

Valorizacija otpadne kore dunje primjenom prirodnih eutektskih otapala

Balaž, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:474522>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Lea Balaž

**Valorizacija otpadne kore dunje primjenom prirodnih eutektičkih
otapala**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, studeni 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2023./2024. održanoj 28. svibnja 2024.

Mentor: doc. dr. sc. Ivana Tomac

Komentor: doc.dr. sc. Valentina Bušić

Valorizacija otpadne kore dunje primjenom prirodnih eutektičkih otapala

Lea Balaž, 0236219607

Sažetak: Valorizacija otpada nastalog preradom voća i povrća predstavlja održiv način dobivanja proizvoda dodane vrijednosti. Ovaj rad uključuje valorizaciju otpadne kore dunje (*Cydonia oblonga*). Kako bi ekstrakcija bioaktivnih spojeva bila ekološki prihvatljiva, uporabljena su zelena otapala poput prirodnih eutektičkih otapala. U ovom je radu ispitana mogućnost primjene pet prirodnih eutektičkih otapala s udjelima vode od 40 % i 80 % (v/v) u ekstrakciji otpadne kore dunje. Rezultati su uspoređeni s konvencionalnim načinom ekstrakcije u zakiseljenom etanolu. Kako je literaturno dokazano da je kora dunje bogata enzimom acetilesteraza, koji posjeduje hidrolitičku aktivnost, ispitana je mogućnost hidrolize acetilsalicilne kiseline u prisutnosti kore dunje u vodi kao zelenom otapalu. Elektrokemijskom tehnikom diferencijalne pulsne voltametrije određen je ukupan sadržaj polifenola u ekstraktu dunje. Ekstrakt je obogaćen određenom koncentracijom jednih od najzastupljenijih polifenolnih spojeva u dunji u svrhu identifikacije i kvantifikacije polifenola u realnom uzorku. Korištena je ugljikova elektroda s nanosom ugljikovih nanočestica kao radna elektroda, ugljik kao pomoćna elektroda i srebro/srebro klorid kao referentna elektroda.

Ključne riječi: ekstrakt kore dunje, eutektička otapala, diferencijalna pulsna voltametrija, hidroliza acetilsalicilne kiseline

Rad sadrži: 35 stranica
21 slika
2 tablica
0 priloga
46 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|-----------------------------------------------|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Ivana Tomac</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Valentina Bušić</i> | član-komentor |
| 4. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 27. studenoga 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods
FranjeKuhača18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on May 28, 2024.

Mentor: *Ivana Tomac*, PhD, assistant prof.
Valentina Bušić, PhD, assistant prof.

Valorisation of waste quince peel using natural eutectic solvents

Lea Balaž, 0236219607

Summary:

The valorization of waste generated from processing fruits and vegetables represents a sustainable approach to producing value-added products. This study focuses on valorizing quince (*Cydonia oblonga*) waste bark. To ensure environmentally friendly extraction of bioactive compounds, green solvents such as natural eutectic solvents were employed. Specifically, the study examined the use of five natural eutectic solvents with water contents of 40 % and 80 % (v/v) for extracting compounds from quince bark. The results were compared to those obtained using a conventional extraction method involving acidified ethanol. Given that literature indicates quince bark is rich in the enzyme acetylcysteine, known for its hydrolytic activity, this study also explored the hydrolysis of acetylsalicylic acid in the presence of quince bark using water as a green solvent. The total polyphenol content in the quince extract was measured using differential pulse voltammetry, an electrochemical technique. This extract was analyzed to identify and quantify one of the most abundant polyphenolic compounds in quince. For the electrochemical measurements, a carbon electrode coated with carbon nanoparticles served as the working electrode, with carbon as the auxiliary electrode and silver/silver chloride as the reference electrode.

Key words: quince bark extract, eutectic solvents, differential pulse voltammetry, hydrolysis of acetylsalicylic acid

Thesis contains: 35 pages
21 figures
2 tables
0 supplements
46 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---------------------------------------------------|---------------|
| 1. <i>Dajana Gašo-Sokač</i> , PhD, full. prof. | chair person |
| 2. <i>Ivana Tomac</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Valentina Bušić</i> , PhD, assistant prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, full prof. | stand-in |

Defense date: November, 27, 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, FranjeKuhača18, Osijek.

DIPLOMSKI RAD JE OBRANJEN DANA

27. 11. 2024.

TE OCJENJEN USPJEHOM

izvršnim (5)

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač predsjednik Gašo-Sokač
2. doc. dr. sc. Ivana Tomac član Tomac
3. doc. dr. sc. Valentina Bušić član Valentina Bušić

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. DUNJA.....	4
2.2. „ZELENA“ KEMIJA	7
2.3. PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA	8
2.4. HIDROLIZA ACETILSALICILNE KISELINE	10
2.5. HIDROLIZA ESTERA POMOĆU HIDROLITIČKIH ENZIMA IZ PRIRODNOG MATERIJLA ..	10
2.6. NUSPROIZVODI PRERADE DUNJE KAO VRIJEDAN IZVOR FITOKEMIKALIJA	11
2.7. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK.....	14
3.2. MATERIJALI I METODE.....	14
3.2.1. <i>Kemikalije i priprema otopina.....</i>	<i>14</i>
3.2.2. <i>Priprava prirodnih eutektičkih otapala</i>	<i>14</i>
3.2.3. <i>Priprava biljnog materijala ekstrakta kore dunje</i>	<i>16</i>
3.2.4. <i>Ekstrakcija kore dunje primjenom prirodnih eutektičkih otapala</i>	<i>16</i>
3.2.5. <i>Hidroliza acetilsalicilne kiseline</i>	<i>17</i>
3.2.6. <i>Diferencijalna pulsna voltometrija</i>	<i>19</i>
4. REZULTATI.....	21
4.1. ELEKTROKEMIJSKA IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA POLIFENOLA IZ EKSTRAKATA KORE DUNJE PRIMJENOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE METODOM STANDARDNE ADICIJE	22
5. RASPRAVA	25
5.1. EKSTRAKCIJA POLIFENOLNIH SPOJEVA IZ KORE NARANČE POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA	26
5.2. HIDROLIZA ACETILSALICILNE KISELINE HIDROLITIČKIM ENZIMIMA IZ KORE DUNJE	27
5.3. ELEKTROKEMIJSKA IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA POLIFENOLA IZ EKSTRAKATA KORE DUNJE PRIMJENOM DIFERENCIJALNE PULSNE VOLTAMETRIJE	28
6. ZAKLJUČCI.....	30
7. LITERATURA.....	32

1. UVOD

Velika problematika današnjeg društva leži u neodgovarajućem gospodarenju otpadom, u prvom se redu misli na učinkovitiju i djelotvorniju politiku rukovođenja otpadom dobivenim od hrane jer se velike količine hrane, čak trećina sveukupne godišnje proizvodnje baca bez mogućnosti sekundarnog iskorištavanja (Soomro i sur., 2021). Iako otpad koji je dobiven od hrane nikada neće nestati, može se pretvoriti u korisne i iskoristive oblike energije, ali i dugoročno utjecati na smanjenje količine otpada i zabrinjavajuće ekonomske i socioekonomske posljedice na svjetskoj razini (Parfitt i sur., 2010). Neke od mogućnosti zbrinjavanja otpada dobivenog od prerade hrane su: kompostiranje, sprječavanje odlaganja i stvaranja otpada, spaljivanje i anaerobna digestija (Kibler i sur., 2018).

Pod pojmom valorizacije (eng. *upcycling*) misli se na ponovno uvođenje prehrambeno-poljoprivrednog nusprodukta u ciklus proizvodnje i potrošnje. Riječ je o velikom izazovu usredotočenom na djelotvornijem upotrebljavanju bioresursa, ali i smanjenju dobivenog biootpada (Othman i sur., 2022).

Široko primjenjivano voće kod izrade slatkiša i marmelada, kod prerade dunje kao nusprodukt najviše se spominje njezina kora (Othman i sur., 2022). Kada je riječ o bioaktivnim spojevima, veoma su zastupljene fenolne kiseline, flavonoidi, vitamini, polifenolni spojevi i minerali (Bystrická i sur., 2017). Kod ploda dunje najviše su zastupljeni fruktoza, jabučna kiselina, kalij i vlakna, a od fenolnih spojeva najviše se spominje flavan-3-ol (Othman i sur., 2022).

Obzirom na veliki izvor antioksidativnog djelovanja, količine ukupnih polifenola i askorbinske kiseline, kora dunje je korištena kao sirovina za izradu ovog diplomskog rada (Bystrická i sur., 2017). Umjesto toksičnih, lako hlapivih i zapaljivih organskih otapala, u istraživanju su korištena tzv. „zelena“ otapala zbog povoljnih svojstava kao što su niska cijena, manja toksičnost te mogućnost otapanja organskih spojeva, u ovom slučaju polifenolnih spojeva što je bio i glavni cilj provedenog istraživanja. Zelena otapala koja su korištena su prirodna eutektična otapala. Ona predstavljaju smjesu donora i akceptora vodikove veze u točno određenom molarnom omjeru. Fizikalna svojstva eutektičkih otapala su: niska hlapivost i niska temperatura tališta, visoka površinska stabilnost i viskoznost i slično (Shabani i sur., 2020).

