

Optimizacija procesa ekstrakcije polifenola

Juričić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:069805>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Juričić

DIPLOMSKI RAD

OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana Juričić

DIPLOMSKI RAD

OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE POLIFENOLA

Mentorica: prof. dr.sc. Jasna Prlić Kardum

Članovi ispitnog povjerenstva: 1. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

2. prof. dr. sc. Aleksandra Sander

3. prof. dr. sc. Mirela Leskovic

Zagreb, rujan 2021.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na mentorstvu i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, sestri i prijateljima što ste mi bili podrška tijekom studiranja

Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

Istraživanja su provedena na Zavodu za mehaničko i procesno inženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u akademskoj godini 2020/2021.

SAŽETAK

Polifenoli su biološki aktivni spojevi prisutni u velikom broju biljaka te im je svrha zaštititi biljku od negativnih vanjskih utjecaja. Zbog *anti-age* svojstava polifenola posljednjih nekoliko godina istražuje se njihova primjena u kozmetičkoj industriji. Zato je cilj ovog rada bila priprema DES-a i odabir odgovarajuće metode za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz lista trputca.

Pripremljeno je 19 otapala od kojih je njih 12 pokazalo dobra fizikalno-kemijska svojstva za daljnju primjenu u procesu ekstrakcije. Za odabrana otapala određena su fizikalno-kemijska svojstva (gustoća, viskoznost, *pH* i polarnost), snimljeni FTIR spektri te je nakon provedene ekstrakcije određena koncentracija ukupnih fenola. Uz to, praćen je utjecaj dodatka vode na učinkovitost ekstrakcije i fizikalna svojstva DES-ova.

Najbolju učinkovitost ekstrakcije pokazao je DES La:Fru:Gly (2:1:2) s 30 i 50 mas% vode te je za La:Fru:Gly s 50 mas% vode provedena optimizacija procesa. Određena je najbolja metoda ekstrakcije te vrijeme potrebno za postizanje ravnotežne koncentracije polifenola. Nadalje je za odabrano otapalo određena ravnotežna koncentracija polifenola na granici faza te je određen difuzijski koeficijent i koeficijent prijenosa tvari.

Ključne riječi: ekstrakcija kapljevina-krutina, list trputca, niskotemperaturna eutektička otapala, polifenolni spojevi.

ABSTRACT

Polyphenols are biologically active compounds present in a large number of plants and their purpose is to protect the plant from negative external influences. Due to the anti-age properties of polyphenols, their application in the cosmetics industry has been investigated in recent years. Therefore, this work aimed to prepare DES and select an appropriate method for the extraction of polyphenolic compounds from plantain leaves.

19 solvents were prepared, 12 of which showed good physicochemical properties for further use in the extraction process. Physicochemical properties (density, viscosity, pH, and polarity) were determined for the selected solvents, FTIR spectra were recorded and the concentration of total phenols was determined after the extraction. In addition, the influence of water addition on the extraction efficiency and physicochemical properties of DESs was monitored.

The best extraction efficiency was shown by DES La: Fru: Gly (2: 1: 2) with 30 and 50 wt% water and for La: Fru: Gly - 50 wt% process optimization was performed. The best extraction method and the time for achieving equilibrium polyphenol concentration were determined. Furthermore, the equilibrium concentration of polyphenols at the phase boundary was determined for the selected solvent, and the diffusion coefficient and the transfer coefficient of the substance were determined.

Keywords: liquid-solid extraction, plantain leaf, low-temperature eutectic solvents, polyphenolic compound

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA (DES).....	2
2.1.2. Fiziklano-kemijska svojstva DES-ova.....	5
2.1.2.1. Talište	6
2.1.2.2. Gustoća	6
2.1.2.3. Viskoznost	7
2.1.2.4. Polarnost.....	7
2.1.3. Podjela i primjena DES-ova.....	7
2.2. POLIFENOLI	9
2.2.1. Podjela polifenola	10
2.2.2. Primjena polifenola u zaštiti kože	11
2.3. EKSTRAKCIJA.....	12
2.3.1. Ekstrakcijske metode	13
2.3.1.1. Ekstrakcija kapljevina-krutina	13
2.3.1.2. Ekstrakcija na magnetskoj mješalici	14
2.3.1.3. Ekstrakcija pomoću ultrazvuka	14
2.3.2. Membranska filtracija	15
2.4. PRIJENOS TVARI PRI EKSTRAKCIJI KRUTINA – KAPLJEVINA	16
2.4.1. Ravnotežna koncentracija na granici faza.....	16
2.5. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM (FTIR)	17
2.5.1. IR zračenje.....	17
2.5.2. FTIR.....	18
3. METODIKA	19
3.1. SVRHA RADA.....	19
3.2. KORIŠTENI MATERIJALI.....	19
3.3. PRIPREMA OTAPALA	20

3.4. KARAKTERIZACIJA PRIPREMLJENIH OTAPALA	20
3.4.1. Određivanje gustoće	20
3.4.2. Određivanje viskoznosti.....	21
3.4.3. Određivanje pH	22
3.4.4. Određivanje polarnosti DES-ova.....	22
3.5. EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ TRPUTCA	23
3.5.1. Ekstrakcija polifenola pomoću magnetske miješalice	23
3.5.2. Ekstrakcija potpomognuta tresilicom	24
3.5.3. Ekstrakcija ultrazvučnom sondom.....	24
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA	26
3.7. IZRAČUNAVANJE KOEFICIJENTA PRIJENOSA TVARI I DIFUZIJSKOG KOEFICIJENTA	28
3.7.1. Određivanje koncentracije polifenola u graničnom sloju	28
3.7.2. Određivanje veličine usitnjenog trputca	28
3.7.3. Određivanje gustoće trputca.....	29
3.7.4. Određivanje raspodjele veličina pora	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. PRIPREMLJENA OTAPALA	32
4.1.1. Karakterizacija DES-ova pomoću FTIR-a.....	35
4.1.2. Određivanje fizikalna svojstva DES-ova	39
4.2. UKUPNA KONCENTRACIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA.....	41
4.3. OPTIMALNA METODA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA	43
4.4. ODREĐIVANJE DIFUZIJSKOG KOEFICIJENTA I KOEFICIJENTA PRIJENOSA TVARI ZA EKSTRAKCIJU POLIFENOLA IZ TRPUTCA	44
5. ZAKLJUČAK.....	46
8. POPIS KRATICA I SIMBOLA	47
7. LITERATURA	49

1. UVOD

Kozmetička industrija je jedna od najbrže rastućih industrija u svijetu. Samo 2019. g ostvarila je profit od 380.2 milijardi dolara te je pretpostavka da će do 2027. g imati vrijednost od 463.5 milijardi dolara [1]. Unatoč padu prihoda zbog prošlogodišnje pandemije, ona počinju ponovno rasti. Neke od posljedica pandemije na kozmetičku industriju su digitalizacija tržišta, povećanje brzine kojom se razvijaju nove formulacije te promjena fokusa sa dekorativne na preparativnu kozmetiku, odnosno prema proizvodima njegu kože [2].

Polifenoli su spojevi koji se ubrajaju u skupinu antioksidansa te se mogu naći u voću, povrću, raznim začinima i vinu. Oni u tijelu uklanjaju slobodne radikale te time smanjuju rizik od raka, dijabetesa i srčanih bolesti [3]. Zbog antioksidacijskih svojstava istražuje se njihova primjena u proizvodima koji usporavaju starenje kože. Polifenoli su u biljkama prisutni kao sekundarni metaboliti te se mogu nalaziti kao dio matrice ili kao slobodni spojevi. Budući da njihov oblik u kojem se nalaze i stabilnost ovise o vrsti biljke i godišnjem dobu javljaju se problemi kod njihove ekstrakcije. Kako bi se poboljšala učinkovitost ekstrakcije polifenola, razvijaju se konvencionalne i nekonvencionlane metode ekstrakcije te su neke od razvijenih metoda specifične za ekstrakciju pojedinih vrsta polifenola.

Standardna otapala poput alkohola (metanola, etanola), dietil-etera i etil-acetata nisu se pokazala pogodnima za ekstrakciju polifenola iz nekoliko razloga. Naime, navedena otapala mogu ostati u maloj koncentraciji u konačnom proizvodu te bez obzira na količinu, mogu predstavljati rizik za ljudsko zdravlje. Zato je potrebno nekoliko dodatnih stupnjeva kako bi se nepoželjno otapalo uklonilo iz ekstrakta što predstavlja dodatan utrošak energije i vremena, a samim time i dodatne financijske troškove. Osim toga, korištenjem čistih organskih otapala, vrlo polarne fenolne kiseline (benzojeva, cimeta kiselina) ne mogu se potpuno ekstrahirati [4].

Zbog ekološke prihvatljivosti i visoke učinkovitosti istražuje se primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *deep eutectic solvents*, DES) u ekstrakciji polifenola. Osim što su ekološki prihvatljivi, polifenoli su vrlo stabilni u DES-u te se zato istražuje kao jedna od opcija koja bi se koristila za ekstrakciju polifenola u kozmetičkoj ili farmaceutskoj industriji [5].

Osim, odabira odgovarajućeg otapala za ekstrakciju važan je i odabir odgovarajuće metode te se u tu svrhu ispituje nekoliko metoda ekstrakcije poput mikrovalne ili ultrazvučne ekstrakcije [4].

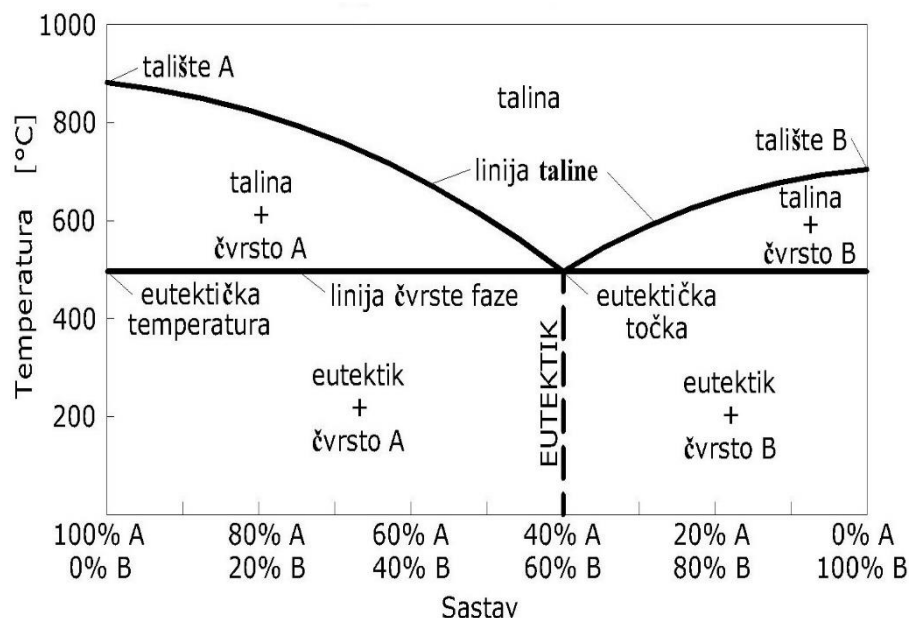
2. TEORIJSKI DIO

2.1. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA (DES)

DES se priprema miješanjem i zagrijavanjem inače nemiješljivih krutina. Komponente koje se koriste za dobivanje DES-ova su biorazgradive, jeftine i obnovljive [6].

Za sve DES-ove karakteristična je eutektička točka (slika 1.) [7]. To je najniža temperatura pri kojoj je kapljevitost prisutna u sustavu [8].

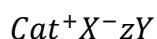
Za pripremu DES-a potrebna je pomiješati elektron-donorsku (engl. *hydrogen bond donor*, HBD) i elektron-akceptorsku komponentu (engl. *hydrogen bond acceptor*, HBA) u određenom omjeru [6]. Na slici 1. se može uočiti da je talište krutina A i B znatno više od tališta DES-a što potvrđuju primjeri iz prakse. Npr. DES koji se sastoji od kolin-klorida (engl. *choline chloride*, ChCl) i uree u omjeru 1:2 (ChCl:urea 1:2) postiže eutektičku točku pri 285,15 K, dok su tališta ChCl-a i uree 575,15 K i 407,15 K. U ovom primjeru ChCl je HBA dok je urea HBD komponenta. Snižanje tališta DES-a u odnosu na talište spojeva od kojih se sastoji posljedica je snažnih međumolekulskih interakcija između HBA i HBD komponente [7]. Razlika u talištu između eutektičke točke i talištu čistih komponenti naziva se temperaturna depresija [8]. Ona je posljedica delokalizacije naboja između HBA i HBD-a [9].



Slika 1. Fazni dijagram dvokomponentnog sustava kapljevitost-krutina [10]

Osim eutektičke točke, na grafu se mogu uočiti ravnotežne linije ili granice faza koje dijele dijagram na slici 1. u nekoliko područja. U području ispod linija taline do linija čvrste faze sustav se sastoji od taline komponenti A i B i kristala taline A, odnosno taline B. U tom području sustav je dvofazan. Ispod linije čvrste faze sustav se sastoji od dvije čvrste faze, eutektika i kristala krutina A, odnosno B. Sastav u bilo kojoj točki na grafu može se odrediti primjenom pravila poluge [11].

Općenita formula kojom se može opisati DES je:



gdje Cat^+ predstavlja bilo koji amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation, a X^- je Lewis-ova baza, odnosno halidni ion. Interakcijom X^- s Lewis-ovom ili Brønsted-ovom kiselinom označenom s Y nastaju kompleksni neionski spojevi. Sa z je označen broj Y interakciji sa X^- [9].

DES-ovi su se razvili kao vrsta ionskih kapljevine (engl. *ionic liquid*, IL). Iako se u literaturi često ova dva pojma koriste u istom kontekstu, potrebno je naglasiti da je riječ o dvjema različitim skupinama otapala [9]. DES se od IL razlikuje po tome što se može pripremiti i od neionskih spojeva te se zato DES više ne smatra jednom od vrsta IL-a, nego posebnom skupinom otapala (tablica 1.) [6].

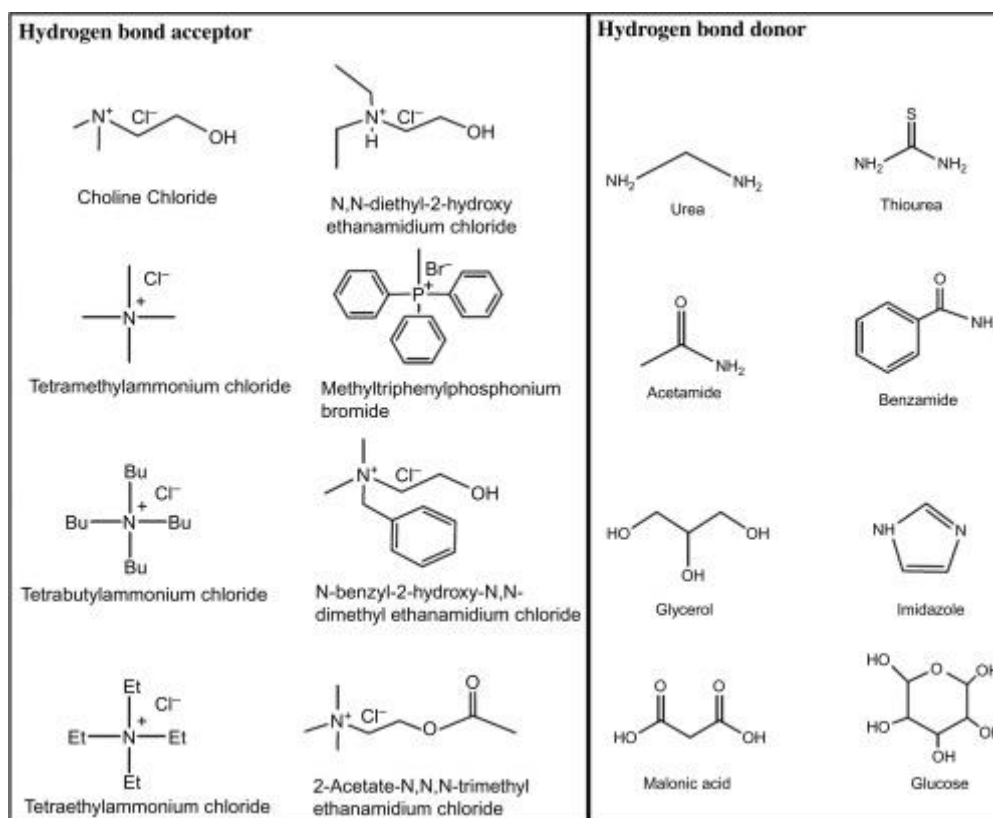
Tablica 1. Razlike u svojstvima i pripremi između IL-a i DES-a (1.dio) [6]

KARAKTERISTIKE	IL	DES
TALIŠTE	Nisko talište ionskih spojeva	Nisko talište eutektičke smjese
EKOLOŠKA PRIHVATLJIVOST	Nisu uvijek ekološki prihvatljiva, mogu se sastojati od otrovnih spojeva	Sastoje se od biorazgradivih i ekološki prihvatljivih spojeva
EL.VODLJIVOST	Umjerena do visoka	Visoka
OSJETLJIVOST	Osjetljivi na vlagu i potrebna je inertna sredina za rad	Nisu osjetljivi na vlagu i vrlo lako se mogu skladištiti

Tablica 1. Razlike u svojstvima i pripremi između IL-a i DES-a (2.dio) [6]

KARAKTERISTIKE	IL	DES
PRIPREMA	Složena priprema te pročišćavanje nakon pripreme	Jednostavna priprema jeftinih komponenti; nije potrebno naknadno pročišćavanje
CIJENA	Skupa	Jeftina otapala koja se mogu regenerirati
VISKOZNOST	Vrlo viskozna otapala	Vrlo viskozna, ali na viskoznost se može utjecati dodavanjem vode ili odabirom komponenti

Najčešće korišteni HBA spojevi u pripremi DES-ova su kvaterne amonijeve soli, ponajprije ChCl jer je jeftin i ekološki prihvatljiv dok se kao HBD koriste amidi, amini, alkoholi ili karboksilne kiseline [13]. Primjeri spojeva koji su korišteni za dobivanje DES-a prikazani su na slici 2.



