Inovativne metode izolacije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala primjenom eutektičkih otapala

Ćurlin, Pavao

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:801697

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

INOVATIVNE METODE IZOLACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA PRIMJENOM EUTEKTIČKIH OTAPALA

ZAVRŠNI RAD

PAVAO ĆURLIN

Matični broj: 82

Split, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

INOVATIVNE METODE IZOLACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA PRIMJENOM EUTEKTIČKIH OTAPALA

ZAVRŠNI RAD

PAVAO ĆURLIN

Matični broj: 82

Split, rujan, 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

INNOVATIVE METHODS OF ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANT MATERIAL USING EUTECTIC SOLVENTS

BACHELOR THESIS

PAVAO ĆURLIN

Parent number: 82

Split, September, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-Tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Prof. dr. sc. Mladen Miloš

INOVATIVNE METODE IZOLACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ BILJNOG MATERIJALA PRIMJENOM EUTEKTIČKIH OTAPALA

Pavao Ćurlin, 82

Sažetak:

Cilj ovog rada bilo je istražiti eutektička otapala (DES), te njihovu primjenu u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Eutektička otapala zbog svojih svojstava i lakoće pripreme sve više zamjenjuju organska otapala u industriji. Nastaju miješanjem dvaju ili više prirodnih organskih komponenata, kao što su kolin klorid, karboksilne kiseline, urea, glicerol i drugi. Važan je odabir komponenata prilikom pripreme kako bi se dobila smjesa željenih svojstva, poput viskoznosti, gustoće, električne vodljivosti, itd. Postoje razne metode pripreme DES-ova, a najčešća upotrjebljena metoda je zagrijavanje dviju čvrstih komponenata na određenoj temperaturi sve dok se ne dobije bistra otopina. Pretraživanjem dostupne literature i dosadašnjih istraživanja o eutektičnim otapalima, moguće je zaključiti da će primjena eutektičnih otapala bit sve veća.

Ključne riječi: eutektička otapala, izolacija, fenolni spojevi, fizikalno-kemijska svojstva, zelena kemija

Rad sadrži: 29 stranica, 8 slika, 4 tablice, 40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Mila Radan - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Prof. dr. sc. Mladen Miloš - član - mentor

Datum obrane: 23. rujna 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate Study of Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6, December 15 and 16, 2020.
Mentor: Ph. D. Mladen Miloš, Prof.

INNOVATIVE METHODS OF ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANT MATERIAL USING EUTECTIC SOLVENTS

Pavao Ćurlin, 82

Abstract:

The aim of this study was to investigate deep eutectic solvents (DES) and their application in isolation of bioactive compounds from plant material. Due to their properties and easy preparation, eutectic solvents are increasingly replacing organic solvents in industry. They are formed by mixing two or more natural organic components, such as choline chloride, carboxylic acids, urea, glycerol and others. It is important to select the components during preparation to obtain a mixture of desired properties, such as viscosity, density, electrical conductivity, etc. There are various methods of preparing DESs, and the most common method used is heating two solid components at a certain temperature until clear solution is formed. By searching the available literature and previous research on eutectic solvents, it is possible to conclude that the use of eutectic solvents will be increasing.

Keywords: eutectic solvents, isolation, phenolic compounds, physicochemical properties, green chemistry

Thesis contains: 29 pages, 8 figures, 4 tables, 40 references

Orginal in: Croatian

Defence committee:

1. Associate professor Mila Radan, PhD. - chair person
2. Assistant professor Franko Burčul, PhD. - member
3. Full professor Mladen Miloš, PhD. - supervisor

Defence date: 23th September 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Miloša u razdoblju od lipnja do rujna 2021. godine.

ZAHVALA

Želim se zahvaliti svom mentoru prof. dr. sc. Mladenu Milošu na pomoći, strpljenju i ukazanom povjerenju tijekom izrade završnog rada. Zahvaljujem se i svojoj obitelji na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog rada je opisati što su eutektička otapala, njihovu strukturu, fizikalno-kemijska svojstva, metode pripreme i njihovu primjenu uz poseban naglasak na izolaciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala koristeći dostupnu literaturu.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bilo je istražiti eutektička otapala (DES), te njihovu primjenu u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala. Eutektička otapala zbog svojih svojstava i lakoće pripreme sve više zamjenjuju organska otapala u industriji. Nastaju miješanjem dvaju ili više prirodnih organskih komponenata, kao što su kolin klorid, karboksilne kiseline, urea, glicerol i drugi. Važan je odabir komponenata prilikom pripreme kako bi se dobila smjesa željenih svojstva, poput viskoznosti, gustoće, električne vodljivosti, itd. Postoje razne metode pripreme DES-ova, a najčešća upotrjebljena metoda je zagrijavanje dviju čvrstih komponenata na određenoj temperaturi sve dok se ne dobije bistra otopina. Pretraživanjem dostupne literature i dosadašnjih istraživanja o eutektičnim otapalima, moguće je zaključiti da će primjena eutektičnih otapala bit sve veća.

Ključne riječi: eutektička otapala, izolacija, fenolni spojevi, fizikalno-kemijska svojstva, zelena kemija

SUMMARY

The aim of this study was to investigate deep eutectic solvents (DES) and their application in isolation of bioactive compounds from plant material. Due to their properties and easy preparation, eutectic solvents are increasingly replacing organic solvents in industry. They are formed by mixing two or more natural organic components, such as choline chloride, carboxylic acids, urea, glycerol and others. It is important to select the components during preparation to obtain a mixture of desired properties, such as viscosity, density, electrical conductivity, etc. There are various methods of preparing DESs, and the most common method used is heating two solid components at a certain temperature until clear solution is formed. By searching the available literature and previous research on eutectic solvents, it is possible to conclude that the use of eutectic solvents will be increasing.

Keywords: eutectic solvents, isolation, phenolic compounds, physicochemical properties, green chemistry

Sadržaj

Uvod 1

1. Opći dio 1

1.1. Zelena kemija 1

1.2. Eutektična otapala 3

2. Eksperimentalni dio 6

3. Rezultati i rasprava 7

3.1. Metode priprave eutektičnih otapala 7

3.2. Fizikalno – kemijska svojstva 11

3.2.1. Viskoznost 11

3.2.2. Gustoća 12

3.2.3. Talište eutektičkih smjesa 13

3.2.4. pH vrijednost 14

3.2.5. Električna vodljivost 14

3.2.6. Indeks loma 15

3.2.7. Toksičnost 16

3.3. Primjena eutektičkih otapala 17

3.3.1. Primjena u izolaciji bioaktivnih spojeva 17

3.3.2. Primjena u organskoj sintezi, katalizi i biokatalizi 22

3.3.3. Primjena u elektrokemiji 23

4. Zaključak 24

5. Literatura 25

Uvod

Napredak industrije i povećanje ljudske populacije dovodi do sve većeg stvaranja otpada i zagađenja prirode, te narušavanja ekološke ravnoteže. Zbog toga znanstvenici nastoje istražiti nove puteve i rješenja, kao što je zelena kemija, kako bi smanjili negativan utjecaj industrijalizacije na prirodu. Cilj zelene kemije je istražiti i osmisliti nove, sigurnije i ekološki prihvatljivije procese proizvodnje te smanjiti upotrebu štetnih kemikalija. Jedno od važnijih polja zelene kemije je zelena ekstrakcija.[1] Zadatak zelene ekstrakcije je osmisliti nove, alternativne, postupke ekstrakcije koji će zamijeniti tradicionalne postupke kako bi se smanjila potrošnja sirovina, energije i otapala. Još jedan od zadataka zelene ekstrakcije je i pronalazak novih, obnovljivih izvora biljnih materijala te zbrinjavanje otpada industrije. U današnje vrijeme gotovo da ne postoji proizvodni industrijski proces koji ne upotrebljava jednu od vrsta ekstrakcije prirodnih proizvoda.[1] Klasični načini ekstrakcije primjenjuju hlapljiva organska otapala u najmanje jednom stupnju proizvodnje koja svojim isparavanjem doprinose efektu staklenika. Klasični načini ekstrakcije su dugotrajni procesi koji iziskuju velike količine energije i visoke temperature te ne ostvaruju potpuno iskorištenje procesa i proizvode velike količine štetnih tvari. Procjenjuje se da otapala koja se upotrebljavaju kod ovakvih procesa ekstrakcije čine oko 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih hlapljivih organskih emisija tvari u cijelom svijetu.[2] Zbog toga zelena kemija nastoji organska otapala zamijeniti zelenim otapalima kako bi se smanjio štetan utjecaj na prirodu. U posljednja dva desetljeća sve veća pažnja se pridavala istraživanju novih vrsta otapala poput ionskih kapljevina i eutektičnih smjesa koje bi zbog svojih svojstava mogle biti dobra zamjena konvencionalnim otapalima.

