

DAN DOKTORATA BIOTEHNIČKOG PODRUČJA 2021.

**PRIMJENA NOVIH TEHNIKA U PROIZVODNJI
BILJNIH EKSTRAKATA CVIJETA TRNINE (*Prunus
spinosa* L.)**

VANJA LOVRIĆ

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Zagreb, 16.09.2021.

IP-PE-FF

„Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane”
„Application of innovative technologies for production of plant extracts as ingredients for functional food”



Ovo istraživanje provedeno je u
Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva,

**Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća i
u Laboratoriju za toksikologiju,**

pod mentorstvom **prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac**

u sklopu projekta

„Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF)”, financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

ZAŠTO CVIJET TRNINE?

- Trnina - samonikla biljna vrsta, u Hrvatskoj vrlo rasprostranjena
- Cvjetovi trnine –prevencija i ublažavanje različitih bolesti i stanja
- Ekstrakti cvjetova trnine - protuupalna, diuretička, spazmolitička i blago laksativna svojstva, sredstva za ublažavanje bolesti krvožilnog sustava
- Visok biološki potencijal - biološki aktivne sastavnice – fenolni spojevi
- Fenolni spojevi- različita biološka svojstva – **antioksidacijsko i antikancerogeno** djelovanje



NOVE TEHNIKE EKSTRAKCIJE VS. KONVENCIONALNE TEHNIKE

- Veća efikasnost
- Skraćeno vrijeme ekstrakcije
- Veća zaštita termolabilnih spojeva
- Viši stupanj automatizacije
- Ekološki prihvatljive tehnike u vidu potrošnje otapala i energije



NOVE TEHNIKE EKSTRAKCIJE KORIŠTENE U SKLOPU ISTRAŽIVANJA

- EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA MIKROVALOVIMA (MAE)
- EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA VISOKIM HIDROSTATSKIM TLAKOM (HPAE)
- UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU (ASE)

U SKLOPU ISTRAŽIVANJA PROVEDENO JE:



- Usporedba utjecaja MAE, ASE i HPAE na prinose fenolnih spojeva iz cvijeta trnine te definiranje optimalnih uvjete ekstrakcije:

MAE- utjecaj **polarnosti otapala, temperature i vremena ekstrakcije**

ASE- utjecaj **polarnosti otapala, temperature i broja ciklusa ekstrakcije**

HPAE- utjecaj **polarnosti otapala, temperature, vremena ekstrakcije i tlaka**

- Izdvajanje ekstrakta sa najvećim masenim udjelom ukupnih fenola, ukupnih flavonida i ukupnih hidrokscimetnih kiselina
- Definiranje sastava i količine fenolnih spojeva u ekstraktima u kojima su određeni najviši maseni udjeli određivanih fenolnih skupina
- Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ekstrakata
- Određivanje antiproliferativnog/citotoksičnog učinka ekstrakata

USPOREDBA UTJECAJ MAE, ASE I HPAE NA PRINOSE FENOLNIH
SPOJEVA IZ CVIJETA TRNINE I DEFINIRANJE OPTIMALNIH UVJETA
EKSTRAKCIJE

PLAN POKUSA
MAE

MAE

ETANOL

50 %

40 °C
(100 W)

5 min

15 min

25 min

50 °C
(200 W)

5 min

15 min

15 min

60 °C
(300 W)

5 min

15 min

25 min

40 °C
(100 W)

5 min

15 min

25 min

70 %

50 °C
(200 W)

5 min

15 min

25 min

60 °C
(300 W)

5 min

15 min

25 min

METANOL

50 %

40 °C
(100 W)

5 min

10 min

25 min

50 °C
(200 W)

5 min

15 min

25 min

60 °C
(300 W)

5 min

15 min

25 min

70 %

40 °C
(100 W)

5 min

15 min

25 min

50 °C
(200 W)

5 min

15 min

25 min

60 °C
(300 W)

5 min

15 min

25 min

PLAN POKUSA ASE

ASE

ETANOL

50 %

60 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

80 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

100 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

METANOL

70 %

60 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

80 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

100 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

50 %

60 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

80 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

100 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

70 %

60 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

80 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

100 °C

1 siklus

2 ciklusa

3 ciklusa

PLAN POKUSA HPAE

HPAE

ETANOL

50 %

200 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

500 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

METANOL

70 %

200 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

500 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

50 %

200 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

500 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

70 %

200 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

500 MPa

40 °C

5 min

15 min

60 °C

5 min

15 min

RASPONI FENOLNIH SPOJEVA ODREĐIVANIH PRIMJENOM MAE

MASENI UDJELI	Vodene otopine etanola	Vodene otopine metanola
UKUPNI FENOLI	46,05-63,72 mg GAE/g	45,19-58,42 mg GAE/g
FLAVONOIDI	12,60-15,61 mg QE/g	11,77-14,76 mg QE/g
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	21,01-25,82 mg CAE/g	19,90-25,77 mg CAE/g

OPTIMALNI UVJETI MAE EKSTRAKCIJE ZA PROIZVODNJU EKSTRAKATA CVIJETA TRNINE U KOJIMA SE PREKLAPAJU NAJVIŠI MASENI UDJELI ODREĐIVANIH SKUPINA FENOLNIH SPOJEVA

OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE			
MAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	70
		Temperatura (°C)	60
		Vrijeme (min)	25
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70
		Temperatura (°C)	54
		Vrijeme (min)	16

RASPONI FENOLNIH SPOJEVA ODREĐIVANIH PRIMJENOM ASE

MASENI UDJELI	Vodene otopine etanola	Vodene otopine metanola
UKUPNI FENOLI	23,57-70,02 mg GAE/g	21,44-58,38 mg GAE/g
FLAVONOIDI	5,29-16,26 mg QE/g	6,23-15,30 mg QE/g
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	7,11-23,79 mg CAE/g	8,97- 22,93 mg CAE/g