Kao elektrokemijska metoda od izbora odabrana je diferencijalna pulsna voltometrija, metoda koja ima visoku razinu osjetljivosti, a najčešće se primjenjuje za kvantifikaciju sadržaja neke elektroaktivne tvari u uzorcima (Piljac i sur., 2010).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DUNJA

Porijeklom iz Male Azije, dunja (*Cydonia oblonga* Mill.) je voće zlatnožute boje s prisutnim dlačicama na površini kore, kruškolikog ili okruglog oblika koja raste kao manje stablo ili pak kao grm (Al-Snafi, 2016, Hanan i sur., 2020). Plodovi dunje (**Slika 1**) se ne konzumiraju u svježem obliku zbog tvrdog mesa, trpkosti i kvarljivosti. Koristi se za preradu u različite proizvode, npr. džemove, žele, pudinge, kolače, marmelade, bombone i likere. Sadrži nizak postotak masti i predstavlja glavni izvor šećera, organskih kiselina, minerala i vlakana. Može narasti i do 4 metara širine i 8 metara visine, a uzgaja se na područjima viših temperatura te pripada porodici *Rosaceae*. Dunja je prepoznatljiva po bijelim ili ružičastim cvjetovima, eliptičnim listovima promjera 5 cm i plodovima oporog okusa i karakterističnog mirisa (Al-Snafi, 2016, Hanan i sur., 2020, Herrera-Rocha i sur., 2022, Othman i sur., 2022).



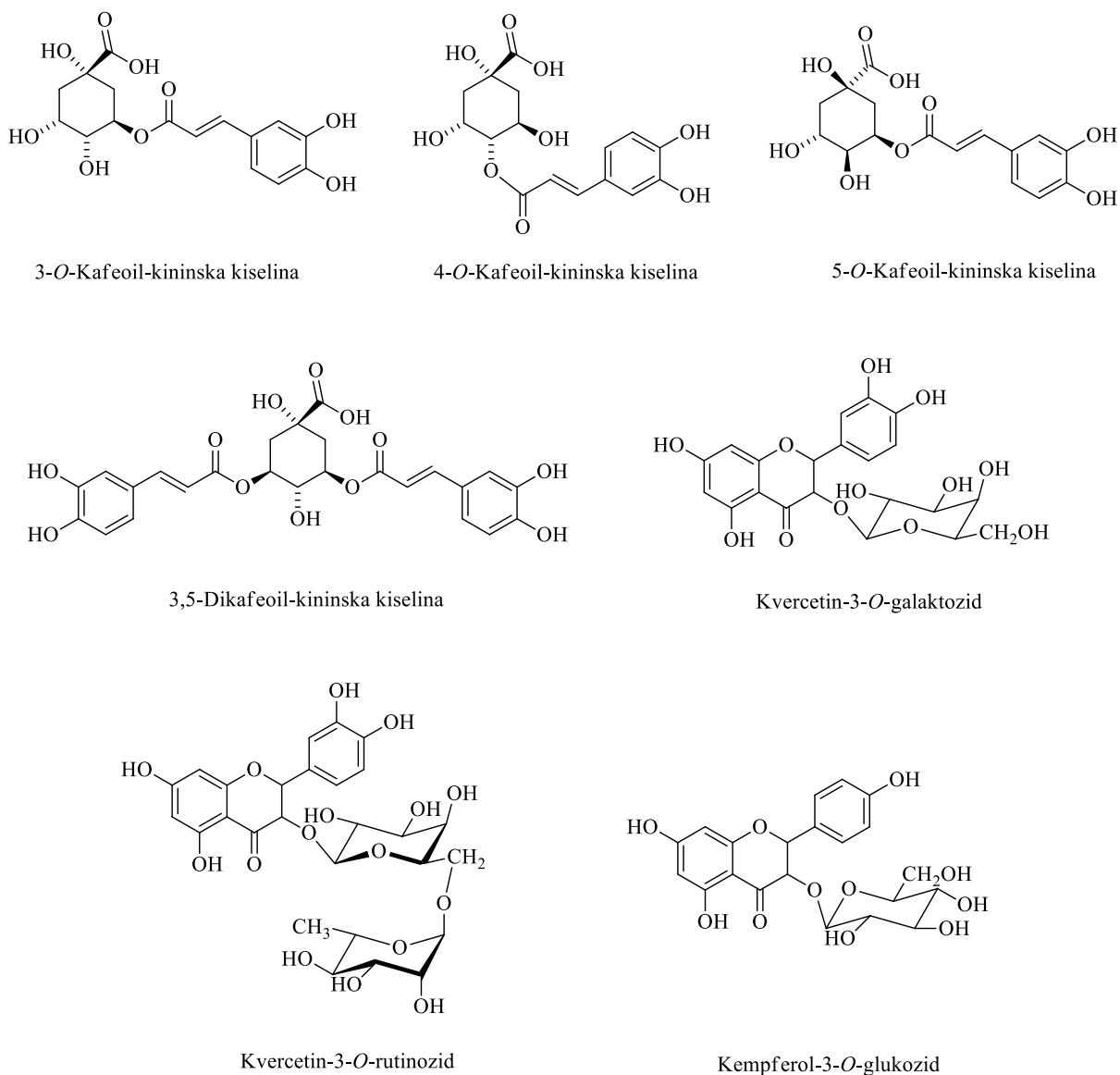
Slika 1 Plod dunje (WEB 1)

Važno je spomenuti i sastav dunje kako bi se bolje razumjela njezina primjena u svakodnevnoj uporabi, ali i tijekom industrijske prerade. Kada je riječ o mineralnim elementima, u kori i pulpi dunje prevladava kalij, u nešto manjim količinama nalaze se i magnezij i fosfor, a najmanje ima natrija. U sastavu kore dunje prevladaju tri slobodna šećera: fruktoza, glukoza i saharoza, a kod pulpe dunje umjesto saharoze nalazi se sorbitol. Identificirane su i organske kiseline, kod kore dunje to su: oksalna, kininska i jabučna kiselina, a u soku pulpe dunje prevladavaju jabučna i vinska kiselina, dok je u oba dijela dunjina ploda utvrđena prisutnost limunske, askorbinske i sličnih kiselina u nešto manjim količinama. Identificiran je i sastav 21 masne kiseline koji se nalazi u kori dunje gdje su najprisutnije palmitinska i stearinska kiselina, a u pulpi prevladaju oleinska i linoleinska kiselina (Othman i sur., 2022).

Među najzastupljenijim spojevima nalazese polifenoli koji su svrstani kao sekundarni metaboliti ili kao fitokemikalije. Kod flavonoida najprisutniji su izoflavoni, flavanoli i glikozidi flavonoida i drugi. Od fenolnih spojeva najviše ima kumarinske kiseline, kafeinske kiseline i njihovih derivata. U nešto manjoj količini nalaze se epikatehin i katehin, dok su u većoj koncentraciji derivati kempferola i kvercetina, esteri *p*-kumarinske i kafeinske kiseline (hidroksicimetne kiseline) (Ňorbová i sur., 2024).

Oliveira i sur. (2007), identificirali su navedene polifenolne spojeve u uzorku dunje: (1) 3-*O*-kafeoil-kininsku kiselinu; (2) 4-*O*-kafeoil-kininsku kiselinu; (3) 5-*O*-kafeoil-kininsku kiselinu; (4) 3,5-dikafeoil-kininsku kiselinu; (5) kvercetin-3-*O*-galaktozid; (6) kvercetin-3-*O*-rutinozid; (7) kempferol-3-*O*-glukozid; (8) kempferol-3-*O*-glikozid; (9) kempferol-3-*O*-rutinozid (**Slika 2**).

Neki od navedenih polifenolnih spojeva su glavni supstrati polifenol oksidaze zbog čega dunja posjeduje veliku sklonost ka enzimskom posmeđivanju. Osim što su pronađene niske količine kvercetina i katehina, prevladavajući spojevi su rutin i epigalokatehin. Uz sve navedene spojeve, bitno je spomenuti i vicenin, stelarín, lucenin, i astragalin (Ňorbová i sur., 2024).



Slika 2 Polifenolni profil dunje (Oliveira i sur., 2007)

Kod dunje, potrebno je spomenuti i činjenicu da obiluje vitaminima, u najvećoj mjeri sadrži askorbinsku kiselinu, ali i vitamine A, K i E, riboflavin, tiamin i druge vitamine u nešto manjim količinama (Al-Snafi, 2016, Ňorbová i sur., 2024). Mikronutrijent vitamin C, dvostruko je veći kod dunja nego kod jabuka, a trostruko veći u odnosu na kruške i važan je dio metabolizma većine živih bića jer ima važnu ulogu kao kofaktor i antioksidans (Ňorbová i sur., 2024).

