako kao i pri 4 °C, vidljiva je bolja stabilnost u usporedbi s alifatskim glukozinolatima. Najbolju stabilnost ponovno pokazuje B:Glc_{1:1} ekstrakt, kod kojeg koncentracija nakon 28 dana iznosi čak 84 % početne vrijednosti. Za usporedbu, u istom se periodu u referentnom otapalu koncentracija indolnih glukozinolata smanjila na 36 % početne koncentracije. Ekstrakti u B:Glc_{5:2}, B:Suc i B:Gly također su pokazali visoku održivost stabilnosti indolnih glukozinolata. Najznačajniji pad koncentracije ponovno je zabilježen u ekstraktu u B:MA.

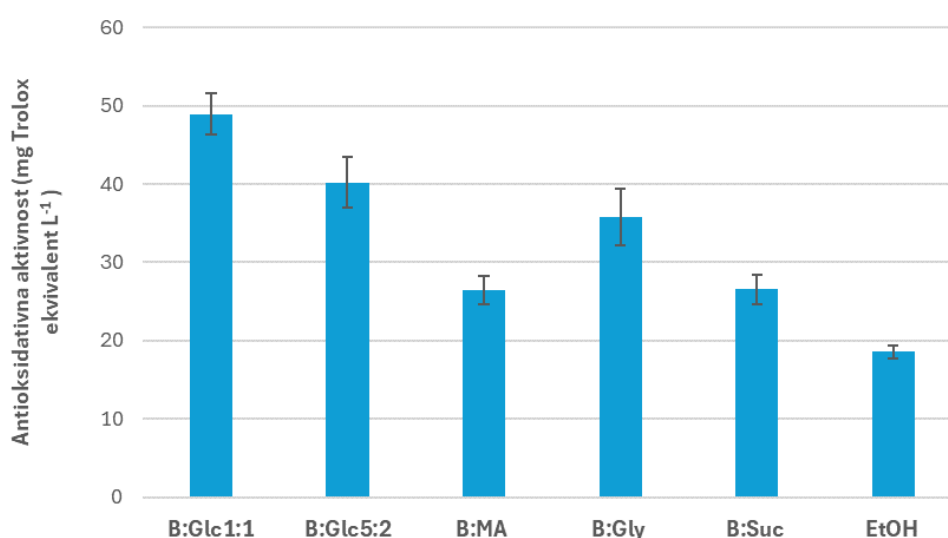
Očekivano, iz rezultata je vidljivo kako su glukozinolati stabilniji pri temperaturi od 4 °C u usporedbi s 25 °C. Kao najbolji NADES-i za ekstrakciju i održavanje stabilnosti pokazali su se B:Glc_{1:1} i B:Gly. Također, treba spomenuti da je na temelju rezultata prikazanih na Slici 16 vidljivo da je najveća koncentracija ekstrahiranih alifatskih i indolnih glukozinolata postignuta u ekstraktu u B:MA. Međutim, na temelju rezultata prikazanih na Slikama 17 - 20 vidljiva je i značajna degradacija ovih glukozinolata nakon 28 dana, što sugerira da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se pronašao NADES koji je jednako učinkovit u ekstrakciji i stabilizaciji glukozinolata.

4.3.3. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata brokule određen je ORAC metodom prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.8. *Određivanje antioksidativnog kapaciteta primjenom ORAC metode.* Ova metoda podrazumijeva praćenje inhibicija djelovanja slobodnog radikala AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid) na fluorescentni spoj fluorescein. Značajna prednost ove metode je što se odvija pri fiziološkoj pH-vrijednosti i temperaturi od 37 °C, odnosno uvjetima koji prevladavaju i u ljudskom organizmu. Osim toga, generiraju se radikalne vrste koje oponašaju lipidni peroksil radikal uključen u reakciju peroksidacije bioloških komponenti (Sakurai i sur., 2022).

Dobiveni rezultati izraženi su u ekvivalentima Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-ugljična kiselina), odnosno kao mg Trolox ekvivalent L⁻¹ ekstrakta (mg TE L⁻¹_{ekst}) te su prikazani na Slici 21. U referentnom, etanolnom ekstraktu brokule izmjerena je najmanja ORAC-vrijednost (18,59 mg TE L⁻¹_{ekst}), dok je najveća ORAC-vrijednost, koja je iznosila 48,95 mg TE L⁻¹_{ekst}, zabilježena je kod ekstrakta pripremljenog u B:Glc_{1:1}. Nešto niže vrijednosti pokazuju slijedeći ekstrakti i to redom: B:Gly > B:Suc > B:MA. Dobivene vrijednosti

antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata u izravnoj su korelaciji s udjelima polifenola opisanima u poglavlju 4.3.1. *Sadržaj i stabilnost polifenola*. Naime, veći antioksidacijski kapacitet odgovara većem masenom udjelu polifenola, što upućuje da su upravo polifenoli odgovorni za antioksidacijsku aktivnost ekstrakata brokule. Slične rezultate dobili su Panić i sur. u istraživanju iz 2021. godine, kada su zaključili kako su određene ORAC-vrijednosti ispitivane komine grožđa u izravnoj korelaciji s ukupnim sadržajem fenolnih spojeva (Panić i sur., 2021a). Osim toga, dobivene vrijednosti u skladu su i s rezultatima istraživanja iz 2008. godine, kada su Borowski i sur. potvrdili korelaciju između masenog udjela bioaktivnih spojeva i oksidacijskih svojstava brokule. Također su potvrdili kako brokula ima jača antioksidativna svojstva u usporedbi s povrćem poput graška, paprike, cikle ili zelene salate (Borowski i sur., 2008).



Slika 21. Grafički prikaz relativnih ORAC-vrijednosti za analizirane ekstrakte brokule

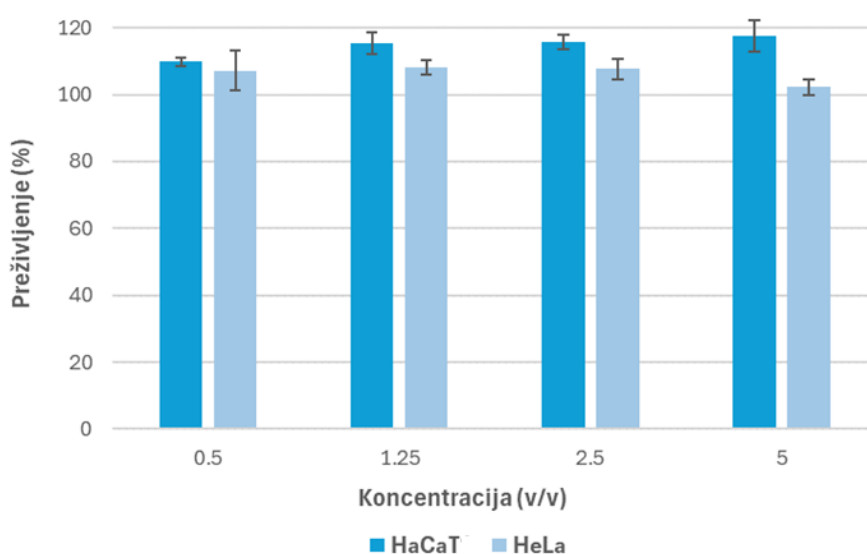
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. ($n=3$)

B:Glc = ekstrakt pripremljen u otapalu betain:glukoza (molarni omjeri komponenti 1:1 odnosno 5:2, B:MA = ekstrakt u otapalu betain:jabučna kiselina, B:Gly = ekstrakt u otapalu betain:glicerol, B:Suc = ekstrakt u otapalu betain:saharozu, EtOH = ekstrakt u 70 %-tnom etanolu (v/v)