OPTIMALNI ASE UVJETI ZA PROIZVODNJU EKSTRAKATA CVIJETA TRNINE U KOJIMA SE PREKLAPAJU NAJVIŠI MASENI UDJELI ODREĐIVANIH SKUPINA FENOLNIH SPOJEVA

OPTIMALNI UVJETI			
ASE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	68
		Temperatura (°C)	100
		Broj ciklusa (N x 5 min)	3
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70
		Temperatura (°C)	100
		Broj ciklusa (N x 5 min)	1

RASPONI FENOLNIH SPOJEVA ODREĐIVANIH PRIMJENOM HPAE

	vodena otopina etanola	vodena otopina metanola
UKUPNI FENOLI	46,41-53,51 mg GAE/g	39,47-48,41 mg GAE/g
FLAVONOIDI:	12,51-14,89 mg QE/g	11,58-13,53 mg QE/g
UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	18,70-26,20 mg CAE/g	16,36-21,60 mg CAE/g

OPTIMALNI UVJETI HPAE EKSTRAKCIJE ZA PROIZVODNJU EKSTRAKATA CVIJETA U KOJIMA SE PREKLAPAJU NAJVIŠI MASENI UDJELI ODREĐIVANIH SKUPINA FENOLNIH SPOJEVA

OPTIMALNI UVJETI			
HPAE	VODENA OTOPINA ETANOLA	Polarnost etanola (%)	70
		Temperatura (°C)	60
		Vrijeme (min)	5
		Tlak (MPa)	200
	VODENA OTOPINA METANOLA	Polarnost metanola (%)	70
		Temperatura (°C)	40
		Vrijeme (min)	5
		Tlak (MPa)	500

ZAKLJUČCI - USPOREDBA EKSTRAKCIJSKIH TEHNIKA I DEFINIRANJE OPTIMALNIH UVJETA



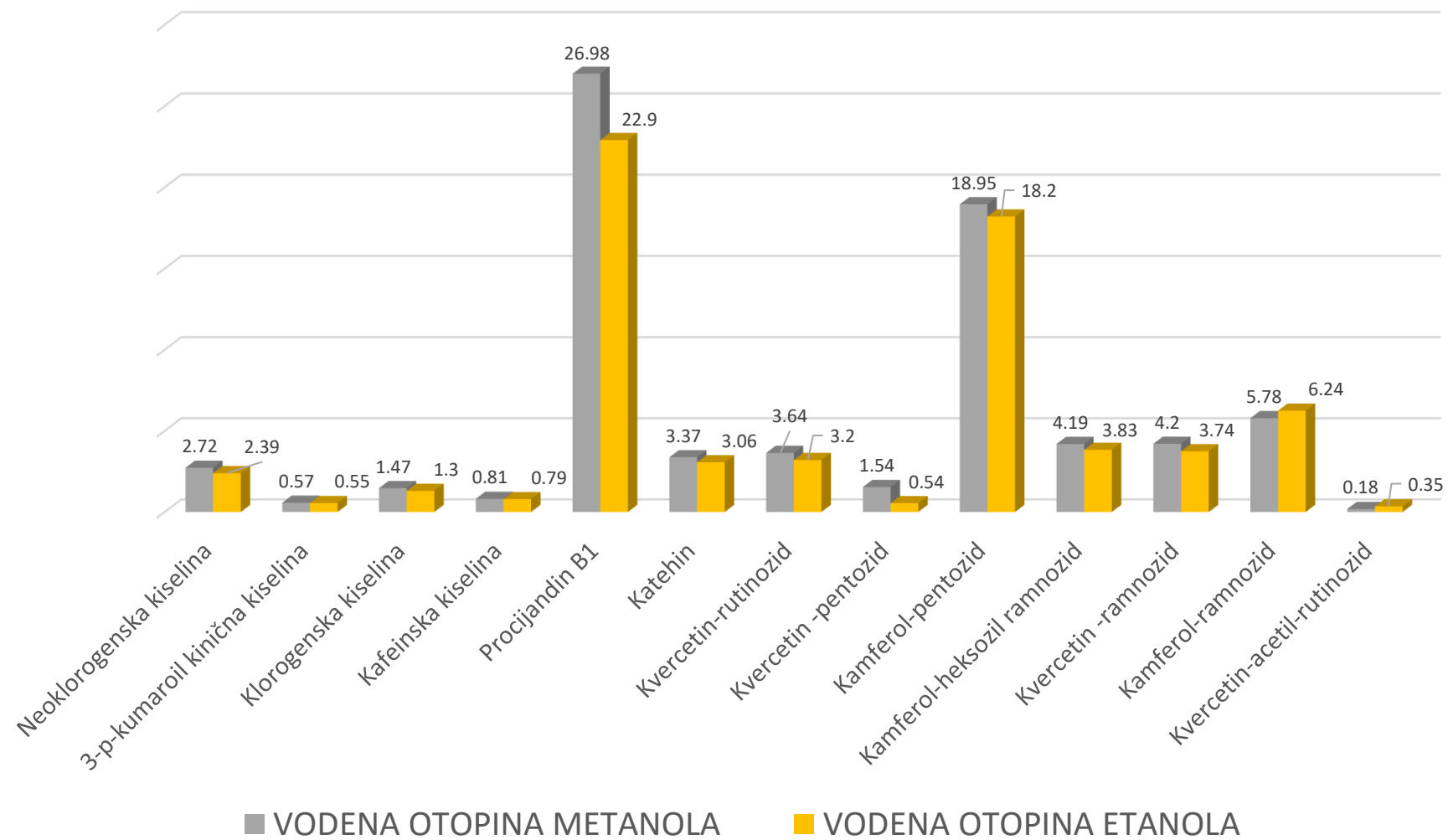
- Optimalni uvjeti tehnika bazirani samo na temelju masenih udjela ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i ukupnih hidroksicimentnih kiselina:
 - **MAE**
 - Etanol – 70 % vodena otopina etanola, temperatura 60°C, vrijeme 25 min
 - Metanol-70 % vodena otopina etanola, temperatura 54°C, vrijeme 16 min
 - **ASE**
 - Etanol – 68 % vodena otopina etanola, temperatura 100°C, 3 ciklusa
 - Metanol-70 % vodena otopina etanola, temperatura 100°C, vrijeme 1 ciklus
 - **HPAE**
 - Etanol – 70 % vodena otopina etanola, temperatura 60°C, vrijeme 5 min, tlak 200 MPa
 - Metanol-70 % vodena otopina etanola, temperatura 40°C, vrijeme 5 min, tlak 500 MPa
- Za izolaciju ukupnih **fenola** je najbolja **MAE**, zatim slijede **ASE** pa **HPAE**
- Za izolaciju **ukupnih flavonoida** i **ukupnih hidroksicimetnih kiselina** najbolja je **ASE**, **MAE** i **HPAE** podjednako učinkovite

