# Stabilnost i primjena ekstrakta polifenola iz lista masline

**Barilar, Katarina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*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:149:024319

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-23**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA
PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Katarina Barilar**

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

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

Kandidatkinja **Katarina Barilar**

Predala je izrađen završni rad dana: 4. srpnja 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

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

Završni ispit održat će se dana: 7. srpnja 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA
PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Katarina Barilar**

# STABILNOST I PRIMJENA EKSTRAKTA POLIFENOLA IZ LISTA MASLINE

**ZAVRŠNI RAD**

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum
2. prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić
3. dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

*Ovaj završni rad napravljen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, 2023. godine, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Prlić Kardum.*

*Zahvaljujem mentorici Jasni Prlić Kardum što je izdvojila vrijeme i strpljivo me vodila kroz ovaj završni rad. Zahvaljujem i asistentici Ivi Zokić što mi je pomagala prilikom rada u laboratoriju te mi objašnjavala postupke rada. Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su me uvijek podržavali u školovanju, a na kraju hvala Bogu na svim spomenutim ljudima.*

# Sažetak

Fenoli su spojevi koji se nalaze u nusproduktima masline, a njihovo djelovanje može pozitivno utjecati na ljudsko zdravlje. Oni se iz nusprodukata mogu separirati ekstrakcijom pri određenim uvjetima. Pri tome je bitno odabrati prirodno otapalo koje zadovoljava kriterije zelene kemije. U posljednje vrijeme istražuju se prirodna niskotemperaturna eutektička otapala koja se dobivaju miješanjem prirodnih komponenti i imaju ogroman potencijal i mogućnosti pri ekstrakciji prirodnih komponenti iz različitih biljaka.

U sklopu ovog završnog rada istraživana je ekstrakcija polifenola iz lista masline pomoću prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala pripravljenog od mliječne kiseline, fruktoze i glicina uz dodatak vode. Otapalu je određena viskoznost, gustoća i pH-vrijednosti. Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakt je umiješan u baznu, hidratantnu kremu u različitim koncentracijama. Kreme pripremljene s manjim udjelom ekstrakta, pokazale su bolju stabilnost.

**Ključne riječi:** fenoli, ekstrakcija, prirodna niskotemperaturna eutektička otapala

# Abstract

Phenols are compounds found in olive byproducts, and their action can positively affect human health. They can be separated from byproducts by extraction under certain conditions. It is important to choose a natural solvent that meets the criteria of green chemistry. Recently, solvents have been reaserched, which are obtained by mixing natural components and have a huge potential and opportunities in extraction of natural components from different plants.

As part of this work, the extraction of polyphenols from olive leaves using a natural deep eutectic solvent composed of lactic acid, fructose, and glycine with the addition of water was investigated. The viscosity, density, and pH values of the solvent were measured. After the extraction, different amounts of the extract are combined with the moisturizer base cream. The creams with the lowest extract content were the most stable.



**Keywords:** phenols, extraction, natural deep eutectis solvent

# Sadržaj

**1.Uvod** ..... 1
**2.Teorijski uvod** ..... 2
2.1.Maslina ..... 2
2.2.Primjena nusprodukata u kozmetičkoj industriji ..... 4
2.3.Lišće masline ..... 6
2.4.Fenolni spojevi i njihov utjecaj na zdravlje ..... 8
2.5.Ekstrakcija čvrsto - kapljevito ..... 9
2.6.NADES (*Natural deep eutectic solvent*) ..... 10
2.6.1.Priprema NADES-a ..... 10
2.6.2.Karakterizacija NADES-a ..... 11
2.6.3.Primjena eutektičkog otapala u ekstrakciji biljnih komponenata ..... 13
**3.Metodika rada** ..... 14
3.1.Svrha rada ..... 14
3.2.Materijali ..... 14
3.2.1.List masline ..... 14
3.2.2.NADES ..... 14
3.3.Priprema i karakterizacija lista ..... 15
3.4.Priprema i karakterizacija NADES-a ..... 16
3.4.1.Priprema otapala ..... 16
3.4.2.Fizikalna karakterizacija otapala ..... 17
3.5.Provedba ekstrakcije ..... 18
3.5.1.Određivanje koncentracije polifenola u ekstraktu ..... 19
3.6.Priprema krema ..... 20
**4.Rezultati** ..... 21
4.1.Karakterizacija usitnjenog lista masline ..... 21
4.2.Priprema otapala ..... 23
4.3.Ekstrakcija ..... 25
4.4.Priprema i stabilnost kreme ..... 26
**5.Zaključak** ..... 28
**6.Popis simbola/kratica** ..... 29
**7.Literatura** ..... 30

# 1. Uvod

Maslina je biljka bogata ljekovitim spojevima kao što su fenolni spojevi. Zanimljiva je činjenica da je 98% fenolnih spojeva sadržano u nusproduktima masline, a tek 2% u samome plodu masline. Nusprodukti tijekom uzgoja masline i proizvodnje maslinovog ulja su koštice, lišće, otpadna voda nakon usitnjavanja (OMWW) te komina. Bacanje nusprodukata uzrokuje velike ekološke probleme kao što su nagomilavanje biološkog otpada te štetan utjecaj na tlo, vodeni i zračni ekosustav. Upravo iz tog razloga javlja se potreba za proučavanjem spojeva u nusproduktima te njihova primjena u kozmetici, medicini i drugim djelatnostima. Potražnja i istraživanje takvih spojeva najviše ovise o potrebama industrije odnosno proizvođačima.

Neki od fenolnih spojeva sadržanih u maslini su oleuropein, tirosol, hidroskitirosol, vanilinska kiselina i kavenska kiselina. Karakterizira ih protuupalno, antimikrobno, antikancerogeno, antioksidativno djelovanje te smanjuju bol. Upravo ta svojstva spojeva se promjenjuju u raznim granama industrije. Tako se u prehrambenoj industriji fenolni spojevi koriste kao sredstva za održavanje svojstva hrane. U kozmetičkoj industriji postoji mnogo proizvoda na bazi fenolnih spojeva s ciljem hidratacije kože, očuvanja zaštitne barijere te sprječavanja starenja kože uzrokovanog fotooštećenjima. U medicini se fenolni spojevi koriste kao sastavni dio lijeka protiv tumora, lijekova za dijabetes te smanjenje masnog tkiva. [1, 2]

Kao metoda separacije polifenola iz masline koristi se ekstrakcija čvrsto-kapljevito odnosno izluživanje. Selektivno otapalo mora ispuniti dugi niz kriterija što se tiče separacije te ekološkog i ekonomskog gledišta. Iz tog razloga se u ekstrakciji često koriste prirodna nikotemperaturna eutektička otapala. To su smjese dviju ili više prirodnih komponenata, čije je talište same smjese niže od tališta pojedinih komponenata. Potrebno je pomno odabrati sastojke otapala kako bi se ostvarila odgovarajuća svojstva odnosno pH-vrijednost, gustoća, viskoznost, polarnost tr selektivnost pri izdvajanju ključne komponente. Uz vrstu sastojaka bitno odrediti njihov optimalan molarni omjer te eventualni dodatak vode. Nizom eksperimenata dokazano je da ovakva selektivna otapala imaju veću separacijsku moć od konvencionalnih selektivnih otapala kao što su metanol, etanol i druga organska otapala te njihove smjese s vodom. [3, 4]

U ovom radu pripremljeno je otapalo od mliječne kiseline, fruktoze i glicerola uz dodatak vode te je provedena ekstrakcija polifenola iz lista masline. Pripremljeni ekstrakti umiješani su u baznu hidratantnu kremu u različitim postotcima.

# 2. Teorijski uvod

## 2.1. Maslina

Maslina (lat. *Olea europaea*) ili uljika je zimzeleno razgranato stablo koje može narasti od 3 do 13 metara u visinu. Jedan je od glavnih sastojaka mediteranske prehrane u obliku stolne masline i maslinovog ulja (Slika 1.). [5]

**Slika 1.** Drvo masline i maslina kao prehrambeni proizvod. [6, 7]

Prilagođena je ekstremnim uvjetima, pa joj tijekom rasta treba svjetlo visokog intenziteta. Prema statistici prosječan plod masline sastoji se od 50% vode, 22% ulja, 19.1% ugljikohidrata, 5.8% celuloze, 1.6% proteina, 1.5% minerala. Upravo zbog takvog sastava ima protupalno, antimikrobno te antioksidativno djelovanje, pa se često koristi u medicini. Još od davnina maslina se koristila u razne svrhe (hrana, ogrjev, građa). Na primjer, Egipčani su koristili maslinovo ulje za izradu krema i parfema, a Rimljani za održavanje mekane kože. Danas se u Hrvatskoj maslina najviše uzgaja na područjima od Istre do Dalmacije, a primjenjuje se većinom u prehrani i kozmetici. U Europskoj Uniji proizvede se oko 67% maslinovog ulja, koje se zatim plasira na svjetsko tržište. Otprilike 4 milijuna hektara zemljišta namijenjeno je upravo za uzgoj maslina. [8]

Ekstrakcija maslinovog ulja je složen proces kojem prethodi pranje, sušenje te usitnjavanje. Može se obavljati kao diskontinuirani proces (tradicionalno prešanje) i kontinuirani proces (centrifugacija). Uzrokuje probleme za okoliš, zato što tijekom procesa

zaostaju visokoonečišćene otapdne vode i krute, otpadne tvari. Nusprodukti u proizvodnji su koštice, lišće, otpadna voda nakon usitnjavanja te komina. Oni sadrže velik udio fenolnih spojeva, koje karakteriziraju niska pH-vrijednost, visoka vodljivost te snažna antioksidativna svojstva, što ima negativan utjecaj na tlo, vodene i zračne ekosustave. U tablici 1. prikazani su nusprodukti masline i njihove bioaktivne komponente.

