

Ispitivanje stabilnosti polifenola u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu

Komljen, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:149:177549>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Komljen

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Komljen

ISPITIVANJE STABILNOSTI POLIFENOLA U
NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum,
Prof. dr. sc. Aleksandra Sander,
Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, srpanj 2019.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum, na stručnom vodstvu, razumijevanju, savjetima i stečenom znanju prilikom izrade ovoga rada.

Također, veliko hvala Anamariji Mitar, mag. ing. cheming. na stručnom vodstvu, savjetima i ugodnoj atmosferi prilikom provedbe eksperimentalnih istraživanja.

Posebno veliko hvala mojoj obitelji i Dominiku na bezuvjetnoj podršci tokom studija.

SAŽETAK

Proizvodnjom maslinova ulja nastaje velika količina otpada što predstavlja veliki problem u mediteranskim zemljama koji su najveći proizvođač maslinovog ulja. Osim prijetnje okolišu, otpad koji nastaje u velikim količinama (maslinova komina, lišće te otpadna voda) nakon proizvodnje, vrijedni je izvor antioksidativnih polifenola. Iako je komina masline štetna jer inhibira rasta biljaka, ona u sebi nakon proizvodnje maslinovog ulja, zadržava čak 98 % polifenola koji se izdvojeni mogu koristiti u farmaceutskoj ili kozmetičkoj industriji. Za izdvajanje polifenola se sve češće pojavljuje upotreba prirodnih eutektičkih otapala koje karakterizira netoksičnost, biorazgradivost, nezapaljivost te niska cijena.

U ovom radu koristi se prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo (NADES) pripravljeno od tri komponente: jabučne kiseline, fruktoze i glicerola (MaFruGly) s različitim udjelima vode koji omogućavaju uspješnu ekstrakciju fenola. Nakon provedene ekstrakcije praćena je stabilnost izdvojenih polifenola.

Dobiveni rezultati pokazuju da je obzirom na smanjenje viskoznosti poželjno dodati veću količinu vode u NADES. Međutim dodatkom više od 50 mas % vode dolazi do degradacije NADES-a, ali i smanjene stabilnosti ekstrakta. Također, veće količine vode pogoduju nastanku gljiva. Dobivanje stabilnih ekstrakata (konstantne koncentracije polifenola i dobre mikrobiološke stabilnosti) otvara mogućnost direktne primjene ekstrakata u kozmetici.

Ključne riječi: izluživanje, komina masline, prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo, polifenoli, stabilnost.

SUMMARY

The production of olive oils results in a large amount of waste, which is a major problem in the Mediterranean countries that are the largest producers of olive oil. In addition to the threat to the environment, waste generated in large quantities (olive pomace, leaves and waste water) after production, are valuable sources of antioxidant polyphenols. Although olive pomace is harmful because it inhibits plant growth, it retains up to 98 % of polyphenols that can be used in the pharmaceutical or cosmetic industry. For the extraction of polyphenols, the use of natural eutectic solvents is increasingly encountered, characterized by non-toxicity, biodegradability, nonflammability and low price.

In this paper a low temperature eutectic solvent is prepared from three components: malic acid, fructose and glycerol (MaFruGly) with different water contents that allow successful extraction of phenols. After the extraction was carried out, the stability of the isolated polyphenols was followed.

The results obtained show that, in view of the decrease in viscosity, it is desirable to add a larger amount of water to NADES. However, with the addition of more than 50 % of water, NADES degradation occurs, but also reduces stability of the extract. Also, larger amounts of water favor the emergence of fungus in the samples. Obtaining stable extracts (constant concentration of polyphenols and good microbiological stability) opens the possibility of direct application of extracts in cosmetics.

Key words: leaching, olive pomace, natural deep eutectic solvent, polyphenols, stability.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Maslina.....	2
2.1.1. Proizvodnja maslinovog ulja	2
2.1.2. Ekološki problem	4
2.2. Fenoli.....	5
2.2.1. Svojstva i upotreba polifenola.....	6
2.2.2. Fenolni spojevi u komini masline.....	8
2.3. Ekstrakcija.....	9
2.3.1. Ekstrakcija kruto-kapljevito.....	11
2.4. Eutektička otapala	14
2.4.1. Prirodna eutektička otapala.....	15
2.4.2. Svojstva i upotreba prirodnih eutektičkih otapala	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1. Priprema komine masline	19
3.1.1. Raspodjela veličina čestica komine	20
3.1.2. Oduljivanje pripremljene komine	21
3.2. Prirodna eutektička otapala.....	22
3.2.1. Priprema prirodnog eutektičkog otapala.....	22
3.2.2. Karakterizacija prirodnih eutektičkih otapala	23
3.3. Ekstrakcija.....	23
3.3.1. Zasićenost NADES-a kominom.....	24
3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenola	25
3.3.3. Mikrobiološko ispitivanje.....	27
3.3.4. Ravnotežna koncentracija fenola	28
4. REZULTATI	29
4.1. Raspodjela veličina čestica	29
4.2. Oduljivanje pripremljene komine	30
4.3. Karakterizacija prirodnih eutektičkih otapala	31
4.4. Zasićenost NADES-a kominom.....	32
4.5. Stabilnost fenola	33

4.6. Mikrobiološko ispitivanje.....	36
4.7. Ravnotežna koncentracija polifenola	37
5. RASPRAVA.....	38
6. ZAKLJUČAK	42
7. POPIS SIMBOLA.....	43
8. LITERATURA.....	45
ŽIVOTOPIS	48

1. UVOD

Proizvodnja maslinovog ulja smatra se jednim od najvećih sektora poljoprivredno-prehrambenog poslovanja na području Mediterana. Osim značajnog utjecaja na gospodarstva zemalja južne Europe, sjeverne Afrike i Bliskog istoka, proizvodnja maslinovog ulja također uključuje značajna socijalna i ekološka pitanja. Međutim, unatoč važnosti proizvodnje maslinovog ulja, otpad koji nastaje može imati negativan utjecaj na okoliš. Naime, proizvodnja maslinovog ulja uključuje stvaranje otpadnih voda i komine koje sadrže fitotoksične tvari koje je prije otpuštanja u okoliš potrebno obraditi te pravilno sanirati. Jedna od toksičnih tvari za okoliš, no potencijalno korisna tvar za daljnju upotrebu u različitim industrijama su polifenoli koji se nalaze u komini masline. Osim svojih antioksidativnih svojstava, fenolni spojevi imaju bitnu ulogu u prevenciji raznih bolesti te imaju antikancerogena i protuupalna svojstva. Zbog toga se brojna istraživanja okreću prema izdvajanju polifenola iz komine masline, a jedan od najučinkovitijih procesa je upravo ekstrakcija.

Kako se ne bi dodatno različitim procesima naštetilo okolišu traže se zamjene za konvencionalna otapala koja bi zadovoljavala ekonomske i ekološke uvjete. Tu do izražaja dolaze prirodna eutektička otapala koja pokazuju brojne prednosti u odnosu na konvencionalna otapala koja su trenutno u fokusu brojnih istraživanja i koriste se kao selektivna otapla u procesu ekstrakcije, osobito prirodnih komponenti. Naime, prirodna eutektička otapala su nehlapiva, netoksična, učinkovita, biorazgradiva su, imaju nisku cijenu i jednostavno se pripremaju. Osim navedenih prednosti koja u svakom pogledu uspješno zamjenjuju dosad korištena otapala, prirodna eutektička otapala eliminiraju potrebu za pročišćavanjem konačnog proizvoda zbog čega se mogu koristiti u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Maslina

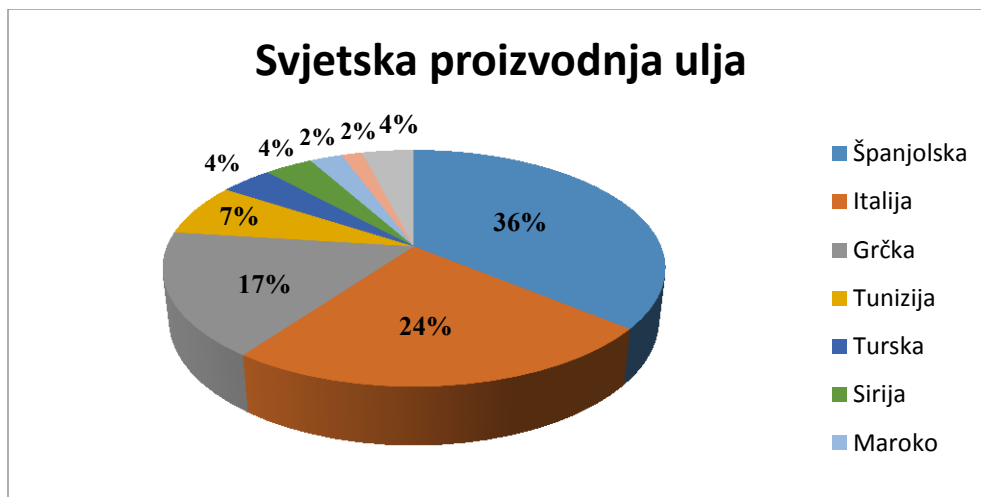
Maslina (uljika, lat. *Olea europaea*) je ime za zimzelenu biljku koja potječe iz istoimene porodice, porodice maslina (Oleaceae). Maslina razvija stablo, koje je nepravilno, kvrgavo i razgranato (slika 1.), s ovalnim listovima tamnozeleno boje. Njezino drvo je izuzetno kvalitetno, a može biti staro preko tisuću godina. Kada je u cvatu, maslina razvija bijele cvijetove u grozdovima, dok joj je plod tamnozeleno do crne boje ovalnog oblika. [1]



Slika 1. Stablo masline [1]

2.1.1. Proizvodnja maslinovog ulja

Plod masline bogat je uljem koje ima veliku važnost na području mediterana prvenstveno u mediteranskoj kuhinji, a vodeći proizvođač maslinovog ulja je Španjolska nakon koje sa nešto manje postotaka slijede Italija i Grčka (slika 2.). [1,2] Ulje se, osim u prehrani, koristi i u medicinske svrhe, kozmetičkoj industriji, a u prošlosti se koristilo i za svete obrede, za masažu kraljeva te kao gorivo za svjetiljke i novac. [3]



Slika 2. Svjetska proizvodnja ulja [1]

Maslinovo se ulje proizvodi mljevenjem maslina i ekstrakcijom ulja mehaničkim ili kemijskim sredstvima. Zelene masline obično daju ulje koje je gorko, dok prezrele masline mogu proizvoditi užeglo ulje, zbog čega se za dobro ekstra djevičansko maslinovo ulje vodi računa o tome da su masline savršeno zrele. [4]

Postupak dobivanja maslinova ulja započinje prozračivanjem, gdje se plod odvaja od lišća i grančica te se pere vodom zbog otklanjanja nečistoća. Sljedeći korak je mljevenje maslina u tijesto pomoću velikih mlinskih kamena (tradicionalna metoda) ili čeličnih bubnjeva (moderna metoda) nakon čega se dobivena maslinova pasta, nanosena na diskove, stavlja u prešu gdje se pomoću tlaka odvaja kapljevina. Zbog prisutstva značajne količine vode slijedi proces centrifugiranja u kojem se dobiva ulje i voda. Ulje proizvedeno samo mehaničkim sredstvima kao što je opisano naziva se djevičansko ulje, a ono pod nazivom ekstra djevičansko maslinovo ulje zadovoljava i specifične visoke kriterije. Maslinovo ulje ne smije sadržavati značajne tragove biljne vode jer time ubrzava proces organske degeneracije mikroorganizama pa se ponekad proizvedeno ulje filtrira kako bi se uklonile preostale čvrste čestice koje mogu smanjiti vijek trajanja proizvoda. [4]



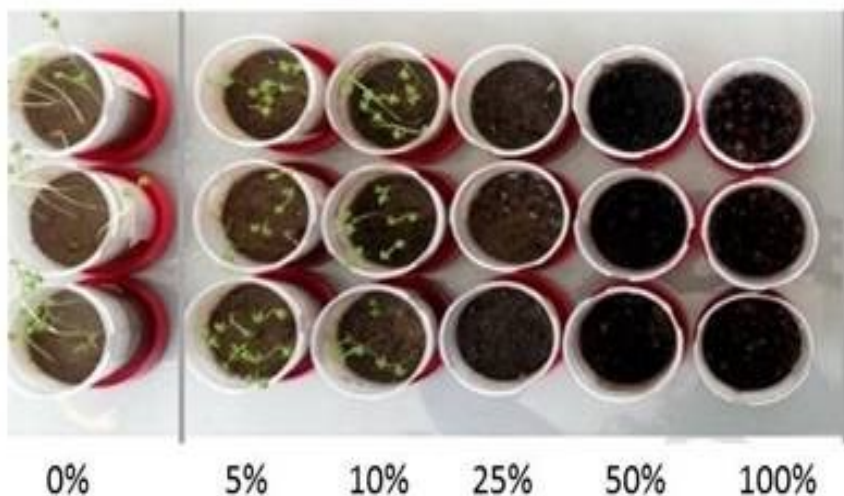
Slika 3. Maslinovo ulje [5]

2.1.2. Ekološki problem

Sve veći utjecaji na okoliš bilježe se tokom proizvodnje maslinovog ulja. Sam uzgoj maslina, upotreba strojeva i alata te korištenje kemijskih proizvoda (pesticida, gnojiva) predstavlja značajno opterećenje za okoliš jer može doći do onečišćenja podzemnih voda što uzrokuje eroziju tla. [5] Činjenica da je za proizvodnju jedne litre ekstra djevičanskog maslinovog ulja potrebno 3900 litara vode te da je potrebno 5 kilograma maslina za proizvodnju 1 kilograma maslinovog ulja ukazuje da prerada maslina nije učinkovit proces. [4-6] Sve to dovodi do problema sa rukovanjem maslinovim otpadom (kominom). Osim što otpadne vode, koje iznose 30 milijuna kubičnih metara godišnje (u mediteranskoj regiji) nisu biorazgradive i ne mogu se preraditi uobičajenim sustavima za pročišćavanje vode, problem preostale komine postaje sve veći, prvenstveno jer sadrži otrovne tvari kao što su npr. policiklički aromatski ugljikovodici poput benzopirena. [2,4-5]

