

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzija u separaciji fenolnih spojeva iz komine masline

Udovčić, Anela

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:149:659038>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

Anela Udovčić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

Anela Udovčić

**PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA I
NANOSUSPENZIJA U SEPARACIJI FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE
MASLINE**

Diplomski rad

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

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

Zagreb, srpanj 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo pod vodstvom prof.dr.sc. Jasne Prlić Kardum u akademskoj godini 2017/2018.

Zahvaljujem se, u prvom redu, prof. dr.sc. Jasni Prlić Kardum na pruženoj prilici da učim i radim pod njenim mentorstvom, na strpljivom i ljubaznom pristupu te na stručnom vođenju, smjericama i sugestijama pri izradi kako ovog rada, tako i usvajanju znanja iz ostalih kolegija u području mehaničkog i toplinskog procesnog inženjerstva.

Veliko hvala od srca asistentici mag. chem. ing. Anamariji Mitar koja je izdvojila mnogo vremena planirajući i objašnjavajući svaki eksperimentalni korak te koja me s profesionalnim i prijateljskim pristupom vodila kroz problematiku rada.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj mami, sestri i dečku koji su mi bili najveća motivacija, podrška u svakojakim situacijama, kako tijekom studiranja, tako i života općenito.

U konačnici, hvala Bogu na pruženom daru studiranja i na svim divnim spomenutim osobama.

Sažetak

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzija u separaciji fenolnih spojeva iz komine masline

Komina masline, poznata kao otpad koji zaostaje nakon obrade masline, predstavlja značajnu opasnost za okoliš. Prisutna je najčešće u Mediteranskim zemljama koje klimatski pogoduju uzgoju maslina. Komina sadrži znatnu koncentraciju fenolnih spojeva, lipida i organskih kiselina, koji se tijekom vremena pretvaraju u fitotoksičan materijal, koji predstavlja ključan problem za okoliš. S druge strane, komina masline sadrži vrijedne nutritivne komponente koje se mogu izdvojiti i upotrijebiti za potrebe farmaceutske industrije i u medicini. Prethodna istraživanja su pokazala da je komina masline vrijedan izvor snažnih antioksidansa zahvaljujući visokom sadržaju fenolnih spojeva. Njihova sposobnost vezanja slobodnih radikala ima pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Primjena eutektičkih otapala nameće se kao jedno od potencijalnih rješenja za poboljšanje učinkovitosti procesa ekstrakcije, dok istodobno zadovoljava načela zelene kemije primjenom sigurnih, ne hlapljivih, ne toksičnih i obnovljivih otapala. Nova, dizajnirana eutektička otapala, pokazala su veću učinkovitost u ekstrakciji biološki aktivnih komponenti u odnosu na ekstrakciju koja se odvila u konvencionalnim otapalima ili vodi.

U ovom radu ispitana je primjenjivost i prednost niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzije u separaciji fenolnih spojeva u odnosu na konvencionalna otapala, te poboljšanja u samom procesu separacije koja je pri tome moguće ostvariti. Prikazani su rezultati ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine masline, određeno je optimalno vrijeme trajanja procesa ekstrakcije i najučinkovitiji načini miješanja. S prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalom, koje se pokazalo najdjelotvornije za ekstrakciju fenolnih spojeva, pripravljena je stabilna nanosuspenzija kako bi se pokušalo postići dodatno poboljšanje prijenosa tvari tijekom procesa što je i ostvareno nakon uklanjanja uljne faze iz komine.

Ključne riječi: *ekstrakcija, fenolni spojevi, komina masline, nanosuspenzije, niskotemperaturna eutektička otapala*

Summary

Application of low temperatured eutectic solvents and nanosuspension in the process of phenolic compounds separation out of olive pomace

Olive cake, known as waste produced after olive processing, pose significant environmental hazards. It is mostly generated in Mediterranean countries that climaticly favor olives growing. Olive cake contains a significant concentration of phenolic compounds, lipids and organic acids, which eventually convert to phytotoxic material, are the main environmental issue. On the other hand, olive cake contains valuable nutritional components that can be extracted and used in medical and pharmaceutical purposes. Previous studies have shown that olive cake is an excellent source of powerful antioxidants due to its high content of phenolic compounds. Their ability to capture free radicals generally has positive effects on a human health. Application of deep eutectic solvents (DES) can be a potential solution for improving the efficiency of extraction process, which satisfies the principles of green chemistry by using safe, non-volatile, non-toxic and renewable solvents. Comparisons of extraction with conventional solvents and new, designed solvents DESs have shown higher efficiency in extracting biologically active compounds, or extraction in water.

This study examines the applicability and the advantage of low-temperatured eutectic solvents and nanosuspensions in the separation of phenolic compounds, compared to conventional solvents, and improvements in the separation process that can be achieved. This study shows results of phenols extraction from olive cake, optimal extraction time and the most effective mixing. With a natural low - temperatured eutectic solvent, which proved to be the most effective for phenolic compounds extraction, a stable nanosuspension was prepared in order to improve the mass transfer during the process which was achieved after removing the oil phase out of olive pomace.

Key words: *extraction, phenolic compounds, nanosuspensions, olive cake, low-temperatured eutectic solvents*

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 3 |
| 2.1. MASLINA | 3 |
| 2.2. KOMINA – NUSPROIZVOD U PRERADI MASLINA | 4 |
| 2.3. FENOLNI SPOJEVI | 5 |
| 2.2.1. Fenolni spojevi prisutni u maslini | 6 |
| 2.2.2. Svojstva fenolnih spojeva | 8 |
| 2.3. EKSTRAKCIJA | 9 |
| 2.3.1. Ekstrakcija kruto - kapljevito | 11 |
| 2.3.2. Poboljšanje procesa ekstrakcije | 12 |
| 2.3.3. Načini miješanja u postupku ekstrakcije | 13 |
| 2.4. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA | 14 |
| 2.4.1. Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 15 |
| 2.5. NANOSUSPENZIJE | 17 |
| 2.5.1. Eutektičko otapalo kao bazni fluid za pripravu nanosuspenzije | 20 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 21 |
| 3.1. SVRHA RADA | 21 |
| 3.2. KOMINA | 21 |
| 3.2.1. Priprema komine masline za eksperiment | 21 |
| 3.3. SOXHLET METODA | 22 |
| 3.4. KARAKTERIZACIJA KOMINE MASLINE | 24 |
| 3.5. PRIRODNA NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA | 25 |
| 3.5.1. Sinteza i karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 25 |
| 3.6. PRIPREMA NANOSUSPENZIJA | 27 |
| 3.6.1. Karakterizacija nanočestica | 27 |
| 3.6.2. Raspršivanje nanočestica | 27 |
| 3.6.3. Karakterizacija nanosuspenzije | 28 |
| 3.7. EKSTRAKCIJA | 28 |
| 3.7.1. Načini provedbe ekstrakcije | 29 |
| 3.7.2. Optimizacija procesa | 31 |

| | |
|--|----|
| 3.7.3. Ekstrakcija nanosuspencijama..... | 31 |
| 3.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH FENOLA..... | 32 |
| 3.8.1. Folin-ciocalteu metoda..... | 32 |
| 4. REZULTATI..... | 34 |
| 4.1. KARAKTERIZACIJA KOMINE MASLINE..... | 34 |
| 4.2. KARAKTERIZACIJA PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA..... | 36 |
| 4.3. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE | 36 |
| 4.3.1. Odabir metode i otapala | 36 |
| 4.3.2. Određivanje optimalnog vremena miješanja..... | 37 |
| 4.3.3. Utjecaj odnosa krutina kapljevina na proces ekstrakcije..... | 38 |
| 4.3.4. Utjecaj temperature na proces ekstrakcije..... | 38 |
| 4.4. KARAKTERIZACIJA NANOSUSPENZIJA..... | 39 |
| 4.5. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE PRIMJENOM NANOSUSPENZIJA | 40 |
| 5. RASPRAVA..... | 42 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 47 |
| 7. LITERATURA..... | 49 |
| 8. ŽIVOTOPIS..... | 52 |

1. UVOD

Proizvodnjom maslinovog ulja dobiva se velika količina otpada u obliku komine masline kao čvrste faze, te vegetativne vode kao tekuće faze. Zbrinjavanje tog otpada je zakonska obveza u Europskoj uniji, no nije reguliran način tog zbrinjavanja. [1]

Brojne industrije kao što su farmaceutska, prehrambena i kozmetička u proizvodnji i primjeni upotrebljavaju bioaktivne komponente koje se najčešće nalaze u prirodnom obliku zarobljene u biljkama. Maslina kao jedna od najznačajnijih biljki Mediteranskog podneblja, pokazala se kao vrijedan izvor brojnih bioaktivnih komponenti koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje te se vrše brojna istraživanja na tu temu. Ona sadrži fenolne spojeve koji pridonose nutritivnoj i zdravstvenoj vrijednosti maslinovog ulja, ali zaostaju i u otpadu koji nastaje preradom maslina. Fenolni spojevi su antioksidansi koji imaju dobra protuupalna, protualergijska te protukancerogena djelovanja zbog čega imaju važnu ulogu u prevenciji mnogih bolesti.

Nakon prerade maslina za proizvodnju maslinovog ulja, nastaje otpad u obliku lišća, komine masline (kruti ostatak) i otpadne vode. Istraživanja su pokazala da upravo u tom otpadu zaostaje najveći broj fenolnih spojeva dok ih vrlo malo prijeđe u maslinovo ulje. Iz tog razloga, pokušava se izdvojiti fenolne spojeve iz nastalog otpada kako bi se njihovi brojni pozitivni učinci iskoristili u proizvodnji velikog niza proizvoda u spomenutim industrijama.

Nadalje, s obzirom da fenolni spojevi sadržani u nastalom otpadu imaju fitotoksična svojstva, odlaganje takvog otpada u okoliš može prouzročiti brojne ekološke probleme. Iz otpadne vode izdvajaju se fenolni spojevi kako bi se voda na kraju mogla ispustiti u okoliš bez rizika od onečišćenje, a osim prerade otpadne vode pronalaze se i različita rješenja obrade čvrstog otpada (komine masline) kako bi se smanjio ili potpuno eliminirao njezin štetan učinak na okoliš.

U današnje vrijeme, velika pažnja se pridodaje razvoju i prilagodbi proizvodnje prema načelima zelene kemije. Područje koje je veoma napredovalo u zadnjih par godina je razvoj zelenih

otapala koja su biorazgradiva, netoksična, nehlapljiva, nezapaljiva i obnovljiva te imaju još niz ekoloških i ekonomičnih svojstava.

Među njima je važno istaknuti prirodna niskotemperaturna eutektička otapala koja su sa svojim izvrsnim svojstvima zadovoljila načela zelene kemije, te se pokazala kao učinkovita otapala u brojnim procesima prehrambene i farmaceutске industrije te eliminirala potrebu pročišćavanja konačnog proizvoda. Eutektička otapala ostvarila su značajnu primjenu u procesima ekstrakcije kao sekundarna otapala za izdvajanje bioaktivnih komponenti iz bioloških materijala gdje su pokazala veću učinkovitost i ekonomičnost od konvencionalnih otapala.

Najnovija istraživanja na području poboljšanja učinkovitosti procesa ekstrakcije razmatraju mogućnosti upotrebe stabilnih nanosuspenzija pripremljenih raspršenjem nanočestica u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Pretpostavka o mogućnosti poboljšanja ekstrakcije uz pomoć nanosuspenzija bazira se na dobivenom poboljšanju toplinskih svojstava korištenjem nanosuspenzija. Naime, zbog Brownovog gibanja nanočestica u stabilnim suspenzijama dolazi do mikrokonvekcije u suspenziji čime se poboljšava prijenos topline te se analogno tome očekuje i poboljšanje u prijenosu tvari.

U ovom radu ispitana je primjenjivost niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzija u separaciji fenolnih spojeva iz komine masline te uspoređena njihova učinkovitost u odnosu na separaciju konvencionalnim otapalima. Također, eksperimentalno su provjerene mogućnosti poboljšanja procesa ekstrakcije fenola primjenom nanosuspenzija

2. OPĆI DIO

2.1. MASLINA

Maslina (*Olea europea*) je jedna od najstarijih kultiviranih stabala u svijetu, a smatra se da potječe od vrste *Olea sylvestris* te da vuče porijeklo iz Male Azije (slika 1). Koristi se za proizvodnju ulja i stolnih maslina.



Slika 1. Stablo i plod masline [1]

Plod masline se sastoji od kožice, pulpe i sjemenke. Kemijski sastav ploda masline ovisi o sorti i uvjetima uzgoja pa stoga postoje razlike u udjelu ulja u plodovima. Ulje se u plodu masline nalazi u pulpi i to u vakuolama unutar stanica. U zreloom plodu takve vakuole ispunjavanju preko 80% volumena stanica. Oko Mediteranskog mora uzgaja se 98% postojećih stabala masline. Stabla masline u svijetu pokrivaju površinu od oko 10 milijuna hektara, od kojih se dobije oko 10 milijuna tona plodova. Devet milijuna koristi se za proizvodnju ulja, a jedan za stolne masline. [1]

Opće je poznata velika primjenjivost masline i njenih proizvoda u prehrambenoj industriji te za medicinske svrhe. Jedno drvo masline može dati 15-40 kg ploda tj. otprilike 3-8 kg ulja. Plod se sastoji od kožice, mesa i koštice. Prosječan kemijski sastav ploda masline je 50% vode, 22% ulja, 19.1% ugljikohidrata, 5.8% celuloze, 1.6% proteina, 1.5% minerala. [2, 3]

Proizvodnja maslinovog ulja generira otprilike 20% maslinovog ulja, 30% polučvrstog ostatka (komine) i 50% otpadne vode. [3]

2.2. KOMINA – NUSPROIZVOD U PRERADI MASLINA

Postupak proizvodnje maslinovog ulja odvija se u nekoliko faza. Kad se plodovi maslina opreme uljaru, nakon čišćenja i pranja slijedi mljevenje s ciljem oslobađanja ulja iz vakuola u stanicama pulpe ploda. Da bi se manje kapljice ujedinile u veće, provodi se miješanje maslinovog tijesta dobivenog mljevenjem. Nakon miješanja slijedi ekstrakcija ulja, koja se temelji na jednom od tri principa: prešanju, centrifugiranju ili selektivnoj filtraciji. Prešanjem se iz maslinovog tijesta izdvaja tzv. uljni mošt, tj. mješavina ulja i vode, iz kojeg se odvaja ulje pomoću različitih filtara. Centrifugiranje je proces odvajanja ulja iz maslinovog tijesta na bazi razlike u gustoći ulja, vegetabilne (biljne) vode i krutih čestica. Odvija se u horizontalnim centrifugama ili dekanterima, s dva ili tri izlaza. Ako postoje dva izlaza, voda i čvrste čestice se odvajaju zajedno, a ako su tri izlaza, sve tri komponente se odvajaju posebno: ulje, voda i čvrsta tvar. Izdvajanje ulja selektivnom filtracijom moguće je zbog različite površinske napetosti ulja i vode. Aparat koji radi na tom principu sastavljen je od mnogo tankih pločica od nehrđajućeg čelika koje se uranjaju u maslinovo tijesto i kad se izvuku van, na sebi zadržavaju ulje zbog njegove manje površinske napetosti.