U ovom radu obradit će se eutektička otapala, njihova fizikalno-kemijska svojstva, te njihova primjena u kemijskoj industriji s naglaskom na metode izolacije bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala.

1. Opći dio

1.1. Zelena kemija

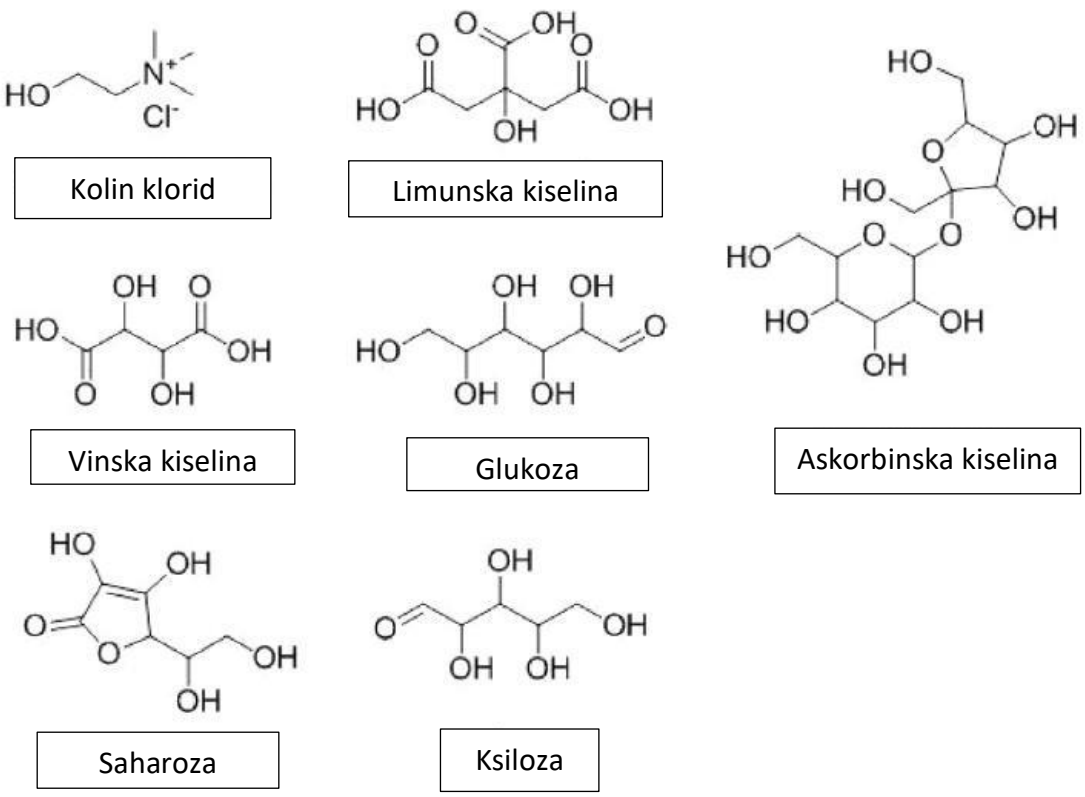
Zelena kemija je dio kemije koja se bavi kreiranjem kemijskih procesa i produkata s ciljem smanjenja ili eliminiranja uporabe i proizvodnje tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš.[3] Pojam i koncept zelene kemije se prvi put pojavljuje početkom devedesetih godina dvadesetog stoljeća i od tada dobiva sve veću važnost. Glavni cilj zelene kemije je osmisliti proizvode i procese kemijske sinteze koji će biti jednostavni, ekonomski prihvatljivi te svojim svojstvima neće naštetiti čovjeku i prirodi. Kako bi se ovaj cilj ostvario znanstvenici Paul Anastas i John Warner su 1998. godine kreirali dvanaest načela zelene kemije koja su prikazana u Tablici 1.[4] Zbog svoje hlapljivosti, toksičnosti, zapaljivosti i korozivnosti organska otapala imaju brojne negativne učinke na okoliš i teško ih je reciklirati, pa se nastoje pronaći njihove prikladne zamjene. Odabir zamjenskih otapala se, prema načelima zelene kemije, temelji na sigurnosti radnika, procesa, okoliša i održivosti procesa.[3] Idealno otapalo mora biti kemijski i fizički stabilno, jednostavno za primjenu, niske hlapljivosti s mogućnosti recikliranja i ponovne upotrebe. Osmišljenih dvanaest načela zelene kemije ne predstavljaju dvanaest neovisnih ciljeva već sustav koji služi kao podloga za mnoga poboljšanja. Jedino primjenom svih načela moguće je dobiti održiv proces.

Tablica 1. 12 načela zelene kemije.[4]

	Načelo
1	Bolje je spriječiti nastajanje otpada nego ga obrađivati ili uništiti nakon što je nastao.
2	Tijek kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno iskoriste sve ulazne sirovine u konačni proizvod.
3	Sintetske procese, ako je moguće, treba kreirati tako da se u njima ne koriste i ne proizvode tvari koje su toksične za ljudsko zdravlje i okoliš.
4	Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se zadrži djelotvornost, a smanji toksičnost.
5	Primjenu pomoćnih kemijskih tvari (otapala, sredstva za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti, kada je god to moguće.
6	Procese je potrebno provoditi na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi energetski zahtjevi bili svedeni na minimum kada je to moguće.
7	Potrebno je koristiti obnovljive sirovine i materijale kada je to s tehničke i ekonomske strane izvedivo.
8	Nepotrebna proširenja procesa kao što su zaštita funkcionalnih skupina i privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa, potrebno je preskočiti kada je moguće, jer takva proširenja procesa zahtijevaju dodatne resurse i mogu stvarati otpad.
9	Katalitički reagensi, selektivni koliko je moguće, prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama.
10	Kemijski produkti moraju biti kreirani tako da se na kraju svoga djelovanja raspadnu na neškodljive degradacijske produkte i da ne štete okolišu.
11	Potrebno je pratiti i nadgledati proces u stvarnom vremenu razvitkom analitičkih metoda, kako bi se spriječilo nastajanje opasnih tvari.
12	Tvari upotrijebljene u kemijskim procesima treba izabrati tako da se minimalizira potencijalna opasnost od eksplozije, požara, štetnog isparavanja i kemijskih nesreća.

1.2. Eutektična otapala

Eutektična otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su smjese dvaju ili više, krutih ili tekućih spojeva, koji pomiješani u odgovarajućem omjeru mogu tvoriti otopinu na sobnoj temperaturi. Zadnjih godina dobivaju sve veću pozornost jer su se zbog svojih svojstava pokazala kao prikladna zamjena za danas korištena organska otapala, iako nisu u potpunosti istražena. Povećava se broj znanstvenih radova vezanih za njihova fizikalno-kemijska svojstva i mogućnost primjene.[5] Smatraju se novim razredom zelenih otapala, koje zbog sličnih svojstava možemo svrstati u četvrtu klasu ionskih tekućina iako su to dvije različite vrste otapala. DES-ovi se sastoje od prirodnih organskih komponenata koji tvore smjesu stvaranjem vodikovih veza gdje je temperatura tališta smjese manja od temperature tališta pojedinih komponenti smjese.[6] Najčešći sastojak je kolin klorid, kvaterna amonijeva sol koja je sigurna za uporabu, jeftina i niske toksičnosti. Obično se kombinira sa spojevima koji omogućavaju stvaranje vodikove veze poput alkohola, amida i kiselina.[7] Eutektične smjese se najčešće sastoje od kolin klorida, karboksilnih kiselina i drugih donora vodikove veze kao što su glicerol, urea, sukcinska i limunska kiselina. Pogodniji su za uporabu od ionskih tekućina zbog niske cijene proizvoda (niža cijena sirovine), imaju manju toksičnost i često su biorazgradivi (ekološki prihvatljiviji). U novije vrijeme za sintezu DES-a koriste se prirodni spojevi, naročito primarni metaboliti (šećeri, urea, organske kiseline, aminokiseline, derivati kolina) čije su strukture prikazane na Slici 1. Takvi spojevi čine prirodne eutektičke smjese (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Danas se može pripraviti veliki broj kombinacija NADES-a zbog raznovrsnosti prirodnih spojeva, što omogućuje dizajniranje smjesa sa željenim svojstvima potrebnih za određenu primjenu.[8] U prirodi i živim organizmima možemo pronaći prirodne eutektičke smjese. Analize nektara iz biljaka pokazala su da se pri sobnoj temperaturi šećeri iz nektara nalaze u krutom agregatnom stanju, ali njihova kombinacija čini tekuću smjesu.[7]



Slika 1. Prikaz kemijskih struktura tvari koje mogu biti komponente prirodnih eutektičkih otapala.[5]

