

Ekstrakcija piperina iz različitih vrsta papra: odabir ekološki prihvatljivog otapala

Opačak, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:238036>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Andrea Opačak

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Andrea Opačak

DIPLOMSKI RAD

Ekstrakcija piperina iz različitih papra: odabir ekološki prihvatljivog otapala

Mentor: prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, siječanj 2023.

Eksperimentalni dio ovog istraživanja proveden je na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo i Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Sander na pomoći, vodstvu i neizmjernom strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Također, zahvaljujem se dr. sc. Ani Petračić, doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić, mag. ing. oecoing. Martini Miloloža, prof. dr. sc. Marku Rogošić i mag. ing. Mia Radović na pomoći i trudu pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili najveća podrška.

SAŽETAK

Kako bi se postigli ciljevi održivog razvoja, razvoj novih zelenih otapala trenutno je u žarištu istraživanja. Zbog lakog procesa pripreme, niske cijene, potencijalne biorazgradivosti i zanemarive toksičnosti niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutentic Solvents* (DES)) prepoznata su kao dobra zamjena organskim otapalima. Zahvaljujući sve većem interesu i razvoju niskotemperaturnih eutektičkih otapala sve se više primjenjuju kao mediji za ekstrakciju, kromatografiju te u biomedicinske svrhe u proteklih nekoliko godina. Cilj ovog rada bio je utvrditi koje niskotemperaturno eutektičko otapalo je najpogodnije za ekstrakciju piperina iz bijelog i zelenog papra. Zrna papra usitnjena su i prosijana te su dobivene tri veličinske frakcije. Piperin je nepolarna molekula te su zbog toga za ekstrakciju su pripravljena četiri hidrofobna otapala, od kojih su dva na bazi timola te dva na bazi mentola. Modelom COSMO-RS predviđena je topljivost piperina u pripremljenim otapalima te je provedena ekstrakcija sa svim veličinskim frakcijama papra. Koncentracija piperina u dobivenim uzorcima utvrđena je UV/Vis spektroskopijom, bez prethodne obrade ekstrakata. Također, disk-difuzijskim testom ispitano je antimikrobno djelovanje ekstrakata, a test toksičnosti čistih otapala proveden je pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*.

Ključne riječi: ekstrakcija, papar, piperin, niskotemperaturna eutektička otapala, antimikrobna aktivnost

ABSTRACT

In order to achieve the goals of sustainable development, the development of new green solvents is currently in the focus of research. Due to the easy preparation process, low price, potential biodegradability and negligible toxicity, Deep Eutentic Solvents (DES) are recognized as a good substitute for organic solvents. Thanks to the increasing interest and development of deep eutentic solvents, it is increasingly used as a medium for extraction, chromatography and for biomedical purposes in the past few years. The aim of this work was to determine which deep eutentic solvent is most suitable for the extraction of piperine from white and green pepper. The peppercorns were crushed and sieved, and three size fractions were obtained. Piperine is a non-polar molecule, which is why four hydrophobic solvents are prepared for extraction, two of them are thymol-based and two are menthol-based. The solubility of piperine in the prepared solvents was predicted by the COSMO-RS model, and extraction was performed with all size fractions of pepper. The concentration of piperine in the obtained samples was determined by UV/Vis spectroscopy, without prior processing of the extracts. Also, the antimicrobial activity of the extracts was tested with the disk diffusion test, and the toxicity test of pure solvents was performed using the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*.

Key words: extraction, pepper, piperine, deep eutentic solvents, antimicrobial activity

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Taksonomija, biološki i farmakološki učinci roda <i>Piper</i>	2
2.2. Piperin.....	3
2.3. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito	4
2.4. Niskotemperaturna eutektička otapala.....	6
2.4.1. Molekularna struktura i sastav DES-a.....	7
2.5. Čimbenici koji utječu na ekstrakciju primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala	10
2.5.1. Temperatura	10
2.5.2. Toksičnost	10
2.5.3. Viskoznost.....	10
2.5.4. Trajanje ekstrakcije	11
2.5.5. Omjer otapala i uzorka	11
2.6. Ostale metode ekstrakcije piperina.....	11
2.6.1. Soxhlet ekstrakcija	12
2.6.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidima	13
2.6.3. Ultrazvučna ekstrakcija	13
2.6.4. Mikrovalna ekstrakcija	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. Cilj rada	16
3.2. Materijali	16
3.2.1. Papri	16
3.2.2. Kemikalije	16
3.3. Metode rada	16
3.3.1. Priprava otapala.....	16
3.3.2. Usitnjavanje uzoraka	17
3.3.3. COSMO-RS i eksperimentalno ispitivanje topljivosti	17
3.3.4. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito.....	18
3.4. Karakterizacija uzoraka i otapala	18
3.4.1. Granulometrijska svojstva.....	18
3.4.2. Fizikalna svojstva otapala	19
3.4.3. UV/Vis spektroskopija.....	20
3.5. Mikrobiološka analiza ekstrakata	21
3.6. Određivanje toksičnosti čistih otapala pomoću bakterije <i>Vibrio fisheri</i>	22

4.	REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1.	Topljivost piperina.....	23
4.2.	Fizikalna svojstva otapala.....	24
4.3.	Granulometrijska svojstva frakcija papra	25
4.4.	Određivanje koncentracije piperina u dobivenim ekstraktima	27
4.5.	Učinkovitost ekstrakcije	28
4.6.	Toksičnost čistih otapala	31
4.7.	Antimikrobna svojstva ekstrakta	31
3.	ZAKLJUČAK	38
4.	LITERATURA.....	39
5.	PRILOZI.....	42
	ŽIVOTOPIS	43

1. UVOD

Trenutno se u svijetu sve više zagovara održivi razvoj te je tako ravnoteža između industrijskog razvoja i zaštite okoliša važan globalni izazov. Koncept zelene kemije predlaže 5R načela uključujući: smanjenje (*reduction*), ponovnu upotrebu (*reuse*), recikliranje (*recycling*), prenamjenu (*repurpose*) i odbijanje (*rejection*). Otapala su sveprisutna u industriji i utječu na čistoću i sigurnost kemijskih procesa. Tendencija koja se pojavila u modernom kemijskom inženjerstvu je zamjena toksičnih otapala s ekološki prihvatljivijim otapalima koja zadovoljavaju kriterije zelene kemije. Mnogu su naponi uloženi u razvoj niskotemperaturnih eutektičkih otapala koja su jeftina, ekonomična te biorazgradiva, a što je još važnije, proizvode se od sigurnih, zelenih i netoksičnih komponenti. DES otapala često se nazivaju i otapalima sljedeće generacije (engl. *The next generation solvents*) te se primjenjuju u brojnim poljima uključujući katalizu, ekstrakciju, elektrokemiju te farmaciju.

Papar je jedan od najpoznatijih začina diljem svijeta, a osebujan ljuti okus ima zahvaljujući prisutnosti alkaloida piperina. Istraživanja farmakoloških učinaka piperina pokazala su da ima antioksidativna, antikancerogena, protuupalna, analgetska, insekticidna i antimikrobna svojstva. U procjeni antimikrobnih i antifungalnih aktivnosti utvrđeno je značajno djelovanje protiv različitih mikroorganizama kao što su *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* i *Candida albicans* [1]. Zbog ljekovitih i nutritivnih svojstava ovog alkaloida, javlja se potreba za pronalaskom načina njegove ekstrakcije iz različitih vrsta papra.

Cilj ovog rada bio je utvrditi koje niskotemperaturno eutektičko otapalo je najpogodnije za ekstrakciju piperina iz bijelog i zelenog papra te utvrditi toksičnost dobivenih otapala. Također, provedena je mikrobiološka analiza kako bi se utvrdila antimikrobna svojstva dobivenih ekstrakata u različitim DES-ovima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Taksonomija, biološki i farmakološki učinci roda *Piper*

Porodica Piperaceae sastoji se od oko 8 rodova i 3000 vrsta koje su rasprostranjene u toplim tropskim i suptropskim predjelima, poput Južne i Srednje Amerike te središnje Azije, a posebice u Indiji [2]. Crni papar (*Piper nigrum*) najpoznatija je vrsta porodice Piperaceae te je jedan od najranijih poznatih začina. Široko se koristi kao začin diljem svijeta, a sve veću primjenu ima i u medicini. Taksonomska klasifikacija roda *Piper* prikazana je u **Tablici 1**.

Tablica 1. Taksonomska kvalifikacija roda *Piper* [2].

Carstvo	Plantae
Podcarstvo	Tracheobionta
Superdivizija	Spermatophyta
Divizija	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Podrazred	Magnoliidae
Red	Piperales
Porodica	Piperaceae
Rod	<i>Piper</i>



Slika 1. *Piper nigrum*

Biljka crnog papra je drvenasta penjačica koja može doseći visinu i do 10 metara zahvaljujući svom zračnom korijenju. Njegovi široki zeleni listovi naizmjenično su raspoređeni. Mali cvjetovi rastu u gustim vitkim klasovima, a plodovi su zrna promjera oko 5 milimetara koja postaju žutocrvene boje kada postignu potpunu zrelost (**Slika 1**). Miris im je prodoran i

aromatičan, a okus ljut i vrlo oštar zahvaljujući prisutnosti alkaloida piperina. Biljka zahtijeva dugu kišnu sezonu, poprilično visoke temperature i djelomičnu sjenu za najbolji rast [3].

Ovisno o stupnju zrelosti razlikuju se zeleni, bijeli i crni papar (**Slika 2.**). Zeleni papar dobiva se sakupljanjem netom prije sazrijevanja, crni sušenjem zrelih plodova, a bijeli papar dobiva se tako što se ubrani plodovi drže natopljeni u vodi sve dok im se ne odvoji ljuska. Postupak se ponavlja do postizanja zadovoljavajuće čistoće te o tome ovisi kvaliteta dobivenog papra.



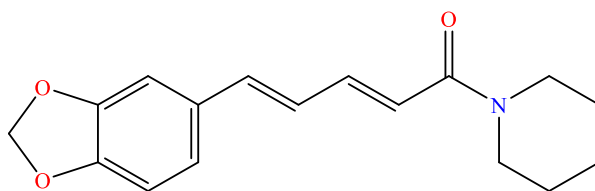
Slika 2. Zeleni, bijeli i crni papar

Osim što se koristi kao začin, papar se koristi i kao antimikrobno sredstvo protiv mnogih patogenih mikroorganizama rezistentnih na klasične lijekove. Utvrđeno je da je najučinkovitiji protiv Gram-pozitivnih bakterija kao što su *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Streptococcus faecalis*.

S druge strane, Gram-negativne bakterije poput *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* i *Escherichia coli* pokazale su manju osjetljivost na crni papar. Nadalje, ekstrakti crnog papra mogu se formulirati s metalnim nanočesticama za zaštitu poljoprivrednih usjeva od biljnih patogena [4].

2.2. Piperin

Piperin je glavna bioaktivna komponenta papra, čiji sadržaj varira od biljke do biljke koje pripadaju porodici Piperaceae, a udjeli variraju od 2 do 7,4%. Piperin je iz crnog papra prvi izolirao Hans Christian Ørsted 1819. godine. Ekstrahirao je žuti kristalni materijal molekularne formule $C_{17}H_{19}NO_3$ (**Slika 3.**) s temperaturom taljenja od 128-130°C.



Slika 3. Kemijska struktura piperina

Kasnije je razjašnjena kemijska struktura i naziv po IUPAC-u je (2E, 4E)-5-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)1-(piperidin-1-il)penta-2,4-dien-1-jedan. Piperin je slabo bazične prirode, a hidrolizom nastaju piperinska kiselina i piperidin.

Piperin se tradicionalno koristi u kineskoj i indijskoj medicini za liječenje reume, artritisa, gripe i groznice. Također, koristi se za poboljšanje cirkulacije krvi, lučenje sline te poticanje apetita. Dokazano je da pokazuje različite biološke aktivnosti kao što su antiinfektivno, antimikrobno, insekticidno, protuupalno i antidepresivno djelovanje. Piperin povećava apsorpciju i bioraspoloživost različitih lijekova, a važna uloga je i povećanje bioraspoloživosti lijekova koji se koriste u liječenju tuberkuloze [5].

Ograničavajući čimbenik u biomedicinskoj primjeni piperina je njegova slaba topljivost u vodi. Zbog te činjenice ova kemijska tvar se mora davati u visokim terapijskim dozama zbog slabe topljivosti i apsorpcije u crijevima, a visokim koncentracijama moguće je uzrokovati toksične učinke na reprodukciju i središnji živčani sustav. Provedena su mnoga istraživanja kako bi se otkrile nove formulacije piperina za poboljšanje njegove bioraspoloživosti [4].

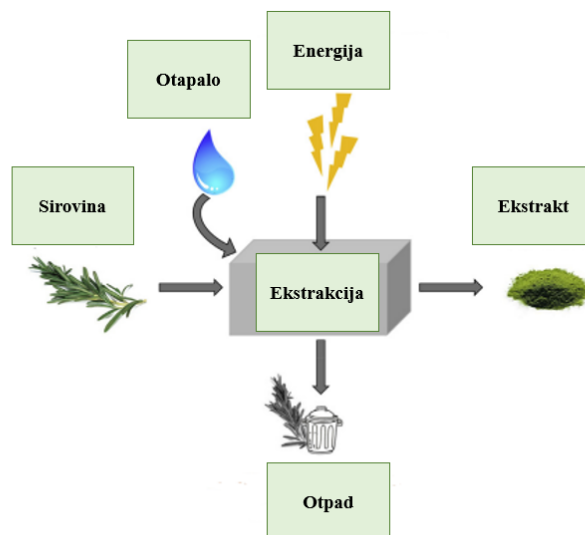
2.3. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito

Ekstrakcija čvrsto – kapljevito (engl. *Solvent liquid extraction* (SLE)) je ravnotežni separacijski proces uklanjanja jedne ili više komponenti iz čvrste smjese pomoću selektivnog otapala. Temperatura, vrijeme zadržavanja i pH znatno utječu na selektivnost i efikasnost procesa ekstrakcije. Proces se većinom provodi pri atmosferskom tlaku jer tlak ne utječe na prijenos tvari ekstrakcijom. Bitnu ulogu ima odabir pogodnog otapala koje mora biti jeftino, neotrovno i nezapaljivo. Također, kapljevina koja se koristi za ekstrakciju mora imati malu viskoznost, točku leđišta te tlak para kako bi se osiguralo lakše rukovanje i skladištenje [6].