**Tablica 1.** Sastav lista masline i drugih nusprodukata.

| NUSPRODUKT | BIOAKTIVNA KOMPONENTA |
|---|---|
| List masline | ➢ flavoni<br>➢ flavonoli<br>➢ flavan-3-oli<br>➢ substituirani fenoli<br>➢ sekoiridoidi |
| Komina | ➢ celuloza<br>➢ polisaharidi<br>➢ hemicelulozni polimeri<br>➢ ksiloglukani<br>➢ fenoli |
| Otpadna voda (OMWW) | ➢ organska tvar (dušik, fosfor, kalij, magnezij)<br>➢ fenolni spojevi<br>➢ šećeri<br>➢ organske kiseline |
| Koštice | ➢ celuloza<br>➢ sjemensko ulje bogato polinezasićenim masnim kiselinama<br>➢ fenolni spojevi |

Jedan hektar stabla maslina daje otprilike 2500 kg maslina, dok 100 kg obrađene masline daje 35 kg krutog otpada. Samo lišće kao otpadna tvar zauzima 5% mase maslina. Štetno djelovanje na okoliš može se spriječiti njihovim ponovnim iskorištavanjem, na čemu se treba intenzivno raditi. [2, 9]

## 2.2. Primjena nusprodukata u kozmetičkoj industriji

S ekološkog i ekonomskog stajališta nusprodukti imaju velik potencijal za iskorištavanje u kozmetičkoj industriji (Slika 2.). Prije upotrebe ekstrakata potrebno je provesti testove stabilnosti i toksičnosti, kako bi se spriječilo neželjeno djelovanje na organizam. Aktivnost sastojaka nusprodukta ovisi o njihovoj pokretljivosti kroz kožnu barijeru te koncentraciji u sastavu. Manje topljive molekule s lipofilnim i hidrofilnim svojstvima bolje prolaze kroz vanjski sloj epiderme od čestica, polimera i drugih visokolipofilnih tvari.

**Slika 2.** Linija proizvoda s ekstraktima masline. [10]

Jedno od važnih svojstava biljnih ekstrakata masline koje se koristi je antioksidativno djelovanje. Ono se koristi u kozmetici za sprječavanje uzroka starenja ograničavanjem biokemijskih posljedica oksidacije. Vanjski utjecaji kojima je koža izložena mogu uzrokovati oštećenja jezgri stanica kože tijekom formiranja reaktivnih oksidirajućih oblika (ROS) i drugih slobodnih radikala. Antioksidativni stres je neravnoteža između antioksidansa i ROS u suvišku. Koža koristi antioksidanse kako bi se mogla boriti protiv fotooštećenja uzrokovanim UV-zrakama, imunološke disfunkcije i ostalih bolesti kože. U kozmetici se koriste proizvodi (serumi, kreme…) kojima se antioksidansi izravno nanose na kožu kao izvor zaštite i smanjenja utjecaja slobodnih radikala iz unutarnjih i vanjskih izvora. Prema istraživanjima većina antioksidansa iz masline su polifenoli i izoflavoni.

Velik udio mononezasićenih kiselina u profilu masnih kiselina nusprodukata daje velik potencijal za iskorištavanje u kozmetičkoj industriji. Masne kiseline su izvor energije u tijelu te igraju važnu ulogu u strukturi kože, živčanog sustava, lipoproteina i bioloških membrana. Utječu na pravilnu funkciju epiderme i lojnih žlijezdi na način da se nalaze ugrađene u složene lipide ili u slobodnom obliku. Kao komponente lipidnog filma održavaju kožu hidratantnom,

mekom, elastičnom te predstavljaju zaštitnu barijeru. Tijekom života se na sadržaj masnih kiselina može utjecati korištenjem proizvoda od masline koji se dobro upijaju u epidermalne i dermalne slojeve tkiva. One održavaju kožu hidratiziranom te sprječavaju bolesti kao što su atopijski dermatitis, psorijaza, akne i ekcemi.

Nusproizvodi masline bogati su mineralima, koji su među glavnim komponentama prirodnog hidratantnog faktora (NMF) povezanog sa stanjem hidratacije, krutosti te pH-vrijednosti vanjskog dijela kože. Ostale komponente NMF-a su krute aminokiseline, laktati, šećeri, urea i ostali ioni topljivi u vodi. U tablici 2. prikazani su opisani sastojci nusprodukta i njihovi efekti na kožu. [2]

**Tablica 2.** Sažetak utjecaja pojedinih sastojaka nusprodukta na kožu.

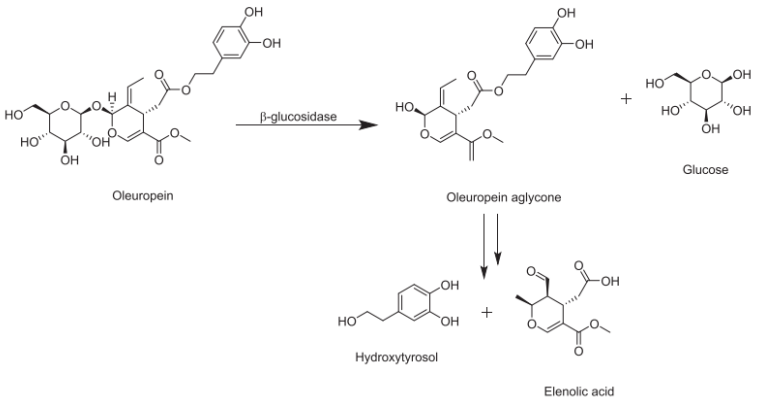
| **SASTOJAK NUSPRODUKTA** | **EFEKT NA KOŽU** |
|---|---|
| skvalen, β-sitosterol | ✓ omekšavanje kože |
| hidroksitirosol | ✓ antimikrobna aktivnost<br>protuupalna aktivnost |
| celuloza, polisaharidi, hemicelulozni polimeri | ✓ hidratacija kože<br>✓ zadržavanje ulja u koži |
| koštice | ✓ eksfolijacija kože |
| masne kiseline | ✓ regulacija epidermalne homeostaze<br>✓ povećanje kiselosti vanjskog sloja kože<br>✓ hidratacija kože<br>✓ omekšavanje kože<br>✓ povećanje elastičnosti<br>✓ poboljšanje zaštitne barijere |
| minerali | ✓ hidratacija kože<br>✓ jačanje kože<br>✓ kontrola pH-vrijednosti kože |

## 2.3. Lišće masline

Lišće masline (Slika 3.) spada u nusproizvode prerade masline, a njegove značajne količine dobivaju se u tijekom obrezivanja te u mlinovima za masline.

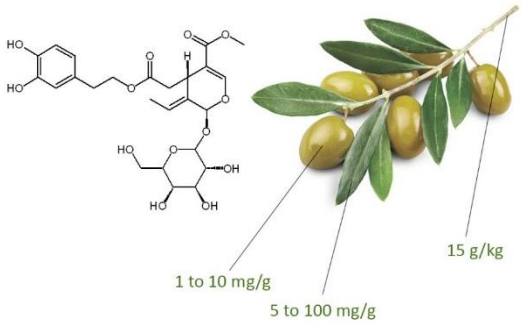
**Slika 3.** Listovi masline. [11]

Dugi niz godina ekstrakti lista masline su se koristili za liječenje bolesti kao što su dijabetes, hipertenzija i hiperkolesterolemija. U listu se nalazi puno različitih fenolnih spojeva kao što su flavoni, flavonoli, vanilin, vanilinska kiselina i sekoiridoidi. Najviše ima oleuropeina nastalog iz elenolne kiseline, glukoze i hidroksitirosola (Slika 4.), koji djeluje kao odličan čistač slobodnih radikala kože.




**Slika 4.** Hidroliza oleuropeina na komponente.

Općenito, u usporedbi s drugim dijelovima masline list ima najveću snagu čišćenja radikala. Oleuropeina ima i u drugim dijelovima masline kao što je plod, kora i sjeme, međutim, u manjim količinama (Slika 5.).