2.2. „ZELENA“ KEMIJA

Definirana prema Američkoj agenciji za zaštitu okoliša, „zelena“ kemija jest kemija koja se bavi kreiranjem procesa i kemijskih produkata koji nisu opasni ni za okoliš ni za ljudsko zdravlje te tako onemogućuju potencijalno onečišćenje. Kada je riječ o ciljevima u svrhu ekonomskog dobitka i zaštite okoliša, oni se postižu putem superiornih pravaca, npr. alternativni reakcijski uvjeti i mediji, nove fotokatalitičke reakcije, korištenje nekonvencionalnih obnovljivih izvora sirovina, biokataliza i kataliza koja se vodi kao temelj „zelene“ kemije. Novim ekološkim pogledom na svijet dolazi do promjene stare prakse koja počinje s proizvodnjom pri čemu se sprječavaju onečišćenja, a čišćenje dolazi tek na kraju proizvodnje. Osnova „zelene“ kemija su dvanaest načela putem kojih dolazi do smanjenja ili potpunog uklanjanja proizvoda ili tvari opasnih za okoliš i za ljudsko zdravlje, a koja bi trebala dovesti do dugoročne održivosti (Anastas i sur., 2007, Jukić i sur., 2005).

„Zelena“ kemija i njezinih dvanaest načela:

1. Bolje spriječiti stvaranje otpada, nego ga kasnije uništavati i zbrinjavati.
2. Sinteza bi se trebala kreirati tako da se svi korišteni materijali tijekom procesa ugrade u završni proizvod.
3. Koliko god je to moguće, sintetske metode bi se trebale kreirati s minimalnom ili nepostojećom opasnosti za okoliš, ali i za ljudsko zdravlje.
4. Veliki naglasak treba staviti i na kemijske proizvode u cilju zadržavanja njihove djelotvornosti i snižavanju toksičnosti.
5. Uporabu pomoćnih sredstava kao što su otapala i slično, treba izbjegavati tamo gdje je to moguće, a ako se koriste, učiniti ih što bezopasnijima.
6. Sintetske metode bi trebalo provoditi pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi zbog postizanja što bolje energetske učinkovitosti.
7. Ako je moguće s ekonomske i tehničke strane, treba rabiti obnovljiv izvor sirovina.
8. Zbog korištenja dodatnih reagenasa i stvaranja novog otpada, potrebno je smanjiti nepotrebne proizvodnje derivata.
9. Od stehiometrijskih reagenasa, prednost se daje selektivnijim katalitičkim reagensima.
10. Na samom kraju svoje uloge, kemijski proizvodi bi trebali biti dizajnirani da se ne razgrađuju do štetnih produkata tokom procesa razgradnje i da ne zaostaju u okolišu.

11. Neophodno je kreiranje, a potom i primjena analitičke metodologije sa svrhom kontroliranja, praćenja i sprječavanja potencijalnog zagađenja.
12. Koristiti tvari u kemijskom procesu koje imaju minimalnu vjerojatnost uzrokovanja različitih kemijskih nesreća (Warner i sur., 2004).

2.3. PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Svakodnevnim korištenjem otrovnih organskih otapala, u prvom redu acetona, metanola, heksana, benzena i drugih otapala, prehrambena i farmaceutska industrija kao i brojne druge industrije dovode do onečišćenja okoliša, ali i narušavanja zdravlja ljudi što postaje sve veći problem za današnje ekološki osviješteno društvo. Veliki postotak organskih otapala je korozivan, zapaljiv i toksičan zbog čega se javlja potreba za razvoj novih, neškodljivih i ekološki prihvatljivijih otapala, putem programa pod nazivom „zelena“ kemija. Kao najbolji izvor otapala zbog svoje nezapaljivosti, netoksičnosti i ekonomske isplativosti, voda se ističe kao najbolji izbor, međutim djelotvorna je samo u ekstrakciji hidrofilnih i polarnih bioaktivnih spojeva, ali ne i kod hidrofobnih i nepolarnih spojeva. Iako su niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*) prvi put spominjana 2000-ih godina, tek 20-ak godina kasnije postaju sve popularnija otapala zbog svoje niske cijene, biorazgradivosti, nezapaljivosti, mogućnosti dizajniranja za neke specifične svrhe, minimalne hlapivosti i niske toksičnosti. Pokazuju veliku razinu učinkovitosti kod elektrokemije, kemijske sinteze, katalize i biokatalize, analize, ekstrakcije i separacije prirodno bioaktivnih komponenata, biomedicine, proizvodnje biodizela, izrade nanomaterijala, biokemije (Paiva i sur., 2014, Radović i sur., 2021, Zainal-Abidin i sur., 2017, Zhuang i sur., 2017).

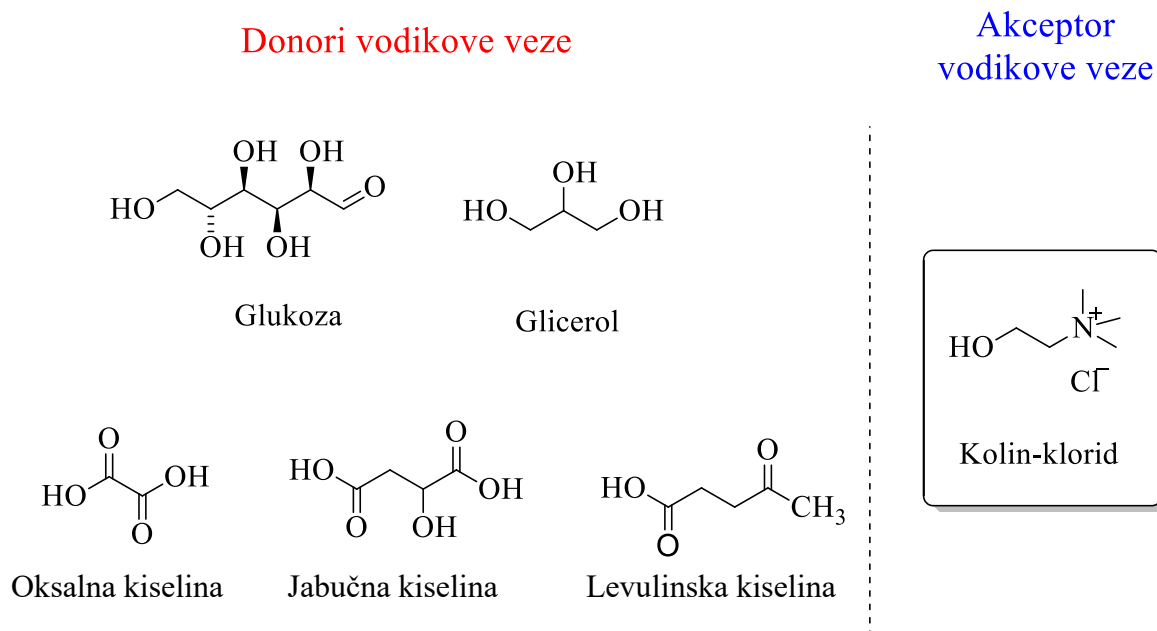
Eutektička otapala predstavljaju homogenu smjesu sastavljenu od dviju ili više komponenata, međusobno povezane jakim vodikom vezama koje bi pri točno definiranim uvjetima trebale stvoriti kapljevinu. U izračunatom molarnom omjeru, eutektička otapala posjeduju nižu temperaturu tališta u usporedbi s pojedinačnim komponentama smjese (Cvjetko Bubalo i sur., 2016, Radović i sur., 2021).

Kada je riječ o podjeli, grupirani su u četiri skupine:

1. tip I (kvaterna sol + halogenid metala, npr. Sn, Fe, Zn)
2. tip II (kvaterna sol + halogenid metala, npr. Co, Fe, Cr)
3. tip III (kvaterna sol + doner vodikove veze, npr. alkohol, kiselina, amid)

4. tip IV (halogenid metala + donor vodikove veze, npr. alkohol, amid) (Radović i sur., 2021).

Najčešće se koriste eutektična otapala tipa III jer im je temelj smjesa pristupačnih i jeftinijih spojeva: akceptora vodikove veze (netoksične kvaterne amonijeve soli, npr. kolin-klorid, betain, cinkov klorid, kolin-dihidrogen fosfat) i nenabijeni donor vodikove veze (šećer, npr. glukoza; amid, npr. urea; organska kiselina, npr. oksalna) (**Slika 3**) (Radović i sur., 2021). Upravo činjenica da eutektička otapala mogu biti akceptori ili donori kako bi stvorili intermolekularnu vodikovu vezu povećava se njihova mogućnost otapanja (Durad i sur., 2013). Bitno je spomenuti i njihov nedostatak, viskoznost, koja sputava učinkovitost procesa ekstrakcije otapala jer dolazi do usporavanja prijenosa neke mase što je veliki nedostatak ovih otapala u odnosu na tradicionalna otapala (Dai i sur., 2013b, Durand i sur., 2013). U ovom je istraživanju korišten kolin-klorid (ChCl) jer zadovoljava kriterije „zelene“ kemije, kao što su biorazgradivost, netoksičnost i niska cijena u sljedećim kombinacijama eutektičnih otapala: kolin-klorid : oksalna kiselina (ChCl : OxA), kolin-klorid : glukoza (ChCl : Glc), kolin-klorid : levulinska kiselina (ChCl : Lev), kolin-klorid : jabučna kiselina (ChCl : MA), kolin-klorid : glicerol (ChCl : Gol) i referentno otapalo - etanol : klorovodična kiselina (EtOH : HCl) (Hayyan i sur., 2012, Radović i sur., 2021).