Za svaku tonu masline koja se prerađuje proizvodi se oko 400 kilograma komine koja se teško može koristiti za bilo što drugo. Osim toga, komina sadrži fitotoksične i antimikrobne tvari koje škode biljkama i zaustavljaju njihov rast (slika 4.). Komina nastala proizvodnjom maslinovog ulja može se adekvatno pripremiti za odlaganje, međutim takav proces je vrlo skup i razlikuje se za različite zemlje što ovisi o različitoj regulativi koja se primjenjuje pri preradi nastale komine. Većina mlinova za maslinovo ulje je relativno mala te za njih nije ekonomski izvedivo izgraditi uređaj za pročišćavanje otpadnih voda, a u nekim se slučajevima, otpadna voda čuva u velikim

bazenima kako bi isparila i ostavila polukrutu tvar. Ova i druga polučvrsta komina nije biorazgradiva i mora se obraditi prije nego se može odbaciti. Na mnogim mjestima se spomenuta komina uopće ne tretira ili se tretira nedovoljno kako bi bila bezopasna, a problem je što se najčešće takva odlaže u prirodu ili na prazan komad zemlje. To je dopušteno u mnogim zemljama poput Italije i Portugala. U Andaluziji su otpadni proizvodi iz proizvodnje maslinovog ulja glavni izvor onečišćenja voda rijeke Guadalquivir i mnogih drugih plovih puteva. [4-6]

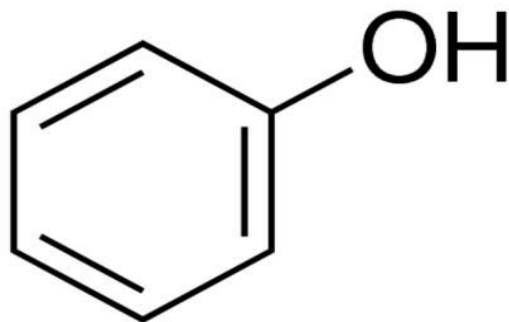


Slika 4. Utjecaj komine na biljke [7]

Kada se pravilno tretira, otpad od proizvodnje maslinovog ulja se može koristiti kao herbicid protiv određenih korova, ali to je skup postupak. Budući da ovaj otpad nije bezopasan, a šteta za okoliš je ozbiljna, posljednjih godina, sve veći broj znanstvenika proučava ovaj problem i traži ekonomičnije rješenje za njegovo rješavanje, prvenstveno jer komina sadrži i vrijedne resurse. Naime, komina zadržava 98% fenola prilikom proizvodnje maslinovog ulja koji se dalje mogu koristiti u različite svrhe. [6]

2.2. Fenoli

Fenoli su grupa kemijskih spojeva koji sadrže hidroksilnu skupinu (-OH) izravno povezanu s aromatskom ugljikovodičnom skupinom (benzenom). Najjednostavniji razred je fenol molekulske formule C_6H_5OH (slika 5.). Fenolni se spojevi, prema tome, klasificiraju kao jednostavni fenoli ili polifenoli na temelju broja fenolnih jedinica u molekuli. [8]



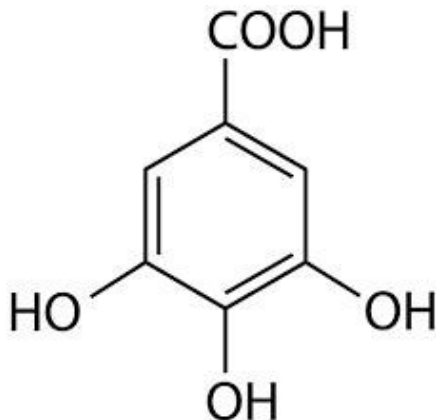
Slika 5. Strukturna formula fenola [9]

2.2.1. Svojstva i upotreba polifenola

Svojstva polifenola su slična svojstvima alkohola, ali u usporedbi sa alkoholima tvore jače vodikove veze. Prema tome, polifenoli su topljiviji u vodi, a imaju i više točke taljenja te mnogo više točke vrenja. Polifenoli se javljaju ili kao bezbojna kapljevina ili kao bijela čvrsta tvar na sobnoj temperaturi i mogu biti vrlo toksični. [8] Osnovna podjela fenolnih spojeva je ona na:

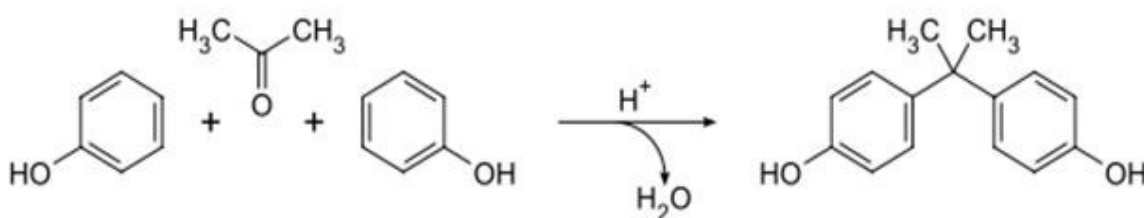
- Fenolne kiseline koje se sastoje od fenolnog prstena i karboksilne kiseline te
- Flavanoide, skupine prirodnih derivata, različitih struktura. [10]

Važan predstavnik fenolnih kiselina je galna kiselina koja se koristi kao standard za određivanje ukupnih fenolnih spojeva u brojnim prehrambenim proizvodima pomoću Folin-Ciocalteu metode. [11]



Slika 6. Struktura galne kiseline [11]

Osim što su reaktivni i podliježu oksidaciji, polifenoli su vrlo osjetljivi na elektrofilne aromatske supstitucije, a najbolji primjer je dobivanje bisfenola A (slika 7.). Navedeni proces opskrbljuje količinu od 1 milijun tona godišnje bisfenola A potrebnog za proizvodnju plastike. [8]



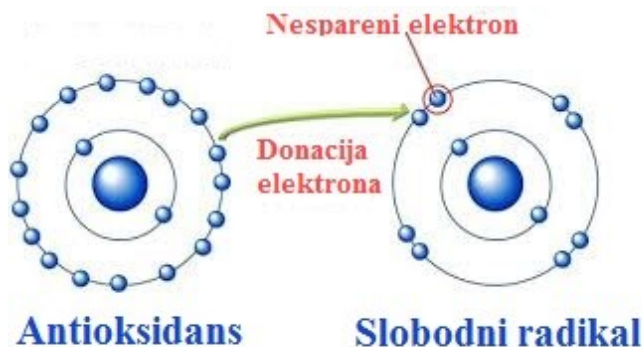
Slika 7. Sinteza bisfenola A [12]

Fenoli se široko koriste u proizvodima za kućanstvo i kao međuprodukti za industrijsku sintezu. Na primjer, sam fenol se koristi (u malim koncentracijama) kao sredstvo za dezinfekciju u sredstvima za čišćenje u kućanstvu i u vodi za ispiranje usta. Fenol je bio prvi kirurški antiseptik koje je 1865. godine koristio britanski kirurg Joseph Lister kako bi sterilizirao sve potrebno za provedenje operacija na svojim pacijentima. Prilikom korištenja fenola na navedeni način, stopa smrtnosti od kirurških amputacija pala je sa 45 na 15 % u Listerovom odjelu. [8]

Međutim, u većim količinama polifenoli mogu biti i vrlo toksični, a one koncentriranije otopine uzrokuju teške opekline kože i sluznice. Manje toksični fenoli, kao što je n-heksilresorcinol, zamijenili su fenol u proizvodima za kašalj i drugim antiseptičkim primjenama, a dodatni primjer je i butilirani hidroksitoluen (BHT) koji se koristi kao antioksidans u hrani. U industriji se fenol kao početni materijal koristi i za izradu eksploziva kao što je pikrinska kiselina te u lijekovima kao što je aspirin. Ostali supstituirani fenoli koriste se u industriji boja kako bi se dobile intenzivno obojene azo boje. [8,13]

Unatoč toksičnosti u svom čistom obliku, plifenoli pokazuju brojne zdravstvene prednosti. Naime, poznato je da su spojevi fenola antioksidansi. To znači da mogu zaustaviti reakciju slobodnih radikala s drugim molekulama u ljudskom tijelu, sprječavajući tako oštećenje DNK, kao i dugoročne zdravstvene posljedice. Sve započinje slobodnim radikalima, molekulama koje

su izgubile elektron i postale nestabilne. To ih čini sklonima da reagiraju i oštećuju molekule. Slobodni radikali zatim uzrokuju da molekule s kojima reagiraju stvaraju još više slobodnih radikala. Upravo su antioksidativne molekule barijera između slobodnih radikala i zdravih molekula, odnosno antioksidansi imaju ulogu zamjene nestalog elektrona te tako slobodni radikal čine bezopasnim (slika 8.). [13]



Slika 8. Mehanizam antioksidativnog svojstva [14]

Uvrštavanje antioksidativnih spojeva u prehranu čovjeka moguće je prevenirati različite bolesti od kojih je najznačajnija prevencija karcinoma. Također se primjenjuju i u kozmetičkoj industriji jer je pokazano da imaju pozitivan učinak na usporavanje procesa starenja stanica u ljudskom organizmu zbog već spomenutog svojstva antioksidativnog djelovanja. [15]

2.2.2. Fenolni spojevi u komini masline

Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni u biljnim tkivima te pridonose boji, okusu i trpkosti plodova. Koncentracija fenolnih spojeva može varirati od 0,5 do 5,0 g na 100 g suhe mase biljnog tkiva. Fenolni spojevi često se smatraju sekundarnim metabolitima u procesu metabolizma biljaka koji doprinose funkcijama biljke kao što je npr. obrambena uloga biljaka protiv biljojeda i patogena. [10,16]

Primjeri polifenola u prirodi uključuju tirozin, jednu od standardnih aminokiselina koje se nalaze u većini proteina, epinefrin (adrenalin), stimulirajući hormon, serotonin, neurotransmiter u mozgu te urushiol kojeg izlučuje otrovni bršljan kako bi spriječio da životinje jedu njegovo lišće. Mnogo složeniji fenoli koji se koriste kao arome dobivaju se iz eteričnih ulja biljaka. Jedan od primjera je vanilin izvučen iz zrna vanilije, timol izoliran iz timijana te eugenol dobiven iz klinčića. [8]

Fenolni spojevi identificirani su u plodovima maslina i nusproizvodima maslina. Maslinovo ulje sadrži estere tirozola, hidroksitirozola, oleokantala i oleuropeina te daju ekstra djevičanskom maslinovom ulju njegov gorak, oštar okus, a također su uključeni u njegovu aromu. Maslinovo ulje je izvor najmanje 30 fenolnih spojeva, među kojima je i elenolna kiselina, marker za sazrijevanje maslina, vanilinska kiselina i brojni drugi. [15,17] Maslinovo ulje sadrži 2 % ukupnog sadržaja fenola u cjelovitim maslinama, dok je preostalih 98 % prisutno u otpadu od maslinovog ulja. Fenolni spojevi u maslinama prepoznati su kao potencijalno bioaktivni i mogu imati antioksidativna i terapijska svojstva koja proizvode antikancerogene, antivirusne, protuupalne, hipolipidemijske i hipoglikemijske učinke. Komina maslina smatra se bogatim izvorom fenolnih spojeva sa širokim spektrom bioloških aktivnosti. Međutim, prisutnost fenolnih spojeva u komini masline ovisi uvelike o kultivaru, zrelosti, klimatskim uvjetima, vremenu skladištenja i procesu prerade. [15,18] Navedeni polifenoli iz komine masline mogu se odvojiti kapljevinskom ekstrakcijom uz pomoć odgovarajućeg selektivnog otapala. [19]

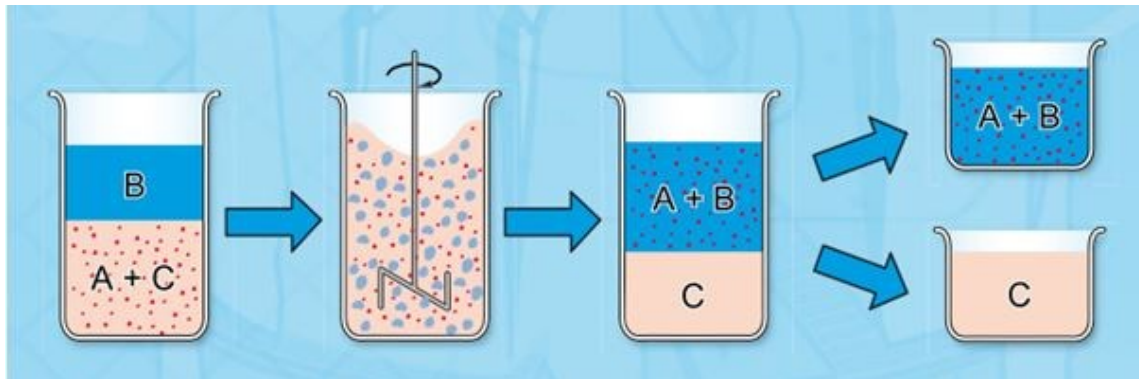
2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je ravnotežni separacijski proces uklanjanja jedne ili više komponenti iz čvrste ili kapljevite smjese pomoću selektivnog otapala. Navedeno se otapalo ne miješa ili se tek djelomično miješa s krutom tvari i kapljevnom. Intenzivnim kontaktom, aktivne tvari prenose se iz čvrste ili kapljevite smjese (rafinata) u otapalo (ekstrakt). [19]

Na temelju različitih faza razlikuju se dva načina ekstrakcije:

- ekstrakcija kapljevito-kapljevito te
- ekstrakcija kruto-kapljevito ili izluživanje. [19-20]

Ključna se komponenta u ekstrakciji kapljevitina-kapljevitina izdvaja pomoću sekundarnog otapala iz kapljevine, dok se ključna komponenta u ekstrakciji krutina-kapljevitina izdvaja pomoću otapala iz krute faze. [19]



Slika 9. Shema procesa ekstrakcije kapljevitost-kapljevitost [21]