**Slika 5.** Molekula oleuropeina i udjeli u pojedinim dijelovima masline. [12]

Oleuropein ima ljekovita svojstva (Tablica 3.) i prema tome velik potencijal za primjenu u raznim granama medicine kao što su kardiologija, neurologija, dermatologija i tako dalje.

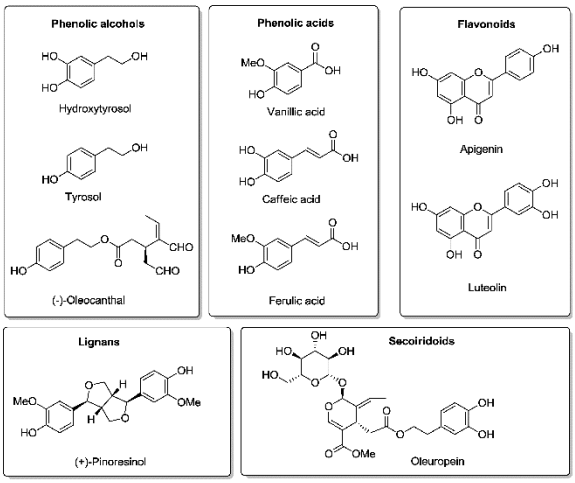
**Tablica 3.** Svojstva oleuropeina.

| **OLEUROPEIN** |
|---|
| ✓ antioksidativna svojstva |
| ✓ pozitivan metabolički učinak kod dijabetesa, glikemije i dislipidemije |
| ✓ protuupalno djelovanje |
| ✓ antihipertenzivno djelovanje |
| ✓ kardioproduktivno djelovanje |
| ✓ neuroprotektivno djelovanje |
| ✓ zaštita kože od starenja |
| ✓ antivirusno djelovanje |
| ✓ antimikrobno djelovanje protiv bakterija, mikrobakterija i gljivica |

Kombinacijom netoksičnih ili umjereno toksičnih otapala s optimizacijom tlaka i temperature, postiže se vrlo učinkovita ekstrakcija polifenola iz lista masline. Mogu se koristiti selektivna otapala kao što je voda, mješavine otapala ili niskotemperaturna prirodna eutektička otapala (NADES). [2]

## 2.4. Fenolni spojevi i njihov utjecaj na zdravlje

Fenolni spojevi (eng. *phenolic compounds*, PC) su najveća skupina fitokemikalija odnosno skupina biološki aktivnih nehranjivih tvari iz bilja. Predstavljaju sekundarne metabolite za gotovo sve biljke, a imaju značajnu ulogu u njihovom rastu te zaštiti od patogena i predatora. Fenolni spojevi se sastoje od jednog ili više aromatskog prstena s jednom ili više hidroksilnom skupinom. To su kristalne ili tekuće tvari čiji je pH manji od 7, a otapanjem u jakim lužinama nastaju fenolati. Neki od fenolnih spojeva u maslini oleuropein, tirosol, hidroksitirosol, vanilinska kiselina, kavenska kiselina. Na slici 6. prikazani su fenolni spojevi u maslini. [3, 13]




**Slika 6.** Fenolni spojevi u maslini. [14]

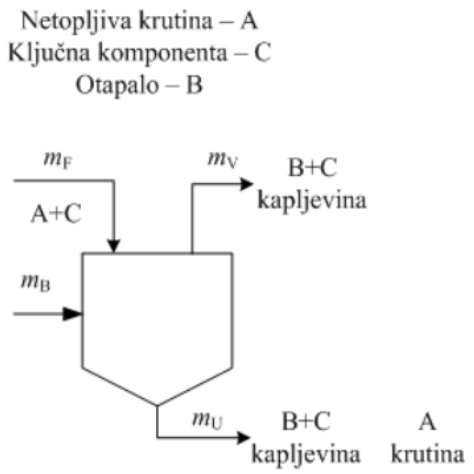
Karakterizira ih da djeluju protuupalno, antimikrobno, antikancerogeno, antioksidativno te da smanjuju bol. Koriste se u očuvanju hrane i kozmetike te se proučavaju zbog svog ljekovitog potencijala. Već su spomenuta neka svojstva oleuropeina, zbog kojih on može poslužiti kao sastavni dio lijeka. Prema istraživanjima utvrđeno je da potiče aktivnost hormona štitnjače te doprinosi gubitku masnog tkiva. Snižava vrijednost šećera u krvi te pospješuje imunološki sustav. Inhibira aktivnost lipoksigenaze i proizvodnje leukotriena B4, čime djeluje protuupalno. Oleuropein uzrokuje jačanje kože i pomaže kod smanjenja elastičnosti zbog dugotrajne izloženosti UVB-zrakama. Smanjuje rast tumora u izloženoj koži te smanjuje razine ROS-a.

Još jedan značajan fenolni spoj je hidroksitirosol, koji uzrokuje apoptozu i zaustavljanje staničnog ciklusa u stanicama raka. Također, može spriječiti kardiovaskularne bolesti smanjenjem vezanja molekule na endotelne stanice te sprječavanjem oksidacije lipoproteina. Ekstrakt lista masline koristi se u mnogim proizvodima kao što su kreme za brijanje, balzami za mišiće, maske za lice, losioni te kreme protiv starenja. [1, 2, 15]

Polifenoli se kod biljaka mogu nalaziti u raznim dijelovima stanice (vakuola, stanična stijenka…). Dosad je poznato oko 8000 fenolnih struktura, od jednostavnih do složenih derivata čija se svojstva značajno razlikuju. [3]

## 2.5. Ekstrakcija čvrsto - kapljevito

Najčešće metode separacije fenolnih spojeva iz masline su ekstrakcija kapljevito-kapljevito i ekstrakcija čvrsto-kapljevito. Ekstrakcija je toplinski separacijaki proces u kojem se uklanja jedna ili više komponenenata iz kapljevite ili čvrste smjese pomoću selektivnog otapala. Kod ekstrakcije kruto-kapljevito odnosno izluživanja, jedna ili više komponenti iz krute smjese je topljiva u selektivnom otapalu.




**Slika 7.** Ekstrakcija kruto-kapljevito.

Već je rečeno da je odabir otapala za ekstrakciju zahtjevan, zato što ono mora zadovoljiti niz prohtjeva. Prvi složen zahtjev kojeg otapalo treba ispunjavati je to da ključna komponenta treba biti dobro topljiva u selektivnom otapalu te u otapalu treba biti topljiva samo ona, a ne i

ostale komponente. Gledano s ekološkog i ekonomskog aspekta, otapalo se treba jednostavno regenerirati, kako bi se moglo vratiti u proces. Selektivno otapalo treba imati niski tlak para, tj. ne smije hlapiti kako ne bi došlo do gubitka otapala. Ne smije kemijski reagirati s nijednom komponentom pojne smjese. Općenito, mora biti jeftino, dostupno te sigurno za rad. [16]

Kao selektivno otapalo koriste se organske tvari kao alkoholi (metanol, etanol) te njihove smjese. Međutim, unatoč dobrom otapanju i ekstrakciji sastojaka pokazuju negativne karakteristike kao što je nisko vrelište, zapaljivost, visoka toksičnost te nisu biorazgradivi. Superkritični fluidi kao što su $CO_2$ i voda ne mogu zadovoljiti zahtjeve ovakve ekstrakcije, jer su vrlo reaktivni te je potrebno nabaviti skupu opremu za dobivanje i održavanje superkritičnih uvjeta, kao i čistu vodu bez onečišćenja. Otapala dobivena iz biomase mogu poslužiti za ekstrakciju polifenola, ali njihova svojstva su poprilično ograničena. Prednosti su to što su bioobnovljiva, ekološki prihvatljiva te pristupačna. Pregledom nekoliko vrsta otapala možemo utvrditi da je potrebno pomno odabrati selektivno za ekstrakciju kako bi učinkovitost separacije bila zadovoljavajuća, a da se ispune ekonomska i ekološka očekivanja. [3]

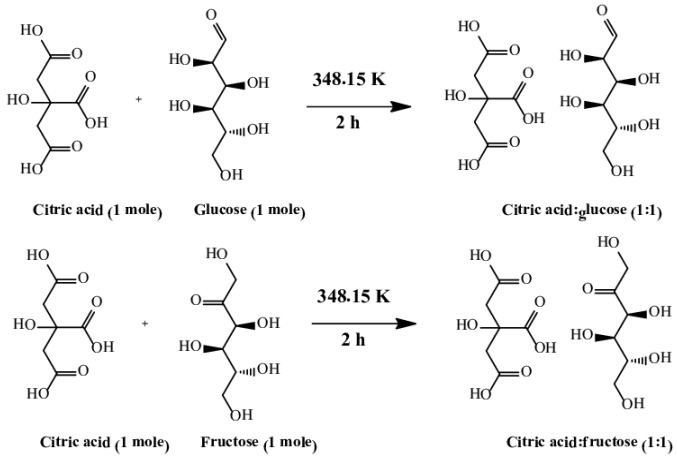
## 2.6. NADES (*Natural deep eutectic solvent*)

Prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo ili NADES se sastoji od bar dvije komponente od kojih je jedna akceptor vodikove veze (eng. *Hydrogen bond acceptor*, HBA), a jedna donor vodikove veze (eng. *Hydrogen bond donor*, HBD). Komponente su primarni metalboliti, odnosno organske kiseline, šećeri, alkoholi, amini i aminokiseline. Riječ „*prirodna*“ koristi se zato što su molekule komponenti obilno prisutne u prirodi i zato što bi takva otapala mogla voditi važnu ulogu kao kapljevine za skladištenje i transport metabolita koji nisu topljivi u vodi živih stanica i organizama.

