

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

# DIPLOMSKI RAD

Marina Milešević, 618/MB

Zagreb, lipanj 2016.

# **Priprava i karakterizacija prirodnih eutektičnih otapala**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof. dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković.

*Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković, te doc.dr.sc. Kristini Radošević na uloženom vremenu i trudu i nesebičnoj pomoći, te na svemu što su me naučile pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Također želim zahvaliti ostalim članovima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pruženoj pomoći i savjetima pri odradi eksperimentalnog dijela rada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Molekularna Biotehnologija

### Priprava i karakterizacija prirodnih eutektičnih otapala

*Marina Milešević 618/MB*

**Sažetak:** Prirodna eutektična otapala (*eng.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) su nova generacija ekološki prihvatljivih otapala sa mogućim primjenama u različitim industrijskim područjima. Definišu se kao smjesa dviju ili više komponenata koje se međusobno mogu povezati vodikovim vezama te koje u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese. Zbog mogućnosti tvorbe NADES iz širokog spektra spojeva moguće je prilagoditi njihova svojstva određenoj primjeni. U ovom radu pripravljeno je osam različitih NADES u različitim molarnim odnosima (kolin klorid:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, betain:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, kolin klorid:limunska kiselina, betain:limunska kiselina). Fizikalno-kemijska svojstva kao što su gustoća, viskoznost, indeks loma, električna vodljivost i pH su izmjerena i analizirana kao funkcija različitih udjela vode u otapalima (10, 30 i 50 % v/v). Također, provedena je i biološka karakterizacija ispitivanjem njihove *in vitro* citotoksičnosti na humanim stanicama HeLa i HEK293T te je izmjeren njihov antioksidacijski kapacitet ORAC metodom. Budući da pripremljeni NADES ne pokazuju citotoksični učinak na tretirane stanice, imaju antioksidativna svojstva, te se fizikalno-kemijska svojstva mogu pozitivno prilagoditi povećanjem udjela vode postoji mogućnost njihove primjene u raznim tehnološkim procesima.

**Ključne riječi:** prirodna eutektična otapala, udio vode, fizikalno-kemijska svojstva, citotoksičnost, antioksidacijski kapacitet

**Rad sadrži:** 43 stranica, 7 slika, 3 tablice, 44 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:**

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr.sc. Kristina Radošević
2. Izv.prof. dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. Izv.prof. dr.sc. Ivana Kmetič
4. Prof. dr.sc. Karin Kovačević-Ganić (zamjena)

**Datum obrane:** 27. lipnja 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Molecular Biotechnology

### **Preparation and characterization of natural deep eutectic solvent**

*Marina Milešević, 618/MB*

**Abstract:** Natural deep eutectic solvents (NADES) are new generation of environmentally friendly solvents with possible applications in various industrial fields. They are defined as a mixture of two or more components which can be connected to each other by hydrogen bonds, and which in a certain ratio have lower melting points than the individual components of the mixture. Because of the possibility of forming NADES from a wide range of compounds it is possible to adjust their properties to particular application. In this study, eight different NADES was prepared at different molar ratios (choline chloride: malic acid, proline: malic acid, choline chloride: proline: malic acid, betaine: malic acid, malic acid: glucose, malic acid: glucose: glycerol, choline chloride: citric acid, betaine: citric acid). Physico-chemical properties such as density, viscosity, refractive index, electrical conductivity and pH were measured and analyzed as a function of water content in the solvent (10, 30 and 50% v/v). Also, a biological characterization was conducted by examination of their *in vitro* cytotoxicity on human cells HeLa and HEK293T and measurement of their antioxidant capacity with ORAC method. Because prepared NADES doesn't show cytotoxic effects toward treated cells, has antioxidant properties and the physico-chemical properties can be positively adjusted by increasing the water content, there is a possibility of their application in various technological processes.

**Keywords:** natural deep eutectic solvents, water content, physico-chemical properties, cytotoxicity, antioxidative capacity

**Thesis contains:** 43 pages, 7 figures, 3 table, 44 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Associate professor*

**Technical support and assistance:**

**Reviewers:**

1. PhD. Kristina Radošević, Assistant professor
2. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Associate professor
3. PhD. Ivana Kmetič, Associate professor
4. PhD. Karin Kovačević-Ganić, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 27. june 2016.

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Eutektična otapala.....	3
2.1.1. Prirodna eutektična otapala.....	4
2.1.2. Priprava prirodnih eutektičnih otapala.....	5
2.1.3. Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičnih otapala.....	7
2.1.3.1. Viskoznost.....	7
2.1.3.2. Električna vodljivost.....	9
2.1.3.3. Gustoća.....	9
2.1.3.4. Indeks loma.....	10
2.1.3.5. pH.....	11
2.1.4. Biološka aktivnost prirodnih eutektičnih otapala.....	11
2.1.4.1. <i>In vitro</i> testovi određivanja toksičnosti.....	11
2.1.4.2. Antioksidativna aktivnost prirodnih eutektičnih otapala.....	13
2.1.5. Primjena prirodnih eutektičnih otapala.....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Kemikalije.....	16
3.1.2. Humane stanične linije.....	16
3.1.3. Uređaji i oprema.....	18
3.2. Metode rada .....	18
3.2.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala.....	18
3.2.2. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava prirodnih eutektičnih otapala.....	19
3.2.3. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala na HeLa i HEK293T i staničnim linijama.....	19
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.....	21
3.3. Obrada podataka.....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	23
4.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala.....	23
4.2. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljeni prirodnih eutektičnih otapala.....	25
4.3. <i>In vitro</i> djelovanje prirodnih eutektičnih otapala na HeLa i HEK293T stanične linije.....	32
4.4. Antioksidacijski kapacitet prirodnih eutektičnih otapala.....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	38
<b>6. LITERATURA</b> .....	39

# 1. UVOD

Razvoj industrijske proizvodnje, s jedne strane donosi gospodarski razvitak koji se očituje u znatnom povećanju životnog standarda, no s druge uzrokuje onečišćenje prirode i narušavanje ekološke ravnoteže. Unutar grane kemije, koja se naziva *Zelena kemija*, intenzivno se istražuju novi, sigurniji i energetski učinkovitiji procesi proizvodnje i primjene kemikalija koji se zasnivaju na kompromisu između ekonomskih, socijalnih i ekoloških zahtjeva. Jedno od ključnih pitanja su ekološki prihvatljiva zelena otapala koja bi zamijenila opasna organska otapala čija je upotreba široko rasprostranjena. Prema smjernicama zelene kemije idealno otapalo trebalo bi biti jednostavno za upotrebu, kemijski i fizički stabilno, niske hlapljivosti te jednostavno za recikliranje uz mogućnost ponovne uporabe.

Do sada je broj dostupnih *zelenih* otapala bio prilično ograničen, no u posljednja dva desetljeća ogromnu pozornost stekle su ionske tekućine (*eng.* Ionic Liquids, ILs) koje se definiraju kao organske soli sa temperaturom tališta nižom od 100 °C (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). S obzirom na vrijeme otkrivanja, kemijsku strukturu spojeva, te fizikalno-kemijska i biološka svojstva ILs se mogu podijeliti na ionske tekućine prve, druge, treće i četvrte generacije. Imaju jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva koja su poželjna s tehnološkog gledišta, no njihova priprava često je skupa i komplicirana, te pokazuju visoku razinu toksičnosti prema okolišu i ljudima (Kudlak i sur., 2015).

U četvrtu generaciju ILs ubrajaju se i eutektična otapala (*eng.* Deep Eutectic Solvents, DES), koja zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava, te jednostavnije i ekonomičnije pripreme (niža cijena početnih sirovina) predstavljaju novu generaciju zelenih otapala. Definiraju se kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koja u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Paiva i sur., 2014). Kada su komponente koje izgrađuju eutektično otapalo najčešće primarni metaboliti takva se otapala nazivaju prirodnim eutektičnim otapalima (*eng.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). Pripravljena otapala često su biorazgradiva, stabilnija, nisu hlapljiva, manje su toksična prema okolišu i ljudima, te je njihova direktna upotreba u proizvodnji moguća bez dodatnog pročišćavanja. Zbog postojanja širokog spektra spojeva koji mogu tvoriti NADES, postoji i mogućnost dizajniranja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava za različite buduće aplikacije kao npr. otapalo ili zamijenski medij u području sinteze, ekstrakcije, biokemije, elektrokemije, kemijske/enzimske katalize, proizvodnji biodzela itd.



Cilj ovog rada je bila priprava osam NADES (kolin klorid:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, betain:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, kolin klorid:limunska kiselina, betain:limunska kiselina) te njihova fizikalno-kemijska karakterizacija. Također je provedena i biološka karakterizacija ispitivanjem njihove *in vitro* citotoksičnosti na humanim stanicama HeLa i HEK293T te je izmjerena njihov antioksidacijski kapacitet ORAC metodom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Eutektična otapala

Abbott i sur. prvi put spominju eutektična otapala 2001. god., a 2003. god. ističu brojne prednosti pripremljenih eutektičnih otopina uree i raznih kvarternih amonijevih soli kao što su stabilnost otopine, biorazgradivost, te mogućnost prilagodbe otapala različitim aplikacijama. Od tada eutektična otapala počinju se razmatrati kao alternativa ionskim tekućinama, te se eksponencijalno povećava broj radova vezanih uz njihovu fizikalno-kemijsku karakterizaciju, te se širi mogućnost njihove primjene (Paiva i sur., 2014).

Danas su eutektična otapala široko priznata kao nova, četvrta generacija ionskih tekućina zbog mnogih zajedničkih fizikalno-kemijskih karakteristika, no ipak treba istaknuti da su to zapravo dvije različite vrste otapala. DES-ovi se definiraju se kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koje u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Paiva i sur., 2014). S obzirom na kemijsku prirodu komponenata, DES-ovi su smjese Lewis-ovih ili Brønsted-ovih kiselina i baza, te mogu sadržavati različite anione i katione. Za razliku od njih, ILs se formiraju prvenstveno od jedne izolirane vrste kationa i aniona (Smith i sur., 2014). Općenito, DES-ove karakterizira velika depresija točke smrzavanja i tekuće stanje na temperaturama nižim od 150 °C, s time da je većina prisutna u tekućem stanju na temperaturama nižim od 70 °C (Zhang i sur., 2012).

Eutektična otapala obično se dobivaju kompleksiranjem organskih soli (kvarterne amonijeve ili fosfonijeve soli) sa metalnim solima ili donorima vodikovih veza (*eng. hydrogen bond donors* - HBD). S obzirom da različite komponente mogu tvoriti eutektična otapala u tablici 1. prikazana su definirana četiri tipa DES-ova.

**Tablica 1.** Tipovi eutektičnih otapala (Smith i sur., 2014)

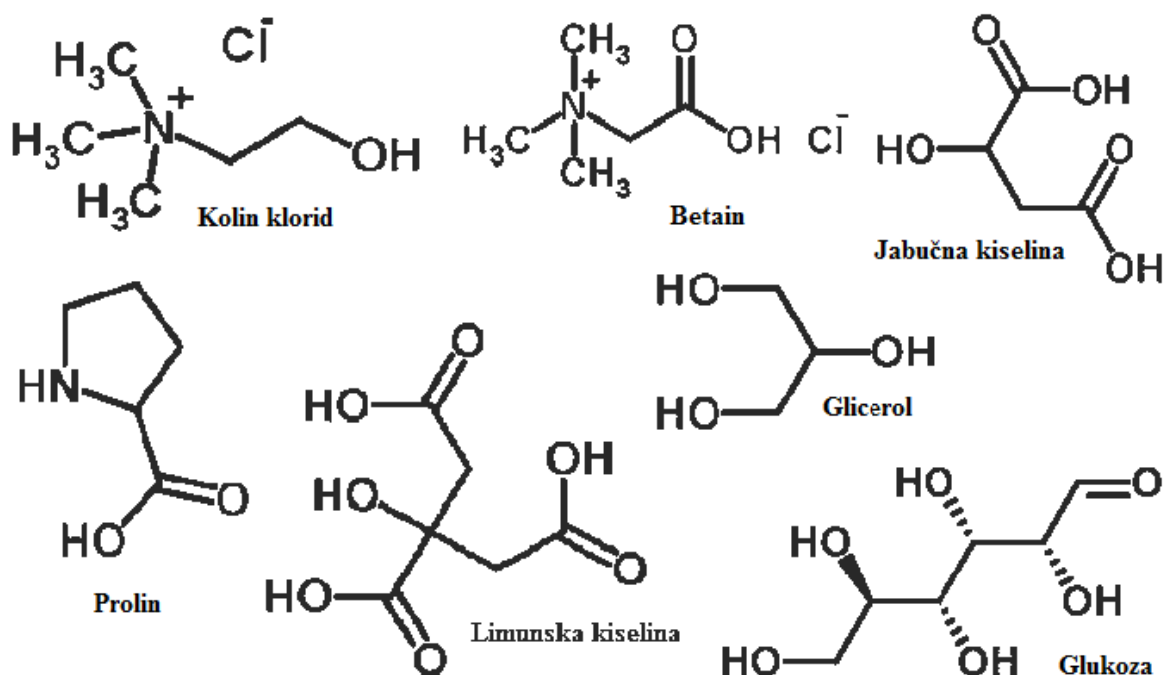
Tip	Opis	Primjer
I	Kombinacija metala i organske soli	ZnCl <sub>2</sub> + kolin klorid
II	Kombinacija hidrata metalne soli i organske soli	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O + kolin klorid
III	Kombinacija donora vodikove veze i organske soli	Urea + kolin klorid
IV	Kombinacija metalnog klorida sa donorom vodikove veze	MCl <sub>x</sub> + urea/etilen glikol

### 2.1.1. Prirodna eutektična otapala

Ideja za prirodna eutektična otapala potiče od mikrobnih, biljnih i životinjskih stanica u kojima su primarni metaboliti kao što su šećeri, aminokiseline, organske kiseline (jabučna, limunska i mliječna kiselina), te kolin prisutni u visokim koncentracijama. Višak šećera stanicama može poslužiti kao skladište i izvor energije, no ostali spojevi prisutni su u prevelikim koncentracijama da bi ih se smatralo samo intermedijerima u metaboličkim putevima. Pretpostavlja se da u živim stanicama metaboliti koji su prisutni u visokim koncentracijama mogu formirati treći alternativni medij koji ima važnu ulogu u biosintezi, otapanju, spremanju i transportu metabolita koji nisu topljivi niti u vodi niti u mastima, te da potpomaže preživljavanju biljaka u ekstremnim sušama i hladnoćama (Choi i sur., 2011).