Slika 3 Donori i akceptori vodikove veze u pripravljenim eutektičkim otapalima

2.4. HIDROLIZA ACETILSALICILNE KISELINE

Aspirin ili acetilsalicilna kiselina, svrstava se u analgetike prve generacije bez narkotičkih svojstava (Onah, 2004). Koristi se u službi analgetika za smanjenje vjerojatnosti dobivanja novog infarkta kao i smrtnosti, ali i u prevenciji različitih kardiovaskularnih bolesti s uporabom od oko 100 milijardi tableta na godinu (Zhou i sur., 2013). Posjeduje veliku paletu fizioloških i farmakoloških svojstava. Acetilsalicilna kiselina (ASA) svrstava se u skupinu estera koji su osjetljivi na katalitičku hidrolizu. Kiselo katalizirana hidroliza acetilsalicilne kiseline (ASA) proces je razgradnje ASA u prisutnosti sumporne kiseline, koja djeluje kao katalizator. Ova reakcija rezultira oslobađanjem salicilne kiseline i octene kiseline (Gorzynski Smith, 2011).

Reakcija hidrolize acetilsalicilne kiseline je reakcija prvog reda s konstantom brzine reakcije ($k = 0,0132$). Eksperimentalnim je podacima dobiveno da je reakcija hidrolize acetilsalicilne kiseline brža pri kiselom pH i na temperaturi od 60 °C. Na reakciju hidrolize pri pH 7 utječu temperatura i koncentracija acetilsalicilne kiseline (Ganea i sur., 2018).

2.5. HIDROLIZA ESTERA POMOĆU HIDROLITIČKIH ENZIMA IZ PRIRODNOG MATERIJA

Hidroliza organskih estera pomoću hidrolitičkih enzima iz voća, povrća i nusproizvoda prehrambene industrije predstavlja važan proces u biotehnologiji i prehrambenoj industriji. Ovi enzimi, poznati kao esteraze ili lipaze, igraju ključnu ulogu u razgradnji estera u jednostavnije molekule, poput kiselina i alkohola, što može imati brojne primjene. Mnogi plodovi i povrća sadrže prirodne enzime koji mogu potaknuti hidrolizu. Na primjer: ananas sadrži bromelain (Ketnawa i sur., 2011), koji može razgraditi estere i proteine, mango sadrži enzime poput amilaze i proteaze, koji mogu djelovati na estere, papaja sadrži papain (Khatun i sur., 2023), koji također može katalizirati hidrolizu. Nusproizvodi poput kore, sjemenki i pulpe voća često sadrže visoke koncentracije enzima. Ovi nusproizvodi mogu se koristiti kao održivi izvor enzima za industrijske procese. Na primjer: kora citrusa sadrži enzime koji mogu razgraditi estere, što ih čini korisnima za proizvodnju prirodnih aroma, sjemenke grožđa su bogate enzimima koji mogu pomoći u razgradnji spojeva u vinskim nusproizvodima (da Silva i sur., 2016).

U posljednje vrijeme se sve više istražuju alternativne mogućnosti za hidrolizu estera. Jedno takvo istraživanje, Chiplunkar i sur. (2018), uključivalo je ultrazvučno potpomognutu hidrolizu

metilnog estera aspirina korištenjem imobilizirane *Candida antarctica* lipaze B (CALB) (1 %) u prisutnosti otapala poput trioleina, kloroforma (CHCl₃) i diklorometana (DCM). Istražen je također učinak ultrazvuka i uloga vode na stope konverzije. Na temelju dobivenih podataka optimizirana je metoda za hidrolizu ispitnog estera koja je uključivala: 1 % CALB, 5 mL trioleina, 1 % H₂O (v/v) naizmjenično 100 okreta u minuti uz ultrazvuk snage 53 kHz, 100 W, 35 °C, 12 h.

2.6. NUSPROIZVODI PRERADE DUNJE KAO VRIJEDAN IZVOR FITOKEMIKALIJA

Kada je riječ o pojmu nusproizvoda, misli se na sekundarne proizvode koji su dobiveni iz glavnog procesa proizvodnje te izlaze u manjoj količini u usporedbi s količinom primarnog proizvoda. To mogu biti proizvodi koji bi se mogli iskoristiti na tržištu kao već gotovi proizvodi, sirovine koje bi bile korištene u proizvodnji novih proizvoda u neprehrambenoj ili pak prehrambenoj industriji, a može biti i otpad koji sadrži veoma malu vrijednost za daljnju uporabu (Jašić i sur., 2021).

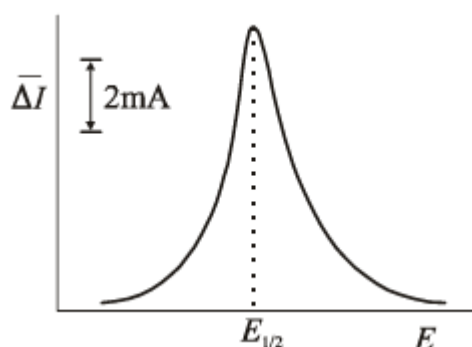
Velike količine nusproizvoda i otpadaka dobivenih u prehrambenoj industriji, npr. ljuske, sjemenke, komina, kore i lišće, bogati su antioksidansima, vlaknima, enzimima i bioaktivnim spojevima (Silva i sur., 2023). Kada je riječ o nusproizvodima dunje, jedan od najvažnijih jest kora koja bi se mogla prerađivati kao potencijalni izvor funkcionalnih i hranjivih spojeva (Othman i sur., 2022).

U tradicionalnoj medicini, plodovi su bili upotrebljavani kao antiseptik, adstringent, kod zacjeljivanja kože, krvarenja iz rana i maternice, za liječenje dizenterije i dijareje, poremećaja jetre. Korištene su bile i sjemenke i lišće za liječenje upale grla, zatvora, bronhitisa, crijevnih kolika i slično (Al-Snafi, 2016).

Kao mogući izvor fitokemikalija dobar izvor jest plod dunje jer sadrži veliki postotak polifenola koji djeluju kao antioksidansi, koriste se u liječenju široke palete bolesti kao što su karcinomi i različite upale, smanjene inzulinske rezistencije i krvnog tlaka, a postoji i potencijal za poboljšanje sastava crijevne mikroflore (Ňorbová i sur., 2024).

2.7. DIFERENCIJALNA PULSNA VOLTAMETRIJA

Pojam diferencijalno pulsne voltametrije, smatra se kao jedna od najučinkovitijih pulsni metoda za određivanje vrlo niskih koncentracija anorganskih i organskih analita, te se ubraja u elektrokemijske tehnike i primjenjuje u analitičke svrhe (Piljac, 2010, Wang, 2000). Diferencijalna pulsna voltametrija definira se kao voltametrijska metoda kod koje se na linearno rastući potencijal susljedno nadograđuju kvadratni impulsi potencijala s odabranom amplitudom (WEB 2). Primjenjuju se mali pravokutni naponski impuls s amplitudom 10-100 mV, najčešće 50 mV (Piljac, 2010). Odziv na signal pobude mjeri se neposredno prije nego što se primijeni slijedeći puls i na kraju pulsa, a razlika tih vrijednosti je struja te se prikazuje kao funkcija potencijala (**Slika 4**). Uz idealne uvjete i točno određeni elektrolit, granica osjetljivosti iznosi 10^{-7} - 10^{-8} mol dm⁻³. Ova elektrokemijska tehnika primjenjuje se za kvantitativno određivanje raznih organskih i anorganskih analita, kinetike i mehanizma elektrokemijskih procesa i istraživanje kompleksnih reakcija (Percevault i sur., 2021, Piljac, 2010).



Slika 4 Primjer diferencijalno pulsne voltamograma (Piljac, 2010)

Kod određivanja ukupnog sadržaja polifenola, pokazala se kao najbolja alternativa uz kromatografske i spektrofotometrijske analize jer osigurava točnost, preciznost, osjetljivost i selektivnost te jednostavnost određivanja komponenti bez korištenja toksičnih reagensa te je upravo zbog svojih prednosti odabrana kao elektrokemijska tehnika za analizu polifenolnih spojeva u ovom diplomskom radu. Niski iznos elektrodnog potencijala govori da ispitani analit posjeduje veći antioksidacijski utjecaj (Percevault i sur., 2021).

Mogući nedostatak primjene ove elektrokemijske tehnike je ponekad duži period mjerenja što može utjecati na tijek složenijih istraživanja i ujedno ometati moguće razlikovanje odgovarajućih signala strujnog odziva (Piljac, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadaci ovog diplomskog rada su:

- Pripraviti različita eutektička otapala za ekstrakciju aktivnih sastojaka iz kore dunje.
- Ekstrahirati aktivne sastojke kore dunje.
- Optimizirati uvjete za najučinkovitiju metodu ekstrakcije.
- Izvesti biološku hidrolizu acetilsalicilne kiseline pomoću kore dunje u vodi kao zelenom otapalu.
- Provesti identifikaciju i kvantifikaciju ukupnih polifenola u ekstraktima kore dunje primjenom diferencijalne pulsne voltametrije.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Kemikalije i priprema otopina

Kemikalije:

- Kolin-klorid (ChCl) (99 %), ArcosOrganics
- Oksalna kiselina (OxA) (98 %), ArcosOrganics
- Glukoza (Glc) p.a., Kemika
- Levulinska kiselina (Lev) (98 %), ArcosOrganics
- Jabučna kiselina (MA) (98 %), Sigma-Aldrich
- Glicerol (Gol) p.a., Gram-Mol
- Demineralizirana voda
- Etilni alkohol (EtOH) (96 %), LabExpert
- Etanol (EtOH) p.a., Gram-Mol
- Etanol (EtOH) (75 %), Gram-Mol
- Klorovodična kiselina (HCl) (0,1 %), Gram-Mol
- Kafeinska kiselina, Sigma-Aldrich.