4.3.4. Učinak ekstrakta brokule u B:Glc_{1:1} na proliferaciju humanih stanica

U nastavku rada je ispitana *in vitro* biološka aktivnost ekstrakta brokule u NADES-u B:Glc_{1:1} primjenom kulture stanica, staničnoj liniji humanih keratocita (HaCaT) te tumorskoj humanoj staničnoj liniji (HeLa) prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9. *Ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata brokule na staničnim linijama HaCaT i HeLa*. Naime, ovaj se NADES pokazao vrlo uspješnim prilikom ekstrakcije polifenola i glukozinolata te očuvanja njihove stabilnosti, zbog čega je odabran za testiranje *in vitro* biološke aktivnosti, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 22. Obje stanične linije pokazale su visoko preživljenje u cijelom rasponu

volumnih udjela ekstrakta u B:Glc_{1:1} (0,5 - 5 v/v), čime je dokazano da ispitani ekstrakt u NADES-u ne djeluje citotoksično, već i blago stimulirajuće na HaCaT staničnu liniju te se može smatrati sigurnim za ljudsku primjenu. Rezultati potvrđuju rezultate istraživanja koje su proveli Panić i sur. (2021a), a gdje je pokazano da ekstrakt kometine grožđa na bazi NADES-a ima stimulatívni učinak na HaCaT staničnu liniju te je učinak proporcionalno ovisan koncentraciji polifenola u ekstraktu (Panić i sur., 2021a). U ovom radu nije dokazana antitumorska aktivnost ekstrakta, iako je u prijašnjim istraživanjima dokazana antitumorska aktivnost polifenola (Radünz i sur., 2020). S druge strane, obzirom da sulforafan, izotiocijanat koji ima značajnu ulogu u suzbijanju rasta tumorskih stanica, nastaje tek hidrolizom glukorafanina u ljudskim crijevima djelovanjem mirozinaze, za očekivati je da glukozinolati u ekstraktu brokule u kojemu nije aktivan ovaj enzim, ne doprinose antitumorskoj aktivnosti ekstrakta, odnosno neće inhibirati rast tumorskih stanica (stanična linija HeLa). Stoga, kao nastavak ovom istraživanju predlaže se ispitati *in vitro* antitumorsku aktivnost ovako pripremljenih ekstrakta nakon *in vitro* simulacije humanog gastrointestinalnog trakta uz dodatak enzima mirozinaze.



Slika 22. Ovisnost preživljenja stanica o koncentraciji NADES-a B:Glc_{1:1}
Vijabilnost stanica (%) izražena je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3)

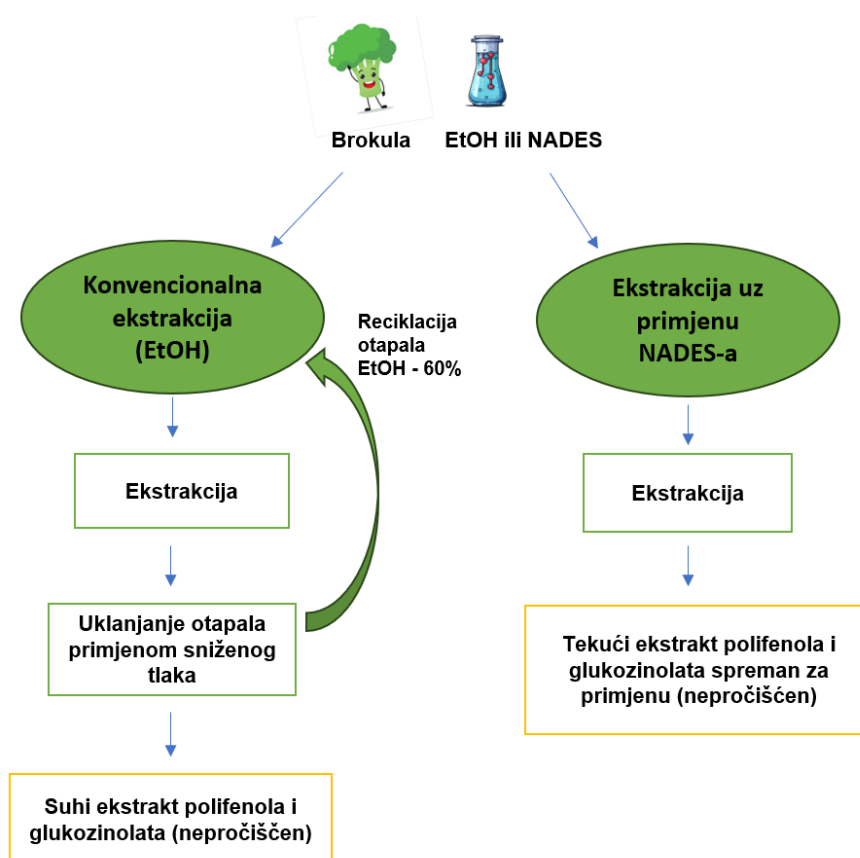
4.4. Procjena održivosti postupka pripreme ekstrakta brokule primjenom prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Održivost postupaka koji se temelje na primjeni NADES-ima, poput ekstrakcije biološki aktivnih spojeva prikazane u ovom radu, oslanja se na zelene karakteristike ovih otapala (npr.

neznatna hlapljivost, nezapaljivost, netoksičnost te jednostavna priprava iz prirodnih i obnovljivih sirovina) (Rente i sur., 2022). Unatoč tome, kako bi se potaknula primjena ovih otapala u novim i postojećim industrijskim procesima, potrebno je holistički pristupiti procjeni održivosti procesa u kojima se ista primjenjuju, uzimajući u obzir njihovu cijenu, zelene parametre i troškove procesa, složenost izolacije produkta te mogućnost regeneracije i ponovne uporabe otapala. Trenutno, za procjenu održivosti određenih postupaka dostupni su brojni alati, poput metodologije izračuna parametara zelene kemije (Sheldon, 2017), procjene životnog ciklusa (*engl.* Life Cycle Assessment, LCA) (Curran, 2013) te detaljne tehnokomonsku analize kojom se procjenjuju investicijski i komunalni troškovi (Martinez-Fernandez i sur., 2021). Stoga, na temelju rezultata prikazanih u ovom radu, procijenjena je održivost postupka pripreme tekućeg ekstrakta brokule temeljenog na NADES-u B:Glc_{1:1} izračunom parametara zelene kemije te kompleksnog indeksa zelenosti analitičke procedure (*engl.* Complex Green Analytical Procedure Indeks, ComplexGAPI). Za usporedbu, procijenjena je i održivost konvencionalnog postupka pripreme ekstrakta brokule, a koji podrazumijeva ekstrakciju etanolom. Naposljetku, provedena je S.W.O.T. analiza (*engl.* Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats analysis) postupka ekstrakcije primjenom NADES-a u kontekstu potencijalne industrijske primjene, koja obuhvaća strukturirani pristup za procjenu unutarnjih i vanjskih čimbenika koji mogu utjecati na održivost istog.

Kao što se može vidjeti na Slici 23, središnji dio konvencionalnog procesa pripreme etanolnog ekstrakta i procesa pripreme NADES ekstrakta brokule bogatog polifenolima i glukozinolatima, koji se odnosi na sam postupak ekstrakcije, proveden je na isti način (miješanje na sobnoj temperaturi tijekom 2 h), dok se isti razlikuju u složenosti daljnje obrade. Naime, u konvencionalnom postupku ekstrakcije, otapalo (70 %-tni etanol, v/v) se nakon ekstrakcije uklanja primjenom sniženog tlaka, čime se dobiva nepročišćeni kruti ekstrakt brokule (uz mogućnost regeneracije etanola, $\eta = 60\%$) (Rente i sur., 2022). U postupku ekstrakcije primjenom NADES-a kao otapala, dobiveni ekstrakt može se primijeniti izravno, bez pročišćavanja (*engl.* ready-to-use extract), što značajno doprinosi smanjenju složenosti pročišćavanja ekstrakta obzirom da nije potrebno uvoditi energetski zahtjevan postupak uklanjanja otapala. Naime, komponente NADES-a korištenog u ovom radu (ali i NADES-a općenito) dio su naše svakodnevne prehrane, kao i prehrambenih dodataka koji su već na tržištu (npr. kolin, betain, jednostavni šećeri, organske kiseline, aminokiseline itd.) te se smatra da su ekstrakti temeljeni na ovim otaplama sigurni za unos u organizam te primjenu na koži (Dai i sur., 2013). Upravo zbog toga, NADES-i mogu poslužiti kao multifunkcionalni medij za ekstrakciju i pohranu bioaktivnih prirodnih prehrambenih, kozmetičkih ili farmaceutskih

proizvoda, pri čemu i sam NADES predstavlja aktivni sastojak odnosno stabilizacijski sustav (Torregrosa-Crespo i sur., 2020; Panić i sur., 2019; Jeong i sur., 2017).