DEFINIRANJE SASTAVA I KOLIČINE FENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA U
KOJIMA SU ODREĐENI NAJVIŠI MASENI UDJELI ODREĐIVANIH SKUPINA

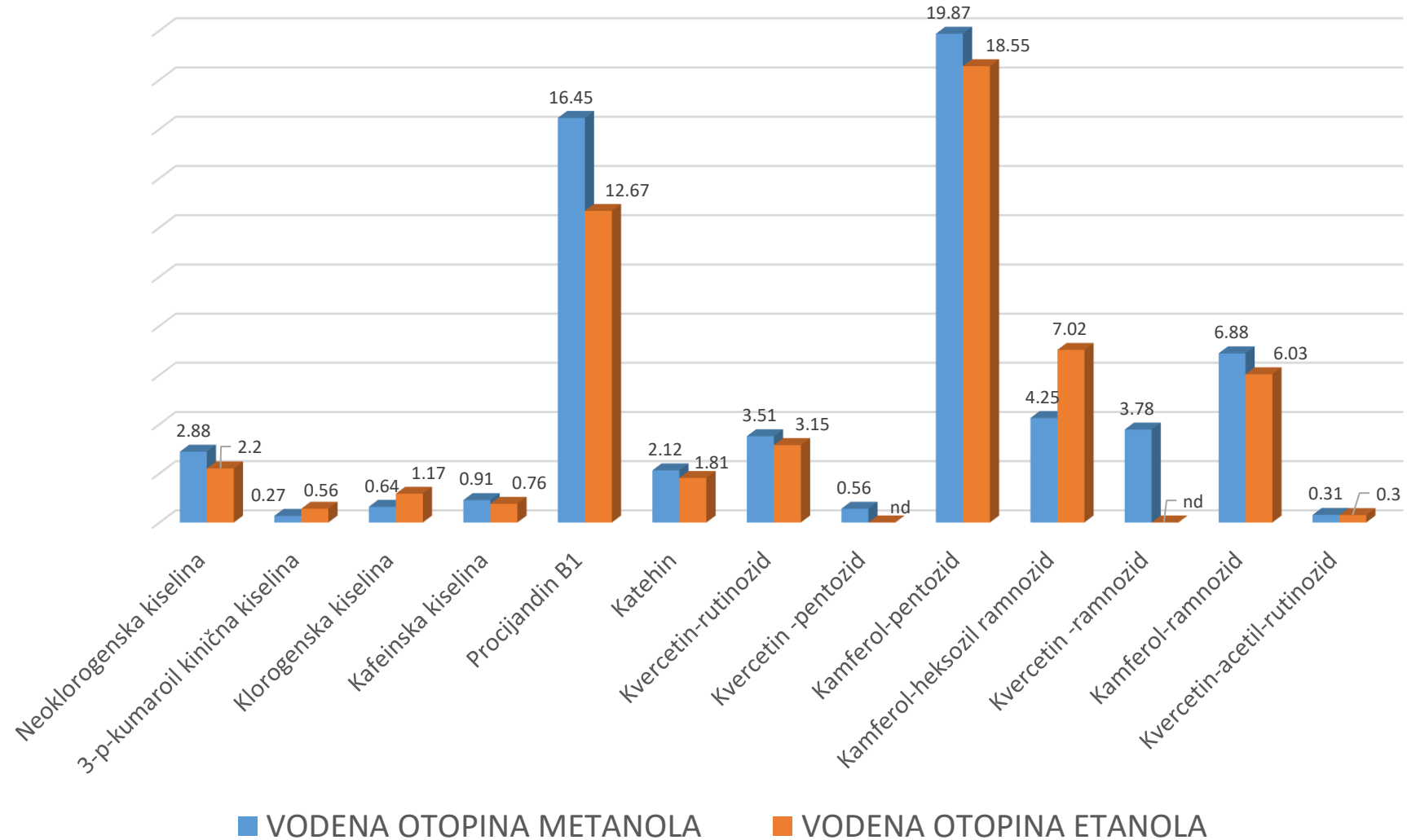


- U ekstraktima cvijeta trnine određeni spojevi iz 3 skupine:
- **7 flavonol glikozida** (kamferol-pentozid, kamferol-ramnozid, kamferol-heksozil ramnozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-rutinozid, kvercetin-pentozid i kvercetin-acetil-rutinozid),
 - **2 flavanola** (procijanidina B i katehin) i
 - **4 hidroksicimetne kiseline** (neoklorogenska kiselina, 3-*p*-kumaroil kinska kiselina, klorogenska kiselina i kafeinska kiselina)
-
- **Kamferol-pentozid** - najzastupljeniji spoj u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima primjenom **MAE**
 - **Procijandin B1** - najzastupljeniji spoj u ekstraktima cvijeta trnine dobivenima primjenom **ASE**
 - Navedeni spojevi zajedno čine oko **50 %** svih identificiranih spojeva u ekstraktima dobivenim primjenom MAE i ASE

