

# Ekstrakcija polifenola iz lista trputca

---

Rončević, Lana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:112455>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Lana Rončević**

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Lana Rončević

Predala je izrađen završni rad dana: 6. srpnja 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Prof. dr. sc. Aleksandra Sander, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu  
Dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, zamjena

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 9. srpnja 2021.

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

**Lana Rončević**

**EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ LISTA TRPUTCA**

**ZAVRŠNI RAD**

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

Članovi povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum
2. prof. dr. sc. Aleksandra Sander
3. doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, srpanj 2021.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na vodstvu, razumijevanju, strpljivosti, susretljivosti i svim pruženim savjetima i pomoći pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem asistentici, Anamariji Mitar, na velikoj pomoći i pristupačnosti pri izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima i sestrama na razumijevanju, strpljenju i podršci tijekom mog studiranja. Također, zahvaljujem i svojim prijateljima i kolegama, posebice Anđeli, Ivanu i Luciji, koji su uvijek bili uz mene i bili mi velika podrška i oslonac kroz ove tri godine studija.*

## SAŽETAK

Polifenoli, koji se nalaze u namirnicama biljnog podrijetla, antioksidansi su koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Postupkom ekstrakcije izdvajaju se iz biljaka pomoću prirodnih eutektičkih otapala, koja su danas sve češće u upotrebi zbog svoje netoksičnosti, biorazgradljivosti i niske cijene.

U ovom radu, od više pripremljenih različitih otapala odabrano je i korišteno prirodno eutektičko otapalo pripremljeno od mliječne kiseline, fruktoze i glicerola (La-Fru-Gly) u molarnom omjeru 2:1:2 sa različitim masenim udjelima vode. Za navedeni NADES pratila su se fizikalno-kemijska svojstva, kao što je gustoća, viskoznost, pH i polarnost. Provedena je i ekstrakcija krutina-kapljevina polifenolnih spojeva iz lista trputca pomoću navedenog NADES-a, kojom se odredila koncentracija ukupnih fenolnih spojeva. Osim toga, ispitan je utjecaj toksičnosti otapala na glavice češnjaka. Gustoća, viskoznost i polarnost se smanjuju povećanjem udjela vode, dok pH pokazuje obrnuti slučaj. Također, koncentracija fenolnih spojeva opada porastom udjelom vode.

**Ključne riječi:** trputac, polifenoli, DES, NADES, gustoća, viskoznost, pH, polarnost, ekstrakcija

## ABSTRACT

Polyphenols, which are found in foods of plant origin, are antioxidants, which have a positive effect on human health. By the extraction process, they are extracted from plants with natural eutectic solvents, which are increasingly used today because of their non-toxicity, biodegradability and low cost.

In this paper, from several different solvents prepared, it was selected and used natural eutectic solvents prepared from milk acid, fructose and glycerol in molar ratio 2:1:2, with different mass fractions of water. Physical-chemical properties were monitored for the mentioned NADES, such as density, viscosity, pH and polarity. Solid-liquid extraction of polyphenolic compounds from plantain leaves was also performed using said NADES, which determined the concentration of total phenolic compounds. In addition, the effect of solvent toxicity on garlic heads was examined. Density, viscosity and polarity decrease with increasing water content, while pH shows the opposite case. Also, the concentration of phenolic compounds decreases with increasing water content.

**Key words:** plantain leaves, polyphenols, DES, NADES, density, viscosity, pH, polarity, extraction

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. BILJKE .....	2
2.1.1. Aktivne komponente.....	2
2.1.2. Trputac .....	3
2.1.3. Polifenoli .....	5
2.2. EKSTRAKCIJA .....	6
2.2.1. Odabir otapala .....	7
2.2.2. Ekstrakcija kapljevina-kapljevina .....	8
2.2.3. Ekstrakcija krutina - kapljevina.....	9
2.3. OTAPALA .....	12
2.3.1. Konvencionalna otapala.....	12
2.3.2. Ionske kapljevine.....	12
2.3.3. DES .....	13
2.3.4. NADES .....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
3.1. Zadatak.....	15
3.2. Priprema otapala.....	15
3.3. Fizikalno – kemijska karakterizacija NADES-a.....	18
3.3.1. Mjerenje gustoće.....	18
3.3.2. Mjerenje viskoznosti.....	18
3.3.3. Mjerenje pH.....	19
3.4. Polarnost .....	20
3.5. Ekstrakcija.....	20
3.5.1. Folin – Ciocalteu metoda.....	22
3.6. Određivanje toksičnosti otapala .....	24
4. REZULTATI .....	25
4.1. Odabir otapala za provedbu ekstrakcije polifenola iz lista trputca.....	25
4.2. Karakterizacija odabranog otapala .....	26
4.2.1. Gustoća.....	26
4.2.2. Viskoznost.....	26
4.2.3. pH.....	27
4.3. Polarnost .....	28
4.4. Ekstrakcija.....	28
4.5. Određivanje toksičnosti otapala .....	29



5. RASPRAVA .....	31
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. POPIS SIMBOLA.....	34
8. LITERATURA .....	35

# 1. UVOD

U današnje vrijeme sve je veći učinak zagađenja okoliša te se radi na tome da se pronađu bolja i ekološki prihvatljivija rješenja, koja će biti dobra za istraživanja i korištenje u industriji, a neće imati negativan utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje. Vodeću ulogu u tome ima grana zelene kemije, koja želi smanjiti, odnosno potpuno izbaciti upotrebu okolišno nepovoljnih otapala. Prije su se koristila konvencionalna otapala, koja su zamijenjena ionskim kapljevinama. Međutim, ona su pokazala brojne nedostatke kao što su velika toksičnost, visoka cijena, niska biorazgradljivost te složena sinteza. Iz toga razloga, bilo je potrebno pronaći bolje rješenje.

Alternativu prethodno navedenim otapalima čine niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *deep eutectic solvent*, DES) i prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *natural deep eutectic solvent*, NADES). Ono što je pokazalo ova otapala boljima od prethodnih jesu niska cijena, jednostavna priprema, biorazgradljivost i niža toksičnost. Ova otapala pripremljena su miješanjem dviju ili više komponenata, odnosno donora i akceptora vodikove veze, kako bi se dobile eutektičke smjese nižeg tališta s obzirom na pojedinačne komponente. Prilikom njihove pripreme ne dolazi do kemijske reakcije, a komponente su povezane međumolekulskim silama, koje utječu na fizikalno-kemijska svojstva DES-ova.

U ovom radu korišteno je prirodno eutektičko otapalo sastavljeno od mliječne kiseline, fruktoze i glicerola u molarnom omjeru 2:1:2 s različitim masenim udjelima vode za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lista trputca, biljke koja je vrlo rasprostranjena na našem području. Polifenolni spojevi, koji se nalaze u biljkama, su važni antioksidansi, koji se koriste u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Također, imaju brojna protuupalna djelovanja te sposobnost sprječavanja raznih bolesti. Osim postupka ekstrakcije, provela se fizikalno-kemijska karakterizacija navedenog NADES-a te ispitaio utjecaj toksičnosti otapala na glavicu češnjaka.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BILJKE

#### 2.1.1. Aktivne komponente

Biljke sadrže mnoge aktivne komponente od kojih svaka služi za neku određenu funkciju i u različitim količinama se nalaze u pojedinim biljkama. Petnaest glavnih aktivnih komponenata koje se mogu naći u biljkama jesu<sup>1</sup>:

- Alkaloidi – najaktivniji sastojci biljaka, koji mogu imati razne ljekovite učinke, ali i biti otrovni ukoliko se koriste u velikim dozama. Jedan od najpoznatijih primjera alkaloida je kofein, koji se može naći u kavi, čaju, kakau.
- Antocijanini – antioksidativni pigmenti koji daju crvenu, ljubičastu ili plavu boju voću i cvijeću. Osim toga, važni su za održavanje zdravlja krvnih žila. Hrana bogata antocijaninom je grožđe i kupina.
- Antrakinoni – prirodne laksativne komponente koje pomažu u ublažavanju zatvora i omekšavanju stolice.
- Srčani glikozidi – prirodni diuretici, koji povećavaju brzinu stezanja srca, čime jačaju srce, snižavaju krvni tlak, pospješuju cirkulaciju. Neke od biljaka koje ih sadrže mogu biti otrovne pa je važno poznavati biljke prije upotrebe.
- Kumarini – njihovo djelovanje pruža zaštitu od sunca, razrjeđuje krv i opušta mišiće.
- Cijanogeni glikozidi – iako sadrže otrovni cijanid, u malim dozama mogu imati sedativan učinak na srce i mišiće, a također se koriste i protiv kašlja. Nalaze se u kori divlje trešnje i bazgi.
- Flavonoidi – antioksidansi koji pospješuju cirkulaciju i pomažu pri oštećenju tkiva patogenima. Skupina polifenola. Imaju protuupalna svojstva. Primjeri flavonoida su luk, češnjak, špinat i zeleno lisnato povrće.
- Glukosilinati – pomažu pri problemima sa zglobovima, povećavaju protok krvi u zahvaćenom području, ali djeluju nadražujuće. Može ih se pronaći u rotkvici.
- Minerali – elementi periodnog sustava elemenata (Mg, Fe, Cu). Nalaze se u svim namirnicama i jedan su od gradivnih sastojaka vitamina. Maslačak i preslica su biljke bogate mineralima.