Nedavno je otkriveno da brojni biljni primarni metaboliti u krutom stanju kada se pomiješaju u pravom omjeru formiraju tekućinu. Pokazalo se da su primarni metaboliti idealan izbor za pripremu NADES zbog njihove velike kemijske raznolikosti, biodegradacije, te zbog farmaceutski prihvatljivog profila toksičnosti. Dai i sur. (2013a) pripremili su velik broj stabilnih NADES baziranih prvenstveno na primarnim metabolitima kao što su aminokiseline, organske kiseline, te šećeri.

Općenito, NADES se dobivaju kompleksiranjem akceptora i donora vodika, te bi ih se mogli klasificirati kao treći tip eutektičnih otapala. Najčešće sadrže donore vodika kao što su alkoholi, kiseline, amidi, amini ili šećeri, a od akceptora vodika najčešće se koristi kolin klorid. Kolin klorid je vrlo jeftina, biorazgradiva, netoksična kvartarna amonijeva organska sol. Koristi se kao vitaminski dodatak krmnim smjesama koji poboljšava i ubrzava rast životinja, a pogotovo peradi. Lako je dostupan zbog široko rasprostranjene i ekonomične proizvodnje, te se najčešće dobiva ekstrahiranjem iz biomase ili jednostavnom sintezom iz fosilnih rezerva (Durand i sur., 2013; Zhang i sur., 2012). Na slici 1. prikazane su kemijske strukture molekula koje su korištene za pripremu prirodnih eutektičnih otapala u ovom radu.



**Slika 1.** Kemijske strukture molekula koje mogu tvoriti NADES (Anonymous 1, 2016)

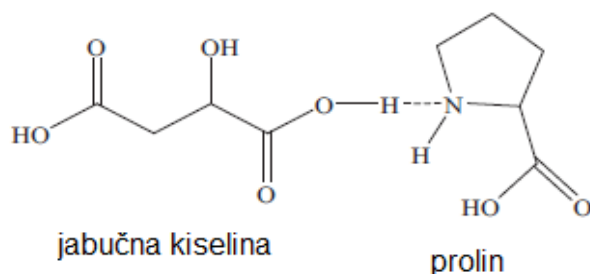
### 2.1.2. Priprava prirodnih eutektičnih otapala

Za razliku od ostalih generacija ILs, priprava NADES je jednostavnija i ekonomičnija, te se mogu pripremiti na više načina: iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do unaprijed određene vrijednosti temperature (Paiva i sur., 2014).

Najčešće se pripravljaju postupkom blagog zagrijavanja gdje se točno određena masa komponenata izvaže, te se s ili bez dodatka vode zagrijava uz miješanje na temperaturi do 100 °C, 30 do 90 minuta dok se ne formira bistra tekućina. Molarni omjer komponenata i temperatura taljenja ovisi o kemijskoj prirodi komponenata eutektičnog otapala. Otapala istog kemijskog profila mogu se dobiti vakuum upravljanjem gdje se sastojci NADES prvo otapaju u vodi, a potom uparavaju na 50 °C pomoću rotacijskog uparivača do postizanja konstantne mase (Abbott i sur., 2004; Dai i sur., 2013a). Gutiérrez i sur. (2009) opisali su postupak dobivanja NADES pomoću liofilizacije. Točnije, vodene otopine pojedinačnih komponenata u određenom omjeru se pomiješaju i zamrznu te se postupkom sušenja (sublimacije) dobiva

tekući NADES. Zbog svoje jednostavnosti, metoda se pokazala pogodna za ugradnju različitih staničnih struktura (vezikula, liposoma) u NADES (Gutiérrez i sur., 2009).

Razlog nastajanja tekućih eutektičnih otapala je međusobno povezivanje dviju ili više krutih ili tekućih komponenata pomoću vodikovih veza. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR) pogodna je za identifikaciju i određivanje strukture (npr. određivanje duljina veza i kuteva, te jakost veze) bilo kojeg uzorka jer ne postoje dvije molekularne strukture koje proizvode isti infracrveni spektar. Usporedbom FT-IR spektara čiste otopine jabučne kiseline, čiste otopine prolina i eutektične otopine jabučne kiseline i prolina u molarnim omjerima 1:1, 3:1 i 1:3 na sobnoj temperaturi, utvrđeni su kemijski pomaci vrpca koji ukazuju da jabučna kiselina i prolin mijenjaju svoju konformaciju da bi formirali vodikovu vezu ( $O=C-O-H\cdots N$ ), kako je prikazano na slici 2. Usporedbom kemijskih pomaka i inteziteta vrpca određenih funkcionalnih grupa koje sudjeluju u formiranju vodikovih veza na spektrima različitih molarnih omjera može se zaključiti da je 1:1 pravilan omjer za stvaranje stabilnog NADES između jabučne kiseline i prolina (Dai i sur., 2015). Općenito, promjene u kemijskoj strukturi molekula koja sudjeluje u stvaranju vodikovih veza moguće je vidjeti iz širenja ili sužavanja vrpca koje uključuju OH skupine, pomaka C-H i C=O vrpca u kiselinama ili u nestanku vrpca reprezentativnih grupa molekule.



**Slika 2.** Vodikova veza između hidroksilne skupine jabučne kiseline i amino skupine prolina (Dai i sur., 2015)

Novonastale vodikove veze u NADES uzrokuju mjestimičnu delokalizaciju naboja, što uzrokuje snižavanje tališta smjese u odnosu na talište pojedinačnih komponenti (Abbott i sur., 2001). Na primjer, kombinacijom dvije čiste krutine kao što su urea (temperatura taljenja,  $T_m = 133\text{ }^\circ\text{C}$ ) i kolin klorid ( $T_m = 302\text{ }^\circ\text{C}$ ) u molarnom odnosu 2:1 dobiva se eutektično otapalo na temperaturi od  $15\text{ }^\circ\text{C}$  što je znatno niže od temperatura taljenja čistih komponenata (Abbott i sur., 2003). Snižavanje temperature tališta ovisi o simetriji prisutnog kationa i o kemijskoj prirodi funkcionalnog bočnog lanca (Abbott i sur., 2001). U slučaju kolin klorida, izbor HBD kao i njihov molarni omjer je kritična točka formiranja NADES sa nižom točkom tališta.

Također, prisutan anion u derivatu kolinskih soli može utjecati na točku tališta, pa tako u kombinaciji s ureom točka tališta NADES opada prema redosljedu  $F^- > NO_3^- > Cl^- > BF_4^-$  (Zhang i sur., 2012).

### 2.1.3. Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičnih otapala

Kemijska struktura vodik donora i akceptora znatno utječe na formiranje i stabilnost NADES. Pod pojmom stabilnosti smatra se mogućnost pripremljenih NADES da ostanu u tekućoj fazi dulje vrijeme, tj. da ne dolazi do pojave kristalnog taloga. U slučaju organskih kiselina, za razliku od jabučne i limunske, jantarna kiselina neće tvoriti tekućinu sa kolinskim solima. Prisutnost dodatnih hidroksilnih i karboksilnih skupina u jabučnoj i limunskoj kiselini omogućava nastajanje više vodikovih veza sa kolin kloridom čime se omogućava formiranje stabilnog NADES. Uz kemijsku strukturu, na stabilnost vodikovih veza veliki utjecaj ima i prostorni raspored skupina unutar molekule (Dai i sur., 2013a). Popescu i Constantin (2014) pokazali su da limunska i malonska kiselina formiraju eutektičnu otopinu sa kolin kloridom u molarnom omjeru 1:2, no zbog različitog prostornog rasporeda reaktivnih skupina, eutektična otopina sa limunskom kiselinom (donor tri protona) gubi na stabilnosti i s vremenom postaje gusti gel, dok eutektična otopina sa malonskom kiselinom (donor dva protona) zadržava svoja svojstva duže vrijeme. Također, na stabilnost NADES mogu utjecati i različiti omjeri komponenata. Na primjer, pripravljena eutektična otopina glukoze i kolin klorida biti će stabilna kada se pomiješaju u molarnom omjeru 2:5, ali u molarnim omjerima 2:1, 1:1 ili 1:4 u nastaloj bistroj tekućini s vremenom se postupno pojavljuje kristalni talog (Dai i sur., 2013a).

Nakon pripreme stabilnih NADES potrebno je provesti fizikalno-kemijsku karakterizaciju (npr. odrediti električnu provodljivost, polarnost, viskoznost, gustoću, površinsku napetost, index loma, pH itd.) kako bi se što bolje definirala njihova svojstva, a time i mogućnost njihove primjene.

#### 2.1.3.1. Viskoznost

Zajedničko svima eutektičnim otapalima, što je ujedno i njihov najveći nedostatak, je vrlo visoka viskoznost ( $200-500 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$  na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) što dovodi do nekih praktičnih problema kao što je dugotrajan prijenos mase u postupcima ekstrakcije (Dai i sur., 2013b). Općenito,

viskoznost opisuje unutarnje trenje gibajućeg fluida tj. otpornost tvari prema tečenju te visoka viskoznost predstavlja problem kod projektiranja industrijskih procesa npr. kod sustava za pumpanje, miješanje i protok tekućina. Visoke vrijednosti viskoznosti povezuju se sa jakim intermolekularnim interakcijama (mreža vodikovih veza i Van der Waalsove interakcije) između pojedinih komponenata NADES koje neizbježno smanjuju pokretljivost slobodnih molekula unutar NADES (Ruß i König, 2012; Zhang i sur., 2012). Na viskoznost se može utjecati dodatkom vode. Voda utječe na prisutne vodikove veze koje postupno oslabljuju tj. progresivno pucaju čime se viskoznost eutektičnog otapala smanjuje. No, kada udio vode pređe 50 %, gubi se struktura NADES (povećava se broj slobodnih molekula), te se takvo otapalo više ne može smatrati NADES (Dai i sur., 2015).

Viskoznost eutektičnih otapala pri atmosferskim tlakom jako ovisi o temperaturi, te mnogi radovi pokazuju da se viskoznost NADES smanjuje sa povećanjem temperature. Porast temperature povećava prosječnu brzinu molekula u otapalu što smanjuje jačinu prosječne intermolekularne sile što u konačnici dovodi do pucanja vodikovih veza. Promjena viskoznosti sa temperaturom može se opisati Arrhenius-ovom jednadžbom (Hayyan i sur., 2012; Hayyan i sur., 2013c; Kareem i sur., 2010).

Uz temperaturu, veliki utjecaj na viskoznost imaju molarni odnos i kemijska priroda komponenata NADES (Kareem i sur., 2010). S obzirom na omjer komponenata u nekim slučajevima se pokazalo da NADES sa najnižom eutektičnom točkom (najniža temperatura taljenja) imaju i najnižu viskoznost u testiranom rasponu temperature. S obzirom na sastav, Mulia i sur. (2015) pokazali su da je viskoznost NADES baziranih na kolin kloridu i alkoholima (1,2-propandiol i glicerol) kao HBD niža nego viskoznost NADES koji kao HBD sadrže šećer (glukoza) ili organsku kiselinu (limunska kiselina). Što HBD ima više hidroksilnih skupina, više vodikovih veza može tvoriti sa kolin kloridom što utječe na jače povezivanje komponenata i povećanje viskoznosti. Kada se uspoređuju alkoholi, kod diola (1,2-propandiol) povećanje koncentracije kolin klorida rezultira povećanjem viskoznosti, dok kod triola (glicerol) dodatak kolin klorida dovodi do redukcije viskoznosti (Harris, 2008). U slučaju NADES koji sadrže kolin klorid i šećerne alkohole ili polirole (ksilitol, sorbitol...) kao HBD izmjerena je visoka viskoznost pri blagim temperaturama, no na viskoznost se može utjecati dodavanjem glicerola što značajno smanjuje viskoznost (Maugeri i Domínguez de María, 2012). Kada se uspoređuju NADES koji sadrže različite organske soli, NADES bazirani na fosfonijevom ionu i različitim HBD imaju nižu viskoznost nego NADES bazirani na kolin kloridu i šećerima (fruktoza, glukoza) (Hayyan i sur, 2012; Hayyan i sur, 2013c;

Kareem i sur., 2010). Kod eutektičnih otapala kolin klorid:urea i kolin klorid:malonske kiselina u omjerima 1:2 razlike u izmjerenoj viskoznosti pripisuju se različitim donorima vodika što utječe na jačinu vodikove veze, urea formira dvije vodikove veze preko  $\text{NH}_2$  grupe, dok malonska kiselina preko hidroksilnih ( $-\text{OH}$ ) i karbonilnih grupa ( $-\text{C}=\text{O}$ ) (Popescu i Constantin., 2014).

#### 2.1.3.2. Električna vodljivost

Električna vodljivost je fizikalna veličina koja opisuje svojstvo materijala da prenosi električnu struju, te ovisi o raspoloživim nosiocima naboja, njihovoj pokretljivosti te valenciji iona. Na električnu vodljivost NADES utječe sastav, udio vode u otapalu, temperatura i viskoznost. Zbog svoje relativno visoke viskoznosti, većina NADES imaju nisku električnu vodljivost (niža od  $2 \text{ mS cm}^{-1}$  na sobnoj temperaturi). Kako se sa povećanjem temperature smanjuje viskoznost, tako se povećava električna vodljivost NADES (Zhang i sur., 2012). Ovisnost električne provodljivosti i temperature, kao i kod viskoznosti, može se opisati Arrhenius-ovom jednadžbom. Također, na električnu vodljivost može se utjecati i dodatkom vode (do 50 %) čime se električna vodljivost NADES povećava čak i do 100 puta (Dai i sur., 2015).