Eutektička otapala mogu se opisati općom formulom Cat^+XzY gdje je Cat^+ amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation, halogenid, a X je Lewisova baza koji zajedno predstavljaju akceptor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) u obliku Cat^+X. Lewisova ili Brønstedova kiselina (Y) je donor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD), koji tvori kompleks s X-. Unutar strukturne formule z označava broj molekula Y u kompleksu. DES-ovi se najčešće dijele na četiri tipa prikazana u Tablici 2.[9]

Tablica 2. Tipovi eutektičkih otapala.[9]

Tipovi	Sastav
Tip 1	Kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala (Zn, Sn, Fe)
Tip 2	Kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala (Cr, Co, Fe)
Tip 3	Kvaterna sol Cat^+X^- i donor vodikove veze (amidi, kiseline i alkohol)
Tip 4	Halogenid metala i donor vodikove veze (amidi i alkohol)

Eutektičke otopine imaju sposobnost primanja i doniranja protona i elektrona što im povećava sposobnost otapanja zbog mogućnosti stvaranja vodikovih veza. Ovo svojstvo poboljšava učinkovitost ekstrakcijskog sredstva. Dai i sur. (2013) su istraživali ekstrakciju fenolnih spojeva i utvrdili da prirodna eutektička otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva zbog povezanosti između molekula prirodnih eutektičkih otapala i fenolnih spojeva nastalom vodikovom vezom. Na ekstrakciju utječu i fizikalna svojstva kao što su polarnost i viskoznost.[8] Optimiziranjem parametara (viskoznost, temperatura i polarnost), autori su utvrdili bolji prinos ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom prirodnih eutektičkih otapala u usporedbi s uobičajenim otapalima korištenim u kemijskim procesima kao što su voda i etanol. Benzojeva kiselina, Danazol, Itrakonazol i Griseofulvin su slabo topive molekule koje su topive 5 do 22 000 puta bolje u eutektičim otapalima kao što su smjese kolin klorid/urea i kolin klorid/malonska kiselina nego u vodi.[5]

U literaturi, kao moguća zamjena za druga otapala, DES-ovi se prvi put spominju 2004 godine. Eutektična otapala su pokazala puno pozitivnih učinaka i potencijala za primjenu u raznim područjima znanosti. Prije nego li se otapala sa sigurnošću mogu zvati zelenim otapalima treba poznavati u cijelosti njihov ekotoksikološki profil. O njihovoj toksičnosti do danas je objavljeno tek nekoliko radova.

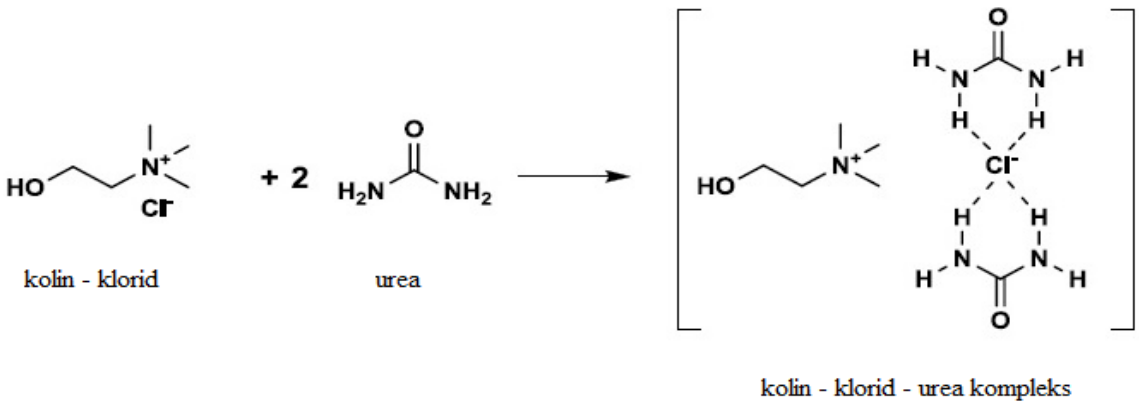
2. Eksperimentalni dio

Pregledom literature istražena su eutektička otapala, njihove metode priprave, fizikalno-kemijska svojstva i primjena koja će biti detaljnije objašnjena u sljedećem poglavlju.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Metode priprave eutektičnih otapala

Priprema eutektičkih otapala u usporedbi s ostalim generacijama ionskih kapljevina je lakša i ekonomičnija. Može se vršiti na više načina: iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži sve komponente, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga komponenta disocirana ili iz čvrste mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do unaprijed određene temperature.[5] Primjer reakcije nastanka eutektičke smjese prikazan je Slikom 2. Kod pripreme eutektičkih otapala komponente međusobno ne reagiraju već se povezuju vodikovim vezama. Važno je napomenuti da kod priprave ovih otapala se ostvaruje 100 %-tna atomska učinkovitost, tj. svi atomi supstrata se ugrađuju u produkt. Takav proces je održiv i ne stvara se otpad.[10]



Slika 2. Reakcija nastajanja kolin klorid:urea DES (1:2).[11]

Jedan od načina kojim se pripremaju eutektička otapala je da se točno određena masa komponenata izvaže, zatim se smjesa komponenata zagrijava uz miješanje s ili bez dodatka vode na temperaturi do 100 ℃ sve dok ne nastane bistra tekućina. Opisani proces može trajati 30 do 240 minuta. Omjeri komponenata koje će činiti eutektičko otapalo kao i njihova temperatura taljenja ovise o kemijskoj prirodi komponenata. Tip komponenata i udio vode u otapalu utječu na vrijeme koje je potrebno za dobivanje tekućeg eutektičkog otapala iz krutih i tekućih komponenata. Vrijeme potrebno za pripremu otapala koje sadrži tekući glicerol bilo je od 30 do 45 minuta ovisno o udjelu vode. Ostala otapala koja imaju čvrste komponente i sadrže veći udio vode zahtijevaju manje vremena za pripravu od otapala sa manjim udjelom vode. Na primjer, za pripravu

eutektičkog otapala koje sadrži čvrstu komponentu i 50 % vode potrebno je u prosjeku od 60 do 90 minuta, dok je za otapalo koje sadrži 10 % vode potrebno od 120 do 180 minuta. Postupkom vakuum uparavanja možemo dobiti otapala istog kemijskog profila gdje se prvo komponente otapaju u vodi, a zatim se voda uparavanjem uklanja na 50 ℃ do konstantne mase uz pomoć rotacijskog vakuum uparivača.[12,8] Eutektička otapala se mogu dobiti i postupkom liofilizacije kojeg su istražili Gutiérrez i sur. (2009). To je postupak koji se sastoji od nekoliko koraka. U prvom koraku se pomiješaju vodene otopine pojedinačnih komponenti u točno određenom omjeru. Dobivena smjesa se zamrzne te se postupkom sušenja, odnosno sublimacijom, dobije tekuće otapalo. Liofilizacija je jednostavna i pogodna za ugradnju staničnih struktura u eutektičko otapalo.[13] Jedna od najnovijih metoda pripreme eutektičkih otapala je primjena ultrazvuka ili mikrovalnog zračenja te njihova istovremena upotreba. Ove metode zahtijevaju manje energetske troškove i kraće vrijeme pripreme. Upotrebom ultrazvučnih valova na reakcijsku smjesu dolazi do nastanka, rasta i implozije mjehurića u reakcijskoj smjesi što dovodi do zagrijavanja reakcijske smjese uslijed nastalih lokalnih pregrijavanja. Ova metoda osigurava ubrzavanje procesa prilikom pred-tretmana krutih uzoraka, ekstrakcije anorganskih i organskih komponenti, homogenizacije i puno drugih procesa, tako da imamo bolje uvjete (uspješniji prijenos mase, bolji prelazak otapala u stanicu i slično) čime se zadovoljavaju zahtjevi zelene kemije.[14] Oscilirajuća energija ultrazvuka utječe na uzorak te imamo manji trošak energije, a energetska učinkovitost je skoro 100 %. Kod mikrovalnog zračenja primjena se temelji na sposobnosti polarnih molekula ili tvari da apsorbiraju i emitiraju mikrovalno zračenje. Tretiranjem takvih uzoraka mikrovalovima dolazi do njihovog zagrijavanja uslijed nastale dipolarne polarizacije i ionske kondukcije. Danas se sve više istražuje istovremena primjena ultrazvuka i mikrovalnog zračenja zbog velikog potencijala, boljih uvjeta, manje potrošnje energije, bolje kvalitete proizvoda i omogućavanja automatizacije procesa. U svom radu Bubalo i sur. (2016) su opisali dvije metode: klasična priprema zagrijavanjem komponenata u vodenoj kupelji uz miješanje i priprava primjenom alternativnih izvora energije uporabom mikrovalno-ultrazvučnog reaktora. Kod priprave sve kemikalije su bile bez prethodnog pročišćavanja, a za higroskopne komponente obavljeno je sušenje do konstantne mase u vakuum sušioniku u trajanju oko 24 sata. Za vrijeme priprave otapala smjesa je bila izolirana od vlage iz zraka zbog higroskopnosti komponenata. Uz konstantno miješanje reakcijsku smjesu su zagrijavali na magnetnoj miješalici do 3 sata na temperaturi od 40

