

Poboljšanje učinkovitosti u procesu izluživanja fenolnih spojeva iz lista masline

Marolt, Nataša

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:149:205104>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nataša Marolt

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nataša Marolt

POBOLJŠANJE UČINKOVITOSTI U PROCESU IZLUŽIVANJA FENOLNIH
SPOJEVA IZ LISTA MASLINE
EFFICIENCY IMPROVEMENT IN LEACHING OF PHENOLIC COMPOUNDS
FROM OLIVE LEAF

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada:

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, srpanj 2018.

*Ovaj rad izraden je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo, akademske godine 2017./2018.*

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na stručnoj pomoći, uloženom
vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog rada.*

*Također, zahvaljujem se komentorici Anamariji Mitar, mag. ing. cheming., na pomoći i stručnom
vođenju tijekom rada u laboratoriju, te na brojnim korisnim savjetima kojima mi je omogućila
dobivanje potrebnih eksperimentalnih rezultata za ovaj rad.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima na njihovoj potpori, strpljenju, razumijevanju i
ljubavi koju su mi pružili tijekom studiranja i bez kojih sve ovo što sam postigla do sad ne bi bilo
moguće.*

Veliko HVALA svima!

SAŽETAK

Lišće masline, najčešće prisutne biljke u Mediteranskim zemljama, predstavlja vrlo važan izvor biološki aktivnih tvari koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Najvažniji za istaknuti su snažni antioksidansi - fenolni spojevi, koji imaju sposobnost vezanja slobodnih radikala. Branjem i obradom maslina, velika količina lišća zaostaje kao otpad. Obradom lišća zaostalog u obliku otpada, mogu se izdvojiti vrijedne nutritivne komponente koje se dalje mogu upotrijebiti u farmaceutskoj industriji.

Zahvaljujući visokom sadržaju fenolnih spojeva te brojnim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje, lišće masline postalo je tema brojnih istraživanja. Sukladno načelima zelene kemije, traže se potencijalna rješenja za poboljšanje učinkovitosti procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala. Nova, dizajnirana prirodna eutektička otapala, kao nehlapljiva, netoksična i obnovljiva otapala koja zadovoljavaju načela zelene kemije, pokazala su veću učinkovitost u procesu izluživanja biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala od konvencionalnih otapala ili vode. Nadalje, u novije vrijeme se ispituje mogućnost poboljšanja prijenosa tvari tijekom ekstrakcije uz pomoć stabilnih nanosuspenzija pripremljenih raspršenjem nanočestica u odgovarajućem prirodnom eutektičkom otapalu.

U ovom radu ispitana je mogućnost poboljšanja učinkovitosti izluživanja fenolnih spojeva iz lišća masline pomoću prirodnog eutektičkog otapala i pomoću njemu pripadajuće, stabilne nanosuspenzije. Određeno je optimalno vrijeme trajanja ekstrakcije i definiran učinkovit način miješanja. Također, ispitan je utjecaj temperature i veličine čestica na učinkovitost procesa.

Ključne riječi: list masline, fenolni spojevi, ekstrakcija, prirodno eutektičko otapalo, nanosuspenzija

SUMMARY

Olive leaves, part of the most common plant in the Mediterranean countries, represents a very important source of biologically active substances that have a positive effect on human health. The most important substances are the strong antioxidants – phenolic compounds, which have the ability to bind free radicals. However, with the harvesting and processing of olive fruits, a large amount of leaves is lagging behind as a waste. By processing residual leaves in the form of waste, valuable nutritional components can be extracted and used in the pharmaceutical industry.

Thanks to the high content of phenolic compounds and many positive effects on human health, olive leaves have become the subject of numerous researches. In accordance with the principles of green chemistry, potential solutions are being sought to improve the efficiency of the extraction process of biologically active components from plant material. New, designed natural deep eutectic solvents, non-volatile, non-toxic and renewable solvents that meet the principles of green chemistry, have shown greater efficacy in the process of leaching biologically active components from plant material than conventional solvents or water. Furthermore, in recent years, the possibilities of improving the mass transfer during extraction process is investigated with the help of the stable nanosuspension, prepared by dispersing nanoparticles in a suitable natural deep eutectic solvent.

In this study, the possibility of improving the efficiency of the phenolic compounds extraction from olive leaves using natural deep eutectic solvent and its corresponding stable nanosuspension was investigated. Optimum duration of extraction was determined and effective mixing method was defined. Also, the influence of temperature and particle size on the efficiency of the process was studied.

Key words: olive leaves, phenolic compounds, extraction, natural deep eutectic solvent, nanosuspension

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. MASLINA.....	3
2.1.1. PROCES PROIZVODNJE MASLINOVOG ULJA.....	4
2.1.2. LIST MASLINE.....	4
2.2. FENOLNI SPOJEVI.....	6
2.2.1. SVOJSTVA FENOLNIH SPOJEVA.....	8
2.2.2. FENOLNI SPOJEVI U LISTU MASLINE.....	9
2.3. EKSTRAKCIJA.....	10
2.3.1. EKSTRAKCIJA KRUTO-KAPLJEVITO.....	12
2.3.2. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA.....	13
2.3.3. POBOLJŠANJE PROCESA EKSTRAKCIJE.....	14
2.4. EUTEKTIČKA OTAPALA.....	15
2.4.1. PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA.....	17
2.4.2. SVOJSTVA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA.....	18
2.5. NANOSUSPENZIJE.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. SVRHA RADA.....	22
3.2. LIST MASLINE.....	22
3.2.1. PRIPREMA LIŠĆA MASLINE ZA EKSPERIMENT.....	22
3.2.2. RASPODJELA VELIČINA ČESTICA LISTA MASLINE.....	23
3.2.3. STRUKTURA LIŠĆA.....	24
3.3. PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA.....	24

3.3.1. ODABIR PRIRODNOG EUTEKTIČKOG OTAPALA.....	24
3.3.2. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA PRIRODNOG EUTEKTIČKOG OTAPALA	25
3.4. PRIPREMA NANOSUSPENZIJE	26
3.4.1. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA	26
3.4.2. PRIPREMA I ODREĐIVANJE STABILNOSTI NANOSUSPENZIJE	27
3.5. PROVEDBA EKSTRAKCIJE	28
3.5.1. NAČINI PROVEDBE EKSTRAKCIJE.....	28
3.5.2. UTJECAJ VREMENA MIJEŠANJA I TEMPERATURE NA PROCES EKSTRAKCIJE	29
3.5.3. EKSTRAKCIJA SA NANOSUSPENZIJOM.....	30
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA.....	31
3.6.1. FOLIN-CIOCALTEU METODA.....	31
3.7. ODREĐIVANJE KOEFICIJENTA PRIJENOSA TVARI	32
4. REZULTATI.....	33
4.1. KARAKTERIZACIJA SUSTAVA	33
4.1.1. LIŠĆE MASLINE.....	33
4.1.2. SELEKTIVNO OTAPALO.....	35
4.1.3. NANOSUSPENZIJA	36
4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE	37
4.3. NAČINI PROVEDBE EKSTRAKCIJE	39
4.4. USPOREDBA UČINKOVITOSTI OTAPALA	40
4.5. KOEFICIJENT PRIJENOSA TVARI	41
5. RASPRAVA	42
6. ZAKLJUČAK	46
7. POPIS SIMBOLA	47
8. LITERATURA.....	49

1. UVOD

Biološki aktivne komponente koje najčešće nalazimo u prirodnom obliku zarobljene u biljkama, koriste se u proizvodnji i primjeni u brojnim industrijama kao što su farmaceutska, prehrambena, kozmetička te u medicini. Jedna od najznačajnijih biljki mediteranskog podneblja koja se pokazala kao vrijedan izvor brojnih biološki aktivnih komponenti sa pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje je maslina.

Obradom maslina za proizvodnju maslinovog ulja nastaje velika količina nusprodukata. Procesom obrade 100 kg maslina, nastaje 35 kg komine i 440 L otpadne vode. Otpadne vode nastale obradom maslina izuzetno su veliki onečišćivači zbog njihove biokemijske i kemijske potrošnje kisika, sadržaja krute tvari te kiselog karaktera. Nakon obrezivanja maslina, nastane 1-5 t/ha biomase (lišće i grančice) u mediteranskom području, dok se za Španjolske i Talijanske maslenike ta količina penje na 4-11 t/ha. [1] To predstavlja veliki ekološki problem pošto taj otpad treba negdje odložiti ili preraditi.

Prateći trendove prehrambene industrije, istražuju se procesi koji bi bili pogodni za izvlačenje vrijednih biološki aktivnih komponenti iz spomenutog otpada te njihovo iskorištenje. [2] Analizom maslinovog ulja, dokazano je da njegovoj nutritivnoj i zdravstvenoj vrijednosti uvelike pridonose fenolni spojevi. Fenolni spojevi su vrijedni antioksidansi kojima su ustanovljena dobra protuupalna, protualergijska te protukancerogena djelovanja zbog čega imaju važnu ulogu u prevenciji i liječenju mnogih bolesti. Istraživanjem navedenog otpada, utvrđeno je da upravo u njemu zaostaje najveći broj fenolnih spojeva, a samo mali postotak prijeđe u maslinovo ulje.

Obzirom da fenolni spojevi u nastalom otpadu imaju fitotoksična svojstva, odlaganje tog otpada u okoliš može prouzročiti razne ekološke probleme. Sukladno tome, prije odlaganja u okoliš, otpad se mora obraditi, odnosno fenolni spojevi se raznim metodama izdvajaju kako bi se smanjio ili eliminirao štetan utjecaj na okoliš.

Sukladno sve strožim zahtjevima zelene kemije, u današnje se vrijeme velika pozornost pridaje razvoju i prilagodbi proizvodnih procesa prema tim zahtjevima. Posljednjih godina, veoma je

uznapredovao razvoj zelenih otapala koja su biorazgradiva, netoksična, nehlapljiva, nezapaljiva, obnovljiva i imaju niz dobrih ekoloških i ekonomičnih svojstava.

Najbitnija za istaknuti su prirodna eutektička otapala koja su u potpunosti uspjela zadovoljiti načela zelene kemije i pokazala se kao veoma učinkovita otapala za brojne procese. Značajna primjena prirodnih eutektičkih otapala ostvarena je u procesima ekstrakcije biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala u kojima su se pokazala visoko učinkovita i ekonomičnija od konvencionalnih otapala.

Najnovija istraživanja razmatraju mogućnost poboljšanja učinkovitosti procesa ekstrakcije korištenjem nanosuspenzija pripremljenih raspršenjem nanočestica u prirodnim eutektičkim otapalima. Polazna pretpostavka o mogućnosti poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije pomoću nanosuspenzija, potječe od provedenih istraživanja u kojima je dobiveno poboljšanje toplinskih svojstava korištenjem nanosuspenzija. U stabilnim nanosuspenzijama, Brownovo gibanje nanočestica uzrokuje mikrokonvekciju u suspenziji čime se poboljšava prijenos topline, a sukladno tome pretpostavlja se i poboljšanje u prijenosu tvari.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MASLINA

Maslina (lat. *Olea europaea*) je zimzelena biljka porodice *Oleaceae*, vrlo dobro poznata i cijjenjena na području Mediterana. Svrstava se u biljke uljarice, a raste u obliku grma ili nepravilnog i razgranatog stabla koje može poživjeti i više od tisuću godina.

Daje plodove ovalnog oblika tamnozeleno do crne boje bogate uljem koje ima veliku primjenu u prehrambenoj industriji i medicini. Jedna biljka može dati od 15 do 40 kilograma ploda maslina iz kojih se može proizvesti od 3 do 8 kilograma ulja. Plod se sastoji od kožice, mesa i koštice a prosječan kemijski sastav mu je 50% vode, 22% ulja, 19.1% ugljikohidrata, 5.8% celuloze, 1.6% proteina, 1.5% anorganskih komponenti te 1-3% fenolnih spojeva. [3,4] Sastav ploda masline i ulja ovisi o brojnim faktorima kao što su sorta, zrelost, režim berbe, klimatski uvjeti te tehnološka izvedba postrojenja za obradu maslina. [2]

Maslina izvorno raste u krajevima svijeta koje karakteriziraju visoke temperature i mediteranska klima. Uzgoj maslina najzastupljeniji je u zemljama Mediterana (99%), a u novije vrijeme uzgaja se i na području Amerike te Australije. Među vodećim zemljama u proizvodnji maslina (prema izvještaju za 2009. godinu) na prvom mjestu se nalazi Španjolska, a slijede ju Italija, Grčka, Turska, Tunis te Sirija. [2]



Slika 1. Maslina u Kaštel Štafiliću stara više od 1500 godina

2.1.1. PROCES PROIZVODNJE MASLINOVOG ULJA

Proces obrade maslina za proizvodnju maslinovog ulja sastoji se od više faza. Prva faza obuhvaća prozračivanje i pranje vodom prikupljenih maslina, čime se plodovi odvajaju od grančica, lišća, prašine i ostalih nečistoća. Sljedeća faza je mljevenje kojom se plodovi drobe i usitnjavaju kako bi se dobila homogena masa za daljnju obradu, a ujedno se omogućava oslobađanje kapljica ulja iz staničnih vakuola. Nakon mljevenja, dobivena smjesa se miješa kako bi se sakupilo prisutno ulje u nastalom tijestu te kako bi se koalescencijom od sitnijih, formirale veće kapljice ulja. Četvrta faza je izdvajanje ulja uz pomoć preša (tradicionalni način) ili kontinuirano pomoću centrifuge. Nakon prerade, ulje se čuva u prozračnom i svježem prostoru pri konstantnoj temperaturi u spremnicima od nehrđajućeg čelika priključenim na plinski spremnik sa dušikom koji onemogućava kontakt sa kisikom. [5]

Proizvodnjom maslinovog ulja nastaje otprilike 20% maslinovog ulja, 30% polučvrstog ostatka (komine), 50% otpadne vode te mali postotak čvrstog ostatka u obliku grančica i lišća masline. Komina masline predstavlja koristan ostatak nakon prešanja ploda masline te se kao takav može primjeniti kao organsko gnojivo, gorivo za domaćinstvo ili tehnološki proces te kao dodatak stočnoj hrani. [6]

2.1.2. LIST MASLINE

Listovi masline su zimzeleni, kožnati, dugi 5-10 cm, široki do 2 cm, cjelovitog ruba, srebrno-sivi na naličju i nalaze se na kratkim peteljka. Mogu se brati tijekom cijele godine (za razliku od ploda koji dozrijeva krajem jeseni) te se najčešće koriste za pripravu čaja. [7]

Listovi su korišteni kao tradicionalni lijek za razne zdravstvene probleme i bolesti kao što su smanjivanje temperature, liječenje i sprječavanje malarije ili hipertenzije. [8] Obradom jednog drveta masline, obrezivanjem i branjem plodova dobije se kao nusprodukt otprilike 25 kg lišća i grančica. Isto tako, u industrijskom procesu proizvodnje maslinovog ulja, u fazi odvajanja i ispiranja plodova masline, dobiva se velika količina lišća i grančica. [9] Unatoč velikoj važnosti

masline u prehrani Mediteranskih zemalja, lišće masline još uvijek nije dovoljno industrijski iskorišteno nego se većinom koristi kao stočna hrana. [10]

Tijekom procesa prerade maslina u maslinovo ulje dospije tek 2 % ukupnih fenolnih spojeva, dok ostalih 98 % zaostaje u otpadu. [11] Upravo zahvaljujući visokoj koncentraciji fenolnih spojeva, lišće masline postalo je tema brojnih istraživanja. Jedno od važnijih za spomenuti je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz lista masline za dodatak maslinovom ulju kako bi mu se povećala nutritivna vrijednost. [10,8] U odnosu na maslinovo ulje i kominu, lišće masline sadrži znatno veći postotak polifenolnih spojeva (npr. količina oleuropeina u maslinovom ulju iznosi 0.005 – 0.12 % dok u lišću iznosi 1-14 %) što ga čini dijelom masline sa najvećom antioksidativnom aktivnosti. [12,13]