S obzirom na sastav NADES električna vodljivost opada u smjeru baza:polialkohol > baza:organska kiselina  $\approx$  baza:šećer > organska kiselina:aminokiselina (nepolarna) > organska kiselina:šećer > šećer:šećer, što znači da kolin klorid (baza) i organske kiseline pokazuju veću vodljivost nego kolin klorid i nepolarne aminokiseline (Dai i sur., 2015). Kada NADES sadrže alkohole točnije diole mora se paziti na koncentraciju soli. Naime, kada sadrže više od 20 % kolin klorida iako se povećava broj nabijenih molekula dolazi do zasićenja otopine solima, te vrijednost električne vodljivosti opada (Harris, 2008). Kareem i sur. (2010) pokazali su da se električna vodljivost NADES koji sadrže metil-trifenil-fosfonijev bromid povećava sa povećanjem temperature te su dobri kandidati za elektrokemijske procese, za razliku od NADES koji sadrže benzil-trifenil-fosfonijev bromid čija se električna provodljivost smanjuje sa povećanjem temperature.

#### 2.1.3.3. Gustoća

Gustoća je jedno od najvažnijih fizikalnih svojstava za otapalo, te se definira kao omjer mase i volumena neke tvari. Općenito, gustoća NADES je veća nego gustoća vode, te je usporediva sa ILs čija gustoća varira između  $1,1$  i  $2,4 \text{ g cm}^{-3}$ .



Na gustoću NADES, kao i na druga fizikalno-kemijska svojstva, može se utjecati promjenom temperature. Povećanje temperature dovodi do veće molekularne aktivnosti i pokretljivosti što povećava molarni volumen otopine i uzrokuje linearno smanjivanje gustoće (Hayyan i sur., 2012; Hayyan i sur., 2013c; Kareem i sur., 2010). Također, na promjenu gustoće NADES utječe i molarni omjer organske soli i HBD, kao i kemijska priroda HBD. Na primjer, smanjivanje gustoće NADES koji sadrži glicerol (alkohol kao HBD) i kolin klorid (organska sol) postiže se povećanjem molarnog udjela kolin klorida što se može objasniti teorijom rupa (Zhang i sur., 2012). U slučaju NADES koji uz kolin klorid sadrže fruktozu ili glukozu (šećer kao HBD), gustoća se povećava kako se povećava molarni udio kolin klorida, te najveću gustoću pokazuje NADES kolin klorid:fruktoza u molarnom omjeru 1:1 (Hayyan i sur., 2012; Hayyan i sur., 2013c). Kao i kod viskoznosti, u nekim slučajevima pokazalo se da NADES sa najnižom eutektičnom točkom (najniža temperatura taljenja) imaju i najnižu gustoću u testiranom rasponu temperature. Također, primjećeno je da povećanje udjela vode do 50 % u NADES uzrokuje linearno smanjivanje gustoće (Dai i sur., 2015).

#### 2.1.3.4. Indeks loma

Indeks loma je bezdimenzionalna fizikalna veličina koja opisuje međudjelovanje svjetlosti i optički prozirne tvari, a definira se kao omjer brzine svjetlosti u vakumu i brzine svjetlosti u mjerenom uzorku (apsolutni indeks loma) ili kao omjer brzina svjetlosti u dva optička sredstva (relativni indeks loma). Bitan je u optičkoj identifikaciji pojedinih tvari, kod provjere čistoće materijala i mjerenja koncentracije otopljene tvari u otopini. Indeks loma proporcionalan je kvadratnom korijenu relativne dielektrične permitivnosti tvari i relativne magnetske permeabilnosti, te njegova promjena sa promjenom temperature nije linearna, no očekuje se da opada sa povećanjem temperature zbog smanjenja gustoće otapala, što se pokazalo točnim u većini slučajeva (Kareem i sur., 2010; Hayyan i sur., 2012). Također, pokazalo se da NADES koji u svom sastavu imaju šećere (fruktoza, glukozu) imaju veći indeks loma zbog veće gustoće u usporedbi sa NADES koji ne sadrže šećere (Hayyan i sur., 2012, Hayyan i sur., 2013c, Kareem i sur., 2010). U slučaju NADES koji sadrže kolin klorid i karboksilne kiseline (npr. limunska, malonska, fenil-propionska, fenil-octena kiselina itd.) vrijednost indeksa loma je relativno visoka, a najveću vrijednost pokazuju kiseline sa fenilnom skupinom jer sadrže aromatski prsten koji je podložniji promjeni dipolnog momenta zbog promjene vanjskog električnog polja što u konačnici uzrokuje veći indeks loma (Abbott i sur., 2004).

### 2.1.3.5. *pH*

pH je mjera kiselosti odnosno bazičnosti vodenih otopina i mijenja se linearno sa promjenom temperature. Važno je svojstvo kod odabira vrste materijala za konstrukciju cijevi u pogonu (zbog moguće korozije), te ima utjecaj na provođenje procesa. Na primjer, eutektična otopina kolin klorid:urea zbog slabe lužnatosti može apsorbirati malu količinu CO<sub>2</sub> (Zhang i sur., 2012).

Osim temperature, na pH može imati jak utjecaj i kemijska priroda HBD, pa tako eutektična otapala koja sadrže kolin klorid i šećerne alkohole kao HBD uvijek pokazuju neutralni pH (Maugeri i Domínguez de María, 2012). Na sobnoj temperaturi pH NADES koji sadrže šećere (fruktoza, glukoza) kreće se u rasponu od 6,1 do 7,1, no postupno povećanje temperature uzrokuje smanjivanje pH (Hayyan i sur, 2012; Hayyan i sur, 2013c). Budući da se organske kiseline koriste kao HBD u prirodnim eutektičnim otapalima, dokazano je da takvi NADES imaju osobito niske vrijednosti pH (manje od 3), te kao rezultat toga je njihov negativan učinak na aktivnost stanica zbog toga što uzrokuju denaturaciju proteina (Radošević i sur., 2015), ali zbog svojih kiselih svojstva takvi NADES su poželjniji u ekstrakcijskim procesima (Dai i sur., 2013b).

## 2.1.4. Biološka aktivnost prirodnih eutektičnih otapala

### 2.1.4.1. *In vitro testovi određivanja toksičnosti*

Zbog prirodnog porijekla većine tvari koje se koriste za pripremu NADES i njihove niske toksičnosti za okoliš i ljude obično se smatra da to nisu toksična otapala. Međutim, između komponenata NADES može doći do pojave sinergijskog učinka što rezultira većom toksičnošću otapala od individualnih komponenata. NADES bazirani na fosfonijevom ionu i različitim HBD (glicerol, etilen glikol i trieten glikol) pokazuju veću toksičnost na gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama od individualnih komponenata što se pripisuje prisutnoj delokalizaciji naboja u otapalu koja uzrokuje pucanje staničnih stijenki bakterija, te se navedena otapala potencijalno mogu koristiti kao antibakterijska sredstva (Hayyan i sur., 2013a, Paiva i sur., 2014). S druge strane, NADES bazirani na kolin kloridu i različitim HBD (glicerol, etilen glikol, trieten glikol i urea) ne pokazuju toksičnost na gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama (Hayyan i sur., 2013b). No, Wen i sur. (2015) su pokazali da pri

većim koncentracijama NADES koji sadrže kolin klorid ili kolin acetat (posebice u kombinaciji sa etilen glikolom i glicerolom kao HBD) narušavaju strukturu stanične stijenke gram-negativne bakterije *Escherichia Coli*. U vodenoj otopini, NADES mogu biti disocirani te kolinski kation može stupati u interakcije preko vodikovih veza i drugih interakcija sa polisaharidima ili peptidnim lancima u staničnoj stijenci što uzrokuje njezino izobličenje.

Osim na bakterijama, toksičnost NADES ispitana je i na drugim organizmima. Na solinskom račiću (*Artemia salina*) NADES bazirani na kolinskim solima ili fosfonijevom ion pokazuju veću toksičnost od individualnih komponenta. Pretpostavlja se da je razlog tome sinergijski učinak između komponenta NADES, nedostatak kisika ili zbog poteškoća u kretanju račića u otapalu zbog visoke viskoznosti (Hayyan i sur., 2013a; Hayyan i sur., 2013b). Nadalje, na humanoj staničnoj liniji karcinoma MCF-7 i stanicama ovarijskog kanalskog soma (CCO) NADES bazirani na kolin kloridu i HBD (glukoza, glicerol i oksalna kiselina) pokazuju nisku ili umjerenu toksičnost, te ne inhibiraju klijavost sjemena pšenice (Radošević i sur., 2015). S druge strane, na CCO staničnoj liniji Radošević i sur. (2016) pokazuju da NADES bazirani na kolin kloridu i organskim kiselinama (limunska i mliječna kiselina), te šećerima (fruktoza, ksiloza, manosa) kao HBD ne pokazuju toksičnost, dok otapalo kolin klorida:jabučna kiselina u molarnom omjeru 1:1 pokazuje najveći inhibicijski utjecaj na viabilnost CCO stanica tj. pokazuje umjerenu citotoksičnost. Također, Paiva i sur. (2014) zaključuju da otapala koja sadrže kolin klorid i vinsku ili limunsku kiselinu pokazuju toksičan učinak na staničnoj kulturi mišjih fibroblasta (L929). Također, u istraživanju Hayyan i sur. (2015) NADES bazirani na kolin kloridu i različitim HBD (glicerol, etilen glikol, trietilen glikol i urea) pokazuju relativno visoku citotoksičnost na tumorskim (PC3, A375, HepG2, HT29, MCF-7) i normalnim (OKF6 i H413) humanim staničnim linijama. Najmanju citotoksičnost pokazuje NADES koji kao HBD sadrži ureu (organska supstanca koja se proizvodi u ljudskom tijelu), dok stanična linija PC3 pokazuje najveću rezistenciju na testirane NADES. U konačnici toksičnost NADES ovisi o sastavu, viskoznosti i omjeru komponenta NADES, ali i o osjetljivosti stanične linije na toksine (Hayyan i sur., 2015, Wen i sur., 2015).

U gore navedenim istraživanjima koristili su se različiti *in vitro* testovi citotoksičnosti koji uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, fragmentima tkiva, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama itd., koji su razvijeni kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama. Prednost *in vitro* testova je u tome što su rezultati dostupni u kratkom vremenskom roku, visoki je stupanj standardizacije i reproducibilnosti,

jeftiniji su troškovi provođenja testa te nastaje manja količina toksičnog otpada. Nedostaci *in vitro* testova su nedovoljna ili potpuna odsutnost metaboličke aktivacije ispitivane tvari u staničnim sustavima zbog izmijenjenih svojstava stanica, te nedostatak validacije.

#### 2.1.4.2. *Antioksidativna aktivnost prirodnih eutektičnih otapala*

Antioksidansi su spojevi koji pomažu u borbi protiv štetnih učinaka reaktivnih kisikovih čestica (ROS) i slobodnih radikala koji mogu oštetiti i promijeniti funkciju biomolekula što dovodi do stanične disfunkcije i smrti stanica, te mogu uzrokovati oksidativni stres u tijelu koji se očituje u pojavi različitih degenerativnih bolesti (npr. ateroskleroza, hipertenzija, karcinomi itd.). Najveću pozornost zbog vrlo izraženog antioksidacijskog i kemoprotektivnog djelovanja na ljudsko zdravlje (smanjuju učestalost teških kroničnih bolesti, kao što su tumorska i kardiovaskularna oboljenja) privlače različite skupine fenolnih spojeva. No, osim njih spojevi kao što su limunska kiselina, jabučna kiselina, prolin i betain također pokazuju određenu antioksidativnu aktivnost, te imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Pošto prirodna eutektična otapala u svom sastavu mogu sadržavati spojeve kao što su limunska kiselina, jabučna kiselina, prolin i betain može se očekivati da čisti NADES imaju određenu antioksidativnu tj. biološku aktivnost.

U literaturi postoji vrlo malo radova koji se odnose na antioksidativnu aktivnost NADES. Hayyan i sur. (2015) pokazuju, na temelju rezultata ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) analize, da NADES bazirani na kolin kloridu i HBD (glicerol, etline glikol, trietilen glikol i urea) imaju nisku antioksidativnu aktivnost u odnosu na korišteni standard kvarcetin, što ukazuje da navedeni NADES nemaju mogućnost hvatanja slobodnih radikala.

S druge strane, NADES su se pokazala su se kao dobra otapala u ekstrakciji fenolnih spojeva iz različitih sirovina, te podaci dobiveni iz istraživanja Mouratoglou i sur. (2016) pokazuju da eutektičke otopine glicerol: kolin klorid i glicerol:natrijev acetat imaju usporediv, a u nekim slučajevima i znatno veći kapacitet ekstrakcije polifenola u odnosu na vrlo učinkovit vodeni etanol, te da postoji korelacija između rezultat prinosa polifenola u ekstraktima i rezultata antioksidativne aktivnosti ekstrakata (FRAP i DPPH metoda), tj. ekstrakti sa većom koncentracijom polifenolnih spojeva pokazuju i veću antioksidativnu aktivnost tj. pokazuju veću moć redukcije i veću antiradikalnu aktivnost.