Nakon miješanja, dvije faze je potrebno razdvojiti djelovanjem gravitacije ili centrifugalne sile. Za regeneraciju otapala te za dobivanje aktivne tvari u čistom obliku potreban je daljnji postupak razdvajanja (rektifikacija ili re-ekstrakcijom). [21]

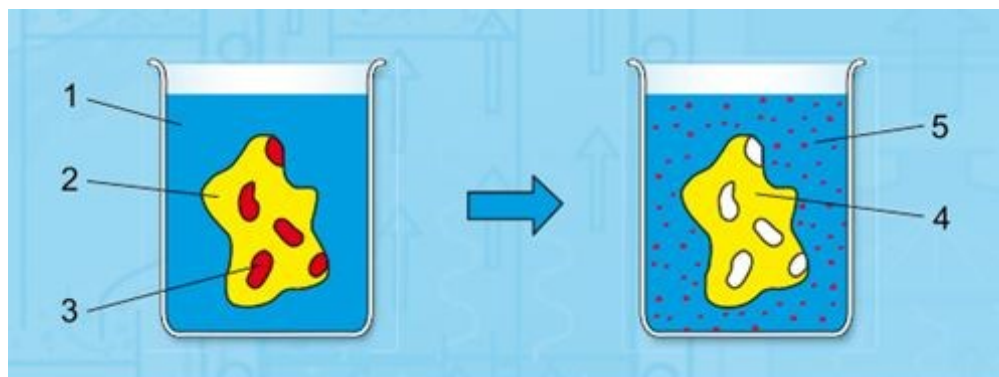
Ekstrakcija se upotrebljava ukoliko su komponente:

- niske hlapivosti,
- bliske hlapivosti,
- toplinski osjetljive komponente te
- ukoliko je otopljena komponenta prisutna u vrlo maloj količini. [19]

Procesi ekstrakcije bitan su dio brojnih industrija. U farmaceutskoj industriji koriste se za izdvajanje aktivnih komponenti iz ljekovitog bilja, u prehrambenoj industriji za izdvajanje aktivnih komponenti poput peptida i nukleinskih kiselina, a u kemijskoj industriji se koriste za dobivanje organskih boja i izdvajanje metala iz ruda. Jedan od primjera je i korištenje ekstrakcije u izdvajanju ulja iz uljarica te naprimjer za izdvajanje polifenola iz komine masline.

2.3.1. Ekstrakcija kruto-kapljevito

Ekstrakcija kruto-kapljevito omogućava uklanjanje ključne komponente iz krutine pomoću otapala. Primjena ove operacije se može vidjeti na svakodnevnom primjeru kao što je priprema kave. Ovdje se voda (otapalo) koristi za ekstrahiranje okusa kave (prijelazne komponente) iz praha kave (materijala za ekstrakciju). Izluživanje rezultira pitkom kavom, tj. otapalom s ekstrahiranim okusom. U stvarnosti dio materijala za ekstrakciju, u ovom slučaju praha kave, ipak ostaje u završnom produktu. [20]



Slika 10. Shema procesa ekstrakcije kruto-kapljevito (1-otapalo, 2-materijal za ekstrakciju, 3-prijelazna komponenta, 4-osiromašeni materijal za ekstrakciju, 5-otapalo sa otopljenom prijelaznom komponentom) [21]

Da bi se postigla učinkovita ekstrakcija iz krutine, potrebno je ostvariti dobar kontakt između otapala i krutine s velikom površinom izmjene te kratkim putem difuzije nakon čega se otapalo s otopljenom tvari izdvaja iz smjese, a otapalo po mogućnosti regenerira. [21]

Zahtjevi za provedbu učinkovite ekstrakcije:

1. Materijal za ekstrakciju mora biti pripremljen na takav način da otapalo može brzo otopiti prijelaznu komponentu. To se postiže pripremom krute faze (drobljenjem, brušenjem ili ljuštenjem).
2. Primjena selektivnog otapala koje otapa samo željenu komponentu.
3. Željenu komponentu potrebno je izdvojiti u najvećoj mogućoj koncentraciji.
4. Regeneracija otapala (npr. destilacijom).

Cjelokupni postupak ekstrakcije obično uključuje sljedeće dodatne stupnjeve: priprema sirovine, kao i odvajanje i obnavljanje otapala i ostatka otopine. [22]

Stupnjevi u provedbi ekstrakcije kruto – kapljevito

1. ostvarivanje kontakta između krutine i otapala;
2. prodiranje ili difuzija otapala u pore krutine;
3. otapanje tvari u otapalu;
4. difuzija otopljene tvari na površinu čestice i
5. prijenos otopljene tvari u glavninu otopine.

Kod kapljevine ekstrakcije drugi korak općenito nije problematičan međutim, kod izluživanja, pri ekstrakciji ključne komponente u otapalo, potrebno je prevladati energiju interakcije između ključne komponente i uzorka. To jest, afinitet između ključne komponente i otapala mora biti veći od njegovog afiniteta prema uzorku. [19]

Ponekad je teško postići željeno razdvajanje te je za postizanje razdvajanja potrebno primijeniti vanjski rad kako bi se omogućila što bolja difuzija. Taj vanjski rad često se očituje kao dovedena toplina, odnosno povišena temperatura. Povišenje temperature dovodi do poboljšanja kinetike, smanjene viskoznosti i površinske napetosti otapala, povećane topljivosti i difuzivnosti otopljene tvari te pomaže u prevladavanju interakcija između otopljene tvari i uzorka. [22] Osim temperature, na selektivnost i efikasnost procesa mogu utjecati i pH i vrijeme zadržavanja. U određenim procesima ekstrakcije (ekstrakciji metala i bio-ekstrakciji) pH vrijednost može povećavati koeficijent raspodjele ili smanjiti mogućnost razgradnje. Obzirom da tlak ne utječe na prijenos tvari ekstrakcijom, ekstrakcija se uglavnom provodi pri atmosferskom tlaku. [19]

2.3.2. Izbor otapala

Od izuzetnog je značaja pažljivo odabrati otapalo. Tako ono mora zadovoljiti određene zahtjeve:

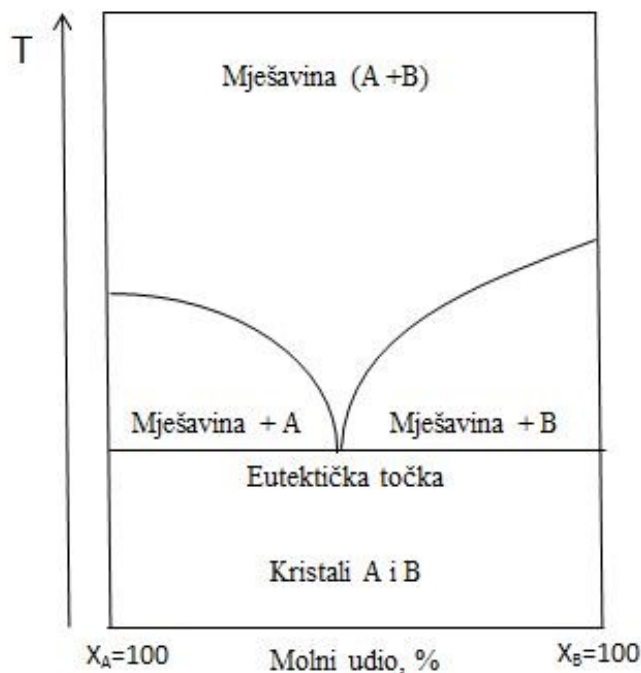
- Dobra selektivnost, jer nijedna druga tvar osim aktivne tvari ne smije biti izdvojena iz smjese,
- Veliki kapacitet kako bi se smanjila količina potrebnog otapala,
- Mješljivost otapala i primarnog otapala (kod kapljevinske ekstrakcije) mora biti zanemariva da bi se postigla jednostavna regeneracija otapala,
- Velika razlika u gustoći kako bi se dvije faze mogle razdvojiti u separatoru, a tome pogoduje velika razlika u gustoći (kod kapljevinske ekstrakcije),
- Optimalna površinska napetost zbog postizanja boljeg kontakta faza,
- Jednostavna regeneracija,
- Niska cijena,
- Netoksičnost ili izrazito mala toksičnost,
- Niska viskoznost što dovodi do manjeg pada tlaka i do dobrog prijenosa tvari i topline,
- Kemijska i toplinska stabilnost,
- Niski tlak para – otapalo ne smije biti hlapljivo,
- Dostupnost i ekološka prihvatljivost [19].

Klasična organska otapala su jedna od najčešće korištenih otapala u kemijskoj i biotehnološkoj industriji. Organska otapala su štetna, tako npr. kada se udišu, posebno u visokim koncentracijama, pokazuju supresivne učinke na središnji živčani sustav. Dugotrajna izloženost otapalima i zagađivačima zraka može dovesti do štetnih učinaka na respiratornom, hematološkom području te na štitnjači. U nižim koncentracijama, kao što se susreću u radnim uvjetima, učinci se manifestiraju kao povećani subjektivni simptomi povezani s središnjim živčanim sustavom. Pokušavajući unaprijediti proizvodnju industrijski važnih kemikalija u

ekološkom, ali i ekonomskom pogledu, istražuje se primjena različitih nekonvencionalnih otapala, među kojima se ističu ionske tekućine i prirodna eutektička otapala. [23-26]

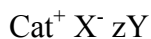
2.4. Eutektička otapala

Abbott i sur. prvi put spominju eutektička otapala 2001. godine, a 2003. ističu njihove brojne prednosti. [27] Eutektička otapala definiraju se kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, povezanih vodikovim vezama, koja u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (slika 11.). Jedan od najznačajnijih eutektičkih otapala je mješavina kolin klorida i uree u molarnom omjeru 1: 2. Dobivena smjesa ima talište 12 ° C (daleko manje od točke taljenja kolin klorida, 302 ° C i uree, 133 ° C), što ga čini tekućim na sobnoj temperaturi. [28]

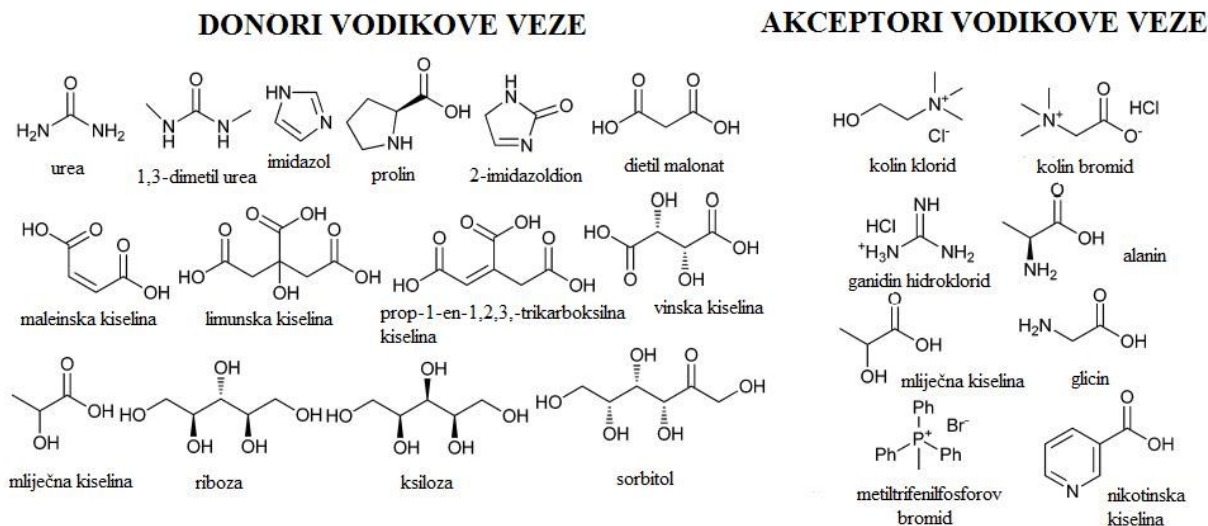


Slika 11. Fazni dijagram eutektičkog otapala [29]

Eutektička se otapala mogu opisati općom formulom:



gdje je Cat^+ u principu bilo koji amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation, a X je Lewisova baza, općenito halogenidni anion. Kompleksne anionske vrste nastaju vezom između X⁻ i Lewisove ili Brønstedove kiseline Y (z se odnosi na broj Y molekula koje stupaju u interakciju s anionom). [30]



Slika 12. Prikazi struktura donora i akceptora vodikove veze koji se najčešće koriste u sintezi eutektičkih otapala [31]

2.4.1. Prirodna eutektička otapala

Eutektička se otapala razvrstavaju kao vrste ionskih otapala s posebnim svojstvima. Kada su komponente koje izgrađuju eutektičko otapalo primarni metaboliti takva se otapala nazivaju prirodnim eutektičkim otapalima (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). [31] Od primarnih metabolita najčešće se koristi šećer, šećerni alkohol, organska kiselina, aminokiseline te amini koji su međusobno povezani jakim intermolekularnim interakcijama, vodikovim vezama.