Zelena ekstrakcija (engl. *Green extraction*) prirodnih proizvoda temelji se na osmišljavanju procesa ekstrakcije koji će smanjiti ili eliminirati potrošnju energije i naftnih otapala, a istovremeno osigurati ekstrakt visoke kvalitete. Proces ekstrakcije sastoji se od nekoliko

jediničnih operacija kao što je predobrada sirovine (sušenje, usitnjavanje i mljevenje) te naknadne obrade kapljevitoeg ekstrakta (filtracija, koncentriranje, pročišćavanje i sl.). Najvažnija operacija u procesu je ekstrakcija čvrsto-kapljevito u kojoj često dolazi do korištenja znatnih količina otapala li velike količine energije ukoliko proces nije optimiziran. Također, dobiveni ekstrakt nije uvijek siguran ukoliko bi mogao sadržavati otapalo ili denaturirane spojeve zbog ekstremnih uvjeta ekstrakcije. Cilj zelene ekstrakcije je postići veću učinkovitost i kvalitetniji ekstrakt uz smanjenje trajanja ekstrakcije, broja operacijskih jedinica, potrošnju energije, količinu otapala u procesu, utjecaj na okoliš, ekonomske troškove i količinu nastalog otpada. Posljednjih godina sve je veći interes za smanjenje utjecaja na okoliš pa su tako inovativne alternativne metode uvelike implementirane u preradu hrane, kozmetičku i farmaceutsku industriju.

Zelena ekstrakcija temelji se na razvoju i dizajnu procesa ekstrakcije koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti korištenje alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih sirovina te osigurati visokokvalitetan proizvod. Načela zelene ekstrakcije nastoje djelovati na glavne ulaze i izlaze sirovina u procesu ekstrakcije (**Slika 4.**).



Slika 4. Glavne ulazne i izlazne jedinice u procesu ekstrakcije

Da bi se dobiveni produkt smatrao „eko-ekstraktom“ mora biti (**Slika 5.**):

- prirodan
- visoke kvalitete s aktivnim i nedenaturiranim spojevima

- visoke funkcionalnosti (antioksidans, antimikrobna svojstva i sl.)
- u skladu s posebnim zakonodavstvom koje se odnosi na sektor primjene (poljoprivredno-prehrambeni, kozmetička industrija, farmaceutska industrija)
- s niskim okolišnim otiskom (određivanje LCA pristupom) [7].



Slika 5. Karakteristike koje produkt mora sadržavati kako bi se smatrao „eko-ekstraktom“

2.4. Niskotemperaturna eutektička otapala

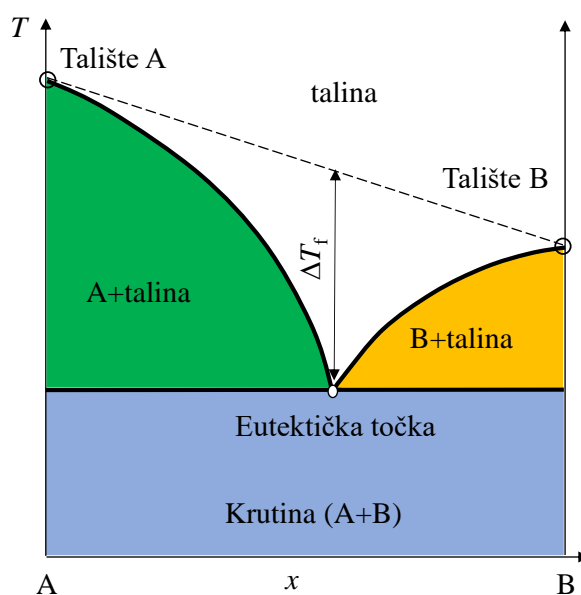
U okviru zelene kemije otapala zauzimaju strateško mjesto, a do sada, broj dostupnih zelenih otapala prilično je ograničen. Kako bi otapalo bilo kvalificirano kao zeleni medij potrebno je zadovoljiti različite kriterije kao što su dostupnost, netoksičnost, biorazgradivost, mogućnost recikliranja te niska cijena.

Niskotemperaturna eutektička otapala su vrsta otapala koja nastaju miješanjem dviju ili više komponenti te tako dobivena smjesa tvari ima točku tališta mnogo nižu od tališta svake komponente zasebno. Ova vrsta otapala može se formirati od mnogih prirodnih molekula čime se osigurava prirodni sustav otapala s niskim tlakom pare te pristupačnom cijenom čak i u industrijskom mjerilu. Velik značaj pridonosi se i tome što nije potrebno pronalaziti način za uklanjanje otapala jer prirodni DES-ovi (engl. *Natural Deep Eutentic Solvents* (NaDES)) mogu ostati u krajnjem proizvodu.

Prisutna je stalna usporedba s ionskim kapljevinama (engl. *Ionic Liquid* (IL)) jer dijele mnoge karakteristike i svojstva no potrebno je istaknuti da se zapravo radi o dvije različite vrste otapala. DES su sustavi formirani od eutektičke mješavine Lewisone ili Brønstedove kiseline i baze koje mogu sadržavati razne anionske i/ili kationske vrste te neutralne spojeve, a nasuprot

tome, ionske kapljavine su sustavi formirani prvenstveno od jedne vrste kationa i aniona. Iako su fizikalna svojstva DES-ova slična ionskim kapljavinama, njihova kemijska svojstva te područja primjene bitno se razlikuju. DES-ovi imaju nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalne ionske kapljavine poput njihove jednostavnosti pripreme i lake dostupnosti relativno jeftinih komponenti, međutim općenito su manje kemijski inertni[8]. Zbog spomenutih prednosti, postoji sve veći interes u mnogim područjima istraživanja za tako nastale eutektične smjese.

Proizvodnja DES-ova uključuje jednostavno miješanje krutih komponenti uz umjereno zagrijavanje, a temperatura pri kojoj smjesa prelazi u kapljevitost naziva se eutektička točka. Razlika u točki ledišta kod eutektičkog sustava binarne smjese A+B u usporedbi s onom teorijski idealne smjese (ΔT_f), povezana je s međusubnom interakcijom između komponenta A i B. Što je veća interakcija, veći će biti ΔT_f , a to je shematski prikazano na **Slici 6**. Kao što je vidljivo iz faznog dijagrama, temperatura i omjer komponenti dva su glavna faktora u binarnom eutektičkom sustavu [8].



Slika 6. Fazni dijagram eutektičkih otapala

2.4.1. Molekularna struktura i sastav DES-a

Molekularna struktura DES-a odnosi se na komponente koje se koriste u njegovoj pripravi. Općenito, niskotemperaturna eutektička otapala dijele se u četiri skupine:

- i. TIP I – kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe

- ii. TIP II - kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Cr, Co, Fe
- iii. TIP III – kvaterna sol Cat^+X^- i donor vodikove veze kao što su amidi, kiseline i alkoholi
- iv. TIP IV – halogenid metala i donor vodikove veze kao što su amidi i alkoholi [9].

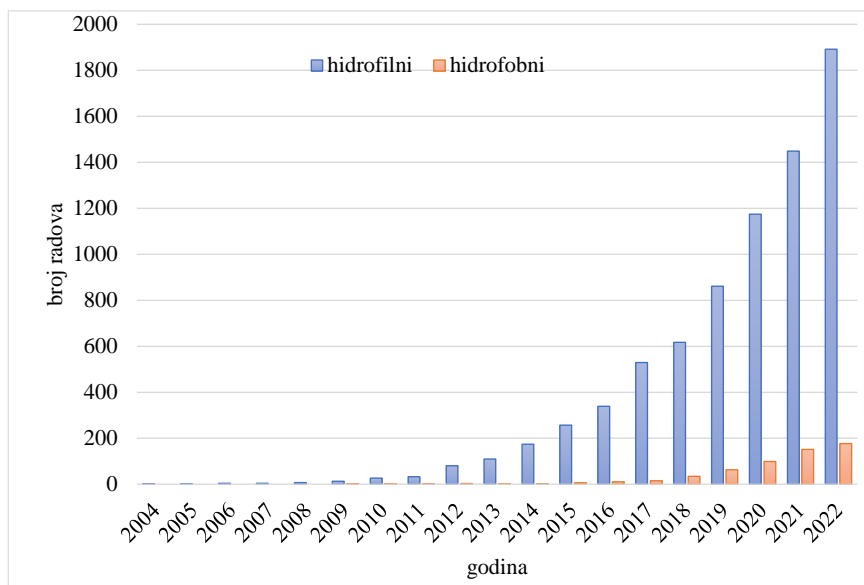
Najčešća su niskotemperaturna eutektička otapala tipa III pri čemu kvaterna amonijeva sol predstavlja akceptor vodikove veze (kolin klorid, etilamonijev klorid, betain i sl.), a najčešći donori vodikove veze su šećeri (glukoza, saharoza, ksiloza), polioli (glicerol, etilen-glikol), amidi (urea) i organske kiseline (mliječna i jabučna kiselina). Također, uz navedene komponente, voda često dolazi kao sastavnica otapala smanjujući njegovu viskoznost i gustoću.

Za provedbu ekstrakcije najvažniji čimbenik koji utječe na topljivost ciljane tvari je polarnost. Stoga, pri odabiru odgovarajućeg DES-a za ekstrakciju u odnosu na mnoge uzorke i ciljane spojeve bitno je da polarnost korištenog DES-a mora biti blizu polarnosti ciljane tvari. Većina pripremljenih DES-ova može se miješati s vodenim medijima i hidrofilnim organskim otapalima čime se ograničava njihova primjena za uzorke koji sadrže vodu ili lipofilne uzorke. Zbog takvih ograničavajućih čimbenika, sve se više pozornosti pridonosi razvoju hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (HDES).

2.4.2. Hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala

Do 2015. godine većina predstavljenih DES-ova bila je hidrofilne prirode, a puni potencijal hidrofobnih otapala pokrenut je tek nakon objave rada Krona i sur. [10] u kojem je ova vrsta otapala dobivena kombinacijom kvaterne amonijeve soli i dekanske kiseline. Marruchova grupa [11] također je izvjestila o hidrofobnom eutektičkom otapalu sastavljenom od mentola i karboksilne kiseline. Cilj ova dva znanstvena istraživanja bio je razviti hidrofobna otapala koja su stabilna u dodiru s vodom, a od tada su u tijeku aktivna istraživanja o razvoju HDES-ova i njihovoj primjeni u različitim područjima. **Slika 7.** prikazuje broj objavljenih znanstvenih članaka o hidrofilnim otapalima u usporedbi s hidrofobnim u razdoblju od 2004. do 2022. godine. Među navedenim radovima ekstrakcijom hidrofilnim DES-ovima se bavi 60,6 % a hidrofobnim čak 86,4 % (Scopus report, 13.12.2022.).

Broj hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala prilično je ograničen, a uglavnom zbog ograničenog broja jeftinih, lako dostupnih hidrofobnih soli i drugih hidrofobnih organskih prirodnih spojeva koji tvore eutektičko otapalo blizu ili ispod sobne temperature.



Slika 7. Broj publiciranih radova na temu hidrofilnih i hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala u razdoblju od 2004. do 2022. godine (Scopus report, 13.12.2022.)

Hidrofobni DES-ovi opisani u literaturi sastoje se od donora vodikove veze (*hydrogen bond donors* (HBD)) i akceptora vodikove veze (*hydrogen bond acceptors* (HBA)) koji imaju nisku mješljivost s vodom. Najviše proučavani hidrofobni DES-ovi su uglavnom pripremljeni od dugolančanih masnih kiselina (oktanska, dekanska i dodekanska kiselina) kao akceptora vodikove veze i mentola kao donora vodikove veze. Neki terpeni, poput timola, mogu djelovati i kao HBA i kao HBD. Komponente se također pripremaju u određenom molarnom omjeru, a molarni omjer 1:2 (HBA:HBD) je najčešće korišten [12]. Hidrofobni DES obično se formiraju miješanjem oba sastojka uz zagrijavanje, nakon čega se dobivena otopina hladi na sobnu temperaturu. Posebno su zanimljivi za upotrebu u vodenim sustavima, kao sredstva za ekstrakciju onečišćenja iz vode. Uz dosadašnja istraživanja dokazali su se kao vrlo efikasna sredstva za uklanjanje proizvoda (obično niske koncentracije) iz vode, ali je proces uklanjanja proizvoda iz otapala najzahtjevniji korak u njihovoj primjeni. Poznata je njihova primjena za ekstrakciju masnih kiselina, nižih alkohola, metalnih iona te hidroksimetilfurfurala iz vodenog okoliša [13].

2.5. Čimbenici koji utječu na ekstrakciju primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Mnogi su čimbenici koji utječu na učinkovitost ekstrakcije primjenom DES-ova, kao što su: temperatura, molekularna struktura i sastav DES-a, toksičnost, viskoznost, trajanje ekstrakcije, sadržaj vode, upotreba aditiva, omjer otapala i uzorka te pH.

2.5.1. Temperatura

Temperatura pri kojoj se odvija ekstrakcija utječe na trajanje ekstrakcije kao i na samu učinkovitost. Općenito, povećanjem temperature povećava se mobilnost molekula te tako ekstrahirane molekule brže difundiraju u otapalo. Također, povećanjem temperature smanjuje se viskoznost otapala koja je često visoka te otežava proces ekstrakcije. Prema literaturnim podacima, poželjni temperaturni raspon za ekstrakciju kreće se od sobne temperature (25 °C) do 60 °C. Povećanje temperature iznad 60 °C nije poželjno jer se time može ugroziti ili otapalo ili ciljani tvar, budući da su mnoge prirodne tvari osjetljive na povišene temperature, a također, potrebna je i veća količina energije za održavanje stalne temperature ekstrakcije.