### 2.1.5. Primjena prirodnih eutektičnih otapala

Prirodna eutektična otapala imaju jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva te zbog mogućnosti dizajniranja istih moguće je osmišljavanje idealnog otapala za specifične svrhe. Razvoj ovih otapala privukao je pozornost u sintetskoj kemiji, elektrokemiji, izradi nanomaterijala, biokemiji te razdvajanju i analizi različitih spojeva. Mnoga istraživanja pokazuju široku mogućnost upotrebe NADES kao otapala na području katalize i organske sinteze, te ona doprinose dizajniranju ekološki prihvatljivih procesa zbog mogućnosti selektivnog i jednostavnog izdvajanja produkta reakcije, prilagodbe pH, otapanja organskih i anorganskih soli kao i tranzicije metal-kompleksa i nanočestica (Zhang i sur., 2012).

Osim što izvrsno otapaju anorganske soli i organske molekule zbog mogućnosti doniranja i primanja protona i elektrona, NADES pokazuju i sposobnost otapanja metalnih oksida i soli, stoga se mogu koristiti u elektrokemijskim procesima kao što su obnova i završna obrada metala (elektropoliranje i elektronanošenje), te razdvajanje i pročišćavanje metala (Smith i sur., 2014). Također, postoji mogućnost otapanja CO<sub>2</sub> u NADES, čija se topljivost u NADES povećava u prisutnosti amina zbog mogućnost formiranja karbamata. Sposobnost otapanja CO<sub>2</sub> čini ih atraktivnim sustavom za kontrolu emisije stakleničkih plinova tj. za katalizu i kemijsku fiksaciju CO<sub>2</sub> (Kudlak i sur., 2015). Nadalje, Jablonski i sur. (2015) pokazali su da NADES, pogotovo kolin klorid:oksalna kiselina, dobro otapaju lignin iz lignoceluloznih ostataka te se predstavljaju kao obećavajuće otapalo za predobradu biomase.

Mnogi NADES pripremaju se iz denaturirajućih agensa (limunska kiselina i urea) koji uzrokuju narušavanje strukture proteina (enzima) i gubitak njihove biološke funkcije. No, *Candida antarctica* lipaza B (Novozyme 435, enzim koji sudjeluju u hidrolizi esterske veze između masnih kiselina i alkohola) pokazuju visoku aktivnost i stabilnost u NADES kao što su kolin klorid:urea i kolin klorid:glukoza. U njima je moguća enzimska kataliza glikolipida zbog njihove sposobnosti otapanja oba supstrata (hidrofilnih šećera i hidrofobnih masnih kiselina), a u slučaju sinteze glukoza-6-O-heksanoata NADES u čijem je sastavu glukoza istovremeno služi i kao otapalo i kao supstrat (Pöhnlein i sur., 2015). Zhao i sur. (2013) predstavili su biokatalitičku proizvodnju biodizela iz triglicerida pomoću Novozyme 435 u kolin klorid:glicerolu. Glavna prednost metode je visoka razina pretvorbe triglicerida (88 %), te se korišteni enzim može upotrijebiti najmanje četiri puta bez gubljenja aktivnosti.

U posljednje vrijeme sve više se ispituje primjena NADES u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva. Mnoga istraživanja pokazuju da NADES imaju visoki potencijal u ekstrakciji fenolnih spojeva, što je povezano sa stvaranjem vodikovih veza između fenolnih spojeva i molekula unutar NADES. Fizikalna svojstva NADES, kao što su polarnost i viskoznost, imaju veliki utjecaj na ekstrakciju, te njihovom optimiranjem mogu se postići veći prinosi fenolnih spojeva u usporedbi s konvencionalnim otapalima kao što su voda i etanol. Nekoliko studija je pokazalo kako je ekstrakcija biološki aktivnih spojeva 10-100 puta učinkovitija u eutekničnim otapalima nego u vodi ili lipidima (Dai i sur., 2013; Bi i sur., 2013). Npr. za ekstrakciju flavonoida miricetina i amentoflavona iz listova *Chamaecyparis obtuse* korištene su različite kombinacije kolin klorida i alkohola, te na temelju analize ekstrakata HPLC-UV metodom, pokazano je da NADES baziran na kolin kloridu i polialkoholu 1,4-butandiolu imaju sličnu ili veću moć ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim metodama (Bi i sur., 2013). Slično pokazuju i rezultati ekstrakcije biološki aktivne komponente  $\alpha$ -mangostina iz perikarpa mangostina (*Garcinia mangostana L.*) gdje NADES baziran na kolin kloridu i polialkoholu 1,2-propandiolu pokazuje veću mogućnost ekstrakcije u usporedbi sa NADES koji sadrže glukozu (šećer), limunsku kiselinu (organska kiselina) i glicerol (polialkohol) (Mulia i sur., 2015), a bolja ekstrakcija sa kolin klorid:1,2-propandiolom pripisuje se njoegovim povoljnijim fizikalno-kemijskim svojstvima. Za ekstrakciju fenolnih spojeva u specifičnim ultrazvučim uvjetima koristili su se 90 % glicerol-bazirani NADES. Rezultati pokazuju da glicerol:kolin klorid i glicerol:natrijev acetat pokazuju visoku učinkovitost ekstrakcije polifenolnih spojeva s obzirom na 60 % vodenu otopinu etanola, te da dobiveni ekstrakti pokazuju znatnu antioksidativnu aktivnost (Mouratoglou i sur., 2016).

Uz sveobuhvatnu karakterizaciju (optimirana priprava, definirana fizikalno-kemijska svojstva i citotoksičnost) prirodna euteknična otapala predstavljaju značajan doprinos uspostavljanju ekološki prihvatljivih postupaka ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz nusproizvoda prehrambene industrije. U konačnici, pošto su komponente eutekničnih otapala prisutne u našoj svakodnevnoj prehrani pripremljeni ekstrakti mogli bi se izravno koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i agrokemijskoj industriji bez dodatnih pročišćavanja (Dai i sur., 2013b).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid (AAPH), Acros Organics, New Jersey, SAD  
6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Aldrich, Steinheim, Njemačka

Betain, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Destilirana voda, PBF

Dinatrijev hidrogenfosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Kemika, Zagreb, RH

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Fluorescein, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Glukoza, Kemika, Zagreb, RH

Glicerol, Kemika, Zagreb, RH

Jabučna kiselina, Kemika, Zagreb, RH

Kolin-klorid ( $\geq 97\%$ ), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Limunska kiselina, Kemika, Zagreb, RH

Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika, Zagreb, RH

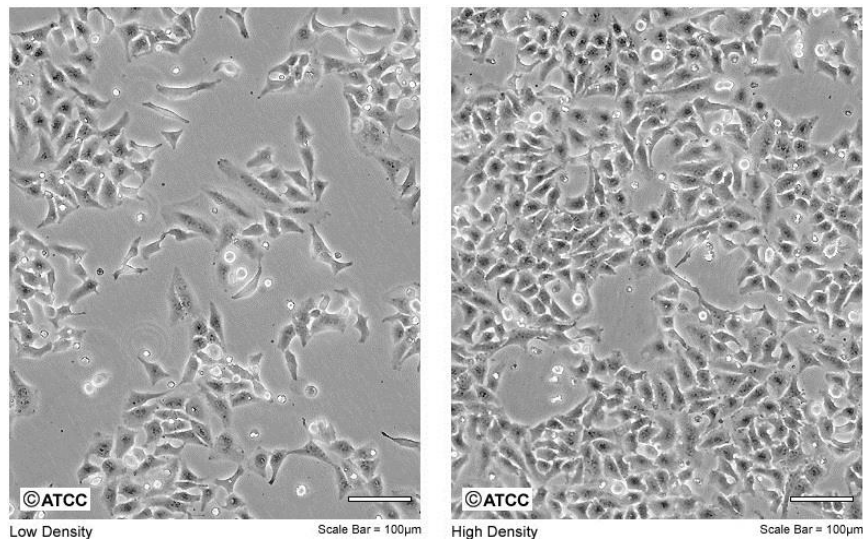
Prolin, Kemika, Zagreb, RH

##### 3.1.2. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su dvije humane stanične linije HeLa i HEK293T, dobivene iz radne banke stanica *American Type Culture Collection* (ATCC).

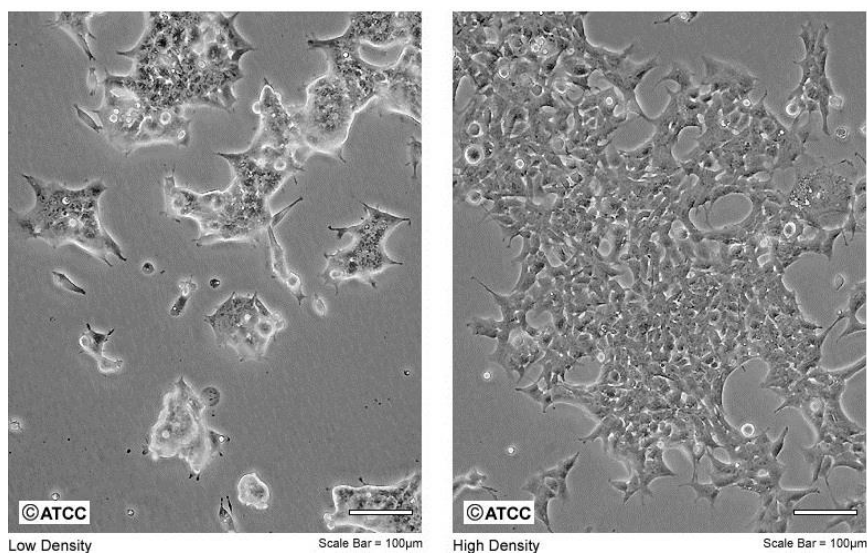
HeLa stanice (slika 3.) izolirane su 1951. godine iz adenokarcinoma vrata maternice pacijentice Henrietta Lacks po kojoj dobivaju ime. One su prva humana tumorska stanična linija uspostavljena u kulturi, koja se u optimalnim uvjetima uzgoja može neograničeno umnažati. Karakterizira ih visok stupanj adherentnosti kao i mogućnost kontaktne inhibicije u *in vitro* ispitivanjima. Koriste se kao modelni organizam za proučavanje staničnih i molekularnih mehanizama u ljudskom organizmu, te je na njima karakterizirano mnogo važnih bioloških procesa. Dva istraživanja na HeLa stanicama rezultirala su Nobelovim

nagradama, za otkriće veze između humanog papiloma virusa i karcinoma vrata maternice te ulogu telomeraze u sprečavanju degradacije kromosoma.



**Slika 3.** HeLa stanice (Anonymous 3, 2016)

HEK293T (slika 4.) stanice su izvedene transformacijom humanih embrionalnih stanica bubrega s DNA adenovirusom 5. Staničnu liniju kultivirao je Alex Van der Eb, ranih 1970-ih godina u Nizozemskoj, a transformaciju je izveo Frank Graham po čijoj metodi dobivaju ime. Popularne su zbog brze i jednostavne reprodukcije i održavanja, te mogućnosti transfekcije različitim metodama. Zbog visoke učinkovitosti transfekcije često se koriste u biološkim istraživanjima. Koriste se za proizvodnju egzogenih proteina ili virusa za farmaceutsku i biomedicinsku namjenu te u raznim istraživanjima.



**Slika 4.** HEK293T stanična linija (Anonymous 4, 2016)



### 3.1.3. Uređaji i oprema

Analitička vaga, Kern, Balingen, Njemačka

Cary Eclipse Fluorescence Spectrofotometar, Varian, Mulgrave, Australia

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, ljevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)

Magnetske miješalice s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke

Neubauerova komorica za brojanje stanica

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala

Sve kemikalije za pripravu NADES korištene su bez prethodnog pročišćavanja, a njihova odvaga se provodila na analitičkoj vagi. Za potrebe istraživanja pripravljeno je osam prirodnih eutektičnih otapala sa različitim udjelima vode (10 %, 30% i 50 %): kolin klorid:jabučna kiselina (ChCl:Ma), betain:limunska kiselina (B:Cit), betain:jabučna kiselina (B:Ma), prolin:jabučna kiselina (Pro:Ma) i jabučna kiselina:glukoza (Ma:Glu) sa molarnim omjerom komponenata 1:1, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina (ChCl:Pro:Ma) i jabučna kiselina:glukoza:glicerol (Ma:Glu:Gly) sa molarnim omjerom komponenata 1:1:1, te kolin klorid:limunska kiselina (ChCl:Cit) sa molarnim omjerom komponenata 2:1.

Priprava se provodi u tikvici s okruglim dnom u kojoj se pomiješaju čvrste-čvrste ili čvrste-tekuće komponente prirodnog eutektičnog otapala u molarnim omjerima kako je navedeno gore uz različiti udio vode (10, 30, 50 %). Reakcijska smjesa se zagrijava na magnetnoj mješalici do 3 sata na temperaturi od 40 do 60 °C uz neprestano miješanje. Reakcija je gotova kada se dobije bistro, tekuće eutektično otapalo.

### 3.2.2. Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava pripremljenih eutektičnih otapala

Zbog mogućnosti pripreme prirodnih eutektičnih otapala iz širokog spektra spojeva postoji mogućnost prilagodbe njihovih fizikalno-kemijskih svojstava određenoj primjeni. Stoga je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije provedena fizikalno-kemijska karakterizacija osam pripremljenih prirodnih eutektičnih otapala sa različitim udjelima vode (10, 30 i 50 %) navedenima u prethodnom poglavlju. Na sobnoj temperaturi (25 °C) izmjerena je njihova gustoća, viskoznost, električna vodljivost, indeks loma te pH.

### 3.2.3. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti prirodnih eutektičnih otapala na HeLa i HEK293T staničnoj liniji

#### **Uzgoj staničnih kultura**

Uzgoj stanica u kulturi ovisi o tipu stanične linije. HeLa i HEK293T su adherentne stanice koje ovise o površini za rast tj. stanice će porasti tek kada se prihvate za površinu. Za uzgoj staničnih kultura koristi se kompleksni tekući medij koji mora zadovoljavati potrebe stanica jednako kao u odgovarajućem *in vivo* sustavu. Medij je neophodan za rast i razvoj stanica, a najvažnije komponente medija su glukoza, aminokiseline, anorganske soli i vitamini. Hranjivom mediju najčešće se dodaje i serum sisavaca koji predstavlja izvor hormona, te različitih faktora kao što su faktori rasta, faktori prihvatanja i širenja stanica i druge specifične tvari potrebne za rast stanica u kulturi. Osim hranjivog medija za uzgoj, stanicama je potrebno osigurati i optimalne fizikalno-kemijske uvjete kao što su pH, temperatura, osmolalnost te odgovarajuća atmosfera. Za vrijeme rada u laboratoriju potrebno je održavati aseptične uvjete i koristiti sterilne tehnike rada kako ne bi došlo do kontaminacije kulture stanica.