### 2.6.1. Priprema NADES-a

Najčešća komponenta NADES-a je kolin klorid (ChCl) kao jeftin i siguran donor vodikove veze, a uz njega se često koriste i urea, etilen glikol te glicerol. Eutektička točka za miješanje HBD i HBA karakteristična je za pojedine molarne omjere tih komponenata. Utjecaj tih omjera na fizička i kemijska svojstva NADES-a vrlo je značajan. Postoji više metoda pripremanja NADES-a. Prva metoda podrazumijeva zagrijavanje i miješanje smjese. Druga

metoda je metoda isparavanja, gdje se komponente otapaju u vodi i isparavaju u rotacijskom isparivaču. Tako dobivena kapljevina stavlja se u eksikator, gdje ostaje sve dok ne dosegne konstantnu masu. Treća metoda se ne koristi često, a zahtijeva zamrzavanje i sušenje mješavina vodenih otopina. Prema istraživanjima, utvrđeno je da su NADES-i hidrofilne kapljevine što omogućava kontrolu i podešavanje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava. Dodavanjem optimalne količine vode smanjuje se viskoznost, vodeći računa da ne dođe do narušavanja vodikovih veza između komponenti u otapalu. Na slici 8. prikazani su primjeri dobivanja NADES-a pri određenim radnim uvjetima.

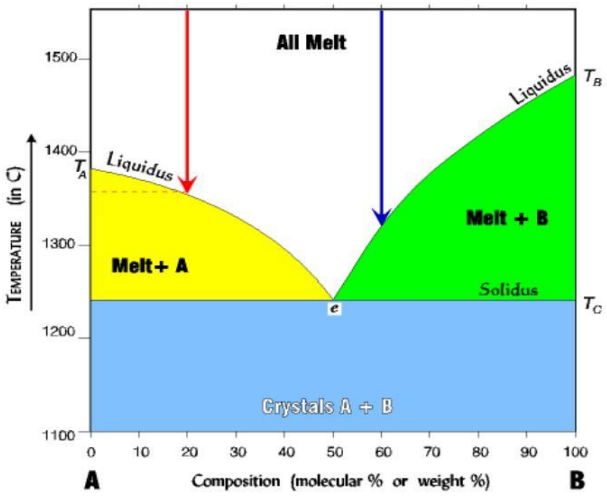



**Slika 8.** Primjeri dobivanja NADES-a. [17]

Općenito, svojstva eutektičkih otapala možemo poboljšati pravilnim odabirom donora i akceptora vodikove veze, mijenjanjem njihovog molarnog omjera te dodatkom vode ili drugih organskih otapala. Upravo stoga postoji velik broj mogućnosti odabira komponenta i načina pripreme otapala. Posebnu pažnju potrebno je usmjeriti na čistoću sastojaka te higroskopna svojstva. [4]

### 2.6.2. Karakterizacija NADES-a

NADES karakterizira definirana struktura koja uzrokuje da smjesa ima točku taljenja manju od tališta komponenata (Slika 9.). Većina je u kapljevitom stanju između sobne temperature i temperature od 70°C, imaju nizak tlak para te su mješljivi s vodom.




**Slika 9.** Dijagram eutektičke smjese. [18]

Viskoznost je vrlo važno svojstvo za selektivno otapalo, pa NADES obično ima viskoznost veću od drugih konvencionalnih otapala, što može dovesti do problema prilikom separacije od krute netopljive komponente poslije izluživanja. To se događa zbog jakih vodikovih sila između molekula te van der Waalsovih interakcija i elektrostatskih interakcija. Viskoznost je povezana sa slobodnim volumenom i vjerojatnosti pronalaženja rupa odgovarajućih dimenzija za prelazak molekula otapala na prazna mjesta. Slobodan volumen se može povećati smanjenjem površinske napetosti korištenjem manjih iona ili optimalnim povećanjem temperature.

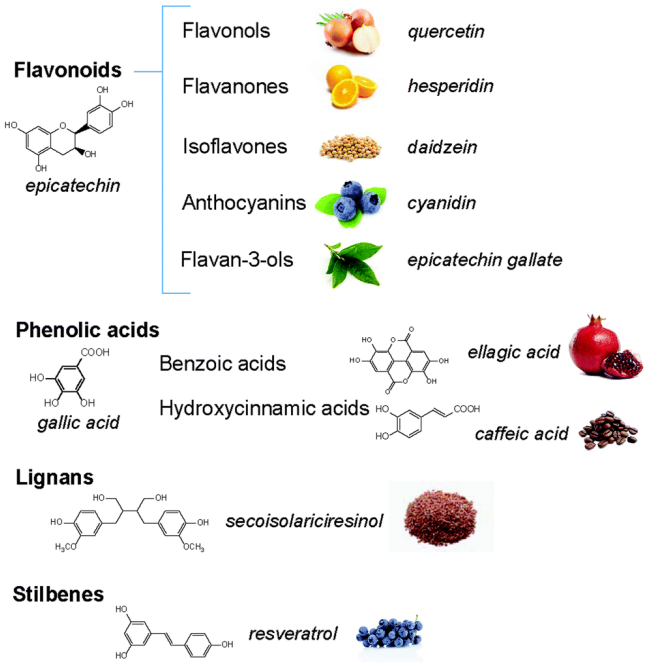
Polarnost NADES-a je vrlo bliska vodi i polarnim otapalima kao što su metanol i etanol. Najpolarnija eutektička otapala su na bazi organske kiseline, zatim eutektička otapala na bazi aminokiselina i šećera, a najmanje su polarna ona na bazi alkohola. Na ovo svojstvo utječe i dodatak vode, što može uzrokovati narušavanje vodikovih veza između početnih sastojaka, a zatim i velike promjene u strukturi otapala. Ovo se događa pri većim udjelima dodane vode.

Gustoća NADES-a isto kao i viskoznost ovisi o međumolekulskim silama, kao i o molekulskoj masi. Što su jače međumolekulske sile i što je veća molekulska masa, gustoća NADES-a je veća. Povećanje temperature uzrokuje smanjenje gustoće, odnosno povećanje slobodnog volumena u kojem se molekule mogu gibati. Dodatkom vode gustoća otapala se približava gustoći vode.

Vodeću ulogu u pH-vrijednosti NADES-a ima odabir donora i akceptora vodikove veze. NADES kojem je donor veze organska kiselina ima vrijednosti pH manje od 3, pa takva otapala nije poželjno koristiti za kozmetičke proizvode. Povećanjem udjela vode u otapalu, smanjuje se pH-vrijednost. [3]

### 2.6.3. Primjena eutektičkog otapala u ekstrakciji biljnih komponenata

Eutektička otapala su izvrsna zamjena za organska otapala u ekstrakciji biljnih komponenata, zato što se optimalnim odabirom radnih uvjeta pripremanja otapala i ekstrakcije mogu postići odgovarajuća fizikalno-kemijska svojstva. Na taj način može se provesti ekstrakcija polarnih i nepolarnih tvari. Na Slici 10. prikazane su biljne komponente u pojedinim prehrambenim proizvodima.




**Slika 10.** Fenolni spojevi u biljkama. [19]

# 3. Metodika rada

## 3.1. Svrha rada

U eksperimentalnom dijelu rada provedena je ekstrakcija polifenola iz lista masline. Korišteno je prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo, kojem je određena gustoća i viskoznost. Ekstrakt je umješan u kremu u različitim koncentracijama te se motrila stabilnost pripravka.

## 3.2. Materijali

Materijali potrebni za ekstrakciju polifenola iz lista masline su listovi masline i prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo.

### 3.2.1. List masline

Listovi masline (sorta *oblica*) prikupljeni su nakon rezidbe masline tijekom ožujka na otoku Ugljanu.

### 3.2.2. NADES

Prirodno eutektičko otapalo sastoji se od mliječne kiseline, D-fruktoze i glicina te dodatka vode čiji maseni udio iznosi 30%. U tablici 4. prikazane su korištene kemikalije.