- Sluz – sastojak biljaka koji sadrži polisaharide, koji pružaju hidratantne i zaštitne učinke, odnosno pomažu u umirivanju kože, grla, pluća i drugih organa. Nalaze se u ljuskama sjemena aloe vere.
- Fenoli – nalaze se u mnogim spojevima kao npr. salicilna kiselina, a imaju antiseptičko i protuupalno djelovanje. U izravnom doticaju s kožom mogu imati nadražujuće djelovanje. Nalaze se u svim namirnicama, a od biljaka u zimnicama i bijeloj vrbi.
- Saponini – bliski su prirodnim hormonima koji se nalaze u tijelu, a potiču hormonalnu aktivnost. Jedan od najpoznatijih saponina jest sladić.
- Tanini – nalaze se u kori i lišću svih biljaka. Vinopijama su poznati kao sastojci koji uzrokuju glavobolju. Također se koriste i za tamnjenje kože. Izvori tanina jesu vino, piva, čokolada, citrusi, hrastova kora.
- Vitamini – jedni od ključnih gradivnih elemenata, jer su važni u određenim staničnim procesima i njihov nedostatak može dovesti do bolesti i poremećaja, kao što je skorbut, do kojeg dolazi bez vitamina C. Vrlo su cijenjeni u kozmetici i većinom služe kao antioksidansi. Biljke s visokom razinom vitamina su potočarke i ruže pasa.
- Aromatična ulja – imaju snažno antiseptičko djelovanje, kao i protuupalna svojstva. Biljke s ovim sastojkom imaju snažnu aromu te se često koriste u aromaterapiji kao esencijalna ulja. Nalaze se u ulju čajevca, pepermintu i ulju origana.

### 2.1.2. Trputac

Trputac (*Plantago lanceolata L.*) ili bokvica je trajna zeljasta biljka koja se u prirodi može vrlo lako pronaći, posebice na vlažnom i plodnom tlu. Jedna je od najrasprostranjenijih biljaka i može se naći na livadama i pašnjacima, u vrtovima, nasipima ili pored ceste te se često smatra korovom iako je to jedna od najljekovitijih biljki na svijetu. Otkriveno je preko 200 vrsta trputca, od kojih su najpoznatiji uskolisni i širokolisni trputac. Svaka od tih vrsta je ljekovita i jestiva. <sup>2</sup> Glavni sastojci trputca su : trijeslovine, polisaharidi, kumarin, flavonoidi, silicijeva kiselina, cink, kalij. <sup>3</sup>



**Slika 1.** Trputac (*Plantago lanceolata* L.)

#### **2.1.2.1. Berba i priprema**

Listovi trputca, koji mogu biti osušeni ili svježi, koriste se u ljekovite svrhe, ali isto tako može se koristiti i cijeli nadzemni dio trputca. Listovi se ubiru u vrijeme cvatnje, jer su tada potpuno razvijeni. Listovi nakon ubiranja idu na sušenje, koje može trajati do tjedan dana i pritom se listovi moraju okretati kako ne bi potamnili. Suhi biljni materijal koji se dobije čuva se u vrećama na suhom mjestu. Nakon procesa obrade, trputac najčešće odlazi u ljekarne u obliku zeleno-smeđih listova, koji ne smiju biti tamnosmeđi, jer je to indikator da je došlo do određenih kemijskih promjena. <sup>3</sup>

#### **2.1.2.2. Djelovanje i upotreba**

Posebno se koristi u narodnoj medicini kao sredstvo za liječenje rana, zaustavljanje krvarenja, snižavanje visoke temperature, zacjeljivanje rana, jačanje želuca, izlučivanje sluzi. Trputac se također koristi i za ublažavanje uboda od insekata te može spriječiti nastanak i širenje

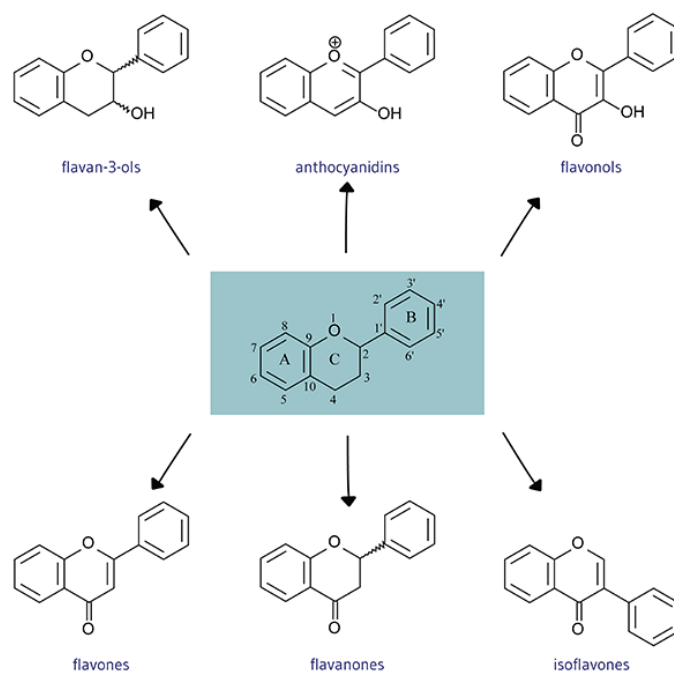
infekcije. Osim toga, u suvremenoj fitoterapiji trputac se može koristiti i za smirivanje kašlja i ublažavanje upala sluznice usne šupljine i ždrijela. Također, još jedan sastojak trputca je i alantoin koji je učinkovit pri regeneraciji oštećenog kožnog tkiva. Koristi se i pri ublažavanju zubobolje, bolova u uhu i kožnih bolesti. Trputac sadrži anti-upalna, analgetska, antibakterijska, adstrigentna i antioksidativna svojstva. Adstrigentno djelovanje predstavlja skupljanje pora u svrhu kontrole masnoće kože. Najčešći proizvodi trputca su sirup i čaj. <sup>3</sup>

### **2.1.3. Polifenoli**

Polifenoli su vrlo važni spojevi za fiziologiju biljaka, jer utječu na njihovu funkciju rasta, pigmentacije, otpornosti za patogene. <sup>4</sup> Nalaze se u brojnim namirnicama koje su uglavnom biljnog podrijetla, a bogate su antioksidansima. Antioksidansi su tvari koje štite stanicu od reaktivne vrste kisika i slobodnih radikala. Upravo zbog svojih antioksidativnih svojstava korisni su u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. <sup>6</sup> Mogu se ekstrahirati iz biomase (biljke), otpada od hrane i mikroalgi. Poznato je oko 8000 molekula polifenola, a neke od najznačajnijih skupina su flavonoidi.<sup>4</sup>

#### **2.1.3.1. Flavonoidi**

Flavonoidi su skupina polifenola koji se nalaze u biljkama. Oni su sekundarni metaboliti koji ne utječu direktno na rast i razvoj biljke, ali kao snažni antioksidansi uklanjaju slobodne radikale, koji oštećuju stanicu i DNA, potiču njeno starenje te uzrokuju mnoge bolesti kod ljudi, biljaka i životinja. <sup>7</sup> Važna značajka koja utječe na njihovu sposobnost antioksidativnog djelovanja je njihova molekularna struktura, odnosno položaj OH skupine.<sup>5</sup> Koriste se pri izradi lijekova za bolesti krvi, disanja, mokraćnog sustava i kože. Neke od većih skupina flavonoida su: antocijani, flavanoni, flavoni, flavonoli, izoflavonoidi, prikazani na slici 2.<sup>7</sup>



**Slika 2.** Skupine flavonoida.

## 2.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je ravnotežni separacijski proces uklanjanja ili odvajanja jedne ili više komponenti iz čvrste ili kapljevine smjese pomoću selektivnog otapala. Postupak trajanja procesa ekstrakcije ovisi najviše o topljivosti komponente u otapalu, viskoznosti otapala, temperaturi i drugim čimbenicima. Ekstrakcijom se dobiva ekstrakt u kojem je sadržana tvar koju se želi odvojiti, ali prije daljnje upotrebe uobičajeno je da se provede postupak pročišćavanja.<sup>8</sup>

Osim zelene kemije, postoji i pojam zelena ekstrakcija, koja se veže na zelenu kemiju, a cilj joj je pronaći bolja alternativna otapala pogodnija za okoliš, koja se većinom temelje na obnovljivim prirodnim produktima, smanjiti upotrebu energije i osigurati što kvalitetniji ekstrakt, odnosno produkt. Postupci kojima se ekstrahira ključna komponenta, a koje je

potrebno zamijeniti ekonomičnijim su Soxhlet ekstrakcija, zbog velike potrošnje energije te ekstrakcija organskim otapalima.<sup>9</sup>

S obzirom na agregatna stanja faza postoje dvije vrste ekstrakcije, kapljevine – kapljevine i krutina - kapljevine. Prednost separacije ekstrakcijom pred destilacijom jest u puno manjem utrošku energije, jer se u pravilu provodi pri temperaturama bliskim temperaturi okoline.<sup>11</sup>