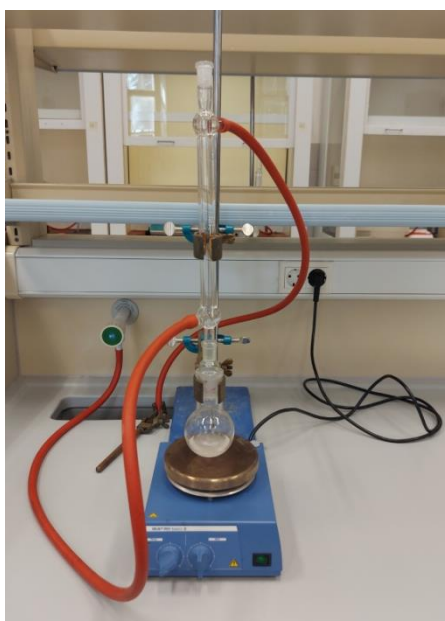
3.2.2. Priprava prirodnih eutektičkih otapala

Tijekom provedbe diplomskog rada, pripravljeno je pet prirodnih eutektičkih otapala: kolin-klorid : oksalna kiselina (ChCl : OxA), kolin-klorid : glukoza (ChCl : Glc), kolin-klorid :

levulinska kiselina (ChCl : Lev), kolin-klorid : jabučna kiselina (ChCl : MA), kolin-klorid : glicerol (ChCl : Gol) s dva različita udjela vode: 40 i 80 % (v/v) (**Slika 5, Tablica 1**). Postupak je uključivao miješanje pri temperaturi od 50 °C 2 sata u tikvici s okruglim dnom u koju su dodane preračunate komponente prema određenim molarnim omjerima (**Tablica 1**) sve do nastanka stabilne homogene kapljevine. Zatim je u tikvicu dodan određeni volumen vode kako bi se dobila prirodna eutektička otapala s 40 % i 80 % vode (v/v).

Tablica 1 Molarni omjeri donora i akceptora vodikove veze, udio vode i pH vrijednost pripremljenih eutektika

DES	Molarni omjer	Kolin-klorid/g	HBD/g	Udio vode /% (v/v)	pH
ChCl : OxA	1 : 1	5	3,21	40(1)/80(2)	(1)4,52/(2)4,06
ChCl : Glc	1 : 1	5	6,45	40(1)/80(2)	(1)3,70/(2)6,48
ChCl : Lev	1 : 2	5	7,3	40(1)/80(2)	(1)3,40/(2)3,30
ChCl : MA	1 : 1	3	8,26	40(1)/80(2)	(1)1,18/(2)1,77
ChCl : Gol	1 : 2	5	4,68	40(1)/80(2)	(1)5,45/(2)5,46
75 % EtOH 0,1 % HCl (referentni uzorak)					



Slika 5 Aparatura za pripravu eutektičkih otapala

3.2.3. Priprava biljnog materijala ekstrakta kore dunje

Kao biološki materijal korištena je kora dunje. Dunja je kupljena na lokalnoj tržnici. Kora dunje je oprana s deterdžentom, sterilizirana EtOH (96 %-tni) te isprana demineraliziranom vodom zbog eliminiranja svih mogućih zagađenja koja bi se mogla naći na površini. Kora je odvojena od ploda i narezana na male komadiće, približne veličine $5 \times 5 \times 2$ mm te izvagana za daljnja istraživanja.

3.2.4. Ekstrakcija kore dunje primjenom prirodnih eutektičkih otapala

Kora dunje (2,5 g) (Slika 6) prenesena je u tarionik s tučkom gdje je dodano automatskom pipetom 10 mL prethodno pripremljenih eutektičkih otapala.



Slika 6 Sterilizirana i usitnjena kora dunje

Postupak homogeniziranja izveden je ručno u tarioniku s tučkom 10-ak minuta (Slika 7). Referentni je uzorak ekstrahiran s dvokomponentnim otapalom (75 % EtOH i 0,1 % HCl).



Slika 7 Postupak ekstrakcije kore dunje u tarioniku s tučkom

Ovim se postupkom dobije ekstrakt koji je potom filtriran (**Slika 8**). Filtrati ekstrakata su čuvani na niskim temperaturama do postupka identifikacije i kvantifikacije ukupnih polifenola elektrokemijskom metodom.



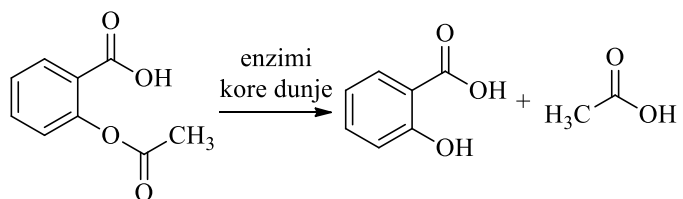
Slika 8 Postupak filtracije ekstrakta biljnog materijala u eutektičkom otapalu

3.2.5. Hidroliza acetilsalicilne kiseline

Primjenom hidrolitičkih enzima iz kore dunje u vodi, provedena je hidroliza acetilsalicilne kiseline. Kora dunje (4 g) je izvagana i prenesena u tikvicu s okruglim dnom u koju je dodano 0,2 g (1 mmol) acetilsalicilne kiseline i 10 ml H₂O. Hidroliza (**Slika 9**) se provodila miješanjem reakcijske smjese na magnetnoj mješalici. Tijek reakcije (**Slika 10**) praćen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala kloroform : metanol = 6 : 2. R_f vrijednost za salicilnu kiselinu u sustavu otapala kloroform : metanol 6:2 iznosi 0,9. Volumen vode uparen je na rotacijskom uparivaču na trećinu. Reakcijska je smjesa ostavljena u hladnjaku kako bi salicilna kiselina iskristalizirala. Kristali su sakupljeni filtracijom te osušeni u eksikatoru.



Slika 9 Aparatura za izvođenje hidrolize acetilsalicilne kiseline



Slika 10 Hidroliza acetilsalicilne kiseline hidrolitičkim enzimima kore dunje

Iskorištenje (η) se računa na sljedeći način:

$$\eta = \frac{m(\text{salicilne kiseline})}{m_T} \times 100 = \frac{0,137 \text{ g}}{0,153 \text{ g}} \times 100 = 89,5 \% \sim 90 \%$$

m masa salicilne kiseline /g

m_T teoretska masa produkta/g.

3.2.6. Diferencijalna pulsna voltometrija

Nakon filtriranja, bistar ekstrakt kore dunje spreman je za elektrokemijsko mjerenje koje se provodi primjenom elektrokemijske tehnike diferencijalne pulsne voltometrije. Diferencijalna pulsna voltometrija provedla se pomoću kompjutorski kontroliranog instrumenta potenciostat/galvanostat μ Autolab (Eco Chemie B. V., Utrecht, Nizozemska), koji je služio za provođenje mjerenja, prikupljanje i analizu elektrokemijskih podataka. Elektrokemijska mjerenja ekstrakata kore dunje provedena su na komercijalnoj jednokratnoj ugljikovoj elektrodi na čiju je površinu nanesen sloj karboksiliranih jednostjenčanih ugljikovih nanočestica, pomoćna elektroda je sloj ugljika i referenta elektroda kao i električni kontakt za sve tri elektrode sloj srebra (Metrohm DropSens, Španjolska). Na **Slici 11** prikazana je jednokratna elektroda za provedena elektrokemijska istraživanja u ovom diplomskom radu.



Slika 11 Elektroda za elektrokemijsko mjerenje

Uzorci ekstrakata kore dunje su elektrokemijski analizirani prema sljedećim parametrima: raspon potencijala od -0,2 V do 1,2 V, brzina polarizacije $0,005 \text{ V s}^{-1}$, korak potencijala 0,002 V i amplituda pulsa 0,05 V. Na površinu tro-elektrodnog sustava nanescena je kapljica ekstrakta kore dunje u odgovarajućem eutektičkom otapalu te je tako provedeno elektrokemijsko mjerenje i dobivena je slika provedenog mjerenja, tj. diferencijalno pulsni voltamogram iz kojeg su se dobiveni podaci karakteristični za odabranu tehniku (elektrodni potencijal, struja i slično), a prikazano je na **Slici 12**. Kao metoda kvantifikacije provedena je metoda standardne

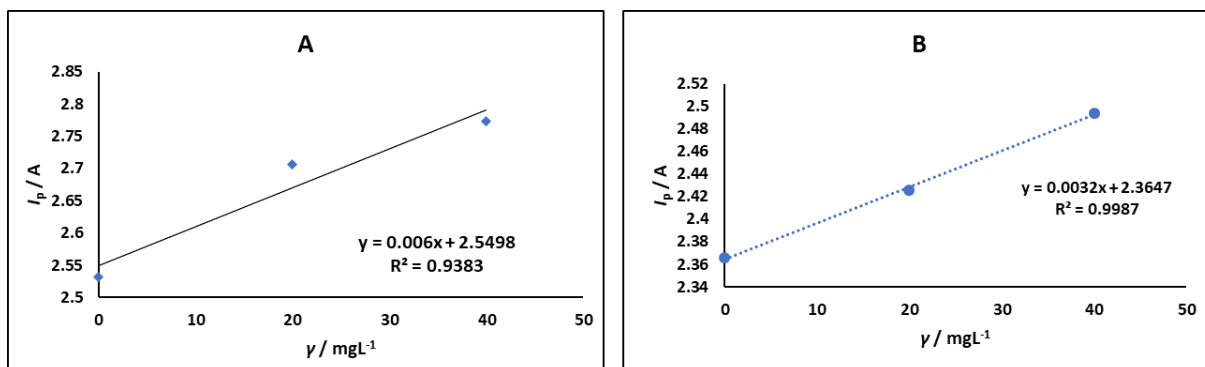
adicije, tj. obogaćivanje uzoraka poznatom koncentracijom kafeinske kiseline. Kafeinska kiselina odabrana je kao standard jer je u značajnoj koncentraciji prisutna u vočki dunji.