**Tablica 4.** Kemikalije za pripremu selektivnog otapala.

| **Naziv kemikalije** | **Formula** | ***M*, kg/kmol** | **CAS** | **Proizvođač** | **Čistoća, %** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Mliječna kiselina, LA** | $C_3H_6O_3$ | 90,08 | 79-33-4 | *Fisher Scientific* | 88 |
| **D-fruktoza, FRU** | $C_6H_{12}O_6$ | 180,16 | 57-48-7 | *Lach-ner, s.r.o.* | za analizu |
| **Glicin, Glc** | $C_2H_5NO_2$ | 75,07 | 56-40-6 | *Carlo Erba* | za analizu |

## 3.3. Priprema i karakterizacija lista

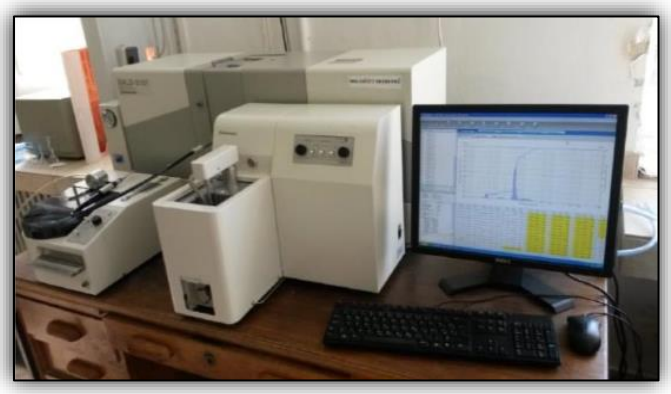
Listovi su oprani s vodom na temperaturi 50 °C te osušeni na 40°C u infracrvenom sušioniku *KERN MLS 50-C2* (Slika 11.). Nakon toga su usitnjeni u električnom mlinu u vremenu 1-2 minute te prosijani kroz sito veličine pora 1 mm.

**Slika 11.** Infracrveni sušionik *KERN MLS 50-C2*.

Usitnjenom listu masline određena je specifična površina, srednja veličina pora i raspodjela veličina pora snimanjem adsorpcijsko-desorpcijskih izotermi dušika pomoću uređaja *ASAP 2000* (*Micromeritics*, SAD). Slika 12. prikazuje korišteni uređaj.

**Slika 12.** Uređaj za određivanje raspodjelu veličina pora *ASAP 2000*.

Raspodjela veličina čestica komine i lišća masline određena je metodom laserske difrakcije primjenom uređaja *SALD-310, Shimadzu*, čije je mjerno područje 0,4 do 3000 μm. Mjerenje je provedeno tri puta te je raspodjela veličina čestica prikazana grafički kao diferencijalna funkcija raspodjele, odnosno kao kvantitativni udio čestica u promatranom veličinskom razredu (Slika 13.).



**Slika 13.** Uređaj laserske difrakcije SALD-3101 (*Shimadzu, Japan*).

## 3.4. Priprema i karakterizacija NADES-a

### 3.4.1. Priprema otapala

Za pripremu selektivnog otapala izračunate su mase prema zadanim molarnim odnosima komponenata. Odvagane mase stavljene su u bocu s čepom, a zatim na magnetnu miješalicu. Temperatura miješanja bila je 45°C. U otapalo je postupno dodavana voda tako da krajnji udio vode iznosi 30%. U tablici 5. prikazani su podaci za pripremu otapala.

**Tablica 5.** Podaci za pripravu otapala LA:Fru:Glc-2:1:2 + 30% $H_2O$.

| **LA:Fru:Glc-2:1:2 + 30% $H_2O$** | **LA** | **Fru** | **Glc** | **$H_2O$** |
|---|---|---|---|---|
| ***M*, kg/kmol** | 90,08 | 180,16 | 75,07 | 18,02 |
| ***m*, g** | 60,0000 | 60,0000 | 50,0022 | 72,8581 |
| ***n*, mol** | 0,6661 | 0,3330 | 0,6661 | 4,0441 |

### 3.4.2. Fizikalna karakterizacija otapala

Vrijednost pH otapala izmjerena je na pomoću uređaja *WTW InoLab pH (pH electrode SenTix 91)* na sobnoj temperaturi (Slika 14.).

**Slika 14.** pH-metar s elektrodom.

Viskoznost je izmjerena na reometru *Brookfield DV-111 Ultra* pomoću koncentričnog vretena *SC4-21* (Slika 15.), vođenog računalnim programom *Rheocalc*. On prikazuje ovisnost smičnog naprezanja o smičnoj brzini te se na temelju te ovisnosti može utvrditi viskoznost fluida, odnosno reološki model ponašanja. Viskoznost je određena u temperaturnom rasponu 20 do 50°C. Za termostairanje je korišten termostat *Julabo F12*.

**Slika 15.** Reometar *Brookfield DV-111 Ultra*.

Gustoća selektivnog otapala je izmjerena pomoću uređaja *Mettler Toledo densitometer 30PX* (Slika 16.) uz tri ponavljanja iz čega je izračunata srednja vrijednost. Mjerenja su izvođena pri sobnoj temperaturi.

**Slika 16.** Uređaj *Mettler Toledo densitometer 30PX*.

## 3.5. Provedba ekstrakcije

Provedena je šaržna ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista masline s priređenim otapalom i sa smjesom etanolom i vode (w= 30 %). U laboratorijsku čašu je dodano 50 mL NADESA-a ili smjesa etanola i vode te 2,5 g masline. Tako pripremljen sustav stavljen na već spomenutu magnetnu miješalicu. Broj okretaja bio je 400 rpm, a ekstrakcija se provodila 2h.

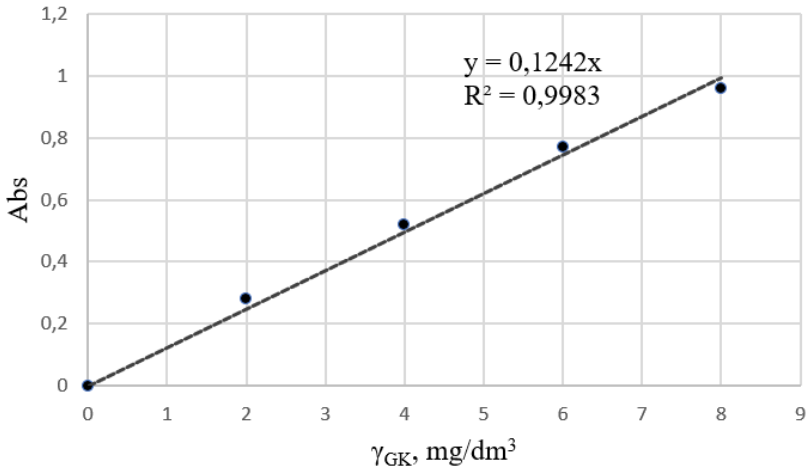
Kako bi se odvojio ekstrakt od lista masline korištena je centrifuga *Tehtnica Centric 322A* (Slika 15). Centrifugiranje se provodilo 3 minute, na 3500 okretaja. Uzorak je nakon toga filtriran pomoću šprice i filtra s veličinom pora 1,2 μm te je dobiven čisti ekstrakt.

**Slika 17.** Centrifuga *Tehtnica Centric 322A.*

### 3.5.1. Određivanje koncentracije polifenola u ekstraktu

U tikvice od 10 ml otpipetirano je 400 µl Folin-Ciocalteu reagensa i 60 µl filtriranog uzorka nakon provedene ekstrakcije pomoću automatske pipete. Tikvice su odstajale u mraku 8 min, a zatim je dodano 4 ml 7,0 mas. % otopine natrijeva karbonata, nakon čega je otopina razrijeđena destiliranom vodom do volumena 10 ml. Sve pripremljene tikvice termostatirane su sat vremena na temperaturi od 40 ˚C. Nakon termostatiranja određena je koncentracija ukupnih polifenola spektrofotometrijski standardnom Folin-Ciocalteau metodom na UV/Vis spektrofotometru *UV 1280, Shimadzu* (Slika 18). Intenzitet apsorbancije određen je na maksimalnoj valnoj duljini spektra, 756 nm. Koncentracija ukupnih polifenola u ekstraktu izražena je preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline za koju je određen baždarni dijagram (Slika 19.). Svaka analiza ponovljena je tri puta te je određena njihova srednja vrijednost.

**Slika 18.** UV/Vis spektrofotometar *UV 1280, Shimadzu.*



**Slika 19.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih polifenola.

## 3.6. Priprema krema

U četiri plastične posudice izvagano je po 7 g bazne hidratantne kreme *Biobaza* te je dodana masa ekstrakta jednaka 5, 8, 10 i 15 mas.% početne mase baze (Tablica 6.)