### **2.2.1. Odabir otapala**

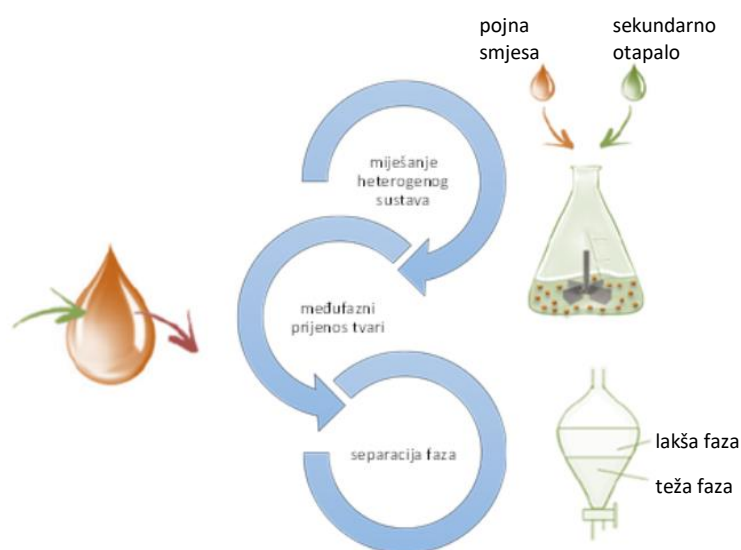
Koliko dobro će se željena komponenta ekstrahirati iz rafinatne u ekstraktnu fazu ovisi o otapalu, stoga je izbor pogodnog otapala vrlo važan za ekstrakciju. Da bi otapalo bilo pogodno za ekstrakciju mora zadovoljiti određene kriterije. Vrlo važan kriterij jest selektivnost tj. otapalo mora biti selektivno za željenu komponentu kako bi upravo nju ekstrahiralo iz početne tvari ili smjese. Osim toga, važno je da je razlika u gustoći između rafinatne i ekstraktne faze što veća kako bi se one lakše odvojile. Otapala međusobno ne smiju biti mješljiva, jer se na taj način sprječava gubitak otapala i onečišćenje obje faze. Otapalo mora biti dostupno, jeftino i sigurno za rad.<sup>10</sup> Selektivno otapalo mora imati mogućnost jednostavne regeneracije što je vrlo važno s ekološkog stajališta, jer se ne stvara novi otpad, a također i s ekonomskog, zbog manjih troškova nabave samog otapala. Osim toga, poželjno je da selektivno otapalo ima što manju viskoznost kako bi se lakše dispergiralo, a otpor prijenosu tvari smanjio. Viskoznost se može smanjiti provođenjem ekstrakcije pri povišenim temperaturama. Niski tlak para je isto tako važan kriterij pri odabiru otapala, jer otapalo ne smije biti hlapljivo kako ne bi došlo do gubitaka, osim toga hlapiva organska otapala su vrlo štetna. Otapalo mora biti toplinski i kemijski stabilno te ne smije reagirati s komponentama pojne smjese.<sup>8</sup>



### 2.2.2. Ekstrakcija kapljevina-kapljevina

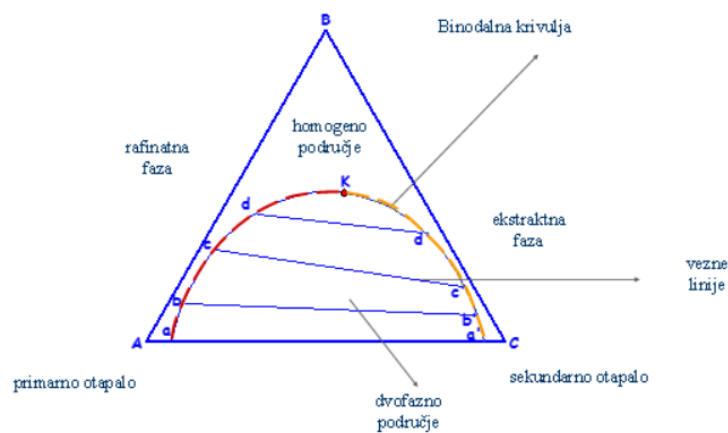
Ekstrakcija kapljevina-kapljevina odvija se u sustavu s dvije ili više kapljeviti faza između kojih dolazi do procesa prijenosa tvari i uspostavljanja ravnoteže. Koristi se za pročišćavanje kapljeviti smjesa kod kojih nije moguća separacija destilacijom pa se tako koristi za smjese komponenata niske hlapivosti, bliske hlapivosti, toplinski osjetljive komponente i kada je željena komponenta u vrlo maloj količini. Pomoćna komponenta, odnosno selektivno otapalo potiče prijenos tvari.<sup>8</sup>

Stupnjevi ekstrakcije su: miješanje pojne smjese i selektivnog otapala, međufazni prijenos tvari te separacija faza, uz uklanjanje ili regeneraciju otapala, slika 3. Prilikom miješanja dolazi do povećanja međufazne površine te disperzije jedne faze u drugoj. Nakon postizanja stupnja separacije, dolazi do razdvajanja faza na rafinatnu i ekstraktnu. Rafinatna faza se uglavnom sastoji od primarnog otapala, male količine ključne komponente te može sadržavati sekundarno otapalo u tragovima. Ekstraktna faza sadrži sekundarno otapalo, veću količinu ključne komponente i primarno otapalo u tragovima. Ekstraktna faza nakon separacije odlazi na regeneraciju, uglavnom destilacijom, gdje se kao jedan produkt dobije ključna komponenta, a drugi pročišćeno sekundarno otapalo, koje se vraća natrag u ekstraktor i koje i nakon čišćenja može sadržavati određeni udio ključne komponente.<sup>8</sup>



**Slika 3.** Koraci u procesu ekstrakcije kapljevina-kapljevina.<sup>8</sup>

Najjednostavniji sustavi su dvofazni trokomponentni koji se prikazuju u trokutnom dijagramu, slika 4. Dodatkom otapala u dvokomponentni sustav može doći do nastajanja homogene otopine odnosno potpuno mješljivog sustava, koji nije pogodan za ekstrakciju. Primarno i sekundarno otapalo mogu biti potpuno nemješljivi, djelomično mješljivi ili mogu nastati dvije ili više djelomično mješljivih faza. Kao što je već spomenuto, idealno je kad su otapala međusobno nemješljiva, ali u praksi su takvi slučajevi rijetki pa se često koriste otapala koja su djelomično mješljiva.<sup>8</sup>

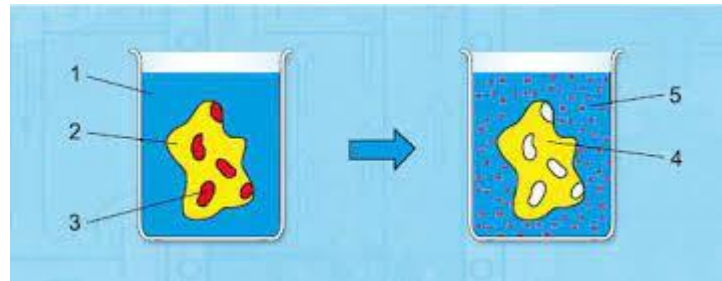


**Slika 4.** Trokutni dijagram dvofaznog trokomponentnog sustava.<sup>8</sup>

### 2.2.3. Ekstrakcija krutina - kapljevina

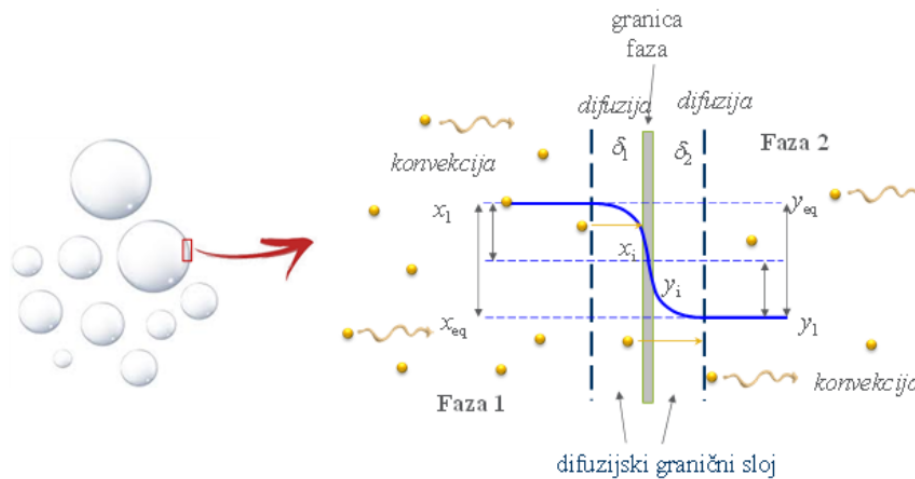
Ekstrakcija krutina - kapljevina (engl. *solvent liquid extraction*, SLE) predstavlja separacijski proces izdvajanja određene komponente iz krute tvari uz pomoć selektivnog otapala, odnosno kapljevine, slika 5. Taj se proces još naziva i izluživanje te je jedan od najčešće upotrebljavanijih procesa separacije aktivnih komponenti iz biljnih materijala. Prvi stupanj ekstrakcije je miješanje, koji se kod ekstrakcije krutina-kapljevina naziva suspendiranje. Suspendiranjem se sprječava sedimentacija krutine i osiguravaju uvjeti za bolji prijenos tvari. Osim mehaničkog miješanja, ekstrakcija se može provoditi pomoću ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja.<sup>12</sup> Ovaj tip ekstrakcije može se provoditi kao maceracija ili perkolacija. Maceracija je šaržni proces koji se odvija u suspenziji, tako da se kruta tvar potopi u otapalo te

se na granici faza krutina-kapljevina odvija prijenos tvari, dok je perkolacija polušaržni proces, koji se odvija na način da otapalo protječe kroz nepokretan sloj čvrstog materijala.<sup>12</sup>