Prerodom maslina u ulje dobiva se velika količina otpada i to u obliku komine masline (kao čvrstog otpada) i vegetabilne ili biljne vode (kao tekuće faze). Procesom centrifugiranja u centrifugama s dva izlaza, tzv. dvofaznim centrifugiranjem, dobiva se treća vrsta otpada, tj. mješavina vegetabilne vode i komine.

Procjena količine otpada koji nastaje u proizvodnji maslinovog ulja u EU je oko 6,8 milijuna tona godišnje. U Hrvatskoj se proizvodi oko 30 000 tona maslina godišnje, pri čemu nastaje oko 12 000 tona svježje komine. Komina masline sastoji se od kožice ploda, pulpe i dijelova koštice, a glavni kemijski sastojci su celuloza, bjelančevine, voda, polifenoli i ulje. Udio vode u komini varira ovisno o procesu prerade maslina. U komini dobivenoj prešanjem je niži nego kod one dobivene procesom centrifugiranja. Udio bjelančevina je uglavnom nizak, a aminokiselinski sastav je sličan onome kod zrna ječma. U tablici 1 je prikazan prosječni kemijski sastav komine masline.

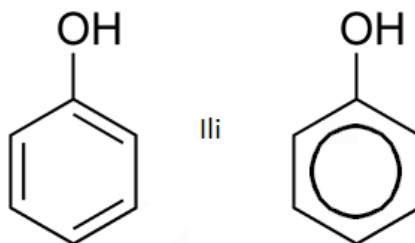
Tablica 1. Kemijski sastav komine masline

| <i>Parametar</i> | <i>Udio (%)</i> |
|------------------|-----------------|
| Voda | 20 - 25 |
| Bjelančevine | 4,5 - 9 |
| Vlakna | 40 – 55 |
| Ulje | 2 – 10 |
| Pepeo | 3 - 6 |

Podaci iz tablice, dobiveni iz literatura, ne moraju se nužno međusobno slagati i podudarati jer do varijacija i odstupanja u kemijskom sastavu komine dolazi ovisno o tome kojeg je tipa, kakvog stanja i podrijetla masline te o načinu kojim je prerađena. Parametar koji može najviše varirati je udio ulja jer je on najovisniji o sorti, uvjetima uzgoja, klimatskim uvjetima i sličnom. [1]

2.3. FENOLNI SPOJEVI

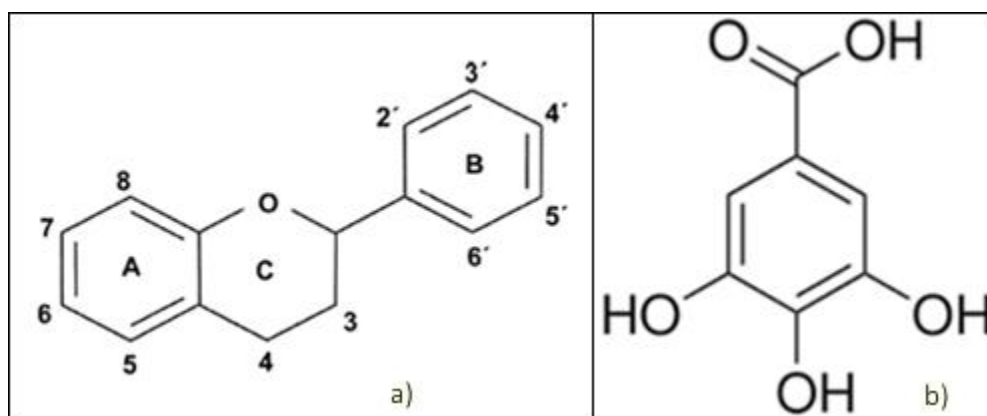
Fenolni spojevi prisutni su u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. To su organski spojevi (aromatski spojevi) koji se sastoje od jedne ili više hidroksilnih skupina (-OH) vezanih izravno na aromatski prsten. Najjednostavniji takav spoj je fenol (slika 2). [4]



Slika 2. Fenol [4]

Prema svojoj osnovnoj kemijskoj strukturi fenolni spojevi dijele se na flavonoide te fenolne kiseline (slika 3). Flavonoidi obuhvaćaju najširu polifenolnu skupinu koja se sastoji od brojnih podgrupa, fenolne kiseline se sastoje od fenolnog prstena i karboksilne kiseline.

Galna kiselina, kao predstavnik fenolnih kiselina, nalazi se u prirodi u slobodnom obliku te u vodi kao dio topivih organskih spojeva tanina. Često se koristi kao standard za određivanje fenolnog sadržaja u raznim materijama putem *Folin-Ciocalteu* metode. [5]



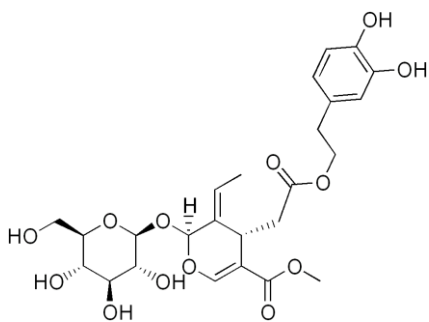
Slika 3. Osnovna kemijska struktura flavonoida (a) i galne kiseline (b) [4]

2.2.1. Fenolni spojevi prisutni u maslini

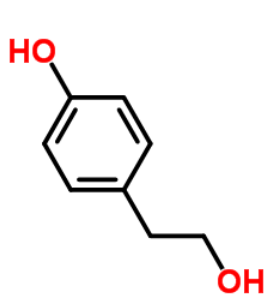
Neki od fenolnih spojeva koje nalazimo u maslinama su hidroksitirozol, tirozol, oleuropein aglikon, ligstrizid aglikon, vanilinska kiselina, kavenska kiselina, p-kumarinska kiselina i brojni drugi. [6]

Sa zdravstvene strane najviše istaknut fenolni spoj u maslinama je *oleuropein* za kojeg su istraživanja pokazala da potiče aktivnost hormona štitnjače u tijelu pa na taj način doprinosi gubitku masnog tkiva. Opušta krvne žile i sprječava nakupljanje plaka na površini krvnih žila koji dovodi do ateroskleroze. Također ima ulogu u snižavanju razine šećera u krvi, potiče rad imunološkog sustava te ima antibakterijsko i antivirusno djelovanje. [7, 8]

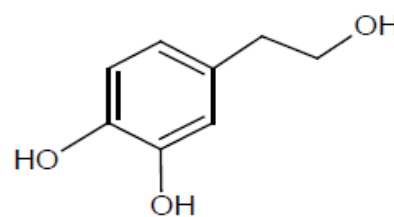
Uz oleuropein važni su tirosol (TS) i hidroksitirosol (HTS). Za njih je utvrđeno da snižavaju razinu C-reaktivnog proteina u krvi (CRP), proteina plazme koji služi kao upalni marker tj. djeluju protuupalno. Nadalje, utvrđeno je da imaju sposobnost suzbijanja i usporavanja rasta nepoželjnih bakterija, uključujući bakterije odgovorne za infekcije probavnog trakta. Medicinska istraživanja su pokazala i da TS i HTS pospješuju formiranje kostiju Naime, uočeno je da ljudi koji redovito konzumiraju maslinovo ulje imaju znatno viši udio osteokalcina, proteina koji doprinosi jačanju kostiju. [9]



Slika 4. Tirosol [4]



Slika 5. Oleuropein [4]

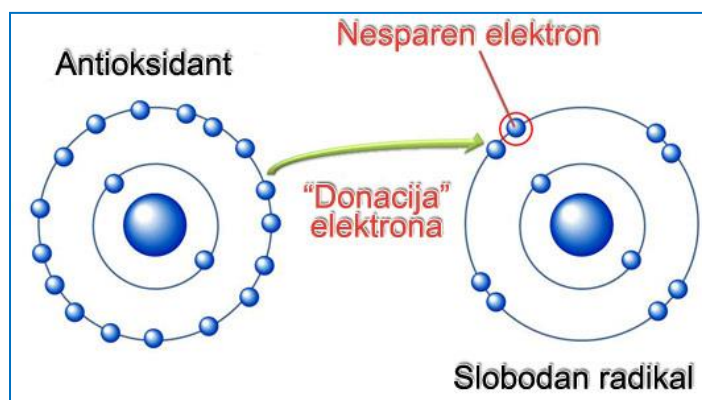


Slika 6. Hidroksitirosol [4]

Uz sve navedene dobrobiti za zdravlje koje maslinovo ulje pruža, primjećujemo da su polifenolni spojevi u najvećoj mjeri zaslužni za njegovu visoku zdravstvenu vrijednost. Nažalost, nakon prerade maslina tek otprilike 2% fenolnih spojeva uspije prijeći u maslinovo ulje dok u komini masline i otpadnoj vodi zaostaje 98% fenolnih spojeva. [11] To se objašnjava činjenicom da antioksidansi kao biljne komponente postoje u tri oblika: topivom - slobodnom, topivom - vezanom i netopivom. Topivi - slobodni fenoli uglavnom su niske i srednje molekularne mase te se mogu izolirati različitim organskim otapalima. Topivi – vezani, obuhvaćaju spojeve s visokom molekularnom masom, vezane na stanične stijenke makromolekula u estere, ili su zarobljeni u jezgri ploda. Netopivi obično ostaju u ostatcima organskih ekstrakata te u njima najčešće zaostaje većina antioksidacijskih tvari. [6]

2.2.2. Svojstva fenolnih spojeva

Fenolni spojevi su kristalne ili tekuće tvari. Bezbojni su ukoliko nisu prisutni neki spojevi koji uzrokuju obojenost. Kiseli su zbog utjecaja aromatskog prstena te otapanjem u jakim lužinama stvaraju soli fenolate. Slabo su topljivi u hladnoj vodi, imaju nisko talište i prilično visoko vrelište. Fenolni spojevi su dobri antioksidansi. [11] Antioksidansi su molekule koje neutraliziraju reaktivne slobodne radikale bilo primanjem ili otpuštanjem elektrona i/ili protona.



Slika 7. Mehanizam djelovanja antioksidansa [6]

Zaštitna uloga fenola u biološkim sustavima se pripisuje antioksidativnim svojstvima fenola tj. njihovoj sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala. Polifenoli u biljkama kao biološki aktivne fitokemikalije sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizama (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, pridonose pigmentaciji biljaka dok u namirnicama pridonose gorčini, oštrini, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti. [12]

Konзумiranje hrane sa antioksidativnim djelovanjem ima pozitivan učinak na prevenciju ljudskih bolesti kao što je karcinom, ateroskleroza, artritis, dijabetes te procese starenja (zbog čega fenolni spojevi nalaze veliku primjenu i u kozmetičkoj industriji). Također imaju važnu ulogu u prevenciji bolesti zahvaljujući svojim dokazanih protuupalnim, protualergijskim te

protukancerogenim djelovanjima. [13] Primjenu nalaze i kao sirovine za proizvodnju anlina, fenolnih smola, bisfenola A, fenol formaldehida, salicilne kiseline te cikloheksanona. [14] Fenoli su prisutni u otpadnim vodama brojnih industrija kao npr. farmaceutske, prehrambene, industrije proizvodnje maslinovog ulja, papira, plastike i raznih drugih.

Pošto su fenolni spojevi fitotoksični, upotrebljavaju se razne metode kako bi ih se uklonilo iz otpadnih voda. [15] Prema Zakonu o održivom gospodarenju otpadom NN 94/2013, otpad u obliku komine masline ne smije se odlagati na tlo te ga je potrebno zbrinuti i upotrijebiti u druge svrhe. [16]

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je jedinična operacija izdvajanja pojedine komponente iz smjese tvari (otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese) na osnovi različite topljivosti u nekom otapalu.

Vrste ekstrakcija :

- ekstrakcija kruto - kapljevito (izluživanje)
- ekstrakcija kapljevito - kapljevito [6]

Najveća primjena ekstrakcije je u prehrambenoj industriji (izolacija aktivnih komponenti ili nepoželjnih tvari, dobivanje šećera i proteina), farmaceutskoj industriji (izolacija aktivnih komponenata iz ljekovitog bilja), kozmetičkoj i kemijskoj industriji (dobivanje metala iz ruda, dobivanje organskih boja).

