

# Priprema ekstrakata lista masline za kozmetičku primjenu

---

Marketin, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:204811>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Petra Marketin**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, rujan 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Petra Marketin**

**PRIPREMA EKSTRAKTA LISTA MASLINE ZA KOZMETIČKU  
PRIMJENU**

**DIPLOMSKI RAD**

Voditelj rada: prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, FKIT

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, FKIT

prof. dr. sc. Aleksandra Sander, FKIT

dr. sc. Lidija Furač, v. pred. FKIT

Zagreb, rujan 2020.

*Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na stručnim savjetima i pomoći te na pristupačnosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se asistentici, Anamariji Mitar mag.ing.cheming. na savjetima tijekom rada u laboratoriju te na ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Najveća hvala mojoj obitelji na podršci tijekom studiranja.*

# SAŽETAK

## **Priprema ekstrakta lista masline za kozmetičku primjenu**

Lišće masline, jedne od najrasprostranjenijih biljaka Mediterana, bogato je različitim bioaktivnim komponentama. Jedni od značajnijih bioaktivnih komponenata prisutnih u lišću su polifenolni spojevi. Polifenolni spojevi pokazuju potencijalno dobar učinak na ljudsko zdravlje zbog antioksidativnih, protuupalnih, antialergenih, antivirusnih, analgetskih i antipiretskih svojstva zbog čega se istražuje njihova primjena u kozmetičke, medicinske i prehrambene svrhe.

U ovom radu ispitana je mogućnost pripreme ekstrakta lista masline za kozmetičku primjenu. Polifenolni spojevi ekstrahirani su iz lišća masline korištenjem otapala MLI:PEG 1:2. Ispitan je utjecaj vode u otapalu na djelotvornost ekstrakcije te je određeno optimalno vrijeme procesa. Također, određena je mikrobiološka aktivnost ekstrakta.

**Ključne riječi:** ekstrakcija čvrsto-kapljevito, lišće masline, polifenolni spojevi

## **SUMMARY**

### **Preparation of olive leaf extracts for cosmetic application**

Olive tree leaves, part of the most common plant in Mediterranean area, is rich in different bioactive components. One of the most important bioactive components present in Olive tree leaves are polyphenolic compounds. Polyphenolic compounds show potentially good effects on human health due to antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergenic, antiviral, analgesic and antipyretic properties. For these reasons, their use for cosmetic, medical and food purposes is being investigated

In this paper, the possibility of preparing olive leaf extract for cosmetic use was investigated. Polyphenolic compounds from olive leaves were extracted using a solvent MLI: PEG 1: 2. Influence of the water in the solvent on the extraction efficiency and optimal process time were determined. Furthermore, the microbiological activity of the extract was determined.

**Key words:**, olive leaves, polyphenolic compounds, solid-liquid extraction

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. Polifenoli .....	3
2.1.1. Polifenoli u listu masline .....	5
2.1.2. Primjena polifenola u zdravstvu i kozmetici .....	6
2.2. Ekstrakcija .....	7
2.2.1. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito (izluživanje) .....	8
2.2.2. Otapala za ekstrakciju .....	10
2.3. Niskotemperaturna eutektička otapala .....	11
2.3.1. Svojstva DES-a <sup>41</sup> .....	13
2.3.2. Primjena DES-a u kozmetici .....	14
2.3.3. Toksičnost DES-a .....	16
2.3.4. Stabilnost polifenola u DES-u .....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. Svrha rada .....	18
3.2. Lišće masline .....	18
3.2.1. Priprema lišća .....	18
3.2.2. Karakterizacija lišća .....	18
3.3. Otapalo .....	20
3.3.1. Priprema otapala .....	20
3.3.2. Karakterizacija otapala .....	22
3.4. Ekstrakcija .....	22
3.4.1. Utjecaj udjela vode i vremena miješanja .....	23
3.4.2. Folin- Ciocalteu metoda .....	23
3.5. Mikrobiološka analiza .....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	26
4.1. Karakterizacija lišća .....	26
4.1.1. Raspodjela veličina čestica .....	26
4.1.2. Gustoća lišća .....	26
4.2. Odabir otapala .....	27
4.3. Utjecaj vode na ekstrakciju polifenola .....	36
4.4. Optimalno vrijeme .....	39
4.5. Mikrobiološka analiza .....	40

5. ZAKLJUČAK .....	41
6. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA .....	42
7. LITERATURA .....	44
8. ŽIVOTOPIS .....	47



# 1.UVOD

Maslina je zimzeleno stablo ili grm iz istoimene porodice maslina. Može dostići visinu od 3 do 13 metara tvoreći kvrgavo deblo s mnogo grana i široku, asimetričnu krošnju. Stablo masline može su uzgojiti iz sjemena ili iz izboja. Korijen je vretenast i razgranat.<sup>1</sup> Listovi su kožnati i duguljasti, po granama su pravilno raspoređeni, po dva nasuprot, a grana završava s jednim listom.<sup>2</sup> Plod je mesnat, jajastog oblika. Prvo je zelene boje, a dozrijevanjem postaje tamno modar, smeđezelen ili crn. Listovi se koriste za pripravu čaja, a plodovi služe za jelo ili proizvodnju maslinova ulja. Listovi se mogu brati tijekom cijele godine, a plodovi u jesen, kada dozriju.<sup>1,3</sup> Stanište masline je Mediteran, a mogu se kultivirati i u dijelovima Azije. Glavni izvori polifenola iz maslina su plodovi i lišće.<sup>4</sup>



*Slika 1. Maslina*<sup>5</sup>

Polifenolni spojevi su sekundarni metaboliti koje se može pronaći u voću, povrću, bilju, korijenju i lišću te imaju važnu fiziološku i morfološku ulogu. Polifenolni spojevi se proizvode kao odgovor na različite stresove poput UV zračenja, visoke temperature, patogene i parazitske infekcije. Osim važne uloge koju imaju u biljnom svijetu, polifenolni spojevi važni su i u ljudskoj ishrani zato jer pokazuju razne pozitivne utjecaje na ljudsko zdravlje te se istražuje moguća primjena u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.<sup>6</sup>

Kako bi istraživanje i primjena polifenolnih spojeva u različitim industrijama bila moguća potrebno je pronaći adekvatnu metodu za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala. Za

ekstrakciju se mogu koristiti različite konvencionalne i nekonvencionalne ekstrakcijske tehnike, ali se sve temelje na ekstrakcijskoj moći različitih otapala, djelovanju povišene temperature i načinu provedbe miješanja.<sup>7</sup> Zbog rastuće brige o okolišu potrebno je proces ekstrakcije učiniti ekološki prihvatljivijim te se sukladno tome istražuju nova, ekološki prihvatljiva otapala.<sup>8</sup>

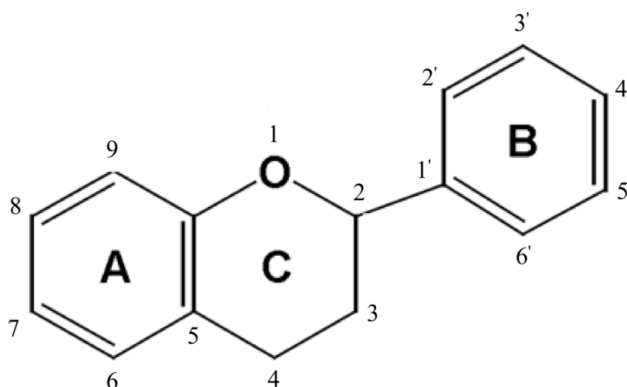
Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. deep eutectic solvents, skraćeno DES) su smjesa pripremljena od dvije ili više komponenti, od kojih je jedna donor vodikove veze, a druga akceptor vodikove veze. Ova otapala smatraju se zelenima zbog niskog talka para, visoke biorazgradivosti i niske toksičnosti.<sup>9</sup>

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Polifenoli

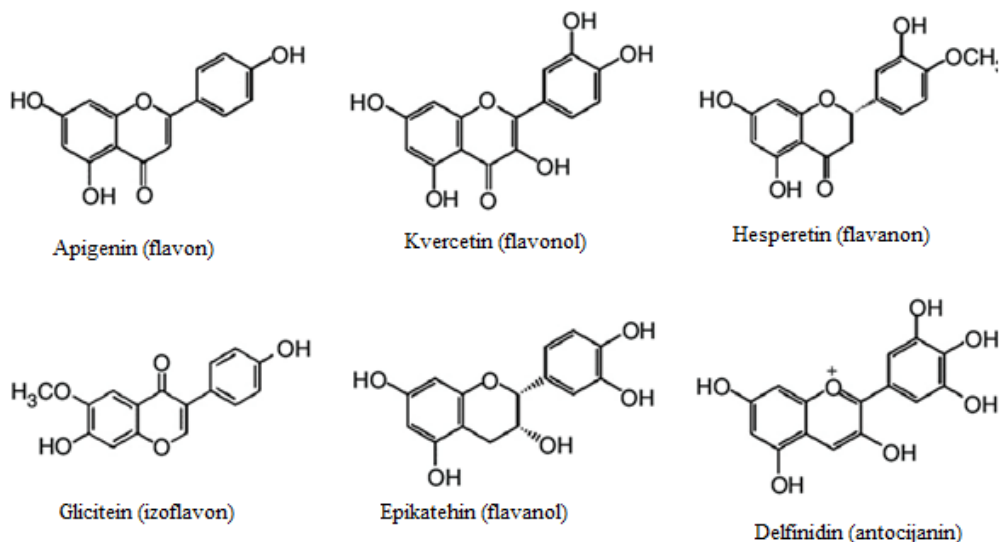
Polifenoli su organski spojevi koji spadaju u sekundarne biljne metabolite, skupinu različitih organskih spojeva koji nisu važni za rast i razvoj već su zaslužni za specifična svojstva biljke čime omogućavaju prilagodbu i preživljavanje u okolišu.<sup>10</sup> Doprinosе gorčini, boji, ukusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti. Može ih se pronaći u voću, povrću, korijenju i lišću, a do danas ih je identificirano više od 8000. Voće poput jabuke, kruške, grožđa i trešanja sadrži oko 200-300 mg polifenola na 100 g svježeg voća.<sup>11</sup>

Jedna od podjela polifenola je na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi su skupina spojeva čija je osnovna struktura ugljični skelet difenilpropana. Sastoji se od dva benzenska prstena (A i B) koji su povezani s tri linearna lanca ugljika, a koji s A benzenom gradi zatvoreni piranski prsten (C).<sup>12</sup>



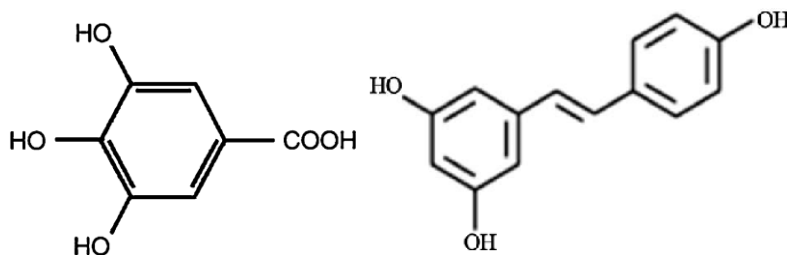
Slika 2. Osnovna struktura flavonoida<sup>13</sup>

Ovisno o oksidacijskom stupnju piranskog prstena, flavonoidi se mogu podijeliti na flavonole, flavone, flavanone, antocijanini, flavanole i izoflavone. Više od 4000 flavonoida je nađeno u voću i napitcima biljnog podrijetla.<sup>12</sup>



Slika 3. Primjeri i vrste flavonoida.<sup>14</sup>

Neflavonoidi su jednostavnije građe nego flavonoidi, njihov skeleton čini samo jedan prsten. U neflavonoide ubrajaju se fenolne kiseline, stilbeni i lignani.



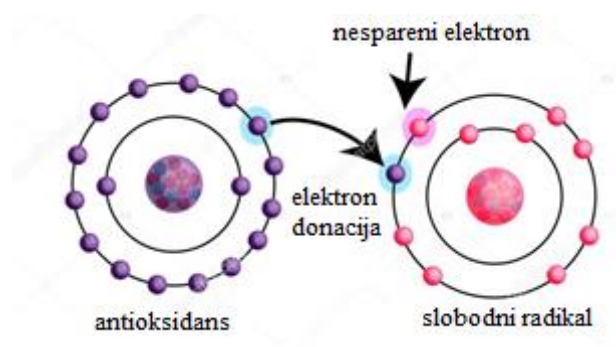
Slika 4. Vrste neflavonoida.<sup>15, 16</sup>

Biološka aktivnost polifenola snažno se oslanja na njihovu antioksidacijsku moć. Poznato je da snižavaju razinu reaktivnog kisika u ljudskom tijelu.<sup>17</sup> Osim antioksidacijskih svojstava, u zdravstvene svrhe promoviraju se i protuupalna, antialergena, antivirusna, analgetska i antipiretska svojstva polifenolnih spojeva.<sup>18</sup>

Antioksidansi su specifični spojevi koje štite biljne, životinjske i ljudske stanice od razarajućeg učinka slobodnih radikala. Reaktivni kisik i dušik neprestano se proizvode u ljudskom tijelu i kontroliraju ih endogeni enzimi. Potrebni su za opskrbu energijom, imunološku funkciju, detoksifikaciju i kemijsku signalizaciju.<sup>4</sup> Ako nastupi hiperprodukcija radikala doći će do neuravnoteženost između antioksidansa i slobodnih radikala, a što može uzrokovati uništenje stanice.<sup>19</sup>

Antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva opisuje se na sljedeće načine:<sup>19</sup>

- neutraliziraju radikalske vrste kao što su reaktivni kisik ili dušik doniranjem vodikova atoma ili elektrona<sup>20</sup>
- sprječavaju formiranje reaktivnog kisika/ dušika inhibiranjem enzima
- keletiraju metale u tragovima koji su uključeni u proizvodnju radikala



Slika 5. Djelovanje antioksidansa.

Antioksidacijski potencijal ovisi o rasporedu i broju hidroksilnih skupina.<sup>21</sup>

### 2.1.1. Polifenoli u listu masline

Mješavina lišća i grana je otpad koji nastaje kao produkt obrezivanja i čišćenja maslina.



Slika 6. Lišće masline.

Kemijski sastav lista, pa tako i udio polifenolnih spojeva, masline različit je s obzirom na podrijetlo, klimatske uvijete, sadržaj vlage, skladišne uvijete. U usporedbi s ostatkom masline, lišće sadrži više polifenolnih spojeva<sup>22</sup> te ima veću antioksidativnu moć.<sup>23</sup>

U lišću masline prisutno je 5 različitih fenolnih skupina:<sup>4, 22</sup>

- oleuropeidi: oleuropein i verbaskosid
- flavoni: luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin i diosmetin
- flavonoli: rutin
- flavan-3-oli: katehin
- substituirani fenoli: tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska kiselina i kafeinska kiselina.