2.5.2. Toksičnost

DES-ovi se smatraju sigurnim i netoksičnim ili otapalima niske toksičnosti, no ta tvrdnja može biti točna jedino u slučaju prirodnih DES-ova (NaDES) koji se sastoje od spojeva koji se pojavljuju u prirodi. Hayyan i suradnici[14] među prvima su proučavali toksičnost i citotoksičnost DES-ova koji su se sastojali od kolin klorida kao HBA i glicerina, etilen glikola, trietilen glikola i uree kao HBD. Ispitani DES-ovi i njihove komponente nisu pokazali toksične učinke protiv *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ili *Pseudomonas aeruginosa*. No, zanimljivo otkriće ove studije je da su dobivena otapala pokazala znatno veću citotoksičnost protiv *Artemia salina*, od njihovih pojedinačnih komponenti. Provedeni su *in vivo* i *in vitro* testovi toksičnosti protiv pet ljudskih stanica raka iz kojih je zaključeno da omjer HBA/HBD te struktura HBD igraju važnu ulogu u toksičnosti.

2.5.3. Viskoznost

Obično visoka viskoznost ove vrste otapala predstavlja glavni nedostatak koji može ograničiti njihovu primjenu kao otapala za ekstrakciju. Povećanje temperature može dovesti do smanjenja viskoznosti, međutim, ova opcija nije uvijek idealan izbor jer troši energiju, a neke od ciljanih tvari mogu biti toplinski osjetljive. Jednostavan način za prevladavanje ovog problema je dodavanje ko-otapala u medij za ekstrakciju. U većini slučajeva, kao ko-otapalo se koristi voda,

a moguća je i primjena otapala poput metanola. Na taj način snižava se viskoznost te se pridonosi učinkovitosti ekstrakcije.

Drugi pristup za prevladavanje problema visoke viskoznosti je iskoristiti prednost velikog broja mogućih kombinacija prirodnih spojeva iz kojih se mogu proizvesti DES-ovi te tako pripremiti otapala niske viskoznosti. Marrucho i suradnici [11] uveli su novi koncept pripreme manje polarnih otapala niže viskoznosti, miješanjem masnih kiselina različitih alkilnih lanaca ili kombinacijom mentola s raznim organskim kiselinama.

2.5.4. Trajanje ekstrakcije

Trajanje procesa ekstrakcije pokazuje male razlike u učinkovitosti procesa. Duže vrijeme ekstrakcije povećava troškove, dok skraćivanjem trajanja ekstrakcije riskiramo zaostajanjem znatnih količina ciljanih tvari u uzorku, što proces čini neučinkovitim. Vrsta ekstrakcije također definira potrebno vrijeme ekstrakcije pa tako energetski potpomognute vrste ekstrakcija zahtijevaju kraće vrijeme trajanja procesa. Općenito, korištenjem DES-a omogućeno je kraće vrijeme trajanja ekstrakcije za sve korištene metode. Vrlo dobra topljivost različitih vrsta tvari u DES-ovima, jedna je od glavnih prednosti ove vrste otapala. S obzirom da je i kapacitet ovih otapala visok, što rezultira velikom pokretačkom silom za proces prijenosa tvari, očito je da će i vrijeme trajanja ekstrakcije biti znatno kraće.

2.5.5. Omjer otapala i uzorka

Omjer uzorka i korištenog otapala također ima značajan utjecaj na ekstrakciju. Premale količine uzorka u otapalu mogu dovesti do neučinkovitosti ekstrakcije pri većem mjerilu, a s druge strane, unošenje obilne količine krutog uzorka može uzrokovati smanjenje kontaktne površine uzorka s otapalom i narušavanje kvalitete sustava. Prema dosadašnjim literaturnim podacima omjer čvrstog uzorka i otapala 1:10 pokazao se najučinkovitijim [14].

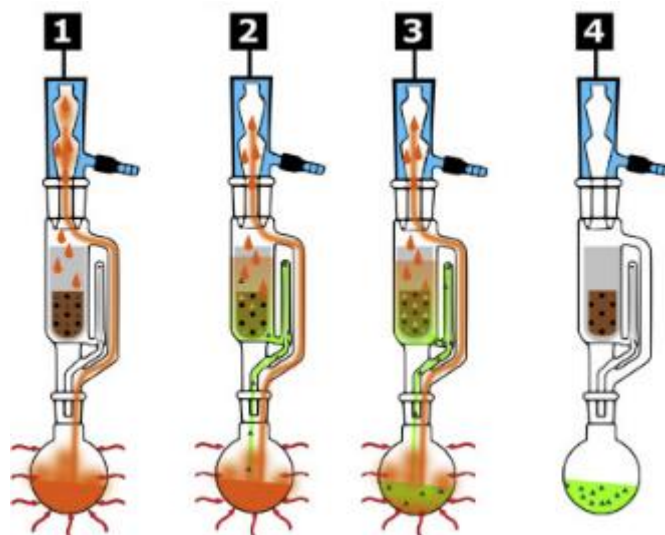
2.6. Ostale metode ekstrakcije piperina

Općenito, idealna metoda ekstrakcije trebala bi biti sveobuhvatna, brza, jednostavna i jeftina. U nekim slučajevima, trošak stupnjeva ekstrakcije i pročišćavanja čini gotovo 50 do 90% konačnog troška proizvoda te zbog toga izbor metode ekstrakcije i ekstrakcijskog otapala uvelike utječe na ekonomičnost procesa. Tradicionalne metode ekstrakcije, poput maceracije i Soxhlet ekstrakcije, obično zahtijevaju dugo vrijeme ekstrakcije i visoku temperaturu što predstavlja rizik toplinske degradacije toplinski osjetljivih spojeva. Također, upotreba velike količine otapala kao i nedovoljno velika selektivnost otapala, glavni su nedostaci konvencionalnih tehnika ekstrakcije. Suvremene tehnike ekstrakcije piperina su ekstrakcija

superkritičnim fluidima (engl. *Supercritical Fluid Extraction (SFE)*), ultrazvučna ekstrakcija (engl. *Ultrasound-assisted extraction (UAE)*) i mikrovalna ekstrakcija (engl. *Microwave-assisted extraction (MAE)*) [15].

2.6.1. Soxhlet ekstrakcija

Primjena Soxhlet metode za ekstrakciju vrijednih bioaktivnih spojeva ima dugu povijest, a danas se najčešće koristi kao referentna tehnika za procjenu učinkovitosti novorazvijenih metoda. Za Soxhlet ekstrakciju, definirana količina suhog uzorka stavlja se u posudu iznad tikvice u kojoj se zagrijava otapalo, **Slika 8**. Otapalo isparava, a stvorena para se kondenzira i tako natapa biljni materijal sve dok ne dosegne razinu prelijevanja. U Soxhlet ekstrakciji uzorak je u stalnom kontaktu sa svježim otapalom čime se ubrzava međufazni prijenos tvari i otapanje u korištenom otapalu. Iako je osnovna oprema jednostavna, ipak ova metoda ima nekoliko nedostataka kao što su dugotrajno vrijeme ekstrakcije, potrošnja znatne količine otapala i energije te onečišćenje okoliša.



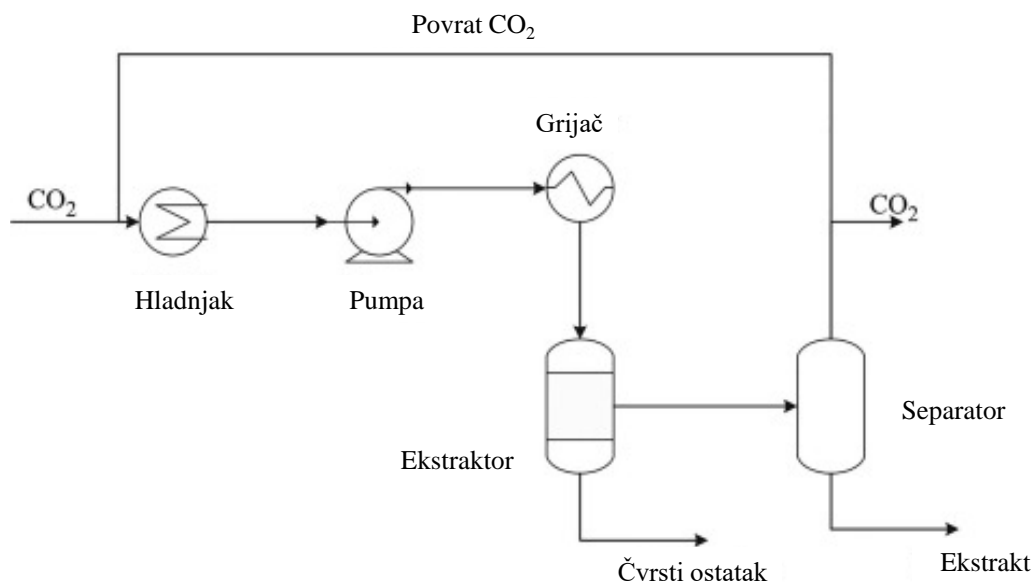
Slika 8. Postupak Soxhlet ekstrakcije [16]: 1) zagrijavanje otapala; 2) kondenzacija i ekstrakcija sa svježim otapalom; 3) kontinuirano ponavljanje postupka; 4) završetak ekstrakcije

Rajopadhye i sur. [17] ekstrahirali su piperin iz papra *Piper nigrum* Soxhlet ekstrakcijom metanolom. Vrijeme trajanja procesa bilo je osam sati, a postignuta je ekstrakcija piperina u iznosu $9,56 \pm 0,83$ mg/g. Yamaguchi i sur. [18] ekstrahirali su piperin iz zrna crnog papra pomoću tri različite metode: ekstrakcijom čvrsto-kapljevito, Soxhlet ekstrakcijom i superkritičnom ekstrakcijom ugljikovim dioksidom. Ekstrakcija metanolom trajala je 10 minuta, Soxhlet ekstrakcija metilen kloridom 20 sati, a superkritična ekstrakcija 25 minuta. Učinkovitost metoda ekstrakcije uspoređena je količinom ekstrahiranog piperina koja je

iznosila 54,9 mg/g za ekstrakciju metanolom, 52,7 mg/g za Soxhlet ekstrakciju, a superkrična ekstrakcija pokazala se najučinkovitijom s 56,6 mg izoliranog piperina po gramu suhe tvari.

2.6.2. Ekstrakcija superkričnim fluidima

Ekstrakcija superkričnim fluidima je tehnika koja se koristi za izolaciju aktivnih sastojaka iz raznih prirodnih izvora, a najčešće upotrebljavani fluid je ugljikov dioksid. Ugljikov dioksid je plinovit na sobnoj temperaturi i tlaku što njegovu uporabu čini jednostavnom jer kao konačni produkt nastaje analit bez otapala. Glavni nedostatak upotrebe ugljikovog dioksida je njegov nizak polaritet, problem koji se može riješiti dodatkom polarnih modifikatora kao ko-otapala za promjenu polariteta superkričnog fluida i povećanje njegove moći otapanja prema analitu. Na primjer, dodavanje relativno malih postotaka (1–10%) metanola u ugljični dioksid proširuje se njegov svoj raspon ekstrakcije uključujući više polarnih analita [19]. Ova tehnika ekstrakcije privukla je pozornost jer, za razliku od tradicionalnih metoda ekstrakcije, ne dolazi do toplinske degradacije i onečišćenja konačnog ekstrakta otapalima. Andrade i sur. [20] proveli su ekstrakciju piperina superkričnim CO₂ pri temperaturama 40, 50 i 60 °C te tlakovima od 150, 200 i 300 bar tijekom 4 sata, dok si Khaw i sur. [21] temperaturu održavali na 1 °C i tlak na 73,8 bara, a proces se provodio dva do pet sati. Jedini nedostatak ove metode su vrlo visoki investicijski troškovi, no zbog svih navedenih prednosti ekstrakcija superkričnim fluidima ima velike mogućnosti u industrijskoj proizvodnji.

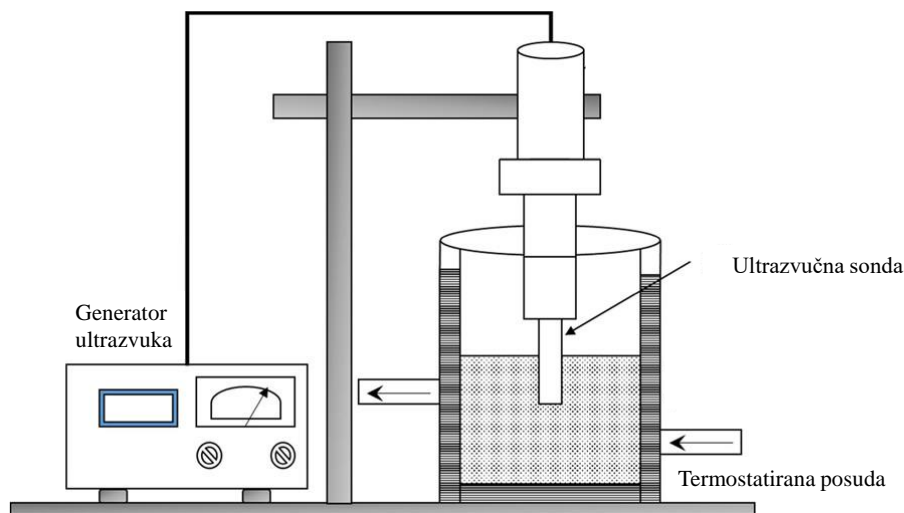


Slika 9. Shematski prikaz postrojenja za ekstrakciju superkričnim CO₂ [22]

2.6.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Ova metoda temelji se na korištenju energije zvučnih valova koji izazivaju cikluse ekspanzije i kompresije u mediju. Mehanizam ultrazvučne ekstrakcije temelji se na fenomenu kavitacije pri

čemu se povećava prijenos mase kroz straničnu stijenku [21]. Mehaničke vibracije ubrzavaju ekstrakciju spojeva pri čemu skraćuju trajanje procesa zbog utjecaja na transport mase, omjer otapala i uzorka te temperaturu. Polarnost, viskoznost, površinska napetost i tlak para otapala čimbenici su koji najviše utječu na odabir otapala. Budući da kontinuirano izlaganje ultrazvuku može dovesti do degradacije, ne preporučuje se koristiti ovu metodu u kontinuiranom načinu. Rathore i sur. [23] uložili su mnoge napore kako bi povećali prinos piperina metodom ultrazvučne ekstrakcije. Istraženi su i optimirani učinci različitih čimbenika kao što su otapalo, vrijeme ekstrakcije, omjer krutine i otapala, trajanje procesa, frekvencija i snaga ultrazvuka i temperatura. Maksimalni prinos piperina (5,8 mg/g) iz praha *Piper longum* dobiven je primjenom etanola kao ekstrakcijskog otapala za trajanje procesa od 18 minuta, sa snagom ultrazvuka od 125 W i temperaturom od 50 °C. Eksperimentalnim rezultatima dokazane su brojne prednosti ultrazvučne ekstrakcije kao što je bolje prodiranje otapala, manja ovisnost o primijenjenom otapalu, niža temperatura, a posljedično s tim i kraće ekstrakcijsko vrijeme te veći prinosi proizvoda.