Slika 23. Shema ekstrakcije polifenola i glukozinolata iz klica brokule korištenjem konvencionalnog otapala (70 %-tni etanol u vodi, v/v, EtOH) i NADES-a B:Glc_{1:1}

Za ekstrakciju uz pomoć NADES-a, NADES ekstrakti su pripremljeni izravno kao spremni za uporabu, dok je za konvencionalni postupak razmatrano uklanjanje otapala smanjenim tlakom, uz recikliranje otapala od 60%.

Kako bi se procijenila održivost navedenih postupaka, najprije su izračunati industrijski prihvaćeni faktori koji opisuju održivost postupka ekstrakcije, uzimajući u obzir ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz 1 g brokule primjenom 10 mL otapala (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3. *Ekstrakcija polifenola i glukozinolata iz brokule*): (1) omjer težine stvorenog otpada i ukupne težine krajnjeg proizvoda (E-faktor), (2) E- faktor pomnožen s kvocijentom opasnosti po okoliš (EQ) i (3) omjer ukupne mase korištene u procesu i mase krajnjeg proizvoda (PMI) (Mbous i sur., 2017). Prema prikazanom rezultatima u Tablici 12, može se zaključiti kako postupak dobivanja tekućeg ekstrakta brokule primjenom NADES-a rezultira značajno nižim faktorima održivosti od konvencionalnog postupka, budući da nije stvoren nikakav otpad. Naime, vrijednosti E-faktora i EQ za taj postupak iznose 0 kg kg⁻¹, dok za

konvencionalni postupak obje vrijednosti iznose 800 kg kg^{-1} (kvocijent opasnosti po okoliš etanola iznosi 1). Što se tiče PMI koeficijenta, ekstrakcija primjenom NADES-a (1100 kg kg^{-1}) također pokazuje bolju održivost od konvencionalnog postupka (2000 kg kg^{-1}) budući da je za dobivanje iste količine biološki aktivnih spojeva potrebno utrošiti veću količinu biljnog materijala te samim time i ekstrakcijskog otapala. Uzimajući u obzir ekonomsku učinkovitost uspoređivanih procesa, cijena NADES-a potrebnog za dobivanje 1 kg biološki aktivnih spojeva manja je od cijene etanola za dobivanje iste količine biološki aktivnih spojeva (Tablica 12), što čini ekstrakciju primjenom NADES-a ekonomski isplativom. Naime, iako je cijena NADES-a (125 € kg^{-1}) veća u odnosu na cijenu etanola (80 € kg^{-1}), pri čemu su za oba slučaja uzete su u obzir komercijalne cijene kemikalija čistoće $> 99,5 \%$, za dobivanje iste količine biološki aktivnih spojeva potrebno je koristiti veću količinu etanola u odnosu na NADES.

Tablica 12. Parametri zelene kemije za pripravu ekstrakata brokule primjenom konvencionalnog otapala (70 %-tni etanol u vodi, v/v) i NADES-a B:Glc_{1:1}

Postupak ekstrakcije	Iskorištenje		E-faktor ^A (kg kg^{-1})	EQ ^B (kg kg^{-1})	PMI ^C (kg kg^{-1})	Cijena otapala ^D (€ kg^{-1})
	Polifenoli ($\text{mg g}^{-1}_{\text{s.t.}}$)	Glukozinolati ($\text{mmol kg}^{-1}_{\text{s.t.}}$)				
Konvencionalni postupak	1,9	9,3	800	800	2000	160
NADES-potpomognuti postupak	4,9	9,6	0	0	1100	140

^A Omjer mase generiranog otpada i ukupne mase krajnjeg proizvoda (ne uključujući biljni materijal)

^B E-faktor pomnožen s ekološki opasnim kvocijentom

^C Omjer ukupne mase korištene u procesu i mase krajnjeg proizvoda

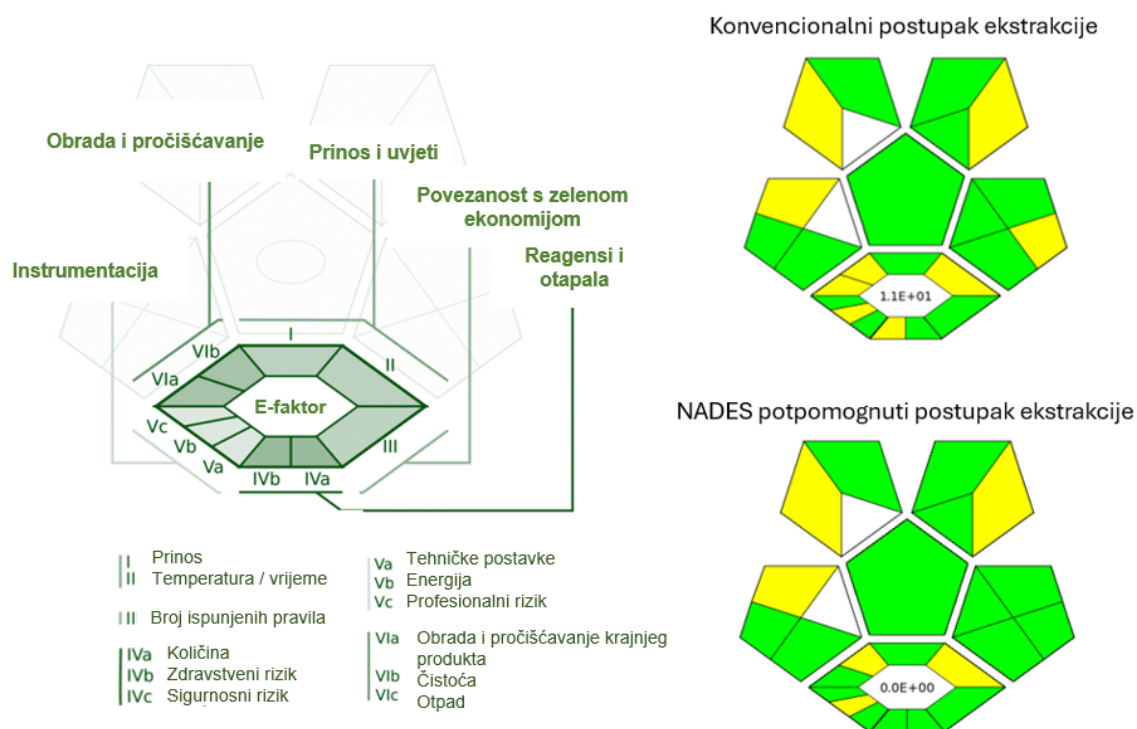
^D cijena otapala procijenjena je prema komercijalnim cijenama tvrtke Sigma-Aldrich

Svi faktori te cijena otapala izračunati su u odnosu na ukupnu masu dobivenih biološki aktivnih spojeva, pri čemu biljnim materijal nije uzet u obzir kao otpad obzirom na održivo porijeklo.