Visoki sadržaj polifenolnih spojeva u listu masline pripisuje se utjecaju sunčevog zračenja i vode koji pospešuju njihovu sintezu u biljkama. U odnosu na ostale dijelove biljke, lišće je izloženije sunčevom zračenju te je usporednom analizom lišća sa sjenovite i sunčane strane drveta ustanovljeno da lišće sa sjenovite strane sadrži manju koncentraciju fenolnih spojeva. [13]

Lišće masline povezuje se sa brojnim ljekovitim svojstvima kao što su: antioksidativnost, antimikrobna aktivnost, anti-aterosklerotičnost, antihipertenzivnost, protuupalna, protukancerogena te brojna druga svojstva. Takav djelotvoran učinak na zdravlje pripisuje se upravo fenolnim spojevima. [12]

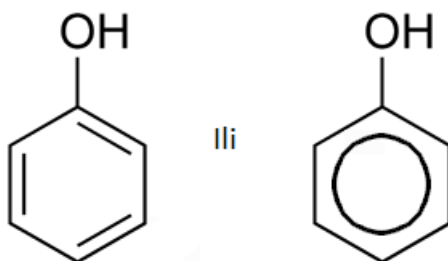
Lišće masline i njegovi ekstrakti sve više nalaze primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji te kao dodatci prehrani. [2]



Slika 2. List masline

2.2. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su aromatski organski spojevi koji se sastoje od jedne (fenol) ili više (polifenol) hidroksilnih skupina (-OH), uključujući i neke druge funkcionalne skupine, vezane izravno na aromatski prsten. To su čvrste kristalne tvari kiselog karaktera (zbog utjecaja aromatskog prstena), koje otapanjem u jakim lužinama stvaraju soli, *fenolate*, te djeluju baktericidno. Najjednostavniji takav spoj je *fenol* (*karbolna kiselina*), C_6H_5OH . [14,15]



Slika 3. Fenol

Fenolni spojevi veoma su raznolika skupina fitokemikalija koji su prisutni u prirodi u gotovo svim biljkama te namirnicama biljnog podrijetla. [16] Najbrojniji su i rasprostranjeniji spojevi biljnog svijeta (sekundarni biljni metaboliti) što potvrđuje više od 8000 otkrivenih biljnih polifenola. [17] Količina biofenolnih spojeva u biljkama povećava se uslijed nepovoljnih uvjeta kao što su UV zračenje, infekcija od strane patogena ili parazita, zagađenje zraka ili izlaganje ekstremnim temperaturama te tako štite biljku. [18]

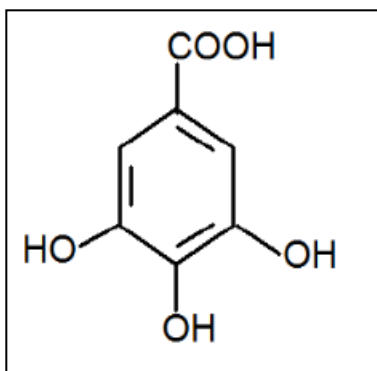
Biljni polifenoli sudjeluju u regulaciji rasta biljaka, štite ih od mikroorganizama (antibiotsko djelovanje), insekata i UV zračenja, privlače oprašivače te pridonose pigmentaciji biljaka. U namirnicama pridonose gorčini, oštini, boji, mirisu i oksidacijskoj stabilnosti. [19] Manje polarni fenolni spojevi dodaju se uljima i mastima kako bi povećali njihovu stabilnost pri skladištenju i zagrijavanju, a polarniji se često koriste kao stabilizatori prehrambenih disperzija. [20] Fenolne spojeve, obzirom na molekulsku strukturu, nalazimo u obliku jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline, ali i kao visoko polimerizirane molekule (npr. tanini).

U prirodi ih rijetko nalazimo u slobodnom obliku, već češće kao polifenole koji teže povezivanju sa raznim šećerima, karboksilnim i organskim kiselinama, aminima i lipidima. [21]

S obzirom na svoju osnovnu kemijsku strukturu, polifenolni spojevi mogu se podijeliti na veliki broj različitih skupina ovisno o broju aromatskih prstenova te vrsti i broju vezanih funkcionalnih skupina. [17]

U biljkama, fenolne spojeve prema kemijskoj strukturi možemo podijeliti na flavonoide, fenolne kiseline, kumarine, stilbene te hidrolizirane i kondenzirane tanine. [19] Najbrojnija skupina, flavonoidi, sadrže keto funkcionalnu skupinu i dijele se u mnogo podskupina (flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni). [21] Fenolne kiseline imaju karboksilnu funkcionalnu skupinu vezanu na aromatski prsten te se s obzirom na svoju strukturu dijele na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. [20]

Važna predstavica fenolnih kiselina, a ujedno sastavni dio mnogih biljnih tanina, je galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) koja se koristi kao standard za određivanje fenolnog sadržaja u raznim materijama putem Folin-Ciocalteu testa.



Slika 4. Galna kiselina [22]

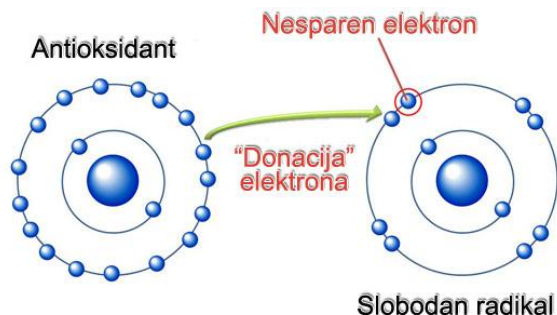
Raspodjela fenolnih spojeva u tkivu, staničnoj i podstaničnoj razini biljke nije ujednačena. Tako su netopljivi fenoli najčešće prisutni u staničnim stijenkama, a topivi unutar staničnih vakuola. Također, ustanovljeno je da vanjski dijelovi biljke sadrže veću količinu fenolnih spojeva od onih u njenoj unutrašnjosti [18] pa su tako fenolni spojevi uglavnom pohranjeni u lišću i kori biljke. [20]

2.2.1. SVOJSTVA FENOLNIH SPOJEVA

Fenolni spojevi smatraju se veoma važnim sastojkom ljudske prehrane zbog svog antioksidacijskog djelovanja, sposobnosti da umanje oštećenja tkiva izloženog oksidacijskom stresu te antikancerogenog djelovanja. [23]

Stanice upotrebljavaju kisik za generiranje energije pri čemu nastaju slobodni radikali kao posljedica proizvodnje adenin trifosfata u mitohondrijima. Slobodni radikal je spoj koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona te je zato veoma reaktivan. Glavni predstavnici slobodnih radikala su vodik (1 nespareni elektron), ioni prijelaznih metala i molekula kisika. [24] Kada je proizvodnja slobodnih radikala veća od količine antioksidansa i antioksidativnih enzima, nastupa oksidacijski stres. Važnost antioksidansa unesenih prehranom je upravo u njihovom doprinosu na djelovanje postojećih antioksidansa u neutralizaciji oksidacijskog stresa. [25] Oksidacijski stres dovodi do staničnog oštećenja te je jedan od uzročnika mnogih kroničnih degenerativnih bolesti kao što je npr. rak ili Alzheimerova bolest. [26]

Antioksidacijska aktivnost polifenola očituje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih kisikovih i dušikovih iona te inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres. Polifenoli se odlikuju i sposobnošću keliranja metala te vezanja ugljikohidrata i proteina pomoću hidroksilnih skupina. [16] Kemijska struktura, broj i smještaj hidroksilnih skupina te prisutnost drugih funkcionalnih skupina, glavni su faktori o kojima ovisi antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva. [13]



Slika 5. Mehanizam djelovanja antioksidansa [27]

Mehanizam djelovanja antioksidansa temelji se na sparivanju njihovog elektrona sa elektronom reaktivnog slobodnog radikala pri čemu ih neutraliziraju. Zahvaljujući postojanoj stabilnosti u svim oblicima, antioksidans doniranjem elektrona ne postaje slobodan radikal. [25]

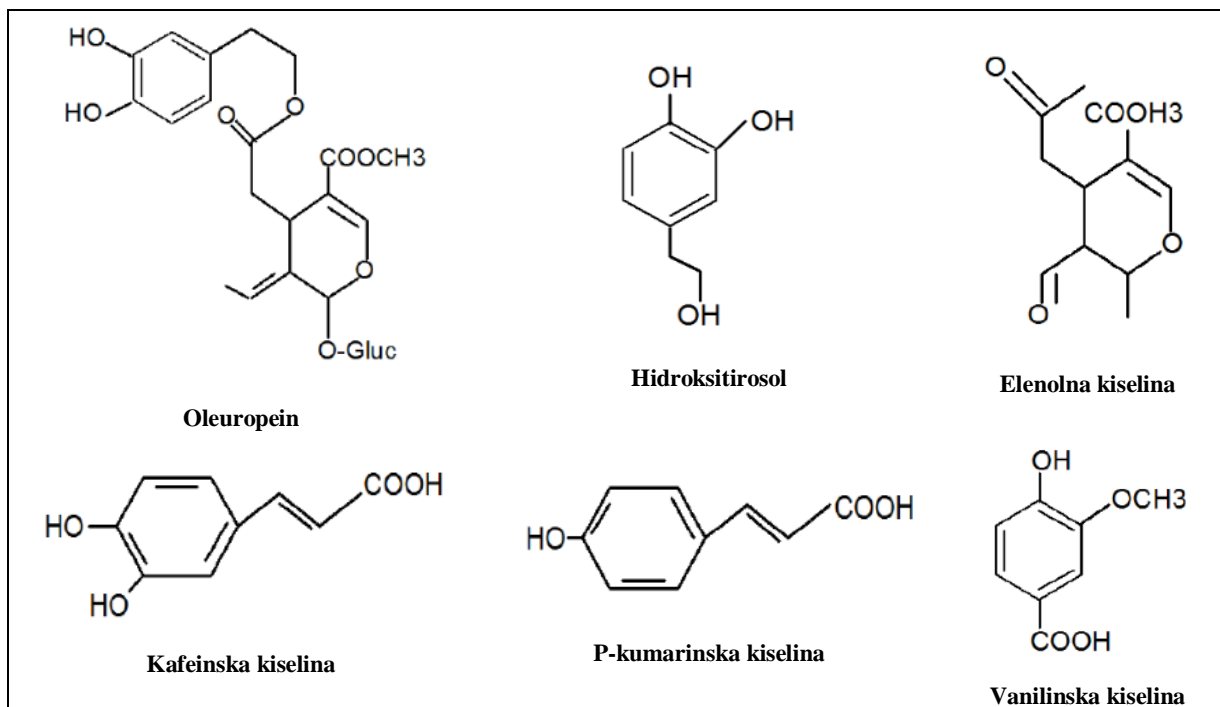
2.2.2. FENOLNI SPOJEVI U LISTU MASLINE

Kemijski sastav lista masline ovisi o sorti masline, klimatskim uvjetima, sadržaju vlage, uvjetima skladištenja te stupnju onečišćenja tla. [28]

U listu masline, s obzirom na njihovu molekularnu strukturu, nalazimo nekoliko grupa fenolnih spojeva:

- lignani
- oleuropezidi (oleuropein i verbaskozid)
- flavonoidi
- flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin, diosmetin)
- flavonoli (rutin)
- flavo-3-oli (katehin)
- substituirani fenoli (tirosol, hidroksitirosol, vanilin, vanilinska i kafeinska kiselina) [9,28]

Djelotvoran učinak na zdravlje pripisuje se polifenolima niske molekulske mase kao što su oleuropein (69-90 mg/g suhog lišća), hidroksitirosol, tirosol, derivati elenolne kiseline, kafeinska kiselina, p-kumarinska kiselina, vanilinska kiselina i razni flavonoidi. Kombinacijom fenolnih spojeva značajno se povećava antimikrobno djelovanje u odnosu na njihovo pojedinačno djelovanje. [2] Najaktivniji i najzastupljeniji spoj u listovima masline sa snažnim antioksidacijskim djelovanjem je oleuropein. [29] Oleuropein je, u kemijskom smislu, heterozidni ester elenolne kiseline i dihidroksifeniletanola. Hidrolitičkim cijepanjem oleuropeina nastaje elenolna kiselina čije kalcijeve soli dokazano imaju antivirusno djelovanje. [30]



Slika 6. Kemijske strukture nekih fenolnih spojeva prisutnih u lišću masline

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija u industriji ima brojne primjene u nuklearnoj tehnologiji, biotehnologiji, zaštiti okoliša, farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji te kozmetičkoj i kemijskoj industriji. Za industrijsku primjenu je razvijen niz postupaka koji se mogu podijeliti na diskontinuirane (šaržne) i kontinuirane, jednostupnjevite i višestupnjevite te križne i protustrujne. [31]

Novije tehnike ekstrakcije su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvučnim valovima ili enzimima, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija superkričnim fluidima, ekstrakcija pri povišenom tlaku i dr. [32]

Ekstrakcija je ravnotežni separacijski proces uklanjanja jedne ili više komponenti iz čvrste ili kapljevite smjese pomoću selektivnog otapala. [33]

Vrste ekstrakcija:

- ekstrakcija kruto-kapljevito (izluživanje)
- ekstrakcija kapljevito-kapljevito [33]

Izluživanjem odvajamo odabrane tvari iz neke čvrste smjese prikladnim otapalom, npr. izluživanje metala iz rude sa kiselinom. Ekstrakcija kapljevito-kapljevito je osnovna tehnološka operacija koja se temelji na raspodjeli otopljene tvari između dviju kapljevina (otopine i otapala) koje se međusobno ne miješaju (teža i lakša faza). Prijenos tvari odvija se difuzijom otopljene tvari kroz granicu faza fino raspršenih kapljica, a raspodjela tvari među fazama ovisi o topljivosti tih tvari. Ekstraktna faza je nakon postupka obogaćena tvari koja se ekstrahira, a početna, pojna smjesa je osiromašena tom tvari i naziva se rafinat. Učinkovitost ekstrakcijskog postupka iskazuje se omjerom ekstrahirane tvari u organskoj i vodenoj fazi nakon ekstrakcije. Na učinkovitost ekstrakcije može utjecati niz faktora: otapalo, temperatura, vrsta i koncentracija komponenti ekstrakcijskog sustava, volumni omjeri faza, vrijeme i način miješanja i dr. [34]

Selektivno otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti nekoliko uvjeta:

- učinkovito ekstrahirati aktivnu komponentu radi što manjeg utroška otapala
- mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima
- radi lakšeg uklanjanja nakon postupka treba imati nisko vrelište
- zbog većeg iskorištenja i učinkovitijeg otapanja treba imati nižu viskoznost i površinsku napetost
- ne smije biti zapaljivo i otrovno
- mora biti ekološki prihvatljivo i jeftino [27]

Budući da klasična organska otapala mogu uzrokovati brojne negativne učinke na okoliš i zdravlje ljudi, istražuje se primjena različitih nekonvencionalnih otapala od kojih se najviše ističu ionske kapljevine i eutektička otapala.