Slika 2. HBA i HBD komponente koje se koriste u pripremi DES-a [12]

Osim po spojevima koji se koriste u pripremi DES-ova, DES se od IL-a razlikuje po fizikalnim svojstvima i načinu pripreme što je prikazano u tablici 1. (2.dio) [6]. Također, DES ima brojne prednosti pred otapalima koja se trenutno koriste u različitim industrijskim procesima. Uz prethodno navedeni mali ekološki otisak i regenerativnost, DES nije zapaljiv, kemijski je i toplinski stabilan te u nekim slučajevima bolje otapa određene spojeve u odnosu na konvencionalna otapala [12].

2.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova

Fizikalno-kemijska svojstva mogu se uočiti ili mjeriti bez da mijenjamo sastav tvari [14]. Ona se određuju pomoću različitih mjernih instrumenata. Neka od fizikalnih svojstava su talište, vrelište, gustoća, viskoznost, električna i toplinska vodljivost, boja, polarnost [15]. Fizikalna svojstva mogu se podijeliti u dvije skupine: ekstenzivna i intenzivna svojstva. Ekstenzivna svojstva poput mase ili volumena ovise o količini tvari, dok intenzivna svojstva poput gustoće ili boje ne ovise o količini neke tvari [16].

Na fizikalna svojstva DES-a utječu svojstva komponenti od kojih se on sastoji, njihov omjer i međumolekulske interakcije. Međumolekulske interakcije između HBA i HBD-a su vrlo složene. Uz vodikove interakcije, mogu se javiti elektrostatske i van der Waalsove interakcije. Do sada su se neka od svojstava DES-a poput temperaturne depresije, pripisivala isključivo vodikovim interakcijama između HBA i HBD komponente, ali F. Pena-Pereira i I. de la Calle u knjizi *Encyclopedia of Analytical Science*, navode da na jačinu interakcija između HBA i HBD-a ima utjecaj i kiselost HBA te struktura/konformacija HBD-a. Ovisno o jačini interakcija mijenjat će se i makroskopska svojstva DES-a poput gustoće ili viskoznosti. [12] Zbog velikih mogućnosti kombinacija DES-ova i složenosti međumolekulskih interakcija do sada u literaturi nisu zabilježena njihova općenita svojstva, nego se mogu naći svojstva za svaki od pripremljenih otapala. S ciljem predviđanja fizikalnih svojstava DES-ova razvijen je QSAR model (engl. *quantitative structure–activity relationship*, QSAR) [7]. Neka od fizikalnih svojstava DES-ova koja su važna za proces ekstrakcije (talište, gustoća, viskoznost, polarnost) detaljnije su objašnjena u nastavku.

2.1.2.1. Talište

Talište je temperatura pri kojoj krutina prelazi iz čvrstog u kapljevito stanje [19].

Već je ranije navedeno da kod DES-a dolazi do temperaturne depresije, ΔT_m . Njezin iznos ovisit će o jakosti međumolekulskih interakcija između HBA i HBD-a, o njihovom talištu te o omjeru HBA i HBD-a u DES-u [9]. Temperaturna depresija raste sa porastom jačine međumolekulskih interakcija između HBA i HBD-a, odnosno njihova mogućnost stvaranja vodikove veze [12]. Isti trend se uočava i kod tališta HBA i HBD-a. Ukoliko su tališta HBA i HBD komponente visoka, temperaturna depresija će biti veća. Velika temperaturna depresija posljedica je velike energije kristalne rešetke koja se oslobodi spajanjem tih komponenti. Osim o svojstvima komponenti DES-a iznos temperaturne depresije ovisit će i o njihovom omjeru. Npr. ChCl i urea, neće imati jednaku eutektičku točku ukoliko ih se pomiješa u omjeru 1:1 i 1:2. Pri omjeru 1:1 talište je $54\text{ }^\circ\text{C}$, dok je pri omjeru 1:2 talište $12\text{ }^\circ\text{C}$ [9].

Iako su do sada pripremljeni DES-ovi širokog raspona tališta, najviše istražuje primjena onih DES-ova koje su stabilne, homogene kapljevine pri sobnoj temperaturi [12].

2.1.2.2. Gustoća

Gustoća je jednaka omjeru mase i volumena neke tvari te se najčešće izražava u g/cm^3 .

Gustoća DES-a kao i druga fizikalna svojstva ovisi o svojstvima komponenti od kojih se sastoji. DES-ovi imaju veliku gustoću te je njihova gustoća najčešće veća u odnosu na gustoću komponenti od kojih se sastoji. Razlika u gustoći DES-a u odnosu na njegove komponente može se objasniti na dva načina. Prvi način odnosi se na teoriju šupljina. Miješanjem HBA i HBD komponente jedna molekula se ugrađuje u šupljine druge te se time smanjuje njihov promjer [18]. Molekule se "gusto pakiraju" te DES poprima strukturu sličnu polimeru [19]. Drugi način kojim se može objasniti gustoća DES-a odnosi se na svojstva komponenti od kojih se sastoji. Npr. duljina alkilnog lanca kod halidnih soli može utjecati na smanjivanje gustoće. Povećanjem duljine lanca, povećavaju se molarna masa i volumen zbog čega se gustoća sustava smanjuje [18].

Ukoliko je gustoća DES-a prevelika ona se može smanjiti dodatkom vode. Na isti način moguće je utjecati i na viskoznost [6].

2.1.2.3. Viskoznost

Viskoznost je mjera unutarnjeg otpora tečenju fluida. Fluidi velike viskoznosti sporije teku jer postoji veliki unutarnji otpor tečenju, dok je kod fluida male viskoznosti otpor manji [20].

Viskoznost DES-ova kreću se od umjerenih do visokih ovisno o odabranim HBA i HBD-a komponentama. Primjerice, DES DL-Mentol:octena kiselina (1:1) ima relativno malu viskoznost (9 cP), dok DES ChCl:urea ima relativno veliku viskoznost (12,027 cP). Velika viskoznost DES-ova posljedica je složenih međumolekulskih interakcija (vodikovih veza između HBA i HBD-a, elektrostatskih i van der Waalsovih interakcija). Velika viskoznost predstavlja problem jer ograničava primjenu DES-ova, pogotovo u procesima prijenosa tvari i topline. Prilikom pripreme DES-ova na viskoznost je moguće utjecati povećanjem temperature, ali i dodatkom vode. Dodatkom vode smanjuje se viskoznost i gustoća DES-ova jer se smanjuje jačina interakcija između HBA i HBD komponente [12].

2.1.2.4. Polarnost

Polarnost je posljedica raspodjela električnog naboja između atoma u molekuli [21].

Važno je poznavati polarnost DES-ova jer ona utječe na njihova separacijska svojstva i primjenu [22]. Polarnost kao i druga svojstva DES-a ovisi o komponentama od kojih se on sastoji, npr. duljina alkilnog lanca kod kvaternih amonijevih soli imat će utjecaja na njihovu polarnost. Prilikom pripreme DES-a važno je voditi brigu o njegovoj polarnosti zbog primjene [19].

2.1.3. Podjela i primjena DES-ova

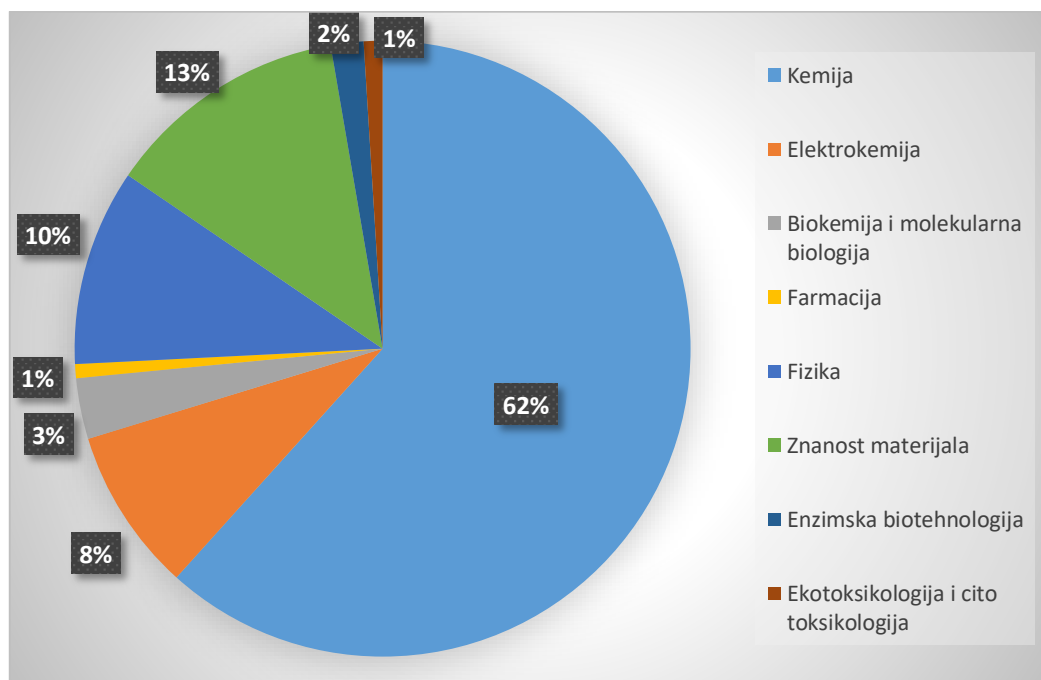
DES se može podijeliti u tri skupine: prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *natural deep eutectic solvents*, NADES), hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *hydrophobic deep eutectic solvents*, HDES) i terapijska niskotemperaturna eutektička otapala. (engl. *therapeutic deep eutectic solvents*, THEDES). Važno je napomenuti da je ova podjela okvirna i da jedno otapalo može pripadati u nekoliko skupina. Primjerice, THEDES-i se mogu smatrati NADES-ima jer se sastoje od prirodnih spojeva koji nisu štetni za ljude i okoliš.

NADES se razvio kako bi se u njima mogli otapati spojevi koji imaju smanjenu topljivost u vodi, a topljiva su u otapalima koja su štetna za okoliš. Zbog biorazgradivosti i ekološke prihvatljivosti potencijalna su zamjena do sada korištenim štetnim otapalima ili IL-ima. Ova otapala se pripremaju od spojeva kao što su: šećeri, voćne kiseline ili aminokiseline [19].

THEDES se razvio s ciljem poboljšanja topljivosti i apsorpcije djelatne tvari. THEDES se najčešće sastoji od najmanje dvije komponente od kojih je jedna djelatna tvar [25].

HDES se po prvi puta spominje u literaturi 2015. g. te je razvijen s ciljem ekstrakcije određenih spojeva iz vode. Zanimljivo je da se HDES može pripremiti od komponenti koje su topljive u vodi, a u kombinaciji s odgovarajućim spojevima tvore hidrofobna otapala. I ova otapala se mogu ubrajati u skupinu NADES-a budući da se sastoje od zelenih spojeva: kvaternih amonijevih soli u kombinaciji s octenom, dekanskom ili drugim organskim kiselinama. Neki od primjera primjene HDES-a su u ekstrakciji biomolekula, pesticida ili metalnih iona iz vodenih otopina [24].

DES-ovi bi u budućnosti mogli imati široku primjenu. Tome u prilog, govori i statistika objavljena u sklopu znanstvenog članka Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biotehnologiji i bioinženjeringu-obećanja i izazovi.



Slika 3. Prikaz udjela znanstvenih članaka vezanih za primjenu DES-a u različitim područjima. Ukupan broj objavljenih članaka je 407 [25]

Članak je objavljen 2016. g. te je u njemu prikazan udio znanstvenih članaka vezanih za primjenu DES-ova u različitim područjima. Praćen je broj članaka koji su objavljeni u periodu od 10 godina. Tijekom navedenog perioda objavljeno je 407 članaka u kojima se spominje primjena DES-ova u različitim područjima poput kemije, fizike, farmacije, biotehnologije itd. (slika 3.) [25].

2.2. POLIFENOLI

Polifenoli su široko rasprostranjeni spojevi te ih se može naći u voću, biljkama, žitaricama i pićima [26]. Jedna od biljaka u kojoj se mogu naći polifenoli je trputac (slika 4.) On pripada porodici biljaka pod nazivom *Plantaginaceae*. Brojne vrste iz ove porodice su se godinama koristile za liječenje upala dišnih puteva, probavnih problema ili za iritacije kože. Njihova ljekovita svojstva su posljedica velike koncentracije polifenola, polisaharida i iridoida. U jugoistočnoj Europi najrasprostranjenije tri vrste trputca: *Plantago major* L., *Plantago media* L. i *Plantago lanceolata* L. [27].



Slika 4. Širokolisni trputac [28]

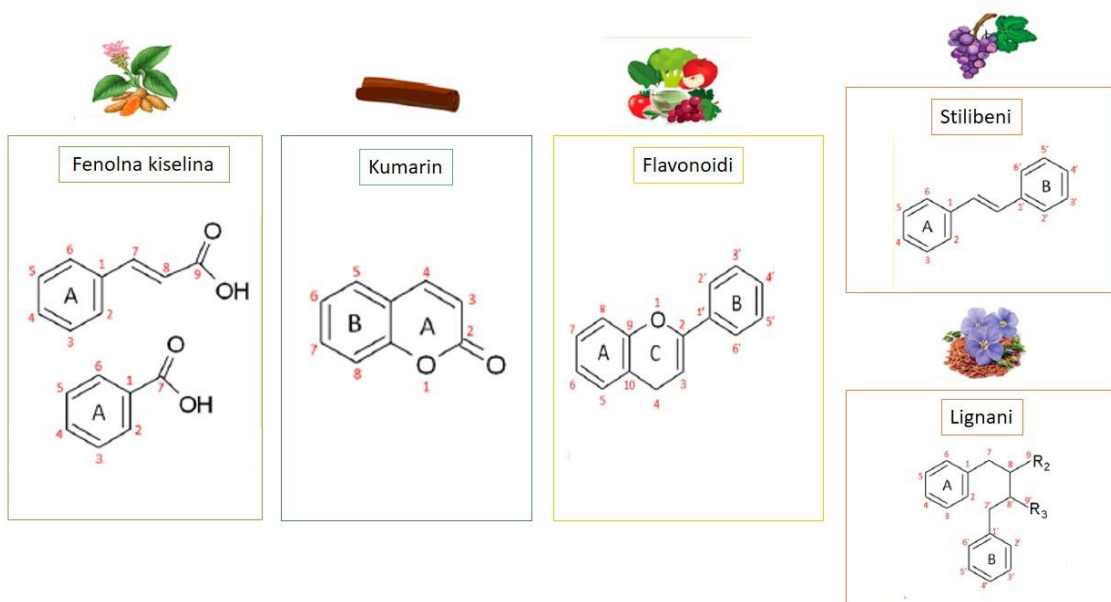
2.2.1. Podjela polifenola

U biljkama su polifenoli prisutni kao sekundarni metaboliti te pomažu biljci u obrani od UV zračenja i patogena [29]. Mogu se podijeliti u sljedeće skupine: fenolne kiseline, kumarine i flavonoidi (slika 5.). Flavonoidi se mogu podijeliti još na stilbene i lignane. U polifenole se ubrajaju jednostavnije fenolne kiseline i koji sadrže dvije fenolne grupe te čine manje ili više kompleksne strukture velike molekulske mase [26].