**Slika 5.** Ekstrakcija krutina-kapljevina.<sup>8</sup>

Za bolju ekstrakciju važno je prethodno pripremiti samu krutinu kako bi se ekstrakt što brže ekstrahirao. Krutina se za te potrebe može gnječiti, mrviti i usitnjavati kako bi se osigurala veća međufazna površina i postigla veća učinkovitost ravnotežnog separacijskog procesa. Nakon toga provodi se miješanje kako bi se ostvarila što bolja interakcija među fazama, brža uspostava ravnoteže, bolji prijenos tvari između kapljevine, odnosno otapala i krutine i reduciralo vrijeme trajanja procesa. Tijekom tog procesa, otapalo ulazi u pore krutog materijala kako bi došlo do željene komponente, koja se nalazi u krutini i prenijelo ju u otapalo. Na površini željene komponente se stvara granični sloj odnosno sloj zasićene otopine te se između tog graničnog sloja i ostatka otapala stvara koncentracijski gradijent zbog razlika u koncentraciji što omogućuje stalan prijelaz komponente u ostatak otapala (slika 6.). Ovisno o debljini graničnog sloja mijenja se brzina izluživanja i to obrnuto – proporcionalno, koja proporcionalno ovisi i o razlici koncentracija između graničnog sloja i otapala.<sup>12</sup>



**Slika 6.** Mehanizam prijenosa tvari tijekom ekstrakcije.<sup>8</sup>

Procesom ekstrakcije ne može se potpuno izdvojiti željena komponenta odnosno ekstrakt, jer velik dio komponente ostane u krutini iz koje ju ekstrahiramo. Otapala je potrebno nakon procesa regenerirati ukoliko se žele ponovno upotrijebiti te podvrgnuti nekim od separacijskih procesa, što je često dio procesa na koji se najviše troši i potrebna je energija.<sup>12</sup>

Na ekstrakciju krutina-kapljevina najviše utječu veličina čestica, temperatura provedbe ekstrakcije, izbor selektivnog otapala, način miješanja i način izvođenja samog procesa ekstrakcije. Temperatura je većinom proporcionalna s brzinom otapanja krutine pa tako viša temperatura najčešće povećava brzinu procesa, smanjuje viskoznost i gustoću otapala, ali to nije uvijek slučaj tako da je važno upoznati se s fizikalno-kemijskim karakteristikama sustava za koji se ekstrakcija provodi.<sup>12</sup> Smanjenje veličine čestica pozitivno utječe na prijenos tvari, jer manje čestice omogućuju veću kontaktnu površinu između dvije faze.

## 2.3. OTAPALA

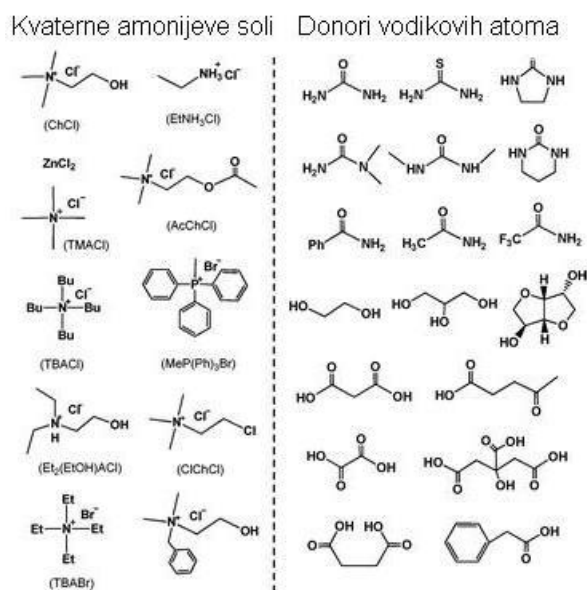
### 2.3.1. Konvencionalna otapala

Konvencionalna otapala, odnosno hlapljivi organski spojevi (engl. *volatile organic compounds*, VOC), kao na primjer etil-acetat, potječu iz petrokemijskih izvora, nafte i koriste se za izdvajanje polifenola iz biomase, međutim ta otapala imaju mnogo nedostataka. Neki od tih nedostataka su njihova velika hlapljivost, toksičnost, zapaljivost, opasni su za okoliš i ljudsko zdravlje. Uz njih, predložena je i voda kao otapalo pogodno za ekstrakciju polifenola, koje nije toksično i ekološki je prihvatljivo. Međutim, voda je specifično otapalo za hidrofilne i polarne spojeve, zbog čega nije baš učinkovita za nepolarne i hidrofobne spojeve i može sadržavati brojne nečistoće.<sup>13</sup>

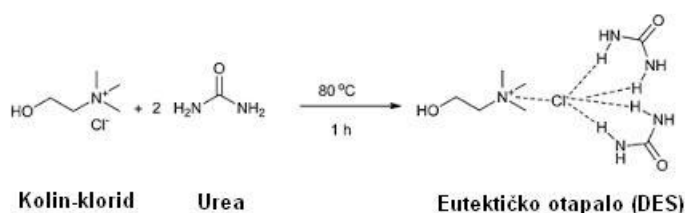
### 2.3.2. Ionske kapljevine

Kao novi izbor, predložene su ionske kapljevine (engl. *ionic liquids*, IL), organske nehlapljive soli, koje su građene od iona, a ne molekula, kao klasična otapala. Anioni u ionskim kapljevinama su najčešće halogenidi ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ), acetatne, sulfatne i druge skupine. Kationi su tipično organske molekule s pozitivnim dušikovim, sumporovim, fosforovim atomom.<sup>11</sup> Imaju nisko talište, zanemariv tlak pare, dobru kemijsku i toplinsku stabilnost.. Prema procjeni, postoji vrlo velik broj ( $10^{18}$ ) mješavina ionskih kapljevine koje bi mogle biti prikladne kao otapala (slika 7.). Kombinacijom raznih aniona i kationa moguće je prilagođavati različita svojstva kako bi se dobile željene vrijednosti viskoznosti, topljivosti i slično.<sup>11</sup> Bez obzira na navedene potencijale ionskih kapljevine imaju i brojne nedostatke koji značajno smanjuju njihovo korištenje. Problemi koji se javljaju kod ionskih kapljevine su njihova visoka toksičnost, visoki troškovi sinteze, slaba biorazgradljivost i teško pročišćavanje. Zbog svih navedenih problema sa dotadašnjim otapalima bilo je potrebno pronaći otapala koja su učinkovitija i uzimaju u obzir utjecaj na okoliš.





**Slika 8.** Strukture komponenta koje se najčešće koriste u izgradnji DES-ova.<sup>10</sup>



**Slika 9.** Priprava DES-a iz kolin-klorida i uree.<sup>10</sup>

### 2.3.4. NADES

Još bolju verziju zelenih otapala čine prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *natural deep eutectic solvent*, NADES). NADES su kapljevine odnosno smjese koje sadrže najviše šećere, organske kiseline, aminokiseline, alkohole tj. pripremljeni su od staničnih metabolita<sup>16</sup> odnosno kombinacijom molekula prisutnih u prirodi.<sup>6</sup> Naziv "prirodni" također se veže uz to da kao kapljevit faza mogu imati važnu ulogu u otapanju, skladištenju i transportu metabolita koji nisu topivi u vodi, a koji se nalaze u živim stanicama i organizmima.<sup>6</sup> Također, NADES sadrže spojeve koji su sigurni za ljudsku upotrebu.<sup>17</sup> Kao i DES-ovi nastaju

kombinacijom donora i akceptora vodikovih veza, povezanih jakim međumolekulskim silama, posebice vodikovim vezama. Nazivaju se i "dizajnerska otapala" zbog mogućnosti prilagodbe njihovih fizikalno-kemijskih svojstava i mogućih brojnih varijacija u strukturi,<sup>17</sup> zbog čega su vrlo prikladna za upotrebu u različitim procesima pa se tako mogu upotrebljavati u enzimatskim reakcijama, elektrokemiji, ali i za ekstrakciju prirodnih spojeva.<sup>16</sup> Fizikalno- kemijska svojstva NADES-a, kao što je velika viskoznosti i niski pH, pružaju im sposobnost da usporavaju degradaciju bioaktivnih komponenti dobivenih ekstrakcijom. Topljivost bioaktivnih komponenti povećavaju šećeri iz NADES-a stvarajući dodatne vodikove veze i pospješujući stabilnost spojeva u ekstraktima.<sup>16</sup>

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Zadatak**

U eksperimentalnom dijelu okarakterizirano je odabrano otapalo La-Fru-Gly (2:1:2) s različitim udjelima vode, određena mu je gustoća, pH, viskoznost i polarnost. Također je provedena ekstrakcija polifenola iz lista trputca s navedenim otapalom te je određena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva. Promatran je i utjecaj toksičnosti otapala na češnjaku.

#### **3.2. Priprema otapala**

Otapala su pripremljena miješanjem komponenata, prikazanih u tablici 1, u određenim molarnim omjerima te su miješana pod vakuumom (slika 10) i zagrijavana do 60°C do pojave bistre kapljevine. Naknadno je u pripremljene NADES-e dodavan određeni maseni udio vode.