MASENI UDJELI FENOLNIH SPOJEVA (MG/G) ODREĐENI PRIMJENOM VISOKODJELOTVORNE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE (HPLC) U EKSTRAKTIMA CVIJETA TRNINE DOBIVENIM PRI OPTIMALNIM UVJETIMA ASE



MASENI UDJELI FENOLNIH SPOJEVA (MG/G) ODREĐENI PRIMJENOM VISOKODJELOTVORNE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE (HPLC) U EKSTRAKTIMA CVIJETA TRNINE DOBIVENIM PRI OPTIMALNIM UVJETIMA MAE



ODREĐIVANJE ANTIPROLIFERATIVNOG/CITOTOKSIČNOG UČINKA

Određivanje antiproliferativnih svojstava na Hep G2 staničnoj liniji *in vitro* metodama

Trypan Blue
metoda

Kenacid Blue
metoda

Neutral Red
metoda

Inkubacija 24 h

Inkubacija 24, 48 i 72 h



Statistička obrada rezultata pomoću Studentovog *t*-testa

Izračun IC vrijednosti iz jednadžbi interpoliranih krivulja

Određivanje tipa stanične smrti na Hep G2 staničnoj liniji

Metoda protočne citometrije

Inkubacija 24 h



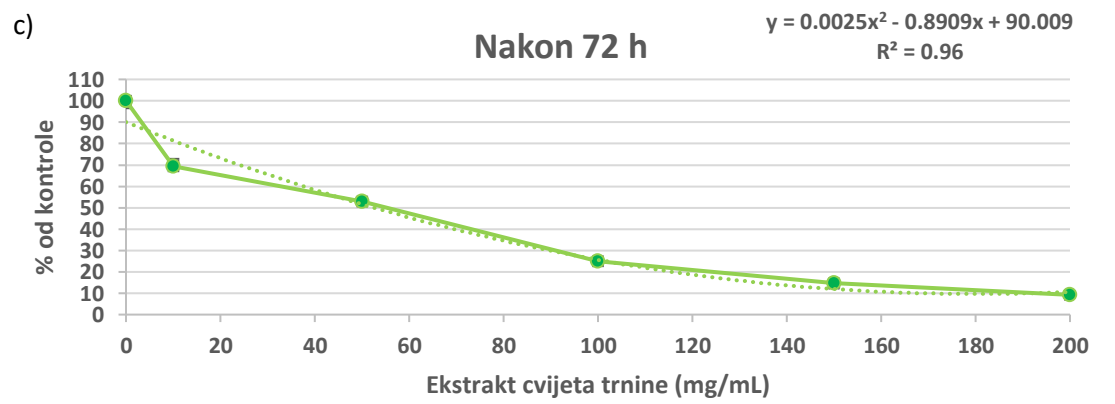
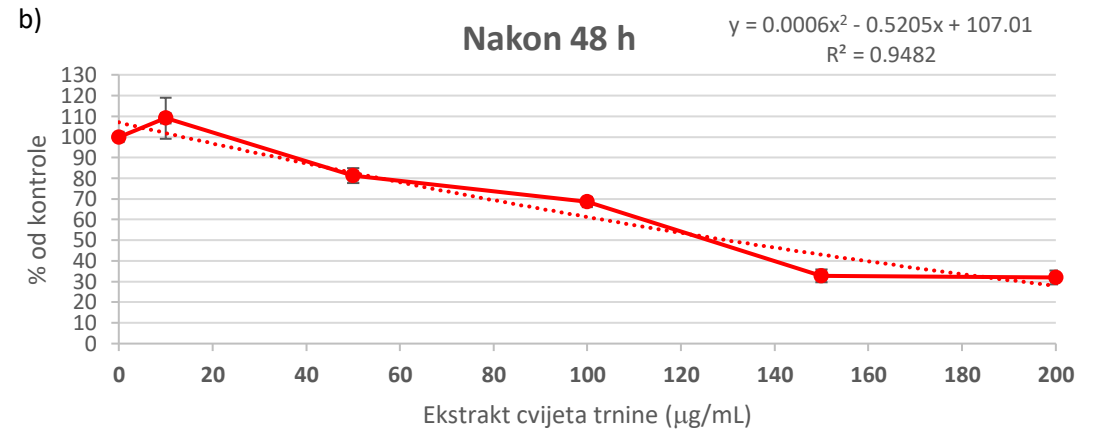
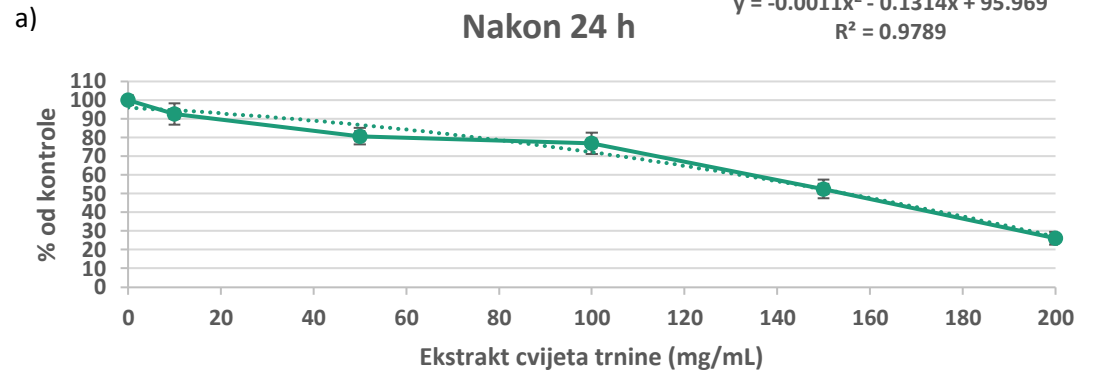
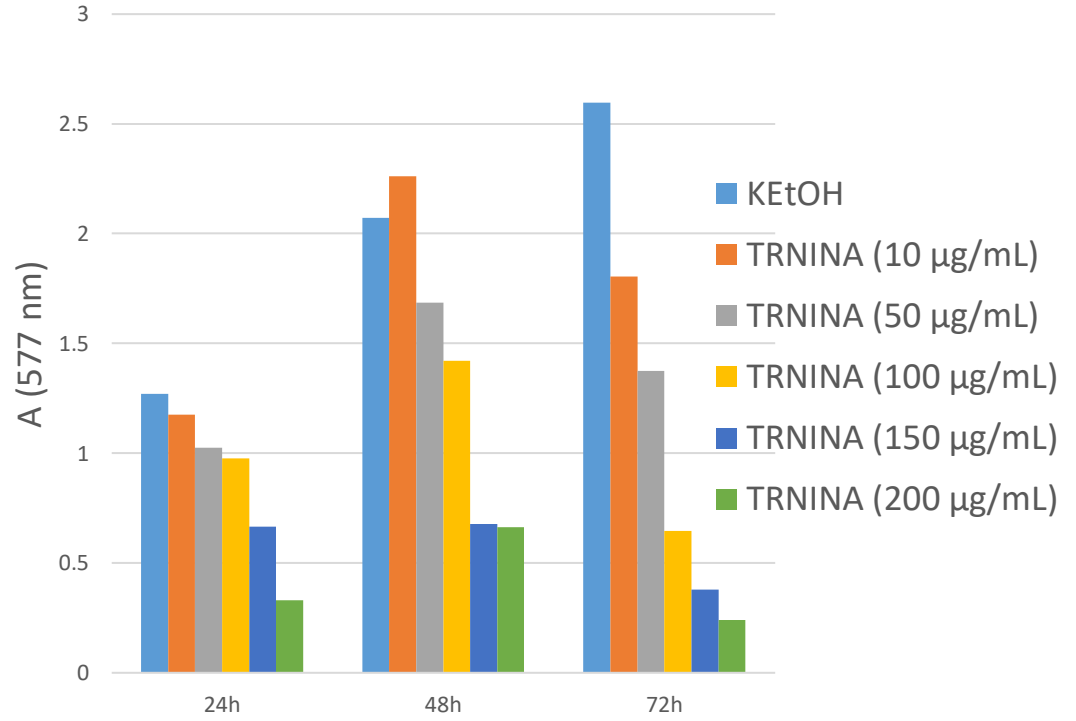
analizira stanica pomoću
Muse Cell Analyzer-a