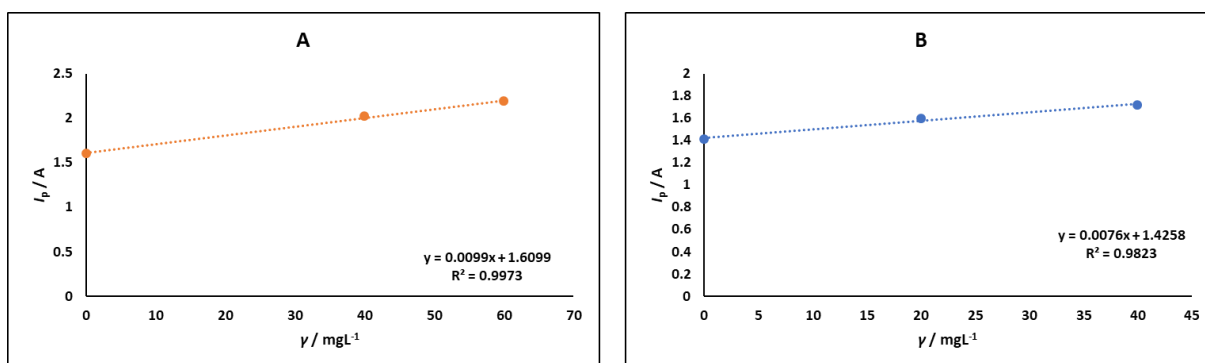
Slika 12 Kompjutorski kontroliran potencijostat/galvanostat

4. REZULTATI

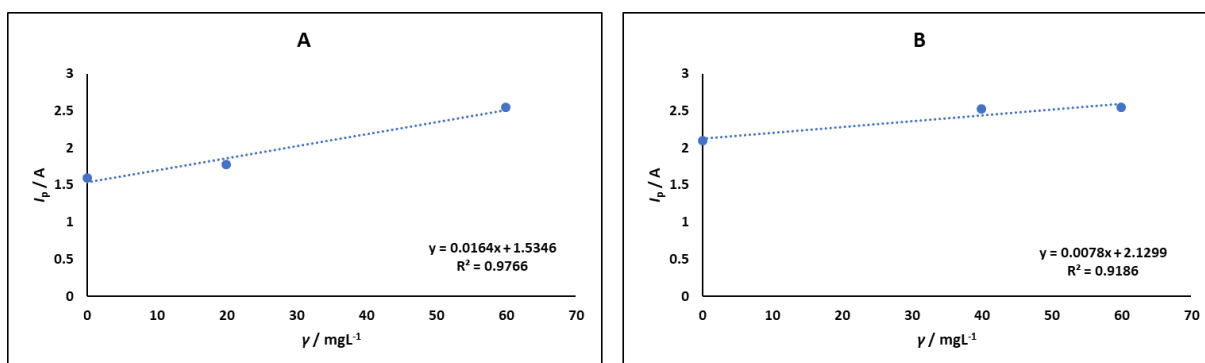
4.1. Elektrokemijska identifikacija i kvantifikacija polifenola iz ekstrakata kore dunje primjenom diferencijalne pulsne voltametrije metodom standardne adicije



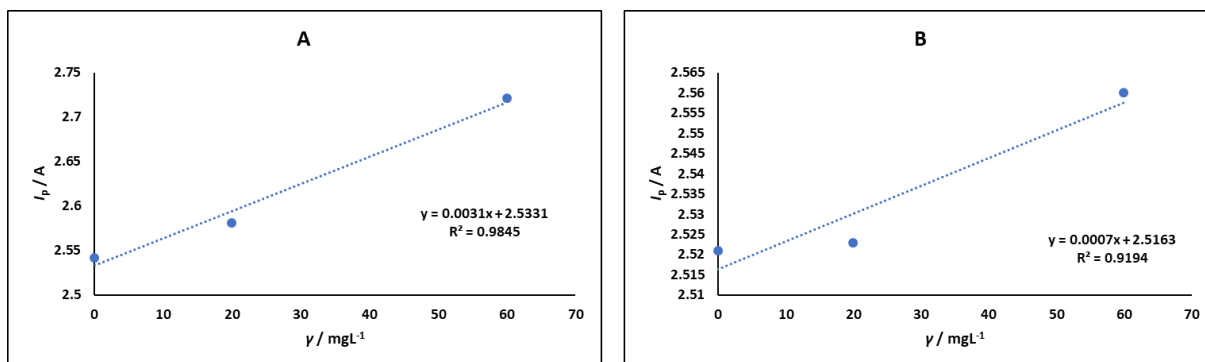
Slika 13 Graf ovisnosti anodne struje pika (I_p) o masenoj koncentraciji za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktu kore dunje u eutektičkom otapalu kolin-klorid : oksalna kiselina s udjelom vode A) 40 % i B) 80 % (v/v) primjenom metode standardne adicije



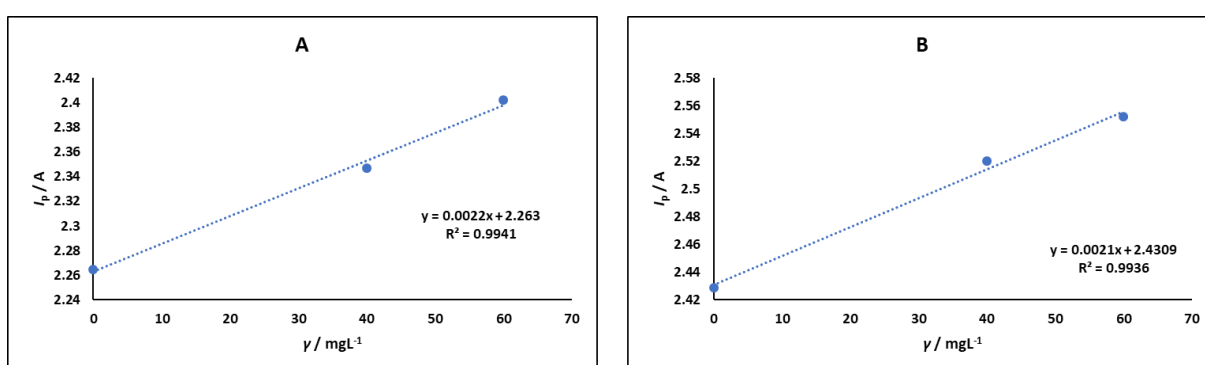
Slika 14 Graf ovisnosti anodne struje pika (I_p) o masenoj koncentraciji za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktu kore dunje u eutektičkom otapalu kolin-klorid : glukoza s udjelom vode A) 40 % i B) 80 % (v/v) primjenom metode standardne adicije



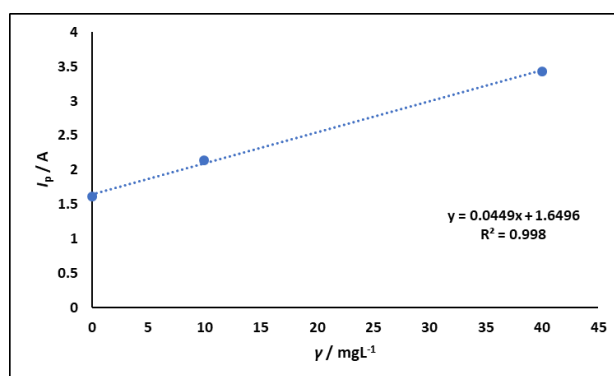
Slika 15 Graf ovisnosti anodne struje pika (I_p) o masenoj koncentraciji za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktu kore dunje u eutektičkom otapalu kolin-klorid : levulinska kiselina s udjelom voda A) 40 % i B) 80 % (v/v) primjenom metode standardne adicije