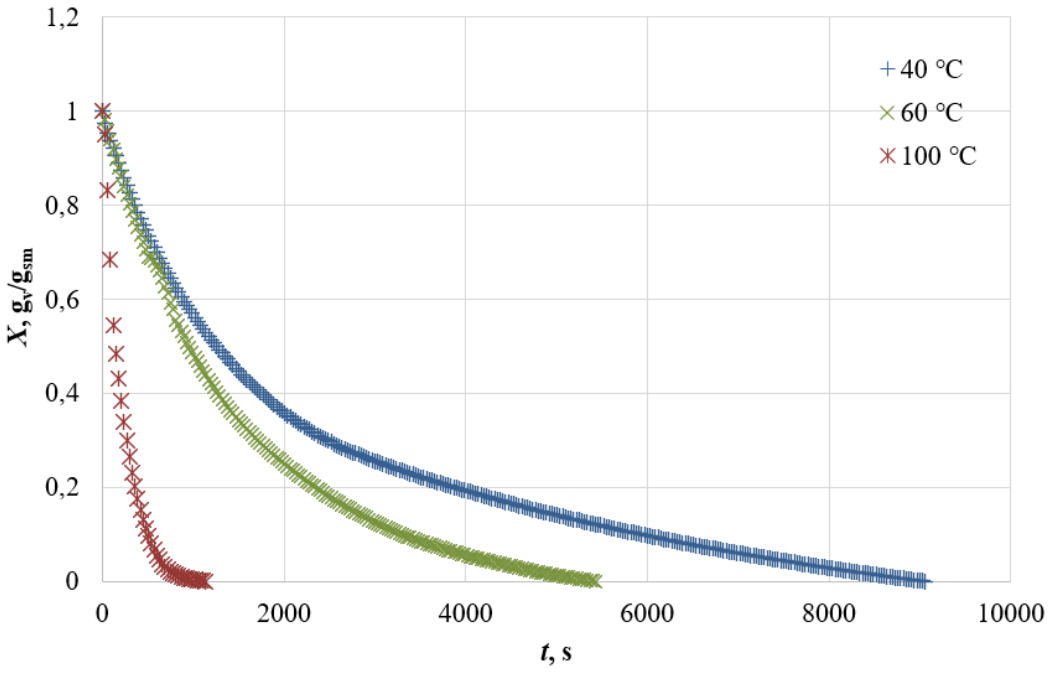
**Tablica 6.** Odvage kod pripremanja krema.

| **Masa baze, g** | **Udio ekstrakta od početne mase baze** | **Masa ekstrakta, g** |
|---|---|---|
| 7 | 5% | 0,35 |
| 7 | 8% | 0,56 |
| 7 | 10% | 0,70 |
| 7 | 15% | 1,05 |

# 4. Rezultati

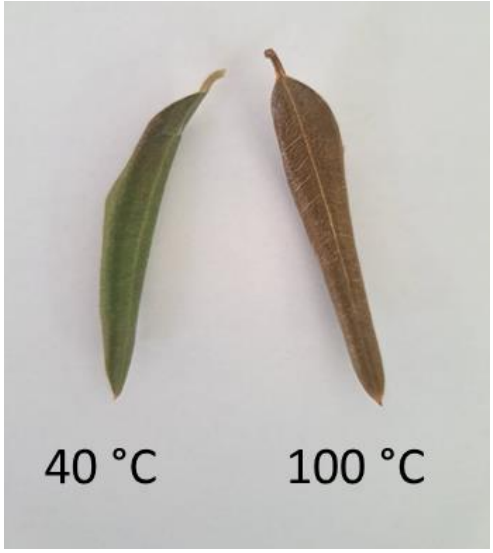
## 4.1. Karakterizacija usitnjenog lista masline

Prikupljen je list masline nakon orezivanja stabla masline sorte *oblica,* tijekom ožujka na otoku Ugljanu. Nakon što su listovi skinuti sa stabljika i oprani u toploj vodi, ocijeđeni su i stavljeni na sušenje u infracrveni sušionik. Budući da su različite komponente polifenola termolabilne na različitim temperaturama bilo bi potrebno optimirati proces sušenja kako bi se dobio ekstrakt s najvećim udjelom polifenola te utrošila minimalna količina energije. [20] Sušenje se provodilo na tri različite temperature kako bi se usporedila konzistencija usitnjenog materijala nakon sušenja i usitnjavanja. Iz krivulja sušenja (Slika 20.), vidljivo je da sušenje na višim temperaturama traje znatno kraće, da je brzina sušenja veća, a materijal osušen do kraja ($X_{kon}$=0 $g_v/g_{sm}$).




**Slika 20.** Krivulje sušenja usitnjenog lista masline na 40, 60 i 100 °C.

Materijal je nakon sušenja na dvije niže temperature izgledao slično, dok je list nakon sušenja na 100 °C potamnio pa se daljnje istraživanje nastavilo s uzorcima osušenim na 40, odnosno 60°C (Slika 21.).




**Slika 21.** List osušen na 40 i 100 °C.

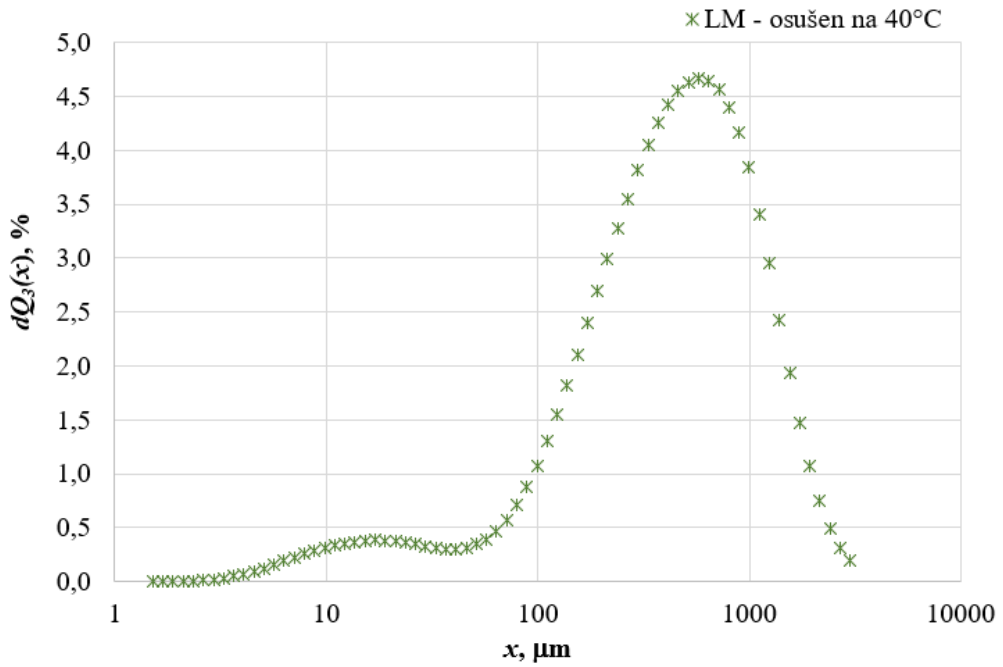
Nakon sušenja, uzorcima osušenim na 40 i 60 °C je određena je specifična površina i srednji promjer pora primjenom Brunauer-Emmet-Teller (BET) metode (Tablica 7.).

**Tablica 7.** Specifične površine i srednji promjer pora uzoraka sušenih na 40 i 60 °C.

| | **40 °C** | **60 °C** |
|---|---|---|
| **Srednji promjer pora, nm** | 10,1513 | 3,1989 |
| **Specifična površina, $m^2/g$** | 0,5360 | 0,5426 |

Specifična površina pora slična je, bez obzira na temperaturu sušenja, dok se promjer pora znatno razlikuje. Uobičajeno je da se pore smanjuju u materijalu prilikom sušenja na višoj temperaturi. Naime, zbog temperaturnog gradijenta i gradijenta vlage dolazi do mikrostrukturnih promjena unutar materijala. [21] Ovo mikrostrukturno naprezanje dovodi do deformacije, odnosno skupljanja materijala. Pri provedbi ekstrakcije, osobito s otapalima koja su dosta viskozna i gusta, veće pore omogućuju da se kapljevina lakše distribuira unutar pora, što može rezultirati većom djelotvornošću ekstrakcije. Kako su pore znatno veće u uzorku koji se sušio na 40 °C, on je korišten za ekstrakciju polifenola. Raspodjela veličina usitnjenog lista masline prikazana je na slici 22. Veličina čestica kreće se u rasponu od 1 nm do 3000 nm, a najviše čestica je veličine 575 nm. . Iako je uzorak prije određivanja raspodjele veličine čestica prosijan na sito veličine 1 mm, u uzorku su prisutne i veće čestice. Ovo se može objasniti

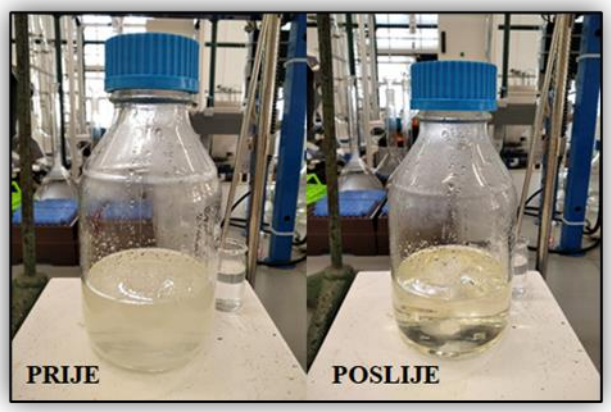
činjenicom da se radi o usitnjenom, prirodnom uzorku koji je sklon aglomeraciji zbog prisutnosti vlakana.