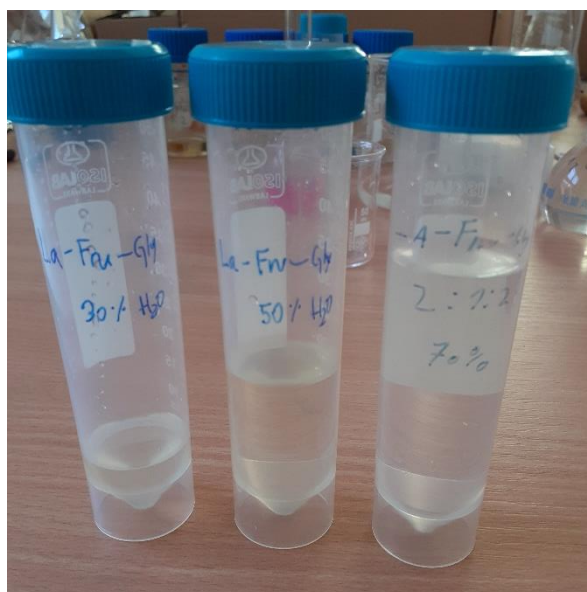
**Tablica 1.** Pripremljena otapala.

<b>NADES</b>	<b>Oznaka</b>	<b>Molarni omjer</b>	<b>Maseni udio vode <math>w(\text{H}_2\text{O})</math>, %</b>
betain-glicerol	Bet-Gly	1:3	0 10 70
betain-fruktoza-glicerol	Bet-Fru-Gly	1:1:20	0 10 70
betain-glukoza-glicerol	Bet-Glu-Gly	4:1:20	0 10 70
jabučna kiselina-glicerol	Ma-Gly	1:4	0 10 70
mliječna kiselina-glicerol	La-Gly	1:1	0 10 70
mliječna kiselina-glicerol	La-Gly	1:2	0 10 70
mliječna kiselina-glicerol	La-Gly	2:1	0 10 70
mliječna kiselina-fruktoza-glicerol	La-Fru-Gly	2:1:2	30 50 70



**Slika 10.** Vakuum isparivač *IKA RV 10 basic*.

Otopina La-Fru-Gly (2:1:2) koja se karakterizirala i koristila za ekstrakciju, s masenim udjelima vode od 30%, 50% i 70%, prikazana je na slici 11.



**Slika 11.** Pripremljeni uzorci NADES-a.

### 3.3. Fizikalno – kemijska karakterizacija NADES-a

#### 3.3.1. Mjerenje gustoće

Nakon provedene ekstrakcije, odabranom NADES-u (La-Fru-Gly 2:1:2) određivana je gustoća pomoću digitalnog uređaja za mjerenje gustoće *Mettler Toledo Densitometer 30PX*, koji je prikazan na slici 12. Mjerenje gustoće provedeno je 3 puta na sobnoj temperaturi te je određena srednja vrijednost gustoće.



**Slika 12.** Uređaj za mjerenje gustoće *Mettler Toledo Densitometer 30PX*.

#### 3.3.2. Mjerenje viskoznosti

Viskoznost NADES-a određivana je sa termostatiranim reometrom *Brookfield DV-111 ULTRA*, prikazanog na slici 13, uz primjernu koncentričnog vretena *SC4-21*. Rotacijsko tijelo potrebno je uroniti u uzorak NADES-a i pomoću računalnog programa *Rheocalc 3.2* obrađuju se podaci, koji prikazuju ovisnost smičnog naprezanja o smičnoj brzini. Iz ove ovisnosti određuje se reološki model ponašanja pojedinog uzorka, odnosno njegova viskoznost. Raspon smičnih brzina pri kojima je određeno reološko ponašanje DES-a bio je od 0 do  $180 \text{ s}^{-1}$ .



**Slika 13.** *Brookfield DV-111 ULTRA* reometar za određivanje viskoznosti.

### 3.3.3. Mjerenje pH

pH vrijednost NADES-a izmjerena je pomoću uređaja *WTW InoLab pH/Cond 740* ( pH electrode *Blue Line* ) prikazanog na slici 14. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 26,7 °C.



**Slika 14.** pH elektroda *BlueLine*.

### 3.4. Polarnost

Uzorcima NADES-a određivana je polarnost na UV/VIS spektrofotometru (*UV-1280*), *SHIMADZU*, prikazanom na slici 15, korištenjem *Nile Red* boje. Da bi se snimio spektar na UV/VIS-u pripremljena je otopina od 2 mL *Nile Red* boje i 2 mL uzorka NADES-a. Za izračun polarnosti potrebna je valna duljina maksimuma apsorbancije, očitana na spektrofotometru. Najmanja vrijednost valne duljine odgovara najviše polarnom NADES-u te se za izračun polarnosti koristi jednadžba (1)<sup>19</sup>.

$$E_{NR} \left[ \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \right] = 28591 \times \lambda_{max}^{-1} [\text{nm}] \quad (1)$$



**Slika 15.** UV/VIS spektrofotometar (*UV-1280*) *SHIMADZU*.

### 3.5. Ekstrakcija

Ekstrakcija je provedena primjenom *Rotamix 609 MM*, *Tehnica* magnetne miješalice. Uzorak trputca pomiješan je s otapalom u masenom omjeru 0,6 g/15 g. Uzorci su miješani na magnetnoj miješalici, prikazanoj na slici 16, 2 sata pri 300-400 okretaja po minuti. Kako bi se odvojio ekstrakt, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 3500 okretaja po minuti, na centrifugi, prikazanoj na slici 17. Uzorci su nakon toga filtrirani pomoću Buchnerovog lijevka,

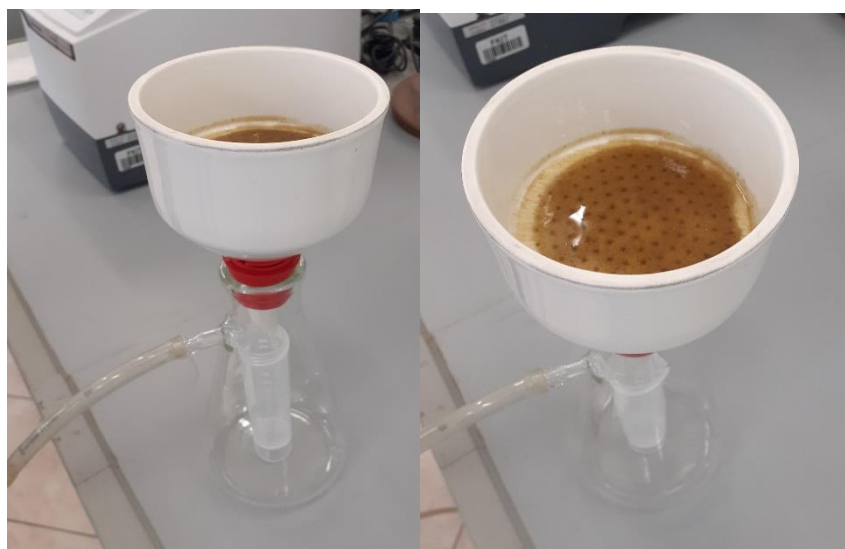
prikazanog na slici 18. Filtracija je dalje provedena pomoću *Chromafil Xtra 45/25* ( 0,45  $\mu\text{m}$  ) filtera.



**Slika 16.** *Rotamix 609 MM, Tehnica* magnetna miješalica.



**Slika 17.** Centrifuga *CENTRIC 322 A Tehnica*.



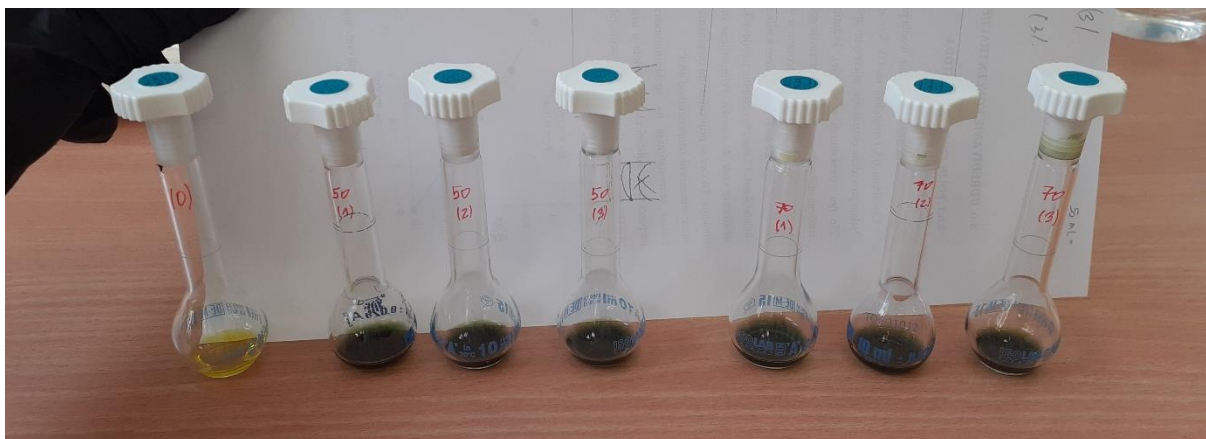
**Slika 18.** Filtracija pomoću Buchnerovog lijevka.

### **3.5.1. Folin – Ciocalteu metoda**

Profiltrirani uzorci korišteni su za određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva Folin- Ciocalteu metodom.