2.3.1. EKSTRAKCIJA KRUTO-KAPLJEVITO

Ekstrakcija krutina kapljevina je često korištena jedinična operacija za izolaciju aktivnih komponenti iz biljnog materijala, a najčešće se provodi kao maceracija ili perkolacija. **Maceracija** je šaržni proces koji se odvija u suspenziji potapanjem krutog materijala u otapalo. **Perkolacija** je polušaržni proces koji uključuje kontinuirano protjecanje otapala kroz nepokretan sloj krutog materijala. [35] Često se upotrebljava i Soxhlet ekstrakcija, a provodi se isparavanjem otapala, koje se zatim propušta kroz usitnjeni i homogenizirani čvrsti uzorak te se potom otapalo kondenzira i s izdvojenim ekstraktom vraća u tikvicu. Ova metoda omogućuje potpuno izdvajanje aktivne komponente iz materijala, na temelju čega se ukupna koncentracija određuje kao maseni odnos aktivne komponente po masi tvari. [36]

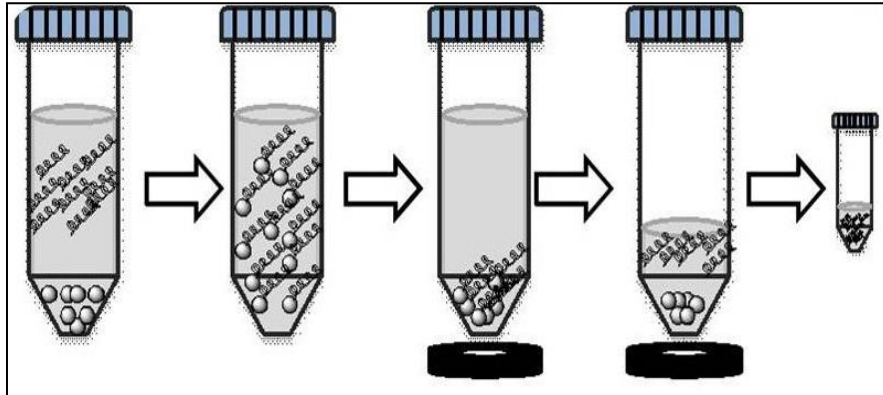
Proces ekstrakcije kruto-kapljevito temelji se na prijenosu tvari na granici faza. Mehanizam procesa izluživanja ključne komponente iz krutog materijala pomoću pogodnog otapala se odvija u nekoliko osnovnih koraka:

- difuzija otapala u krutu tvar
- otapanje ključne komponente
- transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari
- transport otapala s otopljenom tvari sa površine krute tvari u masu otopine
- razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka uzorka
- uklanjanje otapala iz ekstrakta [27]

Kada krutinu dovedemo u kontakt sa selektivnim otapalom, na njenoj površini se stvara sloj zasićene otopine kojeg nazivamo granični sloj. Zbog razlike koncentracija graničnog sloja i ostatka otapala, postoji koncentracijski gradijent zbog kojeg topljiva tvar stalno prelazi u ostatak otapala. [27] Brzina izluživanja može se povećati smanjenjem debljine graničnog difuzijskog sloja (miješanje) i održavanjem velike razlike koncentracija u graničnom sloju i sredstvu za izluživanje. [34]

Procesni uvjeti ovise o svojstvima čvrste tvari i komponente koju treba izdvojiti te ih je potrebno optimizirati. Po završetku ekstrakcije, otapalo se može odvojiti od ekstrahirane tvari različitim

jediničnim operacijama što omogućuje recikliranje otapala odnosno njegovo vraćanje u proces ekstrakcije. [35]



Slika 7. Shema procesa izluživanja

2.3.2. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Topljivost biljnih fenolnih spojeva određuje njihova kemijska i molekularna struktura koja može biti jednostavna do visoko polimerizirana. Biljni materijali sadrže različite vrste fenolnih spojeva koji mogu biti u interakciji sa drugim biljnim komponentama kao što su ugljikohidrati i proteini. Te interakcije mogu rezultirati stvaranjem teško topljivih i/ili netopljivih kompleksnih spojeva. Topljivost fenolnih spojeva ovisi i o polarnosti korištenog otapala te je, s obzirom na navedene faktore, gotovo nemoguće razviti univerzalni proces ekstrakcije primjenjiv za izdvajanje biološki aktivnih tvari iz svih vrsta biljaka.

Često korištena konvencionalna otapala za ekstrakciju su metanol, etanol, propanol, aceton, etil acetat, dimetilformamid i njihove kombinacije, sa raznim udjelima vode.

Uz odabir odgovarajućeg otapala, veoma je važno i vrijeme provedbe procesa. Ekstrakcija može trajati od 1 minute do 24 sata pri čemu treba uzeti u obzir da tijekom dužeg perioda, visokih temperatura te u lužnatim sustavima dolazi do oksidacije odnosno degradacije fenolnih spojeva. [18,37]

Danas se sve više istražuju metode ekstrakcije koje odgovaraju načelima zelene kemije, a uključuju nisku potrošnju otapala, kratko vrijeme ekstrakcije i visoko iskorištenje. Najveća pozornost pridaje se ekstrakcijama uz pomoć otapala koja nemaju štetan utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje. [37]

2.3.3. POBOLJŠANJE PROCESA EKSTRAKCIJE

Na proces ekstrakcije kruto-kapljevito i njenu brzinu, veliki utjecaj imaju: veličina čestica, temperatura, način provedbe procesa, odabir sekundarnog otapala i njegova fizikalna svojstva te način miješanja.

Ekstrakcija pri višoj temperaturi u većini slučajeva ubrzava proces jer se brzina otapanja krute tvari povećava, smanjuje se viskoznost i gustoća otapala što konačno pozitivno utječe i na brzinu prijenosa tvari. U pojedinim slučajevima, aktivne komponente porastom temperature degradiraju te je bitno prije izvođenja ekstrakcije odrediti fizikalno-kemijske karakteristike sustava i aktivne komponente koju se želi ekstrahirati.

Veličina čestica, kao i njihova specifična površina pora, imaju veliki utjecaj na prijenos tvari i brzinu procesa ekstrakcije. Manje čestice s većom specifičnom površinom pora imaju veću kontaktnu površinu između kapljevine i krutine te je put koji otopljen tvar prijeđe izlazeći iz krutine znatno kraći, što pozitivno utječe na prijenos tvari. [27]

Količina izlužene tvari kao i efikasnost procesa ekstrakcije, ovisi o stupnju razgradnje biljnih stanica, pa postoje razne metode za postizanje odgovarajućeg stupnja razgradnje kao što su mehanička kompresija, usitnjavanje te toplinska i kemijska obrada. [38]

Miješanje čvrstih čestica u kapljevinama se naziva suspendiranje, a provodi se u svrhu sprječavanja sedimentacije čvrste tvari i osiguravanja pogodnih uvjeta za prijenos tvari i topline te kemijsku reakciju. [39] U današnje vrijeme, osim upotrebe mehaničkog miješanja, ekstrakcija se provodi ultrazvukom ili kombinacijom ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja.

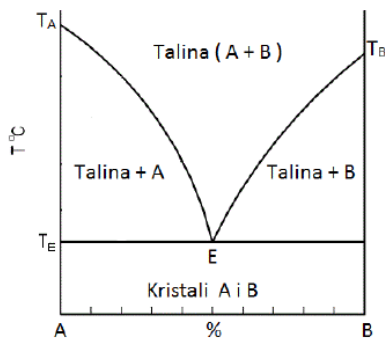
Ultrazvuk visoke snage, zbog kavitacijskog djelovanja na stanične stijenke, omogućuje bolje prodiranje otapala u materijal te tako povećava prijenos tvari. Ekstrakcija biokomponenti ultrazvukom omogućuje visoku reproducibilnost u kraćem vremenu, jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje malih količina otapala. [40]

2.4. EUTEKTIČKA OTAPALA

U današnje vrijeme istražuju se ekološki prihvatljiva otapala kao zamjena za konvencionalna otapala u proizvodnim procesima, kako bi se zadovoljili kriteriji zelene kemije. Nakon ionskih kapljevina, koja su svojim dobrim svojstima konkurirala konvencionalnim otapalima, otkrivena je nova vrsta otapala, niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents* – DESs), koja se još često nazivaju i zelenim otapalima. Ova otapala sve se više primjenjuju u industrijskoj proizvodnji kemikalija i organskoj sintezi, katalizi i elektrokemiji, pripremi uzoraka za analitičku kemiju, izolaciju i frakcioniranje, za uklanjanje zagađivača iz ekstrakcijskih procesa, za pripremu biogoriva te za odvajanje azeotropnih smjesa. Primjena eutektičkih otapala ograničena je svojstvima pripremljenog otapala, odnosno sastavom niskotemperaturne eutektičke smjese. [41]

Niskotemperaturna eutektička otapala definirana su kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koja u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese. [42]

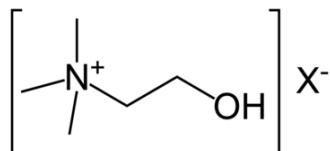
Ova otapala sintetizirana su od organskih kiselina, aminokiselina, saharida, alkohola, aldehida, poliola i amonijevih soli povezanih vodikovim vezama. [41] Delokalizacija naboja koja nastaje stvaranjem vodikove veze, uzrokuje smanjenje točke tališta mješavine u odnosu na tališta pojedinih komponenti. [43]



Slika 8. Fazni dijagram eutektičkog sustava

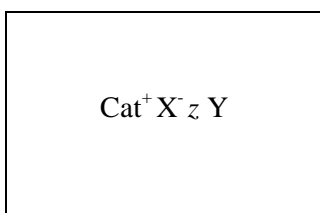
Eutektička otapala mješavina su Lewisovih ili Brønstedovih kiselina i baza te sadrže raznovrsne anionske i kationske dijelove. Zahvaljujući nesimetričnosti iona imaju nisku energiju rešetke te samim time i niska tališta. Najčešće se dobivaju kompleksiranjem kvaterne amonijeve soli s metalnom soli ili donorom vodikove veze (eng. *Hydrogen Bond Donor* - HBD).

Većina eutektičkih otapala bazira se na kvaternom amonijevom kationu (*kolin*, kolin kation, (2-hidroksietil)-trimetilamonijev kation) zbog njegove netoksičnosti i relativno niske cijene. [43]



Slika 9. Struktura kvaternog amonijevog kationa [44]

Općenita formula eutektičkih otapala je:



Cat^+ predstavlja amonij, fosfonij ili sulfonij kation

X^- je Lewisova baza, općenito halidni anion

Y je Lewisova ili Brønstedova kiselina

z se odnosi na broj Y molekula koje su u interakciji sa anionom

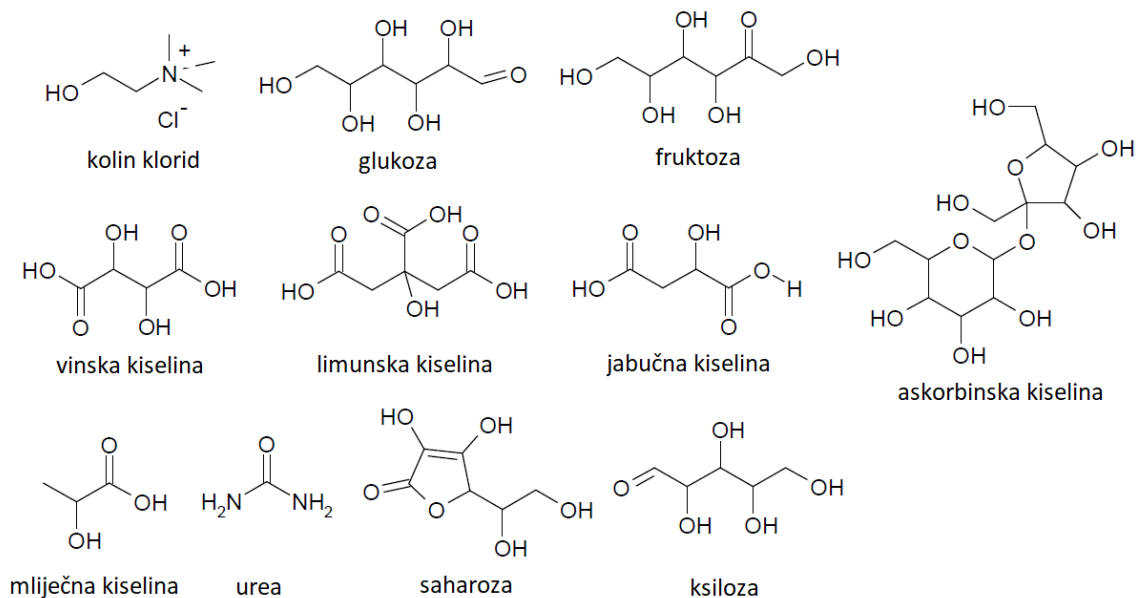
Eutektička otapala sastoje se od kationa, aniona i kompleksirajućeg agensa, a prema tome se mogu podijeliti u tri grupe:

1. metalna sol + organska sol (npr. $ZnCl_2$ + kolin klorid)
2. hidrat metalne soli + organska sol (npr. $COCl_2 \cdot 6H_2O$ + kolin klorid)
3. donor vodikove veze + organska sol (npr. urea + kolin klorid) [45]

2.4.1. PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Posljednjih godina najviše se radi na razvijanju niskotemperaturnih prirodnih 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 (npr. glukoza, fruktoza), a nastaju stvaranjem kompleksa između donora vodikove veze (eng. *Hydrogen bond donor* - HBD) i akceptora vodikove veze (eng. *Hydrogen Bond acceptor* - HBA). [45] Značajan utjecaj na formiranje i stabilnost NADES-a ima broj donora ili akceptora vodikovih veza, položaj tih veza te prostorna struktura tih skupina.

Obzirom na brojnost mogućih struktura i mogućnost dizajniranja fizikalno-kemijskih svojstava nazivaju se i "dizajnerska otapala". Zahvaljujući tome, imaju širok raspon primjene, odnosno nude mogućnost dizajna novog otapala sa točno određenim svojstvima potrebnima za željeni proces. [46] Ekstrakti dobiveni uz ovakva otapala u većini slučajeva mogu biti upotrebljeni u prehrambenoj industriji za konzumaciju, bez potrebe za pročišćavanjem. [47]



Slika 10. Kemijska struktura različitih komponenti koje se mogu upotrijebiti za sintezu NADES [46]

2.4.2. SVOJSTVA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala je jednostavna i ekonomična. Kod sinteze ovih otapala ne dolazi do kemijske reakcije nego se komponente povezuju vodikovim vezama i tvore eutektičko otapalo, pri čemu ne nastaje otpad. Često su biorazgradiva što znači da njihovo ispuštanje u okoliš nema štetnih posljedica. Imaju veliku toplinsku, kemijsku i elektrokemijsku stabilnost i nisu hlapljiva pri atmosferskim uvjetima. [45]

Posebnost ovih otapala je mogućnost kombinacije različitih komponenti, odnosno njihovog molarnog odnosa, čime se može proizvesti novo otapalo sa točno određenim fizikalno-kemijskim svojstvima.

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala u potpunosti zadovoljavaju načela zelene kemije i imaju brojne prednosti kao biorazgradivost, sigurnost prilikom korištenja, mogućnost ponovne upotrebe, široka dostupnost i niska cijena komponenti, niski troškovi sinteze, jednostavna priprema, minimalna toksičnost i stabilnost.