Najviše ima oleuropeina, zatim slijede hidroksitirozol, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid i verbaskosid.<sup>4</sup>

### **2.1.2. Primjena polifenola u zdravstvu i kozmetici**

Hidroksitirozol je polifenolni spoj koji se nalazi u maslini. Smatra ga se najmoćnijim antioksidansom nakon galne kiseline, a jedan je od najmoćnijih antioksidansa u maslini te ga slijede oleuropein, kafein i tirozol. Zbog svoje molekulske strukture ima nekoliko povoljnih utjecaja na ljudsko zdravlje kao što su antioksidacijsko, protuupalno, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. Istražuje se njegova potencijalna primjena kod dijabetesa i osteroporoze te oftamoloških, dermatoloških, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti.<sup>24</sup>

Oleuropein je polifenolni spoj koje se nalazi u maslinovom lišću i plodu. Ima različite povoljne utjecaje na ljudsko zdravlje. Pokazuje protuupalnu, antioksidativnu i antikancerogenu ulogu. Prema istraživanjima, može biti koristan kod snižavanja krvnog tlaka te kardioloških i nauroloških bolesti.<sup>25</sup>

Rezveratrol je polifenol koji se nalazi u crnom grožđu i crnom vinu, bobičastom voću, kikirikiju i japanskom dvorniku. Koristi se u kozmetičkoj industriji kao aktivni sastojak s antioksidativnim i protuupalnim svojstvima.

Rutin je spoj koji se nalazi u kori jabuka, crnom i zelenom čaju, šparogama, luku i većini agruma. Moguća primjena rutina u zdravstvu istražuje se zbog njegove mogućnosti da poboljša cirkulaciju i ojača krvne žile. Također istražuje se utjecaj na moguću prevenciju nastajanja krvnih ugrušaka i sprječavanje kardiovaskularnih bolesti.<sup>26</sup>

Katehini su polifenolni spojevi koji se nalaze u različitoj hrani i biljkama kao što su čaj, jabuke, kaki, kakao, grožđe i bobičasto voće.<sup>27</sup> Istraživanja pokazuju povoljan utjecaj katehina na prevenciju i liječenje kroničnih bolesti kao što je upalna crijevna bolest zahvaljujući antioksidativnim i protuupalnim svojstvima.<sup>28</sup>

Potencijalna primjena polifenolnih spojeva u zdravstvene svrhe se još uvijek istražuje. Iako neka klinička istraživanja potvrđuju pozitivan utjecaj polifenola na zdravlje, druga ih opovrgavaju. Za očekivati je da će daljnja istraživanja u ovom području, zbog rastućeg interesa za farmakološko iskorištavanje biljaka, doprinijeti boljem razumijevanju učinaka polifenolnih spojeva na zdravlje i njihovoj primjeni u zdravstvu, kozmetici i farmaciji.<sup>29</sup>

## **2.2. Ekstrakcija**

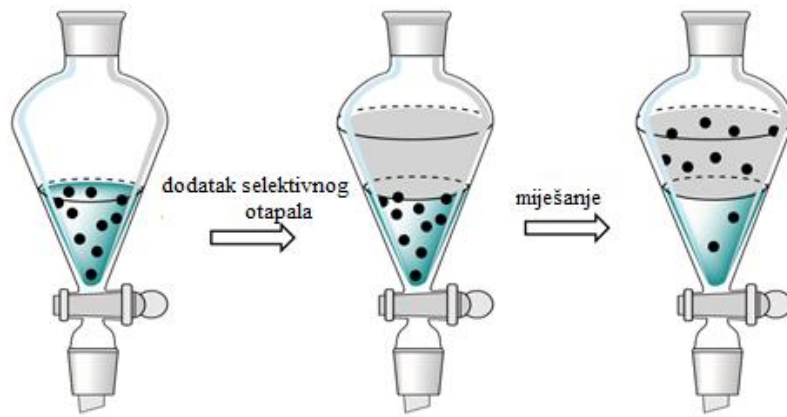
Bioaktivne komponente poput polifenola iz biljaka se izdvajaju procesom ekstrakcije. Polifenoli se mogu ekstrahirati iz svježih, zaleđenih ili osušenih biljnih uzoraka.<sup>30</sup>

Ekstrakcija je ravnotežni separacijski proces izdvajanja jedne ili više tvari iz smjese, a zasniva se na različitoj topljivosti tvari u selektivnom otapalu. Proces ekstrakcije dijeli se na:

- ekstrakciju kapljevina- kapljevina
- ekstrakciju čvrsto- kapljevina (izluživanje)<sup>31</sup>

Izluživanje je postupak izdvajanja topljive tvari iz krutine pomoću kapljevine u kojoj je ta tvar topljiva.<sup>32</sup>

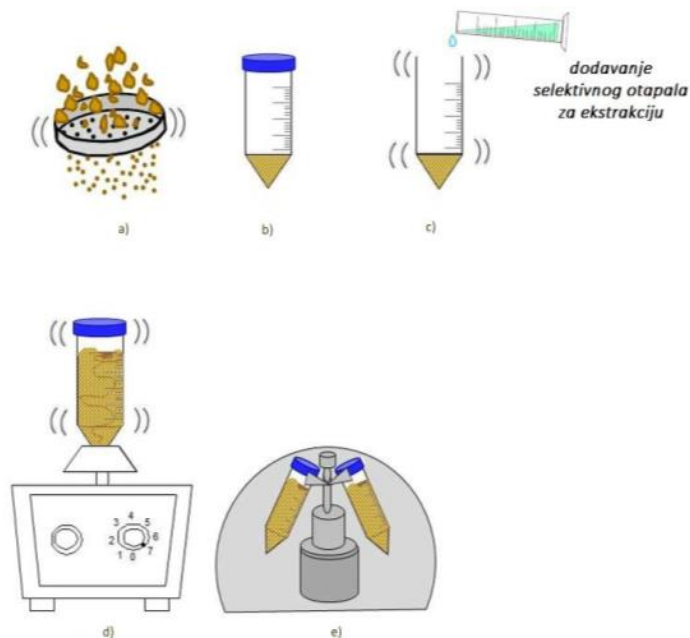
Ekstrakcija kapljevina - kapljevina je postupak izdvajanja otopljene tvari iz otopine s pomoću selektivnog otapala. Otopljena tvar se raspodjeljuje između dvije međusobno nemješljive kapljevine, otopine i selektivnog otapala. Faza koja je nakon postupka ekstrakcije obogaćena s tvari koja se ekstrahira naziva se ekstrakt, a faza koja je osiromašena tom tvari rafinat. Prijenos tvari odvija se difuzijom otopljene tvari kroz faznu granicu.<sup>33</sup>



Slika 7. Ekstrakcija kapljevina- kapljevina.<sup>34</sup>

Na učinkovitost ekstrakcije utječu nekoliko faktora kao što su selektivno otapalo, koncentracija ključne komponente u pojnoj smjesi, temperatura, vrijeme kontakta, miješanje. Proces ekstrakcije se izvodi u laboratoriju i u industriji. Ekstrakcija se može provoditi kontinuirano ili diskontinuirano, jednostupanjevito ili višestupanjevito, istostrujno ili protustrujno.<sup>33</sup>

### 2.2.1. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito (izluživanje)



Slika 8. Ekstrakcija čvrsto- kapljevito.



Mehanizam ekstrakcije čvrsto- kapljevito se odvija u nekoliko koraka (slika 8)<sup>35</sup>:

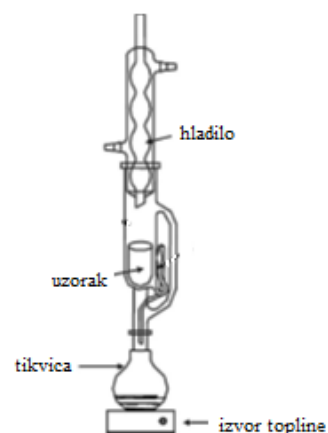
- priprema čvrste tvari (usitnjavanje, mrvljenje) kako bi se povećala međufazna površina
- priprema i dodavanje selektivnog otapala
- miješanje selektivnog otapala i čvrste tvari
- otapanje ključne komponente
- separacija faza
- uklanjanje selektivnog otapala iz ekstrakta

Kod procesa ekstrakcije iz biljnih materijala cilj je odvojiti djelatnu tvar iz stanične strukture difuzijom ili kidanjem biljne stijenke. Ekstrakcijske tehnike izluživanja mogu se podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne. Konvencionalne ekstrakcijske tehnike su Soxhlet ekstrakcija, maceracija i perkolacija. Neke od nekonvencionalnih ekstrakcijskih tehnika su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta enzimima i ekstrakcija kapljevinom pod tlakom (eng. *pressurized liquid extraction*).<sup>36</sup>

Maceracija je šaržni postupak ekstrakcije kod kojeg su usitnjeni biljni materijal i otapalo u kontaktu tri dana na sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje.

Perkolacija je postupak koji se provodi tako što se usitnjeni biljni materijal najprije navlaži otapalom, a zatim otapalo struji kroz usitnjeni biljni materijal.

Soxhlet ekstrakcija odvija se na povišenim temperaturama. Otapalo se zagrijava u tikvici, pare otapala kondenziraju u hladilu te kapaju na usitnjeni biljni materijal iz kojeg se ekstrahira.



### *Slika 9. Soxhlet ekstraktor.*<sup>37</sup>

Ultrazvučna ekstrakcija uključuje upotrebu ultrazvuka frekvencije od 20 kHz do 2000 kHz čime se povećava permeabilnost stanične stjenke.<sup>38</sup>

Ekstrakcija kapljevinom pod tlakom je ekstrakcijska tehnika koja se izvodi pod povišenim tlakom i temperaturom. Primjenom povišenog tlak moguće je održati kapljevito stanje selektivnog otapala iznad njegove temperature vrenja pri normalnim uvjetima. Provođenje ekstrakcije na povišenoj temperaturi uzrokuje povećanje prijenosa tvari i topljivosti ključne komponente čime se vrijeme ekstrakcije i potrošnja otapala smanjuju. Ova ekstrakcijska tehnika se sve više primjenjuje za ekstrakciju iz biljnih materijala.<sup>39</sup>

#### **2.2.2. Otapala za ekstrakciju**

Izbor otapala za proces ekstrakcije od izuzetnog je značaja te otapalo treba zadovoljiti određene kriterije. Kriteriji su:<sup>31</sup>

- dobra topljivost ključne komponente
- selektivnost
- jednostavna regeneracija
- ne smije se miješati s otopinom
- velika razlika gustoća
- odgovarajuća površinska napetost
- niski tlak para
- mala viskoznost
- toplinska i kemijska stabilnost
- jeftino, dostupno, netoksično i nezapaljivo

Konvencionalan otapala poput metanola, etanola, etil-acetata ili propanola imaju odličnu sposobnost ekstrakcije polifenolnih spojeva, ali zbog toga što nisu biorazgradiva, imaju niski tlak para, zapaljiva su i toksična ne zadovoljavaju kriterije zelene kemije.<sup>40</sup>

Novija istraživanja se orijentiraju dizajnu novih prihvatljivijih otapala, odnosno zelenih otapala. Da bi se otapalo moglo smatrati zelenim mora zadovoljiti nekoliko kriterija kao na primjer: dostupnost, netoksičnost, niska cijena, biorazgradivost, ponovna uporaba. S tim

ciljem razvijena su nova otapala: superkritični fluidi, ionske kapljevine i niskotemperaturna eutektička otapala.<sup>41</sup>

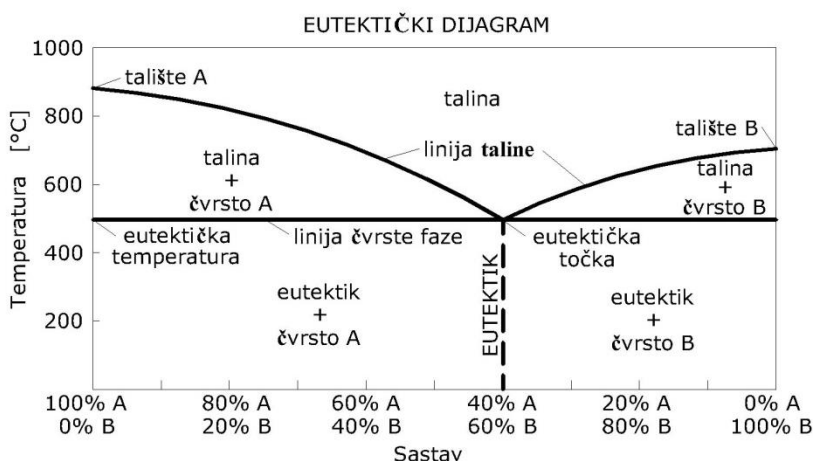
Superkritični fluidi imaju uski raspon molekula koje mogu otopiti. Također, cijena opreme da bi se postigli i održali superkritični uvjeti je visoka te stoga ne zadovoljavaju principe zelene kemije.<sup>40</sup>

Ionske kapljevine su prva sintetizirana višemolekularna otapala. Sastoje se od organskog kationa i različitih aniona te imaju široki raspon različitih fizikalnih svojstava (npr. vrelište, topljivost, viskoznost, gustoća). Kriterije zelene kemije zadovoljavaju zbog niskog tlaka para i visokog vrelišta. Zbog toksičnosti, slabe biorazgradivosti, visoke cijene i neekološke sinteze ne može ih se smatrati zelenim otapalima. te kriterije osporavaju.<sup>40</sup>

Niskotemperaturna eutektička otapala imaju slična fizikalna svojstva ionskim kapljevinama, ali njihova sinteza je jednostavnija i jeftinija.<sup>42</sup>

### 2.3. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturno eutektičko otapalo definira se kao smjesa sigurnih i jeftinih komponenata povezanih vodikovom vezom.<sup>41</sup> Eutektik je otopina sastavljena od dvije ili više komponente koja ima niže talište nego čiste komponente od kojih je sastavljeno. Eutektička točka je najniža temperatura pri kojoj eutektička otopina može postojati u kapljevitoy fazi i u kojoj čvrsta i kapljevita faza imaju jednak sastav.<sup>43</sup> Delokalizacija naboja koja nastaje uslijed formiranja vodikove veze uzrokuje niže talište mješavine nego tališta čistih komponenata.<sup>42</sup>



Slika 10. Fazni dijagram.

Sinteza niskotemperaturnih eutektičkih otapala provodi se iz Lewis-ovih ili Brønsted-ovih kiselina i baza te sadrži raznovrsne anionske i kationske dijelove. Opća formula DES-a glasi:  $Cat^+X^-zY$ , gdje je  $Cat^+$  amonij, fosfonij ili sulfonij kation,  $X^-$  je Lewisova baza (uobičajeno halogeni anion),  $Y$  je Lewis-ova ili Brønsted-ova kiselina, a  $z$  se odnosi na broj  $Y$  molekula koje su u interakciji s anionom. Kompleksirajući agens se formira između  $X^-$  i  $Y$ . Prema kompleksirajućem agensu DES-ovi se dijele na četiri tipa. U tip I spadaju DES-ovi pripremljeni od metalnih halogenida i kvaterne amonijeve soli. Zbog limitiranog broja nehidratiziranih metalnih halogenida koji mogu tvoriti DES s prikladno niskim talištem razvijen je tip II. DES-ovi tipa II pripremljeni su od hidratiziranih metalnih halogenida i kolin klorida. U tip III spadaju DES-ovi pripremljeni od kolin klorida i donora vodikove veze. Zbog širokog raspona donora vodikove veze koji se mogu upotrebljavati ovaj tip DES-a se lako može prilagoditi za različitu upotrebu (npr. uklanjanje glicerola iz biodizela, sintezu derivata celuloze, obradu metalnih oksida). U tip IV pripadaju DES-ovi pripremljeni od metalnih halogenida i prijelaznih metala. U tablici 1. prikazane su opće formule svakog tipa.<sup>42</sup>

Tablica 1. Opće formule tip I, II, III i IV DES-a.