Iako su izračunati parametri zelene kemije te cijena otapala potrebnog za dobivanje 1 kg spojeva od interesa pokazali da je postupak ekstrakcije primjenom NADES-a ekološki i ekonomski povoljniji, potrebno je ovdje spomenuti da, kada je riječ o povećanju mjerila procesa ekstrakcije DES-om, viskoznost ovih otapala može predstavljati problem te uzrokovati dodatne troškove vezane uz potrošnju energije potrebne za osiguravanje homogenosti smjese tijekom ekstrakcije te pri filtraciji ekstrakta (Rente i sur., 2022). Naime, viskoznost korištenog NADESA za ekstrakciju iznosi $71,49 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (Tablica 11), što je znatno više u usporedbi s viskoznosti etanola koja iznosi $1,20 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (PanReac AppliChem, 2024). Naposljetku, bitno je spomenuti kako je jedna od glavnih prednosti NADES-a sigurnost tijekom rukovanja: karakteristike

NADES-a, poput nezapaljivosti, netoksičnosti te neznatne hlapljivosti čine ih sigurnijim otapalom u odnosu na relativno toksičan i lako zapaljiv etanol (Rente i sur., 2022).

Kao što je već spomenuto, ekološka održivost dodatno je procijenjena primjenom računalnog alata Complex GAPI. Ovaj se alat prvenstveno koristi za procjenu održivosti različitih analitičkih metoda u različitim područjima, uključujući farmaceutiku, kemiju hrane i praćenje okoliša, uzimajući u obzir vrstu i količinu upotrijebljenih reagensa i otapala, korištenu instrumentaciju, te složenost obrade i pročišćavanja. Alat Complex GAPI temelji se na pet pentagrama i dodatnom šesterokutnom polju za analizu prinosa postupka i uvjeta procesa u kontekstu načela zelene ekonomije. Za klasificiranje zelenog karaktera svake faze, koristi se ljestvica boja, s tri razine evaluacije za svaku fazu (zeleno – neopasno za okoliš, žuta - blagi ili umjereni negativni utjecaj na okoliš i crvena – negativan utjecaj na okoliš). Vizualni prikaz GAPI-ja omogućuje jednostavnu i istovremenu usporedbu različitih procesa i jednostavan odabir „najzelenijeg“ procesa za određenu namjenu (Płotka-Wasyłka i Wojnowski, 2021).



Slika 24. Procjena ekološkog otiska pripreve ekstrakata brokule primjenom konvencionalnog otapala (70 %-tni etanol u vodi, v/v) i NADES-a B:Glc_{1:1}) korištenjem alata ComplexGAPI (prema Płotka-Wasyłka i Wojnowski, 2021)





Piktogrami su nacrtani pomoću besplatnog softvera dostupnog na: <https://mostwiedzy.pl/en/justyna-plotka-wasyłka,647762-1/complexgapi> (žuta polja označavaju korake sa srednjim utjecajem na okoliš, a zelena polja označavaju ekološki prihvatljive korake)

Uspoređujući pet pentagrama i šesterokutno polje metoda ekstrakcije (Slika 24), postupak ekstrakcije brokule primjenom NADES-a pokazao se ekološki prihvatljivijim od konvencionalnog, što je definirano sa 17 zelenih regija (eko-prijateljski korak), u usporedbi s 14 i 12 zelenih regija za konvencionalnu ekstrakciju. Također, postupak temeljen na NADES-u povoljniji je u smislu stvaranja otpada (proizvodnja potpuno bez otpada), obrade i pročišćavanja (nije potrebno pročišćavanje) i sigurnih kemikalija.

Naposlijetku, u svrhu preglednog prikaza svih prednosti i nedostataka ekstrakcije polifenola i glukozinolata iz brokule primjenom NADES-a, uzimajući u obzir perspektivu ovakvog pristupa za dobivanje visokovrijednih biljnih ekstrakata za primjenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, upotrijebljen je uobičajeni alat u strateškom planiranju – S.W.O.T. analiza (*engl.* Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats analysis) (Tablica 13). Općenito, S.W.O.T. analiza je alat koji se koristi za procjenu unutarnjih i vanjskih čimbenika koji mogu utjecati na uspjeh projekta, proizvoda, procesa ili organizacije, a u ovom je radu primijenjena kako bi se na pregledan način sažele prednosti i nedostaci primjene NADES-a u ekstrakciji biološki aktivnih komponenti iz biljaka, te kako bi se ukazalo na potencijalne prilike i prijetnje ovakvog pristupa. Pored vlastitih rezultata prikazanih u ovom radu, uzeti su u obzir i rezultati vezani uz primjenu NADES-a u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka dostupni u literaturi.

Istaknute snage i prilike ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz biljaka primjenom NADES-a, sažete u Tablici 13, jasno ukazuju na potencijal NADES-a u primjeni u brojnim industrijskim područjima. Potrebno je istaknuti kako se racionalnim dizajnom NADES-a mogu dobiti potpuno novi ekstrakti temeljenih na NADES-ima sa kemijskim profilom koji je nemoguće postići primjenom konvencionalnih otapala (Rente i sur., 2022). S druge strane, potrebna su dodatna istraživanja i razvoj NADES-a kako bi se prevladale potencijalne slabosti (poput ograničene stabilnosti NADES-a ili prijenosa iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo) te uspješno savladale prijetnje poput regulatornih prepreka, uključujući stroge zahtjeve sigurnosti i kvalitete.

Tablica 13. Analiza snaga, slabosti, prilika i prijetnji (S.W.O.T. analiza) ekstrakcije biološki aktivnih spojeva primjenom NADES-a

	<p>STRENGTHS - SNAGE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prilagodljivost: Proces pripreme omogućuje prilagodbu svojstava NADES-a prema specifičnim zahtjevima, poput topljivosti različitih komponenti od interesa, viskoznosti, toksičnosti biorazgradivosti. • Biokompatibilnost: NADES-i često potječu iz prirodnih izvora te se sastoje od biokompatibilnih komponenti, što ih čini sigurnima za ljudsku upotrebu i okoliš. • Univerzalnost: korištenjem hidrofilnih i hidrofobnih komponenata, NADES-i se mogu prilagoditi širokom rasponu biološki aktivnih spojeva s različitim profilima topljivosti. • NADES-i su „aktivno“ otapalo: obzirom da komponente NADES-a često posjeduju biološku aktivnost (npr. antioksidativna i antimikrobna aktivnost), mogu mogu predstavljati dodanu vrijednost proizvodu koji ih uključuje. • Primjenom NADES-a moguće je pripremiti ekstrakte sa jedinstvenim fitokemijskim profilom
	<p>WEAKNESSES - SLABOSTI</p> <ul style="list-style-type: none"> • Složenost formulacije: Balansiranje hidrofilnih i hidrofobnih komponenata u NADES formulaciji zahtijeva preciznu kontrolu i razumijevanje kemijskih interakcija, što može biti izazovno. • Ograničena stabilnost: Neke NADES formulacije mogu pokazati ograničenu stabilnost pod određenim uvjetima skladištenja, što može rezultirati faznom separacijom ili degradacijom aktivnih spojeva tijekom vremena, poput negativnog utjecaja niskog pH kod kiselih hidrofilnih NADES-a. • Izazovi pri prijenosu u veće mjerilo (<i>scale-up</i>): Prijenos pripreve NADES-a iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo može predstavljati izazove u održavanju konzistencije i kvalitete konačnog proizvoda.
	<p>OPPORTUNITIES - PRILIKE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mogućnost širenja primjene: suradnja između akademske zajednice te institucija različitih područja istraživanja mogla bi dovesti do primjene NADES-a u još većem opsegu proizvodnje i razvoja industrije. • Dobivanje regulatornih odobrenja povećalo bi komercijalizaciju ovih prirodnih otapala, stvarajući priliku za otvaranje novih tržišta. • Učestalija primjena NADES-a potencijalno bi omogućila i detaljniju karakterizaciju poznatih biljnih metabolita te otkrivanje novih svojstava biljaka.
	<p>THREATS - PRIJETNJE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sve konkurentnije područje istraživanja zahvaljujući kompetitivnosti među ulagačima. • Regulatorne prepreke: strogi zahtjevi sigurnosti, kvalitete i učinkovitosti NADES-a prije potencijalnog stavljanja na tržište.