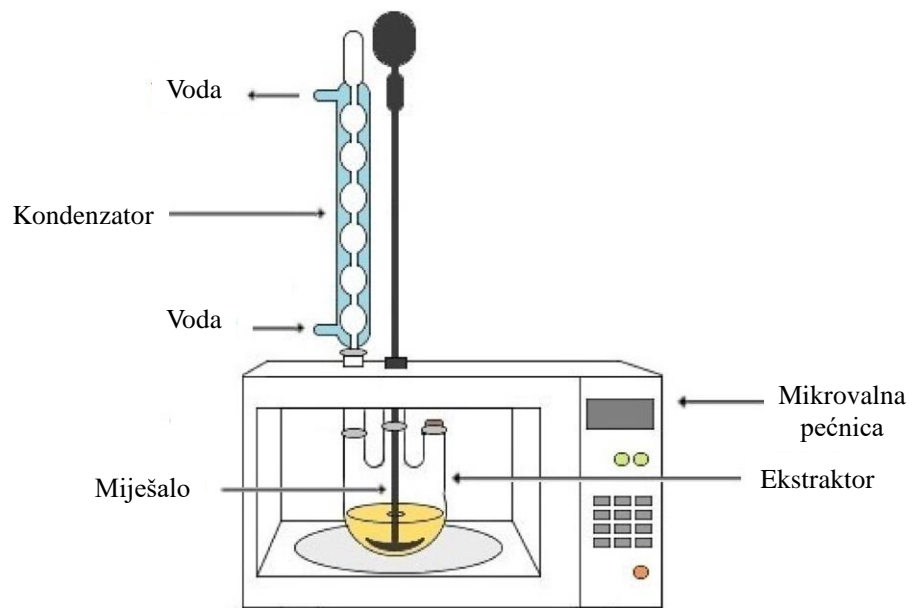


Slika 10. Ultrazvučna ekstrakcija [24]

2.6.4. Mikrovalna ekstrakcija

U posljednjih nekoliko desetljeća, mikrovalna tehnologija doživjela je velik rast u nekoliko područja. U ovoj metodi, hlapljivi organski sastojci apsorbiraju mikrovalnu energiju i isparavaju iz čvrstih matrica nakon čega slijedi njihova kondenzacija. Mikrovalna ekstrakcija smatra se relativno selektivnom tehnikom ekstrakcije jer stvorena mikrovalna energija djeluje izravno na molekule, a ciljane tvari mogu se selektivno zagrijati na temelju njihove dielektrične konstante. Svako povećanje temperature i tlaka ubrzava proces jer ekstrakcijsko otapalo može apsorbirati veće količine mikrovalne energije. U tradicionalnim metodama ekstrakcije

otapalom, prijenos tvari i topline odvija se u različitim smjerovima, pri čemu se prijenos tvari odvija iznutra prema van, dok se toplinski prijenos odvija izvana prema unutra. Nasuprot tome, u mikrovalnoj ekstrakciji oba fenomena prijenosa odvijaju se u istom smjeru iz uzorka u masu otapala. Topljivost ciljanog spoja u otapalu, brzina prodiranja otapala i njegova dielektrična svojstva čimbenici su koje treba uzeti u obzir pri odabiru prikladnog otapala. Temperatura i snaga mikrovalova dva su međusobno ovisna parametra, pri čemu se povećanjem snage mikrovalova povećava temperatura ekstrakcije, a pri višim temperaturama povećava se mogućnost prodiranja otapala zbog smanjenja viskoznosti i površinske napetosti [25].



Slika 11. Mikrovalna ekstrakcija [26]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je utvrditi koje niskotemperaturno eutektičko otapalo je najpogodnije za ekstrakciju piperina iz bijelog i zelenog papra te usporediti učinkovitost s rezultatima dobivenim modelom COSMO-RS. Također, provedena je mikrobiološka analiza kako bi se utvrdila antimikrobna svojstva dobivenih ekstrakata u različitim DES-ovima.

3.2. Materijali

3.2.1. Papri

Za potrebe ovog istraživanja korišten je bijeli i zeleni papar porijeklom iz Vijetnama (**Slika 12.**) koji dolaze od iste biljke *Piper nigrum*, ali su drugačije obrađeni i brani u različita razdoblja.



Slika 12. *Piper nigrum* (bijeli i zeleni papar)

3.2.2. Kemikalije

Za pripremu četiri različita hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala korišteni su timol, mentol, 1-oktanol, tetradekanol te dekanska kiselina u sljedećim molnim omjerima:

- I. DES 1 - timol:1-oktanol (1:2)
- II. DES 2 - timol:tetradekanol (1:2)
- III. DES 3 - mentol:dekanska kiselina (1:1)
- IV. DES 4 - mentol:dekanska kiselina (2:1)

3.3. Metode rada

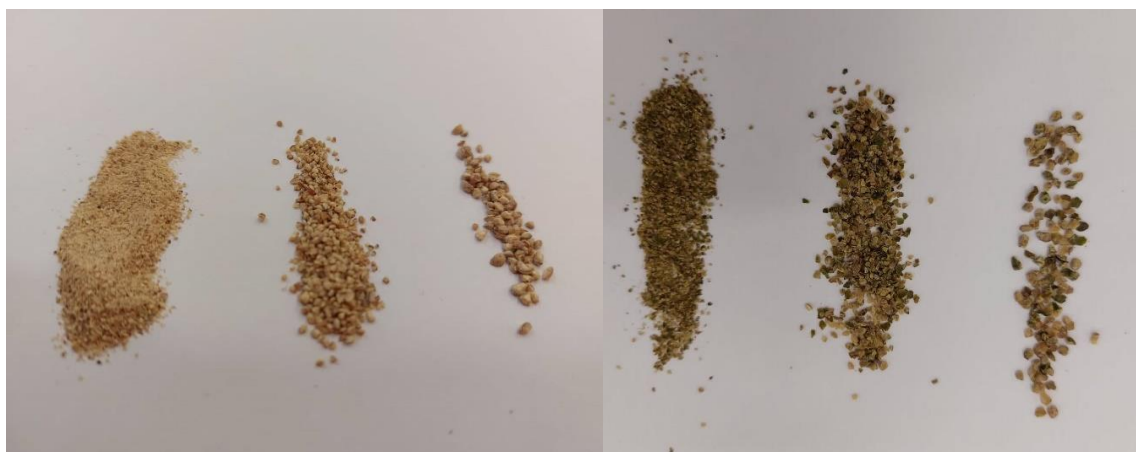
3.3.1. Priprava otapala

Za dobivanje hidrofobnih DES otapala pomiješane su točno određene količine komponenata u zadanom molnom omjeru uz blago zagrijavanje na elektromagnetskoj miješalici. Miješanje se provodi sve do postizanja homogene otopine.

3.3.2. Usitnjavanje uzoraka

Zrna bijelog i zelenog papra usitnjena su pomoću mlinca i prosijana čime je određena raspodjela veličina čestica te su dobivene tri frakcije (**Slika 13.**):

- I. veličina čestica $< 0,71\text{mm}$
- II. veličina čestica $0,71\text{-}1,4\text{mm}$
- III. veličina čestica $1,4\text{-}2\text{mm}$.



Slika 13. Veličinske frakcije bijelog i zelenog papra

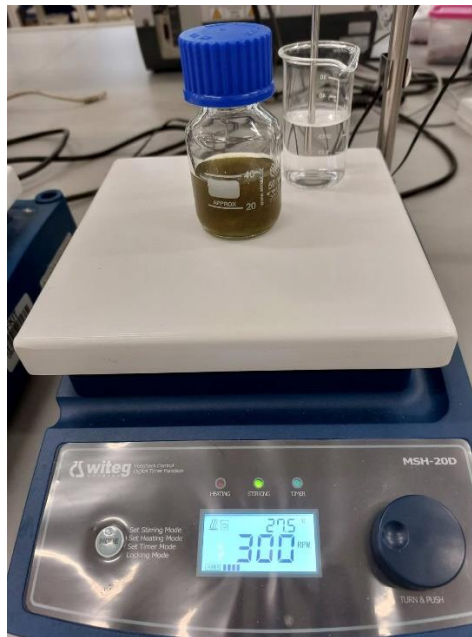
3.3.3. COSMO-RS i eksperimentalno ispitivanje topljivosti

COSMO-RS (*C*Onductor-like *S*creening *M*odel for *R*eal *S*olvents) je termodinamički model temeljen na kvantnoj kemiji i statističkoj termodinamici koji može predvidjeti kemijski potencijal pojedinih spojeva u kapljevitj smjesi. COSMO-RS je koristan za predviđanje faznog dijagrama smjese, uključujući eutektičku točku te predviđanje topljivosti biomolekula u DES-u. Metoda je korištena za predviđanje topljivosti piperina u odabranim otapalima.

Kako bi eksperimentalno dokazali topljivost piperina predviđenu modelom COSMO-RS te odabrali najpogodnije otapalo za provedbu ekstrakcije provedeni su preliminarni pokusi ispitivanja topljivosti čistog piperina u različitim DES-ovima. U tikvicu je odvagana masa od 50 g otapala u koju je dodana odvaga čistog piperina, a ispitivanje se provodilo na magnetskog miješalici pri 300 o/min te 35°C. U daljnjim koracima dodavane su odvage čistog piperina sve do potpune zasićenosti otapala.

3.3.4. Ekstrakcija čvrsto-kapljevito

Ekstrakcije su provedene za četiri različite smjese otapala te sve tri frakcije bijelog i zelenog papra. Sva ispitivanja provodila su se na elektromagnetskoj miješalici Witeg MSH-20D jedan sat pri 300 okretaja po minuti i sobnoj temperaturi (**Slika 14.**). Odvagano je 25 g DES-a u koji je dodan papar (maseni udio papra bio je 3%). Nakon provedene ekstrakcije uzorci su profiltrirani, a dobiveni ekstrakt je podvrgnut daljnjim analizama.



Slika 14. Ekstrakcija piperina iz zelenog papra

3.4. Karakterizacija uzoraka i otapala

3.4.1. Granulometrijska svojstva

Pripremljenim frakcijama oba papra određena su granulometrijska svojstva, odnosno morfologija, te specifična površina pora Brunauer-Emmet-Teller (BET) metodom. Najmanjoj frakciji bijelog i zelenog papra određena je raspodjela veličina čestica. Različite frakcije oba papra snimljene su Olympus SZX16 mikroskopom prikazanom na **Slici 15.** BET površina pora određena je metodom adsorpcije dušika na uređaju prikazanom na **Slici 16.a)**, a raspodjela veličina čestica metodom laserske difrakcije na čestičnom analizatoru prikazanom na **Slici 16.b).**



Slika 15. Mikroskop Olympus SZX16



Slika 16. Uređaji za određivanje granulometrijskih karakteristika uzoraka papra: a) BET površina - Micromeritics ASAP 2000; b) raspodjela veličina čestica - Shimadzu SALD 3101

3.4.2. Fizikalna svojstva otapala

Gustoća i površinska napetost pripremljenih hidrofobnih DES-ova izmjerena su na termostatiranom tenziometru prikazanom na **Slici 17**. Svojstva su izmjerena pri 25 ili 35 °C ovisno u kojem su agregatnom stanju bila otapala pri sobnoj temperaturi. Površinska je napetost određena metodom du Nuoy prstena.



Slika 17. Tenziometar (Dataphysics DCAT 8) i termostat (Julabo CF 31)

Viskoznost otapala određena je također pri 25 ili 35 °C pomoću termostatisiranog rotacijskog viskozimetra prikazanog na **Slici 18.**



Slika 18. Rotacijski viskozimetar (Brookfield DV – III ULTRA) i termostat (Julabo F 12)

3.4.3. UV/Vis spektroskopija

Koncentracija piperina u odabranim otapalima određena je UV/Vis spektroskopijom (spektrofotometar Shimadzu UV-1280, **Slika 19.**), bez prethodne obrade ekstrakata.



Slika 19. UV/Vis spektrofotometar

Za određivanje kalibracijskih krivulja pripravljene su otopine piperina u odabranim otapalima koncentracije 200 ppm u odmjernim tikvicama od 50 mL te su pripravljene otopine različitih razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL. Otopinama su snimljeni UV/Vis spektri te su očitane apsorbancije u maksimumu pika karakterističnog za piperin.

3.5. Mikrobiološka analiza ekstrakata

Za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti ekstrakata korištene su Gram-negativne bakterijske kulture *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-pozitivne bakterije *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* te kvasac *Candida lipolytica*.

Pripremljene su hranjive podloge za uzgoj bakterija (hranjivi agar) i kvasca (malt agar) prema uputama proizvođača (Biolife Manual, second edition, Ingraf, Italija 1991.). Test osjetljivosti provodio se na Mueller Hinton Broth podlogama koje su homogenizirane, zagrijane do vrenja i sterilizirane u autoklavu 15 minuta pri 120 °C i 1,1 atm.

Ispitivanje antimikrobnog djelovanja dobivenih ekstrakata proveden je disk-difuzijskim testom standardnim postupkom NCCLS *disc diffusion method* (CLSI, 2012). Na Mueller Hinton Broth podlogu u Petrijevoj zdjelici otpipetiralo se 0,1 cm³ pripravljene suspenzije mikroorganizama 10⁶ stcm⁻³ i homogeniziralo sa štapićem po Drigalskom. Diskići promjena 6 mm postavili su se na hranjivu podlogu te se na njih otpipetiralo po 0,02 cm³ dobivenih ekstrakata. Petrijeve zdjelice u kojima su se nalazile bakterije stavljene su na inkubaciju na u trajanju od 24 sata pri 37 °C, a zdjelice s kvascem inkubirane su 3 dana pri 28 °C. Nakon inkubacije izmjerene su zone inhibicije.