Fenolne kiseline su skupina organskih aromatskih kiselina koje imaju karboksilnu funkcionalnu skupinu i fenolni prsten. Hidroksibenzojeva (C6-C1) i hidroksicinamicinska kiselina (C6-C3) su dva osnovna oblika u kojima se mogu naći fenolne kiseline u prirodi. Osim njih, u ovu skupinu pripadaju benzojeva i p-kumarinska kiselina [26].

Kumarini su spojevi koji su poznati po mirisu koji podsjeća na vaniliju ili prema nekim autorima na svježe pokošeno sijeno. Budući da na benzenovom prstenu postoji šest mjesta na kojima može doći do supstitucije postoje brojni prirodni i sintetički derivati kumarina [26].

Flavonoidi se sastoje od dva benzenska prstena (prsten A i prsten B) te jednog heterocikličkog prstena (prsten C). Nalaze se u voću i povrću kao antioksidansi poput kvercetina, kempferola ili finestina [26].



Slika 5. Podjela fenolnih spojeva u biljkama [26]

Stilbeni dolaze u obliku *cis* i *trans* izomera. U ovu skupinu ubraja se i resveratrol kojeg se može naći u grožđu ili vinu [26]. U posljednjih nekoliko godina sve se više koristi u proizvodima za njegu kože ili kao dodatak prehrani radi održavanja mladolikog izgleda kože [30].

Lignani su široko rasprostranjena skupina spojeva te ih se u hrani može naći u obliku sekoizolaricirezinola. Od prehrambenih namirnica, sjemenke lana su najbogatnije lignanima od prehrambenih namirnica [31].

2.2.2. Primjena polifenola u zaštiti kože

Polifenoli imaju široku primjenu u farmaceutskoj industriji, u prehrambenoj industriji kao dodatak prehrani te u kozmetičkoj industriji gdje se najviše koriste zbog *anti-age* svojstava [32].

Starenje je vrlo složen i dinamičan proces koji je uzrokovan okolišnim i genetskim čimbenicima. Postoji nekoliko teorija kojima se objašnjava proces starenja, ali zasigurno najbolje prihvaćena te i dalje aktualna je teorija o utjecaju slobodnih radikala koji ju je predložio prof. Harman 1956. g. Prema toj teoriji, na starenje najveći utjecaj ima oksidacijski stres [32,33]. Oksidacijski stres je poremećaj do kojeg dolazi kada u organizmu nije uravnoteženo stvaranje slobodnih kisikovih radikala i koncentracija antioksidansa [34]. Do neravnoteže može doći zbog imunoloških čimbenika, npr. leukocita koji radi obrane organizma od mikroorganizama ili patogena stvaraju veliki broj kisikovih radikala ili zbog vanjskih čimbenika kao što su UV zračenje, onečišćen zrak ili pušenje [35].

Koža je organ na kojem se najbolje uočavaju efekti starenja. Ona se sastoji od tri sloja: hipoderme, dermisa i epidermisa. Hipoderma je najniži sloj kože i ona se koristi radi pohrane masti. Epidermis je sljedeći sloj te on predstavlja barijeru između tijela i okoline. Posljednji sloj kože je dermis. U dermisu se nalaze živčani završeci, žlijezde lojnice i folikule dlake. Na negativan utjecaj UV zračenja najosjetljiviji su epidermis i derma. Neke od negativnih posljedica UV zračenja na kožu su: razgradnja kolagena, zadebljanja epiderme, smanjenena elastičnost kože itd.

Budući da se polifenoli se ubrajaju u skupinu spojeva koji se nazivaju antioksidantima, za njih je karakteristično da onemogućuju stvaranje slobodnih radikala u organizmu, uništavaju stvorene slobodne radikale ili popravljaju oštećenja nastala djelovanjem slobodnih radikala. Upravo zbog antioksidacijskih svojstava, u posljednjih nekoliko godina istražuje se primjena

polifenola kao sredstvo za prevenciju oštećenja na koži uzrokovana UV zračenjem. Također, istražuje se i njihova primjena u sprječavanju raka kože [32].

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je proces u kojem se jedna ili više komponenti odvajaju iz čvrste ili kapljevite smjese pomoću otapala koji je selektivno za tvar koju se želi izdvojiti [36]. Ekstrakcija pomoću otapala iz krute smjese naziva se izluživanje [37]. Ekstrakcija se može provoditi u jednom ili više stupnjeva. Kod jednostupnjevite ekstrakcije iz pojne smjese (koja se sastoji od primarnog otapala i ključne komponente) se izdvaja željena tvar pomoću selektivnog otapala. Produkti ekstrakcije su ekstrakt i rafinat. Ekstrakt se sastoji od selektivnog otapala i tvari koju se želi ekstrahirati te sadrži u maloj koncentraciji primarno otapalo iz pojne smjese. Rafinat se sastoji od primarnog otapala iz pojne smjese te ekstrahirane tvari i selektivnog otapala u tragovima [38]. Ekstrakcija se provodi u procesima kada:

- jedna od komponenti procesa nije termički stabilna
- komponente ekstrakcije imaju visoka vrelišta jer je tada destilacija ekonomski neisplativa zbog velikih energijskih troškova
- primarno otapalo i ključna komponenta tvore azeotrop
- potrebno je izdvojiti ključnu komponentnu koja se nalazi u vrlo maloj koncentraciji u primarnom otapalu

Kako bi proces ekstrakcije bio učinkovit selektivno otapalo mora zadovoljavati sljedeće uvjete:

- mora imati veliku selektivnost prema ključnoj komponenti te ona u njemu mora biti znantno topljivija nego u primarnom otapalu
- ne smije se miješati sa sekundarnim otapalom te treba postojati velika razlika u gustoći između primarnog i sekundarnog otapala
- mala viskoznost i površinska napetost
- sekundarno otapalo treba biti termički i kemijski stabilno

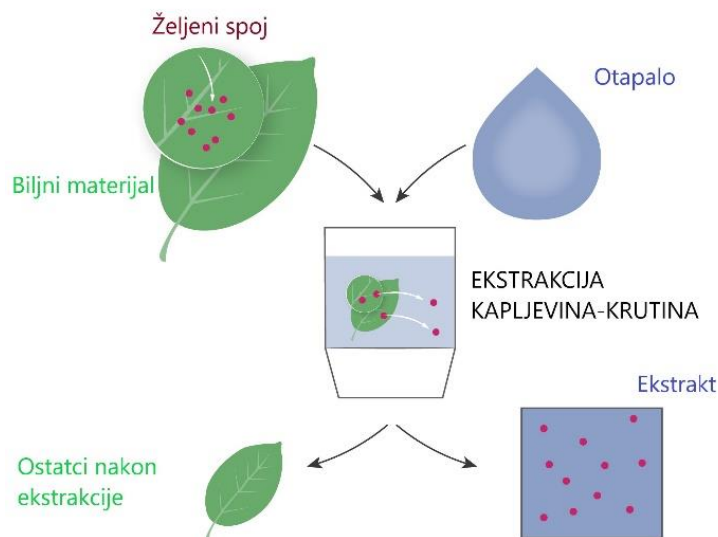
U industrijskim procesima radi bolje učinkovitosti provodi se višestupnjevita ekstrakcija. Nakon procesa ekstrakcije otapalo je moguće regenerirati što se provodi destilacijom rafinata. Nakon regeneracije otapalo je moguće ponovno uvesti u proces [36].

2.3.1. Ekstrakcijske metode

Iako postoje brojne ekstrakcijske metode, samo se neke od njih koriste u ekstrakciji prirodnih komponenti. Ekstrakcija je prvi korak kod izdvajanja djelatne tvari iz prirodne sirovine. Odabir odgovarajuće metode je vrlo važan kako bi se mogla dobiti što veća koncentracija djelatne tvari [39].

2.3.1.1. Ekstrakcija kapljevina-krutina [40]

Ekstrakcija kapljevina krutina (izluživanje) provodi se u nekoliko koraka. U prva dva koraka, otapalo prodire u čvrstu matricu i u njemu se otapa ključna komponenta. Zatim, otapalo difundira iz matrice te se odvaja ključna komponenta iz otapala (slika 6.).



Slika 6. Ekstrakcija bioloških spojeva izluživanjem [40]

Na ovu metodu utječe nekoliko parametara: svojstva otapala, veličina čestica krutine, omjer krutina-kapljevina, temperatura i duljina ekstrakcije.

Otapalo se odabire na temelju njegove selektivnosti, kvalitete otapanja ključne komponente, cijene i sigurnosti za okoliš. Kod kvalitete otapanja ključne komponente u otapalu, može se primijeniti "zakon" slično se otapa u sličnom, što znači da će se polarno otapalo koristiti za otapanje polarne ključne komponente.

Radi postizanja veće učinkovitosti ekstrakcije, poželjno je da su čestice krutine što manje, radi bolje difuzije kapljevine u krutinu. S druge strane, mala veličina čestica može stvarati probleme prilikom odvajanja ključne komponente od otapala.

Uz odgovarajuću veličinu čestice radi bolje učinkovitosti poželjno je provoditi proces pri višoj temperaturi radi bolje topljivosti ključne komponente i difundiranja otapala. Nedostatak provođenja procesa pri visokim temperaturama je taj što može doći do isparavanja otapala ili razgradnje ključne komponente ili otapala ukoliko se oni sastoje od termički nestabilnih spojeva.

Učinkovitost ekstrakcije se povećava s duljinom trajanja procesa, ali sve do postizanja ravnotežne koncentracije. Nakon postizanja ravnotežne koncentracije duljina procesa više nema utjecaja na stupanj iskorištenja.

Omjer otapala i krutine također utječe na učinkovitost. Radi većeg stupnja iskorištenja cilj je da je količina otapala što veća. No, prevelika količina otapala može produljiti vrijeme koje je potrebno za izdvajanje ključne komponente.

2.3.1.2. Ekstrakcija na magnetskoj miješalici

Odabir odgovarajuće metode ekstrakcije vrlo je važan kako bi se postigla što veća učinkovitost. Prilikom izdvajanja biološki aktivnih spojeva, u literaturi se ističe kako se za ekstrakciju istog spoja mogu koristiti različite metode ovisno o vrsti biljke iz koje se ekstrahiraju. Prilikom ekstrakcije na magnetskoj miješalici, miješalo se okreće pod djelovanjem magnetskog polja te se neprestano dovodi nova količina otapala potrebna za izdvajanje ključne komponente. Ova metoda je pogodna za ekstrakciju toplinski nestabilnih spojeva [41,42]. Općenito, prednost magnetske miješalice u odnosu na mehaničku je to što je tiša i nema pokretnih dijelova koji se mogu istrošiti [39].

2.3.1.3. Ekstrakcija pomoću ultrazvuka

Ekstrakcija pomoću ultrazvuka kao što joj i sam naziv kaže koristi ultrazvuk radi izdvajanja ključne komponente iz uzorka [40]. Ultrazvučini valovi se šire otapalom stvarajući cikluse visokog i niskog tlaka što rezultira pojavom akustične kavitacije. Naime, pod djelovanjem ultrazvuka dolazi do stvaranja mjehurića otapala koji rastu do određene veličine kada dolazi do

njihovog pucanja zbog velikih smičnih sila. Pucanjem kavitacijskih mjehurića dovodi do stvaranja lokalnih ekstrema (visok tlak i temperatura), velikih brzina zagrijavanja/hlađenja otapala. Pucanjem kavitacijskih mjehurića u blizini površine krutine istovremeno se javlja nekoliko pojava. Na samoj površini krutine dolazi do guljenja površine i odvajanje čvrstih čestica erozijom. U otapalu dolazi do razvoja makroturbulencija i mikromiješanja. Zbog istovremenog djelovanja navedenih fenomena otapalo može bolje prodirati u granični sloj na površini krutine čime se poboljšava prijenos tvari iz graničnog sloja u otapalo, odnosno učinkovitost ekstrakcije [43]. Prednosti ove metode u odnosu na ekstrakciju pomoću magnetske mješalice je ta što je potrebno manje otapala i kraće trajanje procesa.

Ekstrakcija ultrazvukom provodi se pomoću sonde ili u ultrazvučnoj kupelji. Kupelj proizvodi ultrazvuk frekvencije 40 kHz. Prednost kupelji je niska cijena, što se može koristiti na velikom spektru uzoraka i istovremeno provođenje procesa na više uzoraka. S druge strane, zbog vode u kupelji i kako bi se zaštitilo stakleno posuđe kupelj proizvodi ultrazvuk slabijeg intenziteta od sonde. Unatoč navedenim prednostima kupelji u odnosu na sondu, sonda se češće koristi za ekstrakciju. Naime, pomoću sonde se proizvodi ultrazvuk frekvencije 20 kHz te na uzorak izravno djeluje ultrazvuk većeg intenziteta [44].

2.3.2. Membranska filtracija

Nakon ekstrakcije željeni spoj je potrebno izdvojiti iz otapala. Kao jedna od metoda koja se može koristiti u tu svrhu je membranska filtracija. Kod membranske filtracije polupropusna membrana dozvoljava prolaz manjim česticama dok zadržava veće. Ovisno o veličini čestica koje se propušta može se govoriti o mikrofiltraciji, ultrafiltraciji i nanofiltraciji [40].

Mikrofiltracija se koristi za koncentriranje, pročišćavanje, odvajanje makromolekula i koloidnih ili suspendiranih čestica. Pore mikrofiltera mogu biti u rasponu veličina 0,1-1,0 μm . Ova metoda se koristi u prehrambenoj industriji radi pročišćivanja vina, soka ili piva, u obradi otpadnih voda ili prilikom odvajanja plazme od krvi [45].

2.4. PRIJENOS TVARI PRI EKSTRAKCIJI KRUTINA – KAPLJEVINA

Općenito, brzina prijenosa otapala iz mase otopine na površinu krutine je prilično velika, dok brzina prijenosa otapala u krutu tvar može biti nešto sporija. U većini slučajeva ti koraci nisu oni koji ograničavaju ukupnu brzinu u procesu izluživanja. Taj prijenos otapala obično se događa na početku, kada čestice dođu u kontakt s otapalom. Otapanje otopljene tvari u otapalu unutar krute tvari može biti jednostavan proces fizičkog otapanja ili stvarna kemijska reakcija koja oslobađa otopljenu tvar za otapanje. Naše znanje o procesu otapanja je ograničeno i mehanizam može biti različit za svaku krutu tvar (K1).

Brzina difuzije otopljene tvari kroz krutinu i otapalo na površinu krutine često je najsporiji procesu procesu izluživanja i može ovisiti o nizu različitih čimbenika. Ako se krutina sastoji od inertne porozne krute strukture, s otopljenom tvari i otapalom u porama u krutoj tvari, tada se difuzija kroz poroznu krutu tvar može opisati učinkovitom difuzivnošću. Da bi se u potpunosti modelirao proces difuzije, potrebni su i praznina i uvijenost. To je opisano u odjeljku 19.3C za difuziju u poroznim krutim tvarima [46,48].

2.4.1. Ravnotežna koncentracija na granici faza

Kod heterogenih sustava u koji se ubraja i sustav kapljevina-krutina, na granici dviju faza nalazi se granično područje faza. Sastav u graničnom području nije jednak sastavu u središtima faza [46]. Prilikom kontakta kapljevine s krutinom prvo dolazi do adsorpcije molekula otapala na površini krutine zbog čega nastaje film na površini krutine. Zatim dolazi do difuzije molekula otapala s površine u pore krutine [48]. Tvar, koja se nalazi u krutini, otapa se u otapalu. Otopina zatim difundira kroz krutinu na površinu čestice. Konačno, otopljena tvar se prenosi u otopinu.

Brzina difuzije otopljene tvari kroz krutinu i otapalo na površinu često je otpor koji kontrolira cjelokupni proces izluživanja i može ovisiti o nizu različitih čimbenika. Ako se krutina sastoji od porozne strukture, s otopljenom tvari i otapalom u porama, tada se difuzija kroz poroznu krutu tvar može opisati efektivnom difuzivnošću. Da bi se u potpunosti modelirao proces difuzije, potrebno je poznavati poroznost i zakrivljenost. U prirodnim tvarima dolazi do dodatne složenosti zbog prisutnih stanica.