Imaju i vrlo dobra fizikalno-kemijska svojstva kao što su: prilagodljiva viskoznost, široki raspon polarnosti, visoka moć otapanja različitih spojeva te postojanost u tekućem agregatnom stanju, čak i pri temperaturama daleko nižim od 0°C. Dobra moć otapanja proizlazi iz sposobnosti ovog otapala da primi ili donira elektron ili proton za formiranje vodikove veze. [46]

Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičkih otapala kao što su vodljivost, viskoznost, gustoća i polaritet ovise o kemijskoj prirodi komponenata. Imaju mogućnost otapanja makromolekula što ih čini odličnim otapalima u procesima ekstrakcije visoko vrijednih sekundarnih metabolita iz biljnih materijala (npr. fenolnih spojeva) za upotrebu u prehrambenoj ili farmaceutskoj industriji. [46]

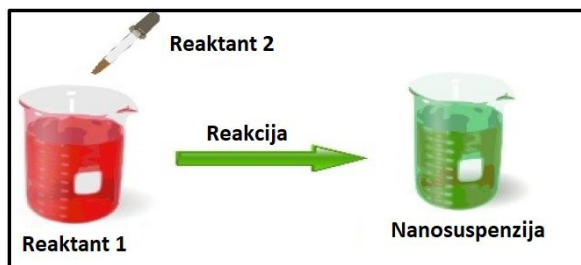
2.5. NANOSUSPENZIJE

Nanočestice su čvrste čestice, veličine između 1 do 100 nm, čija su svojstva između mikro materijala i atoma ili molekula i temeljni su sastojak u proizvodnji nanostrukture čije se vladanje opisuju kvantno-mehaničkom teorijom, umjesto klasičnim Newtonovim zakonima gibanja. [48]

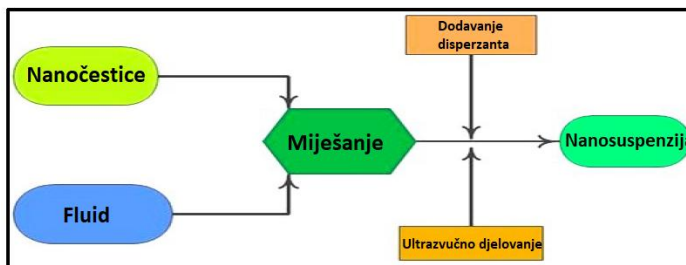
Nanosuspenzije su suspenzije nanočestica u fluidu, s barem jednom kritičnom dimenzijom manjom od 100 nm. [49] Za pripremu nanosuspenzija najčešće se koriste nanočestice metala (Al,Cu,Fe,Au,Ag), metalnih oksida (Al_2O_3 , CuO, Fe_3O_4 , TiO_2) ili ugljikove nanocjevčice raznih izvedbi. [50] Pravilno iskorištenje potencijala nanosuspenzije ovisi o pripremi i stabilnosti nanosuspenzije. [51]

Postoje dvije osnovne metode pripreme nanosuspenzija:

1. **U jednom koraku** – istovremena sinteza nanočestica i priprema nanosuspenzije, pri čemu se nanočestice sintetiziraju direktno u fluid s kojim čine suspenziju
2. **U dva koraka** – prvi korak je priprema nanočestica u obliku praha, a drugi korak je njihovo raspršenje u fluid (raspršivanje ultrazvukom) [51]

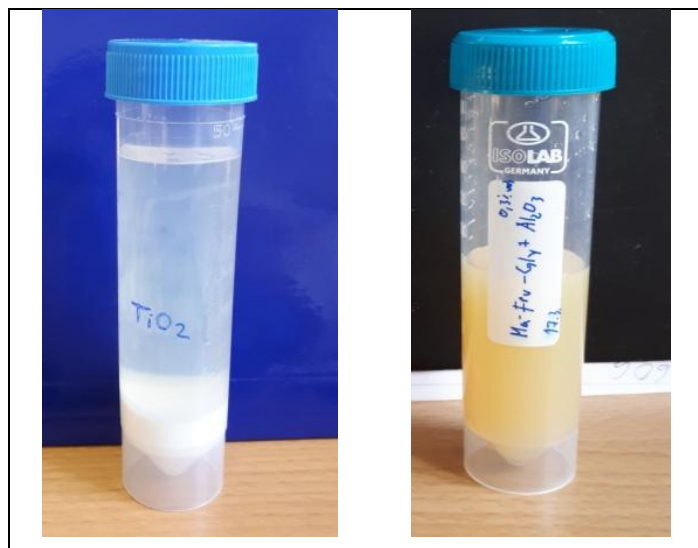


Slika 11. Priprema nanosuspenzije u jednom koraku



Slika 12. Priprema nanosuspenzije u dva koraka

Veliki izazov kod pripreme nanosuspenzija je njena stabilnost tijekom dužeg vremenskog perioda. Naime, nanočestice imaju sklonost stvaranja agregata zbog snažnih van der Waalsovih međudjelovanja. [49] Neke od metoda procjene stabilnosti nanosuspenzija su: sedimentacijska metoda, centrifugalna metoda, UV Vis spektrofotometrija, elektronska mikroskopija i metoda raspršenja svjetlosti te analiza zeta potencijala. Zeta potencijal pokazuje stupanj odbijanja između susjednih čestica u suspenziji te su tako suspenzije sa visokim zeta potencijalom električki stabilizirane, a suspenzije sa niskim zeta potencijalom imaju sklonost koagulaciji. [51]



Slika 13. Fotografije primjera nestabilne (lijevo) i stabilne (desno) nanosuspenzije

Kako bi se poboljšala stabilnost nanosuspenzija, dodaju im se površinski aktivne tvari, površina nanočestica se modificira i primjenjuju se ultrazvučni valovi za raspršivanje nanočestica u fluidu. [51]

Do sad provedena istraživanja ukazuju na značajan doprinos nanosuspenzija povišenju koeficijenta prijenosa topline kao i na povećanje ukupne djelotvornosti procesa. Na poboljšanje toplinske vodljivosti utječu: volumni udio, oblik nanočestica raspršenih u suspenziji te fizikalna svojstva baznog fluida. Neki od mehanizama kojima se objašnjava dobiveno poboljšanje su: djelovanje nanočestica na međufaznoj površini, stupanj agregacije te Brownovo gibanje nanočestica koje uzrokuje konvekciju tvari na mikro razini što pospješuje procese prijenosa. [49]

Na području prijenosa tvari primjenom nanosuspenzija, dosadašnja istraživanja pokazala su da do poboljšanja dolazi u sustavima: plin – plin, plin – kapljevina te kapljevina – kapljevina. Uočeno je da se pri većem stupnju slobode kretanja atoma i molekula postiže veće poboljšanje (u plinovitim sustavima i do 600%). [52]

Općenito, prijenos tvari trebao bi se smanjiti dodatkom nanočestica pošto krutina ima manju difuzivnost od kapljevine, ali kroz nedavne eksperimente, modeliranje i teorijski rad naglašava se da se prijenos tvari može poboljšati nanočesticama zahvaljujući induciranim hidrodinamičkim učincima Brownovog gibanja. [49]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. SVRHA RADA

- Istražiti mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala (NADES) za proces ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline
- Ispitati karakteristike i svojstva sustava
- Optimizirati proces ekstrakcije
- Istražiti mogućnost poboljšanja procesa prijenosa tvari u ekstrakciji kruto-kapljevito pomoću nanočestica, odnosno primjenom nanosuspenzije (NS)

3.2. LIST MASLINE

3.2.1. PRIPREMA LIŠĆA MASLINE ZA EKSPERIMENT

Lišće masline korišteno u ovom radu potječe iz Istre, točnije iz prehrambene tvrtke *Agrolaguna d.d.* smještene u Poreču. Dopremljeno lišće sušeno je na sobnoj temperaturi tijekom šest mjeseci. Sušenjem je uklonjena voda iz listova, a potom je uzorak usitnjen električnim mlinom u vremenu 1-2 minute te prosijan na uređaju za protresivanje sita (*AS 200*), kroz sita promjera očica 180, 355 i 710 μm . Specifična površina pora određena je snimanjem adsorpcijsko-desorpcijskih izoterma dušika pomoću uređaja *ASAP 2000 (Micromeritics, SAD)*. Primjenom ovog uređaja određena je specifična površina, srednja veličina pora i raspodjela veličina pora za pojedinu frakciju lišća (Tablica 1.).

Tablica 1. Karakterizacija lišća masline

Uzorak	Specifična površina pora (BET), m^2/g	Srednja veličina pora, nm	Raspodjela veličina pora, nm
Frakcija 710 μm	4,2084	3,9061	< 200
Frakcija 355 μm	3,1355	4,6098	< 200
Frakcija 180 μm	3,0791	5,7952	< 200



Slika 14. Osušeno lišće masline



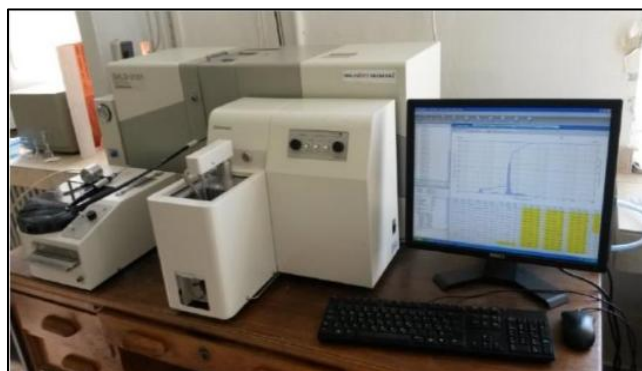
Slika 15. Usitnjeno lišće masline



Slika 16. Fotografija uređaja za protresivanje sita AS 200 (Retsch GmbH, Haan, SR Njemačka).

3.2.2. RASPODJELA VELIČINA ČESTICA LISTA MASLINE

Raspodjela veličina čestica lišća određena je metodom laserske difrakcije primjenom uređaja *SALD-3101* (Shimadzu, Japan) 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 29.).



Slika 17. Uređaj laserske difrakcije SALD-3101 (Shimadzu, Japan)

3.2.3. STRUKTURA LIŠĆA

Struktura različitih frakcija lišća istražena je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) pomoću uređaja *Tescan Vega 3 SEM*. Prije analize uzorka bilo je potrebno izvršiti njegovu pripremu. Uzorak se nanosi na vodljivu vrpču te se fiksira na metalni nosač, koji se potom stavlja u komoru neparivača (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 18. Uređaj pretražne elektronske mikroskopije, *Tescan Vega 3 SEM*

3.3. PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA

3.3.1. ODABIR PRIRODNOG EUTEKTIČKOG OTAPALA

Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz lišća masline ispitana su tri sintetizirana prirodna eutektička otapala: *ChCl-Ma* (kolin-klorid – malična kiselina), *Ma-Glu-Gly* (malična kiselina-glukoza-glicerol) i *Ma-Fru-Gly* (malična kiselina-fruktoza-glicerol).

Ispitivanjem utjecaja reagensa, korištenog za analizu ukupne koncentracije fenolnih spojeva (Folin-Ciocalteu reagens), na navedena prirodna eutektička otapala, ustanovljeno je da reagens u kontaktu sa *ChCl-Ma* stvara bijeli talog, odnosno da to otapalo nije pogodno za određivanje koncentracije fenola s ovim reagensom. Sa preostala dva ispitana NADESa reagens nije stvarao talog kao što je vidljivo na slici 19.



Slika 19. Fotografija taloga nastalog reakcijom Folin-Ciocalteu reagens i *ChCl-Ma*

Odabrano otapalo za ovaj rad je *Ma-Fru-Gly* obzirom da je u prethodnom istraživanju dao bolje rezultate od *Ma-Glu-Gly* za izluživanje fenolnih spojeva iz komine masline.

3.3.2. SINTEZA I KARAKTERIZACIJA PRIRODNOG EUTEKTIČKOG OTAPALA

Korišteno prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo u ovom radu je *Ma-Fru-Gly* (maltoza-fruktoza-glicerol), a za njegovu sintezu korištene su kemikalije navedene u tablici:

Tablica 2. Kemikalije korištene za sintezu prirodnog eutektičkog otapala *Ma-Fru-Gly*

Kemikalija	M , gmol^{-1}	ρ , gcm^{-3}	T_v , $^{\circ}\text{C}$	T_t , $^{\circ}\text{C}$	Čistoća, %	Proizvođač
Jabučna (malična) kiselina	194,09	1,609	-	130,0	99,0	<i>Acros Organics</i>
D - fruktoza	180,16	1,690	-	103,0	99,0	<i>Lachner</i>
Glicerol	92,10	1,260	290,0	-	99,0	<i>BDH Prolabo</i>

Prirodno eutektičko otapalo sintetizirano je od tri komponente kao što je navedeno u tablici 2. Prije same sinteze komponente su sušene u vakuum sušioniku (*Savant SPD131DDA Speed Vac Concentrator*, *Thermo scientific*, USA) pri temperaturi od 60°C tijekom 8 sati. Potom su komponente u određenom molarnom udjelu $Ma:Fru:Gly=1:1:1$ i 30 mas% vode dodane u

tikvicu s okruglim dnom. Sinteza se provodila pri temperaturi od 60°C u rotacijskom vakuum isparivaču (*IKA RV 10, Basic*, Njemačka) u trajanju od 2 sata, odnosno do pojave bistre i homogene kapljevine.

Prirodno eutektičko otapalo sintetizirano je sa određenim postotkom vode kako bi se smanjila viskoznost otapala, a time ujedno poboljšalo miješanje kod primjene u procesu ekstrakcije. Sintetiziranom otapalu eksperimentalno su određena glavna fizikalno-kemijska svojstva: gustoća, viskoznost, indeks loma, pH vrijednost i električna vodljivost pri sobnoj temperaturi korištenjem odgovarajućih uređaja (Tablica 3. i tablica 5.).

Tablica 3. Popis uređaja korištenih za određivanje fizikalnih svojstava prirodnog eutektičkog otapala

Fizikalno svojstvo	Uređaj	Točnost uređaja
Gustoća	Areometar	$\pm 0,001 \text{ g cm}^{-3}$
Viskoznost	<i>Brookfieldovom</i> reometru <i>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	$\pm 0,0002 \text{ V}$

3.4. PRIPREMA NANOSUSPENZIJE

3.4.1. KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA

Za pripremu nanosuspenzija korištene su nanočestice aluminijevog oksida, Al_2O_3 , proizvođača *Evonik industries*. Karakterizacija korištenih nanočestica dana je u tablici 4.

Tablica 4. Karakterizacija nanočestica

Nanočestice	Komercijalni naziv	Specifična površina (<i>BET</i>), m^2/g
Al_2O_3	<i>AROXID Alu C</i>	100 ± 15

3.4.2. PRIPREMA I ODREĐIVANJE STABILNOSTI NANOSUSPENZIJE

Nanosuspenzija je pripremljena raspršivanjem Al_2O_3 nanočestica u volumnom udjelu 0,3 % u prirodnom eutektičkom otapalu *Ma-Fru-Gly*. Za raspršivanje nanočestica korištena je ultrazvučna sonda (*Bandelin sonoplus HD 3200*), snage 200 W i mogućnosti promjene amplitude u rasponu od 10 do 40 %. U uzorak je uronjena ultrazvučna sonda tipa *TT 13*.

Raspršivanje se provodilo 10 minuta, ultrazvučnim valovima amplitude 20 %, a tijekom postupka se uzorak hladio tako da temperatura nanosuspenzije nije bila veća od 60 °C. Nakon raspršivanja, pripremljena nanosuspenzija stavljena je u epruvetu učvršćenu u uspravnom položaju. Tijekom mjesec dana, vizualnom provjerom praćena je stabilnost pripremljene nanosuspenzije te se pokazala stabilna, pošto nije došlo do sedimentacije nanočestica.

Raspodjela veličina čestica pripremljene nanosuspenzije snimljena je na Institutu Ruđer Bošković na uređaju *Zetasizer Nano ZSP, Malvern*. Analiza je provedena kako bi se ispitala stabilnost pripremljene nanosuspenzije.

Pripremljenoj nanosuspenziji eksperimentalno su određena glavna fizikalno-kemijska svojstva pri sobnoj temperaturi (Tablica 6.).



Slika 20. Ultrazvučna sonda *Bandelin sonoplus HD 3200*

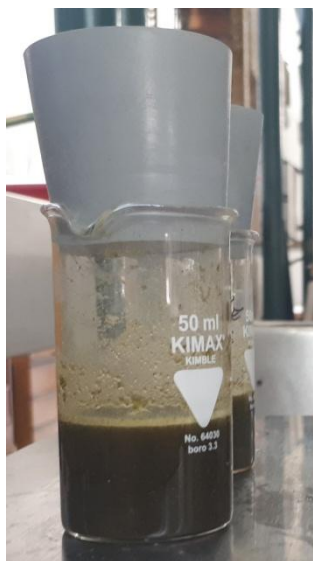


Slika 21. *Zetasizer Nano ZSP, Malvern*

3.5. PROVEDBA EKSTRAKCIJE

Izluživanje fenolnih spojeva iz lišća masline provođeno je šaržnom ekstrakcijom sa prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalom i njemu odgovarajućom nanosuspenzijom te sa konvencionalnim otapalom, etanolom. Uzorak od 1 g usitnjenog lišća miješao se sa 20 mL otapala (NADES, NS, etanol). Provedena je i Soxhlet ekstrakcija sa etanolom, kako bi usporedili učinkovitost ekstrakcije sa NADESom.