Sekundarno otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju, mora zadovoljiti niz uvjeta:

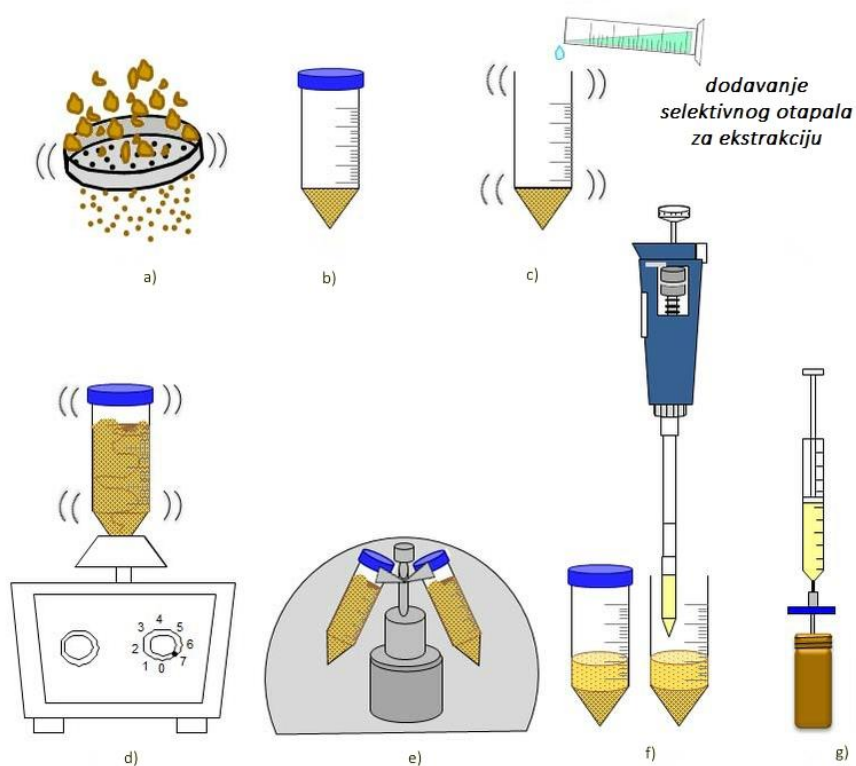
- otapalo mora biti selektivno
- otapalo mora biti učinkovito (ušteda na količini)
- otapalo mora biti kemijski inertno prema ostalim prisutnim tvarima
- dobra topljivost ključne komponente u otapalu

- otapalo ne smije biti zapaljivo i otrovno
- otapalo mora biti dostupno, jeftino i ekološki prihvatljivo
- treba biti moguća jednostavna regeneracija otapala
- razlika u gustoći između otapala potrebna je radi lakše separacije nakon ekstrakcije
- optimalna površinska napetost – što je manja treba dovesti manje energije za dobru homogenizaciju odnosno koalescenciju kapljica
- otapalo ne smije biti korozivno (utječe na cijenu konstrukcije uređaja)
- poželjna manja viskoznost otapala (bolji prijenos tvari i topline) [19]

S obzirom da klasična organska otapala mogu uzrokovati brojne negativne učinke na okoliš i zdravlje ljudi, istražuje se primjena različitih nekonvencionalnih otapala među kojima se najviše ističu ionske kapljevine i niskotemperaturna eutektička otapala.

2.3.1. Ekstrakcija kruto - kapljevito

Ekstrakcija čvrsto – kapljevito (SLE – *solvent liquid extraction*) označava kemijski separacijski proces izdvajanja neke supstance iz krutine uz pomoć određenog otapala, odnosno kapljevine (slika 8). Taj ravnotežni separacijski proces izdvajanja naziva se još i izluživanje, koje je jedna od najčešće korištenih separacijskih operacija za izolaciju aktivnih komponenti iz biljnog materijala.



Slika 8. Stupnjeviti prikaz procesa izluživanja (a) *prosijavanje*; b) *doziranje i priprema za dodavanje selektivnog otapala*; c) *dodavanje selektivnog otapala za ekstrakciju*; d) *miješanje otapala i krutine*; e) *centrifugiranje po potrebi radi bolje separacije faza*; f) *uzorkovanje tekuće faze za ispitivanje*; g) *priprema uzorka za snimanje*) [<https://www.researchgate.net>]

Najčešće se provodi kao maceracija ili perkolacija. Maceracija se provodi u suspenziji, kao šaržni proces, tako što se kruti materijal potapa u otapalo te dolazi do prijenosa tvari na granici faza čvrsto - kapljevito. Perkolacija se odvija polušaržno, tako što kroz nepokretan sloj čvrstog materijala kontinuirano protječe otapalo. [17]

Prije samog procesa ekstrakcije potrebno je pripremiti krutinu tako da ekstrakt može biti ekstrahiran u otapalu u što kraćem vremenu. U tu svrhu krutina se može gnječiti, mrviti i usitnjavati što osigurava veću međufaznu površinu i učinkovitiji ravnotežni separacijski proces. Miješanje se provodi da bi se osigurala što bolja interakcija između dviju faza, brže i kvalitetnije uspostavljanje ravnoteže, intenzivniji prijenos tvari iz krutine u otapalo te u svrhu smanjenja vremena trajanja procesa. Supstanca koja se želi ekstrahirati mora biti topljiva u selektivnom otapalu, a u krutini može biti prisutna kao kapljevita ili čvrsta komponenta. Otapalo prodire kroz pore čvrste komponente i dolazi do molekula koje se nalaze u krutini, otapa željenu supstancu te ju prenosi u otapalo do uspostavljanja ravnoteže. Na površini te tvari se, zapravo, stvara sloj zasićene otopine kojeg nazivamo granični sloj. Uslijed razlike koncentracije između graničnog sloja i ostatka otapala postoji koncentracijski gradijent zbog kojeg topljiva tvar stalno prelazi u ostatak otapala. Brzina izluživanja povećava se smanjenjem debljine graničnog difuzijskog sloja (npr. miješanjem) i održavanjem što veće razlike koncentracija u graničnom sloju i sredstvu za izluživanje.

Procesom ekstrakcije nikada nije potpuno moguće izdvojiti ekstrakt, već dio uvijek ostane zarobljen u krutini. Da bi dobili čisti produkt i reciklirali otapalo za ponovnu upotrebu, provodi se regeneracija otapala i izdvajanje ekstrakta nekom od separacijskih metoda, što je uglavnom najskuplji i najteži dio procesa.

2.3.2. Poboljšanje procesa ekstrakcije

Na proces ekstrakcije kruto-kapljevito i njenu brzinu, veliki utjecaj imaju: veličina čestica, temperatura pri kojoj se provodi ekstrakcija, izvedba procesa, odabir sekundarnog otapala kao i

njegova fizikalna svojstva te način miješanja. Viša temperatura ekstrakcije u većini slučajeva ubrzava proces jer povećava brzinu otapanja krute tvari, smanjuje viskoznost i gustoću otapala što utječe na brzinu prijenosa tvari.

Međutim moguće je da se u nekim slučajevima aktivne komponente degradiraju porastom temperature tako da je prije izvođenja ekstrakcije potrebno poznavati fizikalno-kemijske karakteristike sustava kao i aktivne komponente koju se želi ekstrahirati.

Veličina čestica ima veliki utjecaj na prijenos tvari i samu brzinu ekstrakcije. Što su čestice manje veća je kontaktna površina između kapljevine i krutine što pozitivno utječe na prijenos tvari. Također, kraći je put koji otopljena tvar prijeđe izlazeći iz krutine. [6]

2.3.3. Načini miješanja u postupku ekstrakcije

Miješanje čvrstih čestica u kapljevinama se naziva suspendiranje. Ono se provodi u svrhu sprječavanja sedimentacije čvrstog i osiguravanja pogodnih uvjeta za prijenos tvari i topline te kemijsku reakciju. [18] Uz primjenu mehaničkog miješanja u današnje vrijeme ekstrakcija se provodi upotrebom ultrazvuka ili kombinacijom ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja.

Ultrazvuk visoke snage, zbog kavitacijskog djelovanja na stanične stjenke, omogućuje bolje prodiranje otapala u materijal te tako povećava prijenos tvari. Zbog pucanja staničnih stjenki dolazi do direktnog kontakta otapala sa sadržajem stanice te se na taj način ubrzava ekstrakcija i povećava njezina učinkovitost. Ekstrakcija biokomponenti ultrazvukom omogućuje visoku reproducibilnost u kraćem vremenu, jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala. Istovremenom primjenom mikrovalova i ultrazvuka postižu se u procesu ekstrakcije odlični rezultati. Naime, zbog istovremenog zagrijavanja cijelog volumena (uslijed djelovanja mikro valova) te poboljšanog prijenosa tvari (zbog pojave kavitacije u mediju koji prenosi ultrazvučne valove) dolazi do poboljšanja prijenosa tvari i topline. [19]

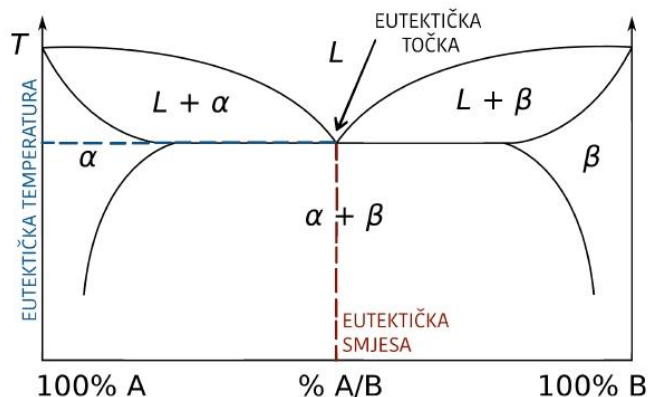
2.4. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Naziv eutektik dolazi iz grčkog *εὐτηκτος* što znači lako topljiv. To je smjesa ili slitina dvije ili više tvari u takvom omjeru u kojem ima najniže talište. Drugim riječima, eutektička smjesa ima niže talište od svake pojedine tvari koje ju sačinjavaju i njihove smjese u bilo kojem drugom omjeru. [20, 21]

Niskotemperaturna eutektička otapala su sustavi sa temperaturom tališta za oko 200°C nižom od temperature tališta pojedinih komponenata. Razvijena su kao alternativa drugim otapalima kao što su npr. ionske kapljevine koje najčešće nisu dozvoljene za upotrebu u prehrambenoj industriji zbog njihove toksičnosti. Eutektička otapala sastoje se od kationa, aniona i kompleksirajućeg agensa, a prema tome se mogu podijeliti u tri grupe:

1. metalna sol + organska sol (npr. ZnCl_2 + kolin klorid)
2. hidrat metalne soli + organska sol (npr. $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + kolin klorid)
3. donor vodikove veze + organska sol (npr. urea + kolin klorid) [22]

Fazne promjene nekog sustava smjese – grafički se opisuju ravnotežnim faznim dijagramom stanja, pri atmosferskom tlaku, odnosno prikazom ovisnosti sastava smjese o temperaturi. Eutektični dijagram je dijagram stanja za smjesu čije se komponente potpuno miješaju u kapljevitom stanju, a ne miješaju u čvrstom stanju. Karakteristični prikaz sadrži: eutektičku točku – sastav smjese u kojem ona ima najnižu temperaturu taljenja, odnosno eutektičnu temperaturu pri kojem su obje komponente u kapljevitom stanju i međusobno potpuno mješljive. Slika 9. prikazuje dijagram stanja (fazni dijagram) za zamišljenu smjesu dviju komponenata (A i B) gdje možemo uočiti područje eutektika, eutektičku točku i temperaturu pri kojoj eutektik nastaje.



Slika 9. Fazni dijagram eutektičkog sustava [4]

Posljednjih godina najviše se radi na razvijanju i usavršavanju prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (*Natural Deep Eutectic Solvents – NADES*). Ova grupa eutektičkih otapala sastoji se od prirodnih komponenata kao što su organske kiseline, amino kiseline i šećeri, a nastaju stvaranjem kompleksa između donora vodikove veze (HBD) i akceptora vodikove veze (HBA). [22]

2.4.1. Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Eutektička otapala su često biorazgradiva što znači da njihovo ispuštanje u okoliš nema štetnih učinaka. Stabilna su i nisu hlapljiva pri atmosferskim uvjetima. Imaju veliku toplinsku, kemijsku i elektrokemijsku stabilnost te su odlična otapala za veliki broj organskih spojeva. Sa stanovišta zelene kemije najvažnija je njihova minimalna toksičnost prema okolišu. Priprava eutektičkih otapala je jednostavna i ekonomična te kod sinteze ovih otapala ne dolazi do kemijske reakcije nego se komponente vodikovim vezama povezuju i tvore eutektičko otapalo, a da pri tom ne nastaje otpad.

Niskotemperaturno eutektičko otapalo je netoksično, ekološki prihvatljivo i bio –razgradivo zeleno otapalo, koje je stabilno i u kapljevitom stanju na sobnoj temperaturi. To je nezapaljivo otapalo inertno u reakcijama s vodom. Specifično je po tome što ima talište niže od svih

komponentata koje ga sačinjavaju najčešće u intervalu od 50 – 100 °C, što ga čini pogodnim za organske reakcije. Karakterizira ga niski tlak para na sobnoj temperaturi zbog čega ne dolazi do isparavanja i visoka viskoznost koja se, ovisno o primjeni, može podešavati dodavanjem vode, a porastom temperature raste mu vodljivost te se smanjuje viskoznost. Posebnost ovih otapala je mogućnost različitih kombinacija donora i akceptora vodikove veze te njihovog molarnog odnosa čime se može proizvesti otapalo sa točno određenim svojstvima. [23, 24, 25]

Učinkovitost ekstrakcije aktivnih komponenti iz biljnog materijala uz pomoć prirodnog eutektičkog otapala ovisi o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su polarnost, viskoznost i pH. Prirodnim eutektičkim otapalima ostvaruje se visoki stupanj ekstrakcije fenolnih kiselina što se pripisuje jakim interakcijama između molekula DES-a i fenolnih spojeva. [26]

Prvu niskotemperaturnu eutektičku smjesu sintetizirali su Abbott i suradnici 2001. godine koristeći cinkov klorid i/ili kositrov (II) klorid sa kvaternim amonijevim solima tijekom traženja otapala koja bi imala slična svojstva, a čija bi sinteza bila jednostavnija i cijena pristupačnija od klasičnih ionskih kapljevina. Nastavljajući svoj prijašnji rad 2002. sintetizirali su smjesu između uree i kolin – klorida te među prvima upotrijebili naziv *deep eutectic solvent* (DES) za opis svojstava ove kapljevine. Danas se upravo smjesa urea – kolin klorid smatra početkom istraživanja ovih novih otapala. Ustanovljeno je da se niskotemperaturne eutektičke smjese mogu pripremiti pomoću organske kiseline, šećera ili polialkohola s aminima ili kolin – kloridom, ali i brojnim drugim kombinacijama. Mogu se pripremiti na dva načina ovisno o svojstvima kemikalija i konačnoj primjeni. Prvi je način zagrijavanje smjese uz konstantno miješanje i otparivanje vode, drugi je liofilizacijom, odnosno tehnikom sušenja i zamrzavanja. Potonje se češće primjenjuje u tehnikama pripreme nanočestica. [27]

2.5. NANOSUSPENZIJE

Pojam nanofluida (nanosuspenzija) uveo je 1995. američki znanstvenik Stephen U.S. Choi razvijajući nove fluide s poboljšanim svojstvima za prijenos energije. Konvencionalni fluidi koji se koriste za prijenos topline (voda, motorno ulje, etilen glikol) imaju relativno nizak koeficijent toplinske vodljivosti te dakle i stupanj učinkovitosti. Zbog toga je došlo do razvoja nanosuspenzija kao novih radnih medija za prijenos topline. Nanofluidi su koloidne suspenzije baznog fluida i krutih nanočestica različitih oblika (sfernih, cilindričnih, plosnatih). Kao bazni fluidi najčešće se koriste voda, emulzije, ulja, vodene otopine, polimerne otopine i u novije vrijeme ionske kapljevine, odnosno eutektičke smjese. S obzirom na vrstu nanočestica, razlikuju se nanosuspenzije s česticama metala (Cu, Fe, Au, Ag, Al), česticama metalnih oksida (TiO_2 , Al_2O_3 , SiO_2 , Fe_3O_4) i česticama ugljika (grafit ili nanocjevčice – CNT „carbon nanotubes“). Nanočestice su temeljni sastojak u proizvodnji nanostrukture čije se vladanje opisuje kvantno-mehaničkom teorijom, a ne klasičnim Newtonovim zakonima gibanja. To su čvrste čestice veličine između 1 do 100 nm koje imaju svojstva između mikro materijala i atoma ili molekula.