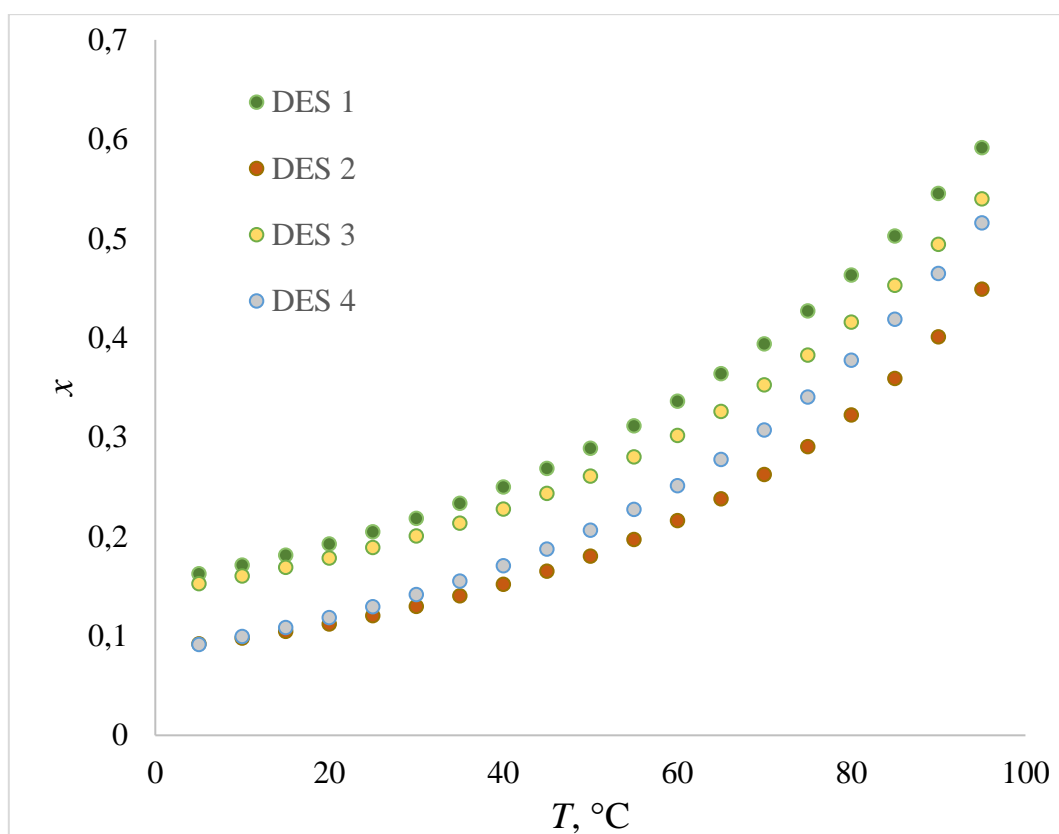
3.6. Određivanje toksičnosti čistih otapala pomoću bakterije *Vibrio fischeri*

Određivanje toksičnosti čistih otapala provedeno je pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Izmjeren je intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 minuta. Bakterija je izložena čistim otapalima 30 minuta te je nakon toga izmjerena inhibicija bioluminiscencije prema standardnoj metodi HRN EN ISO 11348-3:2010 koristeći linearni niz [27]. Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti čiste kulture *Vibrio fischeri* u prisutnosti toksičnih tvari, odnosno otapala. Instrument očitava dva rezultata efektivne koncentracije: EC₂₀ i EC₅₀ koji predstavljaju volumni udio uzorka pri kojem dolazi do 20%-tnog, odnosno 50%-tnog pada luminiscencije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Topljivost piperina

Piperin je nepolarna molekula te su iz toga razloga za ekstrakciju odabrana hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala. Na **Slici 20.** grafički je prikazana topljivost piperina u odabranim otapalima procijenjena COSMO-RS modelom. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da topljivost raste u smjeru DES 2 < DES 4 < DES 3 < DES 1.



Slika 20. Topljivost piperina u odabranim otapalima procijenjena modelom COSMO-RS

Provedeno je ispitivanje topljivosti čistog piperina u otapalima na bazi timola (DES 1 i DES 2) kako bi se procijenila učinkovitost ekstrakcije i usporedila s termodinamičkom procjenom. Dobiveni rezultati uspoređeni su s vrijednostima dobivenim modelom COSMO-RS pri 35°C i atmosferskom tlaku, **Tablica 2.** Može se uočiti da je topljivost procijenjena modelom COSMO-RS veća od eksperimentalno određene topljivosti, što se slaže s literaturnim izvorima [28].

Tablica 2. Topljivost piperina u DES otapalima pri 35°C i atmosferskom tlaku, %

Topljivost piperina, %		
	Eksperimentalna vrijednost	COSMO-RS
DES 1	15,77	23,35
DES 2	9,33	14,03

Prema procjeni topljivost piperina modelom COSMO-RS otapalo DES 1 pogodnije je za ekstrakciju piperina nego otapalo DES 2, a to je i potvrđeno dobivenim eksperimentalnim vrijednostima.

4.2. Fizikalna svojstva otapala

Otapalo koje će se koristiti za ekstrakciju mora zadovoljiti određene zahtjeve. Osim dobre topljivosti ključne komponente, u ovom slučaju piperina, i visoke selektivnosti posebna se pažnja posvećuje gustoći, viskoznosti i površinskoj odnosno međupovršinskoj napetosti. Da bi separacija faza bila učinkovitija potrebna je dovoljno velika razlika gustoća faza između kojih dolazi do međufaznog prijenosa tvari. Viskoznost otapala bitna je zbog brzine prijenosa tvari. Naime, otapala manje viskoznosti lakše će prodrijeti u poroznu strukturu materijala a brzina prijenosa tvari biti će veća zbog manjih otpora prijenosu. Tipična fizikalna svojstva odabranih otapala mjerena su pri 25°C, odnosno 35°C za DES 2 koji je pri sobnoj temperaturi u krutom stanju, te prikazana u **Tablici 3**.

Tablica 3. Fizikalna svojstva odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

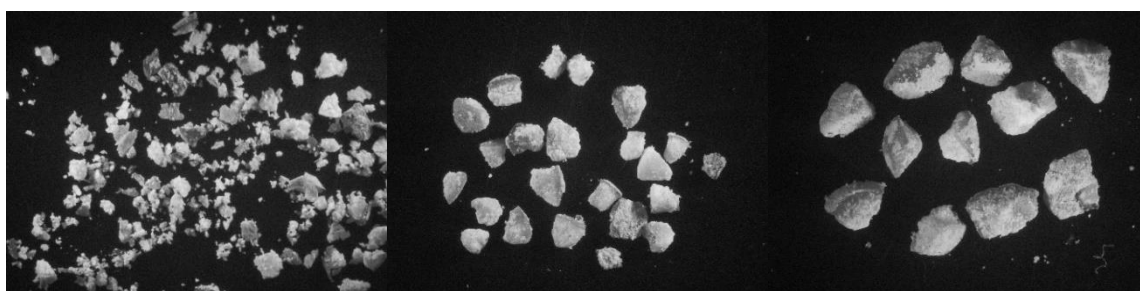
	DES 1	DES 2	DES 3	DES 4
T, °C	25	35	25	25
ρ , kg/m ³	874,38	858,64	898,27	899,83
σ , mN/m	28,08	29,53	27,79	28,26
η , mPa s	8,38	13,75	15,04	19,96

Prema dosadašnjim literaturnim izvorima utvrđeno je da se gustoća ove vrste otapala uglavnom kreće između 0,88 g/cm³ i 0,97 g/cm³ [8], što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Gustoća otapala uvelike ovisi o gustoći njegovih komponenti te tako ukoliko su komponente otapala gustoće manje od gustoće vode tada će i dobiveno otapalo biti gustoće manje od 1 g/cm³. Kao što je

vidljivo iz **Tablice 3.** površinska napetost otapala ima vrijednosti od 27,79 mN/m do 29,53 mN/m, dok se viskoznost otapala uvelike razlikuje te je u rasponu od 8,38 mPa s do 19,96 mPa s. Kao što je ranije naglašeno, visoka viskoznost niskotemperaturnih eutektičkih otapala često predstavlja glavni nedostatak koji može ograničiti njihovu primjenu kao otapala za ekstrakciju te je prevladavanje tog problema jedan od ključnih izazova mnogih znanstvenih istraživanja.

4.3. Granulometrijska svojstva frakcija papra

Na **Slikama 21. i 22.** prikazane su mikroskopske slike sve tri veličinske frakcije bijelog i zelenog papra nakon usitnjavanja. Može se uočiti da su zrna papra nepravilnog oblika kao i da su porozna.



Slika 21. Mikroskopski prikaz različitih frakcija bijelog papra

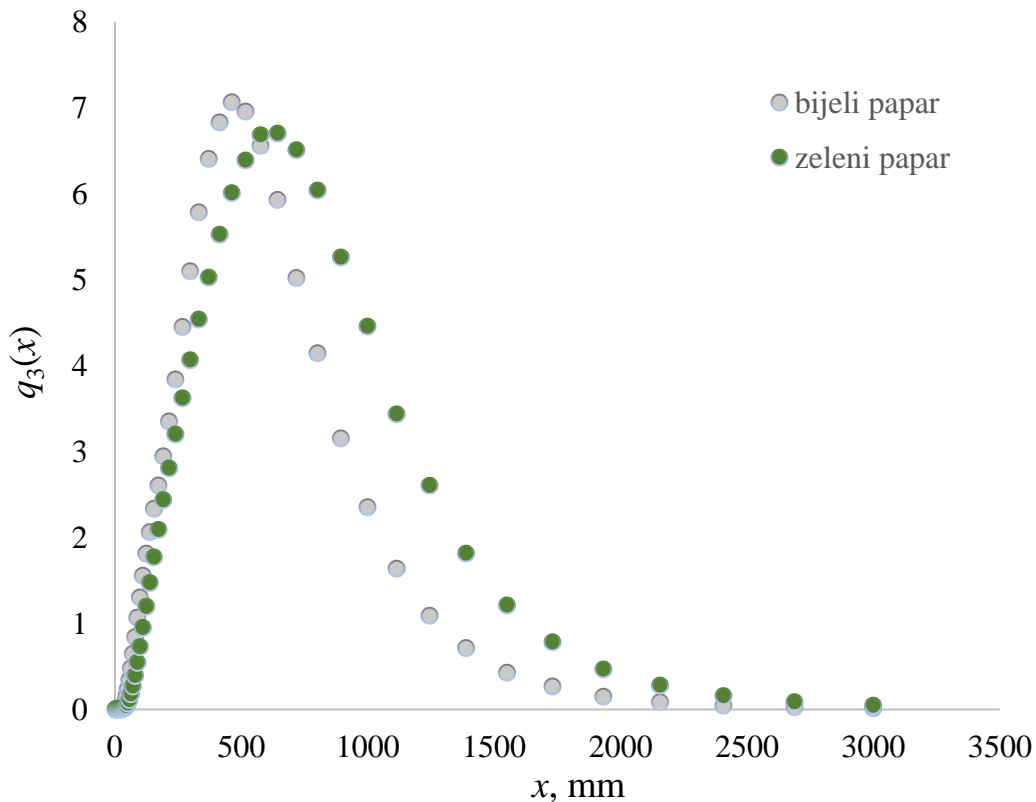


Slika 22. Mikroskopski prikaz različitih frakcija zelenog papra

Najmanjoj frakciji obje vrste papra izmjerena je raspodjela veličina čestica. U **Tablici 4.** prikazane su karakteristične veličine čestica zelenog i bijelog papra procijenjenih iz raspodjele veličina čestica, **Slika 23.** Sve karakteristične veličine nešto su veće za zeleni papar. Širina raspodjele približno je jednaka, dok je specifična površina veća za zeleni papar. Veća specifična površina mogla bi rezultirati učinkovitijom ekstrakcijom jer je brzina prijenosa tvari proporcionalna površini izmjene tvari.

Tablica 4. Karakteristične veličine čestica zelenog i bijelog papra.

Karakteristične veličine	Zeleni papar	Bijeli papar
Medijan, μm	485,72	385,55
Mod, μm	562,34	446,68
Srednji volumni promjer, μm	449,88	354,29
x_{10} , μm	172,75	132,77
x_{50} , μm	486,81	386,48
x_{90} , μm	1028,97	800,37
Širina raspodjele, S	5,96	6,03
Specifična površina, $S_v, \text{m}^2/\text{m}^3$	$17,57 \cdot 10^3$	$22,14 \cdot 10^3$



Slika 23. Raspodjela veličina čestica u najmanjoj veličinskoj frakciji papra

Čestice papra sklone su aglomeraciji. Naime, raspodjela veličina čestica određena je za frakciju čestica manjih od 0,71 mm, a krivulja gustoće raspodjele veličina ukazuje na postojanje čestica znatno većih od 0,71 mm.