HEK293T i HeLa stanice održavane su u Petrijevim zdjelicama za potrebe umnožavanja biomase i postavljanja pojedinačnih pokusa u mediju DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*) uz dodatak 5 % (v/v) serumom FBS (*fetal bovine serum*) te su uzgajane u inkubatoru na 37 °C sa 5 % CO<sub>2</sub> i vlažnoj atmosferi. Stanice su svakodnevno promatrane pod inverznim mikroskopom pri čemu je praćeno njihovo prihvaćanje za podlogu i opće stanje. Stanice su pasažirane svaka 3-4 dana kako bi se održavale u eksponencijalnoj fazi rasta i kako bi se spriječila kontaktna inhibicija.

## Test citotoksičnosti

Kolorimetrijski The CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution test stanične proliferacije je modificirani MTT test. MTT test se bazira na prevođenju žute tetrazolijeve soli (MTT ili 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u ljubičasto obojene kristale formazana koji su topivi u organskim otapalima. Nakon otapanja formazana, intenzitet nastale boje određuje se spektrofotometrijski (Mosmann, 1983). Reagens koji se koristi u The CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution testu stanične proliferacije sadrži novi tetrazolijev spoj (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij, MTS) i elektron-kondenzacijski reagens (fenazin etosulfat, PES). PES ima povećanu kemijsku stabilnost, te u kombinaciji s MTS formira stabilnu otopinu. MTS se bioreducira pomoću živih stanica u obojeni formazan koji se direktno topi u mediju u kojem se stanična kultura uzgaja, čime se preskače korak otapanja formazana u organskom otapalu. Količina formazana mjeri se spektrofotometrijski i izravno je proporcionalna s brojem živih stanica u kulturi (Anonymous 2, 2012).

Budući da su HeLa i HEK293T stanice adherentnog tipa, prije postavljanja pokusa su tretirane tripsinom kako bi se odvojile od podloge, izbrojan je ukupan broj stanica u Neubaerovoj komorici za brojanje stanica, te je izračunat volumen suspenzije stanica potreban za naciijepljivanje ploče s 96 jažica za svaku staničnu liniju. U svaku jažicu naciijepljeno je po 100  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica u početnoj koncentraciji od  $3 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za HeLa stanice i  $2 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$  za HEK293T stanice zbog različite brzine rasta.

Nakon što su se stanice prihvatile za podlogu i porasle, tj. nakon 24 sata uzgoja, tretirane su s 10  $\mu\text{L}$  (po jažici) ishodnih otopina različitih koncentracija NADES, te su stavljene na inkubaciju narednih 72 h. Ishodne otopine NADES pripremljene su u deioniziranoj vodi, sterilizirane su filtracijom kroz 0,22  $\mu\text{m}$  filter, te su razrijeđene u mediju za uzgoj stanica kako bi koncentracije u jažicama bile 500, 1000, 2000  $\text{mg L}^{-1}$ . Nakon 72 sata tretmana, 10  $\mu\text{L}$  CellTiter 96<sup>®</sup> otopine reagensa dodano je u svaku jažicu, te su stanice stavljene na inkubaciju 4 sata, a zatim se mjerili apsorbancija na 490 nm u mikrotitarskom čitaču. Kao kontrola korištene su netretirane stanice i stanice tretirane sa vodom koja je korištena za pripravu ishodnih otopina. Eksperimenti su provedeni dva puta za svaku staničnu liniju s četiri paralele za svaku koncentraciju i podaci su izraženi kao prosjek  $\pm$  S.D. Postotak preživljenja stanica izražen je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip ORAC metode temelji se na inhibiciji peroksil radikala ( $\text{ROO}\cdot$ ) za koji se kao izvor koristi AAPH. Peroksil radikal oksidira fluorescein i stvara produkt bez fluorescencije, što vidimo kao smanjenje intenziteta fluorescencije. Dodatkom antioksidansa inhibira se djelovanje radikala tj. oksidacijska degradacija fluoresceina što uzrokuje sporiji pad fluorescencije. U ovom radu antioksidacijski kapacitet pripremljenih NADES određen je ORAC metodom opisanom u radu Ninfali i sur. (2005).

#### **Priprema otopina**

Priprema  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  otopine fosfatnog pufera:

U odmjernu tikvicu od 200 mL doda se 39 mL otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (6,242 g u 200 mL destilirane vode) i 61 mL otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5,687 g u 200 mL destilirane vode), te se destiliranom vodom nadopuni do 200 mL.

Priprema  $0,075 \text{ mol L}^{-1}$  otopine fosfatnog pufera:

U odmjernu tikvicu od 200 mL doda se 75 mL  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  fosfatnog pufera te se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Priprema otopine fluoresceina:

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

Priprema otopine AAPH:

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

#### **Mjerenje ORAC vrijednosti**

Mjerenje se provodi spektrofluorimetrijski pri temperaturi od  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  uz  $\lambda_{\text{eks.}} = 485 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\text{em.}} = 520 \text{ nm}$ . U kivetu za mjerenje doda se 2,250 mL fluoresceina i 0,375 mL uzorka. Otopine se termostatiraju kroz 30 min pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  u vodenoj kupelji. Nakon 30 min dodaje se 0,375 mL otopine AAPH te se mjeri promjena intenziteta fluorescencije svaku minutu kroz

pola sata tj. dok fluorescencija ne padne na nulu. Na isti način pripravi se i slijepa proba, za čije se mjerenje umjesto uzorka rabi 0,075 mol L<sup>-1</sup> fosfatni pufer. Kao standard se koristi Trolox. Iz osnovne otopine Trolox-a (500 μmol L<sup>-1</sup>) pripremi se razrijeđenje koncentracije 25 μmol L<sup>-1</sup> koje se koristi kod mjerenja.

### Izračun ORAC vrijednosti

ORAC-vrijednosti računaju se prema formulama:

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

$$AUC = 0,5 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_n + R_1)$$

pri čemu je:

- $AUC_U$  = antioksidacijski kapacitet uzorka
- $AUC_{SP}$  = antioksidacijski kapacitet slijepe probe
- $AUC_{TRX}$  = antioksidacijski kapacitet Troloxa
- $a$  = molarna koncentracija Troloxa
- $h = \frac{V}{g \text{ (uzorak)}}$

### 3.3. Obrada podataka

Sva mjerenja su provedena u triplicatu, tako da su rezultati prikazani kao prosječne vrijednosti dvaju iskazana zajedno sa standardnom devijacijom ( $\pm$  S.D.).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripravljeno je osam NADES (kolin klorid:jabučna kiselina, prolin:jabučna kiselina, kolin klorid:prolin:jabučna kiselina, betain:jabučna kiselina, jabučna kiselina:glukoza, jabučna kiselina:glukoza:glicerol, kolin klorid:limunska kiselina, betain:limunska kiselina) u različitim omjerima sa različitim udjelima vode (10, 30, 50%) koji su prikazani u tablici 2. te je provedena njihova sveobuhvatna karakterizacija. Fizikalno-kemijska karakterizacija provedena je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije te je uključivala: gustoću, viskoznost, električnu vodljivost, indeks loma te pH (tablica 3.).

Također je provedena i njihova biološka karakterizacija ispitivanjem njihove *in vitro* citotoksičnosti kolorimetrijskim The CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution testom stanične proliferacije na humanim stanicama HeLa i HEK293T (slika 5. i 6.) te je izmjeren njihov antioksidacijski kapacitet spektrofluorimetrijskom ORAC metodom (slika 7.).

### 4.1. Priprava prirodnih eutektičnih otapala

Pripravljena prirodna eutektična otapala, molarni odnosi komponenata, te različiti udjeli vode prikazani su u tablici 2. Udio vode u pripremljenim NADES ne prelazi 50 %, zbog toga što dodatak vode utječe na prisutne vodikove veze koje postupno oslabljuju tj. progresivno pucaju čime se, osim na fizikalno-kemijska svojstva, utječe i na strukturu NADES koja se gubi jer se povećava broj slobodnih molekula, te se takvo otapalo više ne može smatrati NADES (Dai i sur., 2015). Također, Dai i sur. (2013b) pokazali su da se dodavanjem male količine vode u NADES utječe i na smanjenje vremena i temperature pripreve.

U ovom radu priprava većine otapala provodila se na temperaturi od 60 °C. U slučaju eutektičnih otapala koja sadrže šećer glukozu (Ma:Glu:Gly i Ma:Glu) primjećeno je da na višim temperaturama poprimaju svijetlo smeđu boju zbog oksidacije tj. karamelizacije šećera te se zbog toga njihova priprava provodila na temperaturi od 40 °C, što se slaže sa zapažanjima Hayyan i sur. (2012).

Vrijeme potrebno za dobivanje tekućeg otapala iz krutih i tekućih komponenata također varira, te se ono mijenja s obzirom na tip komponenata i udio vode unutar NADES.

Za pripremu otopala koje sadrži tekući glicerol (Ma:Glu:Gly) bilo je potrebno od 30 do 45 minuta, ovisno o udjelu vode u NADES. U slučaju ostalih otopala koja sadrže čvrste komponente potrebno je manje vremena (u prosjeku sat-sat i pol) za pripremu NADES koji sadrže 50 % vode od onih koji sadrže 10 % vode (u prosjeku dva do tri sata).

**Tablica 2.** Pripravljena eutektična otopala korištena u radu

<b>NADES</b>	<b>Molarni omjer komponenata</b>	<b>Kratica</b>	<b>Udio vode u otopalu (%)</b>
<b>Kolin klorid:Jabučna kiselina</b>	1:1	ChCl:Ma10	10
		ChCl:Ma30	30
		ChCl:Ma50	50
<b>Prolin:Jabučna kiselina</b>	1:1	Pro:Ma10	10
		Pro:Ma30	30
		Pro:Ma50	50
<b>Kolin klorid:Prolin:Jabučna kiselina</b>	1:1:1	ChCl:Pro:Ma10	10
		ChCl:Pro:Ma30	30
		ChCl:Pro:Ma50	50
<b>Betain:Jabučna kiselina</b>	1:1	B:Ma10	10
		B:Ma30	30
		B:Ma50	50
<b>Jabučna kiselina:Glukoza:Glicerol</b>	1:1:1	Ma:Glu:Gly10	10
		Ma:Glu:Gly30	30
		Ma:Glu:Gly50	50
<b>Jabučna kiselina:Glukoza</b>	1:1	Ma:Glu10	10
		Ma:Glu30	30
		Ma:Glu50	50
<b>Kolin klorid:Limunska kiselina</b>	2:1	ChCl:Cit10	10
		ChCl:Cit30	30
		ChCl:Cit50	50
<b>Betain:Limunska kiselina</b>	1:1	B:Cit10	10
		B:Cit30	30
		B:Cit50	50

## 4.2. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih prirodnih eutektičnih otapala

Prirodna eutektična otapala mogu se pripremiti iz širokog spektra spojeva, te zbog mogućnosti dizajniranja njihove strukture imaju vrlo obećavajuća i jedinstvena svojstva, stoga je pažnja znanstvenika usmjerena prema određivanju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava (npr. točka leđišta, viskoznost, provodljivost, gustoća, polarnost i reaktivnost), koja su nužna za razvoj otapala za specifične svrhe (Durand i sur., 2013).

Budući da su fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičnih otapala izrazito važna za njihovu primjenu, provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija osam sintetiziranih NADES sa različitim udjelima vode (10, 30 i 50 %) prikazanih u tablici 2. Na sobnoj temperaturi (25 °C) izmjerena je gustoća, viskoznost, električna vodljivost, indeks loma te pH, a dobiveni rezultati su prikazani u tablici 3.

Također, u tablici 3. prikazano je kako povećanje udjela vode u pripremljenim NADES utječe na njihova fizikalno-kemijska svojstva. Primjećeno je da povećanje udjela vode u NADES uzrokuje linearnu promjenu gustoće, indeksa loma (vrijednosti opadaju), te pH (u nekim slučajevima pada, u nekim raste) i električne vodljivosti (vrijednost raste) dok u slučaju viskoznosti, dodatak vode uzrokuje eksponencijalno opadanje njezine vrijednosti što se slaže sa rezultatima Dai i sur. (2015).

Na temelju rezultata i literaturnih podataka može se uočiti da povećanje udjela vode djeluje na fizikalno-kemijska svojstva NADES slično kao i povećanje temperature. Visoka viskoznost zajednička je svim NADES, te predstavlja veliki problem kod projektiranja industrijskih procesa. Na smanjivanje njezine vrijednosti može se utjecati povećanjem temperature, kao i dodatkom vode, te u oba slučaja dolazi do slabljenja tj. pucanja intermolekularnih veza (vodikovih veza) između komponenata NADES. Npr. viskoznost NADES koji su bazirani na glukozu može se smanjiti povišenjem temperature (Hayyan i sur., 2013c) ili se na viskoznost može djelovati direktno kod pripreme odabirom pravilnog omjera komponenata i udjela vode čime se dodatno štedi na energiji, a i vremenu pripreme NADES.