Općenito, komponente NADES-a su karakterizirane prisutnošću nekoliko funkcionalnih skupina kao što su hidroksilne, karboksilne ili amino skupine. Te skupine mogu tvoriti međumolekularne vodikove veze, što dovodi do visoko strukturiranih viskozni kapljevine, što objašnjava njihova

specifična fizikalna svojstva i sposobnost otapanja različitih komponenti, u odnosu na uobičajena otapala. Te kapljevine također mogu tvoriti vodikove veze s otopljenim tvarima, čime se znatno povećava topivost spojeva u NADES-u, npr. s fenolnim spojevima. [29-32]

DES i NADES obično stvaraju mrežu akceptora vodikovih veza (HBA) i davatelja vodikove veze (HBD), čime se favorizira proces otapanja ciljnih komponenti. HBA je često kvaterna amonijeva sol, dok HBD sadrži amine, karboksilne kiseline, alkohole, polirole ili ugljikohidrate. [17]

Prema njihovim komponentama, NADES se može podijeliti u pet skupina:

1. ionske kapljevine sastavljene od kiseline ili baze,
2. skupina s neutralnim spojevima,
3. mješavine na bazi šećera s kiselinom,
4. mješavine na bazi šećera s bazom i
5. mješavina na bazi šećera s aminokiselina. [33]

Različiti sastavi NADES-a rezultiraju širokim rasponom fizikalnih svojstava, što dovodi do različitog ponašanja prilikom njihove primjene. U pripravi eutektičkih otapala široku primjenu ima kolin klorid (ChCl), organska sol, koja ulazi u interakciju s jeftinim i lako dostupnim donorima vodika (urea, glicerol, polioli iz ugljikohidrata ili karboksilne kiseline dobivene iz različitih izvora). Kolin-klorid je ekonomičan, biorazgradiv i netoksičan te predstavlja kvarternu amonijevu sol koja se može ekstrahirati iz biomase ili sintetizirati iz fosilnih goriva. Radi se također o vrlo dostupnoj sirovini koja se proizvodi u velikim količinama, no iako je kolin-klorid najčešća amonijeva sol koja se koristi u sintezi eutektičkih otapala i mnogi drugi halidi pogodni su za njihovo dobivanje. [31-32]

2.4.2. Svojstva i upotreba prirodnih eutektskih otapala

Otapalo je definirano svojim fizikalno-kemijskim svojstvima koja uvelike ovise o njegovoj pripravi. Prema tome, svojstva poput električne i toplinske vodljivosti, polarnosti, viskoznosti, gustoće, tališta i ledišta mogu biti dizajnirana u skladu sa strukturom DES-a. Većina niskotemperaturnih eutektskih otapala pokazuje slabu ionsku provodnost (manju od 2 mS/cm na sobnoj temperaturi) te veću gustoću od vode. Vrijednost viskoznosti većine poznatih DES-ova iznosi često više od 100 cP, a uspoređujući je sa viskoznošću vode koja iznosi 0,89 cP na sobnoj temperaturi vidljivo je kako je za DES karakteristična visoka viskoznost. Glavni razlog visokih vrijednosti povezuje se s jakom vodikovom vezom formiranom među komponentama eutektskog otapala, koja neizbježno smanjuje pokretljivost molekula. Ostale sile kao što su elektrostatske ili van der Waalove, također mogu doprinijeti visokoj viskoznosti. Unatoč velikoj viskoznosti, NADES-i su još uvijek kapljevine na sobnoj temperaturi, pa čak i na niskoj temperaturi. [29,31-32] Dai i sur. 2013. godine u svom radu istražuju svojstva NADES-a i dokazuju kako i voda može biti dio NADES-a. Osim što je voda za NADES snažno vezana, omogućava da dodatak i malih količina vode značajno smanjuje njihovu viskoznost no ujedno zadržava njihove karakteristike. [30] NADES-i također pokrivaju širok raspon polariteta, od više polarnijih od vode do polariteta istog kao kod metanola. [32-34]

Prirodna eutektska otapala pokazuju brojne prednosti u odnosu na konvencionalna otapala koja se trenutno koriste za ekstrakciju, nehlapiva su, imaju podesivu viskoznost te omogućuju dobro otapanje. S ekološke i ekonomske perspektive, NADES ima i velike prednosti jer su biorazgradivi, imaju nisku cijenu i jednostavno se pripremaju. Osim navedenog, pokazuju nizak tlak para te nisku kemijsku inertnost, a komponente od kojih se sastoje su toksikološki dobro karakterizirane, tako da se mogu lako koristiti i za veće obrade tj. u većim industrijama. [29-30,32]

Sva navedena svojstva ukazuju na veliki potencijal NADES-a u ulozi ekstrakcijskih otapala za prirodne produkte te na njihove potencijalne primjene u područjima povezanim sa zdravljem, hranom, lijekovima i kozmetikom. Prirodna eutektska otapala su se tijekom istraživanja Dai i sur. pokazala kao izvrsna otapala za širok raspon metabolita niskog do srednjeg polariteta koji su netopljivi ili slabo topljivi u vodi. Nadalje se, i makromolekule kao što su DNA, proteini i

polisaharidi također otapaju u NADES-ima. Postojanje NADES-a u biljkama i njihova svojstva također ukazuju da bi NADES mogao biti uključen u biosintezu i skladištenje raznih, u vodi netopljivih, metabolita u stanicama te podrazumijeva ulogu NADES-a u zaštiti organizama od ekstremnih uvjeta. [30]

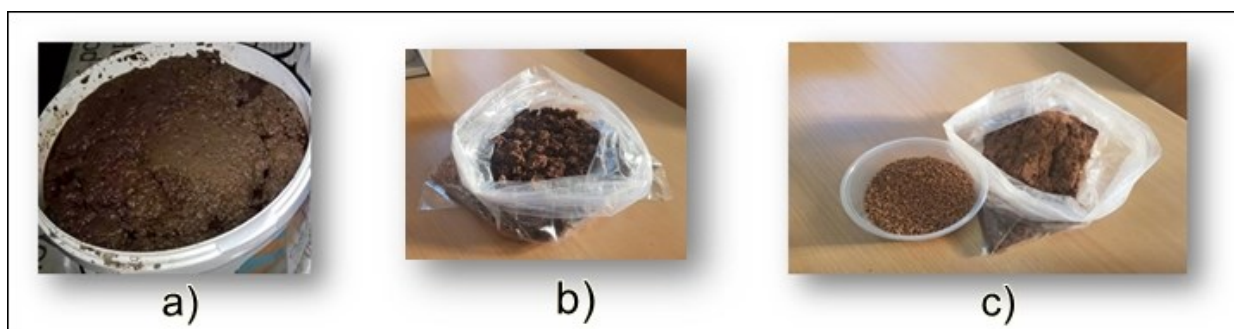
Kao što je već prije spomenuto, posljednji korak u postupku ekstrakcije je regeneracija otapala, koja može biti komplicirana i skupa. Budući da je NADES uglavnom netoksičan i neškodljiv za primjenu, njihovom primjenom u postupku izluživanja moguće je preskočiti ovaj zahtjevan korak. Najbolji primjer za to je korištenje NADES-a u kozmetičkoj industriji. Nakon što se NADES iskoristi za primjerice ekstrakciju fenola iz komine masline dobiva se otopina NADES-a i izdvojenih fenola. Dobivenu otopinu nije potrebno razdvajati jer se i NADES i fenoli mogu koristiti u kozmetičkim proizvodima zbog čega se navedena otopina može izravno koristiti.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu rada navedene su korištene kemikalije i instrumenti, dan je pregled radnih uvjeta i opisana je eksperimentalna aparatura te izvedba mjerenja. Tokom dva mjeseca provodilo se ispitivanje stabilnosti polifenola u uvjetima na dnevnom svjetlu, pod UV svjetlom te u mraku za otapala sa masenim udjelom vode 20, 50 i 70 %.

3.1. Priprema komine masline

U eksperimentalnom radu korištena je maslinova komina, odnosno kruti otpad masline nastao u proizvodnji maslinova ulja. Komina se dopremila iz prehrambene kompanije Agrolaguna d.d. čije je sjedište u istarskom gradu Poreču. Komina se zamrzнула kako bi se usporila razgradnja, odnosno kako se ne bi izgubili vrijedni spojevi komine kao što su naprimjer polifenoli. Zamrznutu kominu prije samog korištenja u procesu ekstrakcije bilo je potrebno najprije odmrznuti na sobnoj temperaturi, a zatim osušiti na 60 °C u laboratorijskom sušioniku. Sušenjem se tako uklonio preostali udio vode u komini koji je iznosio 45 % od ukupne mase uzorka. Nakon sušenja slijedilo je usitnjavanje maslinove komine u električnom mlinu u vremenu od 1-2 minute te prosijavanje 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. Postupak pripreme komine za eksperiment: a) vlažna odmrznuta komina, b) komina nakon sušenja, c) prosijana komina i odvojene koštice

Na Hrvatskom geološkom institutu pomoću uređaja Micromeritics Accupyc 1330 određena je gustoća maslinove komine.



Slika 14. Micromeritics Accupyc 1330

3.1.1. Raspodjela veličina čestica komine

Raspodjela veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije primjenom uređaja za lasersku difrakciju prikazanog na slici 15 čije je mjerno područje 0,4 do 3000 μm . Raspodjela veličina čestica uzorka komine izmjerena je tri puta pa je rezultat izražen kao srednja vrijednost, odnosno srednji promjer čestica komine.

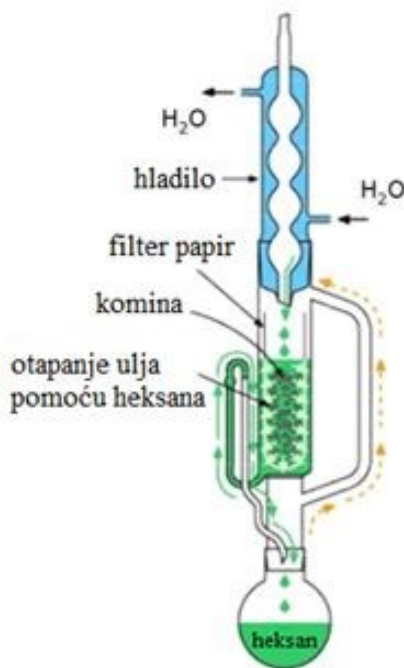


Slika 15. Uređaj laserske difrakcije SALD-3101 (*Shimadzu, Japan*)

3.1.2. Oduljivanje pripremljene komine

Maslinova komina sadrži u sebi ostatke ulja koje je potrebno, kako ne bi utjecalo na prijenos tvari, ukloniti. Aparatura koja se koristi za oduljivanje maslinove komine sastoji se od grijača u koji se stavi tikvica s okruglim dnom te se u nju doda heksan. Navedeni se heksan koristi jer je pogodan za uklanjanje ulja iz komine. U Soxhlet aparaturu stavlja se tuljac načinjen od filter papira u kojem je maslinova komina spremna za oduljivanje.

Cijeli proces započinje zagrijavanjem heksana do njegovog vrelišta kada on počinje isparavati. Ispareni heksan prolazi kroz kominu i uklanja ulje iz komine. Heksan sa uljem odlazi preko sifon cijevčice u tikvicu iz koje dalje isparava samo heksan budući da ima niže vrelište. Postupak oduljivanja se provodi dok heksan u potpunosti ne ukloni ulje što prepoznamo prema boji heksana u sifon cjevčici. Tako u filter papiru zaostaje oduljena komina koja se dalje koristi za eksperimente, a u tikvici heksan i ekstrahirano ulje. Navedena aparatura zove se Soxhelt aparatura i prikazana je na slici 16.



Slika 16. Soxhelt aparatura (shema)

3.2. Prirodna eutektička otapala

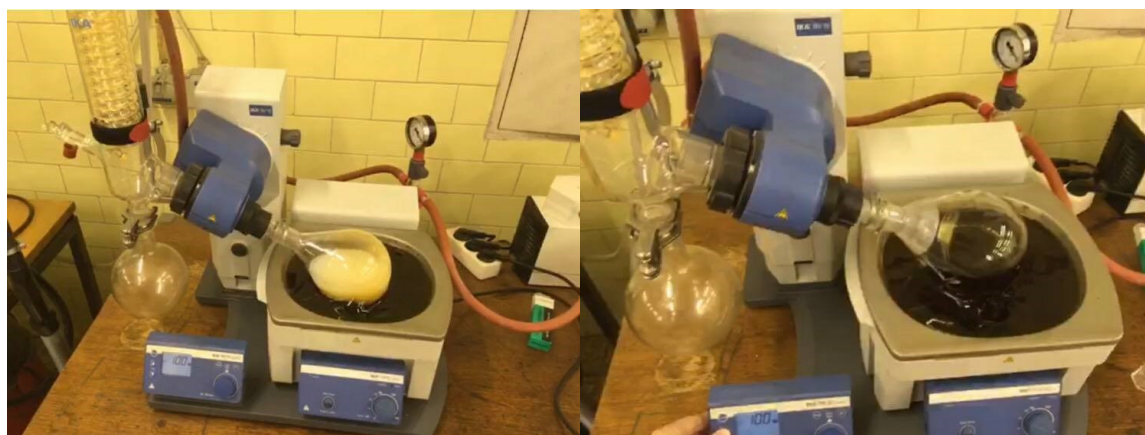
3.2.1. Priprema prirodnog eutektičkog otapala

U ovom radu korišteno je prirodno eutektičko otapalo *Ma-Fru-Gly* (jabučna kiselina-fruktoza-glicerol), a za njenu pripremu korištene su kemikalije navedene u tablici 1.

Tablica 1. Kemikalije korištene za pripremu prirodnog eutektičkog otapala

Kemikalija	ρ , g/cm ³	M , gmol	T_v , °C	T_t , °C	Čistoća, %	Proizvođač
Glicerol	1,260	92,10	290,0	-	99,0	<i>BDH Prolabo</i>
Jabučna kiselina	1,609	194,09	-	130,0	99,0	<i>Acros Organics</i>
D – fruktoza	1,690	180,16	-	103,0	99,0	<i>Lachner</i>

Komponente navedene u tablici 1 su sušene u vakuum sušioniku pri temperaturi od 60 °C tijekom 8 h. Priprema DES-a kreće od miješanja glicerola, jabučne kiseline i D-fruktoze u molarnim udjelima 1:1:1 uz dodatak vode (20, 50 i 70 mas %). Priprema se provodi pri temperaturi od 60 °C na rotacijskom vakuum isparivaču u trajanju od oko 2 sata, odnosno do pojave bistre i homogene kapljevine (slika 17.).



Slika 17. Rotacijski vakuum isparivač *IKA RV 10, Basic*

3.2.2. Karakterizacija prirodnih eutektičkih otapala

Prirodna eutektička otapala sintetizirana su s 20, 50 i 70 % vode čime se smanjila viskoznost originalnog NADES-a, a samim time poboljšalo miješanje kod primjene u procesu ekstrakcije. Sintetiziranim eutektičkim otapalima eksperimentalno su određena glavna fizikalnih svojstva: viskoznost, gustoća, indeks loma, električna vodljivost i pH vrijednost pri sobnoj temperaturi pomoću odgovarajućih uređaja navedenih u tablici 2.