*Opis Folin - Ciocalteu metode.*

Za navedeni NADES (La-Fru-Gly (2:1:2)) pripremljene su po tri tikvice od 10 mL za različite masene udjele vode (30%, 50%, 70%) te jedna tikvica za slijepu probu (ukupno 10 tikvica). U svaku tikvicu dodano je 400  $\mu\text{L}$  Folin - Ciocalteu reagensa. U tikvice za NADES (osim u tikvicu za slijepu probu) dodano je 60  $\mu\text{L}$  profiltriranog uzorka te su sve tikvice stavljene na 8 minuta u mrak. Nakon toga, u svaku je tikvicu dodano 4 mL 7%-tne otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  te destilirana voda do oznake. Tikvice su zamotane u foliju stavljene u termostat (slika 20) na jedan sat pri 40 °C.

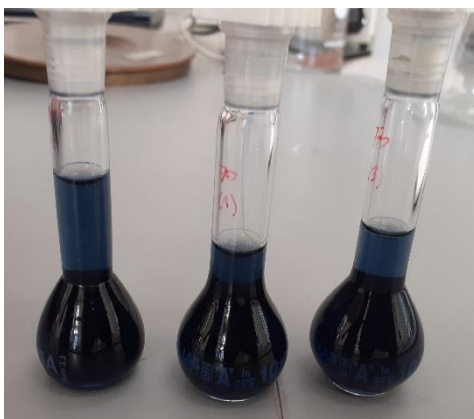


**Slika 19.** Primjer tikvice (0) te tikvica sa filtriranim NADES-om sa 50% i 70% vode u procesu pripreme Folin-Ciocalteu metodom.



**Slika 20.** Termostat *F12 Julabo*.





**Slika 21.** Primjer 70%-tne otopine nakon potpune pripreme Folin-Ciocalteu metodom.

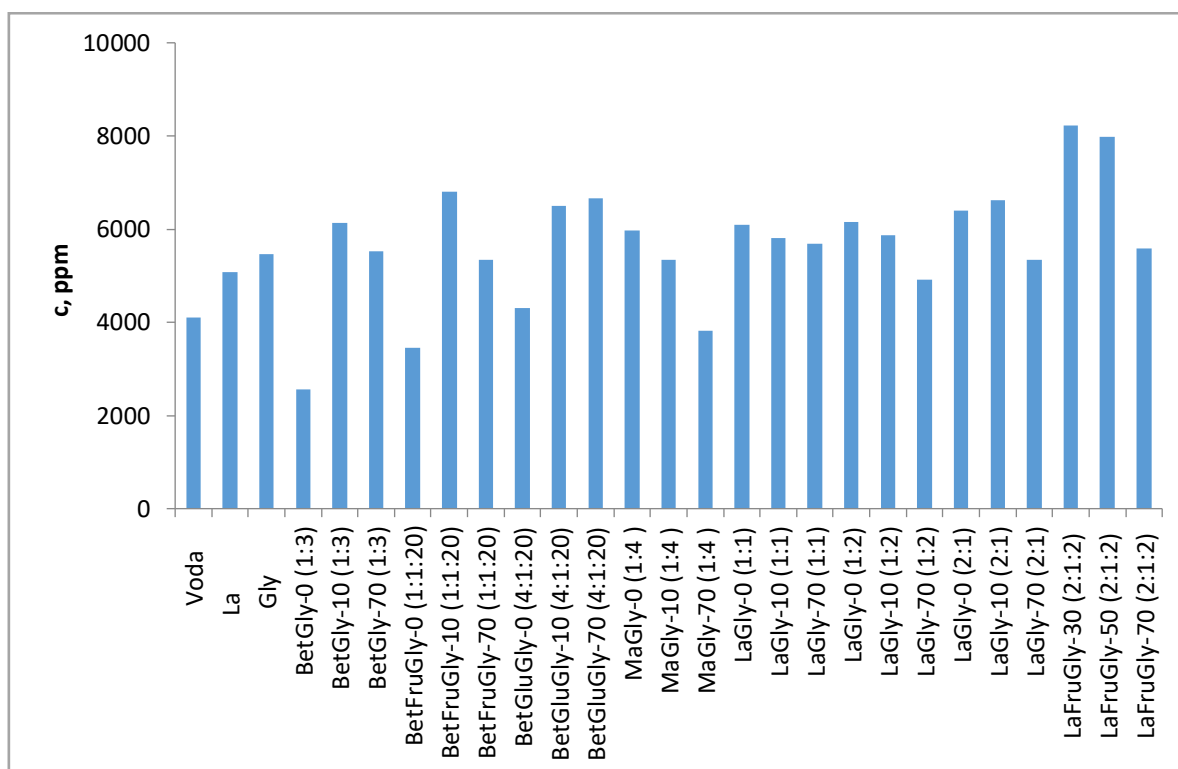
### **3.6. Određivanje toksičnosti otapala**

Očišćene i neproklijale glavice češnjaka stavljene su u uzorke NADES-a 30 mas%, 50 mas% i 70 mas% i promatrane kroz 3 mjeseca.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Odabir otapala za provedbu ekstrakcije polifenola iz lista trputca

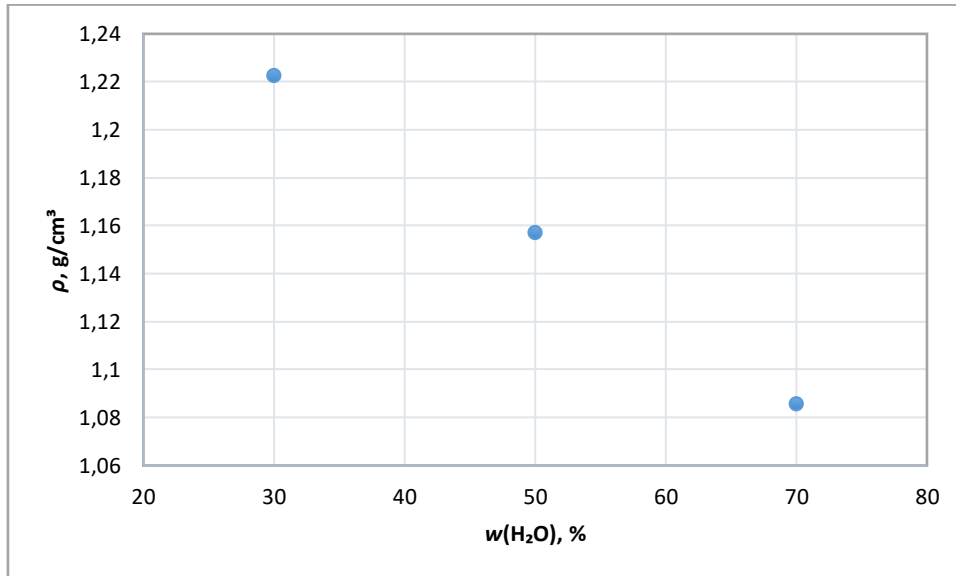
Na slici 22 navedena su sva korištena otapala i podaci za koncentraciju polifenola nakon provedene ekstrakcije.



**Slika 22.** Koncentracija ukupnih polifenola nakon ekstrakcije s različitim otapalima.

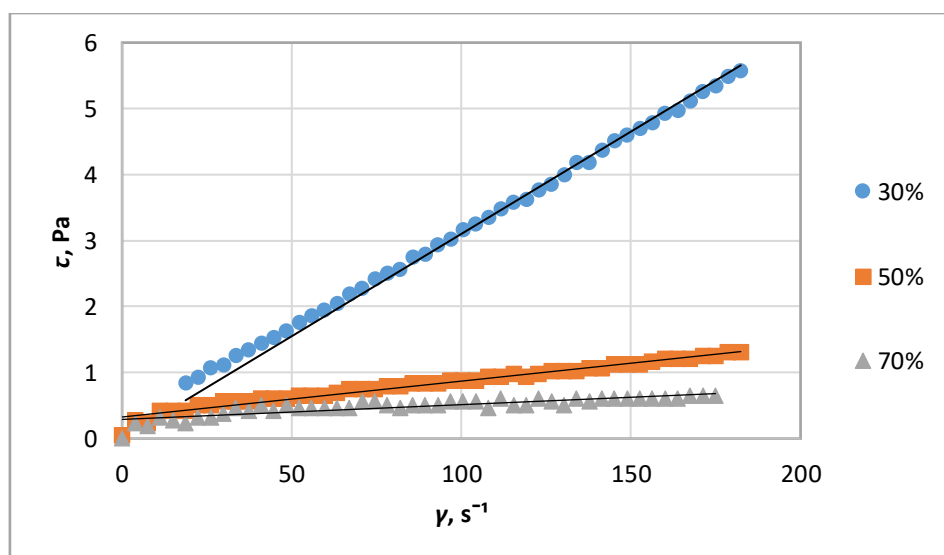
## 4.2. Karakterizacija odabranog otapala

### 4.2.1. Gustoća

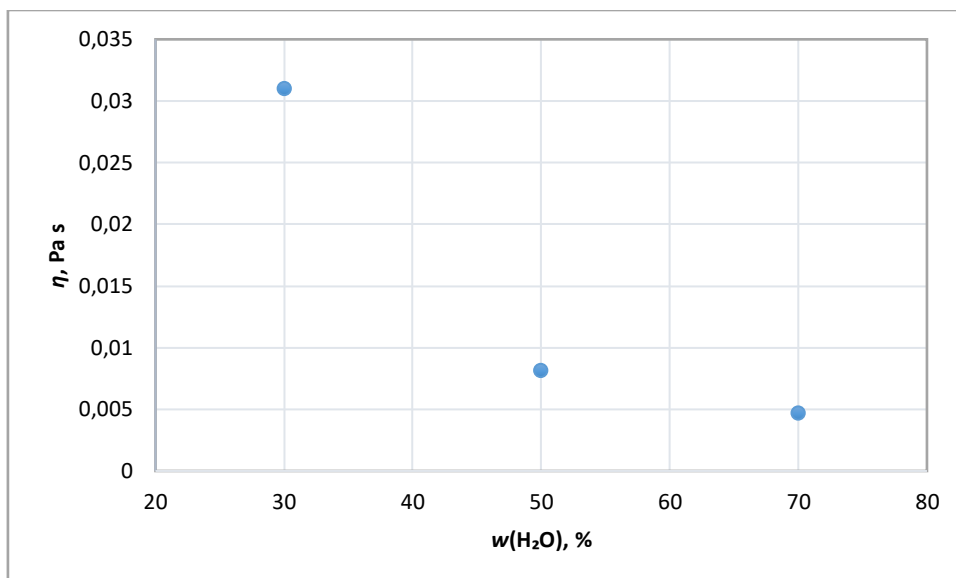


Slika 23. Ovisnost gustoće o masenim udjelima vode u NADES-u.