Tip	Opća formula	
tip I	$Cat^+X^-zMCl_x$	$M=Zn,Sn, Fe, Al, Ga, In$
tip II	$Cat^+X^-zMCl_x \cdot yH_2O$	$M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe$
tip III	$Cat^+X^-zRZ$	$Z = CONH_2, COOH, OH$
tip IV	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1}^+ \cdot RZ + MCl_{x+1}^-$	$M = Al, Zn; Z = CONH_2, OH$

Prema komponentama od kojih se DES sintetizira moguće je izvesti dvije podvrste- prirodna niskotemperaturna eutektička otapala i terapijska niskotemperaturna eutektička otapala.

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. natural deep eutectic solvents, skraćeno NADES) sastoje se od prirodnih komponenata, uglavnom primarnih metabolita kao što su organske kiseline, šećeri i amino kiseline.<sup>44</sup>

Terapijska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. therapeutic deep eutectic solvents, skraćeno THEDES) su bioaktivni eutektički sustav kojima je jedna od komponenti aktivna farmaceutska tvar. THEDES-om se smatraju i bioaktivne komponente otopljene u DES-u.<sup>45</sup>

### 2.3.1. Svojstva DES-a<sup>41</sup>

Zhang i suradnici su radi boljeg razumijevanja DES-a, njihove sinteze i primjene, istraživali fizikalna svojstva kao što su ledište, gustoća, viskoznost, ionska provodnosti i površinska napetost.

- Ledište

Točka ledišta svih poznatih DES-ova je ispod 150°C, međutim broj DES-ova koji su u kapljevitom stanju na sobnoj temperaturi je još uvijek mali. Abbott i suradnici su istražujući svojstva DES-ova zaključili da ledište ovisi o energiji kristalne rešetke otapala, međudjelovanju komponenata i o promjeni entropije.

- Gustoća

Jedno od najvažnijih fizikalnih svojstava otapala je gustoća. Većina uobičajenih DES-ova ima gustoću veću od vode.

- Viskoznost

Većina DES-ova ima veliku viskoznost na sobnoj temperaturi, povišenjem temperature viskoznost se smanjuje. Velika viskoznost na sobnoj temperaturi se objašnjava postojanjem međumolekularnih vodikovih veza koje uzrokuju smanjenu pokretljivost molekula. Razvoj niskotemperaturnih eutektičkih otapala niske viskoznosti je od velikog interesa zbog njihove primjene kao zelenih otapala. Viskoznost DES-a ovisi o komponentama, temperaturi i udjelu vode.

- Ionska provodnost

Većina DES-a pokazuje slabu ionsku provodnost zahvaljujući velikoj viskoznosti. Povišenjem temperature ionska provodnost raste zbog smanjenja viskoznosti.

- Površinska napetost

Površinska napetost DES-a nije još istražena. Očekivano je da slijedi trend viskoznosti jer strogo ovisi o jakosti međumolekulskih veza.

### 2.3.1.2. Polimerni eutektički sustavi

Zadnjih godina istražuje se priprava niskotemperaturnih eutektičkih sustava korištenjem polimera.

Jedan način pripreve je upotreba niskotemperaturnog eutektičkog otapala (THEDES) kao glavnog sastojka, a polimer služi kao modifikator ili nosač. Primjena polimernih eutektičkih sustava je raznovrsna. Tuntarawongsa i Phaechamud prvi su opisali korištenje polimernih eutektičkih sustava za kontroliranu dostavu aktivnih tvari. Prema istraživanjima, dodatak polimera u eutektičko otapalo moguće je formirati gel ili kapljevinu, 3D strukturu i enkapsulirati THEDES u polimernim vlaknima.<sup>45</sup>

Drugi način sinteze polimernih eutektičkih sustava je polimerizacijom niskotemperaturnog eutektičkog otapala koji se smatra monomerom. Ovako priređena otapala mogu se koristiti u procesu separacije.<sup>46</sup>

### 2.3.2. Primjena DES-a u kozmetici



*Sika 11.* Kozmetički proizvodi.

Svjetska proizvodnja kozmetičkih proizvoda raste za 4,5% godišnje zadnjih 20 godina. Porastom potrošnje kozmetičkih proizvoda, njihov mogući štetan utjecaj postaje ozbiljan

problem. Do negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje može doći zbog toksičnih i štetnih sastojaka te je zbog toga bitno poznavati sastojke i sastav kozmetičkih proizvoda. Ako ruž ili sjajilo za usne u svom sastavu imaju toksične metale moguće je da će imati štetni utjecaj na lice. Područje oko oka, na koje se na svakodnevnoj bazi nanose maskara i sjenila, je meko i osjetljivo te može apsorbirati toksične sastojke te uzrokovati iritacije i alergije. Zbog toga je nečistoće potrebno ukloniti ako je ikako moguće.<sup>47</sup>

Jedni od čestih toksina u sastavu kozmetičkih proizvoda su kadmij (Cd) i olovo (Pb). Olovo u sastavu kozmetičkih proizvoda objašnjava se činjenicom da neki pigmenti po prirodi sadrže olovo ili olovo može biti namjerno dodano prilikom pripreve proizvoda. Upotreba sjenila bogatog olovom povezana je s visokom razinom olova u krvi. Prisutnost kadmija u puderu i ruževima dokazala su brojna istraživanja. Kadmijevi spojevi koriste se kao pigmenti koji daju spektar boja od tamno žute do narančaste. Uslijed dermalnog izlaganja kadmijevim spojevima dolazi do formiranja kompleksnih spojeva s tiolima, karboksilnim kiselinama i aminima proteina što može uzrokovati razne bolesti koje rezultiraju oštećenjem pa čak i smrti stanice. Kako bi se štetan utjecaj na ljudsko zdravlje uzrokovan kozmetikom minimalizirao potrebno je odrediti količinu teških metala u kozmetici i osmisлити proizvodnju koja isključuje toksične metale iz kozmetičkih proizvoda.<sup>47</sup>

Kazi i suradnici su istraživali sadržaj toksičnih metala u kozmetici procesom ultrazvučne ekstrakcije korištenjem DES-a zbog njegovih prednosti u odnosu na ionske kapljavine.<sup>47</sup>

Osim primjene DES-a kako bi se poboljšao proces proizvodnje kozmetike, moguće je niskotemperaturna eutektička otapala koristiti kao sastojke kozmetičkih proizvoda. Spojevi koji se koriste za sintezu DES-a za primjenu u kozmetičkoj industriji moraju biti dopušteni od strane Europske komisije (2006.). Neki spojevi, kao npr. kolin klorid koji je čest sastojak DES-a je naveden kao zabranjeni spoj za primjenu u kozmetičkoj industriji. U komponente koje su dopuštene za upotrebu u kozmetičkoj industriji ubrajaju se šećeri (maltoza, fruktoza, surkoza, glukoza, galaktoza), betain, urea i alkoholni šećeri (sorbitol, glicerol, ksilitol, maltitol). Uobičajeno, ove se komponente koriste za hidrataciju i/ ili kondicioniranje u kozmetičkim proizvodima.<sup>48</sup>

Jeong i suradnici su sintetizirali DES iz betaina, glicerola i glukoze (komponente dopuštene za primjenu u kozmetici). Tako sintetizirani DES koristili su kao otapalo u procesu ekstrakcije polifenola iz zelenog čaja. Dobiveni ekstrakt je bi se zbog svog sastava i stabilnosti polifenola mogao koristiti u kozmetičkoj industriji. Također, korištenjem ovog DES-a dobiveno je bolje

iskorištenje procesa u usporedbi s ekstrakcijom korištenjem vode, organskih otapala ili drugih DES-ova.<sup>48</sup>

### 2.3.3. Toksičnost DES-a

Toksičnost DES-a prema živim organizmima kao što su mikroorganizmi, biljke i životinje, mijenja se ovisno o sastavu i koncentraciji DES-a. Mehanizam toksičnosti DES-a još uvijek nije dovoljno ispitan zbog velikog broja mogućih otapala. Dosadašnja istraživanja mehanizam toksičnosti opisuju posljedicama:<sup>49</sup>

- interakcije sa staničnom membranom: DES može penetrirati u stanicu ili se akumulirati/agregirati na staničnoj površini što uzrokuje narušavanje stanične stjenke, oštećenje proteina i enzima i konačno smrt stanice
- delokalizacijom naboja: DES pokazuje veću toksičnost nego što je toksičnost individualnih komponenti
- pH: DES-ovi koji sadrže kiseline pokazuju veću toksičnost
- kompatibilnost sa staničnim metabolizmom: manja toksičnost kada su komponente esencijalni sastojci uključeni u stanični metabolizam
- proizvodnje reaktivnog kisika koja može dovesti do apoptoze
- djelovanja kao dehidrationski agens uzrokujući inaktivaciju stanice.

#### 2.3.3.1. mtk-QSTR model

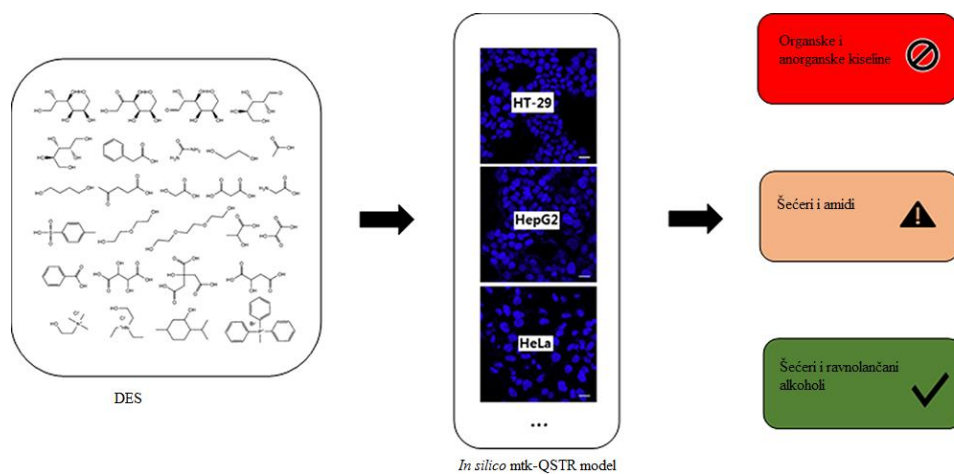
Halder i suradnici razvili su *in silico* pristup za procjenu toksičnosti. *In silico* pristup je u zadnjih par desetljeća stekao golemu pažnju zato što omogućava brzu i preciznu identifikaciju potencijalno opasnih kemikalija čime se smanjuju troškovi i eksperimentalni naponi. Korišteni *in silico* model je multitasking- *Quantitative Structure Toxicity Relationships* (mtk-QSTR).

Za razliku od konvencionalnog QSTR modela, mtk-QSTR model omogućava uključivanje višestrukih uvjeta ispitivanja i bioloških vrsta, ali i mnogih drugih parametara.

Istraživanjem su otkrili da su najmanje toksični donori vodikove veze: saharoza, ksilitol, glicerol i sorbitol. Nakon njih slijede acetamid, etilen glikol, urea, dietilen glikol, mliječna kiselina, glicin i 1,4-butandiol. Oksalna kiselina, fenilacetatna kiselina, cink klorid, benzojeva kiselina, limunska kiselina, vinska kiselina, jabučna kiselina, malonska kiselina, p-



toluensulfonska kiselina, glikolna kiselina, levulinska kiselina i octena kiselina pokazuju najveći doprinos toksičnosti DES-a.<sup>50</sup>



Slika 12. mtk-QSTR.

#### 2.3.4. Stabilnost polifenola u DES-u

U svrhu ispitivanja stabilizacijske sposobnosti DES-a za prirodne spojeve (kao što su polifenoli) provedeno je nekoliko istraživanja, pretežno vezana za prirodna niskotemperaturna eutektička otapala. Razumijevanje stabilnosti različitih spojeva otopljenih u NADES-u je od velike važnosti za primjenu NADES-a u različitim procesima prerade prirodnih proizvoda. Veliki potencijal kao stabilizacijski medij NADES ima zahvaljujući jedinstvenim fiziokemijskim svojstvima.<sup>51</sup>

Dai i suradnici ispitali su stabilnost polifenola ekstrahiranih iz suncokreta korištenjem različitih NADES-a (glukoza-kolin klorid, surkoza- kolin klorid, prolin- malična kiselina, mliječna kiselina- glukoza, ksilitol- kloinklorid), vode i 40% etanola kao otapala te su zaključili da NADES ima bolju stabilizacijsku moć u odnosu na druga, uobičajena otapala (voda i 40% etanol). Razlog tomu je što NADES na bazi šećera, s malim udjelom vode, ima visoku viskoznost što omogućava stabilne molekulske interakcije. Bolja stabilizacijska moć NADES-a rezultat je nastajanja vodikovih veza između otopljene tvari i molekula otapala.<sup>51</sup>

Daljnja istraživanja stabilnosti različitih otopljenih tvari u (NA)DES-u osim što će pomoći u razumijevanju mehanizma stabilnosti, dovest će i do nove primjene (NA)DES-a u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.<sup>51</sup>

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Svrha rada

Svrha ovog rada je odabrati najbolje otapalo za provedbu ekstrakcije polifenolnih spojeva iz lista masline. Odrediti utjecaj vode u otapalu i vremena miješanja na djelotvornost ekstrakcije. Provjeriti mikrobiološku aktivnost dobivenog ekstrakta kako bi se ispitalo je li primjenjiv u kozmetičkoj industriji.

### 3.2. Lišće masline

#### 3.2.1. Priprema lišća

Lišće masline korišteno u ovom istraživanju, podrijetlom je s otoka Ugljana. Vrsta masline je oblica, a prikupljeno je u ožujku 2020 godine. Lišće se sušilo na sobnoj temperaturi 30 dana, nakon čega se usitnilo. Za usitnjavanje lišća korišten je električni mlin, a usitnjavalo se 2 minute. Tako pripremljeni uzorak se prosijava se 3 minute na tresilici *Retsch AS200* kroz sita promjera očica 800  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonili zaostali neusitnjeni komadi. Koraci pripreme lišća prikazani su na slici 13.



*Slika 13.* Koraci pripreme lišća.