Tablica 2. Popis uređaja korištenih za određivanje fizikalnih svojstava

Fizikalno svojstvo	Uređaj	Točnost uređaja
Viskoznost	<i>Brookfield reometar DV – III ULTRA</i>	±1,0 %
Gustoća	<i>Mettler Toledo Densito 30PX</i>	±0,001 g/cm ³
Indeks loma	<i>Refraktometar, Optech Abbe Model RMI</i>	±0,0001
Električna vodljivost	<i>WTW InoLab pH/Cond 740 elektroda: WTW Tetracon 325</i>	±0,0002 V
pH vrijednost	<i>WTW InoLab pH/Cond 740 elektroda: SenTix 81</i>	±0,004 pH

3.3. Ekstrakcija

Provedena je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz maslinove komine s pripremljenim prirodnim eutektičkim otapalo (NADES), a u cilju poboljšanja eksperimenta provodeno je i ispitivanje kapaciteta NADES-a, odnosno koliko NADES može skupiti fenola. Iz prvog koraka ispitivanja kapaciteta korištena je filtrirana komina kako bi se također utvrdilo i da li se ekstrahiraju svi fenoli ili dio zaostaje. Utvrđivanjem zasićenosti dobiva se uvid u iskoristivost NADES-a i komine u procesima što uvelike pomaže u daljnjim istraživanjima.

Nakon što su pripremljeni NADES-i sa različitim masenim udjelom vode (20 %, 50 % i 70 %) pripremaju se tri čaše od 50 mL radi postizanja jednakih hidrodinamičkih uvjeta u procesu

ekstrakcije. U svaku čašu je dodano 20 mL NADES-a (sa 20, 50 i 70 % vode) i 1 g oduljene komine. Smjese su najprije promiješane sa štapićem a zatim ostavljene pola sata na 600-700 okretaja na magnetskoj mješalici. Nakon isteka pola sata ekstrakt je filtriran pomoću Büchnerovog lijevka, a isfiltrirani ekstrakt se dodatno filtrirao pomoću 0,45 μm filtra (CROMAFIL Xtra PET-45/25) u male staklene posude u kojima su ostavljeni na period od dva mjeseca. NADES-i sa masenim udjelom vode od 50 i 70 % raspodjeljena su na tri uzorka čuvana na dnevnom svjetlu, u mraku i pod UV svjetlošću, dok je otapalo sa 20 % masenog udjela vode raspodjeljeno na dva uzorka koja su čuvana na dnevnom svjetlu te pod UV-svjetlošću (slika 18.). Od svakog ekstrakta uzet dio uzorka i poslan na mikrobiologiju, odnosno na mikrobiološko ispitivanje.



Slika 18. Ekstrakti skladišteni na različitim uvjetima a) dnevno svjetlo, b) mrak i c) UV-svjetlost

3.3.1. Zasićenost NADES-a kominom

Kako bi se utvrdio kapacitet NADES-a provedena je višestupnjevita ekstrakcija uz pomoć pripremljenog DES-a sa 30 % vode, odnosno provedeno je onoliko stupnjeva potrebnih da se postigne konstantna koncentracija fenola. Na izmjerenih 100 ml Ma-Fru-Gly-30 dodano je 5 g oduljane komine (omjer 1 g oduljane komine na 20 ml otapala ostao je isti) što predstavlja prvi stupanj. Na magnetskoj je mješalici pripremljena otopina miješana pola sata nakon čega je uslijedilo filtriranje pomoću Büchnerovog lijevka. Dio isfiltrirane otopine se odvojio i dodatno filtrirao pomoću 0,45 μm filtra kako bi se kasnije odredila koncentracija fenola. Ostatak otopine izmjeren je volumen te je na izmjereni volumen dodana izračunata masa oduljane komine nakon čega je postupak ponovljen kroz više stupnjeva.

Kakav je kapacitet NADES-a, odnosno koliko je učinkovita ekstrakcija ukazuje koncentracija fenola zaostala u komini nakon prvog stupnja ekstrakcije. Komina iz prvog skstrakcijskog stupnja je isprana s vodom te se zatim stavila na sušenje. Tako osušenoj komini je dodano proporcionalno NADES-a (onoliko koliko je potrebno da se održi omjer 1 g komine i 20 ml NADES-a). Ekstrakcija se provela na magnetskoj mješalici pola sata i dio ekstrakta je odvojen i filtriran pomoću 0,45 µm filtra za određivanje koncentracije fenola.

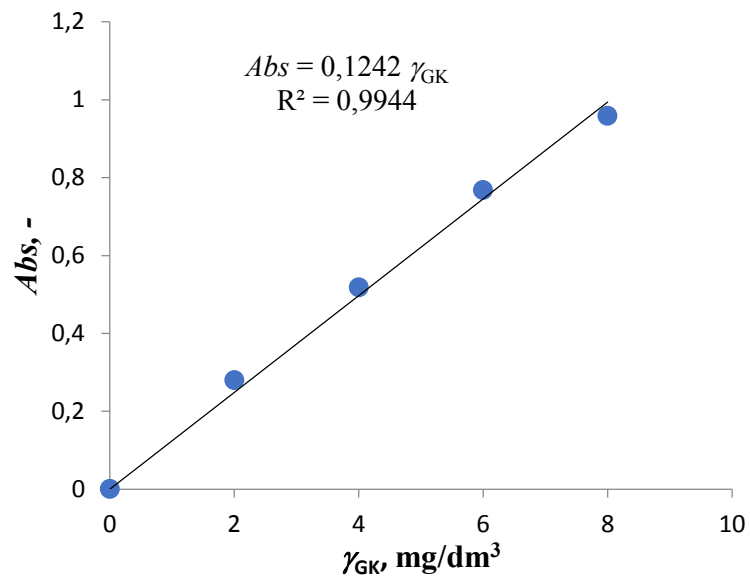
3.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijski standardnom Folin – Ciocalteu (FC) metodom na UV/Vis spektrofotometru proizvođača *Shimadzu UV 1280* (slika 19.). Mjerenjem apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 756 nm (maksimum apsorpcije) kvantitativno je određena preostala koncentracija ukupnih fenola koja je 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 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 termostatirane su još 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 20.).



Slika 19. UV/VIS spektrofotometar, Shimadzu UV-1280.



Slika 20. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih fenola.

3.3.3. Mikrobiološko ispitivanje

U svrhu određivanja mikrobiološke aktivnosti ispitana je prisutnost bakterija i gljivica (kvasci i plijesan).

Osnovna tekuća prirodna podloga za uzgoj bakterija je hranjivi bujon. Dobiva se ekstrakcijom goveđeg mesa uz dodatak peptona. Za pripremu čvrstih podloga dodano je 1 – 2 % agara. Agar je polisaharid koji se sastoji od dvije vrste šećera: agaroze i agaropektina, a mikroorganizmi ga ne mogu iskoristiti za rast i razmnožavanje.

Podloge za uzgoj gljiva i plijesni moraju sadržavati izvor ugljika. Upravo takav je sladni agar koji sadrži organske kiseline, polisaharide i proteine.

Za ispitivanje prisutnosti bakterija uzorak je bilo potrebno prenijeti na hranjivi agar u praznu Petrijevu zdjelicu te inkubirati na 37 °C u periodu od 24 do 48 h. Kako bi se uzorak što bolje prenio na hranjivu površinu korištena je metoda broja 8 i metoda po Drigalskom.

Metoda broja 8 podrazumijeva dodavanje 1 mL uzorka u Petrijevu zdjelicu, zalijevanje uzorka sa hranjivim agrom i homogenizaciju (pomicanjem Petrijeve zdjelice u obliku broja 8).

Metoda po Drigalskom znači dodavanje 0.1 mL uzorka na hranjivi agar i homogenizaciju štapićem po Drigalskom. Isti postupak je ponovljen i za ispitivanje prisutnosti gljivica, samo što je korišten sladni agar temperatura inkubacije 28 °C u periodu 3-5 dana.



Slika 21. Ispitivanje mikrobiološke aktivnosti.

3.3.4. Ravnotežna koncentracija fenola

Za određivanje koeficijenta prijenosa tvari, bilo je prvo potrebno utvrditi ravnotežnu koncentraciju fenolnih spojeva iz komine masline. Uzorak komine, mase 1 g, pomiješan je sa određenom količinom NADES-a 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 (1), uz pomoć dobivenih rezultata, izračunati su koeficijenti prijenosa tvari za provedene eksperimente.

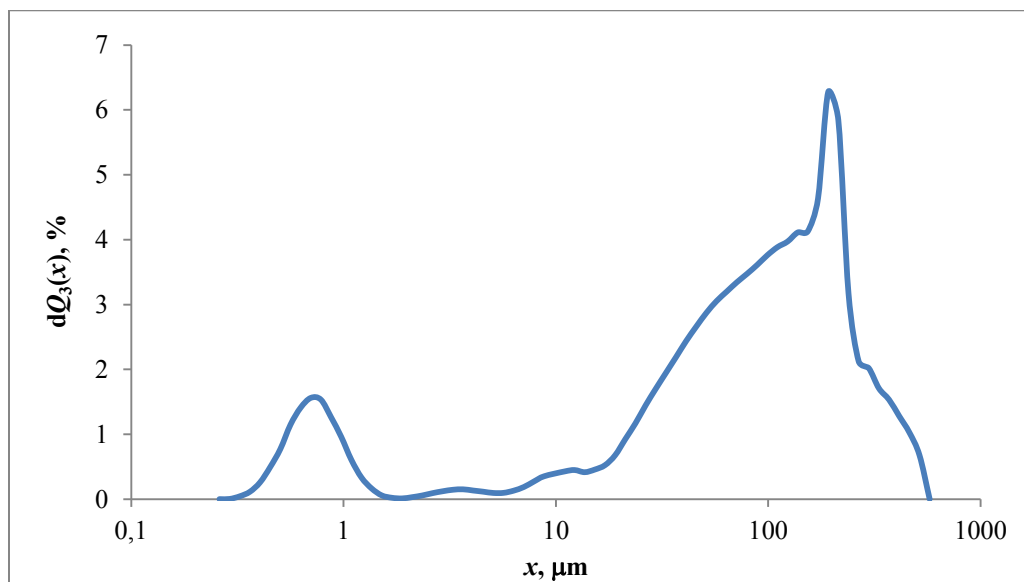
$$\frac{dm}{dt} = K \times A \times (c^* - c_b(t)) \quad (1)$$

4. REZULTATI

4.1. Raspodjela veličina čestica

Tablica 3. Karakterizacija komine.

Temperatura sušenja komine	Specifična površina pora (BET), m ² /g	Srednja veličina pora, nm	Srednja veličina čestica, μm	Gustoća komine masline, kg/m ³
60 °C	4,74	11,86	93,04	1298,2

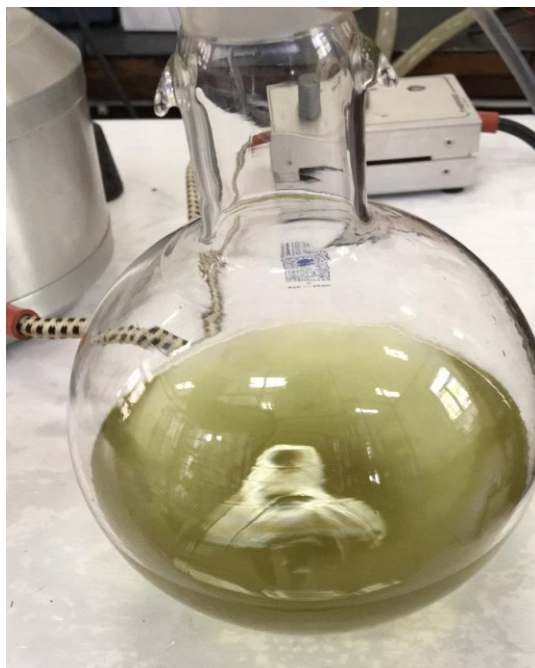


Slika 22. Raspodjela veličina čestica komine masline.

4.2. Oduljivanje pripremljene komine



Slika 23. Oduljena komina masline.

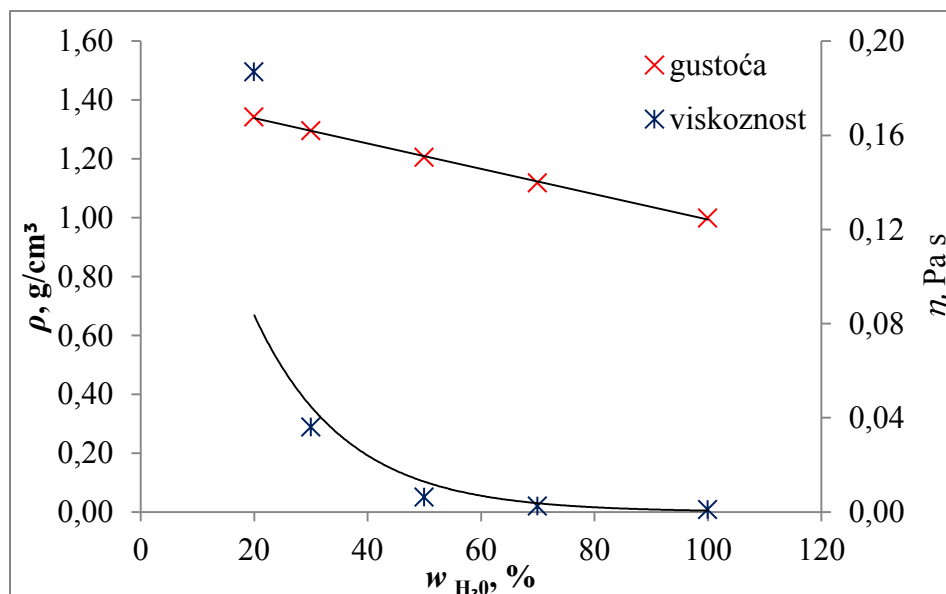


Slika 24. Heksan i ekstrahirano ulje.