### 4.2.2. Viskoznost

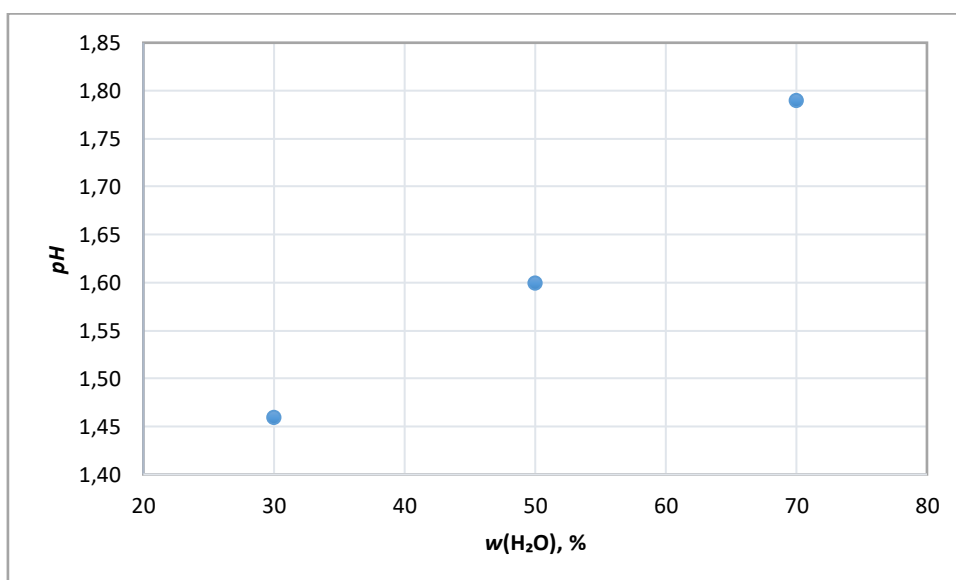


Slika 24. Ovisnost smičnog naprezanja o smičnoj brzini pri različitim masenim udjelima vode.



**Slika 25.** Ovisnost viskoznosti o masenim udjelima vode u NADES-u.

#### 4.2.3. pH



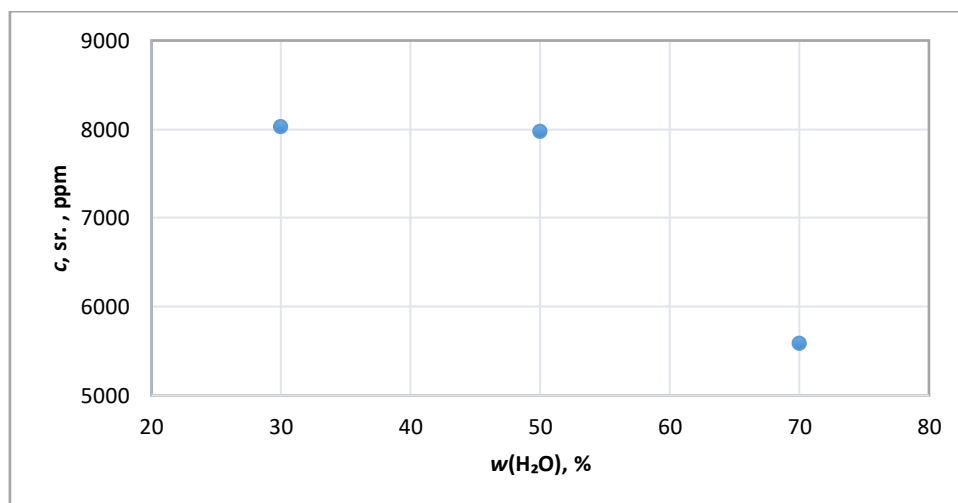
**Slika 26.** Ovisnost  $pH$  o masenim udjelima vode NADES-a.

### 4.3. Polarnost

Tablica 2. Valna duljina maksimuma absorpcije i polarnost za uzorke NADES-a.

La-Fru- Gly (2:1:2) $w(\text{H}_2\text{O}),$ %	$\lambda_{\text{max}}, \text{nm}$	$E_{\text{NR}},$ $\text{kcal}/$ $\text{mol}$
30	567,2	50,4073
50	571,2	50,0543
70	573,2	49,8796

### 4.4. Ekstrakcija

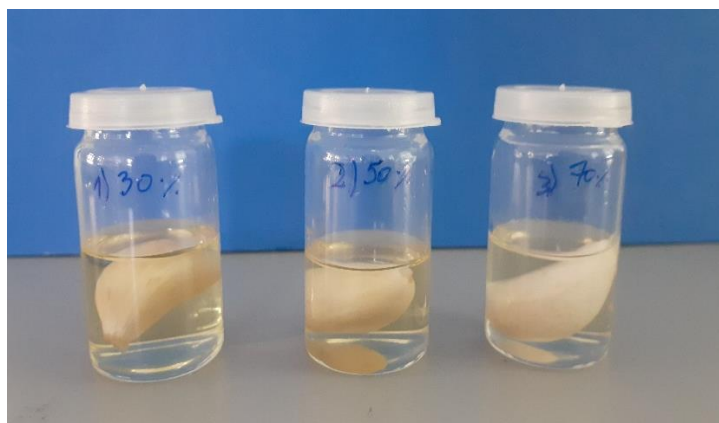


Slika 27. Ovisnost masenog udjela vode NADES-a sa srednjom koncentracijom.

#### 4.5. Određivanje toksičnosti otapala



**Slika 28.** Češnjak u uzorcima NADES-a na početku ispitivanja.



**Slika 29.** Češnjak u uzorcima NADES-a nakon mjesec dana ispitivanja.



**Slika 30.** Češnjak u uzorcima NADES-a nakon dva mjeseca ispitivanja.



**Slika 31.** Češnjak iz uzoraka NADES-a nakon dva mjeseca ispitivanja.



**Slika 32.** Češnjak iz uzoraka NADES-a nakon tri mjeseca ispitivanja.

## 5. RASPRAVA

Na temelju ispitanih otapala u postupku ekstrakcije polifenola (slika 22), odabrano je otapalo koje je izdvojilo najveću količinu ukupnih polifenola.

Slika 22. prikazuje koncentracije ukupnih polifenola nakon ekstrakcije s različitim otapalima. Navedena otapala ispitivana su s udjelima vode od 0, 30, 50 i 70 mas%. Očekivano je da otapala bez dodatka vode, najbolje izdvajaju polifenole iz trputca, međutim otapala bez dodatka vode pokazala su se previskozna, što je dovelo do problema s njihovom pripremom i miješanjem komponenata. Zbog toga je dodavana određena količina vode u otapala. Na slici se vidi da najveću koncentraciju većinom pokazuju otapala s 10 mas% vode, dok koncentracija opada u otapalima sa 70 mas% vode. Neka otapala, koja nisu bila previskozna, pokazuju očekivani trend porasta ekstrahiranih otapala sa smanjenjem udjela vode, npr. La-Gly 1:1, La-Gly 1:2 te La-Fru-Gly 2:1:2. To je dokaz da su otapala bez vode prema svojoj strukturi i vezama u njima najbolja za ekstrakciju u ovom slučaju. Osim pripremljenih NADES-ova, ispitana je i ekstrakcija polifenola s čistim komponentama koje su korištene za pripravu NADES-ova (voda, La, Gly). Koncentracije ekstrahiranih polifenola sa čistim komponentama znatno su manje od koncentracija dobivenih s pripremljenim NADES-ovima s minimalnom količinom vode. Iako većina čistih NADES-ova daje lošije rezultate u usporedbi s rezultatima dobivenih sa čistim komponentama, može se zaključiti da je to zbog njihove velike viskoznosti i poteškoća s miješanjem.