Brzina prijenosa tvari A otopljene u otopini volumena V je [48]:

$$V \frac{dc}{dt} = KA(c_{AS} - c_A) \quad (1)$$

Integriranjem jednadžbe od $t=0$ i $c_A = c_{A0}$ do $t=t$ i $c_A = c_A$, dobije se izraz [48]:

$$\int_{c_{A0}}^{c_A} \frac{dc_A}{c_{AS} - c_A} = \frac{Ak_L}{V} \int_{t=0}^t dt \quad (2)$$

$$\frac{c_{AS} - c_A}{c_{AS} - c_A} = e^{-\left(\frac{k_L A}{V}\right) \cdot t} \quad (3)$$

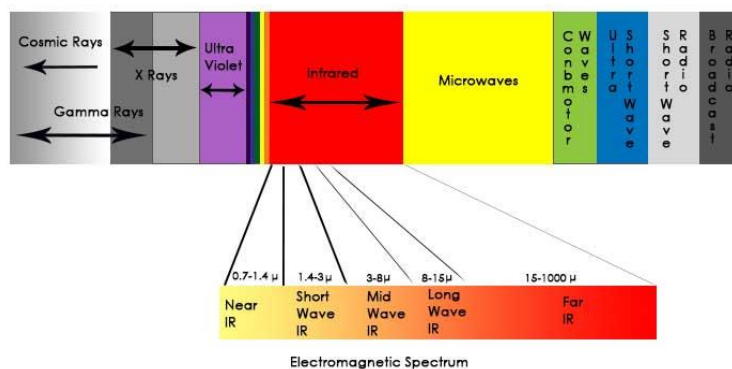
Za sitne čestice ($<0,6$ mm), koeficijent prijenosa tvari u posudi s miješanjem, može se izračunati prema jednadžbi [48]:

$$k_L = \frac{2}{d_p} \cdot D_{ef} + 0,31 \cdot \frac{\eta}{\rho \cdot D_{ef}} e^{-0,667} \cdot \left(\Delta\rho \cdot \eta_c \cdot \frac{g}{\rho_c^2}\right)^{1/3} \quad (4)$$

2.5. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM (FTIR)

2.5.1. IR zračenje

Infracrveno (IR) područje elektromagnetskog spektra otkrio je Sir Frederick William Herschel 1800. g. dok je proučavao Sunce. Herschel je u svojim teleskopima koristio različite obojene filtere kako bi smanjio odsjaj Sunca.

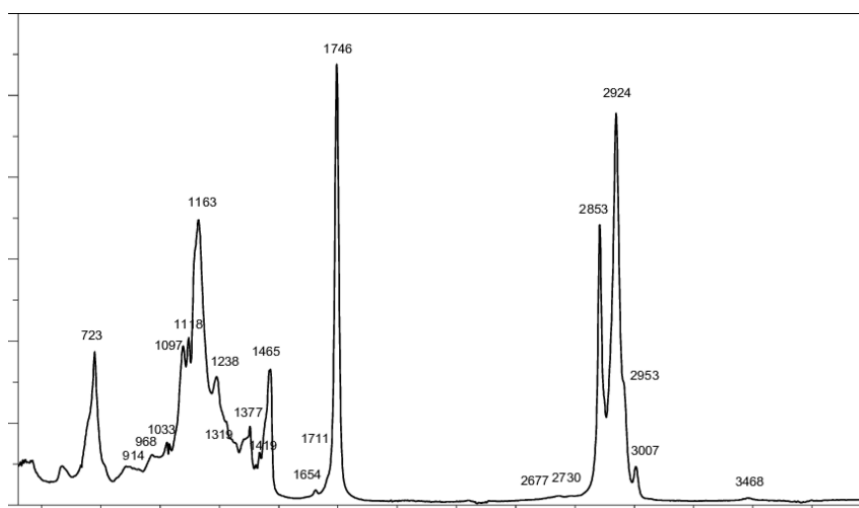


Slika 7. IR područje unutar elektromagnetskog spektra [62]

Primjetio je da bi se crveni filteri zagrijali dok bi s njima gledao Sunce zbog čega je to zračenje nazvao toplinsko zračenje, a kasnije je preimenovano u infracrvene zrake [49]. Infracrveno područje spektra dijeli se na tri dijela: blisko (0,8-2,5 μ), srednje (2,5-25 μ m) i daleko-IR područje (25-1000 μ m) koji su dobili nazive ovisno o tome koliko su udaljeni od vidljivog dijela spektra (slika 7.) [50].

2.5.2. FTIR

Crno tijelo emitira polikromatsko IR zračenje koje prolazi kroz interferometar. Interferometar se sastoji od djelatnika zrake, pokretnog i nepokretnog zrcala. Djelatnik dijeli zraku na dvije zrake, transmitiranu i reflektiranu. Transmitirana zraka pada na pokretno, a reflektirana na nepokretno zrcalo. Zrake se reflektiraju od zrcala i vraćaju se nazad na djelatnik odakle se usmjeravaju prema uzorku [51,52]. Molekule apsorbiraju IR zračenje. Ovisno o energijama veze u molekulama uzorka neće se apsorbirati svo zračenje, nego samo zračenje određenih valnih duljina. Signal koji se dobije nakon prolaska zrake kroz uzorak obrađuje se pomoću složenih matematičkih operacija poznatih kao Fourierova transformacija te se kao rezultat dobije spektrogram na temelju kojeg se dobiju informacije o funkcionalnim skupinama i kemijskim vezama u uzorku. FTIR analiza koristi u organskoj sintezi, analizi polimera, petrokemijskoj industriji, farmaceutskoj industriji i analizi hrane (slika 8.) [52].



Slika 8. Spektrogram maslinovog ulja dobiven pomoću FTIR-a [53]

3. METODIKA

3.1. SVRHA RADA

Cilj rada je priprema i odabir otapala za ekstrakciju polifenola iz prirodnog materijala (trputca). Za ekstrakciju polifenola iz trputca pripremljeno je i karakterizirano više otapala pripremljenih kombinacijom različitih, uglavnom prirodnih komponenata. Sva otapala pripremljena su u kombinaciji s glicerolom koji se nalazi u različitim kozmetičkim preparatima, a radi podešavanja fizikalno-kemijskih svojstava u pripremljena otapala dodana je voda. Uz odabir odgovarajućeg otapala, provedena je i karakterizacija odabranih otapala.

S otapalom koje je pokazalo najbolja svojstva za provedbu ekstrakcije polifenola iz lista trputca je provedena je daljnja optimizacija procesa ekstrakcije. Nadalje je za odgovarajuće otapalo određena ravnotežna koncentracija polifenola na granici faza te je određen difuzijski koeficijent i koeficijent prijenosa tvari.

3.2. KORIŠTENI MATERIJALI

Tablica 2. Komponente potrebne za pripremu otapala

Komponenta	Formula	Molarna masa	Simbol
Glicerol	$C_3H_8O_3$	92,09 g/mol	Gly
Mliječna kiselina	$C_3H_6O_3$	90,08 g/mol	La
Jabučna kiselina	$C_4H_6O_5$	134,09 g/mol	Ma
Limunska kiselina	$C_6H_8O_7$	192,12 g/mol	Cit
Glukoza	$C_6H_{12}O$	180,16 g/mol	Glu
Fruktoza	$C_6H_{12}O$	180,16 g/mol	Fru
Vitamin C	$C_6H_8O_6$	176,12 g/mol	VitC
Betain	$C_5H_{11}NO_2$	117,15 g/mol	Bet

Sve komponente prikazane u tablici 2. osušene su u vakuumskom sušioniku tijekom 8 h na 60 °C kako bi se uklonila sva vlaga prije pripreme DES-ova.

List trputca se nakon prikupljanja prirodno sušio na sobnoj temperaturi, nakon čega je usitnjen u mlinu.

3.3. PRIPREMA OTAPALA

Otapala su pripremljena na rotacijskom vakum isparivaču *IKA RV 10 basic* (slika 9.) gdje su pripremljene krute smjese zagrijavane u tikvici sa okruglim dnom. Vrijeme i temperatura zagrijavanja ovisila su o talištima korištenih spojeva te su navedena na slikama 25.a-25.c. Svi korišteni spojevi za pripremu otapala i njihove kratice navedene su u tablici 2.



Slika 9. Rotacijski vakum isparivač *IKA RV 10 basic* korišten za pripremu DES-ova

3.4. KARAKTERIZACIJA PRIPREMLJENIH OTAPALA

Određena su sljedeća fizikalna svojstva pripremljenim DES-ovima: gustoća, viskoznost, pH i električna vodljivost.

3.4.1. Određivanje gustoće

Gustoća je određena pri sobnoj temperaturi pomoću *Mettler Toledo™ Densito™ 30PX Density Meter* koji je prikazan na slici 10.



Slika 10. *Mettler Toledo™ Densito™ 30PX Density Meter* [54]

3.4.2. Određivanje viskoznosti

Viskoznost je određena pomoću reometra *DV-III Ultra Rheometer by AMETEK Brookfield* (slika 11.) koji je spojen sa računalom te su vrijednosti iz software-a *Rheocalc V2.5* eksportirane u Excel. Na temelju podataka u Excelu je napravljen graf koji prikazuje ovisnost smičnog naprežanja o smičnoj brzini. Viskoznost određena iz nagiba pravca korištenjem Newtonovog zakona viskoznosti iz jednadžbe:

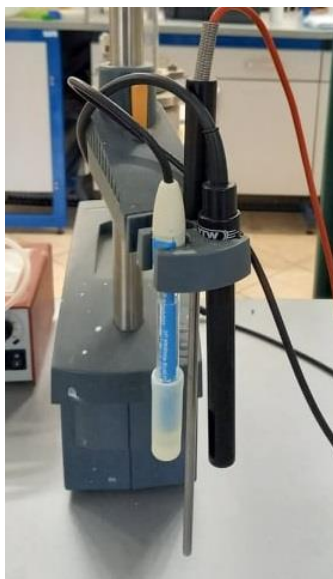
$$\tau = \eta \cdot \frac{dv}{dy} \quad (5)$$



Slika 11. Reometar *DV-III Ultra Rheometer by AMETEK Brookfield*

3.4.3. Određivanje pH

pH pripremljenih otapala određen je pomoću pH *electrode BlueLine 14 pH* (pH: 0-14/ -5°C-100 °C/ 3 mol/L KC) pri sobnoj temperaturi (slika 12.)



Slika 12. pH elektroda *pH electrode BlueLine 14 pH* (lijevo na slici)

3.4.4. Određivanje polarnosti DES-ova

Polarnost DES-ova određena je Nile-red metodom. U odmjernu tikvicu od 100 mL dodano je 1 mL temeljne otopine (1 g/L ot. Nile red/etanol) te etanola do oznake. Zatim je u malu bočicu dodano 3 mL pripremljene otopine i 3 mL DES-a.



Slika 13. Pripremljeni uzorci za određivanje električne provodnosti za Bet:Gly 1:3 (s lijeva na desno udio vode 0%, 10% i 70%)

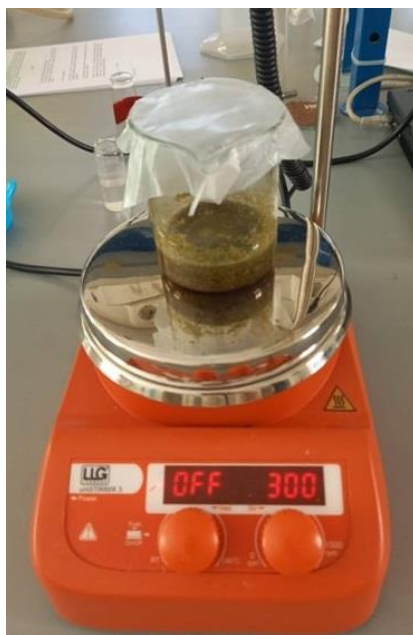
Pripremljene otopine imale su ružičasto do svjetlo ljubičasto obojenje ovisno o DES-u (slika 13.). Iz tako pripremljenih otopina određena je električna provodnost na spektrofotometru.

3.5. EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ TRPUTCA

Ekstrakcija polifenola iz trputca provodila se pomoću magnetske miješalice za sva odabrana otapala, a za odabrano otapalo (La:Fru:Gly (2:1:2) s 50 mas% vode) pomoću tresilice te pomoću ultrazvučne sonde i ultrazvučne kupelji.

3.5.1. Ekstrakcija polifenola pomoću magnetske miješalice

Ekstrakcija polifenola iz trputca s DES-om provodila se u nekoliko koraka. Pripremljene su odvage smjese od 15,60 g u kojima je pomiješano 15,00 g otapala s 0,60 g trputca. Tako pripremljene smjese su se miješale na magnetskoj miješalici 1h bez zagrijavanja (slika 14.). Nakon jednog sata miješanja na magnetskoj miješalici smjesa je centrifugirana.



Slika 14. Smjesa trputca i DES-a na magnetskoj miješalici

3.5.2. Ekstrakcija potpomognuta tresilicom

U DES La:Fru:Gly (2:1:2)-30% H_2O dodan je trputac u prahu te je tako pripremljeni sustav miješan na tresilici *IKA KS 3000* (slika 15.). Sustav je miješan tijekom 2 h pri temperaturi od 25 °C.



Slika 15. Tresilica *IKA KS 3000*

3.5.3. Ekstrakcija ultrazvučnom sondom

U smjesu La:Fru:Gly (2:1:2)-30% H_2O i trputca stavljena je ultrazvučna sonda Bandelin sonoplus HD 3200, snage 200 W pri 20 °C tijekom 5, 10 i 20 min (slika 16.)



Slika 16. Ultrazvučna sonda, *Bandelin sonoplus HD 3200*

3.5.4. Ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji

Pripremljena smjesa otapala La:Fru:Gly (2:1:2)-30% H_2O i truptca stavljena je u ultrazvučnu kupelj *Sonorex digital 10 P, Bandelin* (slika 17.) tijekom 30, 60 i 90 min pri 30°C. Prilikom rada s ultrazvučnom sondom i kupelji potrebno je nositi zaštitne slušalice radi visokih frekvencija.



Slika 17. Ultrazvučna kupelj, *Sonorex digital 10 P, Bandelin*

Nakon ekstrakcije, smjese otapala i truptca su centrifugirane u *Tehnica Centric 322A* tijekom 10 min. Korištena centrifuga prikazana je na slici 18.. Smjese su filtrirane pomoću mikrofiltera *CHROMAFIL Xtra PET, 25 mm, 0.45 μ m*.



Slika 18. Centrifuga *Tehnica Centric 322A*

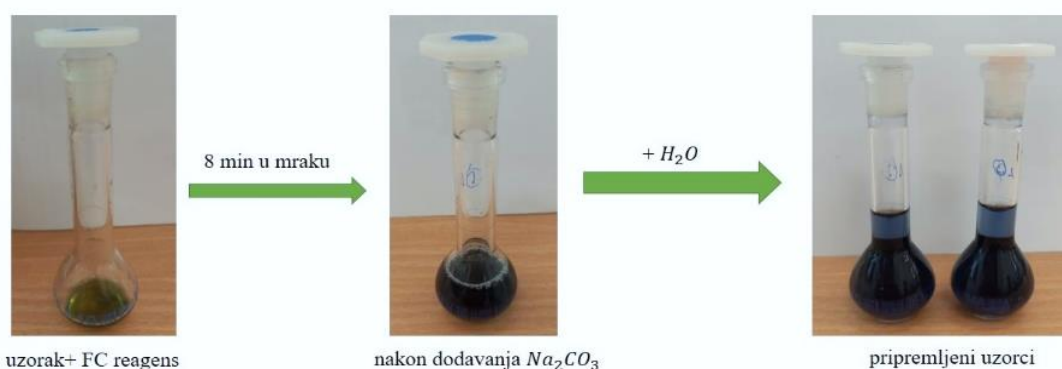
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA

Ukupna koncentracija polifenola iz filtrata određena je Folin-Ciocalteu (FC) metodom na UV-Vis spektrofotometru. Koncentracija ukupnih fenola određena je nakon provedene ekstrakcije pri valnoj duljini od 756 nm (maksimum apsorpcije) te je kvantitativno izražena preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline.



Slika 19. Filtrat otapala nakon ekstrakcije

U odmjerne tikvice od 10 mL, pipetirano je 400 μL FC reagensa i 60 μL filtriranog uzroka (slika 19.) te su tikvice ostavljene da stoje na tamnom mjestu 8 min. Zatim je u tikvice dodano 4 mL (7 mas. %) otopine natrijeva karbonata, a zatim je otopina razrijeđena dodatkom destilirane vode do oznake. Dodatkom vode, pripremljene otopine poprimaju karakteristično plavo obojenje (slika 20.).