℃. Kod eutektičkih otapala koja sadrže šećere uočeno je da na višim temperaturama otapala dobivaju svijetlo smeđu boju uslijed oksidacije tj. karamelizacije šećera. Zbog toga se njihova priprava vršila na temperaturi od 40 ℃ što je u skladu sa zapažanjima Hayyan i sur. (2013). Nastajanjem bistrog, tekućeg otapala priprava je bila gotova, a potrebno vrijeme je bilo 3 sata. Nastala eutektička otapala su se stavila na sušenje pod visokim tlakom idućih 8 sati. Nakon procesa sušenja otapala su se čuvala u eksikatoru napunjenom silikagelom. Kako bi se smanjilo vrijeme pripreme eutektičkih otapala ispitana je mogućnost istovremene upotrebe ultrazvuka i mikrovalnog zračenja. Za provedbu takve pripreme eutektičkih otapala koristili su ultrazvučni-mikrovalni reaktor MW-ER-01 Ultrasonic-microwave Cooperative Extractor/Reactor (LAB-KITS, Slika 3). On omogućuje tri načina rada: vođenje postupaka pod djelovanjem ultrazvuka, mikrovalnog zračenja te istovremena primjena istih. Također se koristi i za istraživanje metoda i mehanizama kemijskih reakcija, sinteza, pripreme materijala, predobrade uzoraka i drugo. U uređaju reakcije se odvijaju pri niskim temperaturama i normalnom tlaku stoga nije potrebno posebno posuđe za njihovo odvijanje. Na uređaju moguće je i podesiti temperaturu i raspon energije korištenih mikrovalova. Zbog visokog kapaciteta uređaja moguće je pripremiti uzorke volumena do 500 mL, ali upotrebom raznovrsnih posuda volumen uzorka moguće je i povećati. Pomoću ovog uređaja moguće je postići temperaturu zagrijavanja uzorka do 120 ℃ (+/- 1 ℃), podesiti snagu mikrovalova između 10 i 800 W kao i vrijeme trajanja reakcije dok su snaga i frekvencija korištenih ultrazvučnih i mikrovalnih zračenja konstantne.



Slika 3. Ultrazvučno-mikrovalni reaktor MW-ER-01 (LAB-KITS)

Eksperiment se provodio pri različitim vrijednostima snage mikrovalova od 300 do 500 W i s različitim vremenom trajanja priprave. Pri prvom pokušaju korištena je snaga mikrovalova od 500 W te je eksperiment trajao više od 30 minuta uz zagrijavanje na 100 ℃. Došlo je do pregrijavanja reakcijske smjese uslijed kojeg je nastala smeđa homogena viskozna otopina. Vjeruje se da je ovakav rezultat dobiven zbog izlaganja glukoze visokoj temperaturi uslijed koje je došlo do njene oksidacije (Slika 4). Kod drugog pokušaja korištena snaga mikrovalova je ostala ista, eksperiment je trajao 25 minuta, a zagrijavanje se provodilo na temperaturi od 80 ℃. Pri klasičnoj pripravi eutektičkog otapala za nastanak homogene viskozne kapljevine bilo je potrebno više od 3 sata.



Slika 4. Usporedba eutektičkog otapala dobivenog klasičnom pripravom (lijevo) i ultrazvučno-mikrovalnim reaktorom (desno).[10]

Na temelju prikupljenih rezultata Bubalo i sur. (2016) su zaključili da je moguće smanjiti vrijeme trajanja priprave eutektičnih otapala istovremenim korištenjem mikrovalova i ultrazvuka. Dobiveni rezultati ukazuju da je ovom metodom moguće pripraviti eutektičko otapalo više od 7 puta brže od klasične metode priprave eutektičkih otapala. Upotrebom ultrazvučnog i mikrovalnog zračenja kao alternativnih izvora energije moguće je smanjiti potrošnju energije za 45 - 65 % u odnosu na upotrebu vodenih kupelji za zagrijavanje reakcijskih smjesa.[15,16]

3.2. Fizikalno – kemijska svojstva eutektičkih otapala

Eutektička otapala možemo nazvati i dizajniranim otapalima zbog mogućnosti njihove pripreme i kombiniranja odgovarajućih komponenata kako bi dobili željena svojstva (viskoznost, pH vrijednost, gustoća, točka ledišta i dr.).

3.2.1. Viskoznost

Viskoznost fluida je mjera otpornosti fluida na istjecanje uslijed unutrašnjih sila trenja kada se slojevi fluida gibaju različitim brzinama. Uzrok tome su kohezijske sile

između molekula u fluidu. Viskoznost se opisuje koeficijentom viskoznosti η i mjeri se u paskal-sekundama (Pa·s), a njena vrijednost ovisi o udjelu vode i temperaturi te predstavlja poteškoću u njihovoj primjeni. Eutektička otapala imaju visoku viskoznost pri sobnoj temperaturi zbog smanjene pokretljivosti molekula uslijed jakih vodikovih veza kojima su povezane (Tablica 3). Kod kolin klorida s glukozom viskoznost se povećava za 1/3 kada se razrijedi s 5 % vode, i za 1/10 početne vrijednosti ako se doda 10 % vode. Ako temperaturu povećamo s 20 na 40 ℃ tada se viskoznost iste smjese umanji za 2/3. Visoka viskoznost se povezuje i sa velikim dimenzijama iona, slobodnim malim praznim prostorima koji se nalaze kod većine eutektičkih smjesa, ali i doprinosom elektrostatskih odnosno Van der Waalsovih sila.[17] Na kapacitet otapanja eutektičnih otapala utječe i polarnost. Otapala koja sadrže organske kiseline su najpolarnija (44,81 kcal/mol), zatim ona koja sadrže šećere i aminokiseline, čija polarnost je slična vodi (48,21 kcal/mol).[18] Zbog svojih potencijala kao zelena otapala, eutektičke smjese su poželjne sa niskim vrijednostima viskoznosti kako bi se spriječili visoki troškovi prilikom rukovanja sa kapljevinom.[17]

Tablica 3. Viskoznost nekih DES-ova na određenim temperaturama.[19]

Sol	Donor vodikove veze	Molarni odnos	Viskoznost (cP)	Temperatura (℃)
ChCl	Urea	1:2	750	25
ChCl	Etilen glikol	1:2	37	25
ChCl	Glicerol	1:2	359	25
EtN$\mathbf{H_3}$Cl	CF_3CONH_2	1:1.5	256	40
EtN$\mathbf{H_3}$Cl	Acetamid	1:1.5	64	40
EtN$\mathbf{H_3}$Cl	Urea	1:1.5	128	40
AcChCl	Urea	1:2	2214	40

3.2.2. Gustoća

Znanstvenici su istraživanjima otkrili da gustoća eutektičnih smjesa ima veću vrijednost od gustoće vode, a slična je gustoći ionskih tekućina (1,1 – 2,4 g/cm^3). Ona ovisi o strukturi molekula odnosno o molekulskoj masi i jakosti među-molekulskih sila. Molekulske vrste sa većom molekulskom masom i slabijim među-molekulskim silama imaju manju gustoću, a molekule s istom masom, a jačim među-molekulskim silama

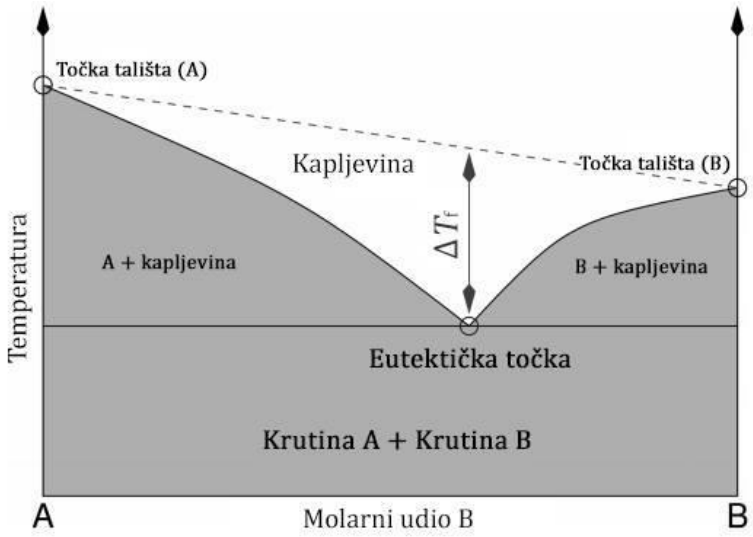
imaju veću gustoću. Također na gustoću utječu šupljine i prazni prostori od kojih su sastavljena otapala, ali i temperatura s čijim se povećanjem smanjuje gustoća. Bržim gibanjem molekula i povećavanjem slobodnog prostora pri istoj temperaturi dolazi do snižavanja gustoće. Povišenjem udjela vode u otapalu i odnos organske soli i donora vodikove veze također utječe na smanjenje gustoće.[17] Primjer je dodatak kolin klorida (ChCl) glicerolu.[20] Gustoća nekih DES-ova prikazana je u tablici 4.