**Slika 22.** Krivulja raspodjele veličina čestica lista masline osušenog na 40 °C.

## 4.2. Priprema otapala

U posljednje se vrijeme za ekstrakciju prirodnih komponenti koriste NADES-i koji daju dobre rezultate u usporedbi s konvencionalnim otapalima. NADES-i se lako pripravljaju (Slika 23.) samo miješanjem u određenom omjeru na povišenoj temperaturi. Otapalo s kojim je provedena ekstrakcija, LA:Fru:Glc + 30% $H_2O$ pripravljeno je na 50 °C. Komponente nisu zagrijavane na višu temperaturu kako ne bi došlo do izgaranja fruktoze. Na slici 23. vidi se NADES prije i poslije bistrenja. Prije bistrenja smjesa je bijelo-žuta, a mutna je zbog neotopljenih čestica fruktoze. Temperatura uzorka postepeno se povećavala zbog toga što je smjesa bila dosta viskozna. Poslije bistrenja smjesa je žute boje, a viskoznost je puno manja od početne zbog već spomenutog povišenja temperature.



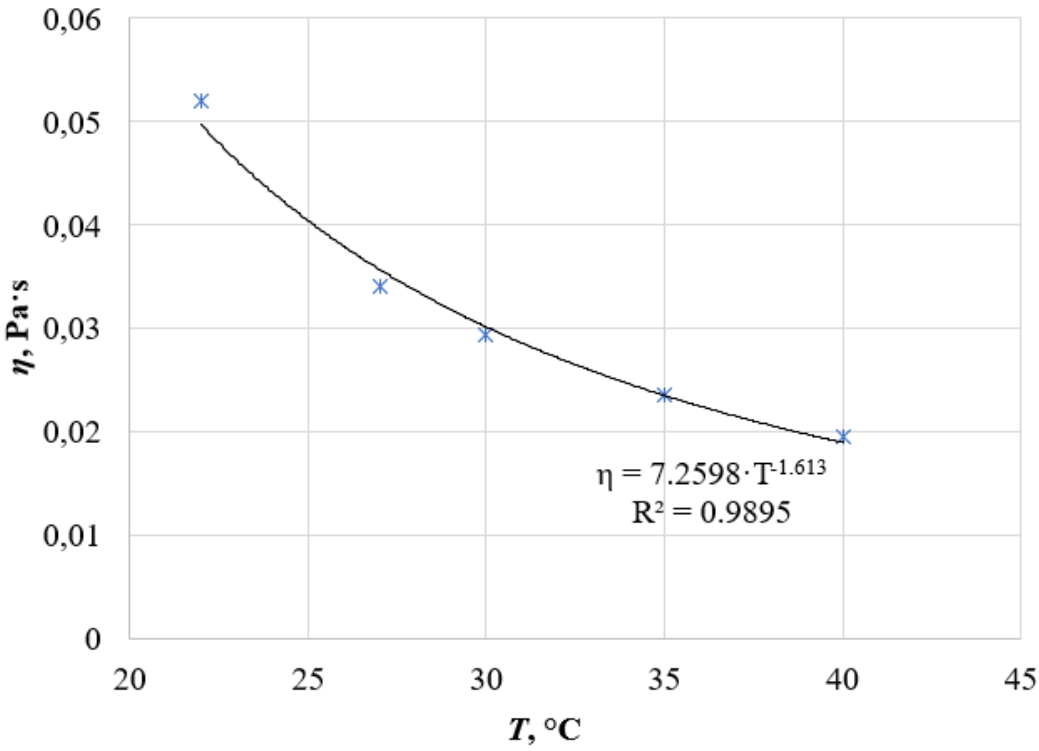

**Slika 23.** Otapalo prije i poslije bistrenja.

Zbog velike viskoznosti otopine, u vodu je dodano 30 mas.% vode. Dodatkom vode do 50 mas.% neće doći do narušavanja vodikovih veza i strukture otapala. [22] U tablici 8. prikazana je gustoća i kiselost pripremljenog otapala. Bez obzira na dodanu vodu, gustoća je relativno velika u usporedbi s konvencionalnim otapalima. Izrazito niske vrijednosti pH jedan su od nedostataka NADES-a. Stoga se može zaključiti da vrijednost pH za pripravljeno otapalo nije preniska, osobito jer će se nakon provedene ekstrakcije u kremu dodati do 15 mas% ekstrakta. Iako niska kiselost otapala može biti štetna za kozmetičke pripravke, niska vrijednost pH pospješuje ekstrakciju polifenola te ekstrakt može u pripravku djelovati kao konzervans.

**Tablica 8.** Srednja gustoća i pH otopine LA:Fru:Glc-2:1:2 + 30% $H_2O$.

| | | | |
|---|---|---|---|
| ***T*, °C** | 28,4 | 28,4 | 28,4 |
| **$\rho$, g/cm$^3$** | 1,2622 | 1,2627 | 1,2625 |
| **$T_{sr}$, °C** | 28,4 | | |
| **$\rho_{sr}$, g/cm$^3$** | 1,2625 | | |
| **pH** | 3,307 | | |

Ovisnost viskoznosti NADES-a LA:Fru:Glc 2:1:2 + 30% $H_2O$ o temperaturi prikazana je na slici 24. Povišenjem temperature smanjuje se viskoznost otapala. Ova ovisnost opisana je potencijskom jednadžbom: $\eta = 7{,}260 \cdot T^{-1{,}613}$. Velika viskoznost otapala pri provedbi ekstrakcije smanjuje djelotvornost provedbe procesa zbog otežanog miješanja otapala s usitnjenim listom. Kako je ekstrakcija polifenola provedena na sobnoj temperaturi, daljnje unapređenje procesa moglo bi se postići povišenjem temperature, jer smanjenje viskoznosti pospješuje kontakt i miješanje otapala i lista masline.




**Slika 24.** Dijagram ovisnosti viskoznosti o temperaturi.

## 4.3. Ekstrakcija

Na temelju prethodnih ispitivanja određen je optimalni odnos otapala i lista masline te vrijeme trajanja procesa. [23] Otapalo je izdvojeno od lista nakon centrifugiranja i uz pomoć igle i filtra (veličina pora 1,2 μm). Zbog velike viskoznosti proces izdvajanja filtrata bio je otežan. Ovaj problem bilo bi moguće riješit povećanjem omjera otapala i lista. Međutim, pri tome bi se smanjila koncentracija polifenola u ekstraktu. Za optimizaciju je potrebno provesti dodatna ispitivanja. Na slici 25. vidimo rezultate nakon centrifugiranja, a možemo primijetiti da se kruta faza digla iznad filtrata, što znači da je njezina gustoća manja.

**Slika 25.** Sustav poslije centrifugiranja.

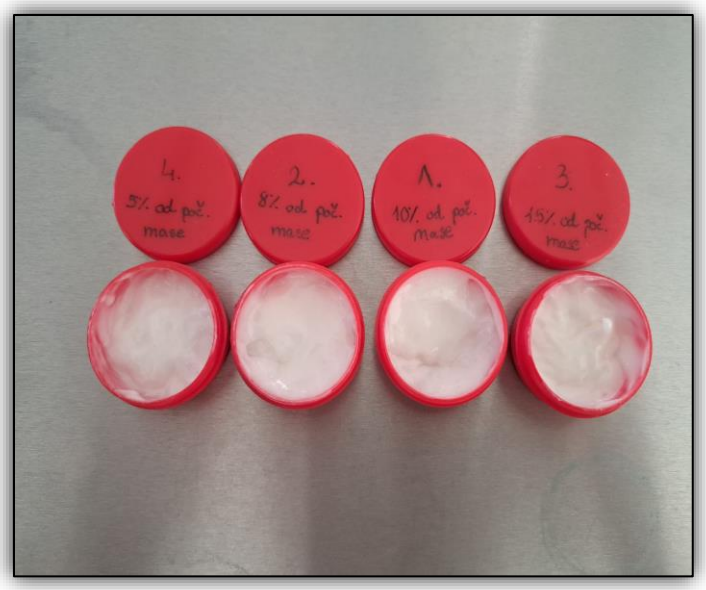
U tablici 9. su prikazane koncentracije polifenola dobivene nakon provedene ekstrakcije. Radi usporedbe ekstrakcija je provedena i sa 70-postotnim etanolom. Koncentracija polifenola s etanolom je nešto viša od one dobivene s ispitanim NADES-om. Razlika nije visoka, a kako je 70% smjesa etanola i vode, otapalo koje je u prethodnim istraživanjima davalo najbolje rezultate, može se smatrati da je odabrano otapalo dobro za provedbu ekstrakcije polifenola iz lista masline.