U cilju poboljšanja provedbe procesa ekstrakcije, ispitani su utjecaji načina miješanja, povišenja temperature, različitih frakcija suhe tvari te primjena različitih otapala.



Slika 22. Fotografija provedbe šaržne ekstrakcije na magnetskom miješalu



Slika 23. Aparatura za Soxhlet ekstrakciju

3.5.1. NAČINI PROVEDBE EKSTRAKCIJE

Različitim načinima provedbe procesa ekstrakcije, ispitan je njihov utjecaj na ekstrakciju fenolnih spojeva iz lišća masline. Obzirom na dobivene rezultate prethodnog istraživanja sa kominom masline, ekstrakcija je provedena primjenom magnetskog mješala i ultrazvučne sonde pošto su se pokazali najučinkovitijima.



**Slika 24. Magnetsko miješalo, Tehtnica Rotamix
609 MM**

Već spomenuta ultrazvučna sonda za raspršivanje nanočestica u otapalu (Slika 20.), korištena je i za provedbu ekstrakcije sa NADES i NS, također pri amplitudi 20%. Za vrijeme ekstrakcije, uzorak se hladio tako da temperatura uzorka nije bila veća od 60 °C.

Na slici 24., prikazano je korišteno magnetsko miješalo, snage 15 W, koje je za provedene ekstrakcije sa NADES i NS radilo pri intenzitetu 650 okretaja/min.

Za Soxhlet ekstrakciju korištena je aparatura prikazana na slici 23., a provedena je sa konvencionalnim otapalom (etanol) u trajanju od 12 sati.

3.5.2. UTJECAJ VREMENA MIJEŠANJA I TEMPERATURE NA PROCES EKSTRAKCIJE

Kako bi se odredilo vrijeme postizanja stacionarnih uvjeta, provedeni su preliminarni eksperimenti za dva načina miješanja: magnetsko miješalo i ultrazvučnu sondu. Tijekom provedbe ekstrakcije, nakon određenih vremenskih perioda, uzorkovanjem te analizom, dobivene su ukupne koncentracije fenolnih spojeva u određenom vremenu trajanja ekstrakcije. Na temelju dobivenih rezultata, određeno je optimalno vrijeme odvijanja procesa ekstrakcije sa magnetskim miješalom te ekstrakcijom sa ultrazvučnom sondom. Optimizacija je provedena i za ekstrakciju sa eutektičkim otapalom i za ekstrakciju sa nanosuspenzijom.

Također, ispitan je i utjecaj povišenja temperature na učinkovitost ekstrakcije. Za ekstrakcije provedene pri temperaturama 25 °C te 60 °C, određene su ukupne koncentracije fenolnih spojeva nakon provedenih ekstrakcija.

3.5.3. EKSTRAKCIJA SA NANOSUSPENZIJOM

Kao jedan od potencijalno učinkovitih načina poboljšanja procesa ekstrakcije, ispitan je utjecaj i primjena nanočestica raspršenih u navedenom eutektičkom otopalu, odnosno primjena odgovarajućih nanosuspenzija. Za sva optimalna ispitivanja sa eutektičkim otapalima, provedena je ekstrakcija sa odgovarajućim nanosuspenzijama. Nakon provedene ekstrakcije, a prije analize, uzorak je bilo potrebno centrifugirati i zatim filtrirati kako bi se dobio uzorak spreman za daljnju analizu i kako bi se uklonila potencijalna prisutnost nanočestica.

Za centrifugiranje uzorka korišten je uređaj *Centric 322A*, pri snazi od 550 W s brojem okretaja 4000 okretaja/min. Centrifugiranje se odvijalo 5min. Nakon toga, uzorak je filtriran pomoću filtera za špricu *ChromafilXtra PET-45/25* (0,45 µm; 25mm).



Slika 25. Uređaj za centrifugu, *Centric 322A*



Slika 26. Filter za špricu *ChromafilXtra PET-45/25*

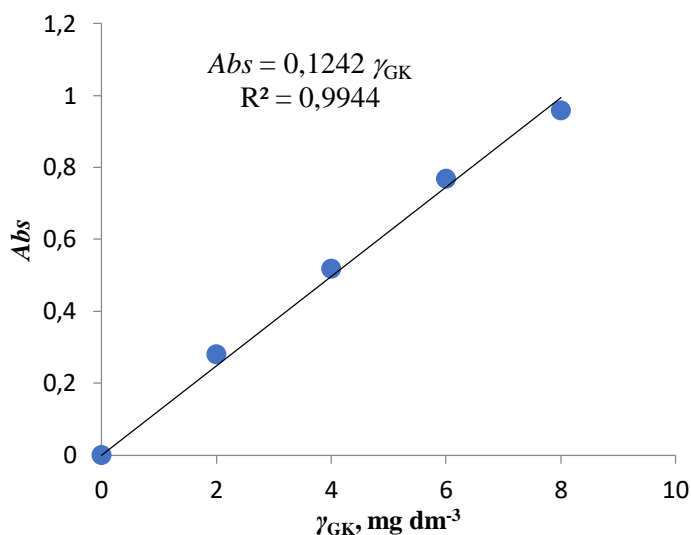
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA

3.6.1. FOLIN-CIOCALTEU METODA

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provedeno je spektrofotometrijski, standardnom Folin – Ciocalteu (FC) metodom na UV Vis spektrofotometru, proizvođača *Shimadzu* (Slika 28.). Nakon provedene ekstrakcije, mjerenjem apsorbancije uzoraka pri maksimalnoj valnoj duljini od 756 nm (maksimum apsorpcije), kvantitativno je određena koncentracija ukupnih fenola, izražena preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline.

U odmjerne tikvice od 10 mL, pipetirano je 400 μL *Folin-Ciocalteu* reagensa i 60 μL filtriranog uzorka te su tikvice ostavljene tijekom 8 min stajati na tamnom mjestu. Nakon 8 min, u tikvice je dodano 4 mL (7 mas. %) otopine natrijeva karbonata, a zatim je otopina razrijeđena dodatkom destilirane vode do oznake. Pripremljene otopine postepeno poprimaju karakteristično plavo obojenje. Tikvice sa pripremljenim otopinama omotane su aluminijskom folijom i termostatirane su sat vremena na temperaturi od 40°C.

Nakon termostatiranja, na spektrofotometru je mjeren intenzitet apsorbancije direktno proporcionalan količini ukupnih fenola u uzorku. Koncentracija ukupnih fenola u otopinama, izražena preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline, određena je iz baždarnog dijagrama (Slika 27).



Slika 27. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih fenola



Slika 28. UV Vis spektrofotometar, *Shimadzu* UV-128

3.7. ODREĐIVANJE KOEFICIJENTA PRIJENOSA TVARI

Za određivanje koeficijenta prijenosa tvari, bilo je prvo potrebno utvrditi ravnotežnu koncentraciju fenolnih spojeva u lišću masline. Uzorak osušenog lišća, mase 1 g, pomiješan je sa određenom količinom prirodnog eutektičkog otapala i nanosuspenzije. Dodana količina otapala bila je dovoljna da osigura potpuno vlaženje uzorka. Uzorci su promiješani i ostavljeni u stanju potpunog mirovanja 10 dana pri sobnoj temperaturi, čime su simulirani uvjeti prisutni u graničnom sloju. Folin-Ciocalteu metodom provedena je analiza uzoraka. Dobivene koncentracije fenolnih spojeva smatraju se ravnotežnim koncentracijama.

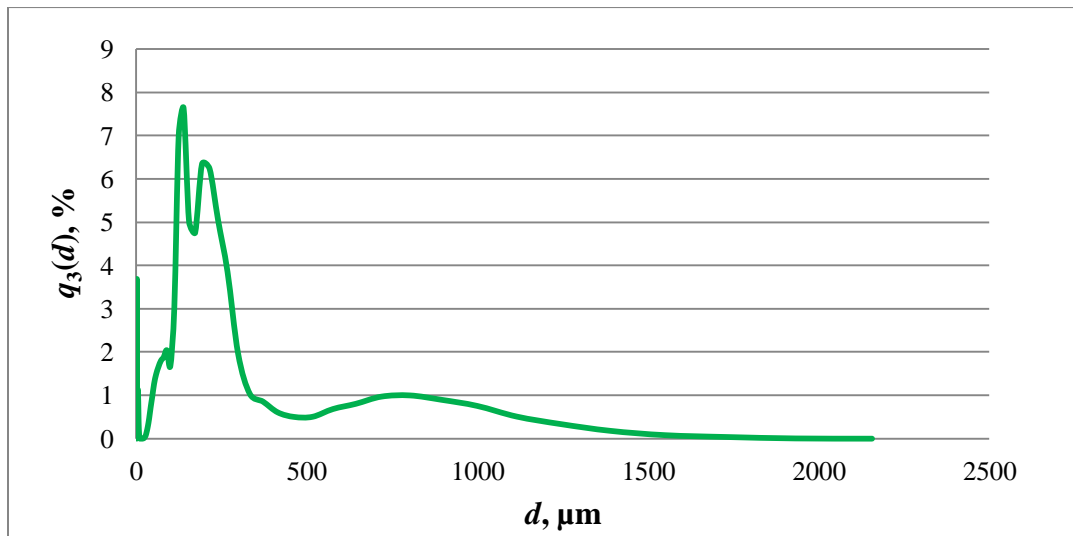
Prema formuli (jednadžba 1), uz pomoć dobivenih rezultata, izračunati su koeficijenti prijenosa tvari za provedene eksperimente.

$$\frac{dm}{dt} = K * A * (c^* - c(t)) \quad (1)$$

4. REZULTATI

4.1. KARAKTERIZACIJA SUSTAVA

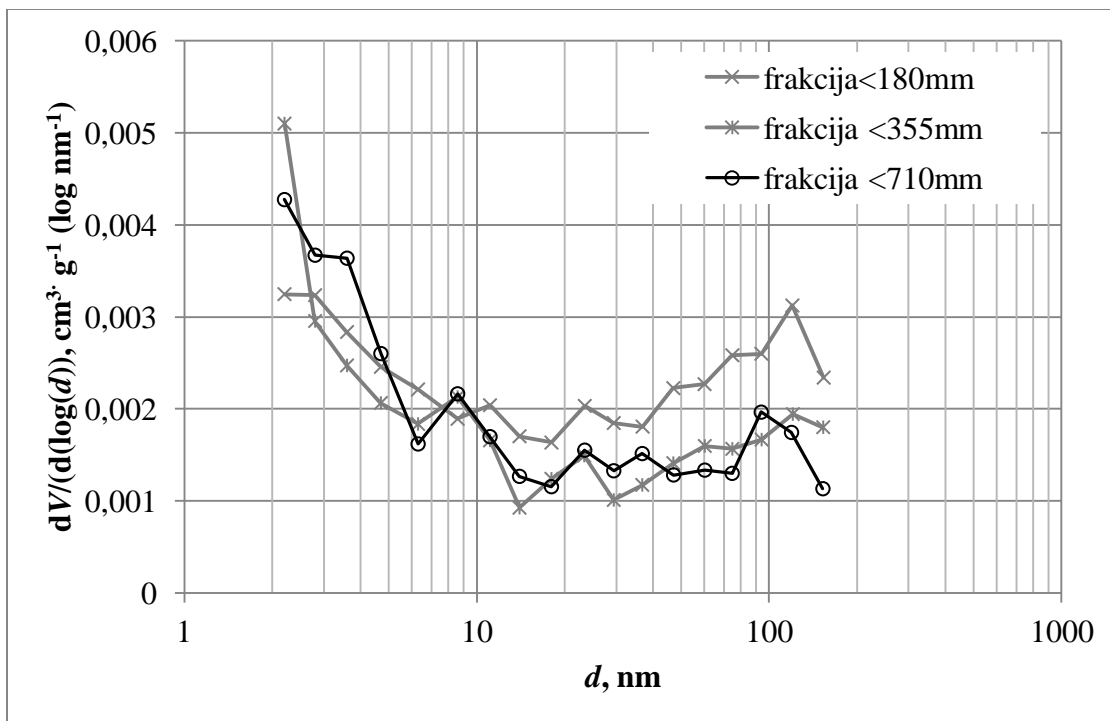
4.1.1. LIŠĆE MASLINE



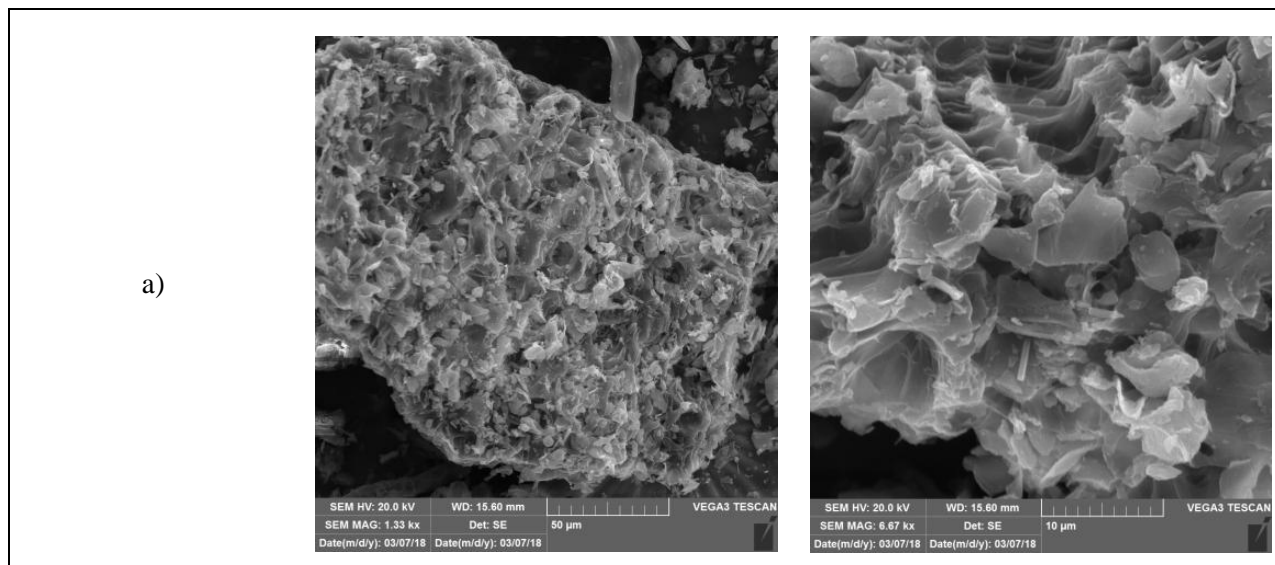
Slika 29. Raspodjela veličina čestica lišća masline