Tablica 4. Gustoća nekih DES-ova i sustava glicerola na temperaturi 25°C.[19]

Sol	Donor vodikove veze	Molarni odnos	Gustoća (g/cm^3)
ChCl	Urea	1:2	1,25
ChCl	Etilen glikol	1:2	1,12
ChCl	Glicerol	1:2	1,18
ChCl	Glicerol	1:3	1,20
ChCl	Glicerol	1:4	1,21
ChCl	Malonična kiselina	1:1	1,25

3.2.3. Talište eutektičkih smjesa

Kao što je već navedeno, eutektičke smjese nastaju miješanjem i zagrijavanjem dviju krutina visokih tališta, najčešće kvartarne amonijeve soli i donora vodikove veze, u određenom molarnom omjeru. Takva smjesa tekućeg stanja pri sobnoj temperaturi ima izrazito nisko talište. Zbog interakcija koje se javljaju između halogenog aniona i donora vodikove veze dolazi do sniženja tališta eutektičke smjese što znači da obje komponente smjese utječu na konačnu točku tališta smjese. Najčešće im je točka tališta manja od 150 °C.[21] Na talište DES-ova utječe struktura tvari od kojih su sastavljeni i molarni omjer, pa je tako utvrđeno da se povećavanjem broja hidroksilnih grupa u molekuli koja djeluje kao HBD povisuje vrijednost tališta. Fazni dijagram eutektičkih smjesa prikazan je Slikom 5.



Slika 5. Fazni dijagram dvokomponentne eutektičke smjese.[9]

ΔT_f predstavlja razliku između točaka tališta idealne i eutektičke smjese. Iz faznog dijagrama je uočljivo kako će kod idealne smjese komponenta A i B imati veću točku tališta upravo za ΔT_f od eutektičke točke, koja nastane kad se pri određenom molarnom omjeru miješaju čiste komponente A i B. Najzanimljivija su otapala koja imaju točku ledišta manju od 50 °C, zbog upotrebe kao jeftina i sigurna otapala u raznim područjima.[21]

3.2.4. pH vrijednost

pH je važno fizikalno svojstvo koje predstavlja mjeru kiselosti ili lužnatosti neke otopine. Kod DES-a pH vrijednost isto ovisi o prirodi komponenata od kojih se sastoji pa su tako otapala koja sadrže organske kiseline kao HBD kisela (pH <3), a ona koja se sastoje od amida kao HBD su bazična (pH >8). Primjer je kolin klorid:urea (1:2) kod koje pH iznosi 8,51.[22] Ovo svojstvo je važno za primjenu eutektičkih otapala u industriji, u biokemijskim reakcijama, vezano za katalitičke reakcije i u farmaciji.

3.2.5. Električna vodljivost

Električna vodljivost je fizikalna veličina koja nam ukazuje koliko dobro otopina provodi električnu struju. Ovisi o vrsti iona, njihovoj pokretljivosti, nabojnom broju i proporcionalna je njihovoj koncentraciji jer su ioni nosioci naboja koji su ključni za provođenje struje. Utvrđeno je da se vodljivost otopine povećava smanjenjem viskoznosti, jer viskoznost utječe na pokretljivost nosioca naboja pa tako i na vodljivost otopine. Kao što je već navedeno eutektičke smjese pri sobnoj temperaturi imaju visoke

vrijednosti za viskoznost što znači da će pri sobnoj temperaturi pokazati slabu električnu vodljivost. Naime, na povećanje električne provodljivosti utječe i porast temperature. Povišenjem temperature dolazi do povećanja kinetičke energije molekula što uzrokuje veći broj sudara između molekula te smanjenje među-molekulskih sila te samim time, povećanje električne provodnosti eutektičkih smjesa.[23] Tako i parametri koji utječu na viskoznost utječu i na provodnost kao što je molarni omjer organske soli i donora vodikove veze.[12] Bitno je istaknuti da eutektičke smjese imaju veću vodljivost od klasičnih organskih otapala, što je važan podatak za potencijalnu zamjenu navedenih otapala s eutektičkim.[9] Vodljivost je važno svojstvo za primjenu eutektičkih smjesa u mnogim elektrokemijskim procesima i sintezama.

3.2.6. Indeks loma

Indeks loma je fizikalno svojstvo eutektičkih smjesa koje se upotrebljava za optičku identifikaciju tvari odnosno analizu čistoće te mjerenje koncentracije pojedinih komponenata. To je bezdimenzijski faktor koji ukazuje kolika je razlika između brzine svijetlosti u promatranom mediju i brzine svijetlosti u vakuumu. Opisan je izrazom:

$$n_D = \frac{c}{v}$$

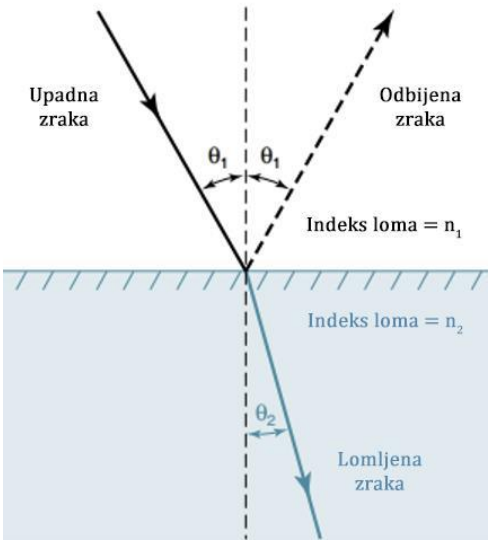
Gdje je:

n_D – indeks loma

c – brzina svjetlosti u vakuumu

v – brzina svjetlosti u promatranom mediju

Kada se svjetlost reflektira, kut refleksije identičan je kutu upada. Naime, kada svjetlost prođe iz jednog medija u drugi, njezin put je „slomljen“ na granici medija, a to se naziva refrakcija koja je prikazana na Slici 6.



Slika 6. Prikaz Snellovog zakona.[24]

Ova pojava je uzrokovana putovanjem zraka svjetlosti raznim brzinama kroz različite medije, a prikazana je Snellovim zakonom:

$$n_{D_1} sin\theta_1 = n_{D_2} sin\theta_2$$

Gdje je :

n_{D_1} i n_{D_2} - indeksi loma dvaju medija

$sin\theta_1$ i $sin\theta_2$ - kutovi

Kako zraka svjetlosti ulazi u optički gušći medij dolazi do loma jer svjetlost uvijek pokušava prijeći put u najkraćem vremenu kroz medij gdje se sporije kreće. Treba spomenuti da indeks loma ovisi o temperaturi, valnoj duljini svjetlosti i vrsti molekula u otopini. Mjeri se refraktrometrom gdje očitane vrijednosti zavise o prirodi uzorka i individualnom očitavanju pojedinca.

3.2.7. Toksičnost

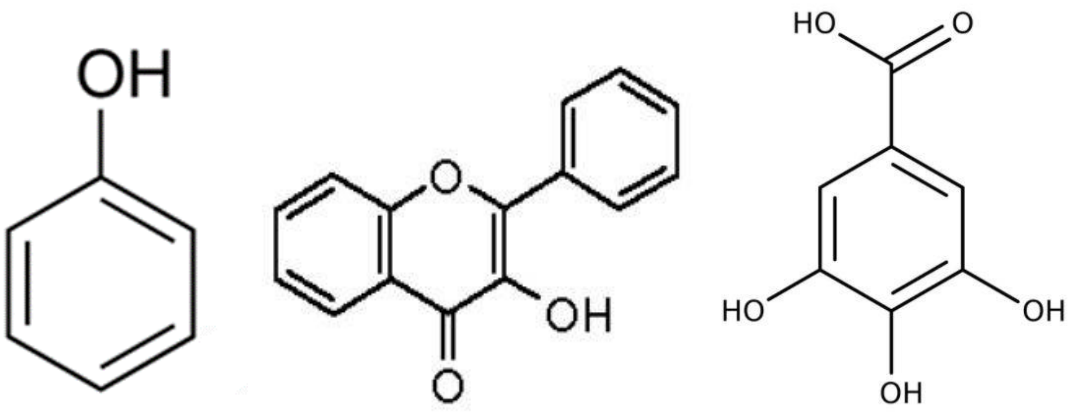
Eutektička otapala se razlikuju od klasičnih organskih otapala po tome što nisu hlapljiva i zapaljiva što bitno pojednostavljuje njihovo skladištenje. Njihova toksičnost još uvijek nije dovoljno istražena, iako se DES-ovi smatraju netoksičnima jer se za njihovu pripravu koriste tvari prirodnog podrijetla, odnosno primarni metaboliti. U svojim radovima Hayyan i sur. ističu da treba uzeti u obzir i sinergističko djelovanje komponenata od kojih se sastoji eutektička smjesa.[25,26] Takvo djelovanje može

uzrokovati veću toksičnost DES-ova nego što je toksičnost pojedinih komponenata. Istraživanja su dokazala da toksičnost ovisi o sastavu otapala te o njegovoj viskoznosti i koncentraciji. Provedeno je istraživanje utjecaja toksičnosti DES-a na bakterije koje je ukazalo na mogućnost njihove primjene kao antibakterijskog agensa. Takav učinak opisan je utjecajem DES-a na narušavanje integriteta membrane bakterija zbog prisutnosti delokaliziranog naboja.[27] Ovo područje je još uvijek tema mnogih znanstvenih istraživanja.