Slika 20. Priprema otopina za određivanje ukupne koncentracije fenola FC metodom

Uz pripremljene uzorke na isti način je u tikvici pripremljena slijepa proba koja bi dodatkom vode postala bezbojna. Tako pripremljene otopine zatim se termostatiraju sat vremena pri 40 °C. (slika 21.).



Slika 21. *Julabo E 12* termostat korišten u FC-e metodi

Nakon termostatiranja određena je koncentracija polifenola u uzorku na spektrofotometru *SHIMADZU UV-1280* (slika 20.). Koncentracija ukupnih fenola u uzorku izražena je preko ekvivalentne koncentracije galne kiseline koja je određena iz baždarnog dijagrama.



Slika 20. *SHIMADZU UV-1280*

3.7. IZRAČUNAVANJE KOEFICIJENTA PRIJENOSA TVARI I DIFUZIJSKOG KOEFICIJENTA [48]

Za određivanje koeficijenta prijenosa tvari korištena je jednačba (3):

$$\frac{c_{AS} - c_A}{c_{AS} - c_{A0}} = e^{-\left(k_L A/V\right)t} \quad (6)$$

Za rješavanje jednačbe (3), potrebno je poznavati: početnu, konačnu i ravnotežnu koncentraciju, vrijeme trajanja procesa te volumen otpala.

Za određivanje difuzijskog koeficijenta korištena je jednačba (4):

$$k_L = \frac{2}{d_p} \cdot D_{ef} + 0,31 \cdot \frac{\eta_c}{\rho \cdot D_{ef}} e^{-0,667} \cdot (\Delta\rho \cdot \eta_c \cdot \frac{g}{\rho_c^2})^{1/3} \quad (7)$$

Za određivanje difuzijskog koeficijenta bilo je potrebno odrediti veličinu i gustoću usitnjenog trputca.

3.7.1. Određivanje koncentracije polifenola u graničnom sloju

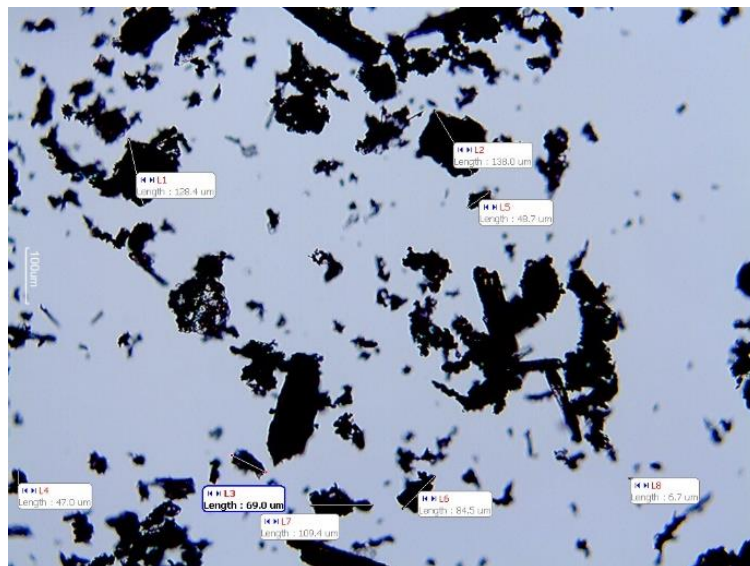
Za određivanje ravnotežne koncentracije polifenola u graničnom sloju korišteno je otapalo La:Fru:Gly (1:2:1)-50% H_2O . Na ovaj način simulirani su uvjeti koji vladaju u graničnom sloju uz sloj trputca. Suspenzije su ostavljene bez miješanja te je određivana koncentracija ukupnih polifenola svakih par dana. Koncentracija koja se ustalila definirana je kao ravnotežna koncentracija polifenola, C_{AS} koja se postiže unutar graničnog sloja tijekom ekstrakcije. Fizikalna svojstva navedenog otapala prikazana su u tablici 5.

3.7.2. Određivanje veličine usitnjenog trputca

Čestice usitnjenog trputca snimljene su na svjetlosnom mikroskopu *Motic BA 200* (slika 21.), a njihova veličina određena je pomoću programa *Motic Plus*, pri uvećanju 40 ili 100 puta. Metoda mjerenja dimenzija kristala, prikazana je na slici 22.



Slika 21. Svjetlosni mikroskop *Motic BA200*



Slika 22. Prikaz određivanja dimenzija kristala glicina programom *Motic Plus*

3.7.3. Određivanje gustoće trputca

Određena masa osušenog i usitnjenog trputca stavljena je u piknometar te je do oznake na piknometru dodan p-xilen. Uz poznate mase piknometra, dodanog trputca i p-xylena te gustoću p-xylena i volumen piknometra, određena je gustoća trputca (slika 23.)



Slika 23. Određivanje gustoće trputca

Postupak izračuna gustoće trputca

Na temelju podataka prikazanih u tablici 5 određena je gustoća trputca prema sljedećem izračunu.

Tablica 3. Mase piknometra, trputca i *p*-xylena potrebnih za izračun gustoće trputca

Masa, <i>m</i>	Iznos, <i>g</i>
praznog piknometra	23,4405
piknometar+trputac	31,1956
piknometar+trputac+ <i>p</i> -xylen	66,5796

$$V(\text{piknometra}) = 50 \text{ mL}$$

Zatim se izračuna volumen *p*-xylena u piknometru prema izrazu za gustoću, gdje je gustoća *p*-xylena $\rho = 0,85663 \text{ g/cm}^3$:

$$V = \frac{m(p - \text{xylen})}{\rho(p - \text{xylen})} = \frac{42,3200 \text{ g}}{0,85663 \text{ g/cm}^3} = 49,2093 \text{ cm}^3$$

Volumen trputca se dobije kao razlika poznatog volumena piknometra i izračunatog volumena *p*-xylena:

$$V = V(\text{piknometra}) - V(\text{p-xylena}) = 50,00 \text{ mL} - 49,2093 \text{ mL} = 0,7907 \text{ mL}$$

Gustoća trputca je:

$$\rho = \frac{m(\text{trputca})}{V(\text{trputca})} = \frac{0,8191 \text{ g}}{0,7907 \text{ mL}} = 1,0359 \text{ g/cm}^3$$

3.7.4. Određivanje raspodjele veličina pora

Raspodjela veličina pora osušenog i usitnjenog trputca određena je pomoću uređaja *ASAP 2000 Micromeritics* (slika 24.). Određivanje strukture pora i njihove raspodjele temelji se na BET (Brunauer, Emmett, Teller) metodi, koja polazi od pretpostavke da su sve pore cilindričnog oblika. Mjeri se volumen plina, u ovom slučaju dušika, adsorbiranog u porama u ovisnosti o parcijalnom tlaku pri konstantnoj temperaturi. Volumen adsorbiranog dušika proporcionalan je specifičnoj površini tijela. Specifična površina je realna površina u kojoj su uključene sve mikroskopski male neravnine i pore.



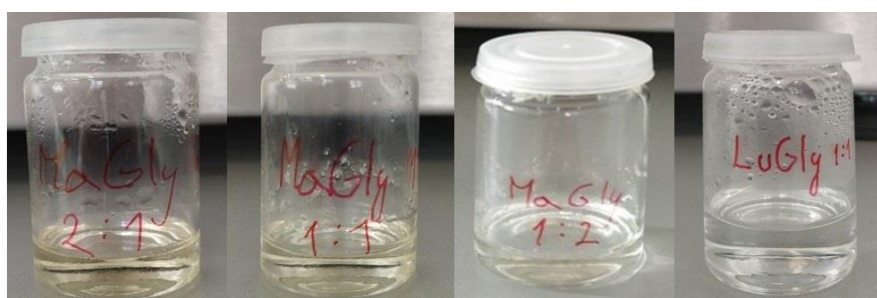
Slika 24. *ASAP 2000 Micromeritics*

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRIPREMLJENA OTAPALA

Pripremljeno je 19 DES-ova. Na slikama 25.a-c. prikazana su pripremljena otapala uz vrijeme zagrijavanja te maksimalnu temperaturu koja je postignuta prilikom pripreme.


Sva pripremljena otapala su stabilne kapljevine pri sobnoj temperaturi. Ma:Gly (1:1) (slika 25.a) je prozirna kapljevina blijedo žute boje koja je nešto viskozniiji od Ma:Gly (1:2), ali unatoč tome ima potencijal za korištenje u procesu ekstrakcije. Uz DES-ove prikazane na slici 25.a pripremljen je DES Ma:Gly u sljedećim omjerima: (1:3), (1:2,33), (2:1), (1:1) i (1:4). La:Gly (1:1) je prozirna kapljevina velike viskoznosti (slika 25.a.). Osim La:Gly (1:1), pripremljena su otapala La:Gly (1:2) i La:Gly (2:1) s masenim udjelima vode 0%, 10% i 70%.



DES	Ma:Gly (2:1)	Ma:Gly (1:1)	Ma:Gly (1:2)	La:Gly (1:1)
vrijeme zagrijavanja [min]	70	80	66	50
T_{max} [°C]	60	73	115	50

Slika 25.a. Pripremljeni DES-ovi Ma:Gly u različitim omjerima i La:Gly (1:1)


La:Fru:Gly (2:1:2) je kapljevina svijetlo žute boje male viskoznosti. La:Fru:Gly (2:1:1) je bezbojna homogena kapljevina koja je nešto viskozniija od La:Fru:Gly (1:1:1) (slika 25.b.). Prilikom pripreme VitC:Gly (1:3) pri 50 °C VitC se nije otopio te je zato postepeno dodavana voda u masenom udjelu 40%. VitC se zatim potpuno otopio i pomiješao sa glicerolom (slika 25.b). Miješanjem VitC:Gly (1:3) s FC reagensom došlo je do oksidacije otapala te zato nije odabran za ekstrakciju polifenolnih spojeva.



DES	La:Fru:Gly (1:1:1)	La:Fru:Gly (2:1:1)	La:Fru:Gly (2:1:2)	VitC:Gly (1:3)	otopljeni VitC:Gly (1:3)
vrijeme zagrijavanja [min]	60	63	60	125	30
T_{max} [°C]	65	53	53	50	50

Slika 25.b. Pripremljeni DES-ovi La:Fru:Gly i VitC:Gly u različitim omjerima

Početa mutnoća nakon pripreme Bet:Gly:Glu (4:20:1) je nestala nakon određenog vremena. Prilikom pripreme Bet:Gly:Glu (4:4:1) pri 50 °C krutina se nije rastalila te je povećana temperatura na 60 °C gdje je došlo do karamelizacije glukoze (slika 25.c.).



DES	Bet:Gly:Glu (4:4:1)	Bet:Gly:Glu (4:20:1)	Bet:Fru:Gly (1:1:1)	Bet:Fru:Gly (1:1:20)	Bet:Gly (1:1)	Bet:Gly (1:3)
vrijeme zagrijavanja [min]	50	96	30	57	58	70
T_{max} [°C]	60	55	50	55	55	60

Slika 25.c. Pripremljeni DES-ovi Bet:Gly:Glu (4:4:1) i (4:20:1) i Bet:Gly (1:1) i (1:3) i Bet:Fru:Gly (1:1:20)

Početa mutnoća nakon pripreme Bet:Gly:Glu (4:20:1) je nestala nakon određenog vremena. Prilikom pripreme Bet:Gly:Glu (4:4:1) pri 50 °C krutina se nije rastalila te je povećana temperatura na 60 °C gdje je došlo do karamelizacije glukoze (slika 25.c.).

Bet:Fru:Gly (1:1:20) se razbistrio miješanjem pri povećanoj temperaturi (slika 25.c), dok je Bet:Fru:Gly (1:1:1) je nakon pripreme sadržavao previše krutih čestica (slika 25.c.).

Bet:Gly (1:3) i (1:1) su mutne kapljevine, ali povećanjem temperature Bet:Gly (1:3) se razbistrio. S druge strane, vizualno se Bet:Gly (1:1) čini znatno viskozniiji u odnosu na Bet:Gly (1:3).

DES Bet:Cit (1:1) nije uspješno pripremljen. Naime, nakon miješanja 55 min pri 30 °C smjesa nije rastalila te zato nije uzet u obzir u daljnjoj analizi.

Mala količina otapala prikazanih u tablici 4. pomiješana je s FC reagensom. Miješenjem otapala i reagensa praćeno je li došlo do nastajanja taloga ili plavog obojenja. Nastanak taloga znak je da je došlo do kemijske reakcije, dok je plavo obojenje znak da je došlo do oksidacije otapala. Obje pojave su znak da bi određivanje koncentracije ukupnih polifenola nakon ekstrakcije s takvim otapalom bila otežano ili nemoguće.

Tablica 4. DES-ovi odabrani za ekstrakciju polifenola iz trpuca

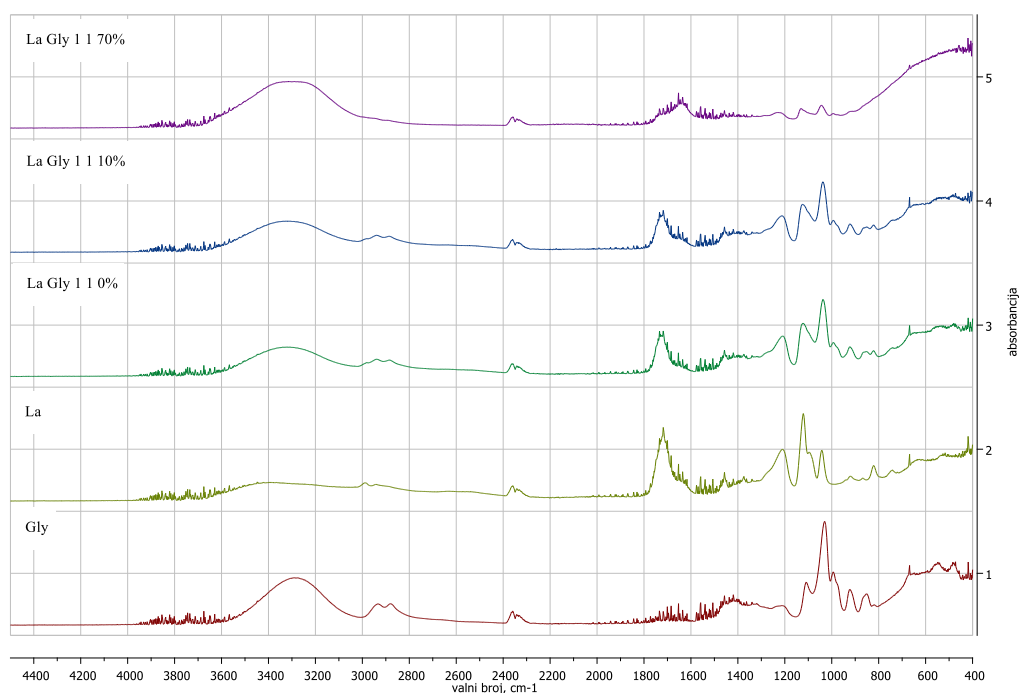
DES-ovi odabrani za ekstrakciju		DES-ovi koji nisu odabrani za ekstrakciju zbog pojave taloga ili plavog obojenja
Ma:Gly (1:2)	La:Gly (1:1)	Ma:Gly (1:3)
Ma:Gly (1:2,33)	Bet:Gly (1:1)	Bet:Gly (1:3)
Ma:Gly (2:1)	Bet:Gly:Glu (4:20:1)	Bet:Gly:Glu (4:4:1)
Ma:Gly (1:1)	Bet:Fru:Gly (1:1:20)	Bet:Fru:Gly (1:1:1)
La:Fru:Gly (2:1:2)	La:Fru:Gly (2:1:1)	VitC:Gly (1:3)
La:Fru:Gly (1:1:1)	La:Gly (2:1)	

Odabrana otapala pogodna za provedbu ekstrakcije prikazana su na slikama 25.a-c i u tablici 4. ne sadrže vodu. Budući da su već nakon pripreme pojedina otapala bila vrlo viskozna, u sva otapala koja su odabrana za ekstrakciju dodana je voda u masenim udjelima 10% i 70%. Dodatkom vode viskoznost otapala se smanjila što je vrlo važno prilikom ekstrakcije radi boljeg

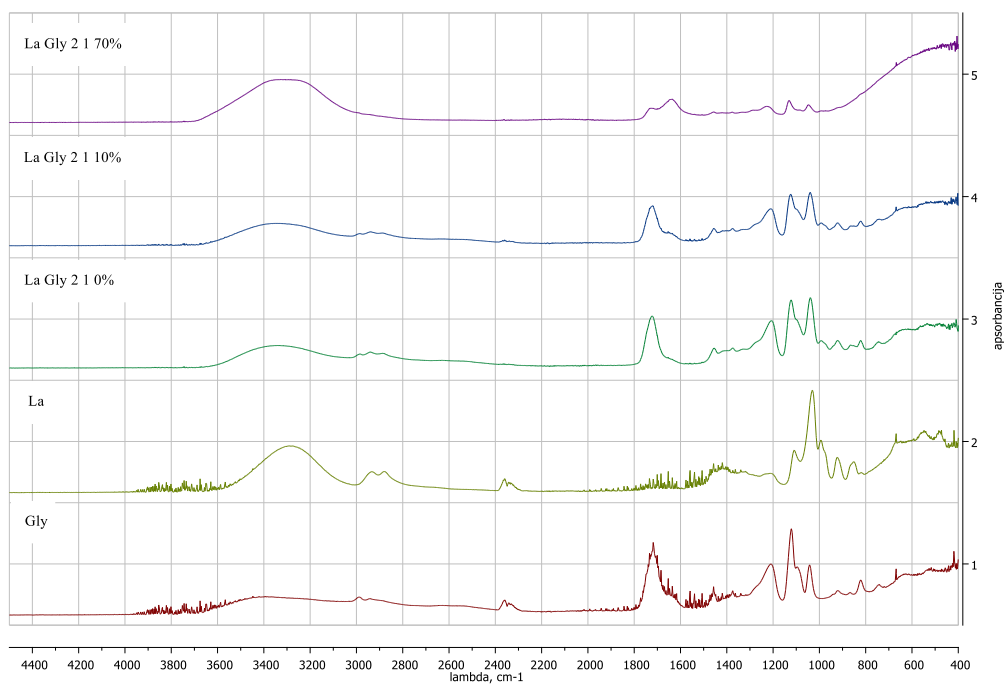
kontakta između otapala i ključne komponente prilikom miješanja. Utjecaj vode na svojstva DES-ova i učinkovitost ekstrakcije polifenola prikazan je kroz rezultate u nastavku. Jedina iznimka u odnosu na druga otapala je La:Fru:Gly (2:1:2), koji je zbog velike viskoznosti pripremljen s udjelom vode od 30, 50 i 70 mas%.