Zbog poboljšanih svojstava, nanosuspenzije su našle široku primjenu u različitim sustavima za prijenos topline, uključujući mikroelektroniku, gorive članke, hladnjake, sustave za hlađenje motora u vozilima, rashladne sustave različitih strojeva i uređaja te u farmaceutskoj industriji.

Postoje dvije metode pripreme nanosuspenzija:

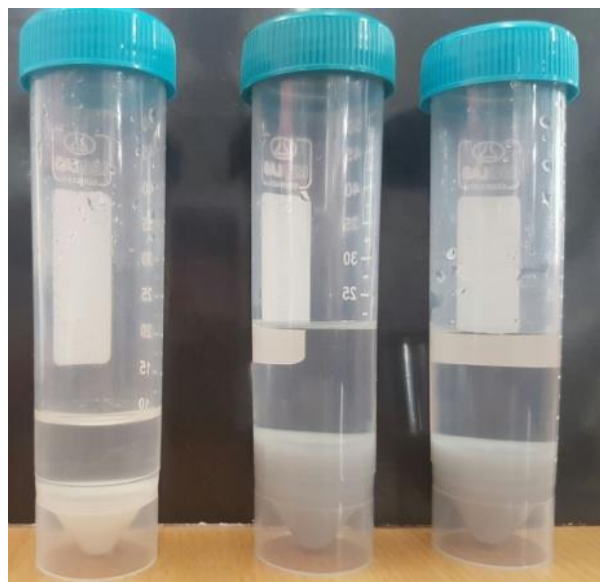
1. U jednom koraku – sinteza nanočestica i priprema nanosuspenzije istovremeno pri čemu nanočestice sintetiziraju direktno u fluid s kojim će činiti suspenziju
2. U dva koraka – prvi korak je priprema nanočestica u obliku praha, a drugi korak je njihovo raspršenje u kapljevinu (raspršivanje ultrazvukom) [28]



Slika 10. Raspršivanje nanočestica sa ultrazvučnom sondom



Slika 11. Stabilne nanosuspenzije



Slika 12. Nestabilne nanosuspenzije

Neki od mehanizama kojima se objašnjava višestruko poboljšanje su: djelovanje nanočestica na međufaznoj površini, stupanj agregacije te Brownovo gibanje nanočestica koje uzrokuje konvekciju tvari na mikro razini što pospešuje procese prijenosa. Na poboljšanje toplinske vodljivosti utječu: volumni udio, oblik nanočestica raspršenih u suspenziji te fizikalna svojstva baznog fluida.

Dosadašnja istraživanja u području prijenosa tvari primjenom nanosuspenzija pokazala su da do poboljšanja dolazi u sustavima: plin – plin, plin – kapljevina te kapljevina – kapljevina. Značajno je uočiti da se pri većem stupnju slobode kretanja atoma i molekula postiže veće poboljšanje (u plinovitim sustavima i do 600%). Međutim, pregledom literature, nisu pronađena istraživanja u sustavima čvrsto – kapljevito. [29]

2.5.1. Eutektičko otapalo kao bazni fluid za pripravu nanosuspenzije

Jedno od bitnih svojstava nanosuspenzija je njihova stabilnost koja predstavlja sposobnost suspenzije da ostane homogenog sastava tijekom dužeg vremenskog razdoblja, tj. da ne dođe do pojave aglomeracije čestica. Aglomeracija nanočestica do koje dolazi zbog djelovanja Van der Waalsovih sila već utječe na proces izmjene tvari i toplinske energije, odnosno, toplinsku vodljivost nanosuspenzija. Zbog toga je važno proučavanje stabilnosti nanosuspenzija kao i analiziranje čimbenika koji utječu na njezinu stabilnost. Iako se nanočestice u suspenziji dobro raspršuju zbog Brownovog gibanja stabilnost nanofluida osigurava se dodavanjem površinski aktivnih tvari (engl. *surfactant*). [28]

Stabilnost nanosuspenzija često predstavlja glavni preduvjet za njihovu primjenu. Ionske kapljevine su pokazale sposobnost da zbog svojih karakterističnih svojstava (velika gustoća i viskoznost te povezanosti ionskim vezama) djeluju pozitivno na stabilnost nanosuspenzija i bez aditiva. Iako sličnih svojstava kao ionske kapljevine, još uvijek nije dovoljno istraženo kako eutektičke smjese djeluju na stabilnost nanosuspenzija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. SVRHA RADA

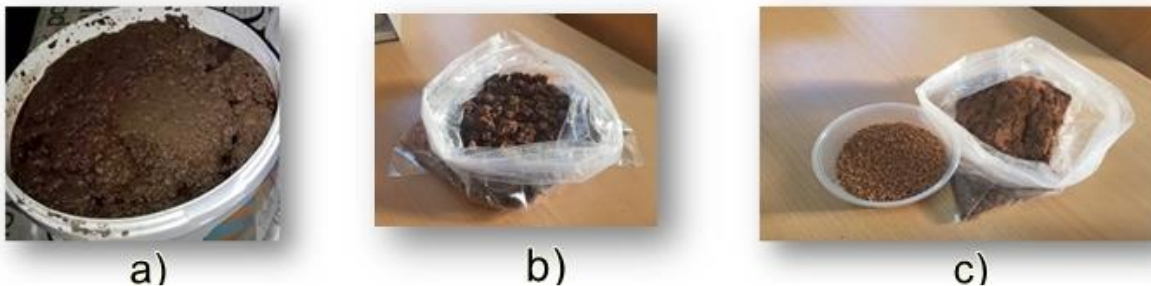
U ovom radu ispitana je primjenjivost, prednost i učinkovitost niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzija u procesu separacije fenolnih spojeva iz komine masline te rezultate usporediti s rezultatima dobivenima primjenom konvencionalnih otapala.

3.2. KOMINA

3.2.1. Priprema komine masline za eksperiment

Komina masline korištena u ovom radu potječe iz Istarske regije, točnije iz vodeće prehrambene kompanije *Agrolaguna* d.d. u Poreču. Dopremljena komina se najprije zamrzнула kako bi se spriječila degradacija vrijednih spojeva uključujući i fenole, tako da je kao prvi korak uslijedilo odmrzavanje i sušenje. Sušenje se provodilo u laboratorijskom sušioniku na temperaturama od 60 °C i 100 °C. Mjerenjem specifične površine pora, veličine pora i raspodjele veličine pora tako osušenih čestica pomoću uređaja ASAP 2000 (*Micromeritics, SAD*) ustvrdilo se kako čestice komine sušene na 60 °C imaju veću specifičnu površinu pora te se iz tog razloga i preostala komina korištena u eksperimentu sušila na temperaturi od 60 °C za sva daljnja ispitivanja.

Sušenjem je uklonjena preostala voda u komini što je iznosilo 45% od ukupne mase uzorka. Nakon sušenja uzorak je usitnjen električnim mlinom u vremenu od 1-2 minute te prosijan sitom promjerom očica 800 μm čime su u većoj mjeri uklonjene koštice iz uzorka. Na slici 13 prikazana su tri koraka u pripremi komine.



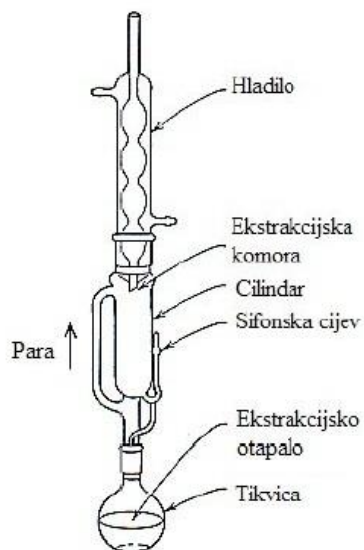
Slika 13. Priprema komine za eksperiment: a) vlažna odmrznuta komina, b) komina nakon sušenja, c) prosijana neoduljena komina i odvojene koštice

3.3. SOXHLET METODA

Soxhlet ekstrakcija je najčešće korištena metoda ekstrakcije krutina kapljevinama. Komponenta, koja se želi izdvojiti, ima ograničenu topljivost u otapalu dok su nečistoće netopljive u istom. Ova metoda ekstrakcije omogućuje odvijanje operacija koje nije nužno neprestano nadgledati i upravljati dok učinkovito reciklira malu količinu otapala kako bi se otopila veća količina ključne komponente.

Čvrsti uzorak se stavi u tuljac za ekstrakciju koji je napravljen od čvrstog filter papira. Tuljac se zatim stavi u Soxhletovu aparaturu, gdje se refluksirano ekstrakcijsko otapalo kondenzira u tuljac i ispire topljive komponente. Soxhlet aparatura je dizajnirana tako da kad se komora koja drži tuljac napuni do određenog volumena otapalo koje sadrži ekstrahirane komponente ispušta se pomoću sifonske cijevi u tikvicu koja sadrži otapalo i proces se ponavlja sve dok se analit uspješno ukloni iz čvrstog uzorka. Soxhlet aparatura je prikazana na slikama 14 i 15.

Nedostaci Soxhlet ekstrakcije su: dugotrajna je (do 24 sata); potrebna je veća količina otapala za ekstrakciju; zbog toga što se otopljeni analit ispušta u tikvicu s otapalom, analit mora biti stabilan na temperaturi vrenja otapala i za svaki uzorak je potreban poseban ekstraktor. Prednosti Soxhlet ekstrakcije su: mogu se koristiti male količine uzorka (nekoliko mg) i jeftinija je u odnosu na neke modernije metode ekstrakcije. [30]



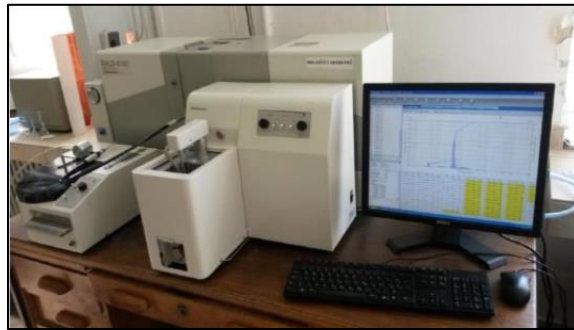
Slika 14. Shema Soxhlet ekstraktora [<https://papihmamih.ga>]



Slika 15. Soxhlet ekstraktor iz laboratorija korišten za oduljivanje

3.4. KARAKTERIZACIJA KOMINE MASLINE

Raspodjela veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije primjenom uređaja za lasersku difrakciju prikazanog na slici 16 čije je mjerno područje 0,4 do 3000 μm . Raspodjele veličina čestica uzorka komine izmjerene su tri puta pa je rezultat izražen kao srednja vrijednost, odnosno, srednji promjer čestica komine.



Slika 16. Uređaj laserske difrakcije SALD-3101 (Shimadzu, Japan)

Struktura maslinove komine istražena je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) pomoću uređaja *Tescan Vega 3 SEM* (Slika 17.). Prije analize uzorka, potrebno je izvršiti njegovu pripremu. Uzorak se nanosi na vodljivu vrpcu te se fiksira na metalni nosač, koji se potom stavlja u komoru naporivača (*sputter coater*) *Quorum SC7620* u atmosferu inertnog plina (Ar). Radna komora mora biti pod tlakom $< 10^{-2}$ mbar, koji se ostvaruje uključivanjem rotacijske pumpe. Katoda, omotač komore, građena je od platine i rodija te služi za oblaganje uzorka ovim metalima. Kada se elektrode priključe na visoki napon (800 – 1200 V), električno polje ionizira argon te njegovi ioni udaraju u katodu i izbijaju atome platine i rodija koji oblažu uzorak te time uzorak postaje vodljiv i spreman za analizu elektronskim mikroskopom. Navedeni uređaj namijenjen je uvidu u strukturu površine sve do nanometarske razine i s mogućnošću povećanja do milijun puta.



Slika 17. Tescan Vega 3 SEM [<http://btmm.bnu.edu.cn>]

3.5. PRIRODNA NISKOTEMPERATurna EUTEKTIČKA OTAPALA

3.5.1. Sinteza i karakterizacija prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

U ovom radu korištena su dva prirodna eutektička otapala *Ma-Fru-Gly* (maltoza-fruktoza-glicerol) i *Ma-Glu-Gly* (maltoza-glukoza-glicerol), a za njihovu sintezu korištene su kemikalije navedene u tablici 2.