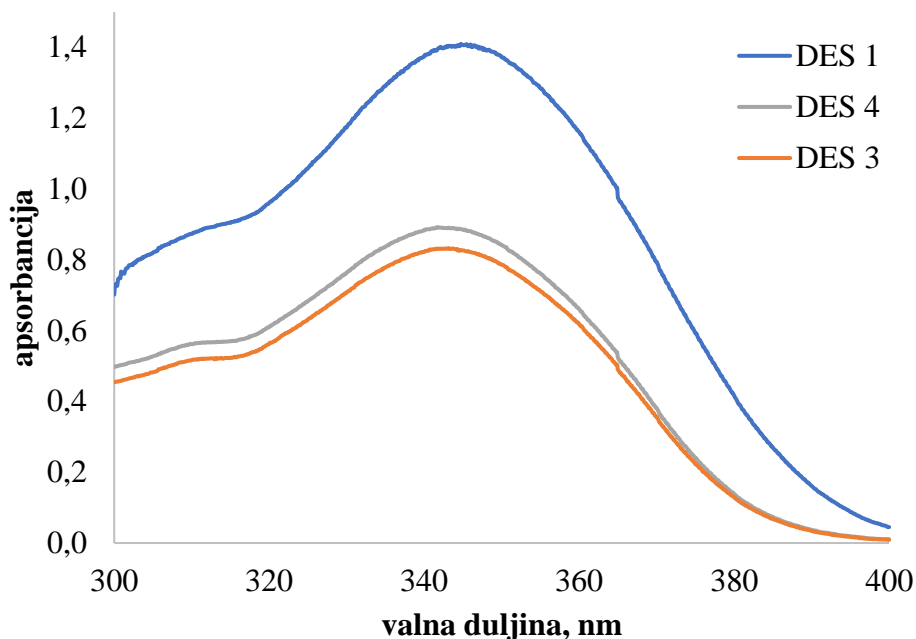
Poznavanje veličine i raspodjele veličina pora omogućava procjenu specifične površine pora, što je također značajno za ekstrakciju čvrsto – kapljevito. Procijenjene BET površine odabranih frakcija bijelog i zelenog papra prikazane su u **Tablici 5**. Može se uočiti da je najveća površina pora izmjerena kod najmanje frakcije bijelog papra te bi provedba ekstrakcije s tom frakcijom trebala rezultirati najvećom učinkovitosti zbog najveće površine za prodiranje otapala. S druge strane, najmanju BET površinu ima srednja veličinska frakcija ($0,71 < x < 1,40 \text{ mm}$).

Tablica 5. BET površine pora čestica papra

	Veličina frakcije	S _{BET} , m ² /g
bijeli papar	$x < 0,71 \text{ mm}$	0,3895
	$0,71 < x < 1,40 \text{ mm}$	0,1317
	$1,40 \text{ mm} < x < 2,00 \text{ mm}$	0,2261
zeleni papar	$x < 0,71 \text{ mm}$	0,1959
	$0,71 < x < 1,40 \text{ mm}$	0,0502
	$1,40 \text{ mm} < x < 2,00 \text{ mm}$	0,1328

4.4. Određivanje koncentracije piperina u dobivenim ekstraktima

Ekstrakcije su provedene s tri frakcije bijelog i zelenog papra te sa sva četiri pripremljena otapala. Nakon provedene ekstrakcije određena je koncentracija piperina UV/Vis spektroskopijom, bez prethodne obrade ekstrakta. UV/Vis spektroskopija koristi se za pouzdanu kvantifikaciju pri čemu je intenzitet pika proporcionalan koncentraciji piperina u ekstraktu. Za korištenje navedene metode za određivanje koncentracije piperina u ekstraktima bilo je potrebno snimiti kalibracijske krivulje u odabranim otapalima. Otapalo DES 2 je pri sobnoj temperaturi u krutom stanju te stoga nije podvrgnuto daljnjim analizama. Prema literaturnim izvorima, piperin pokazuje maksimalnu apsorbanciju na valnoj duljini od 342,5 nm, međutim u različitim otapalima može doći do blagog pomaka maksimuma. Na **Slici 15**, prikazani su UV/Vis spektri otopine piperina u otapalima DES 1, DES 3 i DES 4. U odnosu na literaturnu valnu duljinu pri kojoj se pojavljuje maksimum karakterističan za piperin, maksimumi u otapalima DES 1, DES 3 i DES 4 nalaze se na valnim duljinama 346,2 nm, 343,2 nm i 343,2 nm, **Slika 24**.



Slika 24. UV/Vis spektri standardnih otopina piperina koncentracije 10 ppm

Dobivene su sljedeće kalibracijske krivulje za koncentraciju piperina izraženu u ppm:

$$\text{DES 1: } c = 10,606 \cdot Abs - 3,2906$$

$$\text{DES 3: } c = 0,0119 \cdot Abs - 3 \cdot 10^{-5}$$

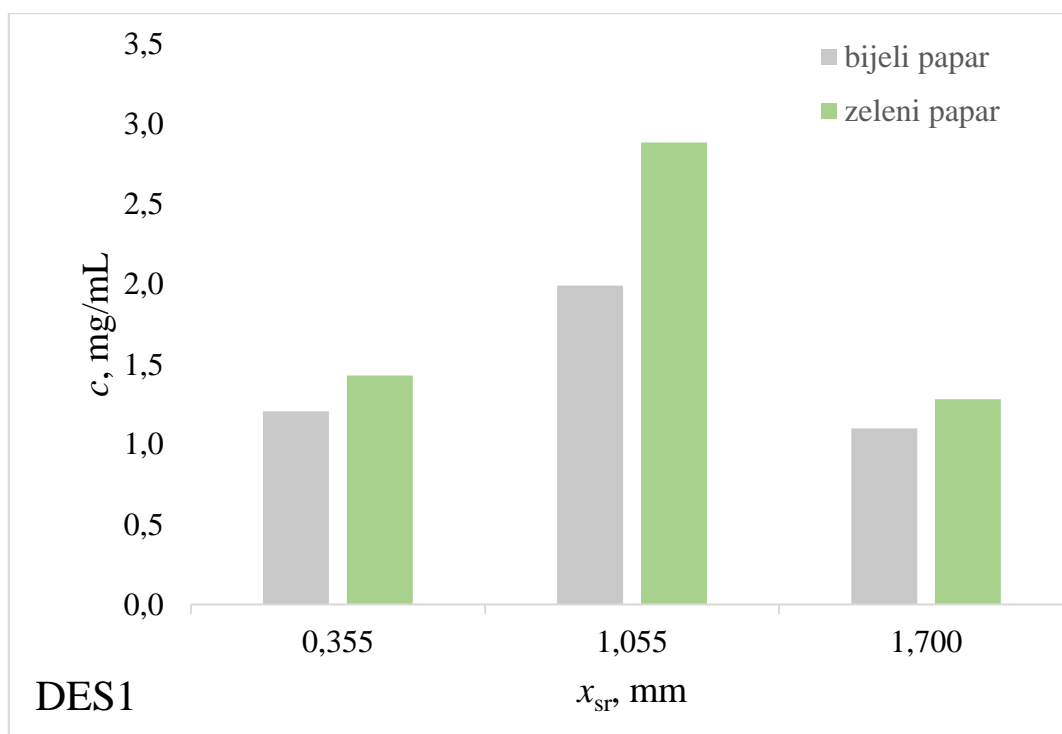
$$\text{DES 4: } c = 0,0108 \cdot Abs - 6 \cdot 10^{-4}$$

4.5. Učinkovitost ekstrakcije

Na **Slikama 25., 26. i 27.** prikazan je utjecaj veličine čestica i vrste papra na učinkovitost ekstrakcije piperina odabranim otapalima. Za procjenu učinkovitosti potrebno je poznavati početnu koncentraciju piperina u paprima. S obzirom da u ovom radu nije određivana koncentracija piperina u papru, uzete su literaturne vrijednosti [29]. Zeleni papar sadrži nešto više piperina od bijelog papra. Usporedbom učinkovitosti ekstrakcije s obzirom na vrstu i veličinu zrna papra te vrstu otapala vidljivo je da je najveća količina piperina ekstrahirana iz zelenog papra pri ekstrakciji s DES 1 (**Slika 25.**). Dobiveni se rezultati podudaraju s procijenjenim i eksperimentalno određenim topljivostima piperina, jer se najpovoljnije pokazalo otapalo DES 1. Veća specifična površina određena metodom laserske difrakcije te znatno veća BET površina pora bijelog papra upućivale su na veću učinkovitost ekstrakcije piperina iz bijelog papra. Razlog odstupanja od očekivanog vjerojatno je posljedica različitog kemijskog sastava bijelog i zelenog papra, **Prilog 1.** Osim piperina tijekom ekstrakcije u otapalu

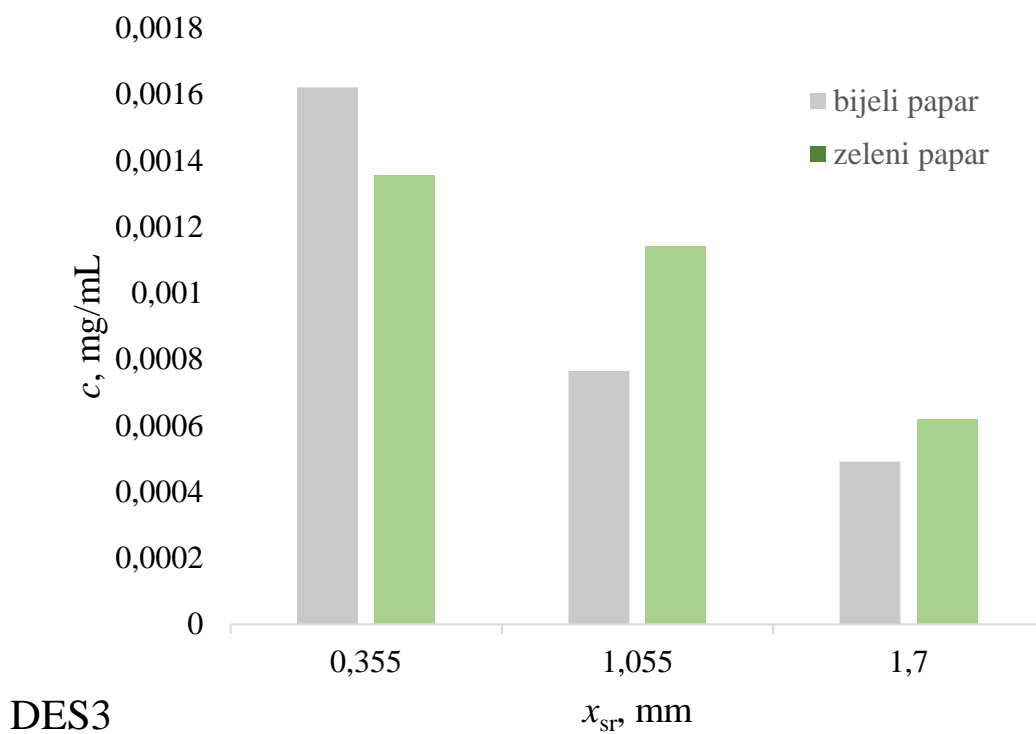
se otapaju i neke druge komponente prisutne u papru, što za posljedicu ima smanjenje topljivosti piperina.

Odstupanja od očekivanog trenda uočavaju se i kod utjecaja veličine čestica na učinkovitost ekstrakcije piperina. Najbolji rezultati postignuti su s veličinskom frakcijom srednjeg promjera čestica $x_{sr} = 1,055$ mm. Sklonost čestica papra aglomeraciji u otapalu DES 1 je izražena, pa je zbog znatno manje stvarne površine izmjene tvari dostupne otapalu, brzina prijenosa tvari manja.

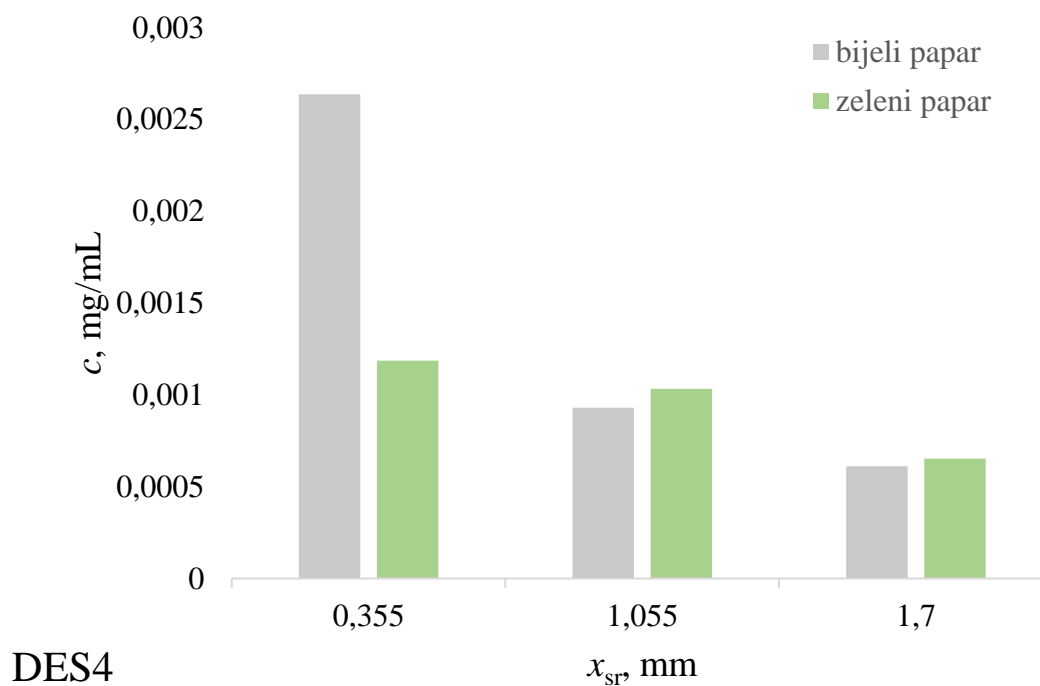


Slika 25. Utjecaj vrste papra i veličine zrna papra na učinkovitost ekstrakcije otapalom DES 1

Učinkovitost ekstrakcije korištenjem otapala DES 3 i DES 4 znatno je manja u usporedbi s otapalom DES 1. Osim najbolje topljivosti piperina u otapalu DES 1, to otapalo ima manju gustoću i znatno manju viskoznost čime je olakšan međufazni prijenos tvari. Usporede li se rezultati dobiveni s otapalima DES 3 i DES 4 koja se razlikuju u molnom omjeru komponenata od kojih se sastoje uočava se da učinkovitost ekstrakcije opada s porastom veličina čestica. Utjecaj veličine čestica više je izražen za bijeli papar. Otapalo DES 4 učinkovitije je za najmanju frakciju oba papra i se više piperina ekstrahira iz bijelog papra. Dobiveni se rezultati ne podudaraju s procijenjenim modelom COSMO-RS te fizikalnim svojstvima otapala.