4.1.1. Karakterizacija DES-ova pomoću FTIR-a

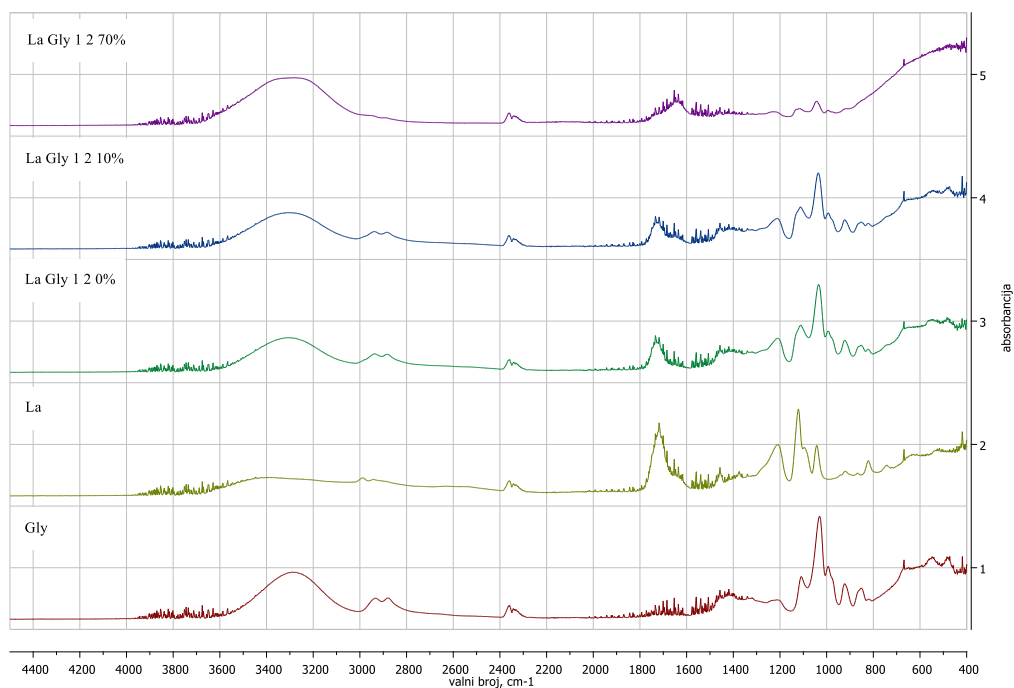
DES-ovi često pokazuju loša ekstrakcijska svojstva zbog velike viskoznosti. Naime, u jako viskoznom mediju, dolazi do otežanog prijenosa tvari. Kako bi se prevladalo ovo ograničenje, u viskozna otapala dodaje se voda. Prema literaturi, obično se dodaje do 40–50 mas% vode, dok se kao optimalna vrijednost dodane vode, navodi 25 mas% [55]. Na slikama 26.-32. prikazane su usporedbe FTIR spektara za čiste komponente, od kojih su pripravljena otapala, te istražena otapala, bez dodane vode te s 10 i 70 mas% vode.



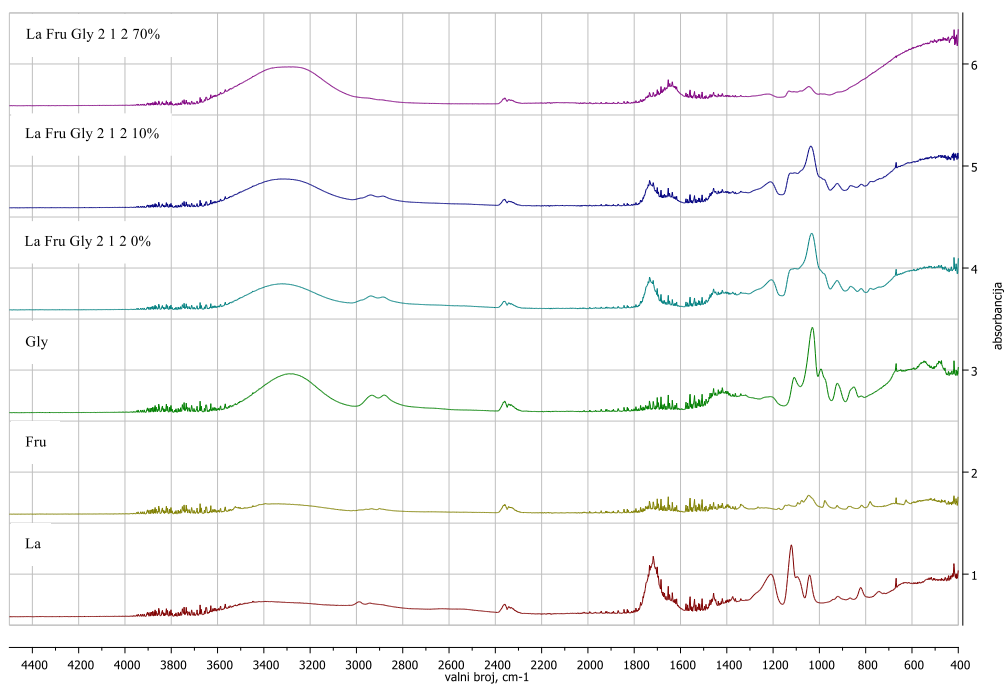
Slika 26. Usporedba FTIR-a za La, Gly te DES La:Gly (1:1) s masenim udjelima vode 0%,10% i 70%



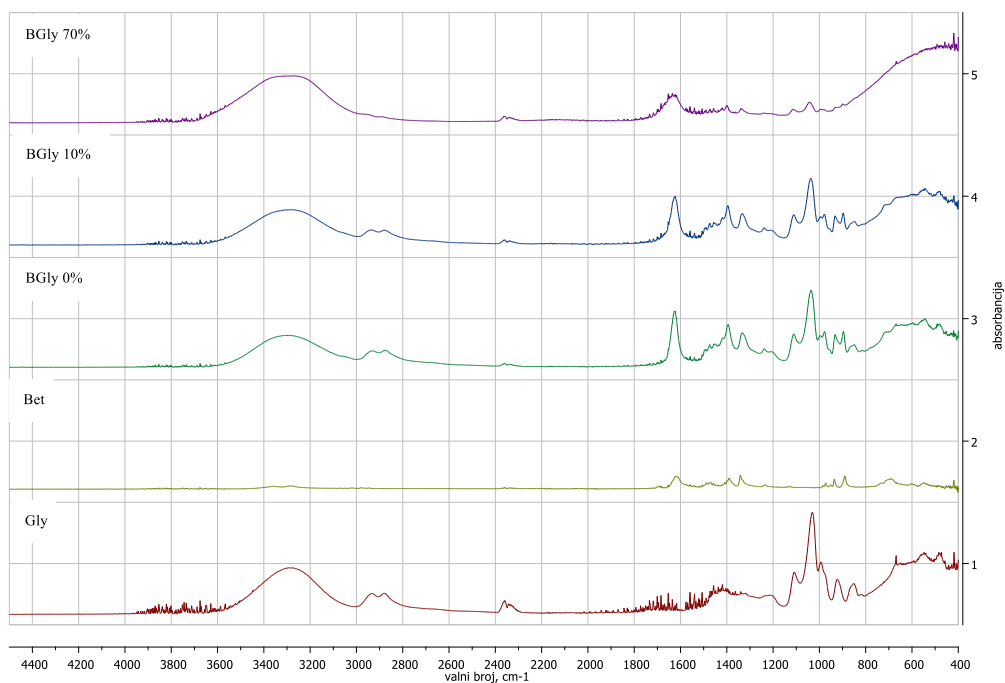
Slika 27. Usporedba FTIR-a za La, Gly te DES La:Gly (2:1) s masenim udjelima vode 0%,10% i 70%



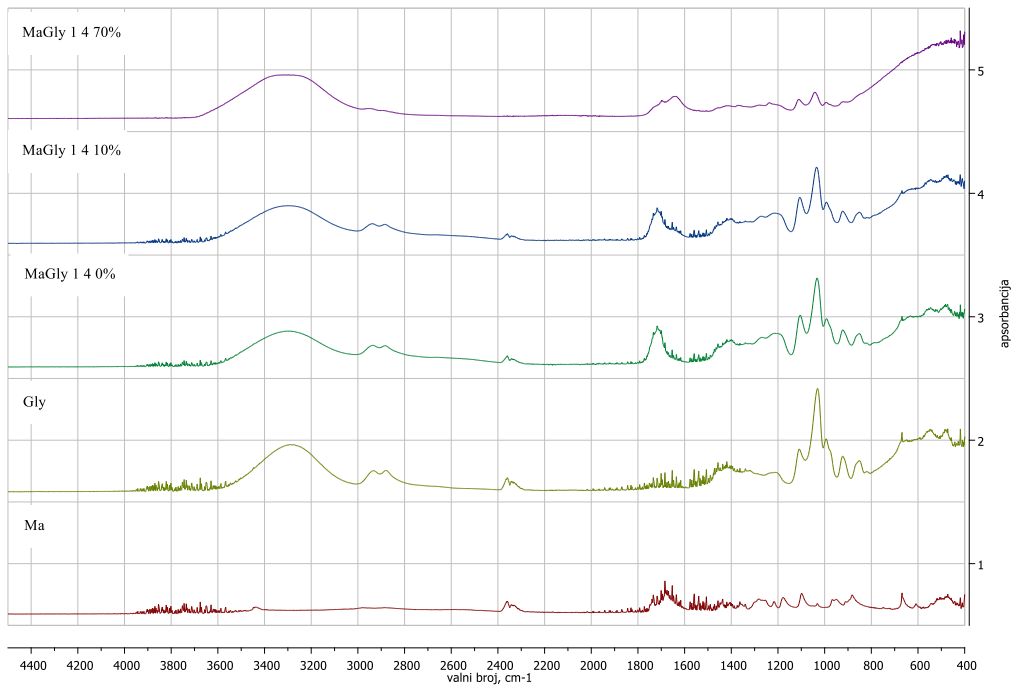
Slika 28. Usporedba FTIR-a za La, Gly te DES La:Gly (1:2) s masenim udjelima vode 0%,10% i 70%



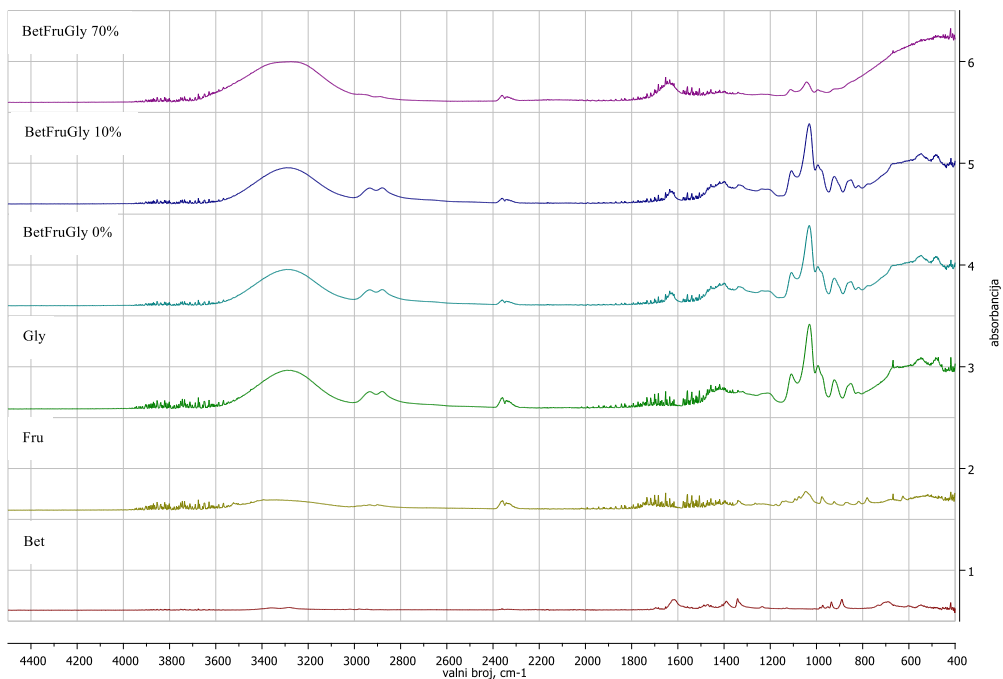
Slika 29. Usporedba FTIR-a za La, Fru i Gly te DES La:Fru:Gly (2:1:2) s masenim udjelima vode 0%,10% i 70%



Slika 30. Usporedba FTIR-a za Bet, Gly te DES Bet:Gly (1:1) s masenim udjelima vode 0%,10% i 70%



Slika 31. Usporedba FTIR-a za Ma, Gly te DES Ma:Gly (1:4) s masenim udjelima vode 0%,10% i 70%



Slika 32. Usporedba FTIR-a za Bet, Fru i Gly te Bet:Fru:Gly (1:1:20) s masenim udjelima vode 0%,10% i 70%

Temeljem FTIR spektara (slike 26.-32.) pripremljenih otapala, vidljivo je da su dobiveni spektri rezultat mješovitih doprinosa vode, glicerola i ostalih komponenti od kojih su pripremljena otapala.

Budući da su kod pripremljenih otapala vidljivi svi spektri karakteristični za komponente od kojih su otapala pripremljena, može se zaključiti kako su nastala otapala DES-ovi. U otapalima s vodom vidljiva su dva pika karakteristična za vodu na 3327 cm^{-1} i 1636 cm^{-1} [56]. Široki maksimum na valnoj duljini oko 3320 cm^{-1} intenzivniji je u otapalima s više vode, pojavljuje se i kod čistog glicerola, a odgovara hidroskilnoj skupini. Otapala s 10 mas% vode ne utječe značajno na strukturu otapala, jer ne dolazi do pomaka, niti smanjenja intenziteta prisutnih pikova. Može se zaključiti da ne dolazi do novih interakcija, ili stvaranja dodatnih vodikovih veza između komponenta otapala i vode. S druge strane povećanjem udjela vode na 70 mas % vidi se pomak apsorpcijskih maksimuma k manjim valnim brojevima što bi moglo ukazivati na slabljenje vodikovih veza. Naime, prema literaturi dodatkom vode H-veze postupno slabe, a oko 50 mas % dodane vode dolazi do potpunog nestanka takvih interakcija i komponente DES -a su potpuno disocirane i hidratizirane. [57, 58] Općenito se može reći da ispitani DES –ovi bez, ili s malim udjelom vode pokazuju slične spektre i slične kemijske sastave s različitim razinama propusnosti.