#### 3.2.2. Karakterizacija lišća

Karakterizacija lišća provedena je na reprezentativnom uzorku. Reprezentativni uzorak je uzorak koji se dobije četvrtanjem. Četvrtanje je postupak poduzorkovanja početnoga uzorka koji se dobro izmiješa, oblikuje u stožac, zatim dijeli na četvrtine. Dvije suprotne četvrtine se

odbacuju, a postupak se ponavlja dok se ne dobije potrebna količina uzorka za analizu ili karakterizaciju.



*Slika 14. Četvrtanje uzorka.*

### **3.2.2.1. Raspodjela veličina čestica**

Za određivanje raspodjele veličina čestica lišća koristi se metoda laserske difrakcije primjenom uređaja SALD-3101 (*Shimadzu*, Japan). Mjerno područje uređaja je u rasponu od 0,4 do 3000  $\mu\text{m}$ . Rezultat mjerenja prikazan je grafički kao diferencijalna funkcija raspodjele, slika 23.



*Slika 15. SALD-3101 (Shimadzu, Japan).*

### 3.2.2.2. Gustoća lišća

Za izračun gustoće lišća koristi se Albert-Bogsova metoda. Metoda je osjetljiva na promjenu temperature te ju je potrebno izvoditi u prostoriji s ujednačenom temperaturom. Prazna tikvica od 25 mL, odnosno piknometar, se važe te se puni reprezentativnim uzorakom lišća do najviše trećine svog volumena i ponovno važe. Piknometar se puni *p*-ksilenom do 3-5 mm iznad razine lišća te se protresa kako bi se istisnuo zrak. Zatim se piknometar puni do oznake i bilježi se utrošak *p*-ksilena.



Slika 16. Albert- Bogsova metoda.

Formula za izračun:

$$\rho = \frac{m(\text{lišće})}{V(\text{piknometar}) - V(\text{dodani pksilen})}$$

## 3.3. Otapalo

### 3.3.1. Priprema otapala

Kako bi se pripremilo i izabralo optimalno otapalo pripremljeno je 58 kombinacija različitih kemikalija (tablica 4). Svaka od kombinacija miješana je 1 h na magnetskoj miješalici uz zagrijavanje. U tablici 2 prikazane su kemikalije korištene za sintezu otapala.

Tablica 2. Kemikalije korištene za sintezu otapala.

Kemikalija	Skraćenica	M, g mol <sup>-1</sup>
Tetrabutilamonij bromid	TBAB	322,36
D-Fruktoza	FRU	180,16
Laktoza monohidrat	LAK	360,31
Maltoza monohidrat	MAL	360,32
Mliječna kiselina	MLI	90,08
D-sorbitol	SORB	182,17
D(+) saharoza	SAH	342,30
Betain	BET	117,15
L(+) vinska kiselina	VIN	150,09
Voda	H <sub>2</sub> O	18,02
Polipropilen glikol	PPG	425,00
Polivinil alkohol	PVA	18,36
Polietilen glikol	PEG	18,90
Polietilen glikol (20)	PEG (20)	21,58
Polietilen glikol, s	PEG, s	4000,00

U sustavima u kojima je jedna kemikalija šećer (D-fruktoza, laktoza monohidrat, maltoza monohidrat, D-sorbitol, D (+) saharoza, betain) temperatura se tijekom sinteze motri da ne prijeđe 60°C kako ne bi došlo do degradacije šećera.

PEG korišten u sintezi otapala se otapa u vodi i kao takav se primjenjuje u svim sintezama (iznimka sustav 6, tablica 4). Većina sinteza je provedena s otapalom nastalim otapanjem 5 g PEG-a u 100 g vode, iznimka je PEG (20) koji se odnosi na otopinu pripremljenu otapanjem 20 g PEG-a u 100 g vode. Otapanje je provedeno uz miješanje i zagrijavanje do 70°C.

PVA korišten u sintezi otapala se otapa u vodi. Otopina je pripravljena otapanjem 2 g PVA u 100 g vode, uz miješanje magnetskom miješalicom i zagrijavanje do 80°C.

Za pripremu otapala uglavnom su korištene dvije komponente, uz neke iznimke gdje je dodana i treća komponenta. Kao treća komponenta u neke je sustave dodana voda kako bi se poboljšala topljivost i međusobna mješljivost, ali i smanjili troškovi.

### 3.3.2. Karakterizacija otapala

Odabranom, otapalu određena su fizikalna svojstva: gustoća, viskoznost i pH pri sobnoj temperaturi. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

Tablica 3. Uređaji za određivanje fizikalnih svojstava

Fizikalno svojstvo	Uređaj/ Sonda
Gustoća	Mettler Toledo Densito 30PX
Viskoznost	Brookfield DV-III Ultra Programmable Rheometer
pH	WTW SenTix 81



Slika 17. Densitometar, reometar, pH sonda.

### 3.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija čvrsto–kapljevito, odnosno izluživanje provedena je uporabom magnetske miješalice na sobnoj temperaturi. U sustav je stavljeno 0,5 g reprezentativnog uzorka lišća i 10 g otapala.



*Slika 18.* Magnetska miješalica.

### **3.4.1. Utjecaj udjela vode i vremena miješanja**

Utjecaj udjela vode na djelotvornost ekstrakcije ispitana je u eksperimentima u kojima je otapalo pomiješano s 0, 10, 20, 30, 40 i 50 mas% vode. Tako dobiveni ekstrakti su analizirani i rezultati su prikazani grafički slika 34.

Utjecaj vremena miješanja na djelotvornost ekstrakcije je ispitan tako što je ekstrakcijski sustav uzorkovan i analiziran u određenim vremenskim intervalima. Na temelju rezultata, odnosno dobivenih ukupnih koncentracija polifenolnih spojeva određeno je optimalno vrijeme, slika 36.

### **3.4.2. Folin- Ciocalteau metoda**

Folin- Ciocalteavom metodom određena je koncentracija ukupnih polifenola nakon provedene ekstrakcije.

Standardnom Folin- Ciocalteau metoda spektrofotometrijski je određena ukupna koncentracija polifenolnih spojeva u ekstraktu lišća masline na UV/ Vis spektrofotometru Shimadzu UV-128. Metoda se temelji na mjerenju apsorbancije ekstrahiranog uzorka pri valnoj duljini koja odgovara maksimumu apsorbancije. Kvantitativno određena koncentracija polifenolnih spojeva se izražava preko ekvivalente koncentracije galne kiseline.



*Slika 19.* UV spektrofotometar, Shimadzu UV-128.

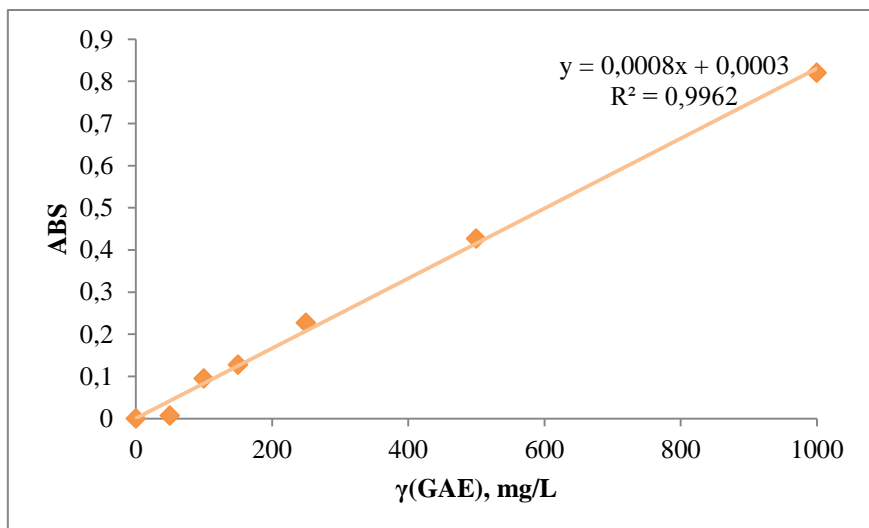
U odmjerne tikvice od 10 mL pipetira se 400  $\mu\text{L}$  Folin- Ciocalteau reagensa i 60  $\mu\text{L}$  filtriranog ekstrakta. Tako pripremljene tikvice se 8 minuta drže u mraku. Nakon 8 minuta, u tikvice se pipetira 4 mL 7 mas. % otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  te se razrijedi destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljene otopine poprimo karakteristično plavo obojenje čiji intenzitet ovisi o koncentraciji polifenolnih spojeva, što je otopina tamnija to je koncentracija polifenolnih spojeva veća. Tikvice s pripremljenim otopinama se omotaju aluminijskom folijom i termostatiraju 1 h na temperaturi od  $40^\circ\text{C}$ .



*Slika 20.* Karakteristično obojenje polifenolnih otopina.

Nakon termostatiranja, na spektrofotometru se mjeri intenzitet apsorbancije koji je direktno proporcionalan koncentraciji ukupnih fenola u uzorku, a koja je izražena preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline. Koncentracija ukupnih fenola u različitim uzorcima određena je iz baždarnog dijagrama.





*Slika 21.* Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih polifenola u uzorku.

### 3.5. Mikrobiološka analiza

Kako bi se odredila mikrobiološka aktivnost ispitana je prisutnost bakterija u uzorku metodom po Drigalskom.

0,1 mL uzoraka se nanosi na hranjivi agar u praznu Petrijevu zdjelicu te se homogenizira štapićem po Drigalskom kako bi se uzorak što bolje prenio na podlogu. Zatim slijedi inkubacija u vremenu od 24 do 48 h na 37°C.

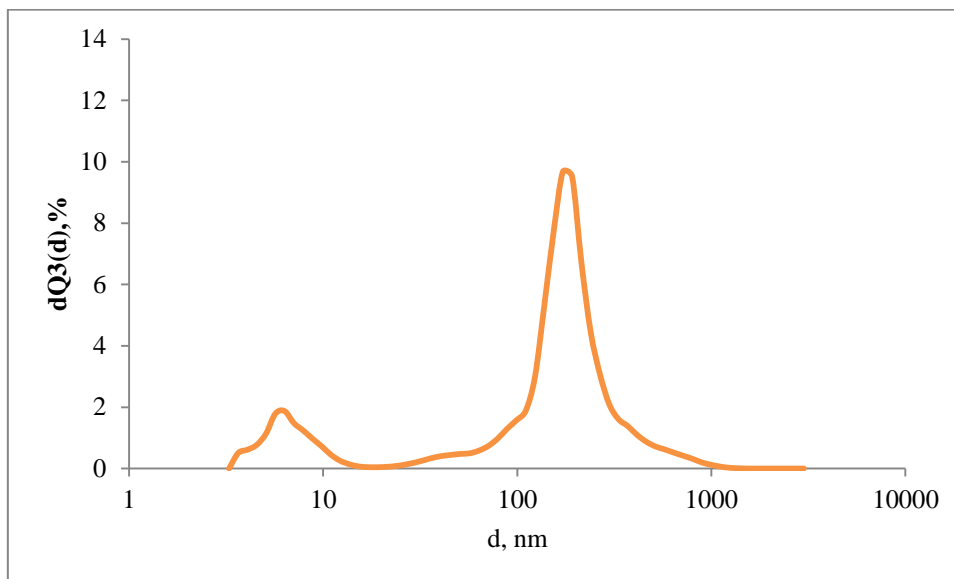


*Slika 22.* Metoda po Drigalskom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Karakterizacija lišća

#### 4.1.1. Raspodjela veličina čestica



Slika 23. Raspodjela veličina čestica lišća masline.

Iz prikaza raspodjele veličina čestica vidljivo je da je najveći udio čestica lišća masline u rasponu od 110 do 300 nm. Zbog različitih dijelova lišća i njihove različite strukture dolazi do razlika pri usitnjavanju pojedinih dijelova što može rezultirati višemodalnom raspodjelom kao što se vidi na slici 23.

#### 4.1.2. Gustoća lišća

Iz mase dodanog lišća i volumena dodanog *p*-ksilena određena je stvarna gustoća lišća.

$$m(\text{lišća}) = 1,5402 \text{ g}$$

$$V(\text{piknometar}) = 25 \text{ mL}$$

$$V(\text{dodani } p\text{-ksilen}) = 24 \text{ mL}$$

$$\rho = \frac{m(\text{lišće})}{V(\text{piknometar}) - V(\text{dodani } p\text{-ksilen})} = \frac{1,5402 \text{ g}}{25 \text{ mL} - 24 \text{ mL}} = 1,5402 \text{ g/mL}$$

Stvarna gustoća lišća iznosi 1540,2 kg/m<sup>3</sup>. Poznavanje gustoće važno je za predviđanje ponašanja praškastih materijala u procesu.

## 4.2. Odabir otapala

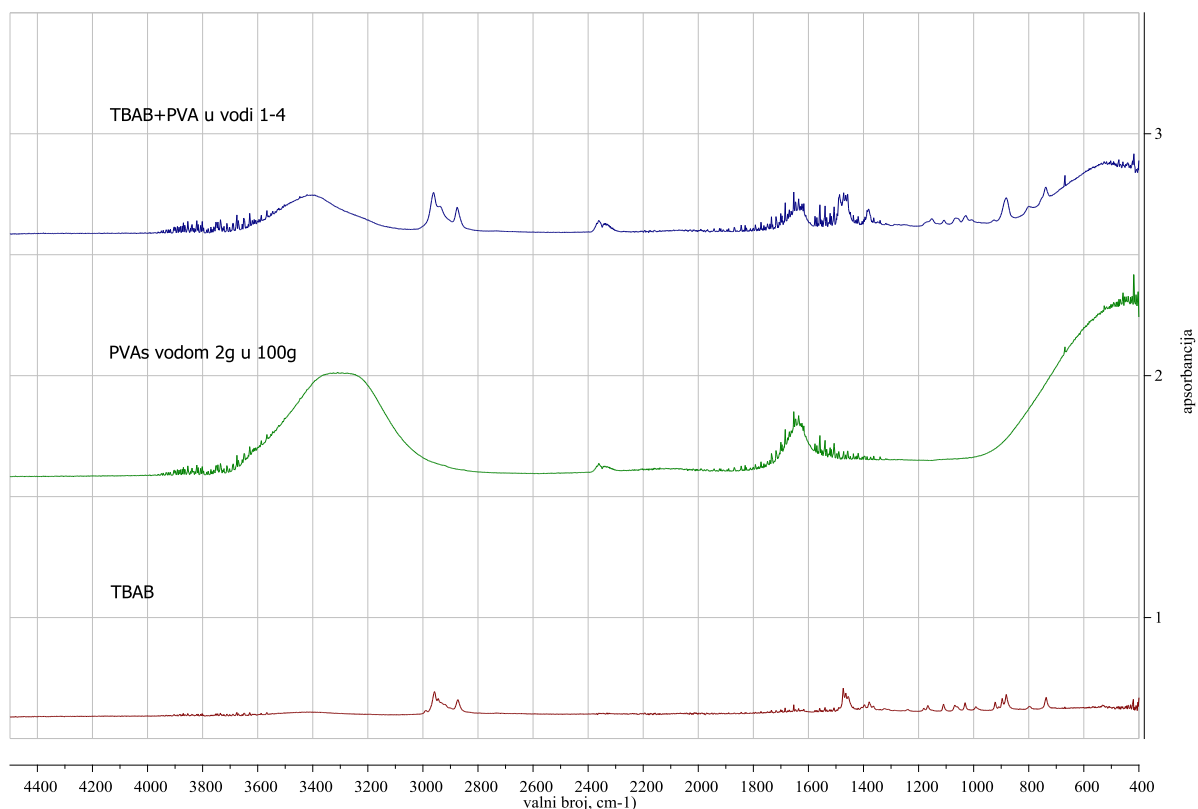
Tablica 4. Kombinacije komponenata za sintezu otapala.