3.3. Primjena eutektičkih otapala

3.3.1. Primjena u izolaciji bioaktivnih spojeva

Tehnika primjene eutektičkih otapala, kao jedna od inovativnih metoda izolacije bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala, koristi se za ekstrakciju fenolnih spojeva koje nalazimo u biljkama. Fenolni spojevi se u biljnom tkivu nalaze u obliku sekundarnih metabolita koji imaju dvostruku ulogu: služe biljci u rastu i razvoju te je štite od nametnika i herbivora.[28] Važna je njihova struktura koja se sastoji od aromatskih prstenova gdje se nalaze jedna ili više hidroksilnih skupina, te ona predstavlja razlog zbog čega su tema mnogih istraživanja od kojih je važna mogućnost primjene u prevenciji različitih bolesti (Slika 7).



Fenol Flavonol Galna kiselina

Slika 7. Prikaz kemijskih struktura fenolnih spojeva

Fenolni spojevi imaju antikancerogeno, antiupalno, analgetsko, antiviralno, antimikrobno i antioksidativno djelovanje.[29] Kao što je već navedeno, skupina se sastoji od velikog broja aromatskih spojeva kao što su flavanoidi, flavonoli, antocijani, flavan-3-oli, tanini, fenolne kiseline, lignin i elagitanin.[30] Izazov za njihovu veću upotrebu u industrijskom smislu predstavlja njihova ekstrakcija. Najčešće metode ekstrakcija su ekstrakcija čvrsto-tekuće (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) i tekuće-tekuće (engl. *Liquid Liquid Extraction*, LLC) gdje se kao otapala upotrebljavaju organska otapala kao što su metanol, propanol, etanol, aceton ili etil-acetat i njihove mješavine.[31,32] Takva otapala, iako posjeduju izvrsnu sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva, se pokušavaju zamijeniti u cijelosti s drugim metodama ili otapalima. Zbog svojih štetnih svojstava kao što su visoka hlapljivost, zapaljivost, toksičnost, nakupljanje u zraku (efekt staklenika), teškog zbrinjavanja, nemoguće biorazgradivosti te visokih troškova zbrinjavanja organska otapala se pokušavaju zamijeniti zelenim otapalima u svim područjima njihove upotrebe, pa tako i u području ekstrakcije biološki aktivnih spojeva.[33]

Iznimno je teško pronaći pravo otapalo i metodu za najučinkovitiju ekstrakciju željenog spoja iz prirodnog izvora zbog raznolikosti fenolnih struktura, broja aromatskih prstenova, razlika u veličini i kompleksnosti molekula od manjih do većih molekula tanina i derivata polifenolnih struktura kao što su glikozidi, esteri i amidi. Zbog sposobnosti da mogu svoja fizikalno-kemijska svojstva prilagoditi namjeni, DES-ovi su se istakli kao moguća zamjena organskim otapalima u ekstrakciji fenolnih spojeva. Od DES-ova za ekstrakciju biološki aktivnih tvari obično se koriste oni na bazi kolin-klorida s ureom, etilen-glikolom i glicerolom koji su donori vodikove veze, iako su ovdje pronašli svoju primjenu i alkoholi, aminokiseline te karboksilne kiseline.[34] Kako bi ekstrakcija bila što uspješnija, osim kemijskih svojstava kemijskih otapala i tvari, potrebno je izabrati odgovarajuću metodu te postići optimalne uvjete za njeno izvođenje. U radu Gullona i sur. ističu se nove metode ekstrakcije pomoću mikrovalova, ultrazvuka i zagrijavanja koje su zasnovane na principima zelene kemije.[35] Uz poboljšanje procesa ekstrakcije dolazi i do smanjenja troškova procesa, jer je kraće vrijeme ekstrakcije i potreban je manji volumen otapala.[14] Metoda koja do sad nije u potpunosti istražena a uključuje DES kao otapalo je ekstrakcija potpomognuta enzimima (engl. *Enzyme-Assisted Extraction*, EAE). Obzirom na do sada objavljene radove na području biokatalize i DES-ova, može se pretpostaviti da će i ova metoda

imati uspješnu primjenu za proces ekstrakcije biološki aktivnih spojeva. U istraživanju kojeg su proveli Bi i sur. korištena je metoda ekstrakcije zagrijavanjem i ekstrakcije ultrazvučnih valova za ekstrakciju fenola iz biljke japanski čempres (*Chamaecyparis obtuse).* Iz dobivenih rezultata može se uočiti veći doprinos ekstrakcije sa 0,031 mg/g na 0,518 mg/g za miricetin i amentoflavon jer su ostvareni optimalni uvjeti ekstrakcije zagrijavanjem, podešavanjem temperature i odvijanja procesa.[36] Nakon dvije godine, uz pomoć mješavine dvojnog sustava 16 različitih DES-ova kombiniranih sa 5 različitih otapala (metanol, etanol, voda, aceton i kloroform) Tang i sur. uspješno su ekstrahirali kvercentin, miricetin i amentoflavone iz biljke japanskog čempresa.[34]

Učinkovitost ekstrakcije ovisi o mnogim faktorima, na primjer kod ultrazvučne ekstrakcije kao što je već spomenuto učinkovitost ovisi o kavitaciji mjehurića koji su nastali unutar DES-a gdje prolazom ultrazvučnih valova dolazi do uništavanja stanične stijenke biljnih stanica pri čemu se stanični sadržaj oslobađa u otapalo za ekstrakciju. Uništavanje stanične stijenke biljnih stanica može izazvati i negativan učinak na učinkovitost ekstrakcije, kao što je nastanak slobodnih radikala unutar mjehurića zraka ili degradaciju fenolnih spojeva.[32] Princip djelovanja ekstrakcije mikrovalovima zasniva se na kretanja molekula u materijalima ili otapalima, koji su sačinjeni od dipola, uslijed čega dolazi do zagrijavanja uzorka, pucanja stanice i oslobađanja aktivnih komponenti.[14] Prednost ekstrakcije mikrovalovima definitivno je znatno smanjenje volumena otapala koji je upotrijebljen tijekom ekstrakcije, pri čemu DES-ovi zbog svoje polarnosti i visoke dielektrične konstante mogu apsorbirati veću energiju mikrovalova što povećava udio fenolnih spojeva u ekstraktu.[32] Temperatura ima značajnu ulogu prilikom odabira metode ekstrakcije, jer su DES-ovi pri niskim temperaturama prilično viskozni, pa malo povećanje temperature dovodi do veće fluidnosti otapala koji tada lakše ulazi unutar biljnog matriksa što dovodi do bolje ekstrakcije. Odabir primjerene metode ekstrakcije ponajprije ovisi o svojstvima DES-a i prirodi spoja koji se namjerava ekstrahirati, premda ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ukazuje na najveću učinkovitost.[33]

Jedno od fizikalno-kemijskih svojstava otapala koje može biti prednost ili nedostatak, ovisno o slučaju, je tlak para. Visoki tlak para otapala može pozitivno utjecati na proces ekstrakcije, a suprotan utjecaj će biti ukoliko je tlak para nizak. Otapala koja imaju niski tlak para ne isparavaju te otežavaju izuzimanje nehlapive otopljene tvari. Faktor koji utječe na sposobnost ekstrakcije DES-ova su snažne inter-