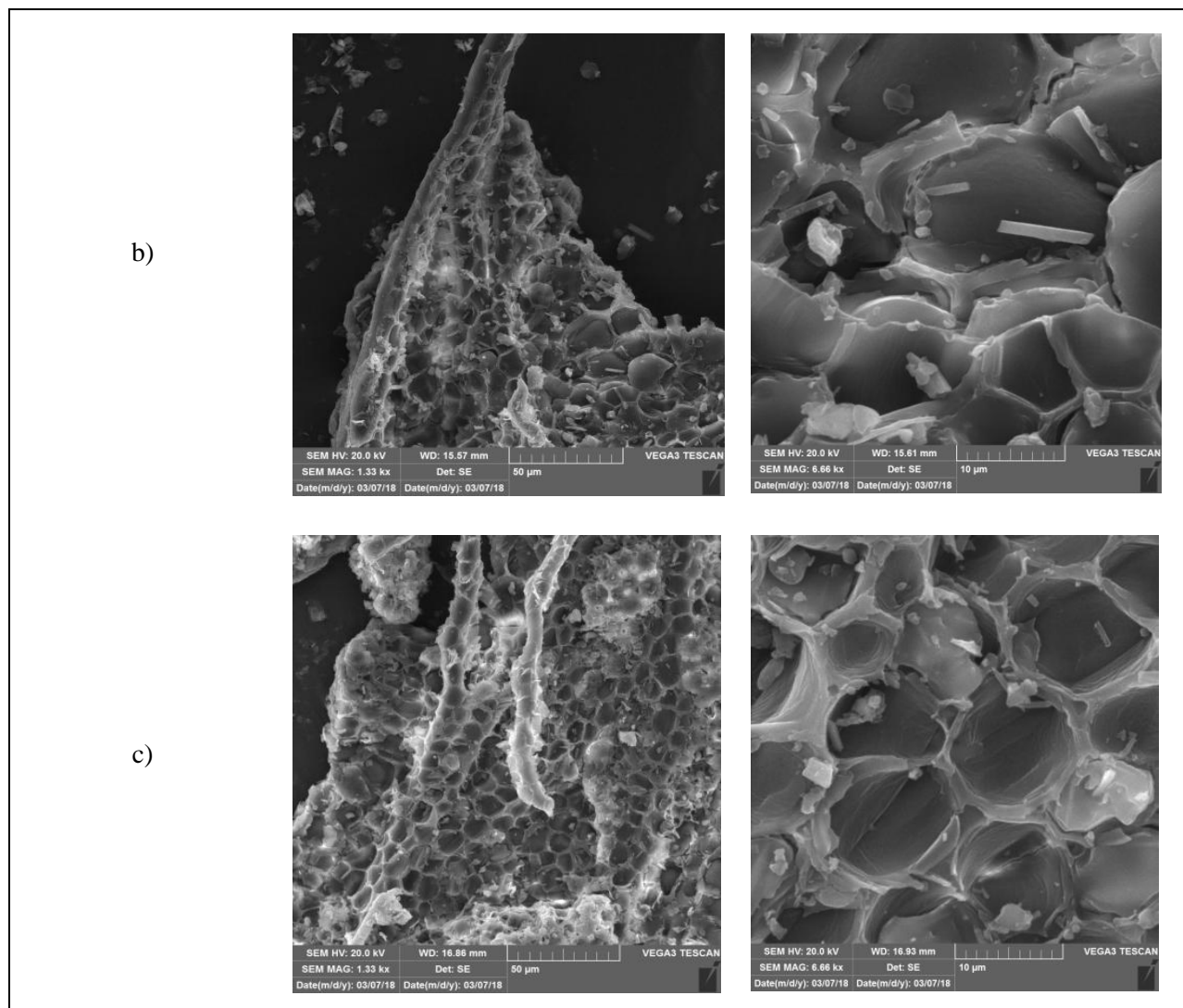


Slika 30. Fotografija različitih frakcija lišća: a) $<180 \mu\text{m}$, b) $<355 \mu\text{m}$, c) $<710 \mu\text{m}$



Slika 31. Raspodjela veličina pora pojedinih frakcija lišća masline





Slika 32. Mikrografije lišća frakcija a) <180 μm , b) <355 μm , c) <710 μm

4.1.2. SELEKTIVNO OTAPALO

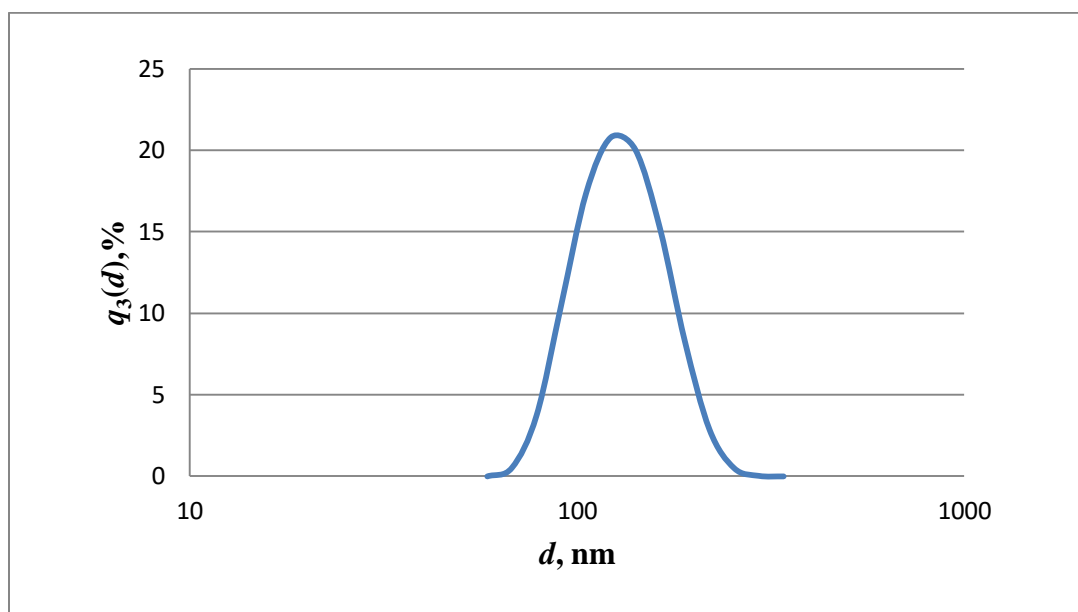
Tablica 5. Svojstva korištenih otapala pri 25°C

Otapalo	mas% vode	ρ , gcm^{-3}	η , mPas	n_D	pH	κ , $\mu\text{S cm}^{-1}$
Ma-Fru-Gly	30	1,295	0,0361	1,4426	0,92	366
Etanol	0	0,789	0,0017	1,3625	6,05	1,2

4.1.3. NANOSUSPENZIJA

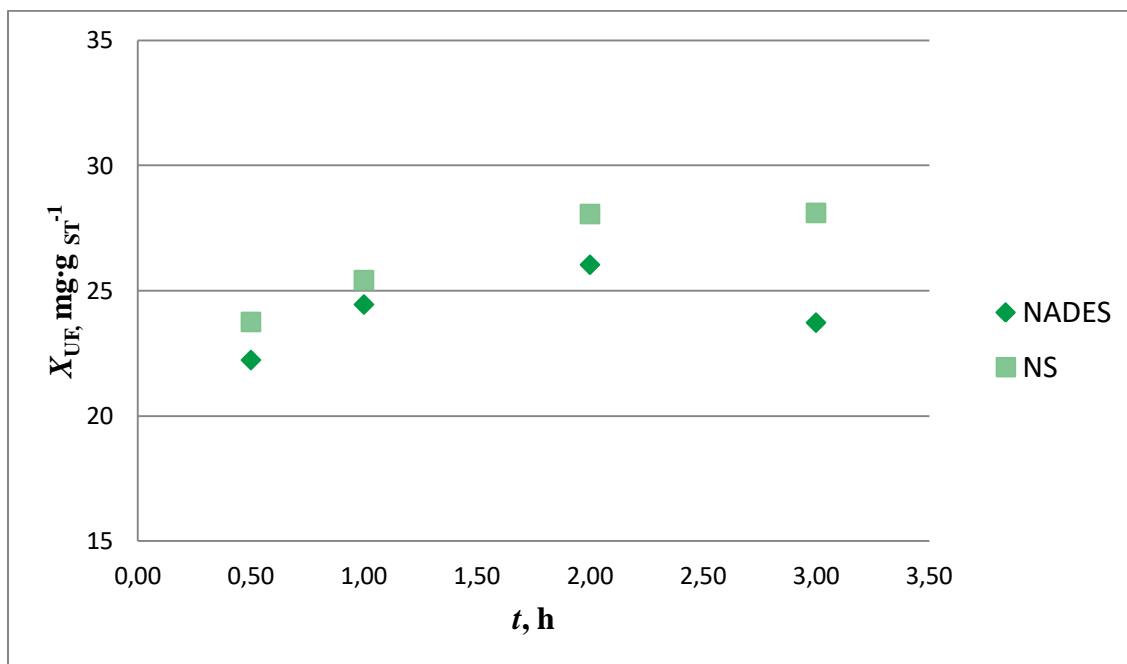
Tablica 6. Svojstva nanosuspenzije

Nanosuspenzija	mas% vode	ρ , g·cm ⁻³	η , mPas	pH	κ , $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
Ma-Fru-Gly + Al ₂ O ₃	30	1,299	0,0424	0,965	322

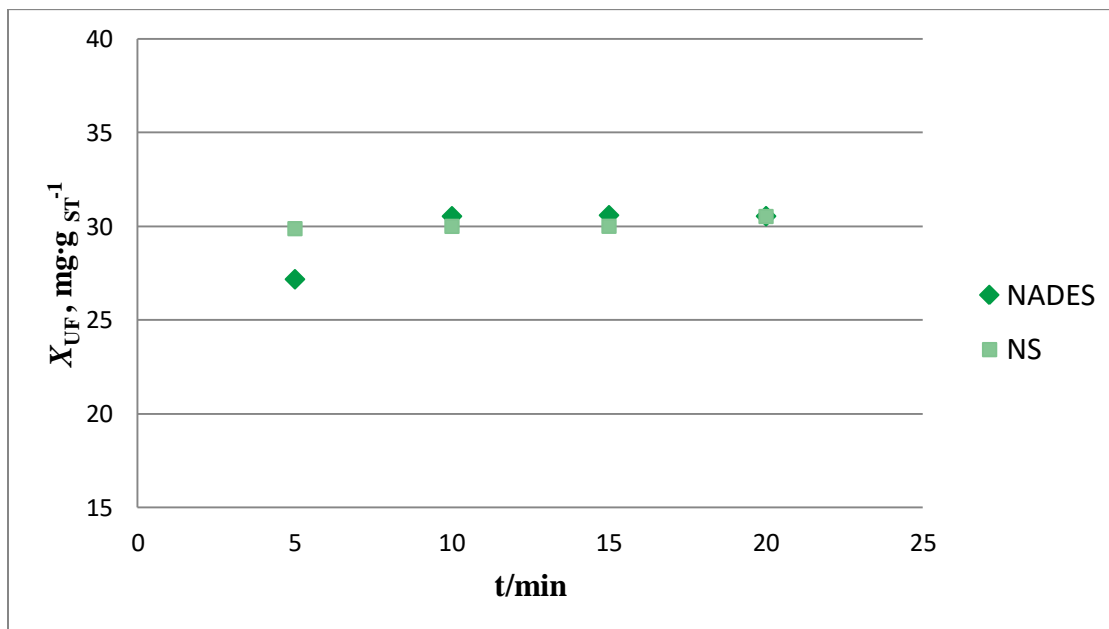


Slika 33. Raspodjela veličina čestica pripremljene nanosuspenzije (Ma-Fru-Gly + Al₂O₃)

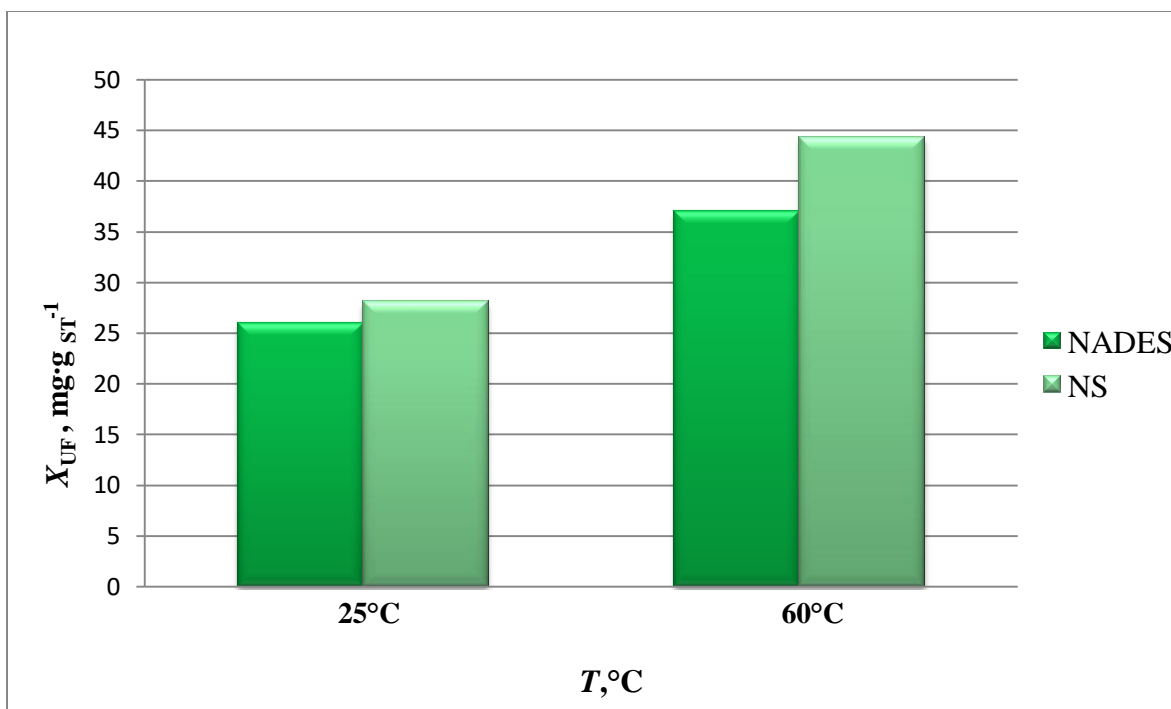
4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE



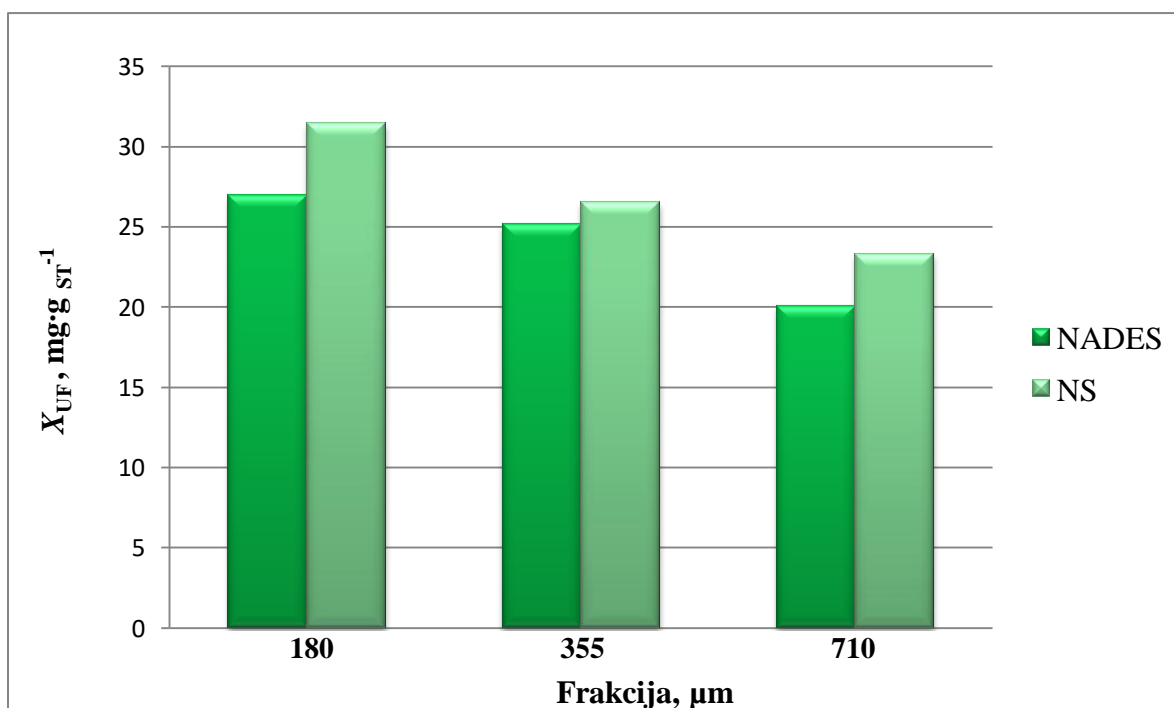
Slika 34. Određivanje optimalnog vremena ekstrakcije za magnetsko miješalo