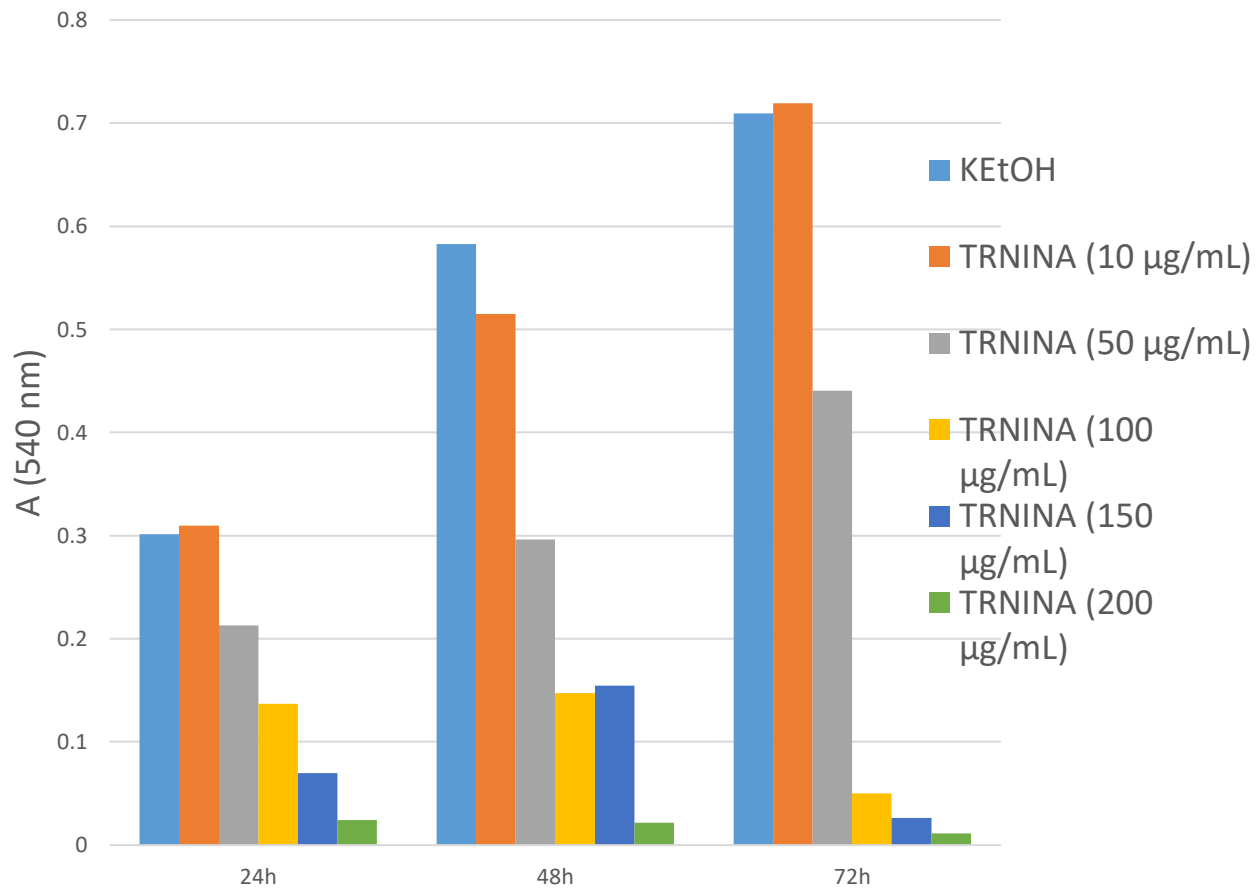
Izrada reprezentativnih „dot-plot” dijagrama s prikazom tipa stanične smrti

OVISNOST PREŽIVLJAVANJA HEP G2 STANICA O KONCENTRACIJI EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U ODNOSU NA KONTROLU PRAĆENO *KENACID BLUE* METODOM.