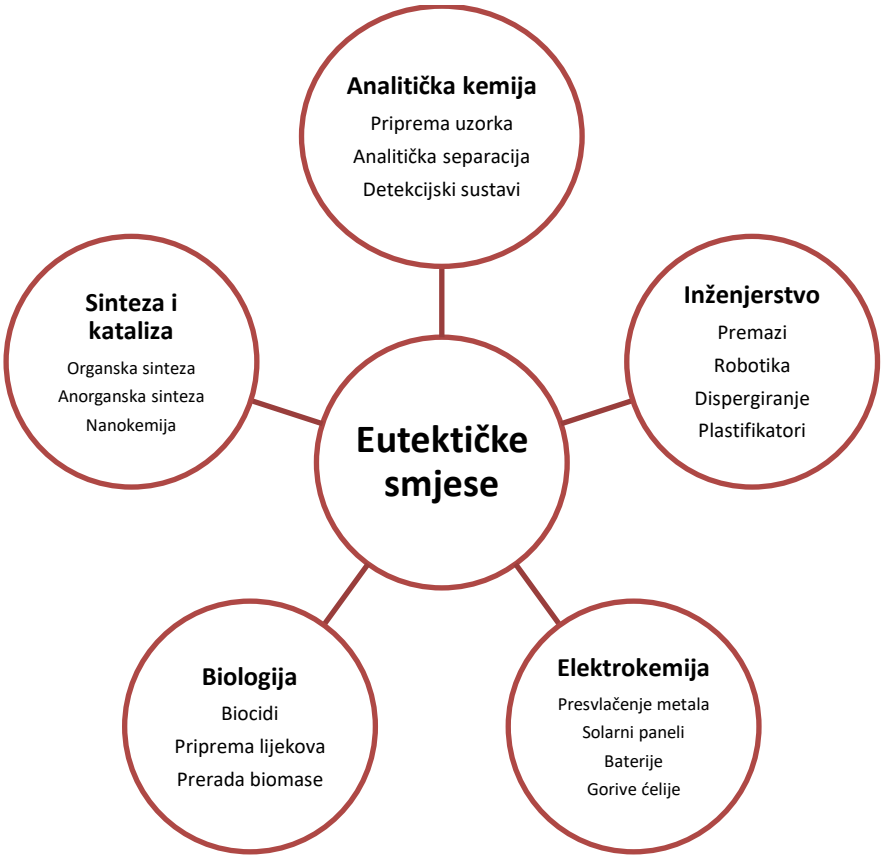
molekulske interakcije formirane između otapala i fenolnih spojeva, koje mogu uzrokovati poteškoće prilikom izdvajanja fenolnih spojeva iz otapala ukoliko su interakcije jake. Ukoliko je potrebno izolirati biološki aktivne tvari iz DES-a koji je upotrijebljen za primarnu ekstrakciju iz biljnog materijala, a pritom i reciklirati sami DES, to se može učiniti raznim tipovima ekstrakcije (čvrsto-tekuće i tekuće-tekuće), upotrebom molekulskih sita, smole ili precipitacija primjenom anti-otapala, preferencijalno vode. DES-ovi se bolje miješaju sa protičnim polarnim otapalima kao što su voda, etanol ili metanol, zbog snažnih vodikovih veza koje definiraju sposobnost miješanja otapala. Prijenos mase se pri tome odvija između kapljica koje se ponašaju kao dispergirana faza DES-a i okoline aprotičkog otapala. O veličini koeficijenta raspodjele ovisi kako će se fenolne komponente podijeliti između aprotičkog otapala i DES-a.[33] Prema Ruesgas-Ramonu i sur. ekstrakcija iz faze DES-a će biti uspješnija što je slabiji kapacitet vezanja vodikove veze. Za izvođenje takvog procesa potrebno je nekoliko koraka ili veći volumeni protičkih otapala, kako bi se omogućilo jednostavnije recikliranje DES-a.[33]

Liu i sur. su proveli uspješnu protustrujnu separaciju koju su upotrijebili za izolaciju i pročišćavanje kvercentina, daidzdeina, rutina i kempferola ekstrahiranih u NADES-u /(ChCl:Glc:H_2O u omjeru 5:2:5).[37] Takav postupak predstavlja uspješni primjer ekstrakcije tekuće-tekuće. Uz pomoć raznih smjesa organskih otapala iz NADES-a su se uspješno izolirale navedene molekule sa 94,6 %, 96,7 %, 95,7 % i 97 %. Ova metoda je interesantna za razdvajanje fenolne tvari iz eutektičkih smjesa, jer je NADES u takvom postupku u cijelosti recikliran, premda je za izolaciju upotrijebljeno organsko otapalo.[37]

Kada su započeta istraživanja metode ekstrakcije čvrsto-tekuće za izolaciju fenolnih spojeva iz biljnih ekstrakata u NADES-u primjenjivana je slabo polarna smola HP-20.[18] Fenolni spojevi su se apsorbirali na kolonu, a DES se mogao otopiti i eluirati u vodi. Sukroza je jedan od sastojaka DES-a koji može utjecati na spomenuti proces separacije zbog toga što u prvom procesu eluacije vodom fenolni spojevi koeluiraju skupa sa sukrozom, no to je sređeno upotrebom 0,1 % mravlje kiseline povećavajući retencijsko vrijeme prije eluacije s etanolom. Polarne fenolne komponente su pročišćene s visokim udjelom od 90 %, dok manje polarne komponente kao što je kartamin, pigment iz šafrana, su odvojeni s udjelom od 84 %.[33] Komponente DES-a je moguće u cijelosti razložiti ili otopiti u polarnim protičkim otapalima kao što je etanol ili voda

zbog njihove velike topljivosti. Poznato je da na sposobnost DES-a kao otapala utječe razrjeđenje s vodom koje povećava udaljenost između komponenata i tako smanjuje jakost intra-molekulskih veza. Osim ekstrakcijom, fenolne spojeve iz DES-a je moguće izolirati i precipitacijom ili formiranjem netopljivog sloja u vodi ili etanolu, a za recikliranje komponenata DES-a potrebno je provesti uklanjanje vode ili isparavanje etanola.[33]

Osim u izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala, eutektička otapala se primjenjuju i u mnogim drugim područjima kao što je područje organske sinteze, elektrokemije, katalize i kemije materijala (Slika 8).



Slika 8. Područja primjene eutektičkih smjesa

3.3.2. Primjena u organskoj sintezi, katalizi i biokatalizi

Kod organske sinteze, izbor otapala je ključan jer upotreba otapala obično predstavlja izvor štetnog otpada kojeg je potrebno na pravilan način ukloniti na kraju procesa. Zbog toga se sve više upotrebljavaju netoksična otapala poput eutektičkih smjesa. Oni se u organskoj sintezi upotrebljavaju kao otapala, katalizatori i reaktanti poput smjese kolin klorid:urea koja se primjenjivala kao otapalo za reakcije brominacije, redukcije epoksida i karbonilnih spojeva te Perinkovu reakciju, odnosno dobivanje nezasićenih organskih kiselina.[38] Za takve reakcije potrebno je postignuti drastične uvjete kao što su visoke temperature, uporaba jakih kiselina i toksičnih otapala za okoliš. Zbog toga se primjenjuju eutektička otapala kako bi se reakcije odvijale brže, na nižim temperaturama te smanjila štetnost za okoliš.[17]

U području katalize, otapalo ima ulogu definiranja načina obrade procesa nakon završetka odnosno potrebno recikliranje i zbrinjavanje. Također, otapalo utječe i na učinkovitost reakcije na način da omogućuje bolji kontakt između katalizatora i reaktanta. Dolazi do povećanog interesa za upotrebu eutektičkih smjesa u spomenutom području, poput bazno-kataliziranih reakcija, kiselo-kataliziranih reakcija, reakcija koje su katalizirane prijelaznim metalima i u biokatalizi.[17]

Biokataliza je proces korištenja enzima, u izoliranoj formi ili u obliku cijelih stanica, kao katalizatora u organskim sintezama. Za katalizu mnogih organskih reakcija u vodenim otopinama korišteni su enzimi, proteini koji su aktivni pri normalnim uvjetima tlaka, pH vrijednosti i temperature. Ovakav medij ima prednosti ali i nedostatke, poput povoljnog utjecaja na okoliš, sigurne primjene, skupe i zahtjevne obrade otpadnih produkata. Naime, hidrofobni supstrati i produkti su slabo topljivi u vodi. Kod biokatalize, u zadnjih nekoliko godina sve veću pažnju je privukla primjena nekonvencionalnih medija. Premda se u brojnim slučajevima ispostavilo da enzimi imaju najveću katalitičku aktivnost u vodenom mediju, oni i cijele stanice također mogu biti aktivne i u organskim otapalima, superkritičnim fluidima, plinovitoj fazi, ionskim kapljevinama te analogno, u eutektičkim smjesama. Dokazano je da su enzimi aktivniji u ionskim kapljevinama nego u organskim otapalima, što ide u korist i eutektičkim smjesama. Na primjer, utvrđena je stabilnost enzima hidrolaza u eutektičkim otapalima, održavajući pritom njihovu katalitičku aktivnost bez obzira na denaturirajuća svojstva komponenata kao što su urea i drugi donori vodikove veze.[17,39]