4.1.2. Određivanje fizikalna svojstva DES-ova

U tablici 5. prikazana su fizikalna svojstva pripremljenih DES-ova. DES-ovima su određeni pH, viskoznost, gustoća i polarnost. Već na prvi pogled vrlo lako se uočava da najveću viskoznost ima Ma:Gly (1:4)-0% H_2O koja iznosi 24,60 Pa·s. S obzirom da su gustoća i viskoznost međusobno povezane veličine tako Ma:Gly (1:4)-0% H_2O ima i najveću gustoću 13,162 g/cm³. Fizikalna svojstva DES-ova ovise o komponentama koje se sastoje i njihovom omjeru što se može uočiti i kod DES-a La:Gly u omjerima (1:1), (1:2) i (2:1). Iako je iznos polarnosti približno jednak za sve omjere, pH, viskoznost i gustoća rastu s povećanjem udjela glicerola što se može pripisati snažnim međumolekulskim interakcijama između komponenti. Osim utjecaja omjera komponenti praćen je utjecaj dodatka vode na fizikalna svojstva. Tako se povećanjem masenog udjela vode za sva otapala linarno smanjuju gustoća, viskoznost i pH. Znatno velike razlike u svojstvima uočavaju se pri masenim udjelima od 10% i 70%. Kod otapala s 10%-tnim udjelom vode uz međumolekulske interakcije njegovih komponenti

prisutne su i interakcije između komponenti DES-a i vode. Nasuprot tome, pri visokim udjelima vode od 70% interakcije između komponenti DES-a su vrlo slabe te se takav sustav može smatrati otopinom komponenti DES-a u vodi [59]. Zato se pri masenom udjelu vode od 70% gustoća otapala sve više približava gustoći vode. Općenito, pH otapala kreće se od kiselog (0,90) za La:Gly (2:1)-10% H_2O do blago lužnatog (7,74) za Bet:Gly (1:3)-10% H_2O . Na temelju rezultata prikazanih u tablici vidljivo je da se polarnost s povećanjem udjela vode povećala što je vidljivo po smanjenju energije u tablici 5. Osim udjela vode, kao i kod ostalih fizikalnih svojstava polarnost svakog od pripremljenih otapala ovist će o svojstvima komponenti od kojih se sastoji.

Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih DES-ova (1.dio)

DES	$w(H_2O)$ [%]	η [Pas]	pH	ρ [gcm ⁻³]	E_{NR} [kcal mol ⁻¹]
Bet:Gly (1:3)	0%	3,0372	7,25	1,233	50,87
	10%	0,2034	7,74	1,206	50,76
	70%	0,0042	6,75	1,065	50,14
Bet:Fru:Gly (1:1:20)	0%	2,5097	6,70	1,270	50,23
	10%	0,2229	7,21	1,247	50,51
	70%	0,0039	6,80	1,057	49,72
Bet:Gly:Glu (4:20:1)	0%	2,1846	7,26	1,251	50,96
	10%	0,2424	7,25	1,227	50,80
	70%	0,0041	7,08	1,061	49,77
Ma:Gly (1:4)	0%	24,600	0,78	1,316	50,63
	10%	24,600	0,90	1,284	50,08
	70%	24,300	1,62	1,086	49,74
La:Fru:Gly (1:2:1)	0%	1,7100	1,11	1,200	50,80
	10%	0,9678	1,32	1,313	50,58
	30%	0,0315	1,46	1,221	50,41
	50%	0,0852	1,60	1,158	50,05
	70%	0,0040	1,79	1,091	49,89

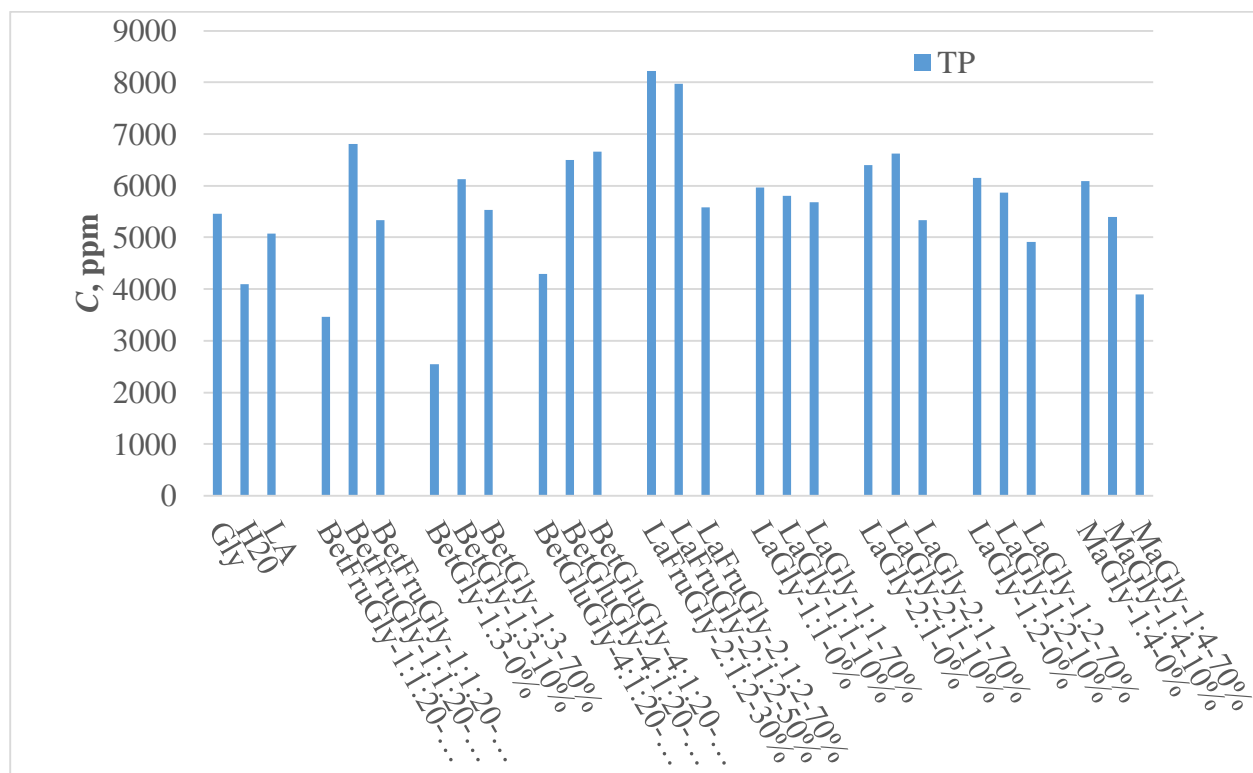
Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih DES-ova (2.dio)

DES	$w(H_2O)$ [%]	η [Pas]	pH	ρ [gcm ⁻³]	E_{NR} [kcal mol ⁻¹]
La:Gly (1:2)	0%	0,5506	0,90	50,46	50,46
	10%	0,1073	1,26	1,225	50,30
	70%	0,0012	1,64	1,070	49,87
La:Gly (2:1)	0%	0,7883	-0,18	1,244	50,51
	10%	0,1041	0,40	1,200	50,14
	70%	0,0013	1,41	1,071	49,82
La:Gly (1:1)	0%	0,3834	0,74	12,466	50,44
	10%	0,0730	0,97	12,216	50,28
	70%	0,0011	1,62	10,712	49,84
La:Fru:Gly (1:2:1)	50%	0,0081	1,60	1,157	5,0070

4.2. UKUPNA KONCENTRACIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA

Na slici 33. prikazana je ukupna koncentracija polifenolnih spojeva u uzorku trputca dobivenih nakon ekstrakcije s pripremljenim DES-ovima. Uz to, koncentracija ukupnih fenola dobivenih ekstrakcijom s DES-ovima uspoređena je s koncentracijama dobivenih ekstrakcijom iz mliječne kiseline, glicerola i vode. Koncentracija ukupnih fenola ostvarena ekstrakcijom Bet:Fru:Gly (1:1:20)-0% H_2O iznosi 3463,20 ppm i pomoću Bet:Gly (1:3)-0% H_2O je 2550,20 ppm što je znatno manje u odnosu na koncentracije polifenola dobivene s vodom (4095,30 ppm), mliječnom kiselinom (5074,60 ppm) i glicerolom (5495,50 ppm). Niska koncentracija može se objasniti velikom viskoznošću navedenih otapala, pogotovo u odnosu na vodu, laktozu i glicerol. Od čistih DES-ova najveće koncentracije ekstrahiranih polifenola dobivene su s La:Gly u omjerima (1:1), (1:2) i (2:1) gdje su ostvarene koncentracije redom: 5965,0 ppm, 6394,40 ppm i 6157,70 ppm. Navedeni rezultati se mogu objasniti boljim fizikalno-kemijskim svojstvima navedenih otapala. Također, prilikom ekstrakcije ukupnih polifenola ispitan je utjecaj vode na učinkovitost ekstrakcije. Od svih pripremljenih otapala najveću učinkovitost u ekstrakciji polifenola imalo je otapalo La:Fru:Gly (2:1:2)-30% H_2O (8218,30 ppm). Na slici 33. potrebno je uočiti da se za sustave La:Fru:Gly (2:1:2), Bet:Gly (1:3), Bet:Fru:Gly (1:1:20) i La:Gly (1:2) najveća učinkovitost postiže ako se u čisto otapalo doda određeni maseni udio

vode. S 70%-tnim masenim udjelom vode smanjuje se koncentracija ukupnih polifenola. Slično kao i kod fizikalnih svojstava smanjenje koncentracije ukupnih polifenola u ovom slučaju može se objasniti smanjenom interakcijom između polifenola i DES-a zbog povećanog udjela vode. Kao što je ranije rečeno, otapala s velikim udjelom vode ponašaju se kao vodeni sustavi s otopljenim komponentama DES-a. S druge strane kod DES-ova Ma:Gly (1:4) i Bet:Glu:Gly (4:1:20) najveća koncentracija postiže se pri 70%-tnom masenom udjelu vode. Moguće je da unatoč velikom masenom udjelu vode u DES-ovima nije narušena njihova stabilnost, ali se uspjela smanjiti viskoznost što je pozitivno utjecalo na prijenos polifenola iz trputca u otapalo. Unatoč velikoj početnoj viskoznosti, La:Fru:Gly (2:1:2) s 30 mas% vode daje najbolje rezultate ekstrakcije polifenola. Isti DES i s 50 mas% vode, daje sličan rezultat, a koncentracija dobivenih polifenola je veća u odnosu na koncentracije dobivene s ostalim otapalima s 10 mas% vode. Ovaj DES je i sa 70 mas% vode među najboljima za ekstrakciju polifenola. Za daljnje istraživanje i optimizaciju procesa ekstrakcije polifenola, odabrano je otapalo La:Fru:Gly (2:1:2) s 50 mas% vode. Naime, iako ne daje najbolje rezultate, ovo otapalo je jeftinije i lakše za rukovanje.

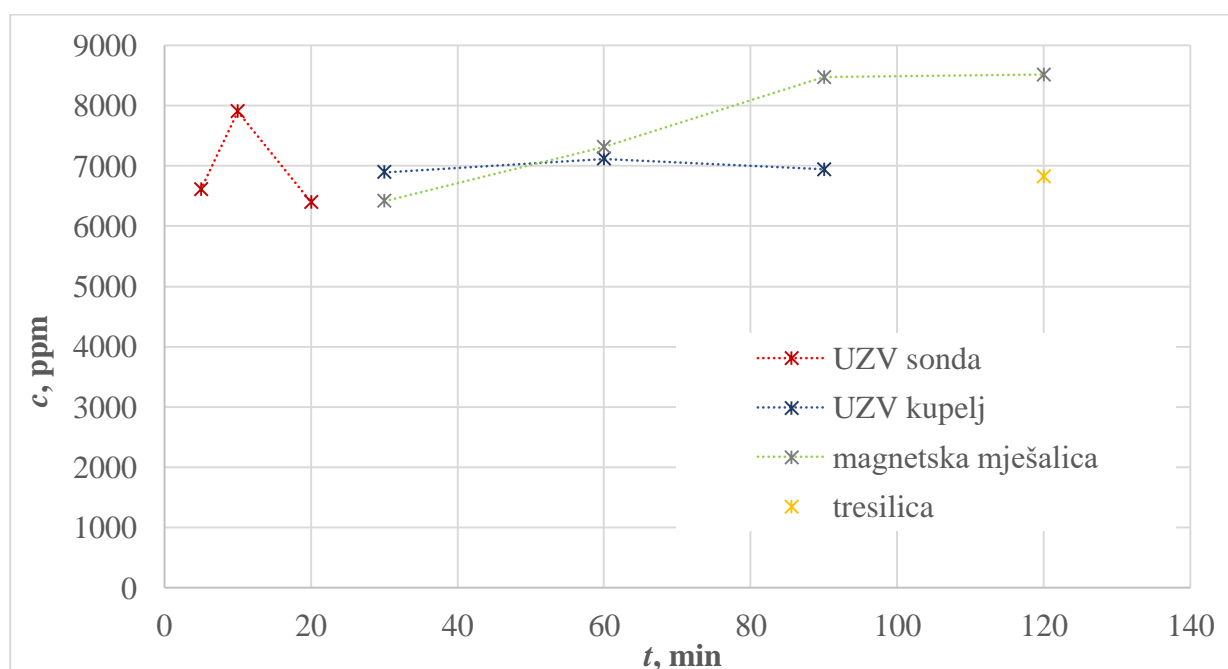


Slika 33. Ukupna koncentracija polifenola u trputcu dobivena ekstrakcijom s različitim DES-ovima

4.3. OPTIMALNA METODA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA

Osim utjecaja vode, ispitan je u i utjecaj odgovarajuće metode ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije polifenola te su rezultati prikazani na slici 34. Kako je već navedeno, La:Fru:Gly (2:1:2) s 50 mas% vode korišteno je za odabir optimalne metode provedbe ekstrakcije.

Kod ultrazvučne sonde se najveća koncentracija polifenola postiže nakon 10 minuta ekstrakcije. te iznosi 7903,33 ppm. Početni porast temperature pogoduje porastu koncentracije polifenola te njihova koncentracija raste do 10. minute kada zbog daljnjeg rasta temperature dolazi do degradacije polifenola. Naime, zbog dužeg trajanja procesa nastaje velik broj kavitacijskih mjehurića koji pucaju. Na mjestima gdje dođe do njihova pucanja nastaju područja visokih temperatura koji mogu doprinijeti degradaciji polifenola jer su to biološki aktivne tvari te su osjetljivi na visoke temperature. Uz degradaciju polifenola, ukoliko se ekstrakcija provodi pri visokim frekvencijama mogu nastati hidroksilni radikali koji mogu uzrokovati oksidaciju polifenola [60].



Slika 34. Koncentracija polifenola u trputcu određena različitim metodama ekstrakcije

Za razliku od ultrazvučne sonde, da bi se kod ultrazvučne (UZV) kupelji postigla optimalna koncentracija proces potrebno je dulje vremena. U 60. minuti postignuta je maksimalna koncentracija od 7315,50 ppm. Unatoč dugom trajanju procesa, nisu ostvarene velike promjene u koncentraciji polifenola. Ovom metodom se pokazala najmanje učinkovita u odnosu na druge metode. Prednost kupelji u odnosu na sondu je taj što kod kupelji nije velik rizik od degradacije ili oksidacije polifenola s obzirom da su frekvencije u kupelji niže u odnosu na sondu te je frekvencija jednolična čime se izbjegavaju nagli porasti temperature.

Ekstrakcijom polifenola u magnetskoj mješalici koncentracija polifenola u 30. i 60. min je vrlo blizu, odnosno praktički jednaka koncentracijama dobivenim pomoću UZV sonde. Nakon 60. minute dolazi do naglog porasta u koncentraciji te se postiže maksimalna koncentracija (8518,80 ppm) postiže u 120. minuti. Ovom metodom ujedno je dobivena najveća koncentracija polifenola u odnosu na druge metode. Budući da se ova metoda provodi bez zagrijavanja smjese trputca i DES-a proces ekstrakcije traje duže. Očito da dobri hidrodinamički uvjeti, koji se postižu primjenom magnetske miješalice, osiguravaju dobar kontakt DES-a i lista trputca te bolje uvjete za ekstrakciju. Mogući razlog za to je i mala gustoća trputca, manja od korištenog otapala (tablica 5. i 6.).