**Tablica 3.** Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih prirodnih eutektičnih otapala na sobnoj temperaturi (25 °C)

NADES	udio vode (%)	gustoća (g cm <sup>-3</sup> )	viskoznost (Pas)	električna vodljivost (mS cm <sup>-1</sup> )	indeks loma	pH
<b>ChCl:Ma</b>	10	1,25	0,51	0,52	1,47	0,23
	30	1,19	0,02	19,21	1,44	0,67
	50	ne može se izmjeriti	0,005	46,30	1,40	1,06
<b>Pro:Ma</b>	10	1,34	1,19	0,38	1,48	2,24
	30	1,24	0,02	4,29	1,43	2,67
	50	1,15	0,004	7,32	1,39	2,67
<b>ChCl:Pro:Ma</b>	10	1,25	0,44	1,32	1,48	3,62
	30	1,19	0,01	17,71	1,44	3,21
	50	1,13	0,003	27,80	1,40	2,97
<b>B:Ma</b>	10	1,29	7,12	0,85	1,47	3,16
	30	1,23	0,05	1,45	1,44	3,27
	50	1,16	0,006	4,74	1,40	2,88
<b>Ma:Glu:Gly</b>	10	1,40	0,34	0,05	1,48	1,01
	30	1,29	0,04	0,25	1,44	1,15
	50	1,20	0,008	1,43	1,40	1,45
<b>Ma:Glu</b>	10	1,49	ne može se izmjeriti	0,03	1,46	0,41
	30	1,33		0,14	1,45	0,49
	50	1,23		0,46	1,44	0,76
<b>ChCl:Cit</b>	10	1,22	ne može se izmjeriti	2,04	1,47	0,62
	30	ne može se izmjeriti		23,90	1,44	0,93
	50	ne može se izmjeriti		53,30	1,41	1,16
<b>B:Cit</b>	10	1,32	2,20	0,16	1,47	2,63
	30	1,24	0,06	2,18	1,44	2,60
	50	1,17	0,006	5,40	1,39	2,59

Zbog ograničenja mjernog instrumenta u slučajevima ChCl:Ma50, te ChCl:Cit30 i ChCl:Cit50 nije moguće izmjeriti gustoću, dok u slučajevima ChCl:Cit i Ma:Glu (sa 10, 30 i 50 % vode) nije moguće izmjeriti viskoznost.

### **Gustoća**

Uspoređujući rezultate pripremljenih eutektičnih otapala primjećeno je da sva otapala na sobnoj temperaturi (25°C) imaju veću gustoću od gustoće vode ( $\rho(\text{H}_2\text{O}) = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ ) te da vrijednost gustoće opada (u prosjeku za 0,08) kako se povećava udio vode u njima što se slaže sa rezultatima Dai i sur. (2015).

S obzirom na sastav otapala, otapalo koje sadrži šećer (Ma:Glu) ima najveću gustoću čija je početna vrijednost ( $1,49 \text{ g cm}^{-3}$ ) manja od vrijednosti gustoće čiste glukoze ( $1,54 \text{ g cm}^{-3}$ ) i čiste jabučne kiseline ( $1,61 \text{ g cm}^{-3}$ ) (Anonymous 5, 2016) te se dodatkom vode vrijednost gustoće smanjuje na  $1,23 \text{ g cm}^{-3}$ . Također, primjećeno je da dodatak glicerola u otapalo Ma:Glu uzrokuje snižavanje gustoće (s  $1,49 \text{ g cm}^{-3}$  (Ma:Glu10) na  $1,40 \text{ g cm}^{-3}$  (Ma:Glu:Gly10)). Uspoređujući sa literaturnim podacima uočava se da otapala koja sadrže kolin klorid i šećere (glukoza, fruktoza) pokazuju manju vrijednost gustoće čija se vrijednost kreće u rasponu od  $1,24 \text{ g cm}^{-3}$  do  $1,34 \text{ g cm}^{-3}$  (Hayyan i sur., 2012; Hayyan i sur., 2013c) nego otapalo sa organskom kiselinom i glukozom (Ma:Glu). Uspoređujući vrijednosti gustoće između ChCl:Pro:Ma i Pro:Ma primjećuje se da se gustoća otapala smanjuje dodatkom kolin klorida ( $\rho(\text{Pro:Ma10}) = 1,34 \text{ g cm}^{-3}$ , a  $\rho(\text{ChCl:Pro:Ma10}) = 1,25 \text{ g cm}^{-3}$ ), te se može zaključiti da otapala sa kolin kloridom imaju manju gustoću od onih bez kolin klorida u sastavu. Zhang i sur. (2012) pokazali su sličan utjecaj kolin klorida tj. povećanjem omjera kolin klorida u otapalima koja sadrže glicerol postiže se smanjenje njihove gustoće pa tako otapalo sa omjerom komponenata 1:1 ima najmanju gustoću. Također, primjećuje se da otapalo ChCl:Cit sa 10 %-tnim udjelom vode od svih pripremljenih NADES sa 10 % vode ima najmanju gustoću ( $1,22 \text{ g cm}^{-3}$ ), dok se gustoća otapala ChCl:Cit sa 30 i 50 % vode nije mogla izmjeriti zbog ograničenja mjernog instrumenta.

Otapala koja sadrže betain i organsku kiselinu (B:Ma i B:Cit) imaju približno jednake vrijednosti gustoće, gustoća B:Cit kreće se u rasponu od  $1,32 \text{ g cm}^{-3}$  do  $1,17 \text{ g cm}^{-3}$ , a gustoća B:Ma od  $1,29 \text{ g cm}^{-3}$  do  $1,16 \text{ g cm}^{-3}$ .

## Viskoznost

Povećanjem udjela vode u eutektnim otapalima smanjuje se vrijednost viskoznosti kod svih otapala što se slaže sa literaturnim podacima (Dai i sur., 2015). U usporedbi s gustoćom, povećanje udjela vode uzrokuje drastičniji pad viskoznosti tj. vrijednost viskoznosti opada za jedan do dva reda veličine npr. pad vrijednosti viskoznosti sa povećanjem udjela vode kod otapala Pro:Ma kreće se u rasponu 1,19 Pas (10 % vode) > 0,02 Pas (30%) > 0,004 Pas (50%).

Uspoređujući otapala sa 10 % vode najveću viskoznost ima B:Ma (7,12 Pas), a slijede ga B:Cit > Pro:Ma > ChCl:Ma > ChCl:Pro:Ma > Ma:Glu:Gly (0,34 Pas). Vidi se da NADES koji sadrže betain i organsku kiselinu imaju veću viskoznost (B:Ma 7,12 Pas, B:Cit 2,20 Pas) s obzirom na ostale NADES (viskoznost ostalih otapala kreće se u rasponu od 1,19 do 0,34 Pas). Uspoređujući NADES sa 10 % vode koji sadrže prolin primjećuje se da je otapala Pro:Ma viskoznije (1,19 Pas) nego ChCl:Pro:Ma (0,44 Pas), što ukazuje da dodatak kolin klorida utječe na smanjivanje vrijednosti viskoznosti za duplo. Slično je pokazao i Harris (2008) gdje dodatak kolin klorida u NADES koji sadrže diole (glicerol) također smanjuje viskoznost.

Kod ostalih otapala sa udjelom vode 30 i 50 % nema značajne razlike u viskoznost. Vrijednost viskoznosti otapala sa 30 % vode kreće se u rasponu od 0,06 Pas do 0,01 Pas, a kod otapala sa 50 % vode od 0,008 Pas do 0,003 Pas. Primjećuje se da se vrijednost viskoznosti otapala približno spušta na vrijednost viskoznosti vode na sobnoj temperaturi (0,001 Pas) što se slaže sa rezultatima Dai i sur. (2015).

## Električna vodljivost

Električna vodljivost eutektnih otapala sa 10 % vode kreće se u rasponu od 0,03 mS cm<sup>-1</sup> (Ma:Glu10) do 2,04 mS cm<sup>-1</sup> (ChCl:Cit10) što se slaže sa podacima Zhang i sur. (2012) koji su pokazali da se vrijednost električne vodljivosti većine otapala na sobnoj temperaturi nalazi ispod 2 mS cm<sup>-1</sup> zbog visoke viskoznosti. Povećanjem udjela vode u otapalima uzrokuje se drastično povećanje električne vodljivosti te u slučaju ChCl:Ma električna vodljivost se povećava čak do 88 puta (s 0,52 mS cm<sup>-1</sup> (ChCl:Ma10) na 46,30 mS cm<sup>-1</sup> (ChCl:Ma50)), što je u skladu sa činjenicom da dodatak vode može povećati električnu vodljivosti do 100 puta (Dai i sur., 2015). No, iako je skok vodljivosti s povećanjem udjela

vode samo 26 puta, otapalo ChCl:Cit pokazuje najveću vodljivost (s 2,04 mS cm<sup>-1</sup> na 53,30 mS cm<sup>-1</sup>), a najmanju vodljivost pokazuje Ma:Glu (s 0,03 mS cm<sup>-1</sup> na 0,46 mS cm<sup>-1</sup>).

S obzirom na sastav eutektičnih otapala električna vodljivost otopina sa 10 % vode opada u smjeru baza:organska kiselina (ChCl:Cit (2,04 mS cm<sup>-1</sup>) > B:Ma (0,85 mS cm<sup>-1</sup>) > ChCl:Ma (0,52 mS cm<sup>-1</sup>)) > nepolarna aminokiselina:organska kiselina Pro:Ma (0,38 mS cm<sup>-1</sup>) > organska kiselina:šećer:polialkohol Ma:Glu:Gly (0,05 mS cm<sup>-1</sup>) > organska kiselina:šećer Ma:Glu (0,03 mS cm<sup>-1</sup>), s tim da otapalo B:Cit (baza:organska kiselina, 0,16 mS cm<sup>-1</sup>) čini iznimku. Dobiveni rezultati, osim iznimke, slažu se sa literaturnim podacima Dai i sur. (2015).

Primjećeno je da otapalo ChCl:Ma ima veću električnu vodljivost kod svih udjela vode od otapala Pro:Ma što se slaže sa rezultatima Dai i sur. (2015) koji pokazuju da otapalo kolin klorid:jabučna kiselina s 25 % vode ima veću električnu vodljivost od prolin:jabučna kiselina s 25 %, što pripisuju ionskoj formi kolin klorida i djelomičnoj ionizaciji prolina (pKa 1,99), te sukladno tome zaključuju da otapala sa kolin kloridom imaju puno veću vrijednost električne vodljivosti od NADES koji sadrže organske kiseline ili aminokiseline što se slaže sa dobivenim rezultatima. Također, povećanje udjela vode na 50 % najveći utjecaj ima na električnu vodljivost otapala koja sadrže kolin klorid (vrijednosti električne vodljivosti otapala s 50 % vode: ChCl:Cit (53,30 mS cm<sup>-1</sup>) > ChCl:Ma (46,30 mS cm<sup>-1</sup>) > ChCl:Ma:Pro (27,80 mS cm<sup>-1</sup>)). Vrijednost električne vodljivosti ostalih otapala s 50 % vode kreće se od 7,32 mS cm<sup>-1</sup> (Pro:Ma) do 0,46 (Ma:Glu).

### **Indeks loma**

Očekuje se da vrijednost indeksa loma opada kako se povećava temperatura zbog smanjenja gustoće otapala (Kareem i sur., 2010; Hayyan i sur., 2012). Pošto povećanje udjela vode u otapalima također uzrokuje smanjenje gustoće primjećeno je da vrijednost indeksa loma polako opada (u prosjeku za 0,04) kako se povećava udio vode u otapalima.

Prema Abottu i sur. (2004) otapala koja sadrže kolin klorid i karboksilne kiseline pokazuju relativno visoke vrijednosti indeksa loma (od 1,53 do 1,49) s time da ChCl:Cit pokazuje vrijednost od 1,50, a prema Jablonsky i sur. (2015) ChCl:Ma pokazuje vrijednost od 1,48. U našem slučaju nema razlike između vrijednosti indeksa loma ChCl:Ma (od 1,47 s 10 % vode do 1,40 s 50 %) i ChCl:Cit (od 1,47 s 10 % vode do 1,41 s 50 %), a u slučaju ChCl:Ma dobiveni su slični rezultati.

U radu Hayyan i sur. (2012, 2013c) euteklična otapala koja sadrže kolin klorid i šećere (fruktozu ili glukozu), čija se gustoća kreće u rasponu od 1,30 do 1,34 g cm<sup>-3</sup>, pokazuju vrijednost indeksa loma u rasponu od 1,51 do 1,66. Ne temelju dobivenih rezultata u ovom istraživanju, za razliku od otapala koja sadrže kolin klorid i šećere primjećeno je da otapala s kolin klorid u kombinacijama s organskim kiselinama i aminokiselinama, osim što imaju nižu vrijednost gustoće (od 1,19 do 1,25 g cm<sup>-3</sup>), pokazuju i znatno nižu vrijednost indeksa loma (od 1,47 do 1,48), te se može zaključiti da vrijednost indeksa loma ovisi o gustoći otapala tj. što otapalo ima nižu gustoću ima i nižu vrijednost indeksa loma.

Općenito, najveći indeks loma izmjeren je kod otapala koje sadrži aminokiselinu prolin čija struktura može utjecati na povećanje vrijednosti indeksa loma pa tako otapalo ChCl:Pro:Ma10 pokazuje najveću vrijednost indeksa loma (1,48), dok otapalo koje sadrži jabučnu kiselinu i šećer (Ma:Glu10) pokazuje najnižu vrijednost indeksa loma (1,46). Također, može se primijetiti da dodatak glicerola otapalu Ma:Glu uzrokuje povećanje vrijednosti indeksa loma na 1,48.

## **pH**

S obzirom da svi NADES u svom sastavu imaju ili jabučnu kiselinu (Ma) ili limunsku kiselinu (Cit) očekivano pH vrijednost se kreće u kiselom području (pH 0,23 do 3,62). Budući da se pH vrijednost otapala koja sadrže šećere, te šećerne alkohole (sorbitol) kreće u neutralnom području (Hayyan i sur., 2012, Maugeri i Domínguez de María, 2012) vidljivo je da sastav otapala tj. kemijska priroda HBD (kao npr. prisutnost organskih kiselina) jako utječe na početnu pH vrijednost.