Na temelju rezultata predstavljenih u ovom radu, kao i relevantne literature, može se zaključiti kako NADES-i imaju izniman potencijal kao otapala za dobivanje visokovrijednih i stabilnih tekućih biljnih ekstrakata za uporabu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji na ekonomski i ekološki održiv način. Također, rezultati prikazani u ovom radu predstavljaju izvorni znanstveni doprinos u području zelenih i održivih tehnologija temeljenih na ovim otapalima u kontekstu njihova racionalnog dizajna za specifičnu namjenu.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata provedenog istraživanja, može se zaključiti sljedeće:

1. Početnim probirom NADES-a za pripremu visokovrijednih ekstrakata brokule primjenom računalnog alata COSMOtherm odabrano je ukupno pet betainijevih NADES-a s glukozom (B:Glc_{1:1} i B:Glc_{5:2}), saharozom (B:Suc), jabučnom kiselinom (B:MA) odnosno glicerolom (B:Gly) kao donorom vodika te su ista otapala uspješno pripremljena i fizikalno-kemijski okarakterizirana.

2. Ekstrakcijom polifenola iz brokule primjenom NADES-a postignut je veći udio ekstrahiranih polifenola u odnosu na referentno otapalo etanol, pri čemu je u B:Glc_{1:1} dobiven otprilike 2,5 puta veći udio polifenola u ekstraktu (4,89 mg GE g⁻¹ s.t.) u odnosu na etanol (1.85 mg GE g⁻¹ s.t.).

3. U ekstraktima brokule u NADES-ima, skladištenim na sobnoj temperaturi (25 °C) odnosno u hladnjaku (4 °C) tijekom 28 dana, polifenoli su bili stabilniji u odnosu na ekstrakt dobiven referentnim otapalom. U B:Glc_{1:1}, B:Glc_{5:2} i B:MA koncentracija ukupnih polifenola očuvana je u potpunosti tijekom 28 dana inkubacije na obje ispitivane temperature.

4. Ekstrakcijom glukozinolata iz brokule primjenom B:MA postignut je značajno veći udio ekstrahiranih glukozinolata u odnosu na referentno otapalo etanol, pri čemu je koncentracija alifatskih glukozinolata u tom NADES-u (54,62 μmol g⁻¹ s.t.) gotovo 7 puta veća od one izmjerene u referentnom otapalu (7,91 μmol g⁻¹ s.t.).

5. U ekstraktima brokule u NADES-ima, skladištenim na sobnoj temperaturi (25 °C) odnosno u hladnjaku (4 °C) tijekom 28 dana, glukozinolati su općenito bili stabilniji u odnosu na ekstrakt dobiven referentnim otapalom. Također, indolni su glukozinolati bili stabilniji od alifatskih glukozinolata, a kao najbolji NADES za stabilizaciju indolnih glukozinolata pokazao se B:Glc_{1:1}. (> 84 % početne koncentracije glukozinolata očuvano je tijekom skladištenja ekstrakata na obje temperature).

6. Na temelju rezultata može se zaključiti da je COSMOtherm pouzdan računalni alat za predviđanje topljivosti određenih spojeva u NADES-ima obzirom da su u otapalima s niskom vrijednosti $\ln(\gamma)$ izmjerene visoke koncentracije polifenola i glukozinolata.

7. Određivanjem antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom utvrđeno je da svi ekstrakti pripremljeni u NADES-ima imaju veći antioksidativni kapacitet od onog pripremljenog u referentnom otapalu, pri čemu se posebno ističu ekstrakti u B:Glc_{1:1} i B:Glc_{5:2} s otprilike

dvostruko većim vrijednostima (48,95 odnosno 40,21 mg TE L⁻¹_{ekst}) od one zabilježene u referentnom otapalu (18,6 mg TE L⁻¹_{ekst}). Također, antioksidacijski kapacitet u izravnoj je korelaciji s udjelom polifenola, što upućuje da su polifenoli najvećim dijelom odgovorni za antioksidacijsku aktivnost ekstrakta.

8. NADES koji se pokazao vrlo uspješnim u ekstrakciji polifenola i glukozinolata te u očuvanju njihove stabilnosti, B:Glc_{1:1}, pri ispitanim koncentracijama pokazao je blago stimulativan učinak na HaCaT staničnu liniju, dok kod HeLa stanične linije nije izazvao učinak.

9. Procjena održivosti postupka pripreme ekstrakta brokule primjenom B:Glc_{1:1}, provedena izračunom parametara zelene kemije te kompleksnog indeksa zelenosti analitičke procedure, ukazuje da je proces proizvodnje i primjene NADES-a u ekstrakciji ekološki i ekonomski održiv, a obzirom na dobivene rezultate i dostupnu literaturu dobiveni ekstrakti mogu se okarakterizirati sigurnim za primjenu.

10. S.W.O.T. analizom na pregledan su način prikazane prednosti i nedostaci primjene NADES-a u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka u kontekstu industrijske primjene te je istaknuta potreba za daljnjim istraživanjima u ovom području.

11. Rezultati prikazani u ovom radu predstavljaju doprinos racionalnom dizajnu inovativnih i visokovrijednih biljnih ekstrakata temeljenih na NADES-ima.

Zahvaljujemo svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na velikoj pomoći i podršci, a posebno izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević, red. prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković, dr. sc. Manueli Panić i Anji Damjanović, mag. ing. biotechn., na vrijednim savjetima i podršci.

Od srca zahvaljujemo i izv. prof. dr. sc. Ani Jurinjak Tušek, djelatnici Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo, na nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

Posebna zahvala našoj dragoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo, s kojom smo imale privilegiju raditi na ovom istraživanju. Naš zajednički rad bio je izuzetno iskustvo, te smo neizmjerljivo zahvalne na velikoj pomoći, podršci, strpljenju te svim dragocjenim savjetima i novim saznanjima koje ste nam prenijeli.

Na kraju, veliku zahvalnost dugujemo i jedna drugoj na strpljenju, međusobnoj pomoći, motivaciji i velikom prijateljstvu koje nas je vodilo kroz cijeli proces izrade ovog rada.

6. LITERATURA

- Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc* **126**, 9142-9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>
- Abranches DO, Martins MAR, Silva LP, Schaeffer N, Pinho SP, Coutinho JAP (2019) Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: the quest for type V DES. *Chem Commun* **55**, 10253-10256. <https://doi.org/10.1039/C9CC04846D>
- Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* **2**, 875-877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Aires A, Mota VR, Saavedra MJ, Monteiro AA, Simões M, Rosa EAS, Bennett RN i sur. (2009) Initial *in vitro* evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol* **106**, 2096-2105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04181.x>
- Ajam M (2005) Metathesis and hydroformylation reactions in ionic liquids (magistarski rad), Faculty of Science, University of Johannesburg, Johannesburg.
- Anastas PT, Warner JC (1998) Green chemistry: theory and practice, Oxford University Press, New York.
- Aten WC (1996) Solvent action and measurement. U: Whim BP, Johnson PG (ured.) Directory of Solvents. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1549-7_2
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**, 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bachiega P, Salgado JM, de Carvalho JE, Ruiz ALTG, Schwarz K, Tezotto T i sur. (2016) Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium. *Food Chem.* **190**, 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.024>
- Baladia E, Moñino M, Pleguezuelos E, Russolillo G, Garnacho-Castaño MV (2024) Broccoli consumption and risk of cancer: an updated systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutrients* **16**, 1583. <https://doi.org/10.3390/nu16111583>
- Ballard TS, Mallikarjunan P, Zhou K, O'Keefe S (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem* **120**, 1185-1192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.063>
- Barbero GF, Ruiz AG, Liazid A, Palma M, Vera JC, Barroso CG (2014) Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annum* L.). *Food Chem* **153**, 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.068>
- Barbero GF, Liazid A, Palma M, Barroso CG (2008) Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* **75**, 1332-1337. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.046>
- Bendif HH (2021) Phytochemical constituents of *Lamiaceae* family. RHAZES: green and applied chemistry 11, 71-88. <https://doi.org/10.48419/IMIST.PRSM/rhazes-v11.25070>
- Bones AM, Rossiter JT (2006) The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochem* **67**, 1053-1067. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.024>
- Borowski J, Szajdek A, Borowska EJ, Ciska E, Zieliński H (2008) Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Eur Food Res Technol* **226**, 459-465. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0557-9>