Optimalno vrijeme ekstrakcije za ekstrakciju s ultrazvučnom sondom je 10 minuta. Ekstrakcijom s ultrazvučnom kupelji optimalno vrijeme se postiže u 60. minuti te se koncentracija neznatno promjeni s vremenom. Slično se uočava kod ekstrakcije miješanjem na magnetskoj miješalici gdje se optimalno vrijeme postiže u 90. minuti te koncentracija dalje ne mijenja znatno. Naime, u 90. min. se postiže ravnotežna koncentracija polifenola te duljina provođenja procesa nema više utjecaj na učinkovitost. Za ekstrakciju pomoću tresilice nije bilo moguće odrediti optimalno vrijeme te je ovu metodu potrebno dodatno ispitati.

4.4. ODREĐIVANJE DIFUZIJSKOG KOEFICIJENTA I KOEFICIJENTA PRIJENOSA TVARI ZA EKSTRAKCIJU POLIFENOLA IZ TRPUTCA

Tijekom provođenja eksperimenta za određivanje ravnotežne koncentracije polifenola u graničnom sloju pripremljena je gusta smjesa DES-a i trputca. Ona simulira uvjete graničnom sloju koji se formira tijekom ekstrakcije, dok koncentracija polifenola simulira koncentraciju koja se postiže u graničnom sloju koji praktički miruje uz čvrstu fazu. Poznavanjem koncentracije trputca u graničnom sloju, specifične površine trputca te ostalih podataka

prikazanih u tablici 6., korištenjem jednadžbe (3) izračunat je koeficijent prijenosa tvari, k_L , a jednadžbe (4) difuzijski koeficijent, D_{eff} .

Tablica 6. Podaci za određivanje koeficijenta prijenosa tvari i difuzijskog koeficijenta pri ekstrakciji s magnetskom miješalicom i La:Fru:Gly (2:1:2) 50 mas H₂O

Koncentracija na granici faza, C_{As} , ppm	63 057
Koncentracija trputca nakon ekstrakcije, C_{As} , ppm	8 218
Specifična površina prema BET metodi, a , m ² g ⁻¹	3,1864
Masa trputca, g	0,6
Volumen DES-a, ml	12,9
Trajanje procesa, min	90
Srednji promjer čestica, d_p , mm	8,5
Gustoća DES-a, r_c , g cm ⁻³	1,165
Gustoća trputca, r_s , g cm ⁻³	1,036
Viskoznost DES-a, h_c , Pa s	0,0081
Koeficijent prijenosa tvari, k_L , m s ⁻¹	$1,74 \cdot 10^{-10}$
Difuzijski koeficijent, D_{eff} , m ² s ⁻¹	$3,46 \cdot 10^{-17}$

Dobivene vrijednosti koeficijenta prijenosa tvari i difuzijskog koeficijenta su niske, u odnosu na uobičajene vrijednosti koje se dobivaju u sustavu kapljevina-krutina. Ovako niske vrijednosti mogu se objasniti velikom gustoćom i viskoznošću DES-a, što značajno usporava proces.

5. ZAKLJUČAK

Svrha ovog diplomskog rada bila je priprema otapala i odabir ekstrakcije metode s kojom će se ostvariti optimalna učinkovitost prilikom ekstrakcije polifenola iz trputca. Pripremljeno je 19 DES-ova od kojih je 12 odabrano za daljnju analizu.

Odabranim otapalima ispitana su sljedeća fizikalna svojstva: pH, gustoća, viskoznost i polarnost jer su ona važna prilikom kontakta između ključne komponente i otapala te za uspostavljanje ravnoteže na granici faza. Uz fizikalna svojstva provedena je karakterizacija pomoću FTIR-a. Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da su ispitana otapala (La:Gly (1:1), (1:2), (1:2), La:Fru:Gly (2:1:2), Bet:Gly (1:1), Ma:Gly (1:4), Bet:Fru:Gly (1:1:20) DES-ovi.

Prilikom određivanja fizikalno-kemijskih svojstava uočeno je da dodatak vode u određenim masenim udjelima (10%, 30% ili 70%) rezultira smanjenjem viskoznosti, gustoće, pH zbog slabljena vodikovih veza između njegovih komponenti te povećanjem polarnosti otapala. Smanjenje viskoznosti otapala doprinijelo je lakšem prijenosu polifenola iz trputca u otapalo što je vidljivo prilikom ekstrakcije polifenola s otapalima La:Fru:Gly (2:1:2)-30% H_2O , Bet:Gly (1:3)-10% H_2O , Bet:Fru:Gly (1:1:20)-10% H_2O i La:Gly (1:2)-10% H_2O . Daljnjim povećanjem udjela vode smanjila se učinkovitost ekstrakcije što se može uočiti kod svih prethodno navedenih otapala s masenim udjelom vode od 70% zbog smanjene stabilnosti otapala.

Za ekstrakciju polifenola s pripremljenim DES-ovima najbolje se pokazala ekstrakcija pomoću magentske miješalice tijekom 90 minuta. Nakon 90-te minute nema velike promjene u koncentraciji polifenola jer je postignuta ravnotežna koncentracija polifenola.

Uz to, određen je difuzijski koeficijent i koeficijent prijenosa tvari koji iznose $k_L = 1,74 \cdot 10^{-10}$, odnosno, $3,46 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ što je posljedica velike viskoznosti i gustoće DES-a.

Na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da DES-ovi imaju potencijal za primjenu u ekstrakciji polifenola iz trputca. Budući da imaju veliku viskoznost, dodatak određene količine vode i odabir odgovarajuće metode pokazao se ključan za postizanje velike učinkovitosti.

8. POPIS KRATICA I SIMBOLA

g	akceleracija slobodnog pada [ms^{-2}]
Bet	betain
A	brzina prijenosa tvari [mol s^{-1}]
BET	Brunauer, Emmett, Teller metoda
D_{ef}	difuzijski koeficijent [m^2s^{-1}]
η	dinamička viskoznost [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]
FC	Folin Ciocalteau metoda/reagens
Fru	fruktoza
Gly	glicerol
Glu	glukoza
$\frac{dv}{dy} = \dot{\gamma}$	gradijent brzine
ρ	gustoća [g cm^{-3}]
r_c	gustoća DES-a [g cm^{-3}]
r_s	gustoća trputca [g cm^{-3}]
HDES	hidrofobno niskotemperaturno eutektičko otapalo
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
IL	ionska kapljevina
IR	infracrveno zračenje
Ma	jabučna kiselina
k_L	koeficijent prijenosa tvari [ms^{-1}]
Cit	limunska kiselina
La	mliječna kiselina
T_{max}	maksimalna temperatura miješanja [$^{\circ}\text{C}$]
$w(H_2O)$	maseni udio vode [%]
m	masa [g]
c	molna ili masena koncentracija [ppm]
C_{AS}	molna ili masena koncentracija na granici faza [ppm]
DES	niskotemperaturno eutektičko otapalo
E_{NR}	polarnost [kcal mol^{-1}]
NADES	prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo

τ	smično naprežanje [Pa]
d_p	srednji promjer čestica [mm]
THEDES	terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo
UZV	ultrazvučna sonda/kupelj
h_c	viskoznost DES-a [Pa·s]
VitC	vitamin C
t	vrijeme [min]
V	volumen [cm ³]

7. LITERATURA

- [1]https://www.beautypackaging.com/contents/view_breaking-news/2021-03-15/global-cosmetics-industry-forecasted-to-reach-4635-billion-by-2027/ (pristupljeno 8.7.2017)
- [2]<https://www.mckinsey.com/~media/McKinsey/Industries/Consumer%20Packaged%20Goods/Our%20Insights/How%20COVID%2019%20is%20changing%20the%20world%20of%20beauty/How-COVID-19-is-changing-the-world-of-beauty-vF.pdf> (pristupljeno 8.7.2017).
- [3]<https://www.healthline.com/nutrition/polyphenols#what-they-are> (pristupljeno 8.7.2017)
- [4]Mojzer EB, Hrnčić MK, Škerget M, Knez Ž, Bren U, Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects, *Molecules*. 2016, 21 (7) 901.
- [5]Percevault L, Limanton E, Nicolas P, Paquin L, Lagrost C, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021, 9 (2) 776-784.
- [6]Rajiv K. Chapter 1 - Removal of Surface Contaminants Using Ionic Liquids. Editor(s): Rajiv Kohli, K.L. Mittal, *Developments in Surface Contamination and Cleaning*, William Andrew Publishing, USA 2013, 1-63.
- [7]García G, Aparicio A, Ullah R, and Atilhan M, *Energy & Fuels*. 2015, 29 (4) 2616-2644.
- [8]Daněk V. Chapter 3 - Phase Equilibria. Editor(s): Vladimír Daněk, *Physico-Chemical Analysis of Molten Electrolytes* Elsevier Science, (2006), 107-2019.
- [9]Smith EL, Abbott AP, and Ryder KS, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chemical Reviews*. 2014, 114(21) 11060-11082
- [10]<https://hr.wikipedia.org/wiki/Eutektik> (pristupljeno 3.7.2021.)
- [11][https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Book%3A_Physical_Chemistry_\(Fleming\)/08%3A_Phase_Equilibrium/8.09%3A_Solid-Liquid_Systems_-_Eutectic_Points](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Book%3A_Physical_Chemistry_(Fleming)/08%3A_Phase_Equilibrium/8.09%3A_Solid-Liquid_Systems_-_Eutectic_Points) (pristupljeno 3.7.2021.)
- [12]Pena-Pereira F, Calle de la I, Solvents and Eutectic Solvents. Editor(s): Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M, *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. Academic Press. 2019 184-190.
- [13]Soltanmohammadi F, Jouyban A, Shayanfar A, New aspects of deep eutectic solvents: extraction, pharmaceutical applications, as catalyst and gas capture, *Chemical Papers*. 2021 (75) 439-453
- [14]<http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/104Aphysprop.html> (pristupljeno 3.7.2021.)
- [15]<https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/4874fe79-8302-4ea2-b516-4657ea249026/kemija-7/m01/j04/index.html> (pristupljeno 3.7.2021.)
- [16]<https://courses.lumenlearning.com/boundless-chemistry/chapter/physical-and-chemical-properties-of-matter/> (pristupljeno 3.7.2021.)
- [17]<https://www.britannica.com/science/melting-point> (pristupljeno 16.9.2021)
- [18]https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=akron1559598953036721&disposition=inline (pristupljeno 3.7.2021.)
- [19]Young L, Friesen BJ, McAlpine BJ, Lankin CD, Chen S, Pauli FG, Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives, *Journal of Natural Products*, 2018 (81) 679 – 690.
- [20]https://www.princeton.edu/~gasdyn/Research/T-C_Research_Folder/Viscosity_def.html (pristupljeno 4.7.2021.)

- [21]<https://www.britannica.com/science/polarity-chemistry> (pristupljeno 4.7.2021.)
- [22]Farooq MQ, Abbasi NM, Anderson JL, Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*. 2020 (1633)
- [23]Duarte AR, Ferreira AS, Barreiros S, Cabrita E, Reis RL, Paiva A, A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017
- [24]van Osch DJGP, Dietz CHJT, Warrag SEE, Kroon MC, The Curious Case of Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: A Story on the Discovery, Design, and Applications, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020 8(29) 10591-10612
- [25]Mbous YP, Hayyan M, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA, Looi CY, Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-Promises and challenges, *Biotechnology Advances*. 2017, 2 (35) 105-134
- [26]Hano C, Tungmunnithum D. Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases, *Medicines*. 2020 7 (5)
- [27]Lukova P, Karcheva-Bahchevanska D, Mollova D, Nikolova M, Mladenov R, Iliev I. Study of prebiotic potential and antioxidant activity in *Plantago* spp. leaves after enzymatic hydrolysis with hemicellulase and xylanase, *Engineering in Life Sciences*. 2018
- [28]<https://burza.com.hr/portal/sirokolisni-trputac-za-rane-ali-i-kasalj/13358>(pristupljeno 19.8.2021)
- [29]Pandey KB, Rizvi SI, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009 2 (5) 270-278.
- [30]<https://www.farmacia.hr/pitanja-i-odgovori/29/sto-je-resveratrol/> (pristupljeno 6.7.2021)
- [31]<https://www.plantagea.hr/zbirka-tekstova/lignani/> (pristupljeno 6.7.2021)
- [32]<https://encyclopedia.pub/3833> (pristupljeno 6.7.2021)
- [33]<https://www.unmc.edu/news.cfm?match=16113> (pristupljeno 17.9.2021)
- [34]Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Jović T, Đidara M, Kopačin T i sur. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja, *Stočarstvo*. 2016 70 (2) 71-92 (pristupljeno 06.07.2021.)
- [35]<https://www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/kako-izbjeci-oksidacijski-stres> (pristupljeno 6.7.2021)
- [36]<https://ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/mavt/process-engineering/separation-processes-laboratorydam/documents/practica%20in%20process%20engineering%202/extraction.pdf> (pristupljeno 8.7.2017)
- [37]<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=28292> (pristupljeno 8.7.2017)
- [38]Sander A, Ekstrakcija. Materijali iz kolegija Toplinsko procesno inženjerstvo <https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/ekstrakcija.pdf> (pristupljeno 8.7.2017)
- [39]Zhang QW, Lin LG, Ye WC, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 2018
- [40]https://www.berkem.com/images/Graphique-EXTRACTION_VEGETALE-EN.jpg (pristupljeno 13.8.2021)

- [41]Yashashri H, Akshay J, Laxmi M, Sagar K, Prmod C, Research Article Application of Magnetic Stirrer for Influencing Extraction Method on Tectona grandis as Analgesic Activity, *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*,. 2019.
- [42]<https://www.pce-instruments.com/f/english/media/magnetic-stirrer-introduction.pdf>
(pristupljeno 19.8.2021)
- [43]<https://www.hielscher.com/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>
(pristupljeno 10.8.2021)
- [44]Sukora N, Jusoha R, Rahima SR, Kamarudin N, Ultrasound Assisted Methods for Enhanced Extraction of Phenolic Acids from Quercus Infectoria Galls, *Elsevier*. 2017
- [45]Charcosset C,3 – Microfiltration, Editor(s): Charcosset C. *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceutics*, Elsevier. 2012 101-141
- [46]<https://repozitorij.kemija.unios.hr/islandora/object/kemos%3A181/datastream/PDF/view>
(pristupljeno 6.9.2021.)
- [47] Inglezakis VJ, Balsamo M, Montagnaro F, Liquid–Solid Mass Transfer in Adsorption Systems-An Overlooked Resistance? *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2020
- [48] Geankoplis CJ, Hersel AA, Lepek DH. Transport Processes and Separation Process Principles, 2018 Pearson Education, Inc., USA
- [49]<https://www.open.edu/openlearn/ocw/mod/oucontent/view.php?id=83459§ion=2.2>
(pristupljeno 13.8.2021)
- [50]<https://www.ru.nl/systemschemistry/equipment/optical-spectroscopy/infrared/>
(pristupljeno 5.9.2021.)
- [51][https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates) (pristupljeno 14.8.2021)
- [52]<https://www.innovatechlabs.com/newsroom/672/stuff-works-ftir-analysis/> (pristupljeno 14.8.2021)
- [53]https://www.researchgate.net/figure/Infrared-absorption-spectrum-of-olive-oil_fig1_264786153
(pristupljeno 17.8.2021)
- [54]<https://www.fishersci.fi/shop/products/mettler-toledo-densito-30px-density-meter/10044682>
(pristupljeno 17.8.2021.)
- [55]Elderderi S, Leman-Loubièr C, Wils L, Henry S, Bertrand D, Byrne HJ,Chourpa I, Enguehard-Gueiffier C, Munnier E, Elbashir AA, Boudesocque-Delaye L, Bonnier F. ATR-IR spectroscopy for rapid quantification of water content in deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, **2020**,(311)
- [56]Kachel-Jakubowska M, Matwiczuk A, Gagoś M, Analysis of the physicochemical properties of post-manufacturing waste derived from production of methyl esters from rapeseed oil, *Int. Agrophys*, 2017 31
- [57]Gabriele F, Chiarini M, Germani R, Tiecco M, Spreti N, Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties, *Journal of Molecular Liquids*. 2019
- [58]Mitar A, Panić A, Prlić Kardum J, Halambek J, Sander A, Kučan KZ, Radošević K, Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2019 (33) 1-18.

[59]Hammond OS, Bowron DT, Edler KJ.The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *A Journal of German Chemical Society*. 2017

[60] Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrew H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N, Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources, *Agronomy*. 2017 3 (7)