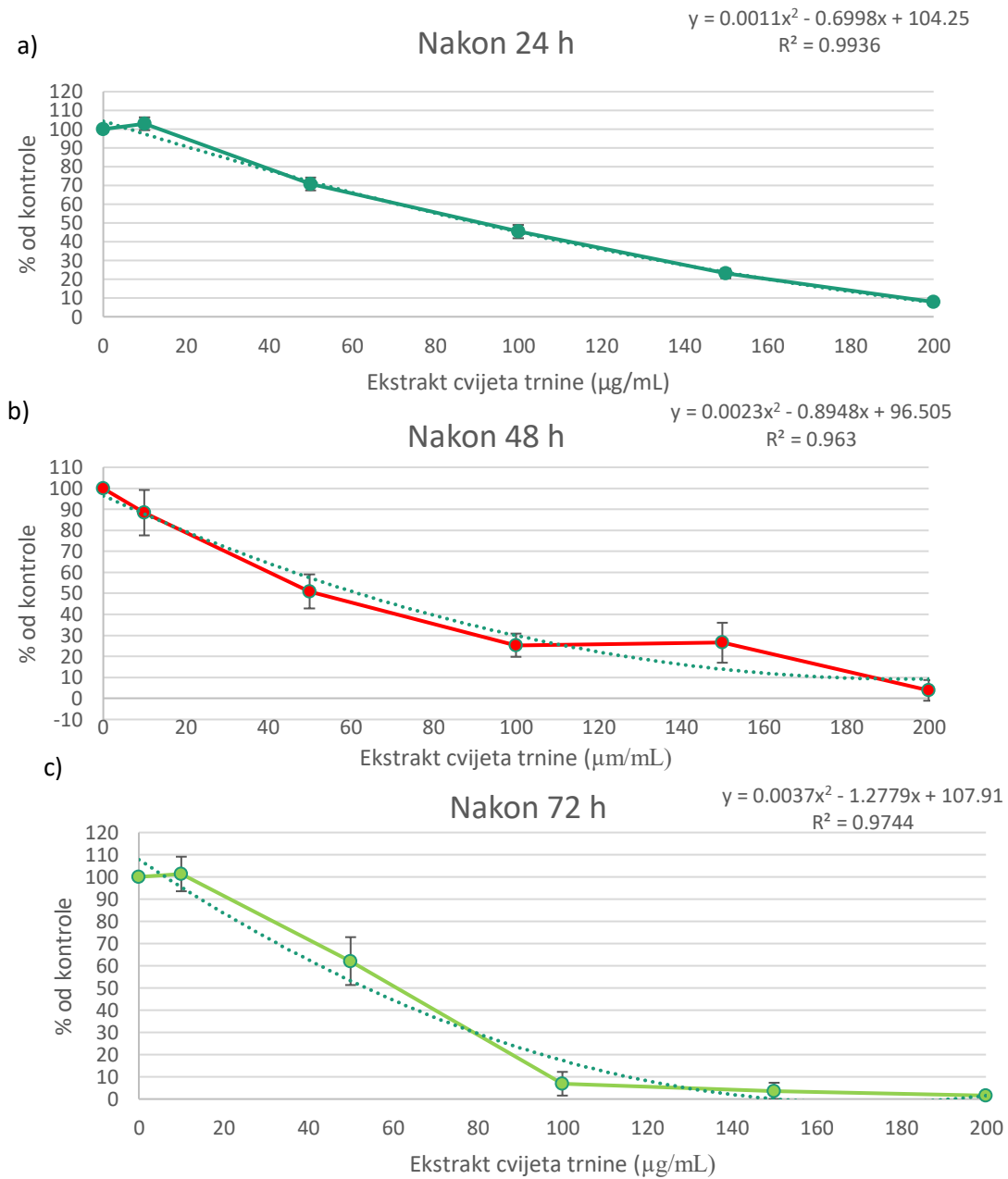
PROLIFERACIJA HEP G2 STANICA TRETIRANIH S EKSTRAKTOM CVIJETA TRNINE (10-200 µg/mL) PRAĆENA NAKON 24, 48 I 72 SATA *KENACID BLUE* METODOM