	Komponenta			Molarni omjer	T/ °C	Komentar
	1	2	3			
1	TBAB	PPG	-	1:2	80	Prozirno žuta, viskozna otopina
2	TBAB	(mono)PG	-	1:2	80	Iskristaliziralo, bež kristali
3	TBAB	PVA	-	1:2	60	Na sobnoj T nakon nekog vremena iskristaliziralo, bijeli i svijetlo rozi kristali
4	TBAB	PVA	-	1:4	60	Prozirna, svijetlo roza otopina
5	TBAB	PEG	-	1:2	65	Na sobnoj T iskristaliziralo
6	TBAB	PEG, s	-	1:1	65	PEG nije prethodno otopljen u vodi, sustav se nije miješao
7	FRU	PPG	-	1:3	50	Nije se otopila sva fruktoza, mliječno bijele boje
8	FRU	PPG	-	1:4	60	Nije se otopila sva fruktoza, se nije otopila, mliječno bijele boje
9	FRU	PPG	H <sub>2</sub> O	1:4:24,60	50	Nije se otopila sva fruktoza
10	FRU	PPG	H <sub>2</sub> O	1:4:69,20	60	Fruktoza se otopila, ali otopina je mutna
11	FRU	PPG	H <sub>2</sub> O	1:4:11,53	60	Fruktoza se otopila, otopina je mutna
12	LAK	PPG	-	1:2	65	Nije se otopila laktoza
13	LAK	PEG	-	1:2	65	Nije se otopila laktoza
14	LAK	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:16,80	60	Nije se otopila laktoza
15	LAK	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:44,80	60	Nije se otopila sva laktoza
16	LAK	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:7,470	60	Nije se otopila laktoza
17	MAL	PPG	-	1:2	50	Nije se otopila sva maltoza
18	MAL	PEG	-	1:2	65	Nije se maltoza otopila
19	MAL	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:16,80	80	Svijetlo žuta, mutna otopina
20	MAL	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:44,80	60	Dvofazno
21	MAL	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:7,47	55	Maltoza se nije otopila
22	MLI	PPG	-	1:2	35	Prozirna otopina
23	MLI	PVA	-	1:2	35	Prozirna otopina
24	MLI	PEG	-	1:2	65	Prozirna otopina
25	MLI	PEG	-	1:4	60	Prozirna otopina
26	MLI	PEG	H <sub>2</sub> O	1:4:9,20	60	Prozirna otopina

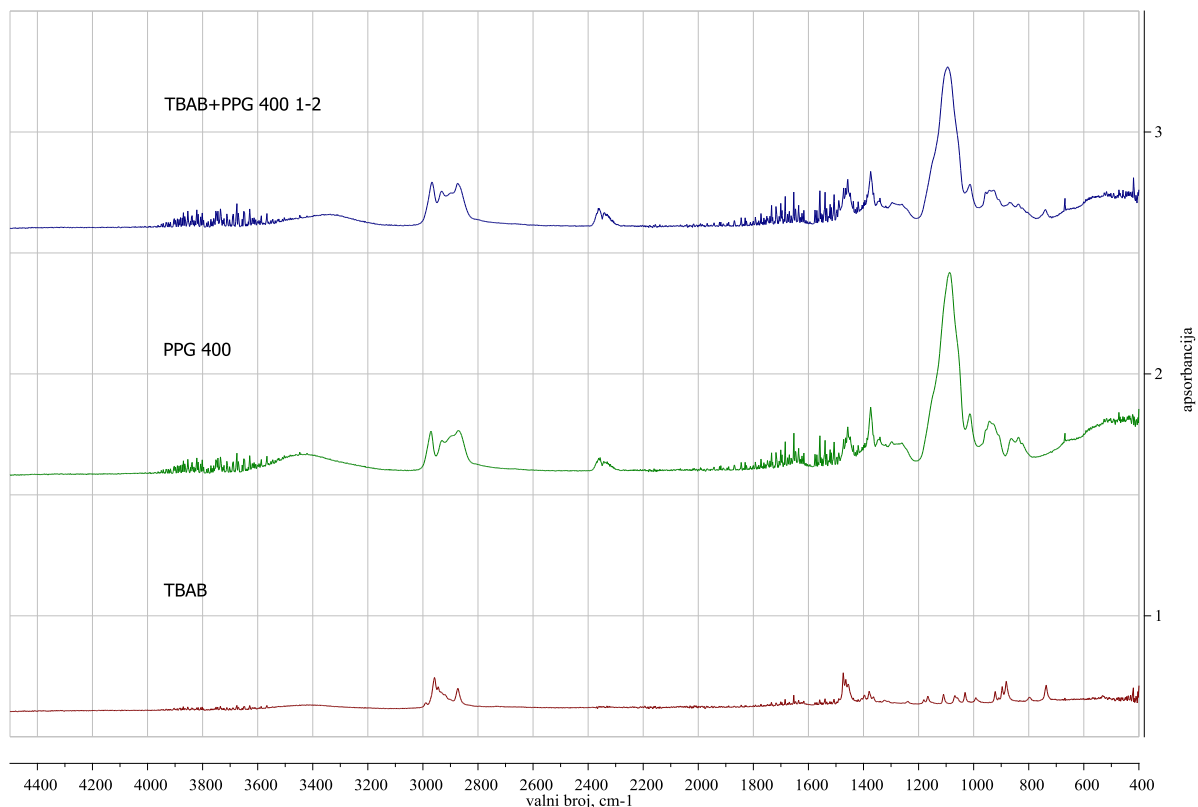
27	MLI	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:13	60	Prozirna otopina
28	MLI	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:34,80	60	Mutna otopina
29	MLI	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:5,80	60	Dvofazno
30	MLI	PEG(20)	-	1:2	60	Prozirna otopina
31	MLI	PEG(20)	H <sub>2</sub> O	1:2:7,40	60	Prozirna otopina
32	SORB	PPG	-	1:1	65	Nije se sorbitol otopio
33	SORB	PPG	-	1:2	65	Nije se sav sorbitol otopio
34	SORB	PPG	-	1:4	65	Nije se sorbitol otopio
35	SORB	PVA	-	1:4	60	Nije se sorbitol otopio
36	SORB	PPG	-	2:1	65	Dio sorbitola se otopio, mutno
37	SORB	PVA	-	1:1	65	Nije se sorbitol otopio
38	SORB	PEG	-	1:2	65	Jako vikožno
39	SORB	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:14,30	80	Mutno, možda dvofazno
40	SORB	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:38,20	60	Sorbitol se otopio, dvofazno
41	SORB	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:6,36	60	Sorbitol se otopio, otopina je mutna, možda se prisutne dvije faze
42	SAH	PPG	-	1:2	65	Nije se saharoza otopila
43	SAH	PPG	-	1:4	65	Nije se saharoza otopila
44	SAH	PPG	-	1:6	65	Dio saharoza se otopio
45	SAH	PPG	H <sub>2</sub> O	1:6:40	70	Saharoza se otopila, možda dvofazno.
46	SAH	PPG	H <sub>2</sub> O	1:6:107,1	60	Saharoza se otopila, otopina je mutna, dvofazni sustav.
47	SAH	PPG	H <sub>2</sub> O	1:6:17,85	60	Nije se saharoza otopila
48	BET	PPG	-	1:2	65	Dio betaina se otopio
49	BET	PVA	-	1:2	65	Dio betaina se otopio
50	BET	PVA	-	1:4	65	Otopio se sav betain, svijetlo roza otopina
51	BET	PVA	-	1:6	65	Nije se sav betain otopio
52	BET	PPG	H <sub>2</sub> O	1:2:6	60	Betain se otopio, otopina je mutna, uljasta
53	VIN	PPG	-	1:1	60	Vinska kiselina se nije sva otopila, nastao svijetlo žuti talog
54	VIN	PPG	-	1:2	60	Dio vinske kiseline se nije otopio
55	VIN	PVA	-	1:4	50	Dio vinske kiseline se nije otopio
56	VIN	PVA	-	1:6	65	Prozirna, svijetlo žuta otopina
57	VIN	PVA	-	1:8	65	Prozirna, svijetlo žuta otopina, manje viskozna od sustava 56
58	VIN	PPG	-	1:4	65	Prozirna otopina

Optimalno otapalo za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lišća masline je odabrano iz ispitivanja 58 različitih kombinacija komponenata prikazanih u tablici 4.

Kombinacija TBAB-a s PPG-om u molarnom omjeru 1:2 se pokazala uspješnom, dobiveno je otapalo koje se može dalje koristiti. Kombinacija TBAB-a s PVA-om u molarnom omjeru 1:4 je također uspješna, sintetizirano je otapalo, dok se miješanje TBAB i PVA u molarnom omjeru 1:2 nije pokazalo uspješnim zato jer su na sobnoj temperaturi, hlađenjem mješavine, nastali kristali. Miješanje TBAB i PEG-a u molarnom omjeru 1:2 nije rezultiralo sintezom otapala jer su u sustavu, nakon što se ohladio, nastali kristali. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je TBAB mješljiv s PPG-om (u molarnom omjeru 1:2) i s PVA (u molarnom omjeru 1:4). Iako su snimljeni FTIR apsorpcijski spektri za smjesu TBAB-PVA molnog omjera 1:4 te TBAB-PPG 1:2 te uspoređeni sa čistim komponentama. Budući da je relativno mala masa PVA otopljena u vodi (2g u 100 g), teško je, na osnovi samo FTIR analize, zaključiti je li nastao DES- ili se radi o smjesi otapala (slika 24). Na slici 25. prikazan je FTIR spektar za otapalo TBAB-PPG. Kako se spektri pojedinačnih komponenti preklapaju, teško je izvesti zaključak o nastanku DES-a.



Slika 24. FTIR spektri: TBAB:PVA 1:4, PVA i TBAB.



Slika 25. FTIR spektri: TBAB:PPG 1:2, PPG i TBAB.

FRU je za potrebe sinteze otapala miješana samo s PPG-om u molarnim omjerima 1:3 i 1:4 te se u takvim sustavima FRU ne otapa. Kako bi se povećala topljivost FRU u sustav FRU:PPG 1:4 je dodana voda. U sustavima s 10 i 40 mas% vode FRU se otopila, dok se u sustavu s 20 mas% vode FRU nije otopila zbog niže temperature prilikom miješanja.

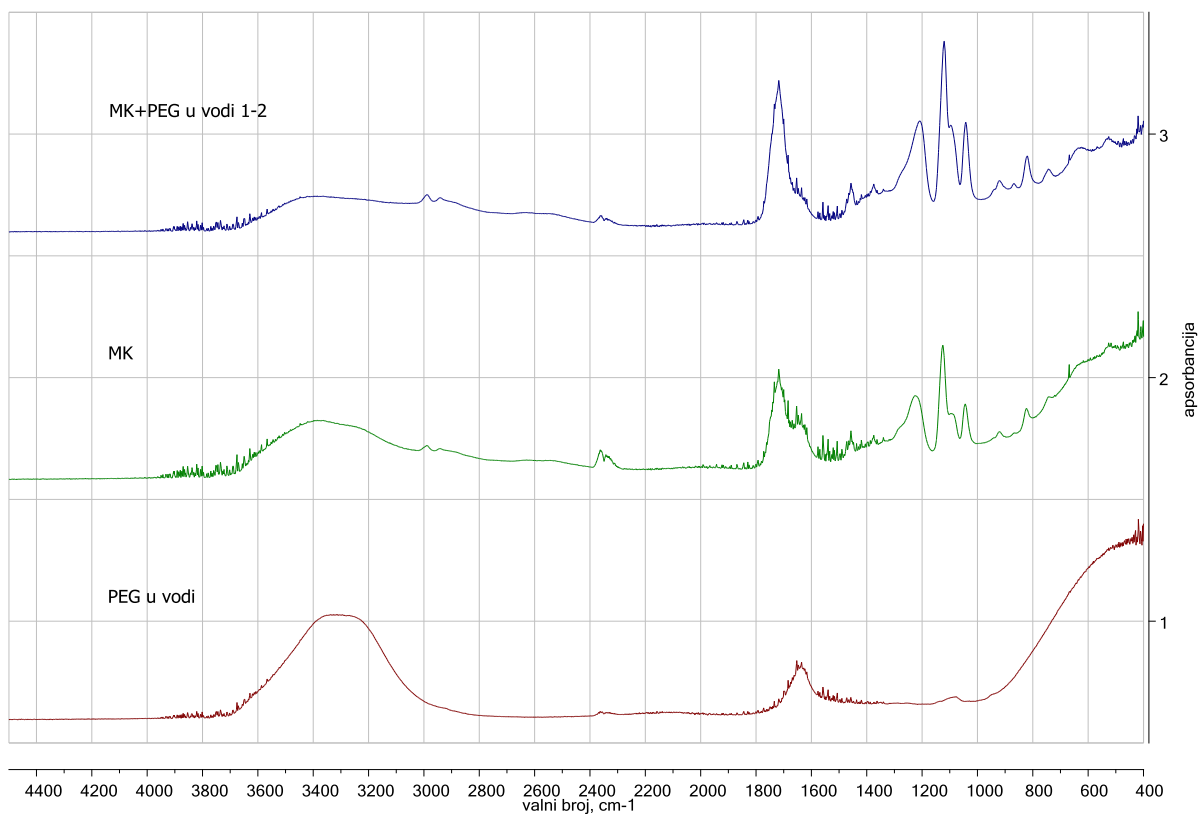
LAK je miješana s PPG-om u molarnom omjeru 1:2 nije se otopila. Kako bi se povećala topljivost LAK u sustav je dodano 10, 20 i 40 mas% vode. Dodatkom 40 mas% vode vidljivo je poboljšanje topljivosti LAK, ali se nije sva otopila. Može se zaključiti da kombinacija LAK, PPG-a i vode ne rezultiraju nastankom homogene smjese. Miješanjem LAK i PEG-a u molarnom omjeru 1:2, LAK se nije otopila.