- Bousquet J, Le Moing V, Blain H, Czarlewski W, Zuberbier T, de la Torre R i sur. (2021) Efficacy of broccoli and glucoraphanin in COVID-19: From hypothesis to proof-of-concept with three experimental clinical cases. *WAOjournal* **14**, 00498. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100498>
- Bulgakov VP, Veremeichik GN, Grigorchuk VP, Rybin VG, Shkryl YN (2016) The roIB gene activates secondary metabolism in *Arabidopsis calli* via selective activation of genes encoding MYB and bHLH transcription factors. *Plant Physiol Biochem* **102**, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.015>
- Calmes B, N'Guyen G, Dumur J, Brisach CA, Campion C, Iacomi B i sur. (2015) Glucosinolate-derived isothiocyanates impact mitochondrial function in fungal cells and elicit an oxidative stress response necessary for growth recovery. *Front Plant Sci* **6**, 414. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00414>
- Chaudhary A, Rampal G, Sharma U, Thind TS, Singh B, Vig AP i sur. (2012) Anticancer, antioxidant activities and GC-MS analysis of glucosinolates in two cultivars of broccoli. *Med Chem Drug Discov* **2**, 30-37. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:201624814>
- Chemat F, Abert Vian M, Ravi HK, Khadhraoui B, Hilali S, Perino S i sur. (2019) Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules* **24**, 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IW i sur. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol* **156**, 1701-1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>
- Chowański S, Adamski Z, Marciniak P, Rosiński G, Büyükgüzel E, Büyükgüzel K i sur (2016) A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. *Toxins* **8**, 60. <https://doi.org/10.3390/toxins8030060>
- Clarke JD, Dashwood RH, Ho E (2008) Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett* **269**, 291-304. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.018>
- Curran MA (2013) Life Cycle Assessment: a review of the methodology and its application to sustainability. *Curr Opin Chem Eng* **2**, 273-277. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2013.02.002>
- Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Radojčić Redovniković I, Halambek J, Vorkapić-Furač J, Gaurina Srček V (2014) Ionske kapljevine – razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem Ind* **63**, 163-171. <https://doi.org/10.15255/KUI.2013.003>
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green solvents for green technologies. *J Chem Technol Biotechnol* **90**, 1631–1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process* **109**, 52–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>
- Dai Y, Rozema E, Verpoorte R, Choi YH (2016) Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *J Chromatogr A* **1434**, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>
- Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Dai Y, Verpoorte R, Choi YH (2014) Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chem* **159**, 116-121.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.155>

Damjanović B, Lepojević Ž, Živković V, Tolić A (2005) Extracting of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: comparison with hydrodistillation. *Food Chem* **92**,143-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.019>

Das K, Gezici S (2018) Secondary plant metabolites, their separation and identification, and role in human disease prevention. *Ann Phytomed* **7**, 13-24. <https://doi.org/10.21276/ap.2018.7.2.3>

Dey P, Kundu A, Kumar A, Gupta M, Le BM, Bhakta T i sur. (2020) Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). *Rec adv nat prod anal*, 505-567. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>

Dinkova-Kostova AT, Kostov RV (2012) Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med* **18**, 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.003>

Duarte AR, Ferreira AS, Barreiros S, Cabrita E, Reis RL, Paiva A (2017) A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *Eur J Pharm Biopharm* **114**, 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.003>

Esclapez MD, García-Pérez JV, Mulet A, Cárcel JA (2011) Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Eng Rev* **3**, 108-120. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>

Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* **10**, 514-528. <https://doi.org/10.1039/C8FO01997E>

Geremu M, Tola YB, Sualeh A (2016) Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea arabica* L.) pulp of wet processing plants. *Chem Biol Technol Agric* **3**, 25. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0077-1>

Gigliotti JC, Tin A, Pourafshar S, Cechova S, Wang YT, Sung SJ i sur. (2020) GSTM1 deletion exaggerates kidney injury in experimental mouse models and confers the protective effect of cruciferous vegetables in mice and humans. *J Am Soc Nephrol* **31**, 102-116. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019050449>

Giordano ME, Caricato R, Lionetto MG (2020) Concentration dependence of the antioxidant and prooxidant activity of trolox in hela cells: Involvement in the induction of apoptotic volume decrease. *Antioxidants* **9**, 1058. <https://doi.org/10.3390/antiox9111058>

Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G (2007) Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* **47**, 231-258. <https://doi.org/10.1080/10408390600698197>

Häckl K, Kunz W (2018) Some aspects of green solvents. *C r Chim* **21**, 572-580. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.010>

Hahn R, Cecot C (2009) The benefits and costs of ethanol: An evaluation of the government's analysis. *J Regul Econ* **35**, 275-295. <https://doi.org/10.1007/s11149-008-9080-1>

Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 303-333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>

Hamdi B, Ben Miri Y, Souilah N, Benabdallah A, Mohamed DM (2021) Phytochemical constituents of Lamiaceae family. *RHAZES: Green Appl Chem* **11**, 71-88. <https://doi.org/10.48419/IMIST.PRSM/rhazes-v11.25070>

Herrero M, Mendiola JA, Cifuentes A, Ibanez E (2010) Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *J Chromatogr A* **1217**, 2495-2511. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>

- Hopkins RJ, van Dam NM, van Loon JJA (2009) Role of glucosinolates in insect-plant relationships and multitrophic interactions. *Annu Rev Entomol* **54**, 57-83. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090623>
- Huang CC (2008) Polyneuropathy induced by n-hexane intoxication in Taiwan. *Acta Neurol Taiwan* **17**, 3-10. http://www.ant-tnsjournal.com/Mag_Files/17-1/dw200841793557_17-1%20p3.pdf
- Ianni F, Scandar S, Mangiapelo L, Blasi F, Marcotullio MC, Cossignani L (2023) NADES-assisted extraction of polyphenols from coriander seeds: a systematic optimization study. *Antioxidants* **12**, 2048. <https://doi.org/10.3390/antiox12122048>
- Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of *Brassicaceae* vegetables. *Breed Sci* **64**, 48-59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>
- ISO 10633-1:1995, Oilseed residues-Determination of glucosinolate content. Part 1: Method using high performance liquid chromatography.
- Jain C, Khatana S, Vijayvergia R (2019) Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *Int J Pharm Sci Res* **10**, 494-504. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(2\).494-04](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(2).494-04)
- Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY i sur. (2017) Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J Clean Prod* **151**, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>
- Kapooore RV, Butler TO, Pandhal J, Vaidyanathan S (2018) Microwave-assisted extraction for microalgae: from biofuels to biorefinery. *Biology* **7**, 18. <https://doi.org/10.3390/biology7010018>
- Karuppagounder SS, Uthaythas S, Govindarajulu M, Ramesh S, Parameshwaran K, Dhanasekaran M (2021). Caffeine, a natural methylxanthine nutraceutical, exerts dopaminergic neuroprotection. *Neurochem Int* **148**, 105066. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105066>
- Khan MY, Kumar V (2016) Phytopharmacological and chemical profile of *Bergenia ciliata*. *Int J Phytopharm* **6**, 90-98. <https://doi.org/10.7439/ijpp>
- Klamt A, Jonas V, Bürger T, Lohrenz JCW (1998) Refinement and Parametrization of COSMO-RS. *J. Phys. Chem. A* **102**, 5074-5085. <https://doi.org/10.1021/jp980017s>
- Kohnen-Johannsen KL, Kayser O (2019) Tropane alkaloids: chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules* **24**, 796. <https://doi.org/10.3390/molecules24040796>
- Kyriakoudi A, Radojčić Redovniković I, Vidović S, Radošević K, Andreou T, Mourtzinou I i sur. (2024) Coupling deep eutectic solvents with innovative extraction techniques towards plant derived bioactive compositions. *RSC Sustainability* **2**, 1675-1691. <https://doi.org/10.1039/D4SU00111G>
- Latte KP, Appel K, Lampen A (2011) Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food Chem Toxicol* **49**, 3287–3309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.019>
- Lee HW, Rhee DK, Kim BO, Pyo S (2018) Inhibitory effect of sinigrin on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells: Involvement of AMPK and MAPK pathways. *Biomed Pharmacother* **102**, 670-680. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.124>
- Li H, Xia Y, Liu HY, Guo H, He XQ, Liu Y i sur. (2022) Nutritional values, beneficial effects, and food applications of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). *Trends Food Sci Technol* **119**, 288-308. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.015>

- Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF (2018) Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *J Nat Prod* **81**, 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>
- Liu Y, Li J, Fu R, Zhang L, Wang D, Wang S (2019) Enhanced extraction of natural pigments from *Curcuma longa* L. using natural deep eutectic solvents. *Ind Crops Prod* **140**, 111620. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111620>
- Martínez GM, Townley GG, Martínez-Espinosa RM (2022) Controversy on the toxic nature of deep eutectic solvents and their potential contribution to environmental pollution. *Heliyon* **8**, 12567. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12567>
- Martinez-Fernandez JS, Gu X, Chen S (2021) Techno-economic assessment of bioactive compound recovery from potato peels with sequential hydrothermal extraction, *J Clean Prod* **282**, 124356. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124356>
- Mbous PY, Hayyan M, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA, Looi CY (2017) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering — promises and challenges. *Biotechnol Adv* **35**, 105-134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>
- Mitar A, Panić M, Prlić Kardum J, Halambek J, Sander A, Zagajski Kučan K i sur. (2019) Physicochemical properties, cytotoxicity, and antioxidative activity of natural deep eutectic solvents containing organic acid. *Chem Biochem Eng Q* **33**, 1-18. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1454>
- Moon CS (2017) Estimations of the lethal and exposure doses for representative methanol symptoms in humans. *Ann Occup Environ Med* **29**, 1-6. <https://doi.org/10.1186/s40557-017-0197-5>
- Neugart S, Baldermann S, Hanschen FS, Klopsch R, Wiesner-Reinhold M, Schreiner M i sur. (2018) The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Sci Hortic* **233**, 460-478. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.038>
- Neveu VV, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L i sur. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291-13295. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>
- Oliveira F, Santos F, Duarte ARC (2021) Therapeutic deep eutectic systems towards the treatment of tuberculosis and colorectal cancer: opportunities and challenges. *Molecules* **26**, 7022. <https://doi.org/10.3390/molecules26227022>
- Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain Chem Eng* **2**, 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- Palmelund H, Andersson MP, Asgreen CJ, Boyd BJ, Rantanen J, Löbmann K (2019) Tailor-made solvents for pharmaceutical use? Experimental and computational approach for determining solubility in deep eutectic solvents (DES). *Int J Pharm* **1**, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100034>
- PanReac AppliChem (2024) Ethanol 70% v/v (BP) pharma grade <https://www.itwreagents.com/italy/en/product/ethanol-70-vv-bp-pharma-grade/192695>. Pristupljeno 17.08.2024.
- Panić M, Gunjević V, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Ganić KK, Redovniković IR (2021a) COSMOtherm as an Effective Tool for Selection of Deep Eutectic Solvents Based Ready-To-Use Extracts from Graševina Grape Pomace. *Molecules* **26**, 4722. <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>

- Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021b) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. *J Chem Technol Biotechnol* **96**, 14–30. <https://doi.org/10.1002/JCTB.6545>
- Panić M, Gunjević V, Cravotto G, Radojčić Redovniković I (2019) Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chem* **300**, 125185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>
- Panić M, Stojković MR, Kraljić K, Škevin D, Radojčić Redovniković I, Gaurina Srček V i sur. (2019) Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chem* **283**, 628-636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.061>
- Plotka-Wasyłka J, Wojnowski W (2021) Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chem* **23**, 8657-8665. <https://doi.org/10.1039/D1GC02318G>
- Radojčić Redovniković I, Bolf N (ur.) (2020) Osvježimo znanje: Zelena otapala. *Kem Ind* **69**, 670-671. <https://hrcak.srce.hr/247595>
- Radojčić Redovniković I, Peharec P, Krsnik-Rasol M, Delonga K, Brkić K, Vorkapić-Furać J (2008) Glucosinolate Profiles, Myrosinase and Peroxidase Activity in Horseradish (*Armoracia lappathifolia* Gilib.) Plantlets, Tumour and Teratoma Tissues. *Food Technol Biotech* **46**, 317-321. <https://hrcak.srce.hr/26383>
- Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Radojčić Redovniković I (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf* **112**, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>
- Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kem Ind* **70**, 551-562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>
- Radünz M, Hackbart HCDS, Bona PN, Pedra NS, Hoffmann JF, Stefanello FM i sur. (2020) Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **192**, 111020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111020>
- Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R (2017) Polyphenols and their benefits: A review. *Int J F Prop* **20**, 1700-1741. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354017>
- Rasul MG (2018) Conventional extraction methods use in medicinal plants, their advantages and disadvantages. *Int J Basic Sci Appl Comput* **2**, 10-14. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:245903807>
- Rente D, Cvjetko Bubalo M, Panić M, Paiva A, Caprin B, Radojčić Redovniković I i sur. (2022) Review of deep eutectic systems from laboratory to industry, taking the application in the cosmetics industry as an example. *J Clean Prod* **380**, 135147. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135147>
- Rodrigues AS, Rosa EAS (1999) Effect of post-harvest treatments on the level of glucosinolates in broccoli. *J Sci Food Agric* **79**, 1028-1032. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990515\)79:7<1028::AID-JSFA322>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<1028::AID-JSFA322>3.0.CO;2-I)
- Routray W, Orsat V (2012) Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioproc Technol* **5**, 409-424. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z>
- Rutkowska J, Stolyhwo A (2009) Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO₂) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. *Food Chem* **115**, 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.046>

- Sakurai S, Kawakami Y, Kuroki M, Gotoh H (2022) Structure–antioxidant activity (oxygen radical absorbance capacity) relationships of phenolic compounds. *Struct Chem* **33**, 1055-1062. <https://doi.org/10.1007/s11224-022-01920-4>
- Schneider NFZ, Cerella C, Simões CMO, Diederich M (2017) Anticancer and immunogenic properties of cardiac glycosides. *Molecules* **22**, 1932. <https://doi.org/10.3390/molecules22111932>
- Sheldon RA (2017) The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem.* **19**, 18-43. <https://doi.org/10.1039/c6gc02157c>
- Singh N, Singh N, Singh AP (2021) Solubility: An overview. *Int J Pharm Chem Anal* **7**, 166-171. <https://doi.org/10.18231/j.ijpca.2020.027>
- Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM i sur. (2019) Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *J AOAC Int* **102**, 1397-1400. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1397>
- Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014) Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem Rev* **114**, 11060-11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- Sotelo T, Lema M, Soengas P, Cartea ME, Velasco P (2015) *In vitro* activity of glucosinolates and their degradation products against brassica-pathogenic bacteria and fungi. *Appl Environ Microbiol* **81**, 432-440. <https://doi.org/10.1128/AEM.03142-14>
- Stanley HE, Barbosa MC, Mossa S, Netz PA, Sciortino F, Starr FW i sur. (2002) Water at positive and negative pressures. U: Imre AR, Maris HJ, Williams PR (ured.) NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry, Springer Dordrecht, Dordrecht, 340 https://doi.org/10.1007/978-94-010-0498-5_6
- Stotz HU, Sawada Y, Shimada Y, Hirai MY, Sasaki E, Krischke M i sur. (2011) Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of Arabidopsis against Sclerotinia sclerotiorum. *Plant J* **67**, 81-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04578.x>
- Tang B, Bi W, Tian M, Row KH (2012) Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. *J Chromatogr B* **904**, 1-21 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.020>
- Temelli F (2009) Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J Supercrit Fluids* **47**, 583-590. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.10.014>
- Thomas M, Badr A, Desjardins Y, Gosselin A, Angers P (2018) Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. italica) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chem* **245**, 1204–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.021>
- Torregrosa-Crespo J, Maset X, Guillena G, Ramón DJ, Martínez-Espinosa RM (2020) New guidelines for testing “Deep eutectic solvents” toxicity and their effects on the environment and living beings *Sci Total Environ* **704**,135382. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135382>
- Twaij BM, Hasan MN (2022) Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. *Int J Plant Biol* **13**, 4-14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>
- UI-Haq I, Khan S, Awan K, Iqbal MJ (2021) Sulforaphane as a potential remedy against cancer: Comprehensive mechanistic review. *J Food Biochem* **46**. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13886>