Slika 26. Utjecaj vrste papra i veličine zrna papra na učinkovitost ekstrakcije otapalom DES 3



Slika 27. Utjecaj vrste papra i veličine zrna papra na učinkovitost ekstrakcije otapalom DES 4

Procijenjena topljivost piperina veća je u otapalu DES 3 koje sadrži manji udio mentola. Osim toga, s porasom udjela mentola rastu i gustoća i viskoznost otapala. Usprkos većoj gustoći i viskoznosti otapala DES 4 moguće je da dolazi do slabljenja privlačnih međučestičnih elektrostatskih sila zbog čega se smanjuje udio aglomerata što rezultira većom površinom raspoloživom za međufazni prijenos tvari. S porastom veličine čestica piperin se lakše ekstrahira iz zelenog papra.

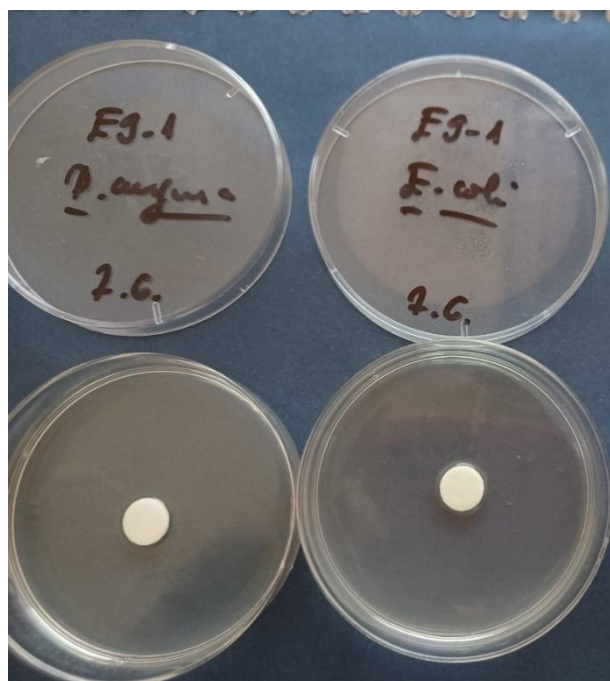
4.6. Toksičnost čistih otapala

Toksičnost čistih otapala određena je pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Podatci koji su dobiveni mjerenjem intenziteta luminiscencije ukazuju na izrazitu toksičnost otapala što se može pripisati njihovoj kiselosti. Priroda spojeva koji tvore DES, a posebno priroda donora vodikove veze, snažno utječe na pH konačne smjese. Povećanjem kiselosti otopine može doći do denaturacije membranskih proteina, a time i do smrti stanice. Prema istraživanju koje su proveli Skulcova i suradnici [30] dokazano je da se pH niskotemperaturne eutektičke smjese smanjuje povećanjem temperature.

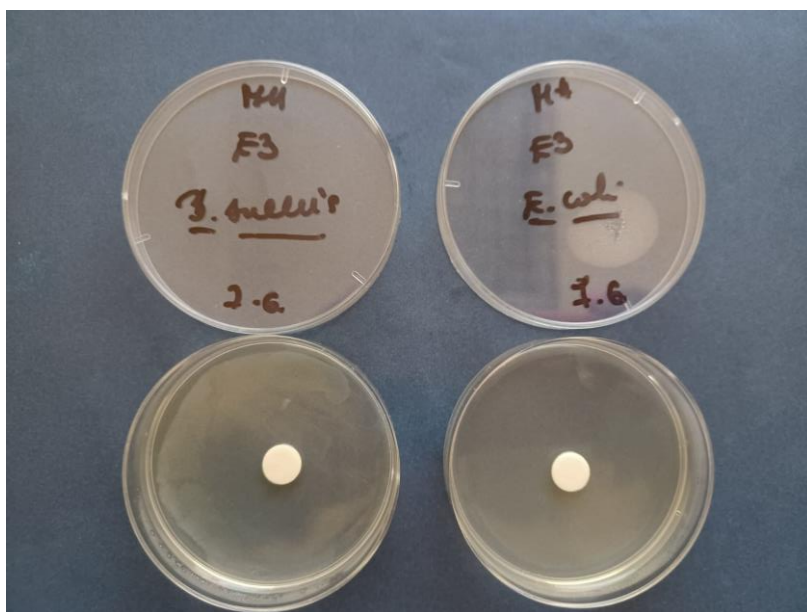
4.7. Antimikrobna svojstva ekstrakta

Antimikrobno djelovanje istraženo je standardnom disk-difuzijskom metodom. Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi antimikrobna svojstva piperina u različitim DES-ovima. Za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti ekstrakata korištene su Gram-negativne bakterijske kulture *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-pozitivne bakterije *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* te kvasac *Candida lipolytica*.

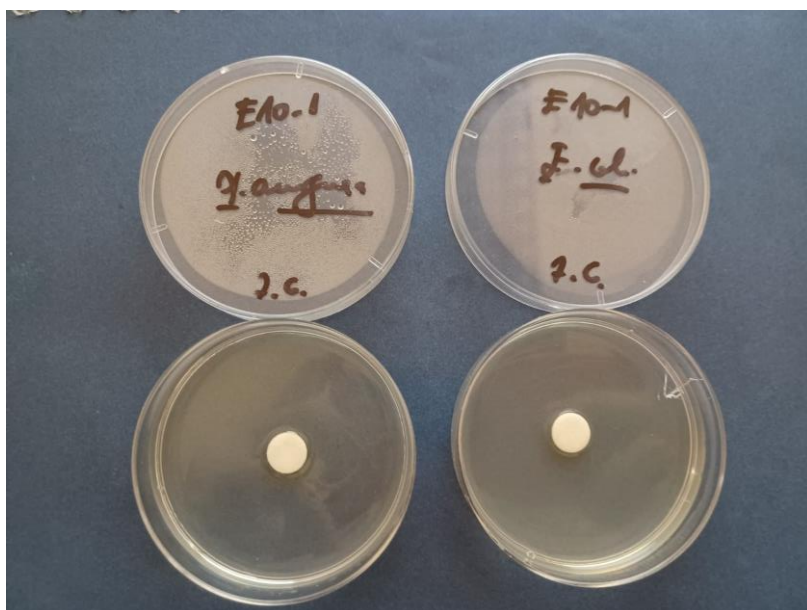
Uočena je 100%-tna inhibicija rasta Gram-negativnih bakterija kod svih ekstrakata dobivenih korištenjem otapala DES 1 (**Slika 28.**, **Slika 29.**, **Slika 30.**). Također, Gram-pozitivne bakterije pokazale su veću osjetljivost na ekstrakte s otapalom na bazi timola, što je vidljivo na **Slikama 31.** i **32.** Ekstrakti otapala na bazi mentola znatno manje inhibiraju rast svih ispitanih bakterijskih kultura (**Slika 33.**, **Slika 34.**), a ne inhibiraju rast bakterije *E. faecalis*. Svi uzorci demonstrirali su 100%-tnu inhibiciju kvasca *C. lipolytica*.



Slika 28. Prikaz zona inhibicija za ekstrakt najmanje frakcije bijelog papra u DES 1 na *E. coli* i *P. aeruginosa*



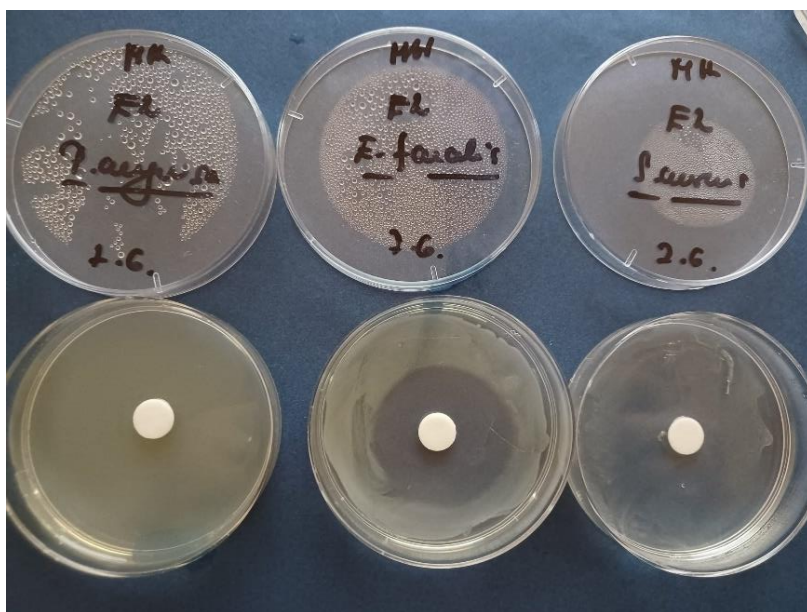
Slika 29. Prikaz zona inhibicija za ekstrakt srednje frakcije zelenog papra u DES 1 na *E. coli* i *B. subtilis*



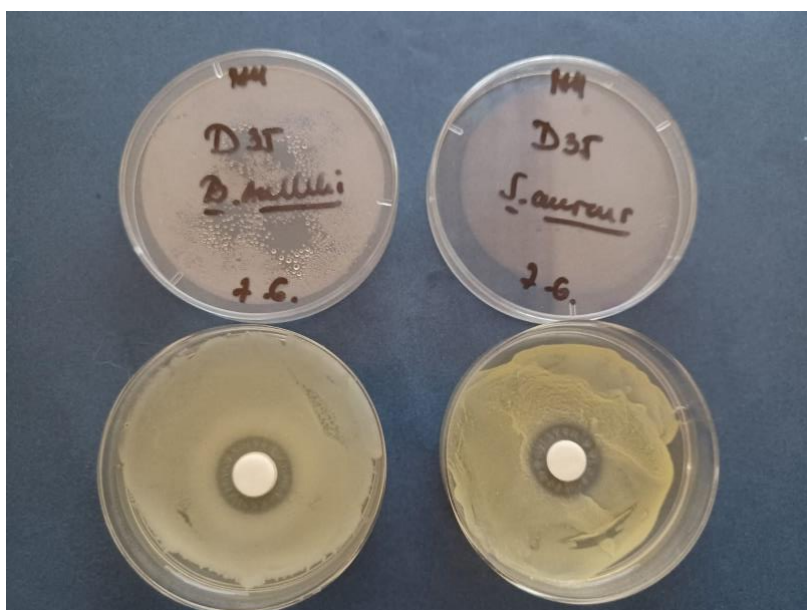
Slika 30. Prikaz zona inhibicija za ekstrakt najmanje frakcije zelenog papra u DES 1 na *E. coli* i *P. aeruginosa*



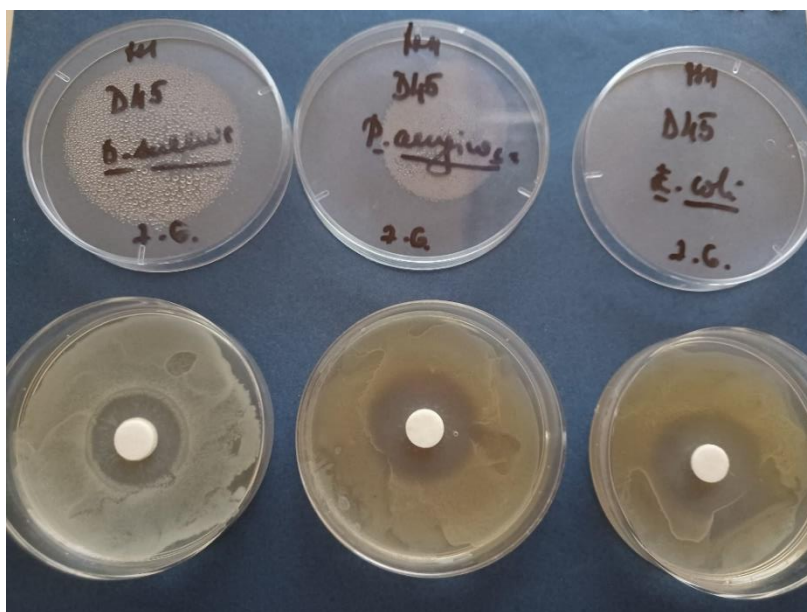
Slika 31. Prikaz zona inhibicija za ekstrakt najmanje frakcije bijelog papra u DES 1 na *E. faecalis* i *S. aureus*



Slika 32. Prikaz zona inhibicija za ekstrakt najveće frakcije bijelog papra u DES 1 na *P. aeruginosa*, *E. faecalis* i *S. aureus*



Slika 33. Prikaz zona inhibicija za ekstrakt srednje frakcije zelenog papra u DES 3 na *B. subtilis* i *S. aureus*



Slika 34. Prikaz zona inhibicija za ekstrakt srednje frakcije zelenog papra u DES 4 na *B. subtilis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*

Na temelju izmjerenih zona inhibicije (**Tablica 6.**) uočena je najveća inhibicija Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*), pri čemu je otapalo DES 1 uzrokovalo najznačajniju antimikrobnu aktivnost. Ekstrakti na bazi timola uzrokovali su i najveću inhibiciju Gram-pozitivnih bakterija sa zonama inhibicije u rasponu od 1 do 1,7 cm. Kod ekstrakata na bazi mentola uočavamo znato manje antimikrobno djelovanje na sve odabrane mikroorganizme, sa zonama inhibicije u rasponu od 0,1 do 1,2 cm.

Silva i suradnici [31] proveli su istraživanje u kojem je uočeno da čisti timol pokazuje značajno antibakterijsko djelovanje protiv svih testiranih mikroorganizama, uključujući i *P. aeruginosa* koja je inače otporna na terpene izolirane iz biljaka. Dobiveni rezultati su u skladu i s prethodnim literaturnim izvještajima koji govore o učinkovitosti timola kao antibakterijskog i antifungalnog sredstva protiv nekoliko organizama uključujući *E. coli*, *P. aeruginosa* te *C. albicans*. No, prema dosadašnjim istraživanjima dokazano je da su učinci timola općenito izraženiji kod Gram-pozitivnih bakterija i kvasaca. Gram-negativne bakterije imaju tendenciju veće otpornosti na djelovanje hidrofobnih spojeva zbog složenije strukture membrane te tako prisutnost lipopolisaharida na vanjskoj staničnoj stijenci sprječava hidrofobne spojeve da dođu do stanice i izazovu svoje citotoksično djelovanje. Gram-pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu koja služi kao dodatni zaštitni i selektivni sloj protiv agresivnosti što rezultira većom izloženošću hidrofobnim spojevima kao što su timol i metanol, do unutarnje citoplazmatske stanične membrane, dopuštajući im da izvrše svoje učinke unutar stanice.