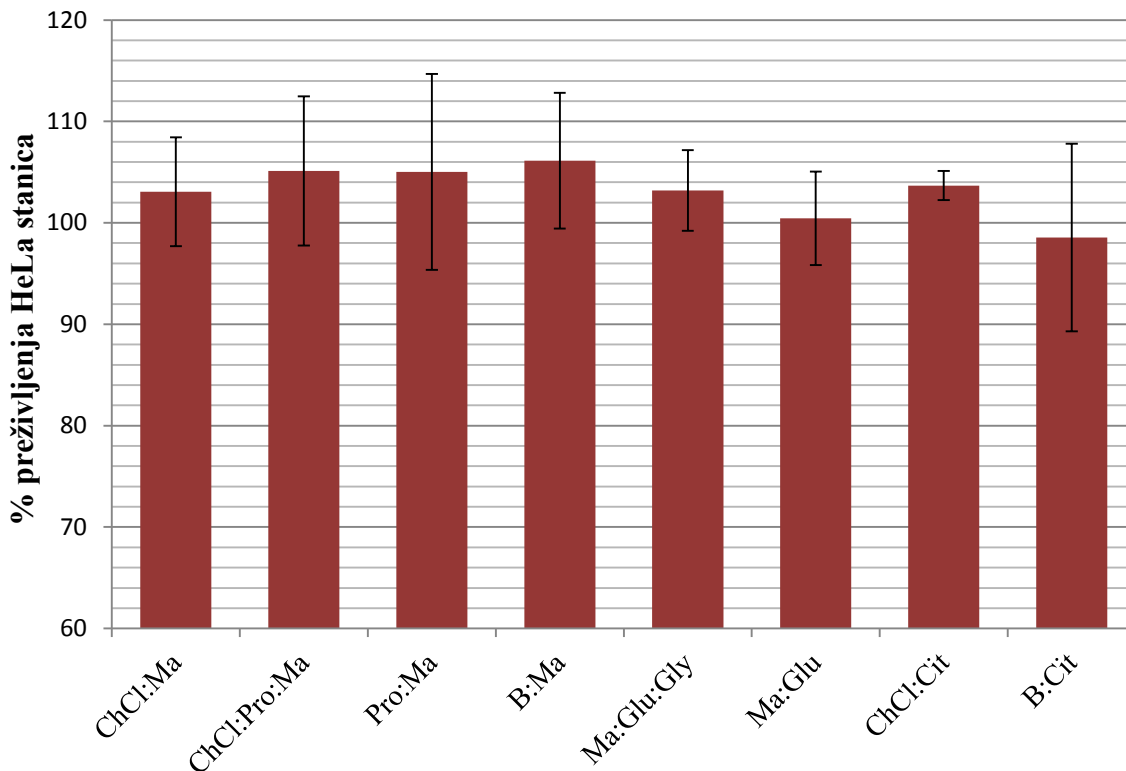
Uspoređujući pH vrijednosti otapala vidljivo je da se vrijednost pH u većini slučajeva linearno mijenja kako se povećava udio vode. U slučaju otapala ChCl:Ma, Ma:Glu:Gly, Ma:Glu i ChCl:Cit vrijednost pH raste, u slučaju ChCl:Pro:Ma i B:Cit vrijednost pH opada, dok u slučaju Pro:Ma i B:Ma dolazi do odstupanja od linearnosti tj. do 30 % udjela vode pH raste, a poslije opada. ChCl:Ma pokazuje najmanju pH vrijednost koja se kreće u rasponu od 0,23 (10 % vode) do 1,06 (50 % vode), dok ChCl:Pro:Ma pokazuje najveću pH vrijednost koja se kreće u rasponu od 3,62 (10 % vode) do 2,97 (50 % vode). Može se primijetiti da dodatak prolina u ChCl:Ma uzrokuje povećanje početne pH vrijednosti, no povećanje udjela vode u otapalu ChCl:Ma:Pro uzrokuje suprotan učinak nego kod otapala ChCl:Ma tj. pH vrijednosti otapala ChCl:Ma:Pro opada.

Također, može se primjetiti da ChCl:Cit i ChCl:Ma pokazuju relativno nisku početnu pH vrijednosti (0,62 kod ChCl:Cit, a 0,23 kod ChCl:Ma), dok su u slučaju otapala B:Cit i B:Ma početne pH vrijednost više (2,63 kod B:Cit, a 3,16 kod B:Ma). S obzirom na navedeno može se zaključiti da eutektična otapala koja sadrže betain i karboksilnu kiselinu imaju veću početnu pH vrijednost, nego otapala koja sadrže kolin klorid i karboksilne kiseline. Uspoređujući pH vrijednosti Ma:Glu i Ma:Glu:Gly primjećuje se da dodatak glicerola uzrokuje povećanje početne pH vrijednosti sa 0,41 (Ma:Glu10) na 1,01 (Ma:Glu:Gly10), a u oba slučaja povećanje udjela vode uzrokuje povećanje pH vrijednosti.

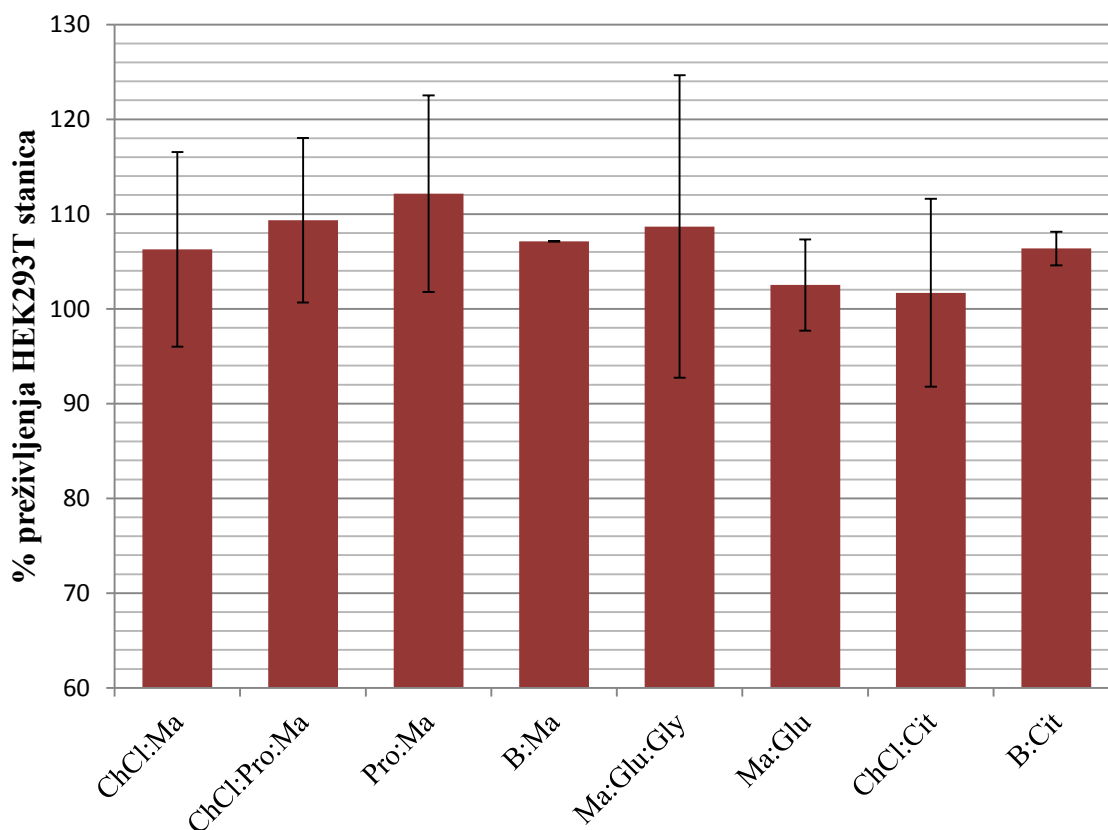
### 4.3. *In vitro* djelovanje prirodnih eutektničnih otapala na HeLa i HEK293T stanične linije

Učinak pripremljenih NADES s 10 %-tnim udjelom vode na proliferaciju humanih staničnih linija HeLa i HEK293T ispitan je kolorimetrijskim The CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution testom stanične proliferacije. Nakon prekonocnog rasta nacijepljenih HeLa i HEK293T stanica u pločama s 96 jažica, stanice su tretirane s ishodnim otopinama NADES tako da je njihova koncentracija u jažicama bila 500, 1000 i 2000 mg L<sup>-1</sup>. Nakon 72 sata tretmana, u svaku jažicu dodaje se reagens The CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution, te se stanice stavljaju na inkubaciju 4 sata. Nakon inkubacije, apsorbancija se mjeri pri 490 nm na mikrotitarskom čitaču. Eksperimenti su provedeni tri puta s četiri paralele za svaku koncentraciju, te su podaci izraženi kao srednja vrijednost ± S.D (n=3). Preživljavanje stanica izraženo je kao postotak tretiranih stanica u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.

S obzirom na male razlike u djelovanju NADES pri koncentracijama 500, 1000 i 2000 mg L<sup>-1</sup>, grafički su prikazani samo rezultati za najvišu ispitanu koncentraciju NADES (2000 mg L<sup>-1</sup>) (slika 5. i 6.).



**Slika 5.** Djelovanje 10 %-tnih otopina NADES (2000 mg L<sup>-1</sup>) na HeLa staničnu liniju



**Slika 6.** Djelovanje 10 %-tnih otopina NADES ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) HEK293T staničnu liniju

Tijekom tretmana HeLa i HEK293T stanica s pripravljenim NADES primjećena je promjena boje medija iz narančaste u žutu (pogotovo kod najveće koncentracije NADES koji sadrže limunsku kiselinu, B:Ma i ChCl:Ma). Budući da medij za uzgoj DMEM sadrži indikator fenol-crveno, čija promjena boje ukazuje na promjenu pH medija, te s obzirom da se pH vrijednost NADES kreće u kiselom području, promjena boje u žutu pokazuje da NADES uzrokuju snižavanje pH medija. Sam pad pH vrijednosti medija nije imao negativan učinak na rast stanica. Vjerojatno zato jer je mediji za uzgoj stanica dobro puferirani te obzirom na razrjeđenje i mali volumen dodanih NADES, njihova kiselost nije značajno promjenila pH medija.

Iz dobivenih rezultata može se uočiti da pripravljena eutektična otapala u ispitanoj rasponu koncentracija ( $500, 1000$  i  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) nemaju inhibitoran učinak na HeLa i HEK293T stanične linije. Postotak preživljavanja HeLa stanica kreće se u rasponu od 106,13 (stanice su tretirane sa B:Ma) do 98,55 (stanice su tretirane sa B:Cit), dok se postotak preživljavanja HEK293T kreće u rasponu od 112,14 (stanice su tretirane sa Pro:Ma) do 101,68 (stanice su tretirane sa ChCl:Ma).



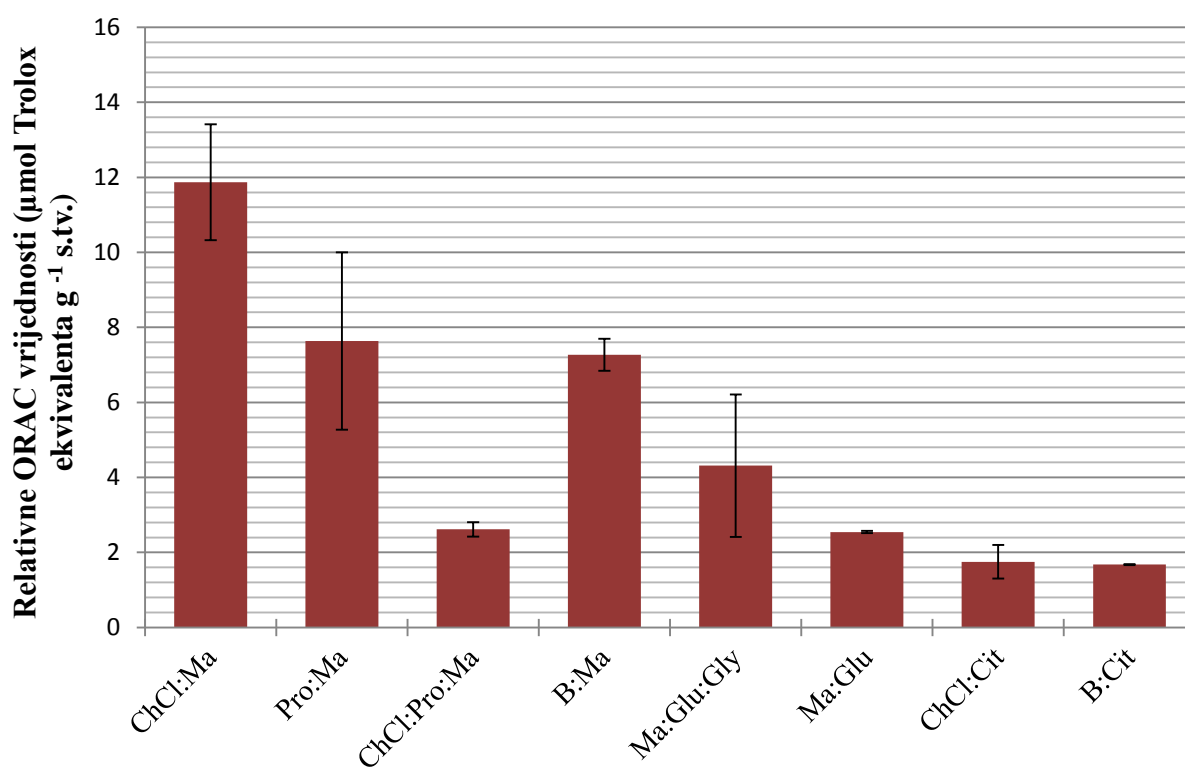
Također, niti jedan od testiranih NADES nije uzrokovao inhibiciju rasta 50 % stanica, čak i kod najviših koncentracija, stoga se može zaključiti da je  $EC_{50}$  vrijednost (koncentracija otapala pri kojoj odumire 50 % tretiranih stanica) veća od  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ . Sukladno tome, u našem slučaju na HeLa i HEK293T staničnim linijama u koncentraciji od  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  eutektična otopina ChCl:Cit ne pokazuje citotoksični efekt (postotak preživljavanja stanica iznosi  $103,67 \pm 1,43$  za HeLa, a  $101,68 \pm 9,91$  za HEK293T), dok u većoj koncentraciji ( $2500 \text{ mg L}^{-1}$ ) na staničnoj liniji mišjih fibroblasta (L929) pokazuje citotoksičan učinak (postotak preživljavanja stanica je oko 70 %) (Paiva i sur., 2014). Također, Radošević i sur. (2016) pokazuju da otapalo ChCl:Ma (molarni omjer 1:1) u koncentraciji od  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  uzrokuje inhibiciju rasta stanica ovarija kanalskog soma (CCO) (postotak preživljavanja oko 70 %), no u našem slučaju navedeno otapalo ne pokazuje inhibitorni učinak na HeLa i HEK293T stanice. S obzirom na navedeno, vidi se da eutektična otapala imaju različiti učinak na različite stanične linije (Hayyan i sur., 2015, Wen i sur., 2015), te da su humane stanične linije HeLa i HEK293T otpornije na djelovanje NADES od CCO i L929 staničnih linija.