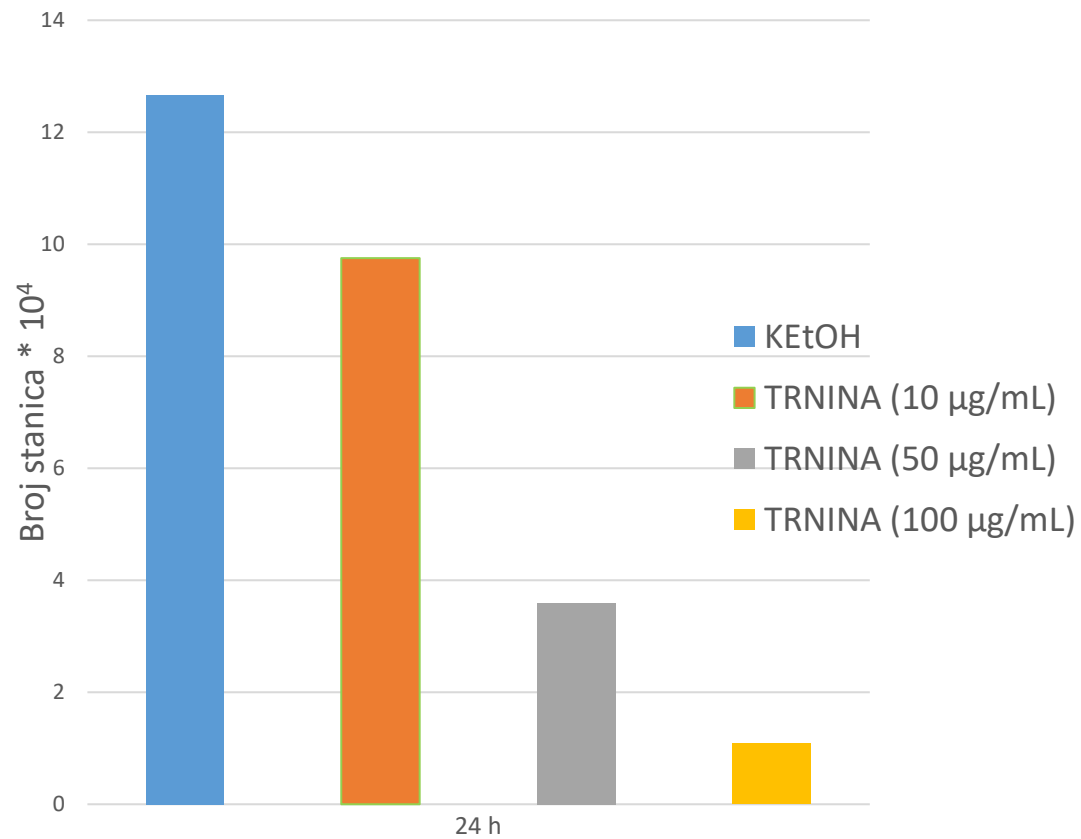
PROLIFERACIJA HEP G2 STANICA TRETIRANIH S EKSTRAKTOM CVIJETA TRNINE (10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) PRAĆENA NAKON 24, 48 I 72 SATA *NEUTRAL RED* METODOM



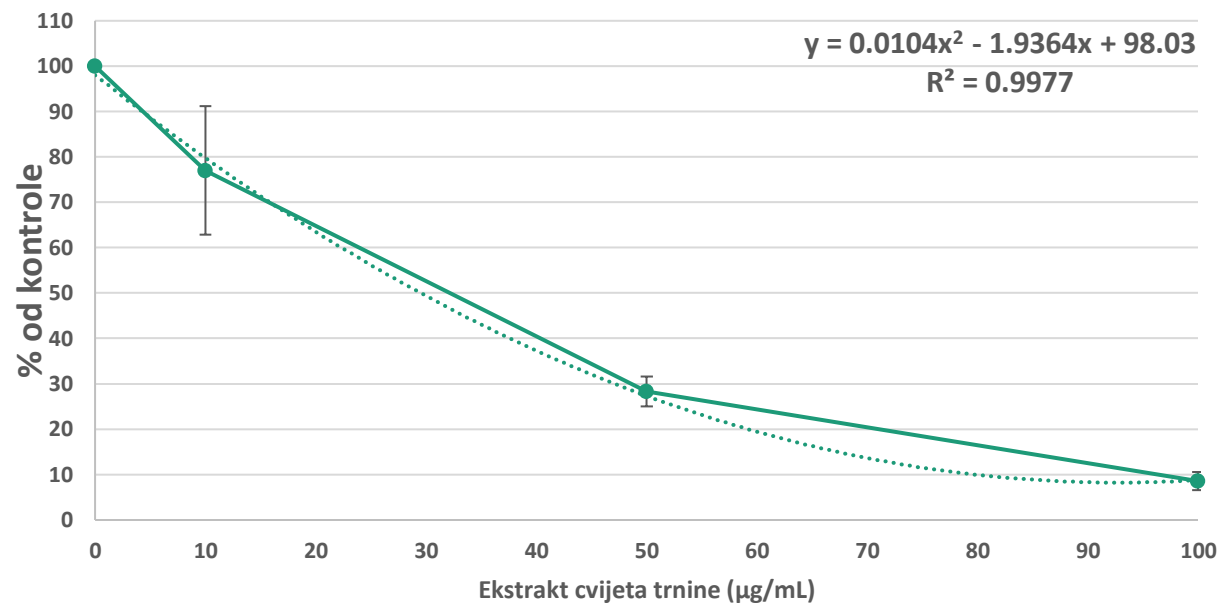
OVISNOST PREŽIVLJAVANJA HEP G2 STANICA O KONCENTRACIJI EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U ODNOSU NA KONTROLU PRAĆENO *NEUTRAL RED* METODOM



PROLIFERACIJA HEP G2 STANICA TRETIRANIH S EKSTRAKTOM CVIJETA (10-100 $\mu\text{G}/\text{mL}$) PRAĆENA NAKON 24 SATA *TRYPAN BLUE* METODOM



OVISNOST PREŽIVLJAVANJA HEP G2 STANICA O KONCENTRACIJI EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U ODNOSU NA KONTROLU PRAĆENO *TRYPAN BLUE*



USPOREDBA IC VRIJEDNOSTI DOBIVENIH PRIMJENOM *KENACID BLUE*, *NEUTRAL RED* I *TRYPAN BLUE* METODA

IC [µg/mL]	Vrijeme/h		
	24	48	72
IC ₂₀	74,75	55,43	11,61
IC ₅₀	153,25	128,59	52,70
IC ₈₀	209,77	x	116,99

Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20 (IC₂₀), 50 (IC₅₀) i 80 (IC₈₀) % određene metodom *Kenacid Blue* nakon 24, 48 i 72 sata