Tablica 6. Zone inhibicije (cm) ekstrakata na odabranim mikroorganizmima

	Veličina frakcije	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	
DES 1	x<0,71mm	100%	100%	1	1,3	1,6	bijeli papar
	0,71<x<1,40mm	inhibicija	inhibicija	1,3	1,2	1,4	
	1,40mm<x<2,00mm			1,3	1,7	1,2	
DES 3	x<0,71mm			0,7	0,7	0	
	0,71<x<1,40mm	0,9	0,8	0	0,3	0,4	
	1,40mm<x<2,00mm	0,8	1	0	0,3	0,3	
DES 4	x<0,71mm	1,2	1	0	0,4	0,7	
	0,71<x<1,40mm	1,0	1,1	0	0,4	0,6	
	1,40mm<x<2,00mm	0,9	1	0	0,4	0,5	
DES 1	x<0,71mm	100%	100%	1,7	1,5	1,5	zeleni papar
	0,71<x<1,40mm	inhibicija	inhibicija	1,5	1,1	1,3	
	1,40mm<x<2,00mm			1	1,1	1,4	
DES 3	x<0,71mm			0,9	0,8	0	
	0,71<x<1,40mm	0,7	0,7	0	0,3	0,3	
	1,40mm<x<2,00mm	1	0,9	0	0,5	0,4	
DES 4	x<0,71mm	0,9	0,9	0	0,5	0,7	
	0,71<x<1,40mm	1,2	1	0	0,5	0,6	
	1,40mm<x<2,00mm	1	0,9	0,1	0,5	0,6	

Aldaly [32] je proveo istraživanje u kojem je piperin ekstrahiran etanolom iz suhih sjemenki biljke *Piper nigrum* te je piperin pokazao snažnu antimikrobnu aktivnost protiv testiranih organizama, a posebno prema kvascu *C. albicans*, zbog svojstva piperina da inhibira nakupljanje lipida u kvascu. Značajno antimikrobno djelovanje uočeno je i kod *E. coli* te *P. aeruginosa*, pri čemu su zone inhibicije iznosile od 8 do 23 mm.

U istraživanju koje smo proveli potrebno je naglasiti da je antimikrobna aktivnost ekstrakata zapravo sinergistički učinak izoliranog piperina i DES-ova. Hayyan i suradnici [14] potvrdili su da sinergistički učinak između donora i akceptora vodikove veze u eutektskim smjesama može rezultirati većom toksičnošću DES-ova nego pojedinačnih komponenti zasebno.

Uvidom u dostupne literaturne izvore moguće je potvrditi da otapala na bazi amina, alkohola i šećera nisu pokazala inhibiciju rasta bakterija jer sadrže komponente koje bakterije mogu koristiti kao izvor hranjivog dušika ili ugljika. S druge strane, DES-ovi s organskim kiselinama mogu dovesti do inhibicije rasta bakterija jer otapala visoke kiselosti ili bazičnosti mogu denaturirati proteine koji se nalaze na staničnoj stijenci što rezultira umiranjem stanica. Iako su komponente DES-ova općenito dobro toksikološki okarakterizirane, postoji vrlo malo informacija o toksikološkoj analizi samih eutektičih otapala te će to zasigurno biti predmet daljnjih znanstvenih istraživanja [33].

3. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivala se mogućnost ekstrakcije piperina iz bijelog i zelenog papra pomoću hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Otapalo DES 1 (timol:1-oktanol (1:2)) pokazalo je najveću učinkovitost ekstrakcije, a najbolji rezultati postignuti su s veličinskom frakcijom $x_{st} = 1,055$ mm. Otapala na bazi mentola DES 3 (mentol:dekanska kiselina (1:1)) i DES 4 (mentol:dekanska kiselina (2:1)) pokazala su znatno manju učinkovitost, a uočeno je da s porastom veličina čestica dolazi do smanjenja učinkovitosti ekstrakcije. Ovaj trend smanjenja učinkovitosti porastom veličina čestica potvrđen je i vrijednostima površina pora, pri čemu najmanja frakcija papra ima najveću površinu pora, a time i najveću površinu za prodiranje otapala.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti dobivenih ekstrakata uočena je najveća inhibicija rasta Gram-negativnih bakterija, a pri tome su najveće zone inhibicije izmjerene kod otapala DES 1. Ekstrakti otapala na bazi mentola (DES 3 i DES 4) nisu inhibirali rast bakterije *E. faecalis*. Svi ekstrakti pokazali su 100%-tnu inhibiciju kvasca *C. lipolytica*. Testovi toksičnosti čistih otapala provedeni su primjenom bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*, a dobiveni rezultati ukazuju na izrazitu toksičnost otapala što se može pripisati njihovoj kiselosti.

Potrebno je istaknuti da se na temelju individualne antimikrobne aktivnosti početnih komponenti ne može predvidjeti mikrobiološka aktivnost ekstrakata jer često dolazi do sinergističkog učinka, kako između sastavnica otapala, tako i između otapala i ekstrahiranog piperina. Na temelju dosadašnjih znanstvenih istraživanja niskotemperaturna eutektička otapala smatraju se obećavajućim otapalima s mnogim primjenama, ali njihova sigurnost i toksičnost će zasigurno biti predmet mnogih budućih istraživanja.

4. LITERATURA

- [1] F.S. Alves, J. N. Cruz, I. N. de Farias Ramos, D. L. do Nascimento Brandão, R. N. Queiroz, G. V. da Silva, D. do Socorro Barros Brasil, Evaluation of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Effects of Extracts of *Piper nigrum* L. and Piperine, *Sep. 10* (2023.), 21.
- [2] I. A. Oyemitan, Medicinal Spices and Vegetables from Africa, AP, 2017, str. 581-597.
- [3] URL: <https://www.britannica.com/plant/black-pepper-plant> (pristup 11.4.2022.)
- [4] S. Shityakov, E. Bigdelian, A. Hussein, M. B. Hussain, Y. C. Tripathi, M. U. Khan, M. A. Shariati, Phytochemical and pharmacological attributes of piperine: A bioactive ingredient of black pepper, *Eur. J. Med. Chem.* 176 (2019) 149-161.
- [5] A. Tiwari, K. R. Mahadik, S. Y. Gabhe, Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties, *MEDIDD* 7 (2020) 100027.
- [6] A. Sander, Toplinski separacijski procesi (interna skripta); Jedinične operacije u ekoinženjerstvu; I dio, Zagreb, 2011.
- [7] F. Chemat, M. Abert-Vian, A. S. Fabiano-Tixier, J. Strube, L. Uhlenbrock, V. Gunjevic, G. Cravotto, Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenge, *TrAC* 118 (2019) 248-263
- [8] E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.* 114 (2014) 11060–11082.
- [9] M. Radović, M. Panić, K. Radošević, M. Cvjetko Bubalo, I. Radojčić Redovniković, Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kem. Ind.* 70 (2021), 551-562.
- [10] D.J. van Osch, L. F. Zubeir, A. van den Bruinhorst, M. A. Rocha, M. C. Kroon, Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chem.* 17(2015), 4518-4521.
- [11] C. Florindo, L. C. Branco, I. M. Marrucho, Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments. *Fluid Ph. Equilibria*, 448 (2017), 135-142.

- [12] J. Cao, E. Su, Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry, *J. Clean. Prod* 314 (2021) 127965.
- [13] S. E. Warrag, M. C. Kroon, (2019). Hydrophobic deep eutectic solvents. *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications (2019)*, 83-93.
- [14] D. Skarpalezos, A. Detsi, Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources, *Appl. Sci.* 9 (2019), 4169.
- [15] L. Gorgani, M. Mohammadi, G. D. Najafpour, M. Nikzad, Piperine—the bioactive compound of black pepper: from isolation to medicinal formulations. *CRFSFS* 16 (2017), 124-140.
- [16] B. A. Weggler, B. Gruber, P. Teehan, R. Jaramillo, F. L. Dorman, Chapter 5 - Inlets and sampling, *Sep. Sci. and Technol.* 12 (2020), 141-203.
- [17] A. A. Rajopadhye, T. P. Namjoshi, A. S. Upadhye, Rapid validated HPTLC method for estimation of piperine and piperlongumine in root of *Piper longum* extract and its commercial formulation, *Braz. J. Pharmacog.* (2012) 1355–61.
- [18] T. Yamaguchi, K. Kamezawa, K. Iwaya, Y. Sato, T. Miyaji, M. Bounoshita, D. J. Tognarelli, M. Saito, Analysis of piperine in peppers using on-line SFE-UHPLC with photodiode array detection, *Am. Lab.* 43(2011) 29–31.
- [19] M. Herrero, J. A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A.* 1217 (2019), 2495-2511.
- [20] K. S. Andrade, G. Trivellin, S. R. Ferreira, Piperine-rich extracts obtained by high pressure methods. *J. Supercrit. Fluids*, 128 (2017) , 370-377.
- [21] K. Y. Khaw, M. O. Parat, P. N. Shaw, J. R. Falconer, Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Mol.* 22(2017), 1186.
- [21] K. S. Andrade, G. Trivellin, S. R. Ferreira, Piperine-rich extracts obtained by high pressure methods. *J. Supercrit. Fluids*, 128 (2017) , 370-377.
- [22] S. C. Lizcano, J. A. Dávila, V. Hernández, Fruit Agroindustrial Wastes for Preparing Beverages for Medicinal Purposes by Supercritical Fluid Extraction Technology: Andes Berry (*Rubus glaucus* benth) Case, *Production and Management of Beverages (2019)*, 151-177.

- [23] S. S. Rathod, V. K. Rathod, Extraction of piperine from *Piper longum* using ultrasound. *Ind. Crops Prod.* 58 (2014), 259-264.
- [24] S. U. Kadam, B. K. Tiwari, C. P. O'Donnell, Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013), 4667-4675.
- [25] V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacogn. Rev.* 1 (2007), 7-18.
- [26] E. M. Vélez-Erazo, J. L. Pasquel-Reátegui, O. H. Dorronsoro-Guerrero, H. A. Martínez-Correa, Phenolics and carotenoids recovery from agroindustrial mango waste using microwave-assisted extraction: Extraction and modeling. *J. Food Process Eng.*, 44 (2021), e13774.
- [27] HRN EN ISO 11348-3:2010, Kvaliteta vode – Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) – 3.dio: Metoda u kojoj se upotrebljavaju liofilizirane bakterije.
- [28] S. Z. S. Jaapar, Y. Iwai, N. A. Morad, M. S. MD. Sarip, The Solubility of 6-gingerol and 6-shogaol in Hot Compressed Water: Experimental and COSMO-RS Prediction, 2007.
- [29] M. Bužančić, Ekstrakcija piperina u ekološki prihvatljivim otapalima, Zagreb, 2016.
- [30] Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S. N. Chen, G. F. Pauli, G. F., Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives, *J. Nat. Prod.*, 81(2018), 679-690.
- [31] E. Silva, F. Oliveira, J. M. Silva, R. L. Reis, A. R. C. Duarte, Untangling the bioactive properties of therapeutic deep eutectic solvents based on natural terpenes, CRCHBI (2021) 100003
- [32] Z. T. K. Aldaly, Antimicrobial Activity of Piperine purified from *Piper nigrum*, BJS 15 (2010)
- [33] S. N. Pedro, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, M. G. Freire, Deep Eutectic Solvents and Pharmaceuticals. *Ency.* 1 (2021), 942–963.

5. PRILOZI

PRILOG 1. Kemijski sastav bijelog i zelenog papra određen tekućinskom kromatografijom u kombinaciji sa masenim spektrometrom (preuzeto iz diplomskog rada Margarite Bužančić: Ekstrakcija piperina u ekološki prihvatljivim otapalima, 2016).

BIJELI	površina pika	%
Piperine	5336639,03	55,17
Piperettine	757979,865	7,84
Piperettine	751440,839	7,77
Trichostachine	577235,299	5,97
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamide	541349,205	5,6
Dihydropipericide	309912,195	3,2
3.761.132	274967,198	2,84
Pipericide	143451,149	1,48
Dehydropiperonaline	120260,222	1,24
2.221.787	99554,5753	1,03

ZELENI	površina pika	%
Piperine	5081066,8	44,56
Piperettine	1302543,39	11,42
Trichostachine	872986,61	7,66
Piperettine	849703,511	7,45
(2E,4E)-N-Isobutyldecadienamide	545870,8	4,79
Dihydropipericide	450728,765	3,95
(2E,4E,82)-N-Isobutyl-eicosatrienamide	442157,244	3,88
3.761.132	254410,731	2,23
Guineensine	206903,712	1,81
Piperlonguminine	151231,59	1,33
Dehydropiperonaline	146577,08	1,29
Tricholein	140820,71	1,24

ŽIVOTOPIS

Andrea Opačak [REDACTED] Od 2004. do 2012. godine pohađala je Osnovnu školu *Antun Mihanović* u Slavonskom Brodu, a potom srednju školu Opća Gimnazija *Matija Mesić*. Srednju školu završila je 2016. godine nakon čega je upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. Tijekom studijskog obrazovanja bila je aktivna članica studentske udruge SUPEUS (*Studentska udruga za promicanje energetske učinkovitosti i savjetovanje*), pri čemu je sudjelovala u organizaciji konferencije BUS – *Budućnost ugodnog stanovanja 2019*. Stručnu praksu pohađala je na Zavodu za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije, u Službi za zdravstvenu ekologiju. Preddiplomski studij je završila 2020. godine obranom završnog rada pod nazivom *Ekstrakcija eteričnih ulja iz borovih iglica* pod mentorstvom prof. dr. sc. Aleksandre Sander, Nakon završenog preddiplomskog studija upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu Kemijskog inženjerstva i tehnologije. U obliku posterskog priopćenja s diplomskim radom sudjeluje na međunarodnom znanstveno-stručnom skupu *19. Ružičkini dani: Danas znanost – sutra industrija*.