Miješanjem MAL i PPG-a u molarnom omjeru 1:2 MAL nije otopila. Kako bi se poboljšala topljivost MAL u sustav je dodano 10, 20 i 40 mas% vode. Dodatak od 10 mas% vode nije rezultirao otapanjem MAL. U sustavu s 20 mas% vode MAL se otopila te je nastala mutna,

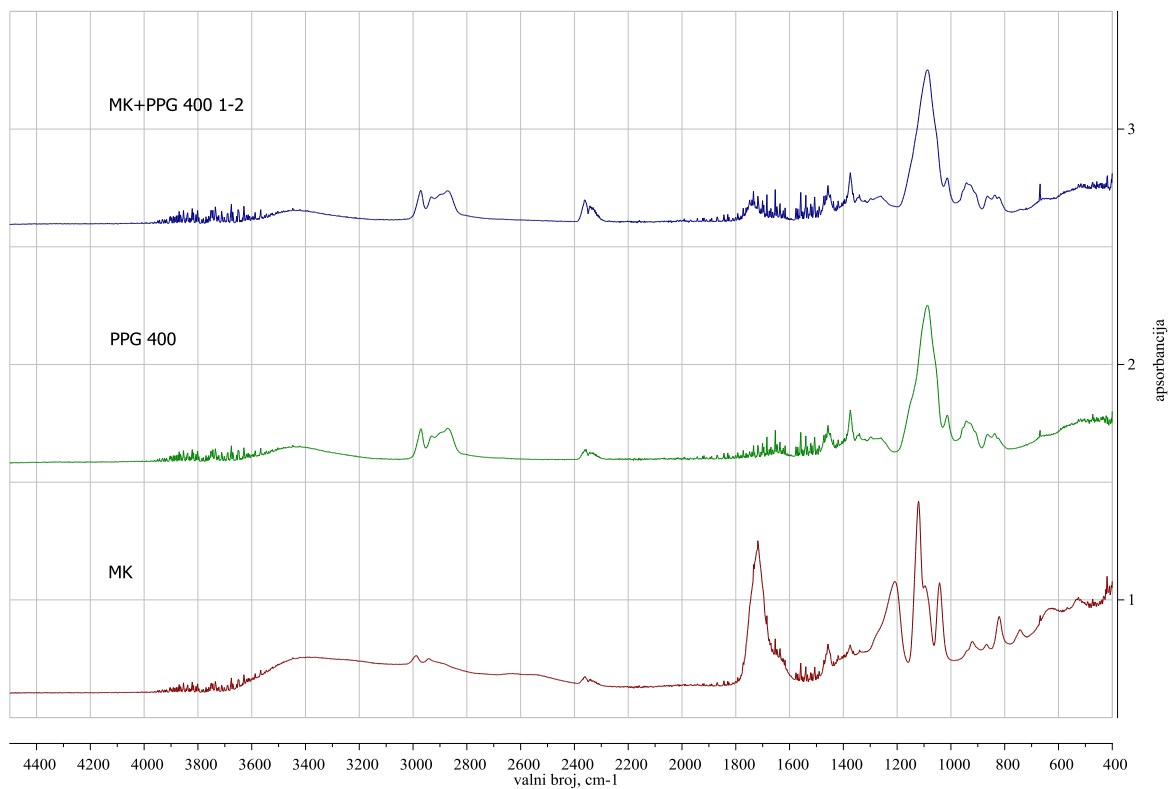
svijetlo žuta otopina. Razlog svijetlo žute boje je zbog povišene temperature pri kojoj se proces odvijao, a iznosila je 80°C. U sustavu s 40 mas% vode MAL se otopila, ali je vidljiva druga faza iz čega se zaključuje da je taj sustav dvofazan. Također MAL se pomiješala i s PEG-om u molarnom omjeru 1:2 te se MAL nije otopila.

Miješanjem MLI s PPG-om u molarnom omjeru 1:2 dobiveno je otapalo. Kako bi se ispitao utjecaj vode na taj sustav dodano je 10, 20 i 40 mas% vode, ali to je rezultiralo nastajanjem mutnih, dvofaznih otopina (iznimka dodatak 20 mas% vode). Miješanjem MLI s PVA-om u molarnom omjeru 1:2 dobiveno je otapalo. Kombinacijom MLI i PEG u molarnim omjerima 1:2 i 1:4 uspješno je sintetizirano otapalo, također uspješnim se pokazalo i dodatak od 50 mas% vode. Miješanjem MLI i PEG (20) također je sintetizirano otapalo, a ispitivanjem utjecaja vode dobiveno je da dodatak od 50 mas% vode ne utječe na otapalo.

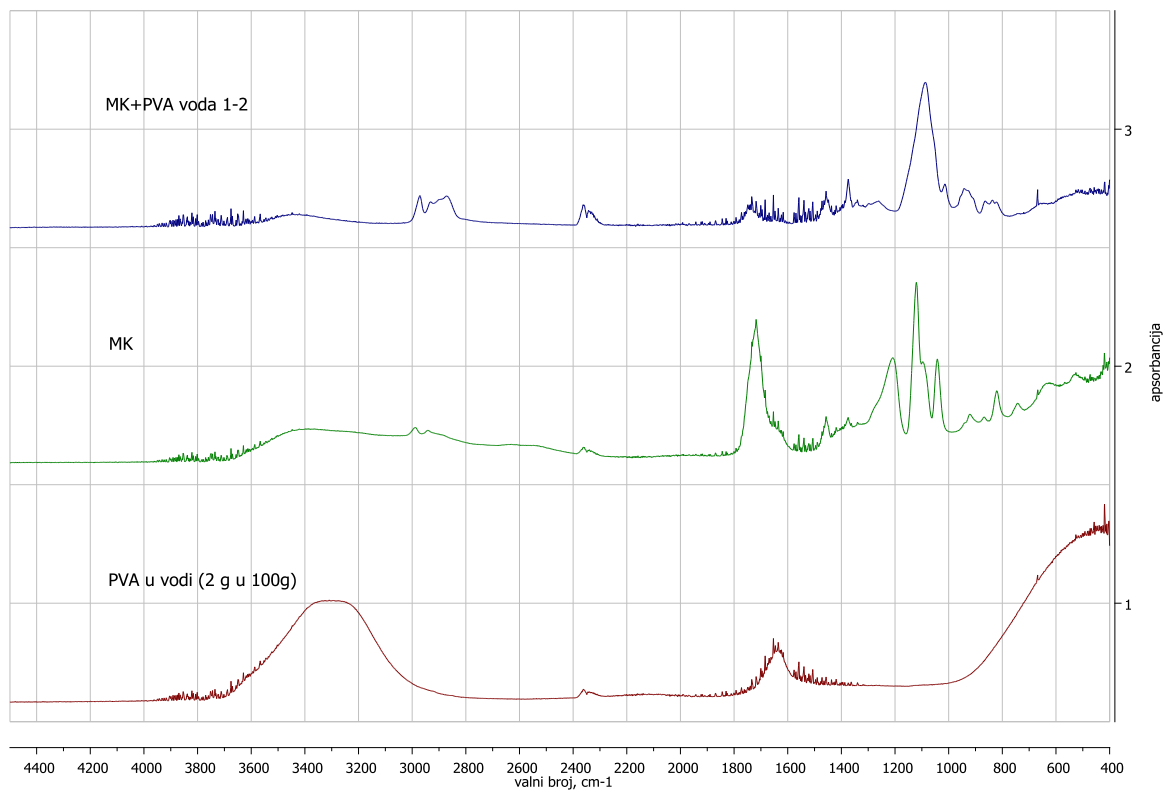
Na slikama 26, 27 i 28 su prikazani snimljeni apsorpcijski spektri za sve kombinacije otapala s MLI. Zbog velikog udjela vode (apsorpcijski spektar za PVA prikazuje samo pikove karakteristične samo za vodu) smatra se da nije nastao DES, već smjesa otapala jer su sve pomiješane komponente u kapljevitom stanju. U apsorpcijskom spektru za otapalo nastalo miješanjem MLI i PPG-a u molarnom omjeru 1:2 nestaju neki pikovi karakteristični za MLI (npr. spektar na valnom broju oko 1250 cm<sup>-1</sup>).



Slika 26. FTIR spektri MLI:PEG 1:2, MLI i PEG



Slika 27. FTIR spektri MLI:PPG 1:2, PPG, MLI.





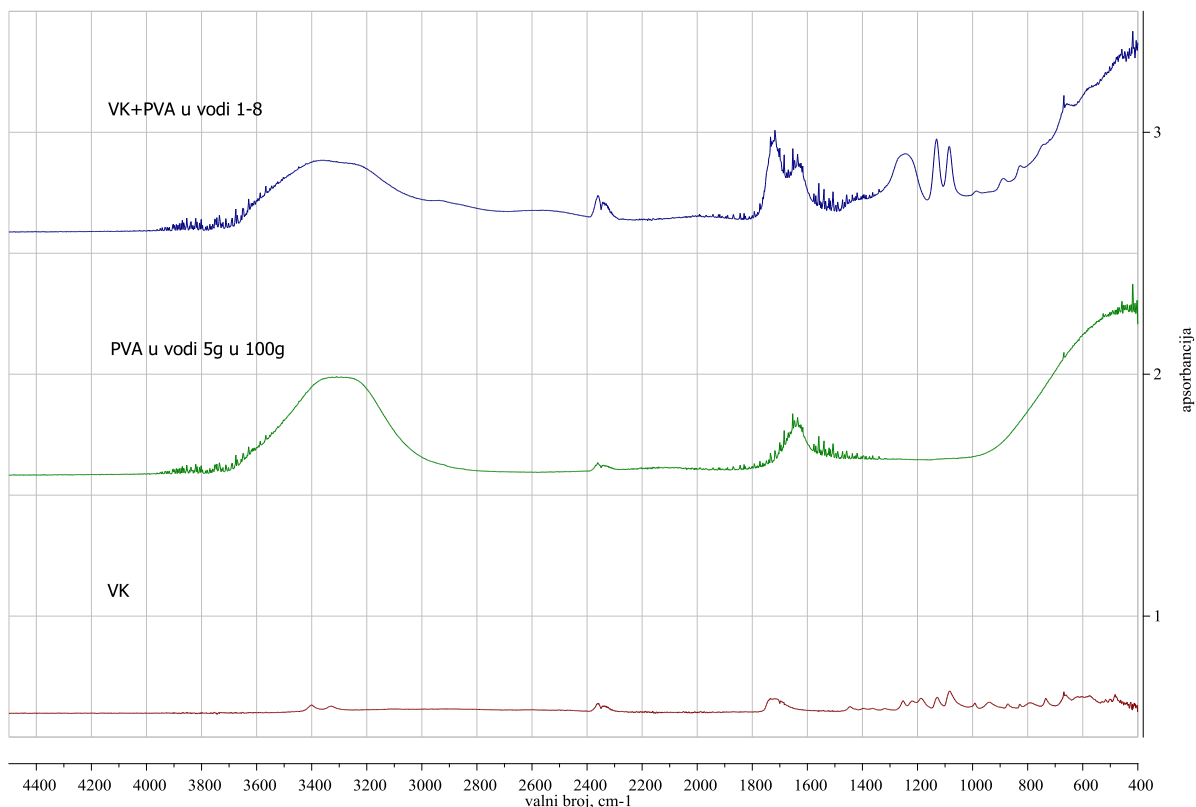
*Slika 28. FTIR spektri MLI:PVA 1:2, MLI i PVA.*

SORB pomiješan s PVA u molarnim omjerima 1:4 i 1:1 nije rezultirao sintezom otapala jer se SORB nije otopio. Miješanjem SORB i PEG-a u molarnom omjeru 1:2 dobivena je otopina koja zbog svoje prevelike viskoznosti nije uzeta u daljnje razmatranje. Kombinacijom SORB i PPG-a u molarnim omjerima 1:1, 1:2 i 1:4 SORB se nije otopio, dok se miješanjem u molarnom omjeru 2:1 dio SORB otopio. U sustav SORB:PPG 1:2 dodano je 10, 20 i 40 mas% vode što je uzrokovalo otapanje sorbitola, ali sustavi su mutni, dvofazni.

SAH pomiješana s PPG-om u molarnim omjerima 1:2 i 1:4 nije rezultirala nastankom otapala zato jer se saharoza nije otopila. Miješanjem SAH s PPG-om u molarnom omjeru 1:6 dio SAH se otopio te je u taj sustav dodano 20 i 40 mas% vode što je uzrokovalo potpuno otapanje SAH, ali i nastanak dvofaznih sustava.

Miješanjem BET-a i PVA-a u molarnim omjerima 1:2 i 1:6 nije dalo zadovoljavajuće rezultate zato jer se otopio samo dio BET-a, dok je njihovim miješanjem u molarnom omjeru 1:4 otopljen sav BET i dobiveno je otapalo. Kombinacijom BET-a u PPG-a u molarnom omjeru 1:2 otopio se dio BET-a te je u taj sustav dodano 10 mas% vode što je uzrokovalo potpuno otapanje BET-a, ali i nastanak mutne otopine.

Miješanjem VIN s PPG-om u molarnom omjeru 1:1 VIN se nije sva otopila te nastaje talog, miješanjem u molarnom omjeru 1:2 nije rezultiralo potpunim otapanjem VIN, dok je miješanjem u molarnom omjeru 1:4 dobivena prozirna otopina. Miješanjem VIN i PVA u molarnom omjeru 1:4 samo se dio VIN otopio, dok se miješanjem u molarnim omjerima 1:6 i 1:8 sva VIN otopila i dobivene su prozirne otopine, odnosno otapala za koje su na slici 29. prikazani apsorpcijski spektri za čiste komponente i smjesu otapala. Ponovno, zbog velike količine vode ne nastaje DES.



Slika 29. FTIR spektar VIN:PVA 1:8,PVA, VIN.

Iz tablice 4. može se zaključiti da su za sintezu otapala s PPG-om, PEG-om, PEG(20)-om i PVA-om najlošiji LAK, SAH, BET, MAL, FRU zato jer se u ispitivanim molarnim omjerima nije uspjelo sintetizirati niti jedno otapalo. Kao najbolja pokazala se MLI jer je i s PPG-om, PEG-om, PEG(20)-om i PVA-om uspješno sintetizirano otapalo.

Kao potencijalno dobra otapala pokazala su se TBAB:PPG 1:2, TBAB:PVA 1:4, MLI:PPG 1:2, MLI:PPG:H<sub>2</sub>O 1:2:13, MLI:PVA 1:2, MLI:PEG 1:2, MLI:PEG 1:4, MLI:PEG:H<sub>2</sub>O 1:4:9,20, MLI:PEG(20) 1:2, MLI:PEG(20):H<sub>2</sub>O 1:2:7,40, BET:PVA 1:4, VIN: PVA 1:6, VIN:PVA 1:8 i VIN:PPG 1:4.

Za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lišća masline korišteni su MLI:PPG 1:2, MLI:PPG:H<sub>2</sub>O 1:2:13, MLI:PVA 1:2, MLI:PVA 1:2 + 50 mas% H<sub>2</sub>O, MLI:PEG 1:2, MLI:PEG 1:2 + 50 mas% H<sub>2</sub>O, MLI:PEG 1:4, MLI:PEG 1:4 + 50 mas% H<sub>2</sub>O, MLI:PEG(20) 1:2, MLI:PEG(20):H<sub>2</sub>O 1:2:7,40, VIN:PVA 1:8, VIN:PVA 1:8 + 50 mas% H<sub>2</sub>O, VIN:PPG 1:4 + 50 mas% H<sub>2</sub>O.