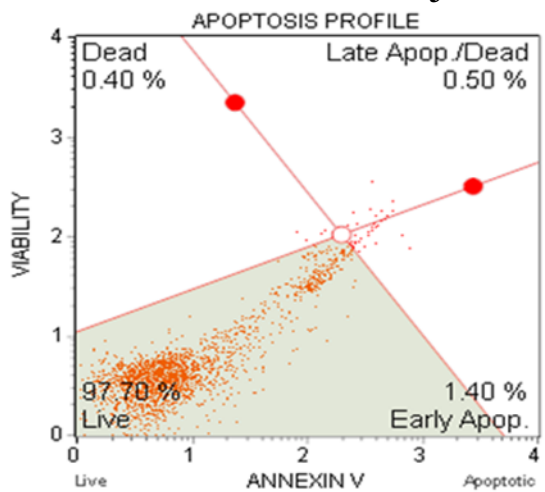
IC [µg/mL]	Vrijeme/h		
	24	48	72
IC ₂₀	36,78	19,41	23,43
IC ₅₀	90,35	61,78	53,65
IC ₈₀	161,28	126,88	94,83

Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20 (IC₂₀), 50 (IC₅₀) i 80 (IC₈₀) % određene metodom *Neutral Red* nakon 24, 48 i 72 sata

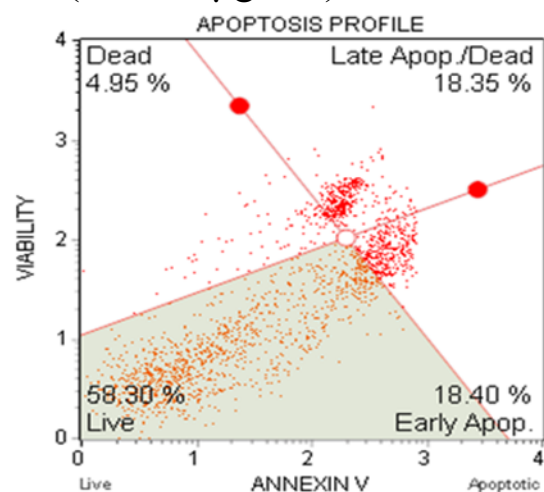
IC [µg/mL]	Vrijeme/h
	24
IC ₂₀	9,83
IC ₅₀	29,47
IC ₈₀	58,98

Koncentracije ekstrakta cvijeta trnine koje inhibiraju proliferaciju Hep G2 stanica za 20 (IC₂₀), 50 (IC₅₀) i 80 (IC₈₀) % određene metodom *Trypan Blue* metodom nakon 24 sata

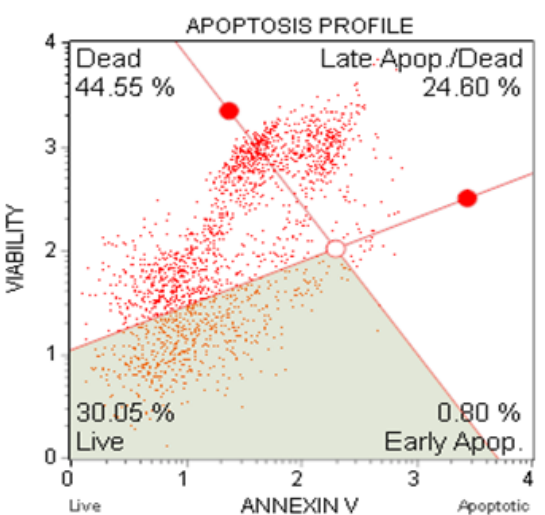
Reprezentativni *dot-plot* dijagrami dobiveni prilikom određivanja **tipa stanične smrti** primjenom *MuseTM Annexin V & Dead Cell* kit-a nakon 24-satnog tretmana Hep G2 stanica s ekstraktom cvijeta trnine (10-100 µg/mL)



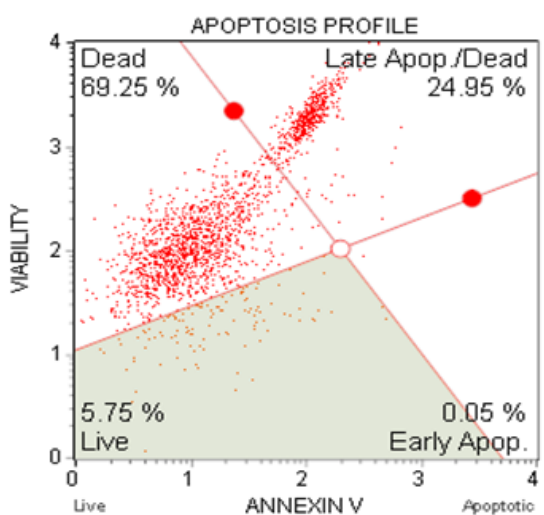
a) Kontrola



b) 10 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine



c) 50 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine



d) 100 µg/mL ekstrakta cvijeta trnine

Postotak živih, ukupno apoptotičkih (rano i kasno apoptotičke) i mrtvih stanica nakon tretmana Hep G2 stanica ekstraktom cvijeta trnine određen metodom protočne citometrije

%	Kontrola	Ekstrakt cvijeta trnine (10 µg/mL)	Ekstrakt cvijeta trnine (50 µg/mL)	Ekstrakt cvijeta trnine (100 µg/mL)
Žive stanice	97,70	58,30	30,05	5,75
Ukupne apoptotičke stanice	1,90	36,75	25,40	25,00
Mrtve stanice	0,40	4,95	44,55	69,25

- Rezultati *Kenacid Blue*, *Neutral Red* i *Trypan Blue* metoda ukazuju da je toksična aktivnost ekstrakta cvijeta trnine ovisna o koncentraciji ekstrakta
- *Rezultati Kenacid Blue* i *Neutral Red metoda* ukazuju da je toksična aktivnost ekstrakta cvijeta ovisna i o vremenu inkubacije
- Na osnovu IC_{50} vrijednosti ekstraktu cvijeta trnine se može pripisati **umjerena toksična aktivnost**
- Metodom protočne citometrije je zabilježeno smanjenje udjela živih Hep G2 stanica s porastom koncentracije ekstrakta
- Pri upotrebi ekstrakta cvijeta trnine **najniže koncentracije - najveća razina apoptotičkih stanica**

Hvala na pažnji!