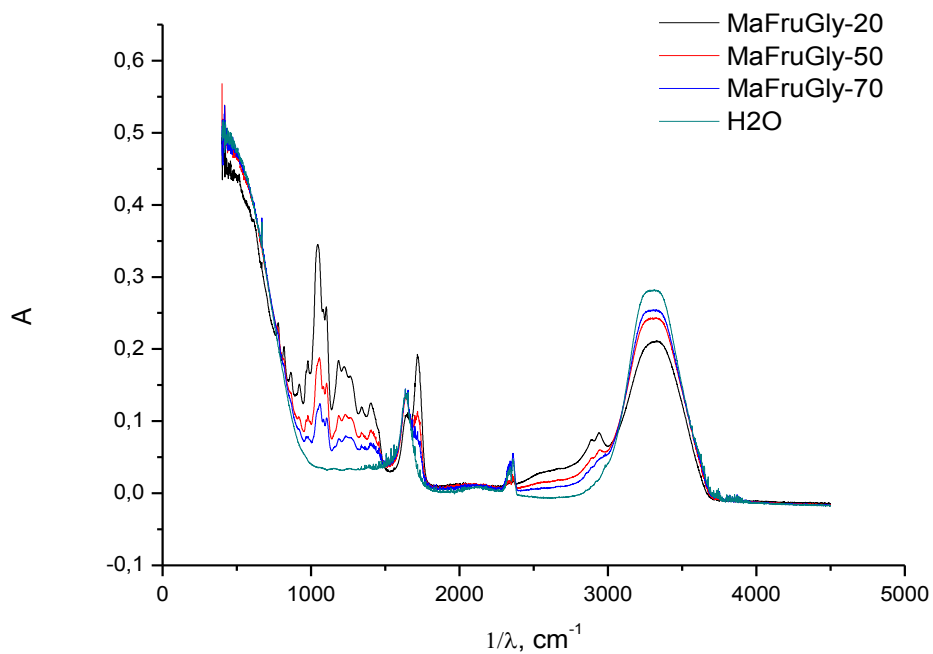
4.3. Karakterizacija prirodnih eutektičkih otapala

Tablica 4. Fizikalna svojstva pripremljenih eutektičkih otapala.

DES	w _{H₂O} , %	ρ , kg/m ³	η , Pa s	n_D	pH	κ , mS/cm ¹
MaFruGly	20	1342	0,1869	1,4585	1,07	0,080
	30	1295	0,0361	1,4426	0,92	0,366
	50	1204	0,0062	1,4055	1,46	1,407
	70	1119	0,0024	1,3735	1,70	2,800

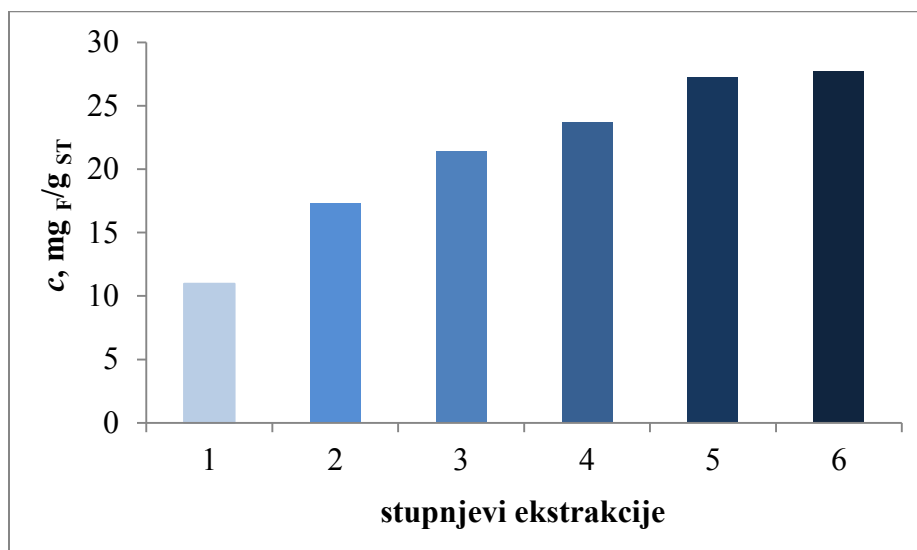


Slika 25. Promjena gustoće i viskoznosti s povećanjem masenog udjela H₂O u NADES-u.



Slika 26. FTIR spektar NADES-a s različitim udjelima vode.

4.4. Zasićenost NADES-a kominom

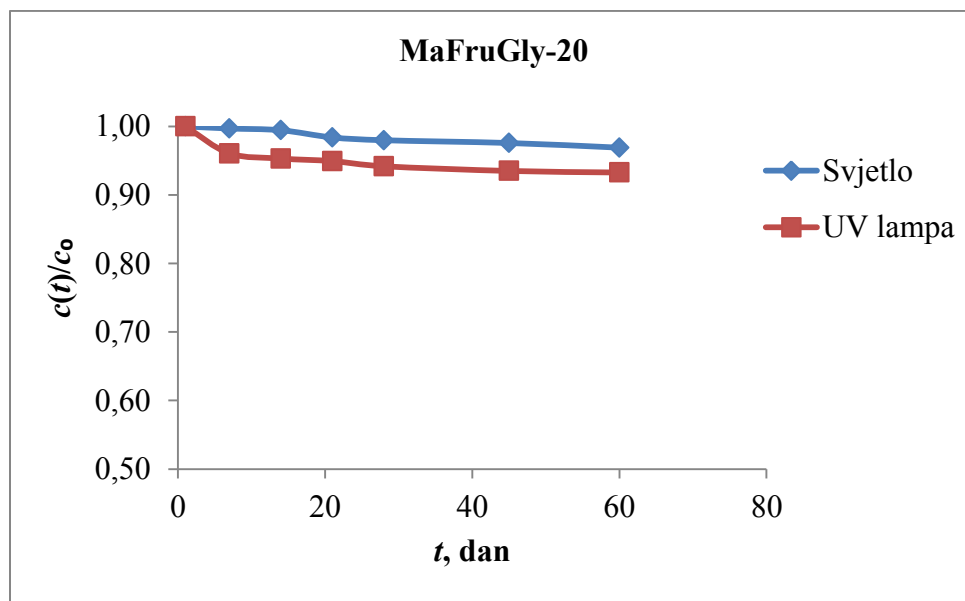


Slika 27. Promjena koncentracije polifenola u NADES-u u višestupnjevitoj ekstrakciji (NADES sa 30 % vode)

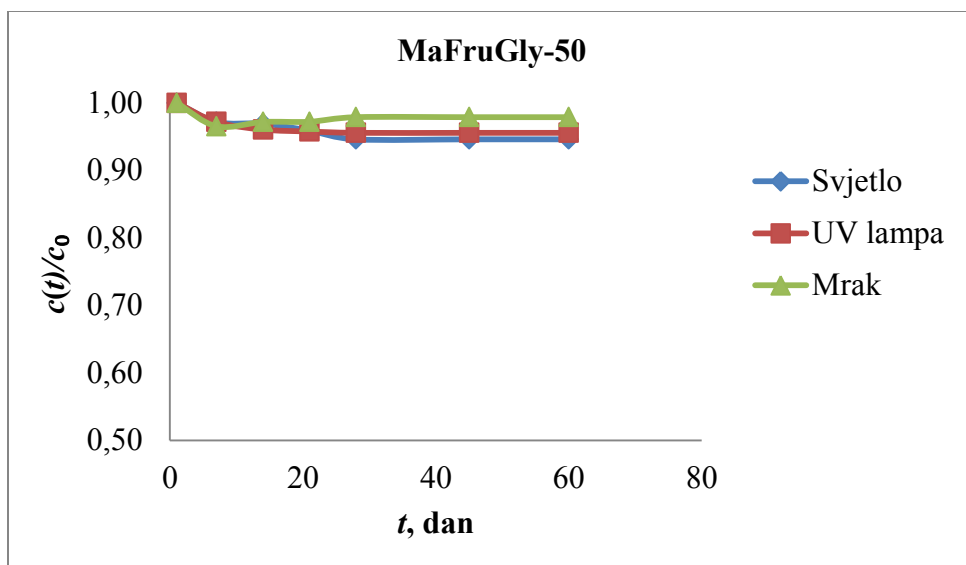


Slika 28. Učinkovitost NADES-a nakon prve ekstrakcije

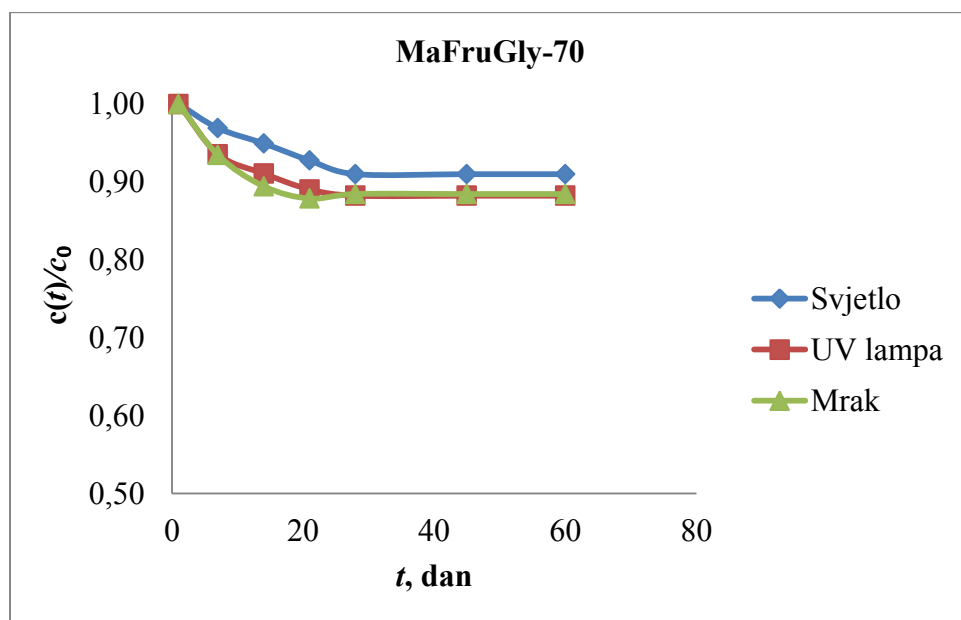
4.5. Stabilnost fenola



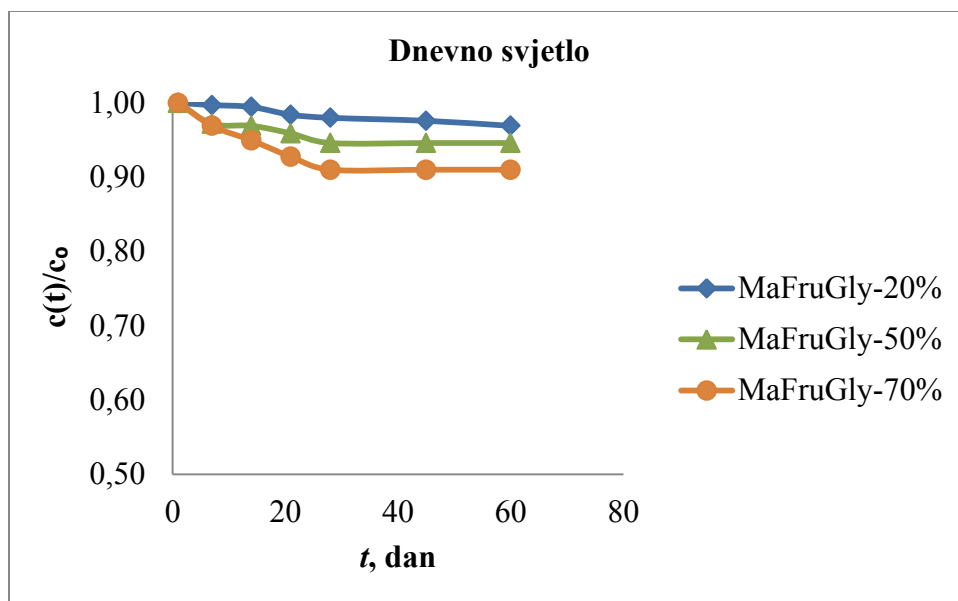
Slika 29. Promjena koncentracije fenola NADES-a s 20 % vode tokom 2 mjeseca u uvjetima na dnevnom svjetlu te pod UV lampom



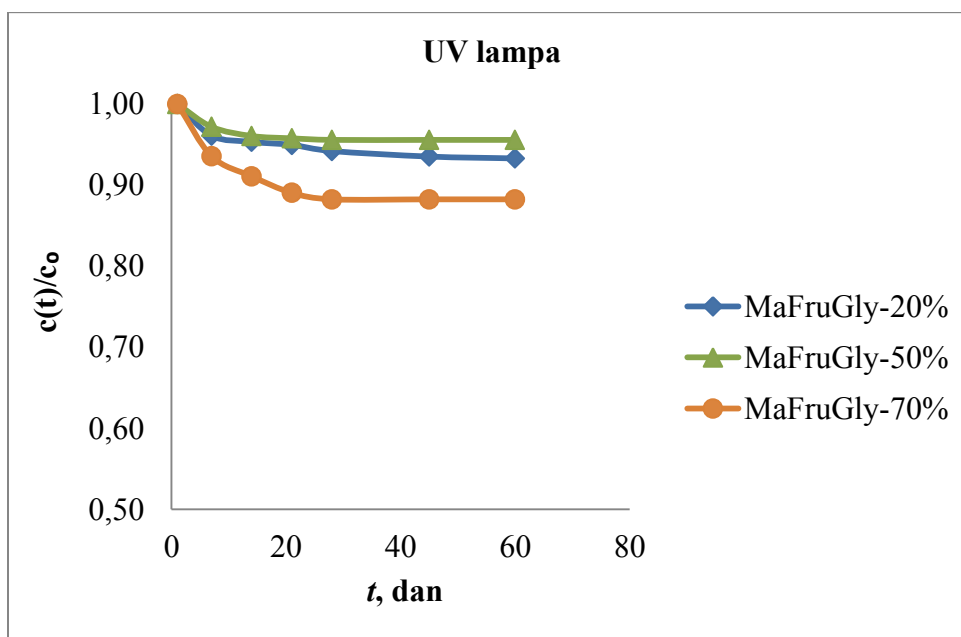
Slika 30. Promjena koncentracije fenola NADES-a s 50 % vode tokom 2 mjeseca u uvjetima na sobnoj temperaturi, pod UV lampom i u mraku



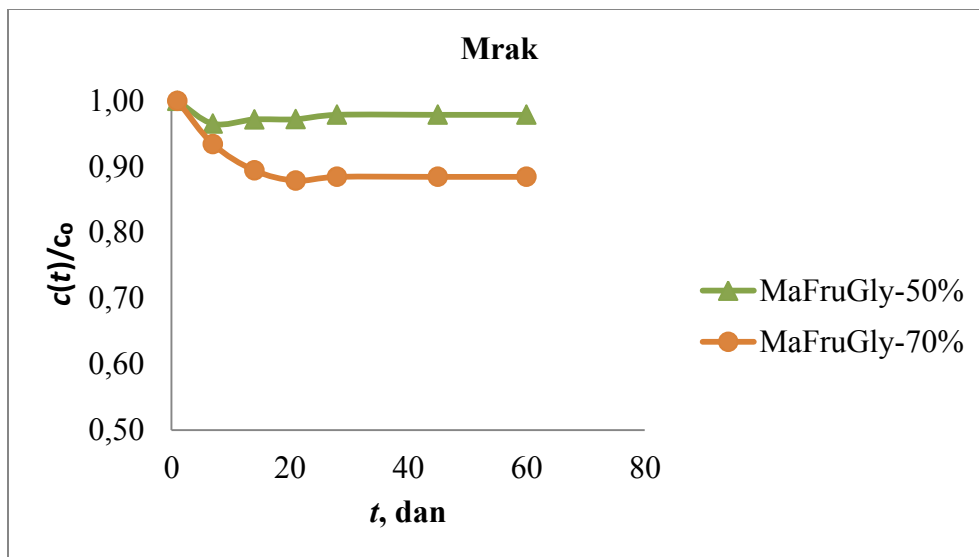
Slika 31. Promjena koncentracije fenola NADES-a sa 70 % vode tokom 2 mjeseca u uvjetima na sobnoj temperaturi, pod UV lampom i u mraku.