Slika 35. Određivanje optimalnog vremena ekstrakcije za ultrazvučnu sondu

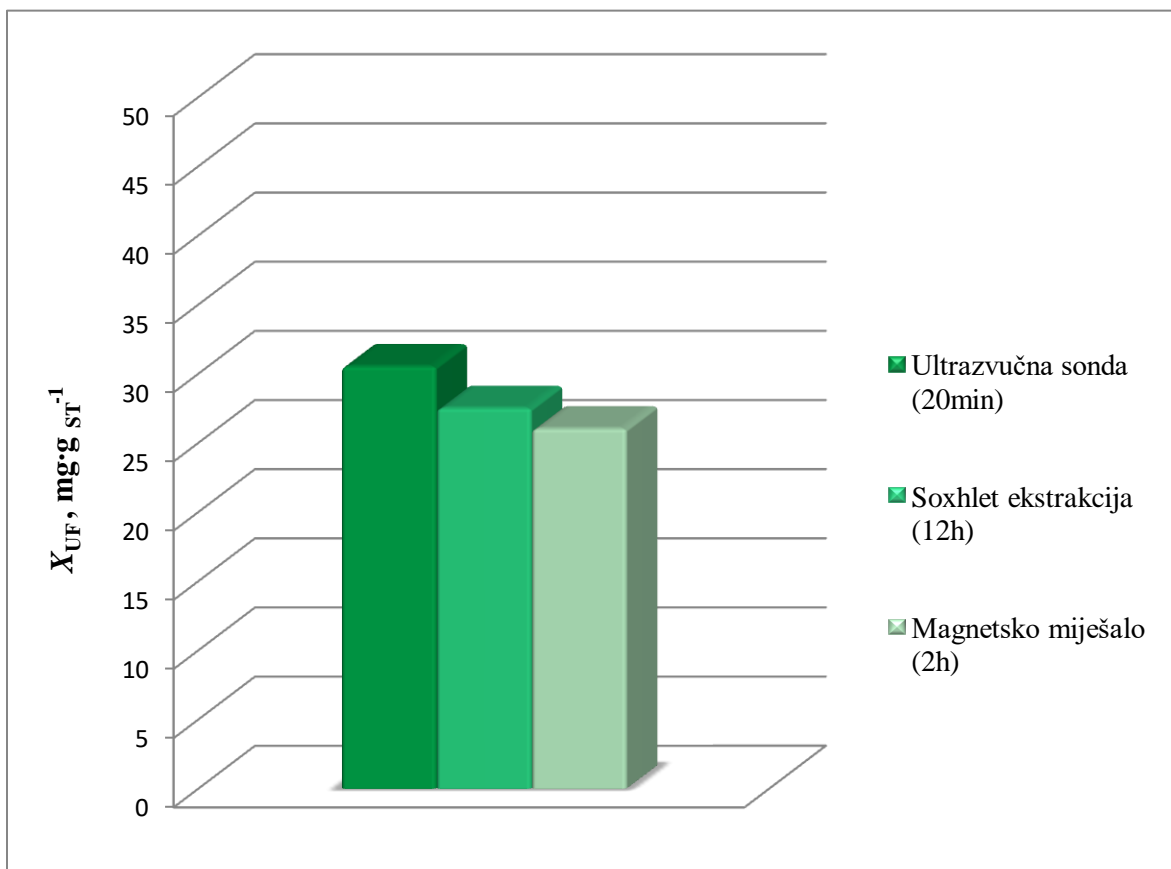


Slika 36. Usporedba ekstrakcije za NADES i NS magnetskim miješalom pri različitim temperaturama



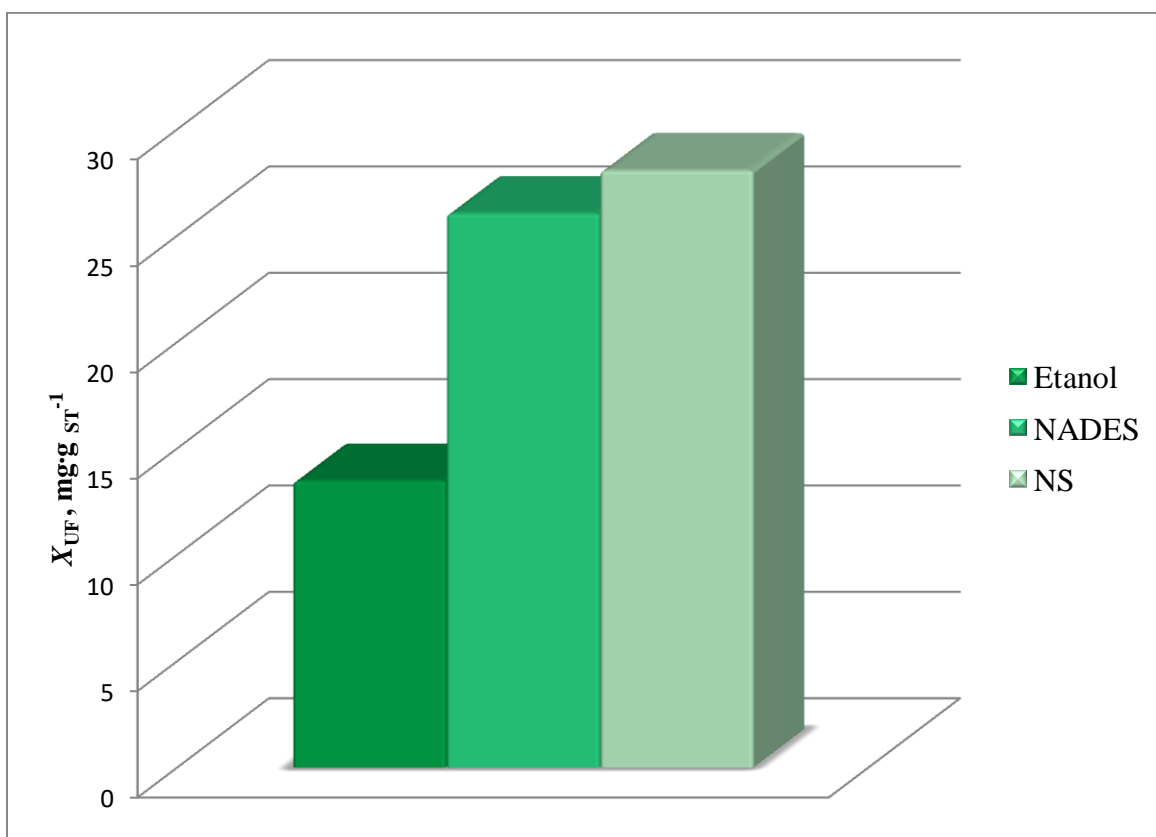
Slika 37. Usporedba ekstrakcije sa NADES i NS za različite frakcije lišća masline

4.3. NAČINI PROVEDBE EKSTRAKCIJE



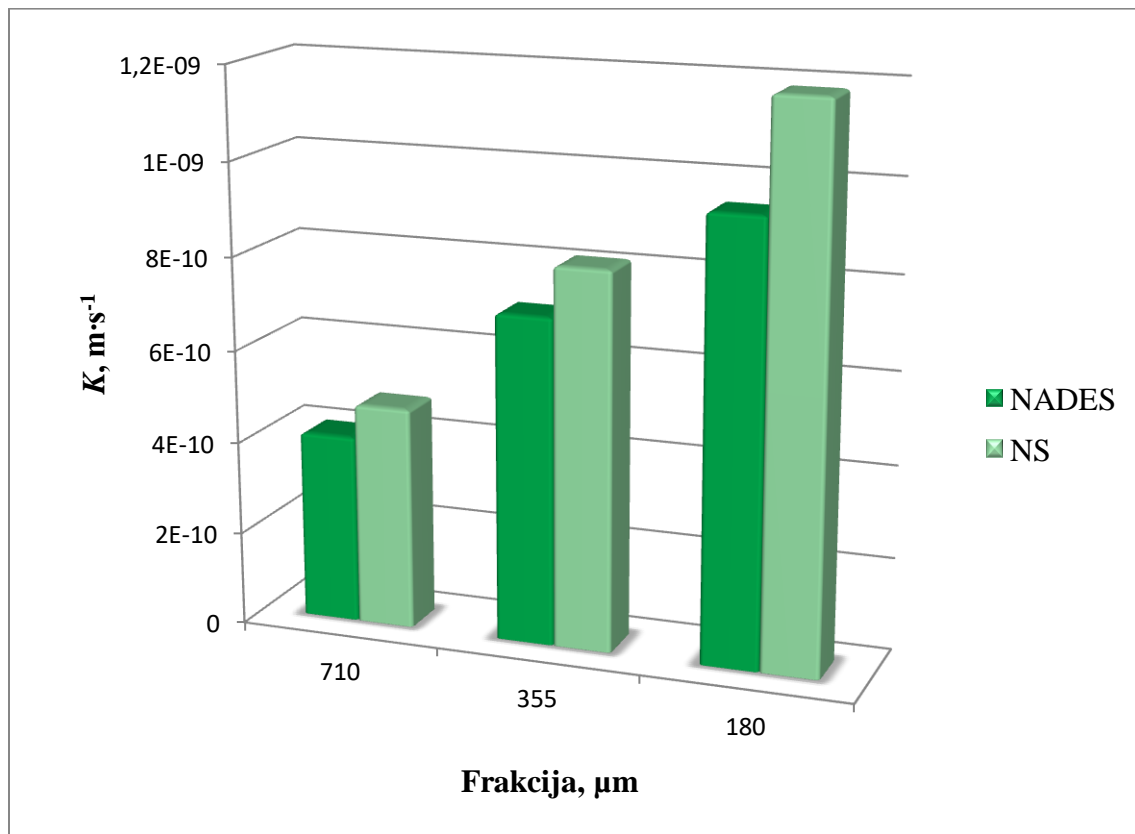
Slika 38. Usporedba utjecaja različitih načina provedbe ekstrakcije

4.4. USPOREDBA UČINKOVITOSTI OTAPALA



Slika 39. Usporedba učinkovitosti otapala za ekstrakciju magnetskim miješalom u trajanju 2h

4.5. KOEFICIJENT PRIJENOSA TVARI



Slika 40. Koeficijent prijenosa tvari za različite frakcije lišća

5. RASPRAVA

Zbog visokog sadržaja vrijednih antioksidansa, fenolnih spojeva, lišće masline tema je brojnih znanstvenih istraživanja. Zahvaljujući sposobnosti vezanja slobodnih radikala, fenolni spojevi imaju niz pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje.

Za izdvajanje fenolnih spojeva iz lišća masline, provedena je šaržna ekstrakcija čvrsto kapljevito. Kao selektivno otapalo odabrano je prirodno eutektičko otapalo (NADES), *Ma-Fru-Gly* (jabučna kiselina-fruktoza-glicerol) te nanosuspenzija (NS) pripremljena od navedenog NADESa i Al_2O_3 nanočestica. Radi usporedbe učinkovitosti NADESa i konvencionalnog otapala, provedena je i ekstrakcija sa etanolom.

Primarni korak prije provedbe procesa ekstrakcije, bio je priprema i karakterizacija lišća. Tijekom perioda od šest mjeseci lišće je sušeno na sobnoj temperaturi, te potom usitnjeno električnim mlinom. Usitnjavanje je provedeno kako bi se povećala kontaktna površina između lišća i otopine. Metodom laserske difrakcije određena je raspodjela veličina čestica usitnjenog lišća (Slika 29.) iz koje je vidljivo da se najveći udio čestica kreće u rasponu između 100 i 200 μm .

Prosijavanjem usitnjenog lišća kroz sita promjera očica 180, 355 i 710 μm , dobivene su tri frakcije različitih veličina čestica. Nakon prosijavanja, frakcije su vidljivo različite bojom te kod najsitnije frakcije nisu prisutna vlakna lista koja su žilava i teško se usitnjavaju. Metodom višeslojne adsorpcije plina (BET metoda) određena je za svaku od frakcija: srednja veličina pora, specifična veličina pora (BET) i raspodjela veličina pora (Tablica 1. i slika 31.). Najveća frakcija (710 μm) ima najveću specifičnu površinu pora (4,2084 m^2/g) i najmanju srednju veličinu pora (3,9061 nm), dok najsitnija frakcija (< 180 μm) ima najmanju specifičnu površinu pora (3,0791 m^2/g) i najveću srednju veličinu pora (5,7952 nm). Raspodjela veličina pora svih frakcija manja je od 200 nm.

Iz grafičkog prikaza raspodjele veličine pora (Slika 31.) pojedinih frakcija, vidljivo je da sve tri frakcije imaju visoke udjele čestica manjih od 3 nm i čestica većih od 100 nm. Čestice veličina od 5 do 100 nm zastupljene su u manjem udjelu.

Pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) istražena je i struktura različitih frakcija lišća. Iz dobivenih mikroskopija (Slika 32.) vidljiva je razlika u veličini pora najsitnije frakcije u odnosu na ostale dvije. Budući da se određene veličine pora ne razlikuju znatno za pojedinu frakciju, a prirodni materijal se razlikuje ovisno o pojedinom dijelu uzorka, nije moguće povući paralelu između rezultata dobivenih na elektronskom mikroskopu i uređaju Micrometrics ASAP 2000.

Osim karakterizacije lišća, provedena je i karakterizacija odabranih otapala. Prirodna eutektička otapala pripremljena sa šećerima visoke su gustoće i viskoznosti te kao takva mogu negativno utjecati na učinkovitost ekstrakcije. Kako bi se omogućilo bolje miješanje i povećala učinkovitost procesa, otapalo (NADES) je pripremljeno sa 30 mas% vode. U tablici 5. prikazana su određena fizikalna svojstva NADESa i etanola. Usporedbom njihovih svojstava primjećuje se veća viskoznost i gustoća NADESa. Nadalje, vrijednost pH pripremljenog otapala (NADES) je vrlo niska ($\text{pH} < 1$) u odnosu na etanol ($\text{pH} = 6.05$), što ukazuje na snažan utjecaj jakih vodikovih veza između HBD i HBA na kiselost NADESa uz prisustvo vode.

Nanosuspenzija je pripremljena raspršivanjem Al_2O_3 nanočestica u odabranom otapalu, *Ma-Fru-Gly* pomoću ultrazvučne sonde. Za utvrđivanje stabilnosti pripremljene NS i provjeru raspršenosti nanočestica u suspenziji, određena je raspodjela veličina čestica (Slika 33.) iz koje je vidljivo da se veličina čestica kreće oko 100 nm čime smo potvrdili dobru raspršenost nanočestica u NADESu te stabilnost pripremljene NS. Osim određene raspodjele veličine čestica u suspenziji, potvrda stabilnosti određena je i vizualnom metodom čime je potvrđena stabilnost kroz duži vremenski period (dulje od mjesec dana). U tablici 6. navedena su određena fizikalna svojstva NS pri sobnoj temperaturi. Usporedbom s fizikalnim svojstvima NADES-a može se uočiti da se dodatkom nanočestica u malom postoku (0,3 vol%) znatnije mijenja samo dinamička viskoznost. Očito da dodatak nanočestica, bez obzira na izrazito nisku koncentraciju, doprinosi povećanju koeficijenta unutarnjeg trenja što definira viskoznost kapljevine/suspenzije.

Nakon provedene karakterizacije sustava, određeni su optimalni uvjeti provođenja ekstrakcije. Za odabrane načine miješanja (magnetsko miješalo i ultrazvučna sonda) određeno je minimalno potrebno vrijeme miješanja za dobivanje maksimalne koncentracije ukupnih fenola (UF) te ispitan utjecaj temperature i veličine čestica na učinkovitost ekstrakcije.

Provedbom ekstrakcije pomoću magnetskog miješala (Slika 34.), koncentracija ukupno izluženih fenola postepeno je rasla te je dosegla maksimum nakon 2 sata. Obzirom da nakon drugog sata, provedenom analizom nije utvrđena promjena koncentracije UF, zaključak je da je 2 sata vrijeme potrebno za postizanje stacionarnih uvjeta procesa ekstrakcije za magnetsko miješalo.