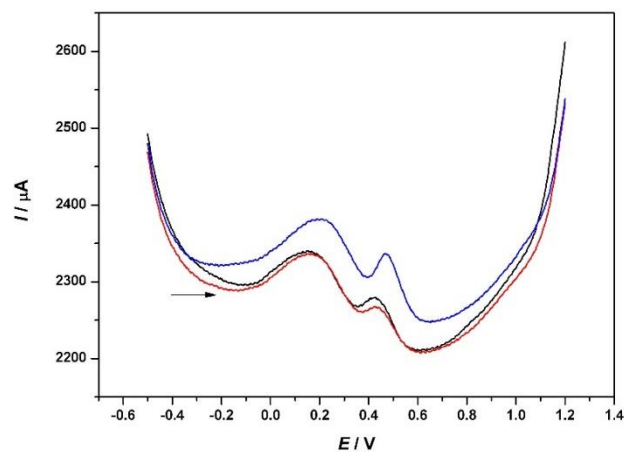
Slika 16 Graf ovisnosti anodne struje pika (I_p) o masenoj koncentraciji za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktu kore dunje u eutektičkom otapalu kolin-klorid : jabučna kiselina s udjelom vode A) 40 % i B) 80 % (v/v) primjenom metode standardne adicije



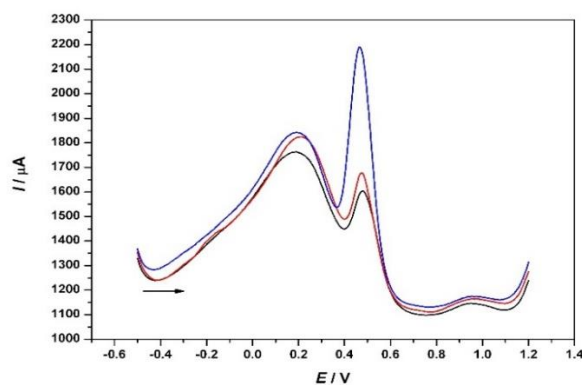
Slika 17 Graf ovisnosti anodne struje pika (I_p) o masenoj koncentraciji za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktu kore dunje u eutektičkom otapalu kolin-klorid : glicerol s udjelom vode A) 40 % i B) 80 % (v/v) primjenom metode standardne adicije



Slika 18 Graf ovisnosti anodne struje pika (I_p) o masenoj koncentraciji za određivanje sadržaja polifenola u ekstraktu kore dunje u referentnom otapalu EtOH : HCl u koncentraciji 75%/0,1 % primjenom metode standardne adicije



Slika 19 Diferencijalno pulsni voltamogrami odabranih ekstrakata kore u dunje u svrhu kvantifikacije polifenolnih spojeva



Slika 20 Diferencijalno pulsni voltamogrami odabranih ekstrakata kore u dunje u svrhu identifikacije prisustva polifenolnih spojeva

Tablica 2 Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima kore dunje

			pH	$\gamma / \text{mgL}^{-1*}$
RE	EtOH/HCl	75%/0,1%		36,74
1B	ChCl-OxA	80	4,06	738,97
2A	ChCl-Glc	40	3,7	162,62
3A	ChCl-Lev	40	3,4	93,57
4A	ChCl-MA	40	1,18	817,13
5A	ChCl-Gol	40	5,45	983,91

* prikazani su rezultati koji su se pokazali najbolji u ovom istraživanju

5. RASPRAVA

5.1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kore naranče pomoću eutektičkih otapala

Narančina kora, koja se često smatra poljoprivrednim otpadom, bogata je bioaktivnim spojevima poput flavonoida, eteričnih ulja i pektina, koji imaju značajan potencijal za različite primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Mojo i sur., 2024, Abdelazem i sur., 2021). Tradicionalne metode ekstrakcije ovih spojeva obično uključuju korištenje velikih količina hlapljivih organskih otapala (VOS, eng. *volatile organic substances*) i veliku potrošnju energije, što izaziva zabrinutost oko ekološke i ekonomske održivosti. Ekstrakcija vrijednih komponenti iz narančine kore pomoću VOS-a predstavlja nekoliko izazova. Ova otapala mogu biti otrovna, opasna i štetna za okoliš, što dovodi do regulatornih ograničenja i poticaja za održiviju praksu. Posljedično, istraživači sve više istražuju alternativne metode ekstrakcije koje koriste zelenija otapala, kao što su prirodna eutektička otapala (DES) (Ozturk i sur., 2018), koja nude održiviji i ekološki prihvatljiviji pristup valorizaciji otpadne narančine kore. Prirodna eutektička otapala mješavine su prirodnih spojeva koji tvore eutektičku smjesu, što rezultira nižom temperaturom tališta i vrelišta od njihovih pojedinačnih komponenti. Ta su otapala biorazgradiva, netoksična i mogu učinkovito otopiti širok raspon polarnih i nepolarnih spojeva, što ih čini idealnim kandidatima za ekstrakciju bioaktivnih tvari iz narančine kore. Studije su pokazale da DES mogu ekstrahirati eterična ulja i druge vrijedne fitokemikalije s većom učinkovitošću i manjom potrošnjom otapala u usporedbi s tradicionalnim organskim otapalima (Fan i Li, 2022). Sposobnost da DES-ovi povećavaju prinos ekstrakcije pripisuje se njihovim jedinstvenim svojstvima, kao što su povećana topljivost ciljnih spojeva i smanjena viskoznost, što olakšava bolju interakciju između otapala i čvrste matrice narančine kore.

U svrhu istraživanja u ovom diplomskom radu korištena je kora dunje kao sirovina u istraživanju. Kao zamjena za klasična organska otapala, korištena su „zelenaa“ niskotemperaturna eutektička otapala. U cilju pronalaska najučinkovitijeg eutektičkog otapala pripravljeno je pet različitih tipova eutektika uz referentni uzorak: kolin-klorid : oksalna kiselina, kolin-klorid : glukoza, kolin-klorid : levulinska kiselina, kolin-klorid : jabučna kiselina, kolin-klorid : glicerol te referentni uzorak etanol : klorovodična kiselina. Eutektička su otapala razrijeđena s određenim volumenima vode do volumnog udjela 40 i 80 % (v/v) (**Tablica 1**). Priprema otapala provodila se jednostavnim postupkom na način da su polazne sirovine pomiješane u određenom molarnom omjerima te zagrijavane uz miješanje na magnetskoj miješalici do nastanka homogene kapljevine. Iskorištenje ovog postupka je 100 %, što je značajna prednost kod pripreme prirodnih eutektičkih otapala budući da su pripravljena

prema principima zelene kemije bez nastalih nusprodukata. Pripremljenim je otapalima određena pH vrijednost prikazana u **Tablici 1**. Budući da su tri otapala bila bazirana na organskim kiselinama kao elektron donorima, pH vrijednosti otapala su bile kisele. Najnižu pH vrijednost pokazalo je eutektičko otapalo $\text{ChCl} : \text{MA}$ s udjelom vode od 40 % (v/v), a najvišu $\text{ChCl} : \text{Glc}$ s udjelom vode 80 % (v/v) u iznosu 6,48. Dokazano je kako su blago kisele pH vrijednosti otapala povoljan uvjet za provođenje različitih biokatalitičkih reakcija jer biljni enzimi mogu provoditi reakcije u blagim uvjetima (pH i temperature), s izvrsnom kemo-, regio- i stereoselektivnošću (Gašo-Sokači sur., 2014). Također, blago kiseli uvjeti povoljni su za izolaciju polifenola iz biljnog matriksa, što je također bio jedan od ciljeva ovoga diplomskog rada. Korištenjem pripremljenih eutektičnih otapala ekstrahirani su aktivni sastojci iz kore dunje. Ekstrakti su profiltrirani u cilju pripreme za elektrokemijske metode.

5.2. Hidroliza acetilsalicilne kiseline hidrolitičkim enzimima iz kore dunje

Hidroliza organskih estera u njihove odgovarajuće alkohole i kiseline je značajna reakcija u organskoj kemiji, s različitim primjenama u sintezi i biokatalizi. Hidrolitički enzimi, posebno oni dobiveni iz biljnih materijala, igraju ključnu ulogu u ovom procesu. Među njima, enzimi ekstrahirani iz narančine kore privukli su pozornost zbog svoje sposobnosti da selektivno hidroliziraju racemične smjese. Značajan primjer je hidroliza racemskog (*R,S*)-1-feniletil acetata, koja rezultira proizvodnjom enantiomerno čistog (*S*)- ili (*R*)-1-feniletanola (Panić i sur., 2021). Ovi enzimi, često klasificirani kao esteraze ili lipaze, djeluju u blagim uvjetima i pokazuju specifičnost prema određenim supstratima. Proces uključuje enzimsko cijepanje esterske veze, što olakšava pristup molekuli vode. Ova se hidroliza može dogoditi putem mehanizma u dva koraka, koji uključuje stvaranje kompleksa enzim-supstrat i naknadnu razgradnju kako bi se oslobodili alkohol i odgovarajuća kiselina. Značaj korištenja hidrolitičkih enzima iz biljnih izvora leži u njihovoj ekološkoj kompatibilnosti i potencijalu za održive prakse u kemijskoj proizvodnji. U usporedbi s tradicionalnim kemijskim metodama, enzimska hidroliza nudi prednosti kao što su smanjena potrošnja energije, manje nusproizvoda i poboljšanu selektivnost, što je čini preferiranim izborom u sintezi finih kemikalija, lijekova i biogoriva. Istraživanja nastavljaju optimizirati ekstrakciju i primjenu ovih enzima, istražujući njihov potencijal u različitim industrijskim okruženjima. Iskorištavanjem prirodnih katalitičkih sposobnosti enzima biljnog podrijetla, znanstvenici nastoje poboljšati učinkovitost i održivost u organskoj sintezi, naglašavajući važnost prirodnih resursa u modernoj kemiji.