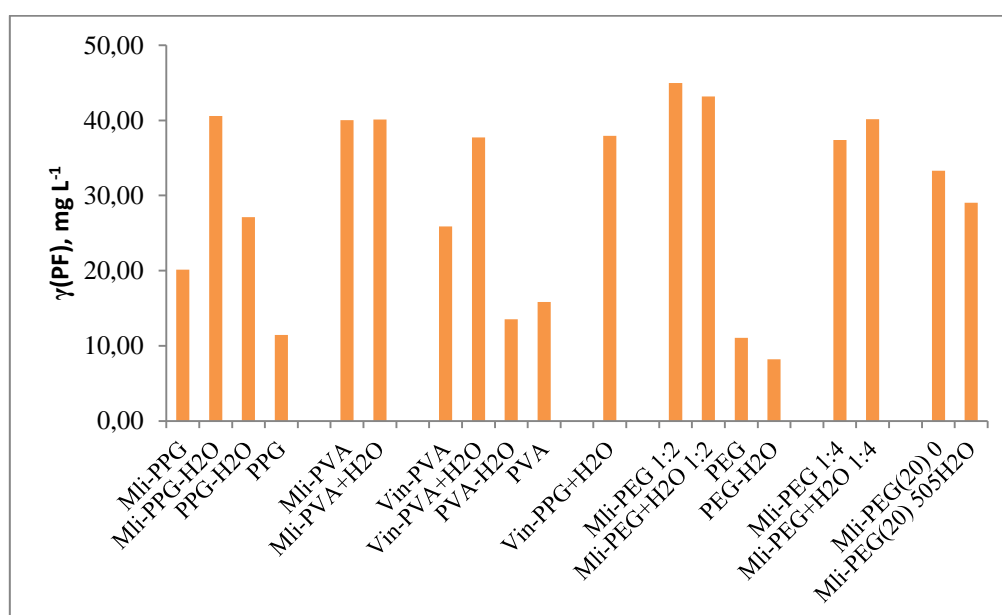
Koncentracija polifenola je određena FC metodom. Zbog stvaranja taloga (slika 31.) s FC reagensom, nakon termostatiranja otopine pripremljene za spektrofotometrijsko mjerenje su profiltrirane.

Prilikom provedbe ekstrakcije s čistim PPG-om, PVA-om i PEG-om najviša vrijednost koncentracije polifenolnih spojeva dobivena je korištenjem PVA, a najniža korištenjem PEG-a.

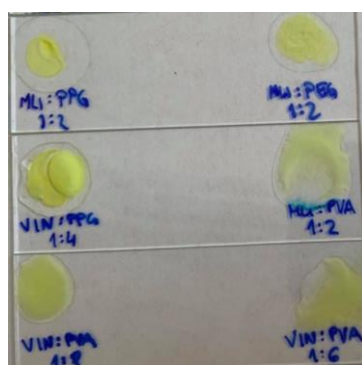
Kada se čistim otapalima doda 50 mas% H<sub>2</sub>O vrijednost koncentracije ekstrahiranih polifenola ima sustav u kojem je korišten PPG- H<sub>2</sub>O raste, dok u sustavima gdje su korišteni PVA-H<sub>2</sub>O i PEG-H<sub>2</sub>O ekstrakcijska moć opada. Opadnje ekstrakcijske moći u sustavima s PVA-H<sub>2</sub>O i PEG-H<sub>2</sub>O je iz razloga što su PVA i PEG dobiveni otapanjem čvrste tvari u vodi te prilikom dodavanja vode dolazi do interakcija između vode i čestica PVA-a i PEG-a, a što negativno utječe na interakciju otapala i polifenolnih spojeva.

Kada se uspoređuju otapala MLI:PPG 1:2, MLI:PVA 1:2, MLI:PEG 1:2, MLI:PEG 1:4, MLI:PEG(20) 1:2 i VIN:PVA 1:8 s trokomponentnim otapalima vidljivo je da je ekstrakcijska moć trokomponentnih otapala veća. Također, tada su i najveće koncentracije ekstrahiranih polifenolnih spojeva. Kako je treća komponenta u svim otapalima voda može se zaključiti da su visoke vrijednosti koncentracija posljedica dobre topljivosti polifenolnih spojeva u vodi.

Kao najbolje otapalo pokazalo se otapalo br. 24, odnosno MLI:PEG 1:2 gdje je dobivena najviša koncentracija polifenolnih spojeva, 44,97 mg L<sup>-1</sup>.



Slika 30. Grafički prikaz rezultata ekstrakcije polifenolnih spojeva s odabranim otapalima.



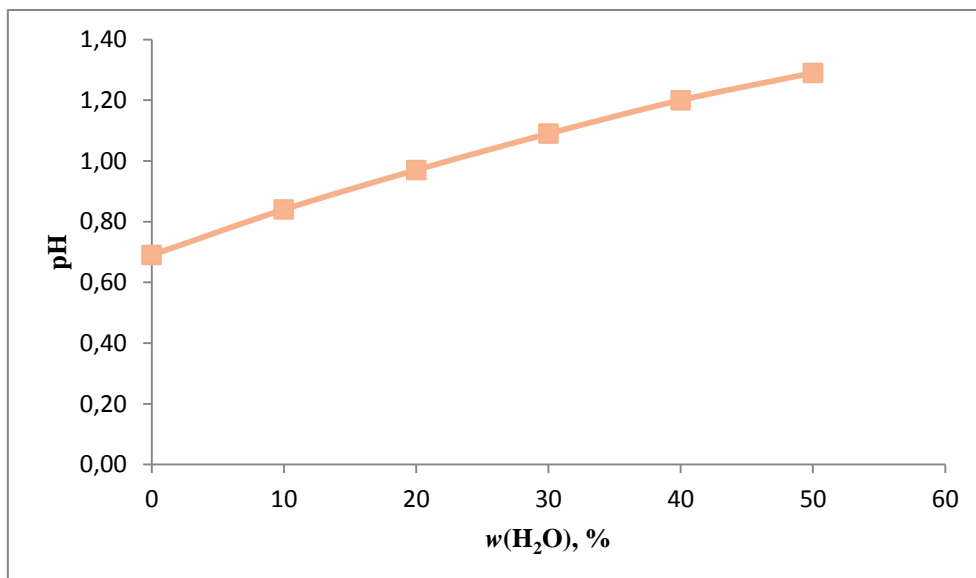
Slika 31. Talog s FC reagensom.

### 4.3. Utjecaj vode na ekstrakciju polifenola

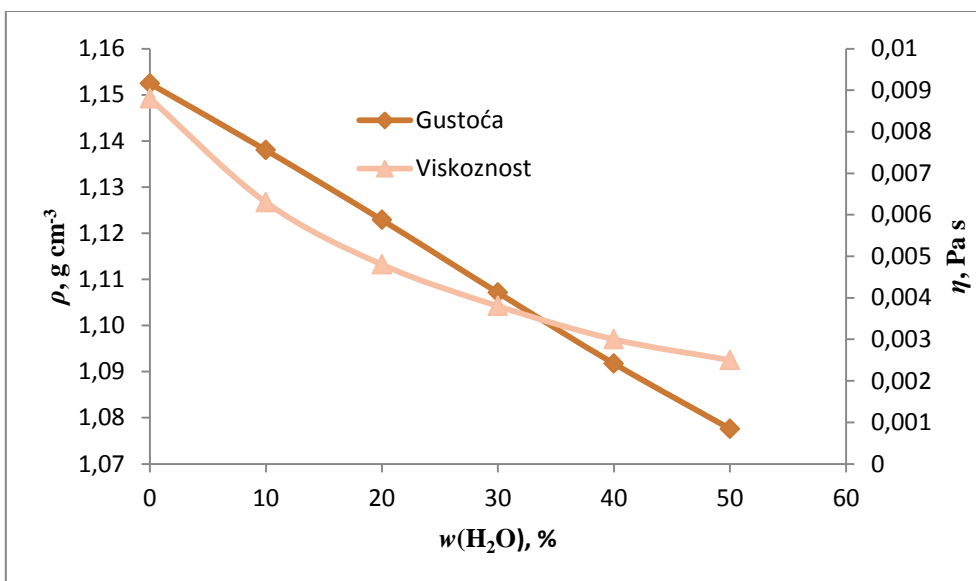
Daljnji cilj istraživanja bio je odrediti kako dodatak vode utječe na djelotvornost ekstrakcije i u tu svrhu pripremljeno je odabrano otapalo MLI:PEG 1:2 s 0, 10, 20, 30, 40 i 50 mas% vode. Tako pripremljenim otopinama određena je gustoća, viskoznost i pH. Povećanjem udjela vode u otopini gustoća i viskoznost se smanjuju, a pH otopine raste, slike 32 i 33. Smanjenje gustoće otopine povećanjem udjela vode upućuje na činjenicu da je gustoća vode pri 25°C 0,9970 g cm<sup>-3</sup> te se povećanjem udjela vode gustoća otopine približava toj vrijednosti. Dinamička viskoznost vode iznosi 0,001 Pa s te se povećanjem udjela vode u otopini, viskoznost otopine približava vrijednosti viskoznosti vode, a takav trend prati i otapalo MLI:PEG 1:2 kako mu se povećava udio vode. Obzirom da je pH vrijednost čistog otapala MLI:PEG 1:2 0,69, a vode oko 7 dodavanjem vode otapalu, pH vrijednost će rasti.

Tablica 5. Fizikalna svojstva otapala.

Otapalo	Udio vode, mas%	Gustoća g/cm <sup>3</sup>	Viskoznost, Pas	pH
MLI-PEG 1:2-0	0	1,1524	0,0088	0,69
MLI-PEG 1:2-10	10	1,1380	0,0063	0,84
MLI-PEG 1:2-20	20	1,1229	0,0048	0,97
MLI-PEG 1:2-30	30	1,1071	0,0038	1,09
MLI-PEG 1:2-40	40	1,0917	0,0030	1,20
MLI-PEG 1:2-50	50	1,0776	0,0025	1,29



Slika 32. Grafički prikaz ovisnosti pH o različitim udjelima vode u otapalu.

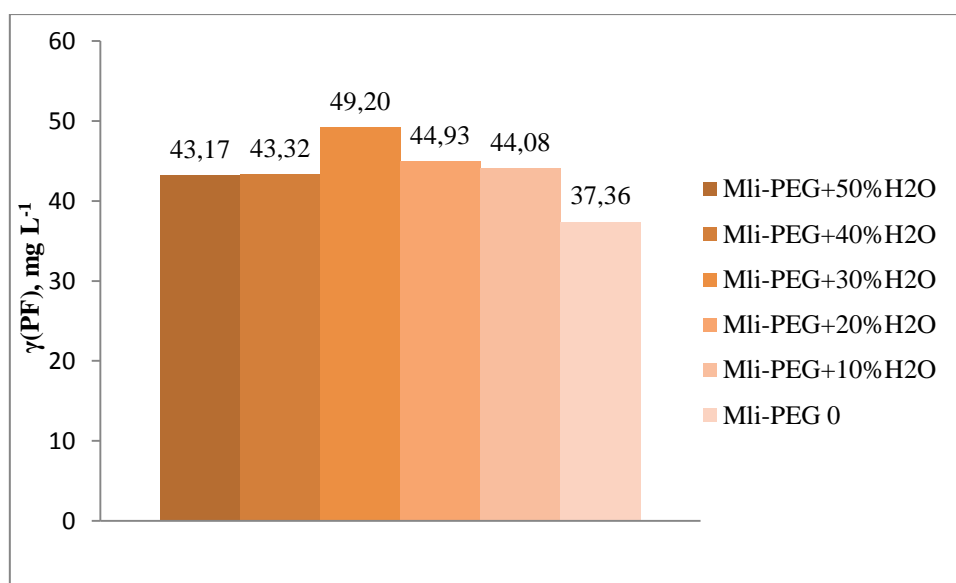


Slika 33. Grafički prikaz ovisnosti gustoće i viskoznosti o udjelu vode u otapalu.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je koncentracija ekstrahiranih polifenola najveća pri korištenju otapalo s 30 mas% vode. Može se zaključiti da je za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lišća masline najdjelotvornije koristiti otapalo s 30 mas% vode jer su tada interakcije između polifenolnih spojeva i komponenata otapala najbolje te uzrokuju najveću djelotvornost ekstrakcije. Povećanjem udjela vode narušava se interakcija između otapala i

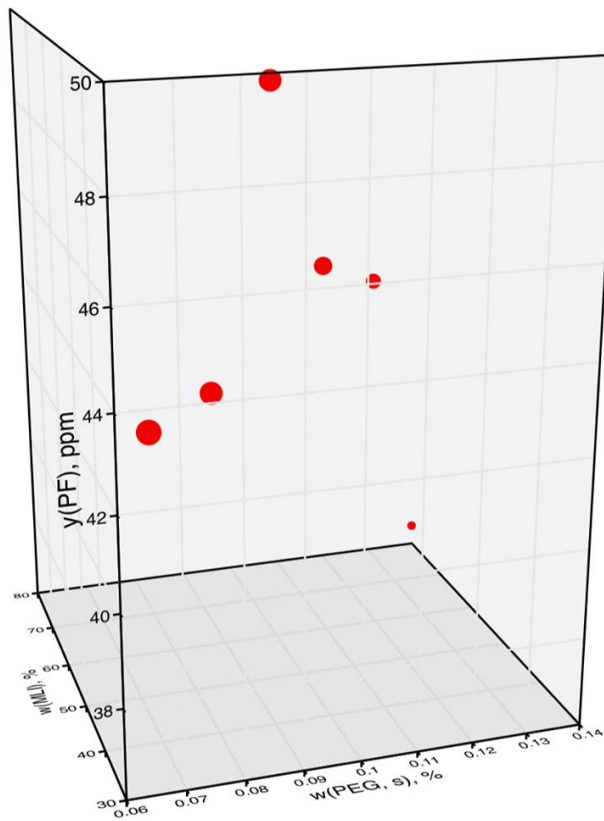
ciljane komponente što uzrokuje smanjenje koncentracije ekstrahiranih polifenola, kao što je vidljivo i na slici 34. Korištenje otapala bez vode nije preporučljivo zbog niske vrijednosti koncentracije ekstrahiranih polifenola.

Otapalo s 30 mas % ode ima relativno nisku vrijednost viskoznosti, što povoljno djeluje na proces miješanja. Miješanje je jedan od ključnih koraka ekstrakcije te služi kako bi selektivno otapalo i čvrsta tvar došli u kontakt. U slučaju velike viskoznosti, proces ekstrakcije bi se značajno usporio, a što bi uzrokovalo i veće troškove. Također, za spektrofotometrijsko mjerenje bitno je izdvojiti i profilirati ekstrakt, a s jako viskoznom otapalom je teže rukovati.