Korištenjem ultrazvučne sonde za ekstrakciju, koncentracija ekstrahiranih fenola se konstantno povećavala, a maksimalna koncentracija UF postignuta je nakon 20 min. Ultrazvučno miješanje je veoma intenzivan način miješanja tijekom kojeg ultrazvučni valovi (zbog efekta kavitacije) oštećuju stanične stijenke što omogućuje bolje prodiranje otapala u materijal. Time se povećava prijenos tvari, ubrzava se ekstrakcija, a samim time raste i učinkovitost procesa. Međutim, djelovanjem ultrazvuka u gustom i viskoznom mediju, dolazi do značajnog zagrijavanja medija, te je suspenziju bilo potrebno hladiti tijekom provedbe ekstrakcije kako temperatura ne bi prelazila 60°C. Povećanje temperature uzrokuje i stalnu promjenu djelotvornosti procesa.

Kod ekstrakcija koje se odvijaju pri višim temperaturama dolazi do ubrzanja procesa ekstrakcije zbog povećanja brzine otapanja čvrste komponente i brže difuzije komponente u otapalo te se smanjuje gustoća i viskoznost kapljevine što doprinosi boljem miješanju i poboljšanju učinkovitosti ekstrakcije. Ekstrakcijom provedenom pri višoj temperaturi (60°C) izdvojena je veća koncentracija ukupnih fenola nego kod ekstrakcija provedenih pri sobnoj temperaturi (Slika 36.) te je time potvrđeno da se povišenjem temperature povećava djelotvornost ekstrakcije. Ipak, temperature ne smiju biti previsoke (ne više od 100°C za biomaterijale) kako ne bi došlo do degradacije bioaktivnih fenola.

Budući da je brzina prijenosa tvari proporcionalna površini čvrste komponente, što su čestice manje i što je njihova specifična veličina pora veća, postiže se veća učinkovitost ekstrakcije. Rezultati ekstrakcije sa različitim frakcijama lišća masline prikazani su na slici 37. Očekivano, najveće koncentracije UF ostvarene su ekstrakcijom sa frakcijom <180 µm, a najmanje sa frakcijom 710 µm. Ekstrakcijama sa NS kod svih frakcija ostvareno je poboljšanje, osobito kod najsitnije frakcije. Dobiveni rezultati potvrđuju da je kod manjih čestica prijenos tvari iz krutine u otopinu brži zbog kraćeg difuzijskog puta, što dovodi do povećanja koncentracijskog gradijenta i više koncentracije izluženih ukupnih fenola.

Primjenom nanosuspenzije za ekstrakciju ostvarena su višestruka poboljšanja u odnosu na NADES za sve usporedno provedene eksperimente (Slike 34.-37.). Pri istim uvjetima provedbe procesa (način miješanja, vrijeme provedbe procesa, temperatura, različite frakcije) korištenjem nanosuspenzije dobivene su veće koncentracije UF.

Kako bi usporedili učinkovitost ekstrakcije s NADES-om, provedena je Soxhlet ekstrakcija sa etanolom. Ekstrakcija Soxhlet metodom traje do trenutka prestanka promjene boje korištenog otapala. Nakon prestanka obojenja otapala smatra se da je ekstrakcija završena. Na slici 38. prikazani su rezultati ekstrakcije ultrazvučnom sondom, magnetskim miješalom i Soxhlet ekstrakcije. Kao najučinkovitija se pokazala šaržna ekstrakcija ultrazvučnom sondom kojom se za 20 min uspjela izdvojiti veća koncentracija UF, nego Soxhlet ekstrakcijom nakon 12 h. Ovo je dokaz da se UZV ekstrakcijom dodatno djeluje na unutarnju strukturu materijala što rezultira povećanjem izdvojenih fenola.

Usporedba učinkovitosti sekundarnih otapala (etanol, NADES, NS) prikazana je sa slici 39. Ekstrakcijom magnetskim miješalom tijekom 2 sata najveća koncentracija UF izlužena je korištenjem nanosuspenzije. Etanolom je dobivena najmanja koncentracija fenola, čime se NADES pokazao najučinkovitijim za proces ekstrakcije fenolnih spojeva iz lišća masline.

Na slici 40. uspoređeni su određeni koeficijenti prijenosa tvari u NADES-u i nanosuspenziji za različite frakcije lišća. Vidljivo je da se koeficijent prijenosa povećava u nanosuspenzijama što potvrđuje teoriju poboljšanja prijenosa tvari. Naime iz odnosa koeficijenta prijenosa tvari i difuzijskog koeficijenta (jednadžba 2) vidljivo je da se smanjenjem debljine graničnog sloja povećava koeficijent prijenosa tvari.

$$K = \frac{D}{\delta} \quad (2)$$

Naime, Brownovo gibanje u nanosuspenziji narušava strukturu graničnog sloja koji se formira uz čestice usitnjenog lišća, a koji predstavlja najveći otpor prijenosu tvari u otapalo.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu istraživala se mogućnost primjene niskotemperaturnog prirodnog eutektičkog otapala za proces ekstrakcije fenolnih spojeva iz lista masline te mogućnost poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije upotrebom nanočestica raspršenih u navedenom otapalu, odnosno primjenom nanosuspenzije.

Na temelju rezultata dobivenih eksperimentima može se zaključiti:

- Lišće masline usitnjeno električnim mlinom i prosijano sitom promjera očica 180 μm dalo je najbolje rezultate.
- Određivanjem optimalnog vremena trajanja procesa, ekstrakcija ultrazvučnom sondom pokazala se kao najučinkovitija i najbrža metoda ekstrakcije.
- Provođenjem ekstrakcije na višoj temperaturi (60°C) dobivena je najveća koncentracija ukupnih fenolnih spojeva.
- Primjenom sintetiziranog prirodnog eutektičkog otapala (*Ma-Fru-Gly*) ostvarena je viša učinkovitost procesa ekstrakcije fenolnih spojeva iz lišća masline od konvencionalnog otapala (etanol).
- Primjenom stabilne nanosuspenzije, pripremljene od NADES i Al_2O_3 nanočestica, postignuto je poboljšanje procesa ekstrakcije za sve provedene eksperimente čime je potvrđen pozitivan učinak nanočestica na prijenos tvari između nanosuspenzije i lišća masline.

7. POPIS SIMBOLA

Simboli

<i>A</i>	specifična površina čestica, $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$
<i>c*</i>	ravnotežna koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
<i>c</i>	eksperimentalno određena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$
<i>d</i>	promjer čestica, nm
<i>D</i>	difuzijski koeficijent
κ	električna vodljivost, $\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$
<i>K</i>	koeficijent prijenosa tvari, $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
<i>M</i>	molarna masa, $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
<i>n_D</i>	indeks loma, -
<i>pH</i>	mjera kiselosti, -
<i>q₃</i>	diferencijalna funkcija raspodjele
<i>T</i>	temperatura, °C
<i>t</i>	vrijeme, s
<i>X</i>	maseni odnos, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Indeksi

GK	galna kiselina
T	talište
UF	ukupni fenoli
V	vrelište

Skraćenice

Abs	apsorbancija
BET	Brunaver-Emmett-Teller metoda
DES	niskotemperaturno eutektičko otapalo (<i>eng. Deep Eutectic Solvent</i>)
FC	Folin - Ciocalteu
HBA	akceptor vodikove veze
HBD	donor vodikove veze
NADES	niskotemperaturno prirodno eutektičko otapalo (<i>eng. Natural Deep Eutectic Solvent</i>)
NS	nanosuspenzija
ST	suha tvar
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (<i>eng. Scanning Electron Microscope</i>)

Grčka slova

δ	debljina graničnog sloja
γ	masena koncentracija, $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
η	dinamička viskoznost, mPas
ρ	gustoća, $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$

8. LITERATURA

1. Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2015) Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res. Int.* **77**, 92-108.
2. Rahele G., Farooq A., Khalid M. Alkharfy, Anwarful-Hassan G. and Nazamid Saari, Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea*,L.)-A reiew, *International Journal of Molecular Sciences*, 2012.
3. <https://www.coolinarika.com/namirnica/masline/> (pristup 20.04.2017.)
4. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, mag. ing. cheming., Mia Grga, Skripta za vježbe iz kolegija "Prerada maslina", Sveučilište u Splitu, 2015.
5. <http://www.maslinovo.hr/procitaj/proizvodnja-maslinovog-ulja-meljavanja-ekstrakcija-i-bistrenje/36/> (pristup 26.10.2016.)
6. Mohammad N. Alhamad, Taha M. Rababah, Muhammad Al-u'datt, Khalil Ereifej, Ranya Esoh, Hao Feng, Wade Yang, *The physicochemical properties, total phenolic, antioxidant activities, and phenolic profile of fermented olive cake*, King Saud University, 2012.
7. <https://www.plantea.com.hr/maslina/> (pristup 18.03.2018.)
8. Stavros Lalas, Vasilios Athanasiadis, Olga Gortzi, Maria Bounitsi, Ioannis Giovanoudis, John Tsaknis, Filippos Bogiatzis, Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves, *Food Chemistry*, 2011
9. Leila Abaza, Amani Taamalli, Houda Nsir, Mokhtar Zarrouk, (2015) Olive tree (*Olea europaea* L.) Leaves:Importance and advances in the analysis of phenolic compounds, *Antioxidants* 4 : 682-698
10. Zafer Erbay, Filiz Icier, The importance and potential uses of olive leaves, *Food reviews international*, 2010.
11. Muhammad H. Alu'datt, Inteaz Alli, Khalil Ereifej, Mohammad Alhamad, Abdel Rahman Al-Tawaha, Taha Rababah, Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake, *Food Chemistry*, 2010

12. Omar M. M. Sabry, Review:Beneficial health effects of olive leaves extracts, *Journal of Natural Sciences Research*, 2014
13. Xie, P., Huang, L., Zhang, C., Zhang, Y. (2015) Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure-activity relationships. *J. Funct. Foods*, 16, 460-471.
14. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Fenoli> (pristup 05.11.2016.)
15. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=19233>, Hrvatski leksikon, (pristup 20.03.018.)
16. Suzana Berend i Zorana Grabarić, Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 2008 ; 59:205-212
17. Ph.D. Laura Bravo, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, 1998, *Nutrition Reviews*, Vol.56, No. 11, 317-333
18. Marian Naczk, Fereidoon Shahidi, Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1523-1542
19. Marian Naczk, Fereidoon Shahidi, Extraction and analysis of phenolics in food,2004, *Journal of Chromatography A*, 1054:95-111
20. Sytar Oksana, Brestic Marian, Rai Mahendra and Shao Hong Bo, Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetic production, 2012, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(13):2526-2539
21. Fernando Gomez-Pinilla, Trang T.J. Nguyen, Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders, 2012, *Nutritional Neuroscience.*; 15(3):127-133
22. https://sh.wikipedia.org/wiki/Galna_kiselina (pristup 29.03.2018.)
23. R. Japón-Luján, M.D. Luque de Castro, Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, 2006, *Journal of Chromatography A*, 1136; 185-191
24. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol.* 186,1–85.
25. Singh, Nimmi., Niyogi, R. G., Mishra, D., Sharma, M., Singh, D. (2013) Antioxidants in Oral Health and Diseases: Future Prospects. *J. Dental Med. Sci.* 10(3), 36-40.

26. Prior, R. L. , Xu, X. (2013) Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *Am. J. Biomed. Sci.* 5(2), 126-139.
27. Antonija Jakšetić, *Optimiranje procesa kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz ječma metodom odzivnih površina*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015.
28. Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Terezinha Zani, V., de Souza, D., Morelo Dal Bosco, S. (2015) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr. Hosp.* **31**, 1427-1433.
29. N. Talhaoui, A. G.-Caravaca, L. León, R. Rosa, A.S.-Carretero, A. F.-Gutiérrez, Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves, *LWT-Food Science and Technology* 58, 2014, pages 28-34
30. Khan, Y., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A., Kumar, V. (2007) PHCOG REV.: Plant review *Olea europaea*: a phyto-pharmacological review. *Phcog Rev.* **1**, 112-116.
31. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=17468> (pristup 04.04.2018.)
32. Alcazar-Alay SC, Cardenas-Toro FP, Santos DT, Meireles MAA: Study of an Extraction Process as the Pretreatment Step for Sugar Production from Acid Hydrolysis. *Food and Public Health* 5(2): 47-55, 2015
33. Prof. dr. sc. Aleksandra Sander, nastavni materijali kolegija, Toplinsko procesno inženjerstvo, 2015
34. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=28292> (pristup 05.04.2018.)
35. Darijo Šibalić, *Utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2016.
36. Dijana Drljača, Marina Mrđa, *Ultrazvučna ekstrakcija epikatehina i procijanidina B2 iz čokolade*, Rad za Rektorovu nagradu, Zagreb, 2009.
37. Maja Dent, Verica Dragović-Uzelac, Marija Penić, Mladen Brnčić, Tomislav Bosiljkov i Branka Levaj, The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts, 2013, *Food Technol. Biotechnol.* 51(1) 84-91

38. Chalermchat Y., Fincan M., Dejmek P., Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering* 64:229-236, 2004.
39. Izv. prof. dr. sc. Gordana Matijašić, Jedinične operacije u ekoinženjerstvu, Skripta-2.dio, Mehaničke operacije, 2016.
40. 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)
41. Skulcova Andrea, Michal Jablonsky, Filip Kalman, Ales Haz, Properties of deep eutectic solvents, Conference paper, 2016
42. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Eutektik> (pristup 02.07.2018.)
43. Emma L. Smith, Andrew P. Abbott, Karl S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chemical Reviews*, 114, 11060-11082, 2014
44. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Kolin> (pristup 15.05.2018.)
45. Kristian Bakić, Maja Kovačić, *Primjena nanočestica u eutektičkim smjesama radi poboljšanja prijenosa tvari u postupku ekstrakcije*, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
46. Katarzyna Owczarek, Natalia Szczepanska, Justyna Plotka-Wasyłka, Malgorzata Rutkowska, Olena Shyshchak, Michael Bratychak, Jacek Namiesnik, Natural deep eutectic solvents in extraction process, *Chemistry & Chemical Technology*, Vol. 10, No. 4, 2016
47. 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.
48. J. Ramsden, *Essentials of Nanotechnology*, ISBN 978-87-7681-418-2, 2009.
49. R.Taylor, S.Coulombe, T. Otanicar, P. Phelan, A. Gunawan, W. Lv, G. Rosengarten, R. Prasher, H. Tyagi, *Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids*, *Journal of applied physics* 113, 011301, 2013
50. S. K. Das, S. U. S. Choi, H. E. Patel, *Heat transfer in nanofluids – A review. vol. 27*, str 10., 2006.

51. Sayantan Mukherjee, S. Paria, *Preparation and stability of nanofluids – a review*, IOSR Journal of mechanical and civil engineering, vol 9, issue 2, PP 63-69, 2013
52. 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

Nataša Marolt [REDACTED] Nakon osnovne škole upisuje Petu gimnaziju u Zagrebu koju završava 2008. godine te iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu.

Na trećoj godini preddiplomskog studija, vezano uz temu svog završnog rada "Vođenje šaržnih procesa" pod mentorstvom prof. dr. sc. Nenada Bolfa, odrađuje stručnu praksu u sektoru za istraživanje i razvoj farmaceutske tvrtke Pliva d.o.o.

Završetkom preddiplomskog studija Kemijsko inženjerstvo, 2015. godine stječe titulu Sveučilišne prvostupnice (*baccalauree*) inženjerke kemijskog inženjerstva.

Dobitnica je dekanove nagrade 2017. godine kao koautor znanstvenog rada "Primjena zelenih otapala u poboljšanju ekstrakcije fenolnih spojeva", izrađenog pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Prlić Kardum.

Sudjelovala je 2018. godine na XII. susretu mladih kemijskih inženjera kao koautor sa posterskim priopćenjem znanstvenog rada "Izdvajanje biološki aktivnih tvari iz otpada nastalog proizvodnjom maslinovog ulja primjenom prirodnih eutektičkih otapala".