Tablica 2. Kemikalije korištene za sintezu prirodnih eutektičkih otapala

| <i>Kemikalija</i> | <i>M, g mol⁻¹</i> | <i>ρ, g cm⁻³</i> | <i>T_v, °C</i> | <i>T_v[*], °C</i> | <i>Čistoća, %</i> | <i>Proizvođač</i> |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| Glicerol | 92,10 | 1,260 | 290,0 | - | 99,0 | BDH Prolabo |
| Jabučna kiselina (maltoza) | 194,09 | 1,609 | - | 130,0 | 99,0 | Acros Organics |
| D – fruktoza | 180,16 | 1,690 | - | 103,0 | 99,0 | Lachner |
| D – glukoza | 180,16 | 1,540 | - | 146,0 | 99,0 | BDH Prolabo |

Prirodna eutektička otapala sintetizirana su u određenom molarnom udjelu 1:1:1. Netom prije sinteze, komponente se suše u vakuum sušioniku (*Savant SPD131DDA Speed Vac Concentrator, Thermo scientific, USA*) pri temperaturi od 60 °C tijekom 8 h. Dvije ili više komponenti u određenom molarnom udjelu i 30 mas% vode dodaju se u tikvicu s okruglim dnom. Sinteza se uglavnom provodila pri temperaturi od 60 °C na rotavaporu (vakuum isparivaču) do pojave bistre i homogene kapljevine. Prirodna eutektička otapala sintetizirana su s određenim postotkom vode (tablica 5) kako bi se smanjila viskoznost otapala, a samim time poboljšalo miješanje kod primjene u procesu ekstrakcije. Sintetiziranim eutektičkim otapalima eksperimentalno su određena glavna fizikalno-kemijska svojstva: gustoća, viskoznost, indeks loma, pH vrijednost i električna vodljivost pri sobnoj temperaturi pomoću odgovarajućih uređaja navedenih u tablici 5.

Tablica 3. Popis uređaja korištenih za određivanje fizikalnih svojstava

| Fizikalno svojstvo | Uređaj | Točnost uređaja |
|------------------------------|--|-------------------------------|
| Gustoća | Areometar | $\pm 0,001 \text{ g cm}^{-3}$ |
| Viskoznost | <i>Brookfieldovom reometru DV – III ULTRA</i> | $\pm 1,0\%$. |
| Indeks loma | Optech Abbe Model RMI | $\pm 0,0001$ |
| pH vrijednost | WTW InoLab pH/Cond 740 elektroda SenTix 81; | $\pm 0,004 \text{ pH}$ |
| Električna vodljivost | WTW InoLab pH/Cond 740 elektroda: WTW Tetracon 325 | $\pm 0,0002 \text{ V}$ |

3.6. PRIPREMA NANOSUSPENZIJA

3.6.1. Karakterizacija nanočestica

Za pripremu nanosuspenzija korištene su nanočestice aluminijev oksid i silicijev oksid proizvođača *Evonik industries*. Karakteristike spomenutih nanočestica prikazane su u tablici 6. i 7. Pripremljenim nanosuspenzijama eksperimentalno su određena glavna fizikalno-kemijska svojstva (gustoća, viskoznost, pH vrijednost i električna vodljivost) pri sobnoj temperaturi (tablica 7).

3.6.2. Raspršivanje nanočestica

Nanočestice u volumnom udjelu od 0,3 % raspršivane su u prirodnom eutektičkom otapalu i u etanolu. Za raspršivanje nanočestica korištena je ultrazvučna sonda marke *Bandelin sonoplus HD 3200* (slika 18), snage 200 W i mogućnosti primjene amplitude u rasponu od 10 do 40 %. U uzorak definirane mase otapala i nanočestica uronjena je ultrazvučna sonda tipa *TT 13*. Nanočestice su se u uzorku raspršile ultrazvučnim valovima amplitude 20 % u vremenu od 10 minuta. Za vrijeme raspršivanja nanočestica uzorak se hladio te temperatura nanosuspenzije nije bila veća od 60 °C.



Slika 18. Ultrazvučna sonda Bandelin sonoplus HD 3200

3.6.3. Karakterizacija nanosuspenzije

Raspodjela veličina čestica pripremljenih nanosuspenzija sa eutektičkim otapalom (DES 1) snimljena je na Institutu Ruđer Bošković na uređaju *Zetasizer Nano ZSP, Malvern*, (slika 19). Analiza je provedena kako bi se ispitala stabilnost pripremljenih nanosuspenzija.



Slika 19. Zetasizer Nano ZSP, Malvern [<https://www.atascientific.com.au>]

3.7. EKSTRAKCIJA

Provedena je šaržna ekstrakcija fenolnih spojeva iz maslinove komine s prirodnim eutektičkim otapalima i njima odgovarajućim nanosuspenzijama, te ekstrakcija sa etanolom kao konvencionalnim otapalom za ekstrakciju. U cilju poboljšanja provedbe procesa ekstrakcije ispitani su utjecaji različitih miješala, povišenje temperature u procesu ekstrakcije, primjena različitih otapala, te različit odnos čvrste tvari i otapala. Za sve eksperimente, osim ako nije drugačije navedeno, uzorak od 1g komine miješao se s 20 mL otapala (DES 1, DES 2 ili etanol).

3.7.1. Načini provedbe ekstrakcije

Različitim načinima provedbe ekstrakcije ispitan je utjecaj na ekstrakciju fenola iz komine. Šaržne ekstrakcije su se provele primjenom mehaničkog miješala, magnetskog miješala, ultrazvučne sonde i ultrazvučne kupelji te mikrovalno ultrazvučnim miješanjem.



Slika 20. Mehaničko miješalo



Slika 21. Magnetsko miješalo



Slika 22. Ultrazvučna kupelj

Na slici 20 prikazano je korišteno mehaničko miješalo *Eurostar Ika Labortechnik*, koje ima mogućnost rada 50-2000 okretaja/minuti, a korišten je intenzitet miješanja od 650-700 okretaja/min. Magnetsko miješalo (slika 21), marke *Tehnica Rotamix 609 MM* snage 15 W, korišten je za ekstrakciju fenola pri intenzitetu 600-650 okretaja/min.

Već prethodno spomenuta ultrazvučna sonda *Bandelin sonoplus HD 3200* (slika 10), pri 20% amplitudi, korištena je, osim za već spomenuto raspršivanje nanočestica u otapalu, i kao jedan od načina provedbe ekstrakcije. Za vrijeme ekstrakcije ultrazvučnom sondom, uzorak se cijelo vrijeme hladio te temperatura uzorka nije bila veća od 60° C.

Ultrazvučna kupelj, maksimalne snage 220 W, također je korištena kao jedan od načina provedbe ekstrakcija, a temperatura uzorka za najdulje vrijeme trajanja ekstrakcije 4 h je uznosila 40° C. Ultrazvučna kupelj prikazana je na slici 22.

3.7.2. Optimizacija procesa

Radi određivanja vremena potrebnog za postizanja stacionarnih uvjeta provedeni su preliminarni eksperimenti za različita parametre. Praćena je promjena dobivenih koncentracija nakon ekstrakcije sa vremenom. Također je ispitan i utjecaj temperatura na efikasnost ekstrakcije, određene su koncentracije fenola pri temperaturama od 20, 40 i 60 °C.

3.7.3. Ekstrakcija nanosuspenzijama

Kao jedan od mogućih načina poboljšanja ekstrakcije fenola, ispitan je utjecaj i primjena nanočestica raspršenih u navedenim otapalima, odnosno, primjena odgovarajućih nanosuspenzija. Za sva optimalna ispitivanja sa eutektičkim otapalima, provedena je ekstrakcija sa odgovarajućom nanosuspenzijom. Nakon ekstrakcije s nanosuspenzijom, a prije same analize, uzorak je bilo potrebno centrifugirati, zatim filtrirati kako bi se dobio uzorak spreman za daljnju analizu i uklonila eventualna prisutnost zaostalih nanočestica. Za centrifugiranje uzorka korišten je uređaj *Centric 322* (pri snazi od 550 W s brojem okretaja 5000 okretaja/min (slika 24), a uzorak se filtrirao pomoću filtera za špricu *ChromafilXtra PET-45/25* (0,45 µm; 25 mm).



Slika 23. Uređaj za centrifugu Centric 322A

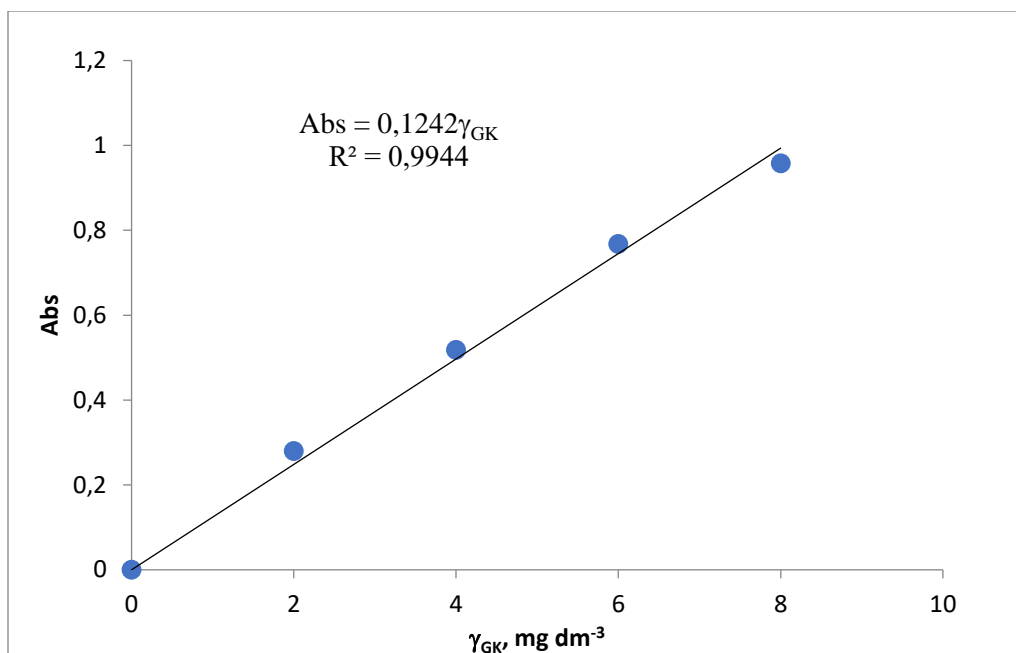
3.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH FENOLA

3.8.1. Folin-ciocalteu metoda

Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijski standardnom *Folin – Ciocalteu* (FC) metodom na UV/Vis spektrofotometru proizvođača *Shimadzu*. Mjerenjem apsorbancije uzoraka pri maksimalnoj valnoj duljini od 756 nm (maksimum apsorpcije) kvantitativno se odredila preostala koncentracija ukupnih fenola te se izrazila preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline.

U odmjerne tikvice od 10 mL pipetirano je 400 μ L *Folin-Ciocalteu* reagensa i 60 μ L filtriranog uzorka te su tikvice stavljene na tamno mjesto tijekom 8 min. U tikvice je nakon 8 minuta dodano 4 mL (7 mas. %) otopine natrijeva karbonata nakon čega je otopina razrijeđena destiliranom vodom do oznake. Tako pripremljene otopine postepeno poprime karakteristično plavo obojenje. Sve pripremljene tikvice omotane su aluminijskom folijom i termostatirane sat vremena na temperaturi od 40 °C.

Nakon termostatiranja na spektrofotometru se mjerio intenzitet apsorbancije koji je direktno proporcionalan količini ukupnih fenola u uzorku. Koncentracija ukupnih fenola u reakcijskoj smjesi izražena preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline određena je iz baždarnog dijagrama (slika 25).



Slika 24. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih fenola



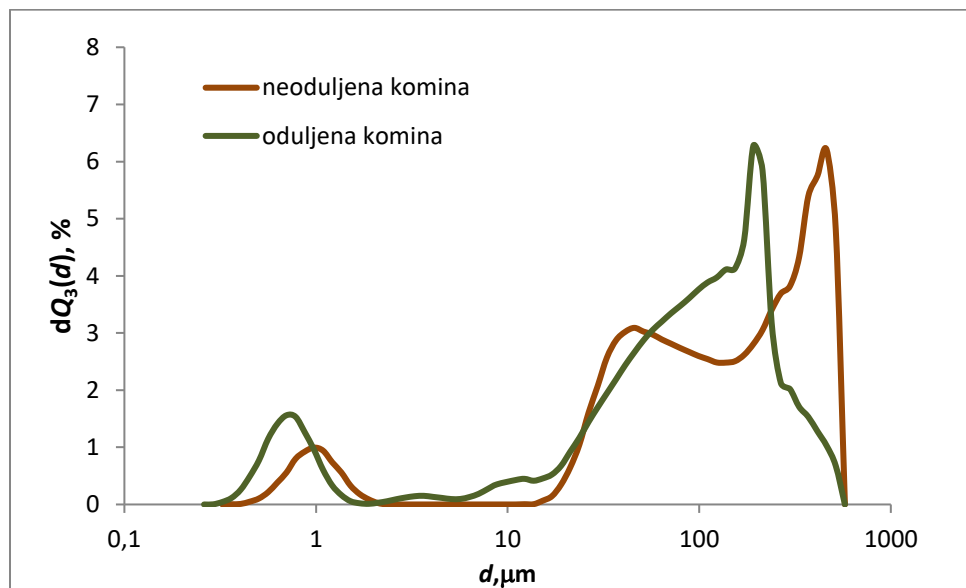
Slika 25. UV VIS spektrofotometar, Shimadzu UV-1280 [<https://www.avantech.it>]