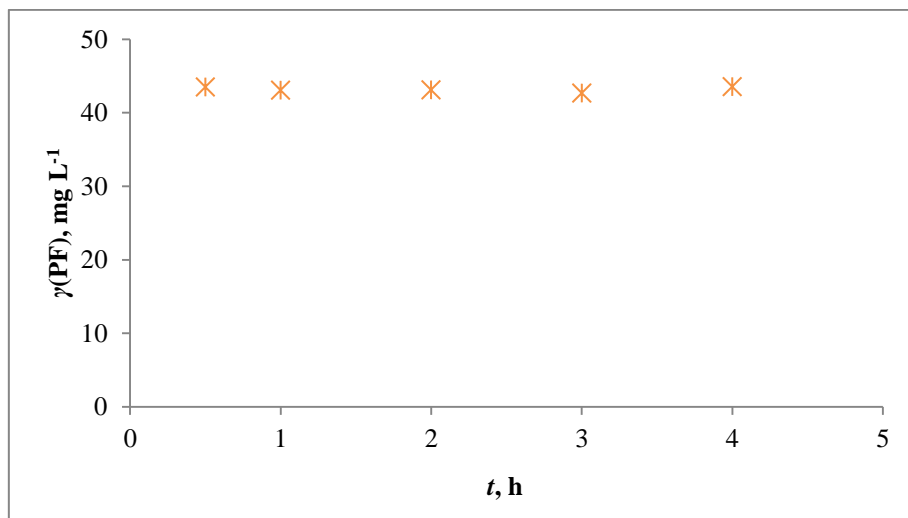
Slika 34. Grafički prikaz utjecaja vode u otapalu na moć ekstrakcije polifenolnih spojeva.

Kako bi se prikazao utjecaj udjela pojedine komponente na ekstrabilnost polifenola, na slici 35 prikazan je 3D graf s dobivenim koncentracijama ekstrahiranih polifenola u odnosu na maseni udio mliječne kiseline i čvrstog, bezvodnog polietilen glikola. Iz garfa je vidljivo da je najveća koncentracija ekstrahiranih polifenola pri masenom udjelu mliječne kiseline od 49,3 % i masenom udjelu bezvodnog polietilen glikola od 0,0939 % odnosno, otapalu MLI:PEG 1:2+ 30 mas% H<sub>2</sub>O.



Slika 35. Ovisnost koncentracije polifenola, masenog udjela mliječne kiseline i masenog udjela bezvodnog polietilen glikola.

#### 4.4. Optimalno vrijeme

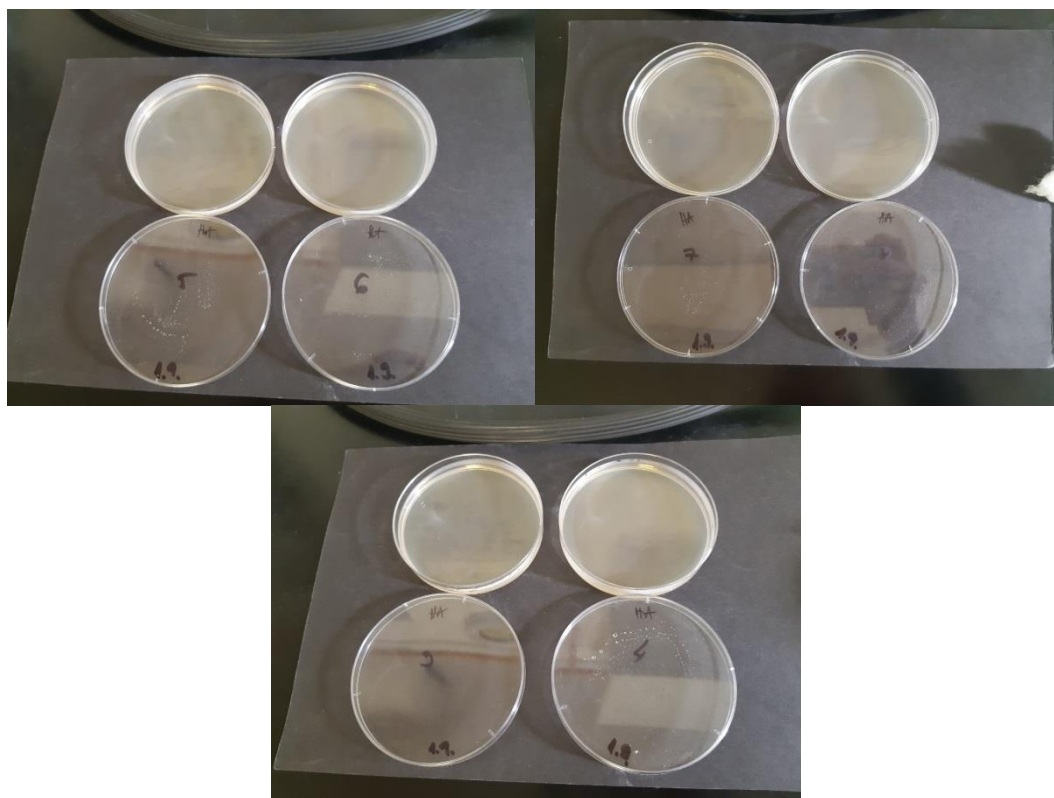


Slika 36. Određivanje optimalnog vremena.

Iz dobivenih rezultata (slika 36) može se zaključiti da je proces ekstrakcije polifenolnih spojeva iz lišća masline korištenjem otapala MLI:PEG 1:2- 30 mas% H<sub>2</sub>O moguće provoditi 30 minuta te dobiti optimalne rezultate, odnosno izrazito visoku koncentraciju polifenolnih spojeva u ekstraktu. Eksperiment se provodio 4 h kako bi se utvrdilo dolazi li do inverzne reakcije s vremenom, ali iz rezultata (slika 36) se vidi da se to ne događa.

#### 4.5. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka aktivnost ispitana je za ekstrakte s 0, 10, 20, 30, 40 i 50 mas% vode. Iz dobivenih rezultata, zaključuje se da u ekstraktima nema bakterija što potvrđuje antibakterijsko djelovanje dobivenih ekstrakata.



Slika 37. Rezultati mikrobiološke aktivnosti.



## 5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu istraživana je mogućnost pripreve ekstrakta lista masline za kozmetičku primjenu.
- Lišće je usitnjeno, prosijano sitom veličina očica 800  $\mu\text{m}$ , najveći udio čestica je u intervalu 110 - 300 nm, specifična težina lišća određena prema Albert-Bogsovoj metodi iznosi 1,5402 g/mL.
- Ekstrakcija je provedena na sobnoj temperaturi uz miješanje na magnetskoj miješalici.
- Koncentracija polifenolnih spojeva u ekstraktu određena je Folin- Ciocalteavom metodom.
- Optimalno otapalo za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lišća masline je MLI:PEG 1:2, koncentracija ekstrahiranih polifenola iznosi 44,97 ppm.
- Otapalo je karakterizirano: određena su mu fizikalna svojstva- gustoća, viskoznost i pH.
- Dodatak vode od 30 mas% u otapalo MLI:PEG 1:2 daje najbolji rezultat jer je tad najveća koncentracija ekstrahiranih polifenola te iznosi 49,20 ppm.
- Mikrobiološkom analizom, provedenom metodom po Drigalskom, nije utvrđeno postojanje bakterija.

## 6. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

### SIMBOLI

$d$  – promjer [m]

$m$  – masa [kg]

$pH$  – mjera kiselosti

$V$  – volumen [ $m^3$ ]

$t$  – vrijeme [s]

$\eta$  – dinamička viskoznost [Pa s]

$\rho$  – gustoća [ $kg\ m^{-3}$ ]

$\gamma$  – masena koncentracija [ $kg\ m^{-3}$ ]

### SKRAĆENICE

ABS - absorbancija

BET - betain

DES - niskotemperaturno eutektičko otapalo (engl. deep eutectic solvents)

FRU – D-fruktoza

FC – Folin- Ciocalteu

GAE - galna kiselina

LAK – laktoza monohidrat

MAL – maltoza monohidrat

MLI – mliječna kiselina

NADES – prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo (engl. natural deep eutectic solvents)

PF - polifenoli

PPG – polipropilen glikol

PVA – polivinil alkohol

PEG - polietilen glikol

PEG (20) - polietilen glikol, 20 g u 100 g vode

PEG, s - polietilen glikol, čvrsta tvar

SAH – D(+)saharoza

SORB – D-sorbitol

TBAB – tetrabutilamonij bromid

THEDES terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. therapeutic deep eutectic solvents)

UV – ultra ljubičasto

VIN – L(+) vinska kiselina

## 7. LITERATURA

1. <https://www.plantea.com.hr/maslina/> (pristup 2.6.2020.)
2. <file:///C:/Users/Petra/Downloads/Maslina.pdf> (pristup 2.6.2020.)
3. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/maslina-18/> (pristup 2.6.2020.)
4. El S.N., Karakaya S., *Nutrition Reviews* **67(11)** (2009) 632–638.
5. <https://www.plantea.com.hr/maslina/#maslina-2> (pristup 2.6.2020.)
6. Soto M.L., Falqué E., Domínguez H., *Cosmetics* **2** (2015) 259-276.
7. Vitali Čepo D., Albahari P., Zovko Končić M., Radić K., Jurmanović S., Jug M., *Food in Health and Disease* **6 (1)** (2017) 7-14.
8. Alanon M.E., Ivanović M., Gomez-Caravaca A.M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., *Arabian Journal of Chemistry* (2018).
9. Jeong K.M., Ko J., Zhao J., Jin Y., Yoo D.E., Han S.Y., Lee J., *Journal of Cleaner Production* **151** (2017) 87-95.
10. Bennett R.N., Wallsgrove R.M., *New Phytol.* **127** (1994) 617-633.
11. Bhooshan Pandey K., Rizvi S.I., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2(5)** (2009) 270-278.
12. Daglia M., *Current Opinion in Biotechnology* **23** (2012) 174-181.
13. [https://www.researchgate.net/figure/General-structure-of-flavonoids\\_fig1\\_324178516](https://www.researchgate.net/figure/General-structure-of-flavonoids_fig1_324178516) (pristup 4.6.2020.)
14. [https://www.researchgate.net/figure/Examples-of-subclasses-of-flavonoids\\_fig1\\_228091712](https://www.researchgate.net/figure/Examples-of-subclasses-of-flavonoids_fig1_228091712) (pristup 4.6.2020.)
15. [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-gallic-acid-3-4-5-trihydroxybenzoic-acid\\_fig2\\_295678543](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-gallic-acid-3-4-5-trihydroxybenzoic-acid_fig2_295678543) (pristup 4.6.2020.)
16. [https://www.researchgate.net/figure/Structural-formula-of-resveratrol\\_fig1\\_275996345](https://www.researchgate.net/figure/Structural-formula-of-resveratrol_fig1_275996345) (pristup 4.6.2020.)
17. Gorzynik-Debicka M., Przychodzen P., Cappello F., Kuban-Jankowska A., Marino Gammazza A., Knap N., Wozniak M., Gorska-Ponikowska M., *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018) 547.
18. Rajbhar K., Dawda H., Mukundan U., *Sci. Revs. Chem. Commun.* **5(1)** (2015) 1-6.
19. Ghasemzadeh A., Ghasemzadeh N., *J. Med. Plants Res.* **5(31)** (2011) 6697-6703.
20. Petti S., Scully C., *Journal of dentistry* **37** (2009) 413-423.
21. Shahidi F., Ambigaipalan P., *Journal of functional foods* **18** (2015) 820–897.

22. Vogel P., Kasper Machado I., Garavaglia J., Terezinha Zani V., de Souza D., Morelo Dal Bosco S., *Nutricion Hospitalaria* **31(3)** (2015) 1427-1433.
23. Bilgin M., Sahin S., *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **44** (2013) 8–12.
24. Martínez L., Ros G., Nieto G., *Medicines* **5** (2018) 13.
25. Sun W., Frost B., Liu J., *Oncotarget* **8(11)** (2017) 17409-17409.
26. <https://www.verywellhealth.com/the-benefits-of-rutin-supplements-89508> (pristup 10.6.2020.)
27. Isemura M., *Molecules* **24** (2019) 528.
28. Fan F.Y., Sang L.X., Jiang M., *Molecules* **22** (2017) 484.
29. Leri M., Scuto M., Ontario M.L., Calabrese V., Calabrese E.J., Bucciantini M., Stefani M., *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020) 1250.
30. Dai J., Mumper R.J., *Molecules* **15** (2010) 7313-7352.
31. [https://www.fkit.unizg.hr/\\_download/repository/ekstrakcija.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/ekstrakcija.pdf) (pristup 4.6.2020.)
32. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=28292> (pristup 4.6.2020.)
33. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=17468> (pristup 4.6.2020.)
34. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_Lab\\_Techniques\\_\(Nichols\)/04%3A\\_Extraction/4.01%3A\\_Overview\\_of\\_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/04%3A_Extraction/4.01%3A_Overview_of_Extraction) (pristup 4.6.2020.)
35. Anela Udovčić, *Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otopala i nanosuspenzija u separaciji fenolnih spojeva iz komine masline*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2018.
36. Alcázar-Alay S.C., Cardenas-Toro F.P., Santos D.T., Meireles M.A.A., *Food and Public Health* **5(2)** (2015) 47-55.
37. Luque de Castro M.D. , Priego-Capote F., *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2383–2389.
38. Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D., *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, International Centre for Science and High Technology, Trst 2008.
39. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/pressurized-liquid-extraction> (pristup 4.6.2020.)
40. Ruesgas-Ramón M., Figueroa-Espinoza M.C., Durand E., *J. Agric. Food Chem.* **65** (2017) 3591–3601.

41. Zhang Q., Vigier K.DeO., Royer S., Jerome F., *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 7108–7146.
42. Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S., *Chem. Rev.* **114** (2014) 11060–11082.
43. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=eutektik> (pristup 4.6.2020.)
44. Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R.L., Duarte A.R.C., *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2** (2014) 1063–1071.
45. Roda A., Matias A.A., Paiva A., Duarte A.R.C., *Polymers* **11**(2019) 912.
46. Tomé L.I.N., Baião V., da Silva W., Brett C.M.A., *Applied Materials Today* **10** (2018) 30–50.
47. T.G. Kazi, H.I. Afridi, M. Bhatti, A. Akhtar, A rapid ultrasonic energy assisted preconcentration method for simultaneous extraction of lead and cadmium in various cosmetic brands using deep eutectic solvent: A Multivariate study, *Ultrasonics Sonochemistry* (2018).
48. Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY, Lee J, Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products, *Journal of Cleaner Production* (2017).
49. Yang Z., Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications, First Edition, 43-59 (2020).
50. Halder A.K., Cordeiro M.N. D.S., *ACS Sustainable Chem. Eng.* **7** (2019) 10649–10660.
51. Dai Y., Verpoorte R., Hae Choi Y., *Food Chemistry* **159** (2014) 116–121.

## 8. ŽIVOTOPIS

Petra Marketin [REDACTED] Nakon završetka osnovne škole upisuje Srednju školu Biograd na Moru, smjer opća gimnazija. Maturirala je 2015. godine te upisuje preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odradila je u PLIVA HRVATSKA d.o.o na odjelu Istraživanja i razvoja.

Završetkom preddiplomskog studija 2018. godine upisuje diplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

2020. godine sudjelovala je na XII susretu mladih kemijskih inženjera kao koautorica sa posterskim priopćenjem pod nazivom Spectroscopic characterization of benzimidazole conjugates as sensors for metal cations and pH detection in solutions.