Od svih ispitanih otapala odabrano je samo jedno za daljnje ispitivanje, ono koje je pokazivalo najbolje rezultate, a pripremljeno je od mliječne kiseline, fruktoze i glicerola (La-Fru-Gly) u molarnom omjeru 2:1:2 i udjelima vode od 30, 50 i 70 mas% (otapalo s 10 mas% je bilo previskozno). Vidljivo je da ovaj NADES i s 50 mas% vode daje bolje rezultate od ostalih otapala s 10 mas% vode, čak je i 70 mas% vode među najboljima za ekstrakciju polifenola. Odabranom NADES-u određena je gustoća, viskoznost, pH i polarnost za masene udjele vode: 30, 50 i 70%. Karakterizacija za niži udio vode nije određena zbog prevelike gustoće i viskoznosti. Poznavanje fizikalno-kemijskih svojstava važno je kako bi se odredilo koje je otapalo najbolje za željenu primjenu.

Ovisnost gustoće o masenom udjelu vode NADES-a prikazana je na slici 23. Vrijednosti gustoća kreću se od 1,0854 do 1,2226 g cm<sup>-3</sup>. Može se primijetiti da gustoća linearno pada s povećanjem masenog udjela vode. Gustoća je aditivno svojstvo što znači da gustoća smjese



ovisi od gustoći NADES-a i gustoći dodane vode te njihovom udjelu u smjesi. Porastom udjela vode, gustoća se sve više približava vrijednosti gustoće vode.

Navedeni NADES je za sve masene udjele vode Newtonov fluid. Iz slike 24. vidljiva je linearna ovisnost smičnog naprezanja o smičnoj brzini te da pravac ide iz ishodišta. Iz nagiba pravaca tih linearnih ovisnosti određuje se viskoznost. Za Newtonove fluide je karakteristično da se viskoznost ne mijenja promjenom smične brzine, ali se znatno mijenja promjenom udjela vode, što se vidi na slici 25. Viskoznost eksponencijalno opada s porastom udjela vode. Može se uočiti puno veća vrijednost viskoznosti za 30%-tni sadržaj vode, nego za 50%-tni i 70%-tni, iz čega se također može zaključiti da bi ovaj NADES s 10% vode zaista bio previskošan i pretežak za rukovanje i upotrebu, kao što je već spomenuto.

Iz slike 26. vidljivo je da se ispitivani NADES nalazi u izrazito kiselom području. pH NADES-a linearno raste s povećanjem udjela vode, tj. kiselost NADES-a se smanjuje dodavanjem sve većeg sadržaja vode. Na temelju istraživanja<sup>17</sup> pokazano je da pH raste s povećanjem sadržaja vode za one eutektičke smjese koje imaju izrazito niski pH (<2), dok za one koje imaju pH veći od 2 opada. Jake vodikove veze između HBD i HBA snažno utječu na kiselost NADES-a.

U tablici 2 prikazane su vrijednosti za valne duljine maksimuma absorbancije i polarnosti te se može zaključiti da porastom masenog udjela vode polarnost NADES-a opada, a valna duljina raste. Polifenolni spojevi su, kao i NADES-i, polarni te sve veći dodatak vode u otapala smanjuje njihovu polarnost, što tada može negativno utjecati na ekstrakciju polifenola.

Na slici 27. prikazana je ovisnost koncentracije odabranog NADES-a o masenim udjelima vode, gdje se vidi da koncentracija otapala opada sa sve većim sadržajem vode. Kako je već rečeno, povećanje udjela vode negativno utječe na ekstrakcijsku sposobnost otapala.

Slike 28.-32. prikazuju glavice češnjaka u odabranom NADES-u koje su se promatrale kroz tri mjeseca i slikane svakih mjesec dana. Prema slikama 31. i 32. lako je vidljivo da najbolje izgleda glavica češnjaka koja se nalazila u 70 %-tnom NADES-u, odnosno najrazrjeđenijem, dok je u koncentriranijim uzorcima došlo do raspada češnjaka. NADES-i dakle u određenoj mjeri mogu prouzročiti štete na stanicama, međutim održivost stanica poboljšana je dodatkom vode. Naime, češnjak se u vodi nakon samo par dana raspada i trune. Također, utvrđeno je da održivost stanica u prisutnosti DES-a ovisi i o udjelu vode.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu pripremljeno je 8 prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala koja su korištena za ekstrakciju polifenola iz trputca.

Zbog velike gustoće i viskoznosti u otapala je dodana voda u različitim masenim omjerima.

Ekstrahirana količina polifenola smanjuje se povećanjem udjela vode u otapalu, međutim kada su otapala jako viskozna, mali dodatak vode (10 mas%) smanjuje viskoznost te pospješuje ekstrakciju polifenola.

Najbolja ekstrakcija postignuta je primjenom La-Fru-Gly (2:1:2) otapala uz dodatak vode od 30 mas%.

Određena je ovisnost gustoće, viskoznosti i pH o masenom udjelu vode u otapalu. Ispitana je i polarnost, kao i utjecaj toksičnosti otapala na češnjak.

Kao i viskoznost, gustoća i polarnost opadaju porastom udjela vode u otapalu, dok pH raste.

Ispitujući utjecaj toksičnosti NADES-a na glavicu češnjaka, pokazalo se da La-Fru-Gly ima toksični učinak, iako se toksičnost smanjuje s povećanjem udjela vode, međutim puno manje je toksično u usporedbi s konvencionalnim otapalima ili ionskim kapljevinama.

## 7. POPIS SIMBOLA

### Simboli:

$T$  – temperatura, °C

$w(\text{H}_2\text{O})$  – maseni udio vode, %

$E_{NR}$  – polarnost, kcal mol<sup>-1</sup>

$c$  – koncentracija, ppm

### Grčka slova:

$\lambda$  – valna duljina, nm

$\rho$  – gustoća, kg m<sup>-3</sup>

$\tau$  – smično naprezanje, Pa

$\gamma$  – smična brzina, s<sup>-1</sup>

$\eta$  – dinamička viskoznost, Pa s

## 8. LITERATURA

- [1] <https://pfaf.org/user/cmspage.aspx?pageid=139> (pristupljeno 27.05.2021.)
- [2] <https://www.krenizdravo.hr/zdravlje/alternativna-medicina/biljna-ljekarna/trputac-korov-koji-zacjeljuje-rane-i-zaustavlja-prehladu-i-upale-probavnog-sustava> (pristupljeno 27.05.2021.)
- [3] <https://www.adiva.hr/nutricionizam/ljekovito-bilje/mali-neugledni-trputac-tisucljetni-cuvar-naseg-zdravlja/> (pristupljeno 27.05.2021.)
- [4] <https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/od-cega-nas-stite-polifenoli-4709/> (pristupljeno 29.05.2021.)
- [5] M. Saxena, dr. J. Saxena, dr. A. Pradhan, Flavonoids and Phenolic Acids as Antioxidants in Plants and Human Health, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **16** (2), 2012; n°28, 130-134
- [6] M. Ruesgas-Ramon, M. Cruz Figueroa-Espinoza, E. Durand, Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compound Extraction: Overview, Challenges and Opportunities, *J. Agric, Food Chem.*, **65**, 2017, 3591-3601
- [7] <https://nutricionizam.com/flavonoidi/> (pristupljeno 29.05.2021.)
- [8] A. Sander, Ekstrakcija, skripta, 2021
- [9] M. Glasnović, Zelena otapala u ekstrakcijama bioaktivnih komponenti i eteričnih ulja, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, 2018
- [10] J. Milačić, Ekstrakcija glicerola iz biodizela sintetiziranog iz otpadnih ulja, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2016
- [11] A. Krišto, Ravnoteža kapljevina-kapljevina u sustavima s niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na osnovi betaina i propilen-glikola, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2018
- [12] A. Udovičić, Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzija u separaciji fenolnih spojeva iz komine masline, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2018
- [13] Wan M. Asyraf Wan Mahmood, A. Lorwirachsutee, C. Theodoropoulos, M. Gonzalez-Miquel, Polyol-based deep eutectic solvents for extraction of natural polyphenolic antioxidants from *Chlorella vulgaris*, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **7**, 2019, 5018-5026

- [14] KM Jeong, J. Ko, J. Zhao, Y. Jin, DE Yoo, SY Han, J. Lee, Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products, *J. Jclepro*, **151**, 2017, 87-95
- [15] Y. Wang, Y. Hu, H. Wang, M. Tong, prof. Y. Gong, Green and enhanced extraction of coumarins from *Cortex Fraxini* by ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction, *J. Sep. Sci.*, **43** (17), 2020, 3441-3448
- [16] A. Mitar, D. Kučić Grgić, J. Prlić Kardum, Ekstrakcija i ispitivanje stabilnosti polifenola komine masline u prirodnim eutektičkim otapalima, *Kem. Ind.* **68** (9-10), 2019, 407-414
- [17] A. Mitar, M. Panić, J. Prlić Kardum, J. Halambek, A. Sander, K. Zagajski Kučan, I. Radojčić Redovniković, K. Radošević, Physicochemical properties, cytotoxicity and antioxidative activity od neutral deep eutectic solvents containing organic acid, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **33** (1), 2019, 1-18
- [18] Abbott, A. P.; Capper, G.; Davies, D. L.; Munro, H. L.; Rasheed, R. K.; Tambyrajah, V., Preparation of novel, moisture – stable, Lewis – acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains, *Chem. Commun (Camb)*, (19), 2001, 2010-2011
- [19] F. Gabriele, M. Chiarini, R. Germani, M. Tiecco, N. Spredi, Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties, *J. Mol Liq*, **291**, 2019, 111301
- [20] Q. Wen, Jing-Xin Chen, Yu-Lin Tang, J. Wang, Z. Yang, Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents, *Chemosphere*, **132**, 2015, 63-69