**Tablica 9.** Koncentracije polifenola nakon ekstrakcije.

| **Otapalo** | **$\gamma$, $mg_{GK}\ g^{-1}_{ST}$** |
|---|---|
| 70 % etanol | 11,69 |
| LA:Fru:Glc 2:1:2 – 30% | 11,58 |

## 4.4. Priprema i stabilnost kreme

Na slici 26. vidimo izgled kreme od najmanje do najveće koncentracije polifenola, tri dana nakon pripreme kreme. Krema je čvrsta, bijela te ujednačenog sastava.




**Slika 26.** Krema 3 dana nakon pripreme.

Slika 27. prikazuje izgled kreme 10 dana nakon pripreme. Vidimo da je na kremi nastala glazura, koja upućuje na odvajanje ekstrakta od bazne kreme. Krema je još uvijek bijele boje, ali je manje čvrsta nego početna krema.

**Slika 27.** Krema 10 dana nakon pripreme.

Slika 28. potvrđuje da je došlo do izdvajanja ekstrakta iz kreme. Najviše ekstrakta izdvojilo se kod koncentracije ekstrakta od 15% u početnoj masi bazne kreme, a najmanje kod

kocentracije ekstrakta od 5%. Krema je bijele boje, sjajnija nego na prijašnjoj slici, a čvrstoća joj je najmanja u usporedbi s ostalim slikama.

**Slika 28.** Krema 17 dana nakon pripreme.

# 5. Zaključak

Ekstrakcija polifenola iz lista masline može se provoditi pomoću niskotemperaturnog prirodnog eutektičkog otapala sastavljenog od mliječne kiseline, fruktoze i glicina u molarnom omjeru 2:1:2 s dodatkom vode masenog udjela 30%.

List masline opran je, osušen i usitnjen. Sušenje je provedeno u infracrvenom sušioniku na tri različite temperature (40 °C, 60 °C i 100 °C). Sušenjem pri 100°C list je promijenio boju što ukazuje na promjenu svojstava, zbog čega su se za ekstrakciju dalje istraživani listovi masline osušeni na 40 i 60 °C. Srednji promjer pora listova osušenih na najnižoj temperaturi najveći je pa su za ekstrakciju korišteni listovi osušeni na 40 °C. Prema rezultatima mjerenja krivulje raspodjele veličina čestica lista vidimo da je najveći broj čestica veličine 575 nm.

Selektivno otapalo pripremljeno je na temperaturi od 50 °C. Zbog velike viskoznosti otapala dodano je 30 mas.% vode. Usporedbom koncentracije polifenola nakon ekstrakcije s NADES-om i konvencionim otapalom, tj. otopinom etanola, može se zaključiti da je odabrano pogodno otapalo.

Promatranjem kreme tijekom 17 dana, utvrđeno je da dolazi do izdvajanje ekstrakta. Krema je bijele boje cijelo vrijeme, no tijekom vremena dolazi do stvaranja glazure vodenaste strukture i smanjena čvrstoće kreme. Krema najmanje koncentracije ekstrakta pokazuje najveću stabilnost.

Općenito, niskotemperaturna prirodna eutektička otapala zanimljiva su zbog mogućnosti njihovog dizajniranja optimiziranjem radnih uvjeta. Prigodnija su za ekstrakciju od konvencionalnih otapala zato što su prirodna, a daju iste ili bolje rezultate ekstrakcije.

# 6. Popis simbola/kratica

## Simboli

| SIMBOL/ | ZNAČENJE |
|---|---|
| $M$ | molarna masa |
| $m$ | masa |
| $n$ | množina |
| $w$ | maseni udio |
| $X$ | sadržaj vlage materijala |
| $t$ | vrijeme |
| $x$ | promjer čestice |
| $T$ | temperatura |
| $\rho$ | gustoća |
| $\rho_{SR}$ | aritmetička vrijednost gustoće |
| $\eta$ | viskoznost |

## Kratice

| KRATICA | ZNAČENJE |
|---|---|
| GK | galna kiselina |
| GA | gallic acid |
| ST | suha tvar |
| DM | dry matter |
| v | voda |
| sm | suhi materijal |

# 7. Literatura


(1)Al-Rimawi, F.; Yateem, H.; Afaneh, I. Formulation and Evaluation of a Moisurizing Day Cream Containing Olive Leaves Extract, Int. J. Dev. Res., **4** (2014) 1996-2000,.

(2)Rodrigues, F.; Pimentel, F. B.; Oliveira, M. B. P. P. Olive By-Products: Challenge Application in Cosmetic Industry, Ind. Crops Prod., **70** (2015) 116–124.

(3)Ruesgas-Ramón, M.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Durand, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities, J. Agric. Food Chem., **65** (2017) 3591–3601.

(4)Alcalde, R.; Gutiérrez, A.; Atilhan, M.; Aparicio, S. An Experimental and Theoretical Investigation of the Physicochemical Properties on Choline Chloride – Lactic Acid Based Natural Deep Eutectic Solvent (NADES), J. Mol. Liq., **290** (2019) 110916.

(5)URL: https://www.vrtlarica.hr/maslina-sadnja-uzgoj/ (pristup 21.6.2023.).

(6)URL: https://whc.unesco.org/en/list/344/ (pristup 21.6.2023.).

(7)URL: https://costablog.com/jaen-spains-home-to-olive-oil/ (pristup 21.6.2023.).

(8)Melguizo-Rodríguez, L.; González-Acedo, A.; Illescas-Montes, R.; García-Recio, E.; Ramos-Torrecillas, J.; Costela-Ruiz, V. J.; García-Martínez, O. Biological Effects of the Olive Tree and Its Derivatives on the Skin, Food Funct., **13** (2022) 11410–11424.

(9)Nunes, A.; Marto, J.; Gonçalves, L.; Martins, A. M.; Fraga, C.; Ribeiro, H. M. Potential Therapeutic of Olive Oil Industry By-products in Skin Health: A Review, Int. J. Food Sci. Technol., **57** (2022) 173–187.

(10)URL:https://organicoliveessence.files.wordpress.com/2011/05/68a5bolive252520bunch.jpg (pristup 22.6.2023.).

(11)URL: https://www.hekmac.com/en/blessed-olive-leaves-benefits/ (pristup 22.6.2023.).

(12)URL: http://www.plantmedicinenews.com/2018/05/what-is-oleuropein/ (pristup 22.6.2023.).

(13)URL: https://nutricionizam.com/fitokemikalije-definicija/ (pristup 22.6.2023.).

(14)Rodríguez-Morató, J.; Xicota, L.; Fitó, M.; Farré, M.; Dierssen, M.; De La Torre, R. Potential Role of Olive Oil Phenolic Compounds in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. Molecules, **20** (2015) 4655–4680.

(15)Rafehi, H.; Ververis, K.; Karagiannis, T. C. Mechanisms of Action of Phenolic Compounds in Olive, J. Diet. Suppl., **9** (2012), 96–109.

(16)URL: https://moodle.srce.hr/2022-2023/mod/lesson/view.php?id=3101636 (pristup 23.6.2023.).

(17)URL: https://www.researchgate.net/figure/Preparation-of-deep-eutectic-solvents_fig2_304933380 (pristup 23.6.2023.).

(18)URL: https://www.slideserve.com/lee-reese/binary-phase-diagrams (pristup 23.6.2023.).

(19)Fraga, C. G.; Croft, K. D.; Kennedy, D. O.; Tomás-Barberán, F. A. The Effects of Polyphenols and Other Bioactives on Human Health, Food Funct., 10 (2019) 514–528.

(20)D'Archivio, M.; Filesi, C.; Varì, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies, Int. J. Mol. Sci., **11** (2010) 1321–1342.

(21)Mahiuddin, M.; Khan, Md. I. H.; Kumar, C.; Rahman, M. M.; Karim, M. A. Shrinkage of Food Materials During Drying: Current Status and Challenges: Shrinkage of Food Materials during Drying, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., **17** (2018) 1113–1126.

(22)Panić, M.; Radošević, K.; Radojčić Redovniković, I.; Zagajski Kučan, K.; Sander, A.; Halambek, J.; Prlić Kardum, J.; Mitar, A. Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid, Chem. Biochem. Eng. Q., **33** (2019) 1–18.

(23) Mitar, A.; Prlić Kardum, J. Intensification of Mass Transfer in the Extraction Process with a Nanofluid Prepared in a Natural Deep Eutectic Solvent, Chem. Eng. Technol., **43** (2020) 2286–2294.