Mnogi autori ističu da NADES koji sadrže organske kiseline kao HBD (npr. oksalana, limunska, jabučna, vinska i ostale kiseline) pokazuju veću citotoksičnost na različitim staničnim linijama (normalne i tumorske humane, riblje i mišje stanične linije) od NADES koji sadrže šećere kao HBD (npr. glukoza, manoza, fruktoza, ksiloza i ostali) (Paiva i sur., 2014; Radošević i sur., 2015; Radošević i sur., 2016; Hayyan i sur., 2015). Uspoređujući međusobno dobivene rezultate citotoksičnosti testiranih NADES na HeLa i HEK293T staničnim linijama primjećuje se da nema prevelike razlike između citotoksičnosti NADES. Budući da svi NADES u svom sastavu imaju ili jabučnu kiselinu (Ma) ili limunsku kiselinu (Cit) primjećeno je da dodatak šećera (glukoza), glicerola, prolina, betaina, kolin klorida ili glicerola navedenim organskim kiselinama ne utječe puno na promjenu citotoksičnosti NADES.

#### 4.4. Antioksidacijski kapacitet prirodnih eutektičnih otapala

ORAC metodom određen je antioksidacijski kapacitet (AUC) prirodnih eutektičnih otapala s 10 %-tnim udjelom vode praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog radikala AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamid) dihidroklorid) na fluorescentni spoj fluorescein. U usporedbi sa standardiziranim metodama za određivanje antioksidacijskog kapaciteta (FRAP metoda, DPPH metoda) ORAC metoda ima mnoge prednosti kao što je odvijanje metode u području fiziološkog pH i pri temperaturi od 37 °C te se koristi peroksil radikal s redoks potencijalom i reakcijskim mehanizmom koje je sličan mehanizmu koji se odvija u našem organizmu.

Rezultati analize se izražavaju u ekvivalentima Troloxa (TE, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), tj. kao  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.tv. Rezultati analize NADES izraženi su kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D. (n=3), te su prikazani na slici 7.



Slika 7. Relativne ORAC vrijednosti za analizirana prirodna eutektična otapala s 10 %-tnim udjelom vode

Relativne ORAC vrijednosti analiziranih NADES znatno se razlikuju od uzorka do uzorka. Među ispitanim otapalima najveći antioksidativni kapacitet, ima ChCl:Ma ( $11,87 \pm 1,54 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.t.}$ ), a prate ga Pro:Ma  $\approx$  B:Ma  $>$  Ma:Glu:Gly  $>$  Ma:Glu  $\approx$  ChCl:Pro:Ma  $>$  ChCl:Cit i B:Cit ( $1,67 \pm 0,01 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) koji ima najniži antioksidativni kapacitet. Navedeni rezultati pokazuju da testirani NADES imaju određenu antioksidativnu aktivnost, što se razlikuje od zapažanja Hayyan i sur. (2015), koji su pokazali da NADES koji u sastavu imaju kolin klorid i HBD kao što su glicerol, etilenglikol, trietilen glikol i urea ne pokazuju antioksidativnu aktivnost. S obzirom na sastav NADES vidi se da najmanju antioksidativnu aktivnost imaju NADES koji sadrže limunsku kiselinu (ChCl:Cit i B:Cit), za razliku od ostalih koji sadrže jabučnu kiselinu. Iako Triantis i sur. (2001) nisu mjerili antioksidativnu aktivnost NADES, vidi se poveznica između rezultata. Oni su na temelju rezultata PSCL (*photo-storage chemiluminescence*) metode pokazali da aditiv jabučna kiselina (E296) ima puno veću antioksidativnu aktivnost od limunske kiseline (E330).

Pripravljene NADES u svojem sastavu sadrže spojeve kao što su organske kiseline (jabučna i limunska), prolin i betain koji u čistom stanju pokazuju različita antioksidativna svojstva. Npr. limunska i jabučna kiselina imaju značajnu ulogu kao sredstva za keliranje, tj. limunska kiselina djeluje kao antioksidativni sinergist jer uklanja ione metala koji kataliziraju reakcije oksidacije i utječu na povećanje aktivnosti fenolnih antioksidansa, te se može koristiti kao sredstvo za uklanjanje radioaktivnih čestica, dok jabučna kiselina kao sredstvo za keliranje uspješno štiti tkivo jetre od štetnog učinka  $\text{AlCl}_3$ , inhibira aktivnost mnogih enzima kao npr. polifenoloksidaze (spečava posmeđivanje voća), te djeluje sinergistički uz vitamin C čime povećava njegovo djelovanje. Također, pripravci koji sadrže metalne ione i limunsku kiselinu blagotvorno djeluju na kronične rane jer limunska kiselina deaktivira superoksidne anione (ROS) koji sprečavaju zacijeljivanje rana (Van der Berg i sur., 2003). Obje kiseline pokazale su zaštitni učinak kod ishemijsko-reperfuzijske ozljede srčanog mišića tj. utječu na smanjenje veličine srčanog mišića, agregaciju trombocita, te djeluju protuupalno (Tang i sur, 2013). Što se tiče aminokiseline prolina i tercijarnog amina betaina (N,N,N-trimetilglicin), egzogeni prolin i betain u biljnim stanicama uzrokuju aktivaciju antioksidativne obrane koja ublažava štetne učinke oksidativnog stresa uzrokovanog nakupljanjem Cd u stanici. Prolin smanjuje lipidnu peroksidaciju uzrokovanu Cd i povećava aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (KAT) koje sudjeluju u antioksidativnoj obrani, ali za razliku od betaina, ne smanjuje koncentraciju Cd u stanici (Islam i sur., 2009).

S obzirom na to da navedene komponente (limunska i jabučna kiselina, prolin i betani) imaju mogućnosti primjene kao antioksidativna sredstva, te na dobivene rezultate o antioksidativnim svojstvima NADES može se očekivati da će daljnja istraživanja na staničnim kulturama pokazati neku vrstu biološke aktivnosti prirodnih eutektičnih otapala. Smatramo da se pravilnim odabirom tvari za pripravu NADES, osim što se mogu dizajnirati njihova fizikalno-kemijska svojstva za buduće primjene, mogu se dizajnirati i biološka svojstva.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Primarni metaboliti kao što su glukoza, prolin, betain, glicerol, kolin klorid, limunska i citratna kiselina u odgovarajućim omjerima i s različitim udjelima vode (10, 30, 50%) uspješno tvore stabilne NADES.
2. Ovisno o strukturi NADES njihova fizikalno-kemijska svojstva međusobno se znatno razlikuju.
3. Povećanje udjela vode u NADES uzrokuje linearno smanjivanje vrijednosti gustoće, smanjivanje indeksa loma, a u slučaju viskoznosti dodatak vode uzrokuje eksponencijalno smanjivanje vrijednosti. Za razliku od njih povećanje udjela vode u NADES ima suprotan učinak na vrijednost električne vodljivosti koja se povećava čak do 88 puta.
4. Vrijednost pH NADES kreće u kiselom području od 0,231 do 3,619 budući da u svom sastavu imaju jabučnu ili limunsku kiselinu. pH vrijednosti također se mijenjaju dodakom vode, te u slučaju ChCl:Ma, Pro:Ma, Ma:Glu:Gly, Ma:Glu i ChCl:Cit pH vrijednost raste, u slučaju ChCl:Pro:Ma i B:Cit vrijednost pH opada, dok u slučaju B:Ma i Pro:Ma do 30 % udjela vode pH raste, a potom opada.
5. Osam pripremljenih NADES u ispitanom rasponu koncentracija ( $500 \text{ mg L}^{-1}$  do  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) ne pokazuje negativan utjecaj na rast i preživljavanje HeLa i HEK293T staničnih linija tj. ne inhibiraju rast stanica.
6. Analizom antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom utvrđeno je da svi testirani NADES pokazuju antioksidativnu aktivnost što upućuje na moguću biološku aktivnost NADES u daljnjim istraživanjima na staničnim kulturama.
7. S obzirom da pripremljeni NADES ne pokazuju citotoksični učinak na tretirane stanice, imaju antioksidativna svojstva, te se fizikalno-kemijska svojstva mogu pozitivno prilagoditi povećanjem udjela vode dobri su kandidati kao otapala za primjenu u raznim tehnološki procesima.

## 6. LITERATURA

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

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

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

Anonymous 1 (2016) <<http://www.chemspider.com/>> Pristupljeno 08. travnja 2016.

Anonymous 2 (2012) <<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/>> Pristupljeno 15. travnja 2016.

Anonymous 3 (2016) <<http://www.lgcstandards.atcc.org/~media/Attachments/E/7/3/C/1765.ashx>> Pristupljeno 16. travnja 2016.

Anonymous 4 (2016) <<http://www.lgcstandards.atcc.org/~media/Attachments/E/1/4/7/1820.ashx>> Pristupljeno 16. travnja 2016.

Anonymous 5 (2016) <<http://www.chemicalbook.com/>>, Pristupljeno 27. travnja 2016.

Bi, W., Tian, M., Row, K. H. (2013) Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A.* **1285**, 22-30.

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

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

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

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013b) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius L.* *Anal. Chem.* **85**, 6272–6278.

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

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

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

Harris, R. C. (2008) Physical properties of alcohol based deep eutectic solvents. Ph.D. Thesis, Department of Chemistry, University of Leicester.

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

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

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

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

- Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A. (2015) In Vitro and In Vivo Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLoS ONE* **10**, e0117934. doi:10.1371/journal.pone.0117934
- Islam, M. M., Hoque M. A., Okuma E., Banu, M. N., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Murata, Y. (2009) Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* **166**, 1587-1597.
- Jablonsky, M., Škulcova, A., Kamenski, L., Vrška, M., Šima, J. (2015) Deep eutectic solvents: Fractionation of Wheat Straw. *BioResources* **10**, 8039-8047.
- Kareem, M. A., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M. (2010) Phosphonium-based ionic liquids analogues and their physical properties. *J. Chem. Eng. Data* **55**, 4632-4637.
- Kudlak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11975-11992.
- Maugeri, Z., de María, P. D. (2012) Novel choline-chloride-based deep-eutectic solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. *RSC Adv.* **2**, 421–425.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63.
- Mouratoglou, E., Malliou, V., Makris, D. P. (2016) Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass. *Waste Biomass Valor.* 1-11. doi 10.1007/s12649-016-9539-8
- Mulia, K., Krisanti, E., Terahadi, F., Putri, S. (2015) Selected natural deep eutectic solvents for the extraction of  $\alpha$ -mangostin from mangosteen (*Garcinia Mangostana L.*) pericarp. *Int. J. Technol. Des. Ed.* **7**, 1211-1220.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M., Bacchiocca, M. (2005) Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Methods Enzymol.* **93**, 257-266.



- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Pöhnlein, M., Ulrich, J., Kirschhöfer, F., Nusser, M., Muhle-Goll, C., Kannengiesser, B., Brenner-Weiß, G., Luy, B., Liese, A., Syldatk, C., Hausmann, R. (2015) Lipase-catalyzed synthesis of glucose-6-O-hexanoate in deep eutectic solvents. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **117**, 161-166.
- Popescu, A. M., Constantin, V. (2014) Synthesis, Characterization and Thermophysical Properties of Three Neoteric Solvents-Ionic Liquids Based on Choline Chloride. *Chem. Res. Chin. Univ.* **30**, 119—124.
- Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46-53.
- Radošević, K., Železnjak, J., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I., Slivac, I., Gaurina Srček, V. (2016) Comparative in vitro study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. *Ecotox. Environ. Safe.* **131**, 30-36.
- Ruß, C., König, B. (2012) Low melting mixtures in organic synthesis—an alternative to ionic liquids? *Green Chem.* **14**, 2969-2982.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082.
- Tang, X., Liu, J., Dong, W., Li, P., Li, L., Lin, C., Zheng, Y., Hou, J., Li, D. (2013) The Cardioprotective Effects of Citric Acid and L-Malic Acid on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Evid-based Compl Alt.* **2013**.
- Triantis, T., Papadopoulos, K., Dimotikali, D., Nikokavouras, J. (2001) Evaluation of food antioxidant activity by photostorage chemiluminescence. *Anal Chim Acta.* **2**, 263-268.
- Van der Berg, A. J. J., Halkes, S. B. A., van Ufford, H. Q., Hoekstra, M. J., Beukelman, C. J. (2003) A novel formulation of metal ions and citric acid reduces reactive oxygen species in vitro. *J Wound Care.* **12**, 355-366.

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

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

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