4. REZULTATI

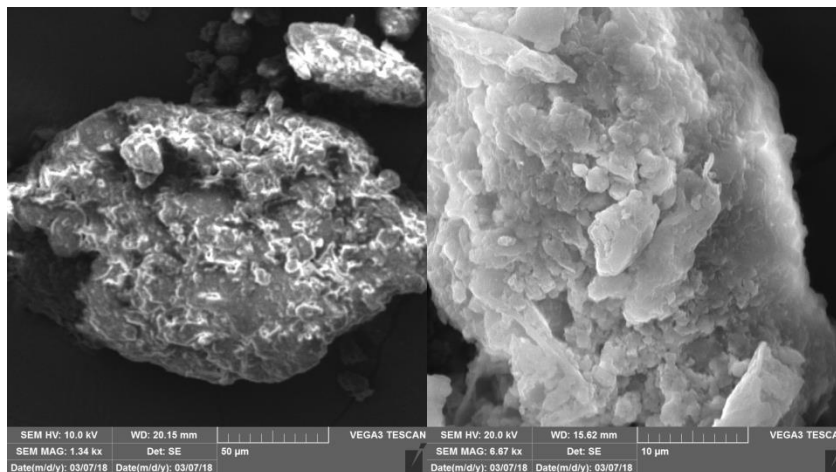
4.1. KARAKTERIZACIJA KOMINE MASLINE

Tablica 4. Karakterizacija komine masline

| <i>Temperatura sušenja</i> | | <i>Specifična površina pora (BET), m²/g</i> | <i>Srednja veličina pora, nm</i> | <i>Raspodjela veličina pora, nm</i> |
|----------------------------|--------|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>neoduljena komina</i> | 60 °C | 1,0647 | 4,172 | < 200 |
| | 100 °C | 0,9170 | 4,4277 | < 200 |
| <i>oduljena komina</i> | 60 °C | 4,7379 | 11,8493 | 11,8493 |



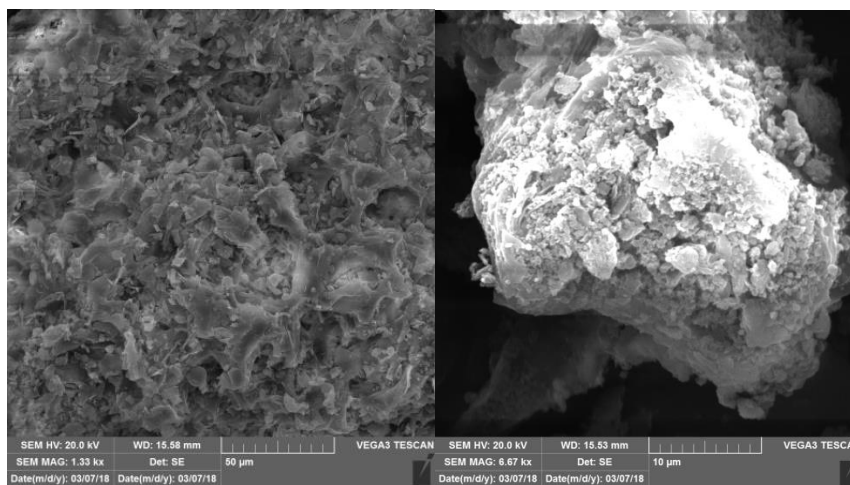
Slika 26. Raspodjela veličina čestica neoduljene i oduljene komine masline



a)

b)

Slika 27. Mikrografije neoduljene komine: a) uvećanje 1000x, b) uvećanje 6000x



a)

b)

Slika 28. Mikrografije oduljene komine: a) uvećanje 1000x, b) uvećanje 6000x

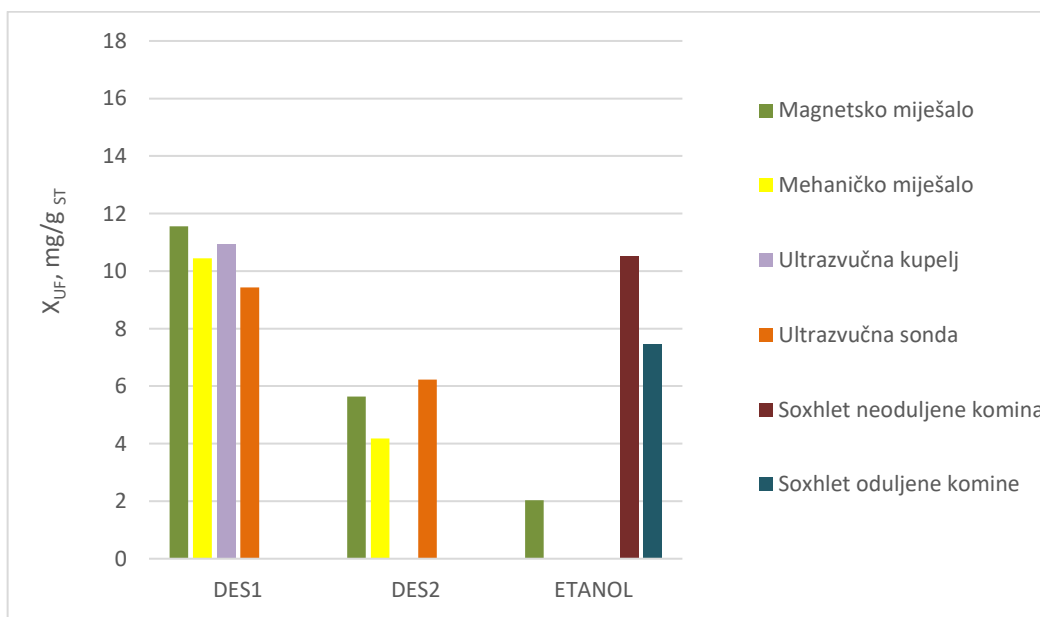
4.2. KARAKTERIZACIJA PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Tablica 5. Svojstva prirodnih eutektičkih otapala pri 25 °C

| <i>DES</i> | <i>mas% vode</i> | <i>Oznaka DES-a</i> | ρ, gcm^{-3} | $\eta, mPas$ | n_D | <i>pH</i> | $\kappa, \mu S cm^{-1}$ |
|-------------------|------------------|---------------------|------------------|--------------|--------|-----------|-------------------------|
| Ma-Fru-Gly | 30 | DES 1 | 1,295 | 0,0361 | 1,4426 | 0,916 | 366 |
| Ma-Glu-Gly | 30 | DES 2 | 1,287 | 0,0447 | 1,4428 | 0,990 | 280 |

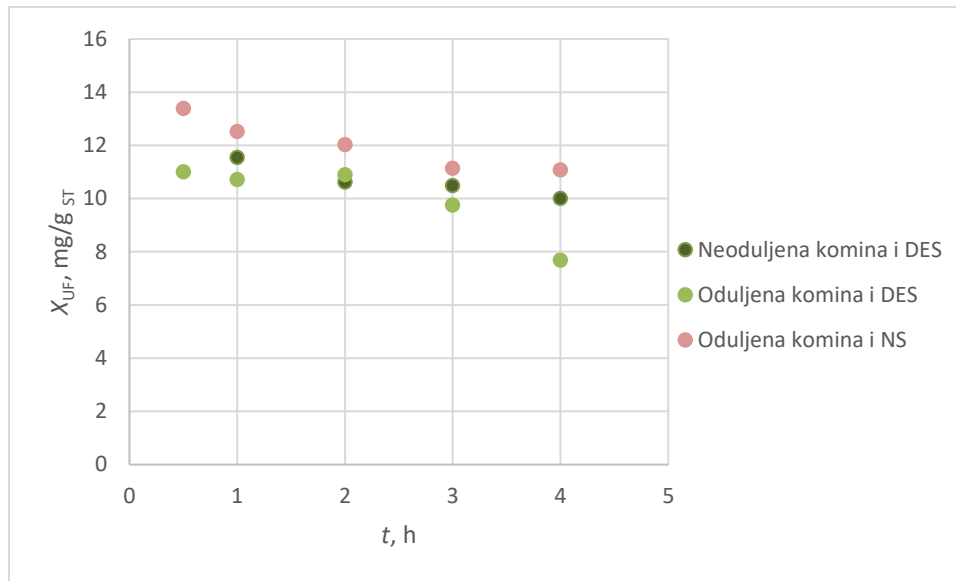
4.3. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

4.3.1. Odabir metode i otapala

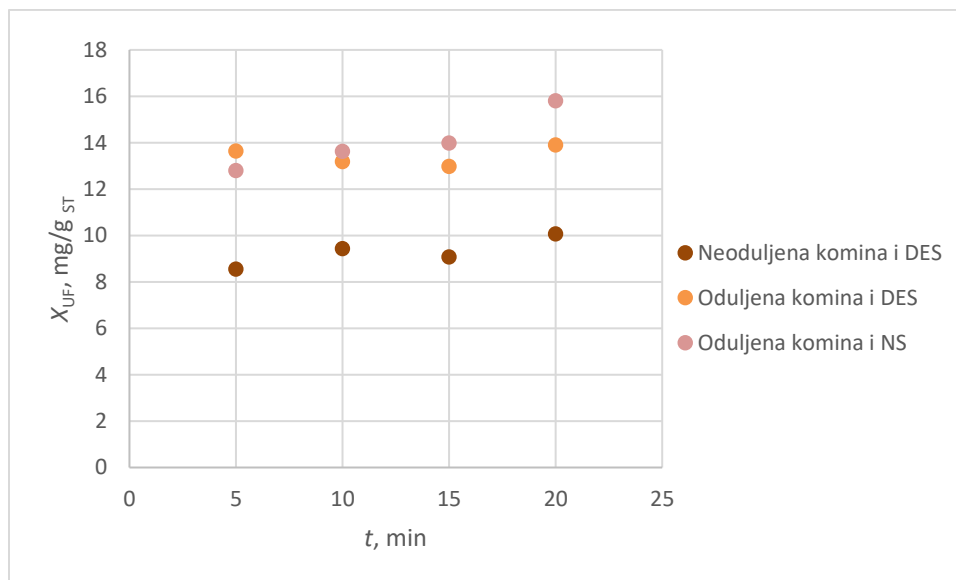


Slika 29. Usporedba ekstrakcije fenola primjenom različitih otapala i metode

4.3.2. Određivanje optimalnog vremena miješanja

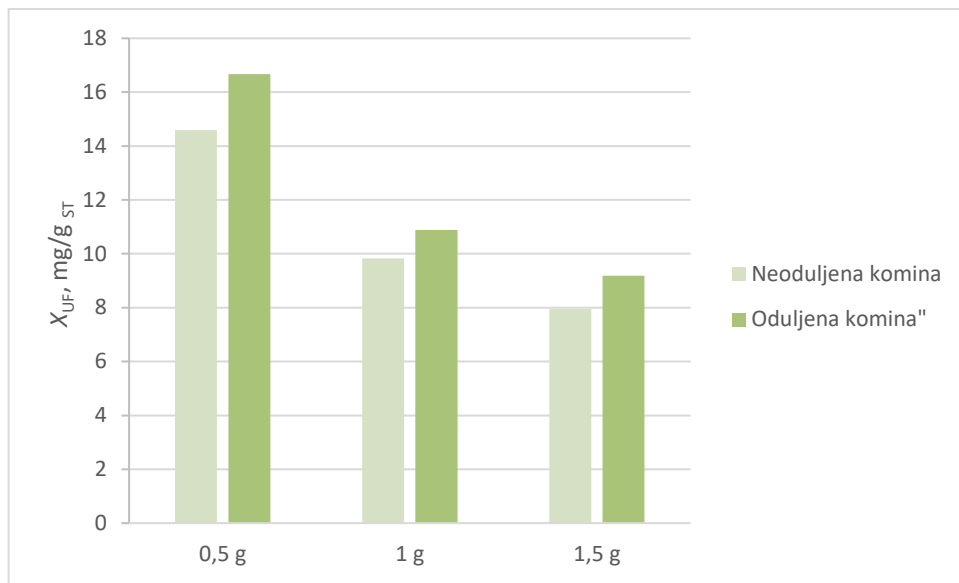


Slika 30. Određivanje optimalnog vremena ekstrakcije fenola iz neoduljene i oduljene komine za magnetsko miješalo



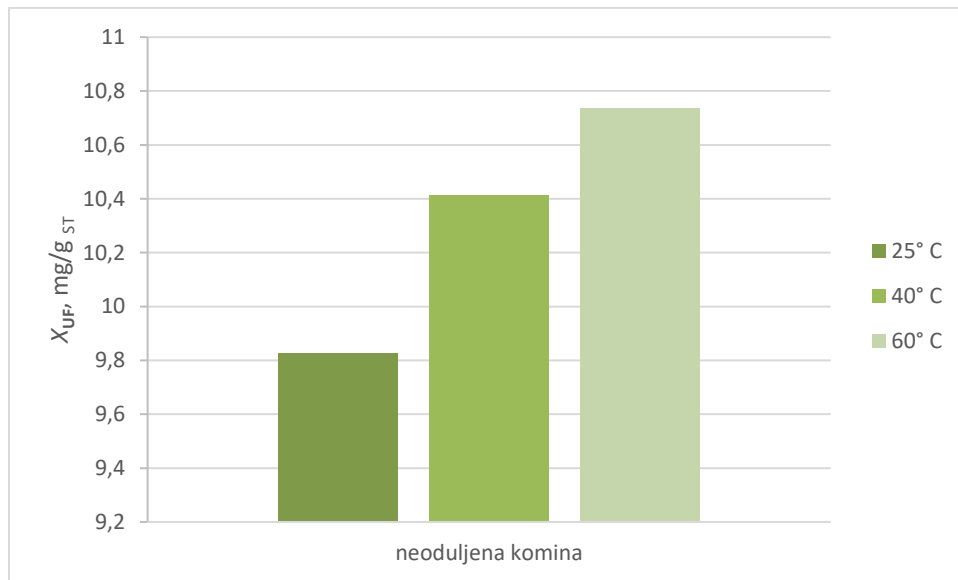
Slika 31. Određivanje optimalnog vremena ekstrakcije fenola iz neoduljene i oduljene komine za ultrazvučnu sondu

4.3.3. Utjecaj odnosa krutina kapljevina na proces ekstrakcije



Slika 32. Usporedba ekstrakcije fenola za različite udjele maslinove komine primjenom DES-a

4.3.4. Utjecaj temperature na proces ekstrakcije



Slika 3330. Usporedba ekstrakcije fenola iz neoduljene komine pri različitim temperaturama