3.3.3. Primjena u elektrokemiji

Upotreba eutektičkih otapala u elektrokemiji zabilježena je pri procesu elektrodepozicije metala. Elektrodepozicija ili elektrotaloženje metala je postupak taloženja željenog metala na elektrodnu površinu uz pomoć elektrolize radi funkcionalizacije površine metala. Eutektične smjese su zbog svojih svojstava kao što su niska cijena, nezapaljivost, dobra vodljivost, sposobnost otapanja metalnih soli, velika brzina prijenosa tvari i postojanje širokog potencijalnog odnosno elektrokemijskog prozora prikladna kao otapala elektrolita. Imaju prednost pri primjeni zbog većeg elektrokemijskog potencijala od vode i bolje električne vodljivosti od organskih otapala. U eutektičkim otopinama elektrolita evidentirane su elektrodepozicije metala poput Ni, Zn, Co, Cr, Sn, Sm, Cu, Ag, Al i nekih legura i poluvodića.[9] Elektropoliranje je proces obrnut od elektrodepozicije jer uključuje kontrolirano otapanje površine metala kako bi se smanjila njena hrapavost, povećala otpornost na koroziju, postigao sjaj itd. Procesi elektropoliranja metala koji su temeljeni na primjeni vodenih otopina fosfornih i sumpornih kiselina kao otopina elektrolita, uz aditiv poput CrO_3 su većinom uspješni. Naime takve otopine su toksične, jako korozivne i pri izvođenju procesa može doći do smanjenja efikasnosti uslijed nastanka plina na anodi. Eutektička otapala s obzirom na navedeno su sigurna, nekorozivna i netoksična otapala te imaju visoku efikasnost zbog zanemarivog razvoja plina između površine anode i otopine. Elektropoliranje se primjenjuje kod nehrđajućeg čelika, no moguća je i primjena kod titanija, aluminija, legura Ni/Co i superlegura u eutektičkoj smjesi.[17]

Eutektička otapala se primjenjuju i kao otapala elektrolita koja su sastavni dio ćelija s fotoosjetljivim pigmentima (engl. *Dye Sensitized Solar Cell,* DSSC), a služe za dobivanje električne iz solarne energije.[40] Koristila su se i za dobivanje prirodnih otopina elektrolita na bazi polimera sa visokom vodljivošću a uočena je i njihova primjena kao otapala za elektrolite u baterijama.[17]

4. Zaključak

S porastom svijesti o zaštiti okoliša, istraživači ulažu velike napore kako bi smanjili zagađenje okoliša i zamijenili toksične sastojke s netoksičnim. Organska otapala predstavljaju opasnost za dobrobit okoliša zbog čega su brojna istraživanja upravo posvećena otkrivanju zelenih otapala. Do pojave eutektičkih otapala ionske tekućine su prednjačile na ovom području, no zbog svojih svojstava i superiornosti u mnogim aspektima DES-ovi dobivaju sve veću važnost. Povoljna cijena, jednostavna priprema, netoksičnost, nehlapljivost, sigurnost pri radu i brojne druge prednosti predstavljaju veliki potencijal u primjeni ovih otapala. Problem pri korištenju eutektičkih smjesa povezan je sa viskoznosti i kiselosti. Naime, smanjenje viskoznosti je veoma važno za primjenu eutektičkih smjesa jer se upotrebom smjese manje viskoznosti omogućuje slobodniji prijenos tvari, ali se i smanjuju energetski utrošci. Povećanjem temperature i sadržaja vode u eutektičkim smjesama, može se regulirati viskoznost uz minimalne troškove. Električna vodljivost prati ponašanje viskoznosti pa tako kad viskoznost pada, vodljivost će rasti. Veći sadržaj vode također utječe i na gustoću, eutektične smjese imaju veću gustoću od vode. DES-ovi imaju široku mogućnost primjene od izolacija spojeva, elektrokemije, obrade metala, organske sinteze, katalize, analitičke kemije, biologije, farmacije i mnogih drugih područja.

5. Literatura

[1] Chemat, F., Vian M., Cravotto, G., *Int. J. Mol. Sci*. **2012**, *13*, 8615.

[2] Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Vorkapić-Furač, J., Gaurina Srček, V., *Kem. Ind.* **2014**, *63*, 163.

[3] Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T., Kleine, P., Knight, C., Nagy, M., Perry, D., Stefaniak, M., *Green Chem*. **2008**, *10*, 31.

[4] Anastas, P., Warner, J., *Green Chem.* **1998**, 30.

[5] Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C., *ACS Sustain. Chem. Eng. 2*. **2014**, 1063.

[6] Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I., *Ecotoxiyol. and Environ. Safe*. **2015**, *112*, 46.

[7] Kudlak, B., Owczarek, K., Nemieśnik, J., *Environ. Sci. Pollut. Res. 22*. **2015**, 11975.

[8] Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. -J., Verpoorte, R., Choi, Y. H., *Anal. Chim. Acta*. **2013**, *766*, 61.

[9] Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S., *Chem. Rev*. **2014**, *114*, 11060.

[10] Cvjetko Bubalo M., Panić, M., Radošević K., Radojčić Redovniković I., *Croat. J. Food. Technol. Biotech. Nutr*. **2016**, *11*, 164.

[11] Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V., *Chem. Commun.* **2003**, 70.

[12] Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 9142.

[13] Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., del Monte F., *Langmuir*. **2009**, *25*, 5509.

[14] Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura.Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., *Molecules*. **2010**, *15*, 8813.

[15] Deetlefs, M., Seddon, K. R., *Green Chem*. **2010**, *6*, 1.

[16] Cvjetko Bubalo, M., Sabotin, I., Radoš, I., Valentinčić, J., Bosiljkov, T., Brnčić, M., Žnidaršič-Plazl, P., *Green Process. Synth*. **2013**, *2*, 579.

[17] Kuzmanovski, L., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Završni rad. **2016**.

[18] Dai, Y., Withkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H., *L. Anal. Chem*. **2013**, *85*, 6272.

[19] D'Agostino, C., Harris, R. C., Abbott, A. P., Gladden, L. F., Mantle, M. D., *Phys. Chem. Chem. Phys*. **2011**, *13*, 21383.

[20] Abbott, A. P., Harris, R. C., Ryder, K. S., D'Agostino, C., Gladden, L. F., Mantle, M. D., *Green Chem*. **2011**, *13*, 82.

[21] Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jerome, F., *Chem. Soc. Rev*. **2012**, *41*, 7108.

[22] Radović, M., Panić, M., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I., KUI (rad prihvaćen za objavljivanje), **2021**.

[23] Yue, D., Jing, Y., Ma, J., Yao, Y., Jia, Y., *J. Therm. Anal. Calorim*. **2011**, *110*, 773.

[24] Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, **2010**, str. 461

[25] Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S., Saheed, O. K., *Chemosphere*. **2013**, *99*, 2193.

[26] Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S., Saheed, O. K., *Chemosphere*. **2013**, *93*, 455.

[27] Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Wahaibi, T., Hashim, M. A., *J. Mol. Liq.* **2013**, *178*, 137.

[28] Tsao, R., *Nutrients.* **2010**, *2*, 1231.

[29] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., *Am. J. Clin. Nutr*. **2004**, *79*, 727.

[30] Shahidi, F., Zhong, Y., *Eur. J. Lipid. Sci. Technol*. **2010**, *11*, 622.

[31] Khezeli, T., Daneshfar, A., Safraei, R., *Talanta.* **2016,** *150*, 577.

[32] Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H., *Molecules*. **2013**, *18*, 2328.

[33] Ruesgas-Ramon, M., Figureoa-Espinoza, M. C., Durand, E., *J. Agric. Food. Chem.* **2017**, *65*, 3591.

[34] Tang, B., Ho, K., *Monatsh. Chem*. **2013**, *144*, 1427.

[35] Gullon, B., Lu – Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G., *Trends Food Sci. Technol*. **2017**, *76*, 220.

[36] Bi, W., Tian, M., Row, K. H., *J. Chromatogr. A.* **2013**, *1285*, 836.

[37] Liu, Y., Garzon, J., Friesen, B., Zhang, Y., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., Pauli, G. F., *Fitoterapia*. **2016**, *112*, 30.

[38] Veronica Fischer, Properties and Application of Deep Eutectic Solvents and Low-Melting Mixtures, Dissertation, **2015**.

[39] Gorke, J. T., Srienc, F., Kazlauskas, R. J., *Chem. Commun.* **2008**, 1235.

[40] Jhong, H. R., Shan-Hill Wog, D., Wan, C. C., Wang Y. Y., Wei, T. C., *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 209.