Slika 32. Promjena koncentracije fenola u NADES-u s 20, 50 i 70 % vode tokom 2 mjeseca na dnevnom svjetlu.

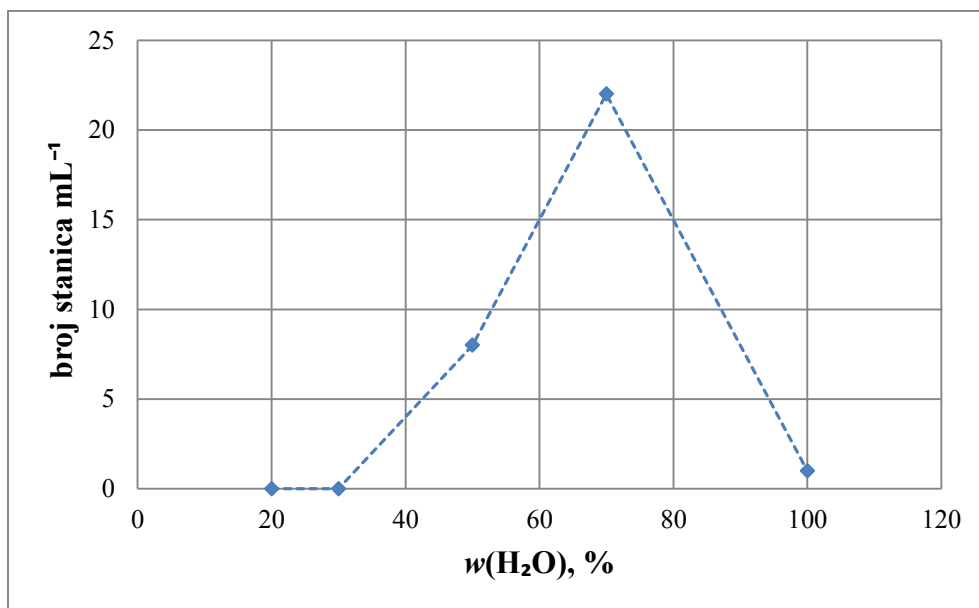


Slika 33. Promjena koncentracije fenola u NADES-u s 20, 50 i 70 % vode tokom 2 mjeseca pod UV lampom.

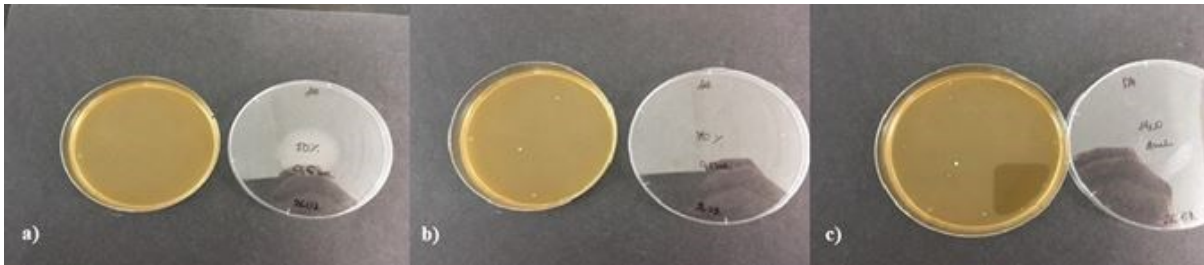


Slika 34. Promjena koncentracije fenola u NADES-u s 50 i 70 % vode tokom 2 mjeseca u mraku.

4.6. Mikrobiološko ispitivanje



Slika 35. Broj stanica razvijenih na NADES-u sa 20, 30, 50 i 70 % vode te 100%-tnoj H₂O.



Slika 36. Prikaz razvijenih gljiva na a) NADES-u s 50% vode, b) NADES-u sa 70% vode te c) u vodi.

4.7. Ravnotežna koncentracija polifenola

Tablica 5. Definirani parametri za izračun koeficijenta prijenosa tvari.

A, m^2	$c^*, \text{kg/m}^3$	$c(t), \text{kg/m}^3$	$\Delta c, \text{kg/m}^3$	$K, \text{m/s}^1$
4,74	1,820	0,551	1,269	$1,011 \cdot 10^{-9}$

5. RASPRAVA

Neadekvatno odlaganje komine masline predstavlja ekološku prijetnju okolišu, no komina ujedno sadrži i vrijedne sastojke koji se mogu dalje iskoristiti. Jedan od takvih primjera su polifenoli koji se u velikom postotku zadržavaju u krutom ili tekućem otpadu nakon proizvodnje maslinovog ulja. Vrijednost polifenola se očitava u antioksidativnom djelovanju, odnosno u mogućnosti primjene kao benefita ljudskom zdravlju u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog čega dobiva sve veću pozornost kroz različita istraživanja. Fenolne spojeve moguće je odvojiti iz komine masline procesom ekstrakcije NADES-a koji ovaj proces čine "zelenim". Nakon provedene ekstrakcije fenola iz komine primjenom NADES-a (MaFruGly), pratila se stabilnost prirodnih eutektičkih otapala pri različitim uvjetima, odnosno na dnevnom svjetlu, UV svjetlu te u mraku.

Prvi korak bila je priprema komine masline. Naime, kominu masline potrebno je čuvati na niskim temperaturama da ne bi došlo do razgradnje polifenola koje je potrebno ekstrahirati. Prije ekstrakcije, kominu je potrebno odlediti i osušiti na 60 °C kako bi se uklonio višak vode. Temperatura sušenja od 60 °C je utvrđena prijašnjim istraživanjima koje je pokazalo da sušenje na višim temperaturama od 60 °C dovodi do skupljanja pora i smanjenja specifične površine komine. [35-36] Posljedica toga je smanjenje kontaktne površine između komine i kapljevine što dovodi do smanjenja djelotvornosti procesa. Sušenjem na 60 °C, uklonjeno je 45 % vode iz početne mase vlažne komine. Nakon sušenja, komina je usitnjena u električnom mlinu te su zaostale koštice maslina izdvojene prosijavanjem kroz sito promjera očica 800 µm. Na slici 22 prikazana je raspodjela veličina usitnjenih čestica komine masline gdje se može vidjeti da je najveća gustoća raspodjela čestica veličine oko 190 µm dok srednja veličina čestica iznosi 93,0 µm. Pomoću uređaja *Micromeritics Accupyc 1330* određena je gustoća komine masline od 1,2982 g/cm³.

Budući da komina masline u sebi sadrži ostatke ulja, u Soxhelt aparaturi je provedeno oduljivanje. Oduljivanje je završeno nakon 4 sata. Kao rezultat, na filter papiru zaostaje oduljena komina koja se dalje koristi za eksperimente (slika 23.), a u tikvici heksan i uklonjeno ulje što se vidi na slici 24. Iskorišteni heksan, zajedno sa ekstrahiranim uljem se dalje ne koristi što je nedostatak procesa. Da bi se izbjeglo nastajanje većih količina zagađenog organskog otapala,

potrebno je razdvojiti ulje i heksan u rotacijskom vakuum isparivaču te regenerirani heksan ponovno koristiti.

Za uspješnu provedbu procesa ekstrakcije potrebno je pripremiti niskotemperaturna prirodna eutektička otapala te provesti karakterizaciju, kao što je prethodno provedeno i na krutini. Niskotemperaturna prirodna eutektička otapala se pripremaju miješanjem jabučne kiseline, fruktoze i glicerola u molnom omjeru 1:1:1 (MaFruGly) uz različite masene udjele vode (20, 50 i 70 mas %). Tako pripremljena otapala sa 20, 50 i 70 % vode, korištena su za praćenje stabilnosti koncentracije polifenola u NADES-u nakon ekstrakcije. Pripravljenim otapalima određena je gustoća te se može uočiti da se gustoća smanjuje s povećanjem udjela vode, odnosno najveću gustoću ima MaFruGly s 20 % vode ($1,342 \text{ g/cm}^3$), dok najmanju gustoću ima MaFruGly sa 70 % vode koja iznosi $1,119 \text{ g/cm}^3$. U tablici 4, je navedena i viskoznost otapala te indeks loma koji također padaju s povećanjem udjela vode. Ovakav trend je očekivan, budući da se radi o aditivnim fizikalnim svojstvima te se dodatkom vode, koja ima nižu gustoću, viskoznost i indeksa loma, vrijednosti smanjuju. Posljedica visoke viskoznosti je teže rukovanje sa otopinom što automatski utječe i na samu provedbu ekstrakcije zbog otežanog miješanja te posljedično moguće niže učinkovitosti procesa. Kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije moguće je, osim dodatka vode, povisit temperaturu provedbe procesa. Visoka viskoznost prirodnih eutektičkih otapala (NADES) posljedica je nastanka mreže vodikovih veza u DES-u, što rezultira nižom pokretljivošću molekula te većom viskoznošću otapala. Velika veličina iona i vrlo mali volumen većine NADES-a kao i druge sile poput elektrostatičke ili van der Waalove mogu doprinijeti njihovoj visokoj viskoznosti zbog utjecaja na smanjenje pokretljivosti molekula. Upravo zbog relativno visoke viskoznosti, većina eutektičkih otapala pokazuje slabu ionsku provodljivost (oko 2 mS/cm na sobnoj temperaturi) što se vidi iz tablice 4. [32] Kod vrijednosti pH, situacija je malo drugačija. Naime, vrijednost pH svih otapala je vrlo mala, oko 1,0-1,5 što upućuje na jaku kiselost, odnosno na jake vodikove veze između HBD i HBA uz prisustvo vode.

Struktura NADES-a pri različitim udjelima vode ispitana je FTIR analizom, slika 26. Iz prikazanih spektara vidljivo je da se povećanjem udjela vode smanjuje intenzitet apsorpcije veza u NADES-u, a povećava se intenzitet apsorpcije veza O-H i H-O-H, karakterističnih za vodu. Također, vidimo da voda i NADES sa 70 % vode nemaju pikove pri 1716 i 2940 cm^{-1} , koji

su karakteristični za NADES i vidljivi su s 20, 30 i 50% vode. Iz toga možemo zaključiti da je pri 70% vode došlo je do narušavanja strukture NADES-a.

Koliko polifenola može ekstrahirati NADES pokazuje provođenje višestupnjevite ekstrakcije u kojoj se koristi, kroz više stupnjeva, uvijek nova komina u istom NADES-u, odnosno onom prethodno isfiltriranom nakon svakog stupnja ekstrakcije. Vidljivo je na slici 26 kako se koncentracija fenola iz stupnja u stupanj povećava. U prva tri stupnja je povećanje koncentracije fenola veće, dok provođenje sljedeća tri pokazuju smanjenje povećanja. U 5. i 6. stupnju vidljivo je da se koncentracija fenola neznatno mijenja što ukazuje na to da je postignuta konstantna koncentracija fenola, odnosno kako je u 5 stupnjeva ekstrakcije ekstrahirana maksimalna količina polifenola čime je određen kapacitet NADES-a pri izdvajanju polifenola iz komine. Tako postignut kapacitet NADES-a iznosi 27,72 mg_F/g_{ST} (miligrama fenola po gramu suhe tvari). Alu'datt i sur. [18] su ekstrakciju polifenola uspješno proveli unutar 3 stupnja. Koristili su također kominu masline kao izvor polifenola, a prilikom provođenja ekstrakcije izabiru metanol kao otapalo. Krajnji rezultat im je ukupna koncentracija unutar sva 3 stupnja, odnosno 3,32 mg/g_{ST}. Iako je NADES prirodan, 2 dodatna stupnja troše više energije i vremena te su financijski lošija opcija. No, uzevši u obzir kako je NADES prilično jeftin, bolji za okoliš te kako je njegova regeneracija ponekad i nepotrebna te se zajedno sa ekstrahiranom tvari može koristiti u daljnjim procesima industrije, NADES se ipak pokazuje kao bolja opcija.

Na slici 27. prikazana je promjena koncentracije polifenola u drugom stupnju kada se koristi svježiji NADES za daljnju ekstrakciju polifenola. U prvom stupnju ekstrakcije, ekstrahirano je 10,97 mg_F/g_{ST}, dok je u drugom stupnju izdvojeno 2,99 mg_F/g_{ST}. U prvom stupnju izdvojena količina polifenola odgovara koncentraciji u stacionarnim uvjetima, dok je u drugom stupnju svježiji NADES ekstrahirao dodatnu količinu polifenola.