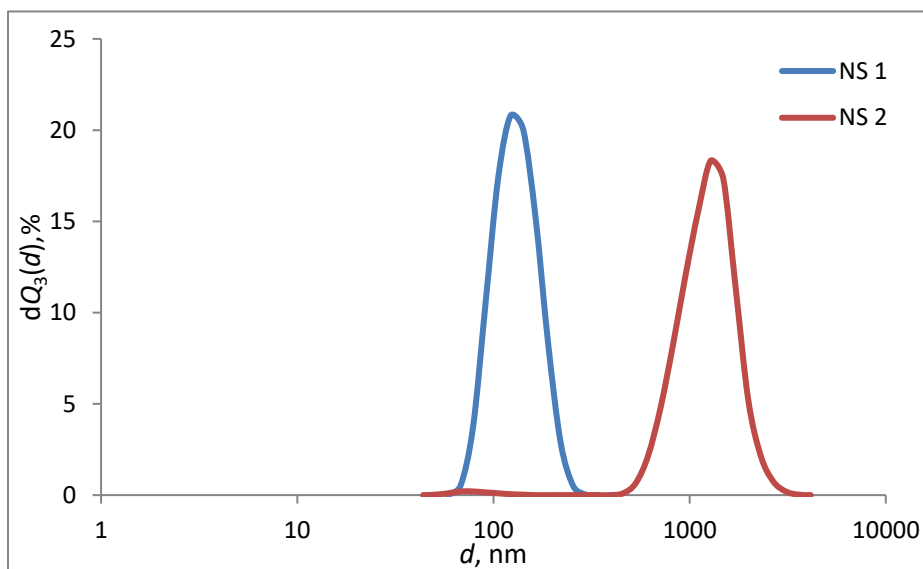
4.4. KARAKTERIZACIJA NANOSUSPENZIJA

Tablica 6. Specifična površina nanočestica

| <i>Nanočestice</i> | <i>Komercijalni naziv</i> | <i>Specifična površina (BET), m²/g</i> |
|------------------------------------|---------------------------|---|
| Al₂O₃ | AROXID Alu C | 100 ± 15 |
| SiO₂ | Fumed silica 90 | 90 |

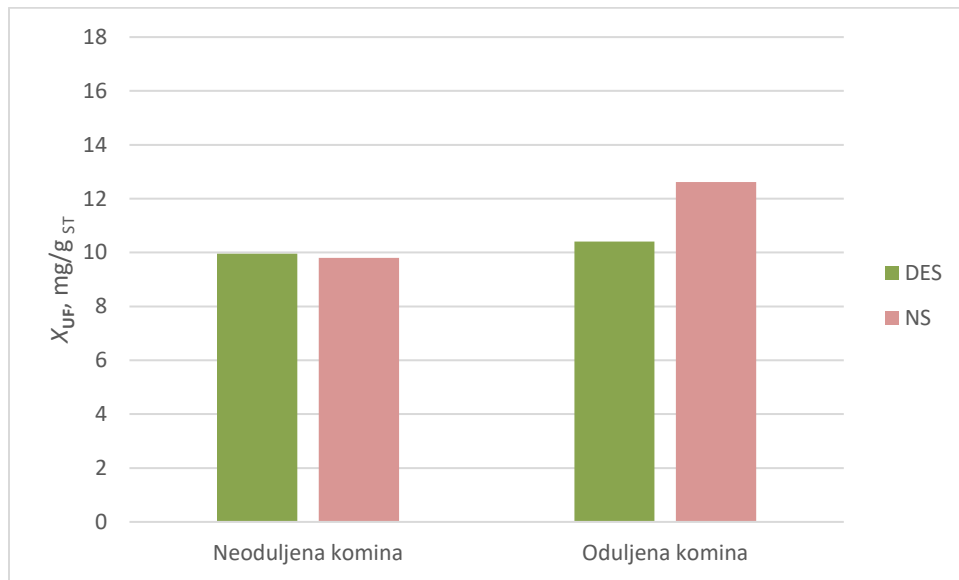
Tablica 7. Svojstva nanosuspenzija

| <i>Nanosuspenzija</i> | <i>mas% vode</i> | <i>Oznaka nanosuspenzije</i> | <i>ρ, gcm⁻³</i> | <i>η, mPas</i> | <i>pH</i> | <i>κ, μs/cm⁻¹</i> |
|---|------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|-----------|------------------------------|
| Ma-Fru-Gly + Al₂O₃ | 30 | NS 1 | 1,299 | 0,0424 | 0,965 | 322 |
| Ma-Fru-Gly + SiO₂ | 30 | NS 2 | 1,292 | 0,0393 | 1,055 | 313 |

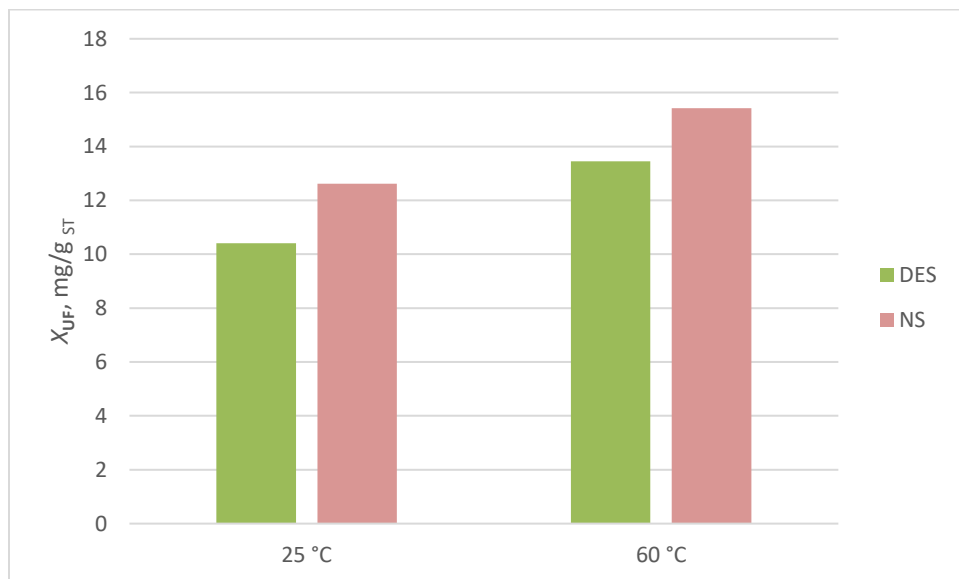


Slika 34. Raspodjela veličina čestica pripremljenih nanosuspenzija

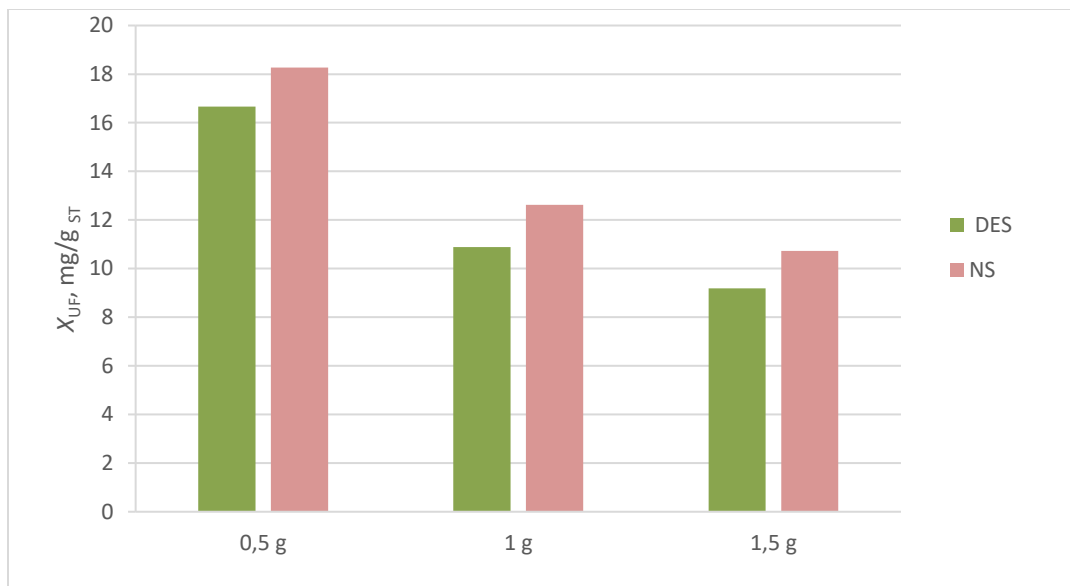
4.5. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE PRIMJENOM NANOSUSPENZIJA



Slika 31. Usporedba ekstrakcije fenola iz neoduljene i oduljene komine primjenom DES-a i NS-a



Slika 36. Usporedba ekstrakcije fenola iz oduljene komine primjenom DES-a i NS-a pri različitim temperaturama



Slika 37. Usporedba ekstrakcije fenola za različite udjele oduljene komine primjenom DES-a i NS-a

5. RASPRAVA

Fenolni spojevi zaostali u otpadu predstavljaju prijatnu okolišu, a jedan od takvih primjera je i proizvodnja maslinovog ulja nakon koje zaostaje otpad – komina masline. Posljednjih godina takav otpad posebice privlači pažnju znanstvenika zbog visokog sadržaja fenola poznatih po svom antioksidacijskom djelovanju i sposobnosti hvatanja slobodnih radikala te općenito pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Kako bi se fenolni spojevi izdvojili iz komine masline, provedena je ekstrakcija odabranim prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima koji zadovoljava uvjete „zelene kemije“.

U ovom radu komina je posebno obrađivana te korištena kao sirovina na dva načina – neoduljena i oduljena. U procesu ekstrakcije fenola ispitani su utjecaji različitih procesnih uvjeta te primjena nanosuspenzije na djelotvornost samog procesa budući da su dosadašnja znanstvena ispitivanja pokazala da se primjenom nanosuspenzije u procesu kapljevinske ekstrakcije postižu višestruka poboljšanja zbog Brownovog gibanja i postojanja mikrokonvekcije na strani selektivnog otapala. Prema tome, može se očekivati da će i u procesu ekstrakcije kruto - kapljevito doći do istog fenomena. Pri analizi rezultata prikazani su usporedbeni grafovi koncentracije fenola dobivenih ekstrakcijom iz neoduljene i oduljene komine te u konačnici i poboljšanje koje je postignuto primjenom nanosuspenzije.

Prvi korak u provedbi ekstrakcije čvrsto kapljevito je priprema komine. Komina je osušena u atmosferskom sušioniku pri 60 °C. Sušenje je provedeno na nižoj temperaturi (<105 °C) budući da su rezultati određivanja raspodjele veličine pora i specifične površine pora pokazali da sušenje iznad 100 °C dovodi do skupljanja pora i smanjenja specifične površine komine (tablica 1). Posljedica toga je smanjenje kontaktne površine između komine i kapljevine što bi u konačnici dovelo do smanjenja djelotvornosti procesa. Sušenjem na 60 °C uklonjeno je 45% od početne mase uzorka. Nakon sušenja, komina je usitnjena u električnom mlinu te su zaostale koštice izdvojene prosijavanjem kroz sito promjera očice 800 μm. Iako tako usitnjena i pripremljena za ekstrakciju, komina još uvijek, kao sirovina dobivena nakon obrade masline, sadrži i uljnu fazu, koja onemogućuje potpunu ekstrakciju fenolnih spojeva. Stoga je dio komine

oduljen s heksanom u Soxhlet ekstraktoru te je za oba uzorka određena raspodjela veličina čestica, slika 26. Može se vidjeti da se nakon oduljivanja raspodjela veličina čestica neznatno promijenila, u oba slučaja vidljiva su dva pika koja karakteriziraju dvije dominantne veličine oko 1 μm i 200 μm odnosno 400 μm . Drugi pik se nalazi u većoj veličinskoj frakciji (vjerojatno se odnosi na zaostale usitnjene koštice koje se teže usitnjavaju zbog velike tvrdoće). Mikrografi napravljeni na elektronskom mikroskopu (slike 28. i 29.) pokazuju neoduljene i oduljene uzorke komine. Pri većem uvećanju vidljivo je da se uklanjanjem uljne faze povećava broj pora kao i njihova specifična površina (tablica 4.). Ova činjenica ide u prilog poboljšanju prijenosa tvari te povećanju izdvojenih fenola što je i dokazano u svim eksperimentima (slike 30., 31. i 32.).

Za uspješnu provedbu ekstrakcije, osim pripreme i karakterizacije krutine, bilo je potrebno okarakterizirati i odabrano otapalo. U tablici 5 prikazana su određena fizikalna svojstva eutektičkih otapala koja su pripravljena od tri komponente. Može se uočiti velika viskoznost i gustoća za oba ispitana eutektička otapala. Velika viskoznost može biti ograničavajući čimbenik pri provedbi ekstrakcije zbog otežanog miješanja i posljedično niže učinkovitosti procesa. Upravo zbog izrazito velike viskoznosti prirodnih eutektičkih otapala pripremljenih sa šećerom, u otapala je dodano 30 mas% vode. Nadalje, pH vrijednost dobivenih otapala je vrlo niska (<1). Očito je da jake vodikove veze između HBD i HBA uz prisustvo vode imaju snažan utjecaj na kiselost prirodnih eutektičkih otapala.

Kako bi se ekstrakcija provela pri optimalnim uvjetima, provedena je optimizacija procesa ekstrakcije kojom su odabrani metoda, otapalo te minimalno potrebno vrijeme miješanja za sve metode miješanja.