- Vetter J (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* **38**, 11-36. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00128-2)
- Vranova V, Rejsek K, Skene KR, Formanek P (2011) Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant and Soil* **342**, 31-48. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0673-y>
- Wang Z, Zhang Y, Zhang D, Li J, Yi X (2016) Nutritional and defensive properties of Fagaceae nuts dispersed by animals: a multiple species study. *Eur J For Res* **135**, 911-917. <https://doi.org/10.1007/s10342-016-0983-6>
- Wikene KO, Rukke HV, Bruzell E, Tønnesen HH (2017) Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **171**, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.030>
- Williams OJ, Raghavan GV, Orsat V, Dai J (2004) Microwave-assisted extraction of capsaicinoids from capsicum fruit. *J Food Biochem* **28**, 113-122. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2004.tb00059.x>
- Wittstock U, Halkier BA (2002) Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci* **7**, 263-270. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02273-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02273-2)
- Wojeicchowski JP, Ferreira AM, Abranches DO, Mafra MR, Coutinho JAP (2020) Using COSMO-RS in the design of deep eutectic solvents for the extraction of antioxidants from rosemary. *ACS Sus Chem Eng* **8**, 12132-12141. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03553>
- Wong PY, Kitts DD (2006) Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chem* **97**, 505-515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.031>
- Xu X, Dai M, Lao F, Chen F, Hu X, Liu Y i sur. (2020) Effect of glucoraphanin from broccoli seeds on lipid levels and gut microbiota in high-fat diet-fed mice. *J Funct Foods* **68**, 103858 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103858>
- Yang Z (2018) Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. U: Itoh T, Koo YM (ured.) Application of Ionic Liquids in Biotechnology. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **168**. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/10_2018_67
- Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev* **41**, 7108-7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>
- Zhansheng L, Yajie M, Yumei L, Fang Z, Yang L, Zhuang M i sur. (2019) The evolution of genetic diversity of broccoli cultivars in China since 1980. *Sci Hortic* **250**, 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.034>
- Zhao BY, Xu P, Yang FX, Wu H, Zong MH, Lou WY (2015) Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sus Chem Eng* **3**, 2746-2755. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619>

7. Sažetak

Ivona Karaula i Emma Karolina Vasung

Inovativni pristupi u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka: racionalnim dizajnom do visokovrijednih ekstrakata brokule u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Ključne riječi: prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, zelena ekstrakcija, brokula, polifenoli, glukozinolati

Sažetak: Brokula je bogata biološki aktivnim spojevima, osobito polifenolima i glukozinolatima, koji su zaslužni za višestruke zdravstvene koristi ove biljke i svrstavaju je u funkcionalnu hranu. S obzirom na brojne nedostatke konvencionalnih metoda ekstrakcije, novi trendovi u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz brokule, ali i biljaka općenito, usmjereni su na dobivanje visokokvalitetnih ekstrakata s poboljšanom biološkom aktivnošću primjenom prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (*engl.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). U ovom su radu pripremljeni tekući ekstrakti brokule primjenom NADES-a, spremni za primjenu bez dodatnih koraka pročišćavanja, bogati biološki aktivnim spojevima - polifenolima i glukozinolatima. Najprije, topljivost predstavnika polifenola i glukozinolata u brokuli u NADES-ima predviđena je programom COSMO-RS, nakon čega je pripravljeno i fizikalno-kemijski okarakterizirano pet betainijevih NADES-a sa glukozom, saharozom, glicerolom odnosno jabučnom kiselinom kao donorom vodika. Primjenom odabranih NADES-a pripravljene su ekstrakti brokule, sastav ekstrakata analiziran je obzirom na ukupne polifenole i pojedinačne glukozinolate te je ispitan antioksidacijski kapacitet ekstrakata ORAC metodom, kao i *in vitro* biološka aktivnost primjenom staničnih linija HaCaT i HeLa. Također, praćena je stabilnost polifenola i glukozinola tijekom skladištenja ekstrakata na sobnoj temperaturi odnosno u hladnjaku. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je kako su udio polifenola i glukozinolata te antioksidativni učinak veći u ekstraktima pripremljenim u NADES-ima u odnosu na ekstrakt dobiven primjenom referentnog otapala etanola. Također, biološki aktivni spojevi stabilniji su u ekstraktima dobivenim pomoću NADES-a u odnosu na etanolni ekstrakt. Ekstrakt brokule u betainijevom NADES-u sa glukozom kao donorom vodika pokazao je blago stimulativan učinak na HaCaT staničnu liniju, dok antitumorska aktivnost ekstrakta, praćena primjenom HeLa stanične linije, nije uočena. Naposljetku, procjenom održivosti postupka pripreme ekstrakta brokule primjenom NADES-a te S.W.O.T. analizom potvrđen je izvanredni potencijal NADES-a u pripravi biološki aktivnih i stabilnih biljnih ekstrakata na ekološki i ekonomski održiv način.

8. Summary

Ivona Karaula and Emma Karolina Vasung

Innovative approaches to the extraction of biologically active compounds from plants: Rational design of high-value broccoli extracts using natural deep eutectic solvents

Keywords: natural deep eutectic solvents, green extraction, broccoli, polyphenols, glucosinolates

Summary: Broccoli is rich in biologically active compounds, particularly polyphenols and glucosinolates, which are responsible for the plant's numerous health benefits and classify it as a functional food. Considering the many drawbacks of conventional extraction methods, new trends in the extraction of biologically active compounds from broccoli, and plants in general, are focused on obtaining high-quality extracts with enhanced biological activity using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES). In this study, liquid broccoli extracts were prepared using NADES, designed for use without additional purification steps, and enriched with biologically active compounds such as polyphenols and glucosinolates. Initially, the solubility of polyphenols and glucosinolates representatives in broccoli in NADES was predicted using the COSMO-RS program. Subsequently, five betaine-based NADES were prepared and characterized, using glucose, sucrose, glycerol, and malic acid as a hydrogen bond donor. Broccoli extracts were then prepared using the selected NADES, and their composition was analyzed for total polyphenols and individual glucosinolates. The antioxidant capacity of the extracts was tested using the ORAC method, and *in vitro* biological activity was assessed using HaCaT and HeLa cell lines. Additionally, the stability of polyphenols and glucosinolates during storage at room temperature and in the refrigerator was monitored. Based on the results obtained, it was concluded that the levels of polyphenols and glucosinolates and the antioxidant effect were higher in extracts prepared with NADES compared to those obtained using a reference solvent ethanol. Furthermore, the biologically active compounds were found to be more stable in extracts obtained with NADES than in ethanol extracts. The broccoli extract in a betaine-based NADES with glucose as a hydrogen bond donor showed a mildly stimulatory effect on the HaCaT cell line, while no antitumor activity was observed when tested with the HeLa cell line. Finally, the sustainability of the broccoli extract preparation process using NADES, along with a S.W.O.T. analysis, confirmed the exceptional potential of NADES for preparing biologically active and stable plant extracts in an environmentally and economically sustainable manner.