Stabilnost fenola, odnosno održavanje koncentracije ekstrahiranog fenola konstantnim u NADES-u, proučeno je kroz period od dva mjeseca pri različitim uvjetima. Tako je MaFruGly s 20 % vode praćen pod UV svjetlom te na dnevnom svjetlu. Iz slike 28. može se uočiti mali pad koncentracije polifenola za oba uvjeta, odnosno pod UV svjetlom koncentracija pada za 7 %, dok na dnevnom svjetlu koncentracija pada za samo 3 %. Također se može uočiti kako je u prva dva tjedna pad koncentracije najveći, bez obzira na uvjete, nakon čega koncentracija neznatno pada ili ostaje konstantna. Iz navedenog se može zaključiti da se polifenoli u otapalu s 20 % vode

najbolje čuvaju pri dnevnom svjetlu. Nakon toga, slijedi MaFruGly s 50 % vode koji je osim pod UV i dnevnim svjetlom praćen i u mraku. Na slici 29. vidljivo je slično ponašanje otapala kao i u prethodnom slučaju. Pod UV svjetlom koncentracija polifenola pada za 4 %, pod dnevnim svjetlom 5 %, dok se u mraku koncentracija smanjuje za 2 %, što su najbolji uvjeti za čuvanje polifenola u NADES-u s 50 % vode.

Sljedeće proučavano otapalo je MaFruGly sa 70 % vode koji praćen u svim uvjetima kao i NADES s 50 % vode. Na slici 30., može se uočiti veći pad koncentracije polifenola nego kod prijašnja dva otapala.

Uspoređujući međusobno otapala pri različitim uvjetima, (slike 31 i 32) vidljiva je promjena koncentracije polifenola na dnevnom i UV svjetlu gdje se koncentracija polifenola slično mijenja u NADES-u s 20 % i 50 % vode, dok je stabilnost polifenola u NADES-u sa 70 % vode više narušena. Sličan trend vidljiv je i na slijedećoj slici (slika 33.), gdje je ponovno došlo do većeg pada koncentracije polifenola u NADES-u sa 70 % vode u mraku. Ovo je u skladu s prethodno izvedenim zaključkom o degradaciji veza u NADES-u s većim količinama vode (slika 26.).

U svrhu određivanja mikrobiološke aktivnosti ispitana je prisutnost bakterija i gljiva (kvasci i plijesan) u svim pripremljenim otapala. U otapalima s 20 i 30 % vode nisu se razvile ni bakterije ni gljive, dok otapala s 50 i 70 % vode ne razvijaju bakterije, ali razvijaju gljive.

Za određivanje koeficijenta prijenosa tvari, bilo je prvo potrebno utvrditi ravnotežnu koncentraciju fenolnih spojeva iz komine masline. Utvrdivši eksperimentalno kako je ravnotežna koncentracija fenolnih spojeva iz komine masline $1,820 \text{ kg/m}^3$, iz jednadžbe 1 izračunat je koeficijent prijenosa tvari koji iznosi $6,081 \cdot 10^{-9} \text{ kg/s}$. Pod pretpostavkom da debljina graničnog sloja iznosi manje od 1 mm, iz dobivene vrijednosti koeficijenta prijenosa tvari može se odrediti red veličine difuzijskog koeficijenta, oko 10^{-12} , što je u skladu s literaturnim vrijednostima za sustave kapljevine krutina.

Dobiveni rezultati pokazuju da je obzirom na smanjenje viskoznosti poželjno dodati veću količinu vode u NADES. Međutim dodatkom više od 50 mas % vode dolazi do degradacije NADES-a, ali i smanjene stabilnosti ekstrakta. Također, veće količine vode pogoduju nastanku gljiva u uzorcima. Dobivanje stabilnih ekstrakata (konstantne koncentracije polifenola i dobre mikrobiološke stabilnosti) otvara mogućnost direktne primjene ekstrakata u kozmetici.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitana je stabilnost ekstrahiranih polifenolnih spojeva u prirodnim eutektskim otapalima kroz period od dva mjeseca u uvjetima dnevnog svjetla, UV svjetla te u mraku, a dobiveni rezultati pokazuju sljedeće:

- ✓ Povećanjem udjela vode pada vrijednost gustoće, viskoznosti i indeksa loma. Vrijednost pH je za sva pripremljena otapala vrlo niska.
- ✓ Prirodna eutektska otapala imaju relativno visoku viskoznost koja znatno pada s povećanjem udjela vode. Pripremljena prirodna eutektska otapala također pokazuju slabu ionsku provodljivost.
- ✓ Maksimalna, odnosno konstantna koncentracija polifenola se uspostavlja nakon 5 stupnjeva ekstrakcije i iznosi 27,72 mg_F/g_{ST}.
- ✓ MaFruGly s 30 % vode ekstrahira gotovo 80 % fenola koji se nalazi u komini masline što čini proces ekstrakcije učinkovitim.
- ✓ Koncentracija fenola u periodu od dva mjeseca neznatno pada upotrebom MaFruGly s 20 % i 50 % vode (ne više od 7 %), dok otapalo sa 70 % vode pokazuje veće smanjenje stabilnosti.
- ✓ Najbolji uvjeti očuvanja ekstrahiranih polifenola su u mraku i u ekstraktima s manjim udjelom vode.
- ✓ Otapala sa 20 i 30 % vode nisu razvili ni bakterije ni gljive, dok otapala sa 50 i 70 % vode ne razvijaju bakterije, ali razvijaju gljive.
- ✓ Koeficijent prijenosa tvari iznosi $6,081 \cdot 10^{-9}$ kg/s.

7. POPIS SIMBOLA

Popis kratica i indeksa

Abs	apsorbancija
BET	Brunauer-Emmet-Teller metoda određivanja specifične površine
Cat ⁺	kation
ChCl	čolin klorid
DES	eutektičko otapalo (<i>eng. deep eutectic solvent</i>)
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom signala
HBA	akceptor vodikove veze
HBD	donor vodikove veze
<i>l</i>	kapljevinina (<i>eng. liquid</i>)
mg _F /g _{ST}	miligram fenola po gramu suhe tvari
NADES	prirodno eutektičko otapalo (<i>eng. natural deep eutectic solvent</i>)
<i>s</i>	krutina (<i>eng. solid</i>)
ST	suha tvar

Popis simbola

<i>A</i>	apsorbancija
<i>A</i>	površina izmjene tvari, m ²
<i>c(t)</i>	koncentracija u vremenu <i>t</i> , kg m ⁻³
<i>c₀</i>	koncentracija u vremenu <i>t</i> =0, kg m ⁻³
<i>c*</i>	ravnotežna koncentracija, kg m ⁻³
Δc	razlika koncentracija, kg m ⁻³

$dQ_3(x)$	masena gustoća raspodjele, %
η	dinamička viskoznost, Pas
γ	masena koncentracija, mg/dm ³
$1/\lambda$	valni broj, cm ⁻¹
κ	ionska provodnost, S m ⁻¹
K	ukupni koeficijent prijenosa tvari, m s ⁻¹
M	molarna masa, gmol
n_D	indeks loma
ρ	gustoća, kg/m ³
T_T	temperature tališta, °C
T_V	temperature vrelišta, °C
t	vrijeme, s
w	maseni udio, %
x	veličina čestica, μm
z	broj molekula

8. LITERATURA

- [1] <https://hr.wikipedia.org/wiki/Maslina> (pristupljeno 2.06.2019.)
- [2] <https://www.healthdiaries.com/eatthis/first-cold-pressed-and-cold-pressed-extra-virgin-olive-oil.html> (pristupljeno 2.06.2019.)
- [3] <http://www.madehow.com/Volume-3/Olive-Oil.html> (pristupljeno 2.06.2019.)
- [4] <https://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-basics/olive-oil-grades/olive-pomace-oil/6210> (pristupljeno 2.06.2019.)
- [5] <https://thegreenvegans.com/why-olive-oil-is-bad-for-the-environment/> (pristupljeno 2.06.2019.)
- [6] G. Baniyas, Ch. Achillas, Ch. Vlachokostas, N. Moussiopoulos, M. Stefanou, Environmental impacts in the life cycle of olive oil: A literature review, *Journal of the science of Food and Agriculture*, 97(6), 1686-1697
- [7] I. A. Pinho, D. V. Lopes, R. C. Martins, M. J. Quina, Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds, *Chemosphere*, 2017
- [8] L. G. Wade, Phenol: Chemical compound, *Encyclopedia Britannica*, 1998; Dostupno: <https://www.britannica.com/science/phenol#ref278042>
- [9] <http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/P/phenol.html> (pristupljeno 9.6.2019.)
- [10] M. Škerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. Rižner Hraš, M. Simonič, Ž. Knez, Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chemistry* 89 (2005) 191–198
- [11] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic-acid> (pristupljeno 9.6.2019.)
- [12] https://hr.wikipedia.org/wiki/Bisfenol_A (pristupljeno 9.6.2019.)
- [13] T. Jewell, A. Carter, What are the Medical and Health Uses for Phenol?, *Healthline*, 2018; Dostupno: <https://www.healthline.com/health/what-is-phenol>
- [14] A. Arnarson, Antioxidants Explained in Human Terms, *Healthline*, 2017; Dostupno: <https://www.healthline.com/nutrition/antioxidants-explained>
- [15] M. H. Alu'datt, I. Alli, K. Ereifej, M. N. Alhamad, A. Alsaad, T. Rababeh, Optimisation and characterisation of various extraction conditions of phenolic compounds and antioxidant activity in olive seeds, *Natural Product Research*, 25(9) (2011) 876-889

- [16] S. Hättenschwiler, P. M. Vitousek, The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling, *Trends in Ecology & Evolution*, 15(6) (2000) 238-243
- [17] A. Shishov, A. Bulatov, M. Locatelli, S. Carradori, V. Andruch, Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review, *Microchemical journal* 135 (2017) 33-38
- [18] M. H. Alu'datt, I. Alli, K. Ereifej, M. Alhamad, A. R. Al-Tawaha, T. Rababah, Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake, *Food Chemistry*, 123(1) (2010) 117–122
- [19] A. Sander, Jedinične operacije u ekoinženjerstvu (1. dio); Toplinski separacijski procesi (interna skripta), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.
- [20] <https://www.sciencedirect.com/topics/chemical-engineering/extraction> (pristupljeno 11.6.2019.)
- [21] G. Hamburg, Thermal Process Engineering: Liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction, 2014, dostupno: https://www.gunt.de/images/download/extraction_english.pdf
- [22] T. Voeste, K. Weber, B. Hiskey, G. Brunner, Liquid–Solid Extraction, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2006) 310-336
- [23] M. Ikeda, Public health problems of organic solvents. *Toxicology Letters*, (1992). 191–201.
- [24] J. H. Clark, S. J. Tavener, *Alternative Solvents: Shades of Green*, *Organic Process Research & Development*, 11(1) (2007) 149–155
- [25] N. Uzma, B. M. Khaja, M. Salar, B. S. Kumar, N. Aziz, M. A. David, and V. D. Reddy, Impact of Organic Solvents and Environmental Pollutants on the Physiological Function in Petrol Filling Workers 5(3) (2008) 139–146
- [26] A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R. L. Reis, A. R. C. Duarte, Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2(5) (2014) 1063–1071
- [27] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chemical Communications* 9 (1) (2003) 70- 71
- [28] A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids, *Journal of the American Chemical Society* 126 (29) (2004) 9142–9147

- [29] S. Mouden, P.G. L. Klinkhamer, Y. Hae Choi, K.A. Leiss, Towards eco-friendly crop protection: natural deep eutectic solvents and defensive secondary metabolites, *Phytochemistry Reviews*, Volume 6 (5) (2017) 935-951
- [30] Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Analytica Chimica Acta* 766 (2013) 61–68
- [31] P. Liu, J.-W. L.P. Mo Hao, Z.H. Zhang, Recent advances in the application of the deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions; *RSC Adv.* (2015) 548-675
- [32] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme, Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chemical Society Reviews* 41(21) (2012) 7108-7146
- [33] Y. Dai, E. Rozema, R. Verpoorte, Y. H. Choi, Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents, *Journal of Chromatography A* 1434 (2016) 50–56
- [34] E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chemical Reviews* 114(21) (2014) 1060–11082
- [35] L. Đuran, Ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine masline, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, rujan 2017.
- [36] N. Marolt, A. Udovčić, Poboljšanje učinkovitosti ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine masline, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.

ŽIVOTOPIS

Marija Komljen je rođena 30.09.1995. u Zagrebu. Srednju školu završava u Svetom Ivanu Zelini u Općoj gimnaziji Srednje škole Dragutina Stražimira sa odličnim uspjehom i postignutim trećim mjestom na državnom natjecanju sa istraživačkim radom na temu “Brojnost pjegavog daždevnjaka na području Svetog Ivana Zeline,„. Godine 2014. upisuje smjer Kemijskog inženjerstva na Fakultetu Kemijskog inženjerstva i tehnologije i održava prosjek koji trenutno iznosi 4,529. Prediplomski studij brani sa temom završnog rada “Kitozanski nosači za uklanjanje industrijskih bojila iz vodene otopine,„ pod mentorstvom prof. dr. sc. Marice Ivanković. Obaveznu studentsku praksu odraduje u Plivi u Zavodu za kontrolu kvalitete 2016.-te godine. Tokom četvrte godine studija sudjeluje na SMLKI 2018, XII. Susretu mladih kemijskih inženjera sa temom “Pročišćavanje biodizela ekstrakcijom u mikrostrukturiranom uređaju,„ sa kolegama Martinom Koren i Igorom Lukanovićem. Prilikom prijave na natječaj, 2018.-te godine, dobiva studentski posao u Plivi u Pogonu za injekcije, gdje radi i danas. Godine 2019.-te dobiva Rektorovu nagradu za rad sa temom “Uklanjanje imidakloprida iz simuliranih otpadnih voda naprednim oksidacijskim procesom” zajedno sa koautorima Martinom Koren i Igorom Lukanovićem.