Na slici 29. uspoređene su koncentracije ukupnih fenola za različite načine provedbe ekstrakcije primjenom različitih otapala. Miješanje magnetskim miješalom rezultiralo je najvišom koncentracijom ukupnih fenola, unatoč povišenju temperature koje se događa djelovanjem ultrazvučnih valova. Naime, kako su u sustavu prisutne čvrste čestice, jedino se magnetskim miješalom u potpunosti osigurava podizanje čestica sa dna što povećava kontaktnu površinu i bolju ekstrakciju fenola iz komine. Na drugu stranu, u kratkom vremenu se dobiva relativno visoka djelotvornost sa UZV sondom. Problem koji se javlja kod ekstrakcije provedene na ovaj

način je brzo zagrijavanje medija u kojem se provodi ekstrakcija, zagrijavanje je brže što je viskoznost medija veća. Na istoj slici (slika 29.) prikazana je usporedba rezultata dobivena Soxhlet metodom, vidljivo je da se ekstrakcijom neoduljene komine dobiva slična koncentracija fenola kao i s DESom 1. Ovdje je potrebno spomenuti da se ekstrakcija u Soxhlet ekstraktoru provodila na povišenoj temperaturi do prestanka promjene boje etanola, odnosno do potpunog uklanjanja fenola (više od 10 sati). Dakle, radi se o energetski zahtjevnom procesu kojeg je poželjno zamijeniti ekološki i energetski prihvatljivom metodom. Postupak ekstrakcije s etanolom nakon oduljivanja s heksanom rezultira nižim vrijednostima dobivenih fenola, ali ovdje nije mjerena količina uklonjenih fenola tijekom oduljivanja. Bolje izdvajanje fenola dobiva se ekstrakcijom s odabranim eutektičkim otapalima, nego s konvencionalnim otapalom - etanolom. Visoki stupanj ekstrakcije fenola može se pripisati jakim interakcijama između molekula DES-a i fenolnih spojeva. Budući da je niskotemperaturno eutektičko otapalo DES 1 pokazalo bolja separacijska svojstva prema fenolnim spojevima, u nastavku rada se koristilo kao glavno i osnovno otapalo. Naime, iako sličnog kemijskog sastava, gustoće i kiselosti, korištena otapala imaju različitu viskoznost (DES 1 ima nižu viskoznost) koja ima značajni utjecaj na miješanje i učinkovitost ekstrakcije pa se tome pripisuje bolja separacija u ovom slučaju. Učinkovitost ekstrakcije aktivnih komponenti iz biljnog materijala uz pomoć prirodnog eutektičkog otapala ovisi o njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su polarnost, viskoznost, pH vrijednost i napetost površine. Također, na učinkovitost ekstrakcije utjecala je uljna faza u komini masline, koja se pokazala kao ograničavajući korak tako da je provedbom Soxhlet metode, odnosno, oduljivanjem komine masline dobiven očekivan porast ekstrahirane koncentracije fenola (slike 30., 31. i 32.) te se u nastavku radilo s tako oduljenom kominom

Način miješanja značajno utječe na trajanje procesa, a kako se kao najprikladnija pokazala metoda miješanja s magnetskim miješalom, naredna ispitivanja ostalih procesnih uvjeta provedena su tom metodom. Za neke načine miješanja nisu određena optimalna vremena miješanja jer su se pokazali neekonomičnim odabirom za provedbu ekstrakcije zbog dugotrajnosti izvođenja (ekstrakcija u UZV kupelji) ili konstantnog povišenja temperature (ekstrakcija s UZV sondom) što je dovelo do konstantnog povećanja koncentracije. Na slici 30. maksimalna koncentracija ukupnih fenola kod miješanja magnetskim miješalom postiže se

nakon pola sata, a nakon toga dolazi do laganog sniženja koncentracije. Najkraće vrijeme potrebno da se dobije maksimalna koncentracija ukupnih fenola postignuto je ultrazvučnim miješanjem sa uronjenom sondom i kod primjene eutektičkog otapala te nanosuspenzije u kasnijem dijelu rada (slika 31.). Ovaj način miješanja vrlo je intenzivan, a zbog djelovanja ultrazvuka u viskoznom i gustom mediju dolazi do značajnog zagrijavanja medija. Zbog toga je suspenziju bilo potrebno hladiti tijekom provedbe ekstrakcije, pri čemu maksimalna temperature nije prelazila 60 °C. Iz navedenog slijedi da se optimalni rezultati postižu na magnetskoj miješalici.

Ispitan je i odnos krutina-kapljevina buduću da količina korištenog otapala direktno utječe na troškove procesa ekstrakcije. Povećanjem količine otapala kao što je prikazano na slici 34. dolazi do većih razlika u koncentraciji ekstrahiranih fenola. Ovi rezultati su u skladu s načelima prijenosa tvari buduću da je pokretačka sila koncentracijski gradijent između krutine i otapala. Veći omjer krutina-kapljevina povećava koncentracijski gradijent, što dovodi do povećanja brzine difuzije fenola iz čvrstog materijala u otapalo te se kao rezultat dobije veća količina ekstrahiranih fenola korištenjem veće količine otapala. Utjecaj odnosa krutina-kapljevina ispitan je i s NS kao ekstrakcijskim otapalom. Rezultati postignuti sa NS slijede isti trend kao i rezultati dobiveni NADES-om, poboljšanja su postignuta za sve frakcije te je time potvrđena teorija prijenosa tvari i prisutnost veće pokretačke sile (slika 37.).

Na slici 33. uspoređene su različite temperature miješanja: 25° C, 40° C i 60° C. Povišenjem temperature smanjuju se gustoća i viskoznost kapljevina što dovodi do bolje ekstrakcije, ali buduću da povišenje temperature nije dalo značajno poboljšanje u postupku (postignuto povećanje koncentracije od 10 %) zaključeno je da nije ekonomski isplativo te su se daljnja ispitivanja provodila pri 25 °C.

Pri ispitivanju različitih utjecaja na proces ekstrakcije iz neoduljene komine paralelno su provedena ispitivanja s oduljenom kominom. Može se uočiti da su na taj način poboljšani svi rezultati. Naime, oduljivanjem komine ostvaruje se veća kontaktna površine te uklanja dodatni sloj koji usporava prijenos tvari od površine čvrste tvari u otapalo. U svim eksperimentima dobiveno je poboljšanje procesa ekstrakcije polifenola (37 %).

Kako bi se ispitalo poboljšanje ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom nanosuspenzija, bilo je potrebno pripremiti stabilnu nanosuspenziju. Stabilnost pripremljenih nanosuspenzija moguće je odrediti vizualnim praćenjem kroz određeni vremenski period ili određivanjem RVČ. Za nanosuspenziju u kojoj je dobivena RVČ ispod 100 nm može se očekivati dobra stabilnost suspenzije. RVČ pripremljenih nanosuspenzija (slika 34.) s odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalom, pokazala je kako nanosuspenzija pripravljena s Al_2O_3 odgovara nano – području te je pogodnija za daljnja ispitivanja iako su obje nanosuspenzije (određeno vizualnom metodom) pokazale stabilnost kroz period od mjesec dana (slika 11.).

Nakon pripreme i odabira stabilne nanosuspenzije proces je optimiran. Dosadašnja znanstvena ispitivanja pokazala su da se primjenom nanosuspenzija u procesu kapljevinske ekstrakcije postižu višestruka poboljšanja zbog Brownovog gibanja i postojanja mikrokonvekcije na strani selektivnog otapala, a takav fenomen potvrđen je i u procesu ekstrakcije kruto-kapljevito. Slike 36. i 37. prikazuju znatno povećanje ukupne koncentracije ekstrahiranih fenola primjenom nanosuspenzija od čak 20% iz oduljene komine. Do ovakvog poboljšanja došlo se tek nakon uklanjanja uljnog sloja što je omogućilo da se direktnim kontaktom NS i komine poboljša najsporija faza u procesu prijenosa tvari, prijenos fenola kroz granični sloj uz čvrstu površinu (slika 35).

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu svrha je bila ispitati primjenu niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzija u separaciji fenolnih spojeva iz komine masline te usporediti i eksperimentalno potkrijepiti njihovu efikasnost u izvedbi procesa ekstrakcije u odnosu na konvencionalna otapala.

Nakon provedenih preliminarnih koraka, karakterizacije korištenih materijala i optimizacije procesa došlo se do sljedećih zaključaka:

- s definiranim optimalnim vremenom ekstrakcije najveća koncentracija ekstrahiranih fenola postignuta je primjenom magnetskog miješala pri temperaturi od 60 °C,
- najbolja efikasnost ekstrakcije postignuta je s niskotemperaturnim eutektičkim otapalom DES 1,
- oba eutektička otapala pokazala su znatno bolju učinkovitost ekstrakcije u odnosu na etanol,
- poboljšanje primjenom nanosuspenzija ostvareno je nakon oduljivanja komine, jer je postojeća uljna faza usporavala i onemogućavala prijenos aktivnih komponenti, odnosno, fenola.

Ustanovljeno je, dakle, da se primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala i nanosuspenzija pokazala uspješnom i boljom od primjene konvencionalnih otapala u procesu separacije fenola iz komine masline.

POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA

Simboli

| | |
|----------|-----------------------------------|
| κ | električna vodljivost, S |
| n_D | indeks loma, - |
| X | maseni odnos, - |
| pH | mjera kiselosti, - |
| M | molarna masa, g mol^{-1} |
| T | temperatura, $^{\circ}\text{C}$ |
| t | vrijeme, h |

Grčka slova

| | |
|----------|--|
| ρ | gustoća, g cm^{-3} |
| η | kinematička viskoznost, mPas |
| γ | masena koncentracija, g cm^{-3} |

Indeksi

| | |
|----|---------------|
| UF | ukupni fenoli |
| T | talište |

Skraćenice

| | |
|-----|---|
| Abs | apsorbancija |
| HBA | akceptor vodikove veze |
| HBD | donor vodikove veze |
| NS | nanosuspenzija |
| DES | prirodno eutektičko otapalo (<i>eng. deep eutectic solvent</i>) |

7. LITERATURA

1. Tea Brlek Savić, Voća N., Tajana Krička, Vanja Jurišić: *Komina masline kao izvor energije*, Stručni rad, Glasnik zaštite bilja 3/2009.
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, mag. ing. chem. ing. Mia Grga; Skripta za vježbe iz kolegija "*Prerada maslina*", Sveučilište u Splitu, 2015.
3. <http://www.maslinovo.hr/procitaj/proizvodnja-maslinovog-ulja-meljjava-ekstrakcija-i-bistrenje/36/>, 22.06.2018.
4. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Fenoli> - 05.11.2016.
5. Antonija Jakšetić: *Optimiranje procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz ječma metodom odzivnih površina*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015.
6. Žanetić M., Škevin D., Vitanović D., etc: *Ispitivanje fenolnih spojeva i senzorski profil dalmatinskih djevičanskih maslinovih ulja*, Promologia Croatica, Vol 17, 2011, br. 1-2
7. Muhammad H. Alu'datt, Intez Ali, Khalil Ereifej, Mohammad N. Alhamad, Ahmad Alsaad, Taha Rababeh, *Optimisation and characterisation of various extraction conditions of phenolic compounds and antioxidant activity in olive seeds*, Natural Product Research, Jordan, 2011.
8. Doc. dr. sc. H. Kušić: *Tehnološki procesi organske industrije*, predavanje, 2016.
9. <http://gospodarenjeotpadom.hr/toksicni-ucinci-otpadne-vode-od-prerade-maslina/>- 22.06.2018.
10. Zakon o održivom gospodarenju otpadom, Narodne novine 94/2013., 2013.
11. Darijo Šibalić, *Utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2016.
12. Izv. prof. dr. sc. Gordana Matijašić, *Jedinične operacije u ekoinženjerstvu*, Skripta-2.dio, Mehaničke operacije, 2016.
13. E. Martinez-Guerra, V. G. Gude, Synergistic effect of simultaneous microwave and ultrasound irradiations on transesterification of waste vegetable oil, *Fuel*, 137, 2014. (100-108)

14. Kristian Bakić, Maja Kovačić: *Primjena nanočestica u eutektičkim smjesama radi poboljšanja prijenosa tvari u postupku ekstrakcije*, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
15. Marta Faggian, Stefania Sut, Beatrice Perissutti, Valeria Baldan, Iztok Grabnar, Stefano Dall'Acqua: *Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a tool for bioavailability improvement: pharmacokinetics of rutin dissolved in proline/glycine after oral administration in rats: possible application in nutraceuticals*, Molecules, Switzerland, 2016.
16. Marina Cvjetko Bubalo, Manuela Panić, Kristina Radošević, Ivana Radojčić Redovniković: *Metode pripreme eutektičkih otapala*, Stručni rad, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
17. J. Ramsden: *Essentials of Nanotechnology*, ISBN 978-87-7681-418-2, 2009.
18. S. K. Das, S. U. S. Choi, H. E. Patel: *Heat transfer in nanofluids – A review*. vol. 27, str 10., 2006.
19. E. V. Timofeeva: *Nanofluids for heat transfer – potential and engineering strategies, two phases flow, phase change and numerical modeling*, Dr. Amimul Ahsean (Ed.) Agronne, IL, USA, 2011.
20. Hrvatska enciklopedija, sv. 3: Da-Fo, Leksikografski Zavod "M. Krleža", Zagreb, 2001, str. 555-36.
21. Opći hrvatski leksikon: A/Ž, Leksikografski Zavod "M. Krleža", Zagreb, 1996, str. 256]
22. A. Abo-Hamad, M. Hayyan, M. A. AlSaadi, M. Ali: *Potential Applications of deep eutectic solvents in nanotechnology*, Chem. Eng. J, 273, 2015, 551-567.
23. Matković, T., Matković, P.: *Fizikalna metalurgija I (interna skripta)*, Sisak, 2009. str. 80-96
24. Dai., Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Hae Choi, Y.: *Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development*, Leiden, 2013.
25. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed R. K., and Tambyrajah, V.: *Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains*, Chem. Commun., 2001, (2010-2011.)
26. Papaik I., Gunjević V.: *Zeleni pristupi u ekstrakciji i izolaciji antocijana iz kome grožđa*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Znanstveni rad

27. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed R. K., and Tambyrajah, V.: *Novel solvent properties of choline chloride / urea mixtures*, Chem. Commun., 2002, (2003.) 70-71]
28. Taylor, R. A., Coulombe S., Otanicar T., Tyagi H., *Small Particles, Big Impacts: A Review of the Diverse Applications of Nanofluids*; Journal of Applied Physics, 2013., str. 113.
29. J. Ramsden, *Essentials of Nanotechnology*, ISBN 978-87-7681-418-2, 2009.
30. Settle F.: *Hanbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997. str. 18-19, 24-33, 147-153.