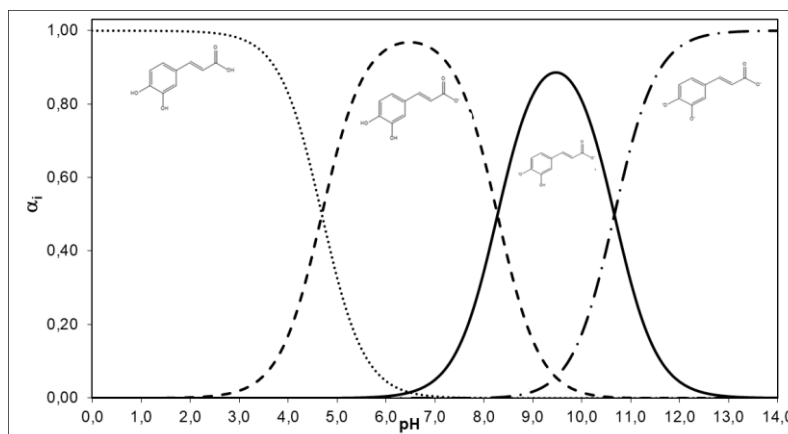
Stoga je jedna faza diplomskog rada uključivala pokušaj izvođenja postupka hidrolize acetilsalicilne kiseline hidrolitičkim enzimima iz kore dunje u blagim reakcijskim uvjetima u vodi kao „zelenom“ otapalu. Enzimi kore dunje su uspješno hidrolizirali acetilsalicilnu kiselinu do salicilne kiseline uz prinos od 90%.

5.3. Elektrokemijska identifikacija i kvantifikacija polifenola iz ekstrakata kore dunje primjenom diferencijalne pulsne voltametrije

Također je primijenjena i elektrokemijska tehnika, diferencijalna pulsna voltametrija kao točna, precizna i osjetljiva metoda za analizu ekstrakata kore dunje u različitim eutektičkim otapalima. Na **Slikama 13 do 18** prikazane su grafičke vrijednosti za određivanje polifenola u ekstraktima kore dunje za svako pojedino eutektičko otapalo, primjenom metode standardne adicije. Kafeinska kiselina, kao standard, odabrana je jer je prema literaturnim referencama prisutna u značajnoj količini u vočki dunje (Herrera-Rocha i sur., 2022). Diferencijalna pulsna voltametrija je elektrokemijska tehnika koja se primjenjuje u kvantitativnoj analizi nekoga elektrokemijskog sustava jer je osjetljiva i niske granice detekcije (1×10^{-8} mol L⁻¹) (Patel, 2021). Stoga je metoda standardne adicije provedena obogaćivanjem ekstrakata kore dunje poznatim koncentracijama kafeinske kiseline u rasponu od 0 do 60 mg L⁻¹ te su dobiveni pravci prikazani na **Slikama 13 do 18** kao i pripadajuće jednadžbe pravca i koeficijenti determinacije. Svi ispitani ekstrakti kore dunje u različitim eutektičkim otapalima, pokazali su linearnu ovisnost struje pika o koncentraciji kafeinske kiseline, a neki izdvojeni diferencijalni pulsni voltamogrami prikazani su na **Slici 19**. Ovaj se postupak koristio za potvrdu prisutnosti kafeinske kiseline i njezinu kvantifikaciju u ekstraktima kore dunje.

Najveći sadržaj polifenolnih spojeva ekstrahiranih je u eutektičkom otapalu kolin-klorid : glicerol (40 % v/v), kolin-klorid : jabučna kiselina (udio vode 40 % v/v), kolin-klorid : oksalnakiselina (udio vode 80% v/v), kolin-klorid : glukoza (udio vode 40 % v/v), i najniži kolin-klorid : levulinska kiselina (udio vode 40 % v/v). Količine ukupnih polifenolnih spojeva izraženih kao ekvivalenti kafeinske kiseline prikazani su u **Tablici 2**, a iznose od 36,74 do 983,91 mg L⁻¹.

Na osnovi pKa vrijednosti kafeinske kiseline (4,8 - karboksilna skupina; 8,6 – *p*-hidroksi i 11,2 – *m*-hidroksi skupine) kreirana je simulacija izgleda molekule kafeinske kiseline u rasponu pH vrijednosti od 1 do 14 (**Slika 21**).



Slika 21 Distribucijski dijagram kafeinske kiseline

Na **Slici 21** uočava se da je iznad pH 5 molekula kafeinske kiseline u obliku karboksilatnog iona (- - -) te prema višim pH vrijednostima dolazi do daljnje ionizacije *p*-hidroksilne skupine (— dianion) te naposljetku i *m*-hidroksilone skupine (—·—·— trianion). Povećanjem pH vrijednosti iznad vrijednosti pK_{a1} (4,8) poboljšava se disocijacija skupina i dok je ispod pH 5 deprotonirana zanemariva količina kateholne skupine što utječe na smanjenju učinkovitost ekstrakcije jer je vrijednost ispod pK_{a1} vrijednosti (4,8) (Genaro-Mattos i sur., 2015).

Primjenom diferencijale pulsne voltametrije, izvršila se identifikacija polifenola. Potvrda prisutnosti polifenola u ekstraktu kore dunje je potvrđena dodatkom poznate koncentracije kafeinske kiseline kao standarda u uzorak. Jedan diferencijalni pulsni voltamogram je izdvojen i prikazan na **Slici 20** te se uočava porast strujnog odziva na potencijalu oksidacije kafeinske kiseline dodatkom kafeinske kiseline u ekstrakte, što potvrđuje prisutnost polifenolnih spojeva u ispitanom realnom uzorku dunje.

U ovom diplomskom radu po prvi puta su ispitani ekstrakti kore dunje dobiveni u različitim eutektičkim otapalima s udjelom vode 40 i 80 % (v/v) primjenom diferencijalne pulsne voltametrije na jednokratnoj elektrodi sa slojem nanočestica. Može se zaključiti da je metoda prihvatljiva za potvrdu i dokazivanje prisutnosti kafeinske kiseline iz dunje nakon provođenja ekstrakcije sa „zelenim“ otapalima, niskotemperaturnim eutektičnim otapalima, no potrebno je učiniti još istraživanja u svrhu validacije metode i proučavanja elektrokemijskog ponašanja ekstrakta elektroaktivnih tvari u eutektičkim otapalima iz realnih sustava.

Prema trenutnom pregledu literaturnih referenci, nema dovoljno podataka o kemijskom sastavu kore dunje što je bio motiv za provedeno istraživanje ukupnih polifenola izraženih kao ekvivalenti kafeinske kiseline u ovom diplomskom radu te je ujedno i znanstveni doprinos ovoga rada.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene pet prirodnih eutektičkih otapala s 40 i 80 % vode (v/v) u valorizaciji otpadne kore dunje, nusproizvoda prehrambene industrije nastalim preradom dotične vočke, dunje. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

- Uspješno su pripravljena različita eutektička otapala na bazi kolin-klorida s udjelima vode 40 i 80 % (v/v).
- Niskotemperaturna eutektička otapala pokazala su se kao vrlo dobra zamjena za toksična organska otapala u procesu ekstrakcije polifenolnih spojeva iz kore dunje. Neka od njih (kolin klorid : glicerol (40 % v/v), kolin-klorid : jabučna kiselina (40 % v/v) i kolin-klorid : oksalna kiselina (80 % v/v)) učinkovitiji mediji za ekstrakciju od referentnog otapala – zakiseljeni etanol.
- Hidrolitički enzimi kore dunje bili su učinkoviti u hidrolizi acetilsalicilne kiseline uz prinos od 90 %.
- Diferencijalna pulsna voltametrijia koristila se kao elektroanalitička metoda s ciljem identifikacije i kvantifikacije sadržaja polifenola u ekstraktima kore dunje. Dodatkom određenih masenih koncentracija standarda kafeinske kiseline, potvrdila se prisutnost polifenolnih spojeva u ispitanom ekstraktu kore dunje, dok je najveći sadržaj polifenolnih spojeva određen u ekstraktu dobivenom u eutektičkom otapalu kolin klorid : glicerol (40 % v/v; pH 5,45) u iznosu od 983,91 mg ekvivalenata kafeinske kiseline po litri što je bilo i za očekivati jer je pH ovog eutektičkog otapala najpogodniji za uspješnu ekstrakciju.
- Kao najbolja eutektička otapala za ekstrakciju aktivnih spojeva, pokazala su se kolin-klorid : glicerol (udio vode od 40 % v/v), kolin-klorid : jabučna kiselina (udio vode od 40 % v/v) i kolin-klorid : oksalna kiselina (udio vode od 80 % v/v).

7. LITERATURA

- Abdelazem, R.E., Hefnawy, H.T., El-Shorbagy, G.A. (2021) 'Chemical composition and phytochemical screening of *Citrus sinensis* (Orange) peels', *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 48(3), str.793-804.
- Al-Snafi, A.E. (2016) 'The medical importance of *Cydonia oblonga*- A review', *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(6), str.87-99.
- Anastas, P.T., Beach, E.S. (2007) 'Green chemistry: the emergence of a transformative framework', *Green Chemistry Letters and Reviews*, 1(1), str.9-24.
- Bystrická, J., Musilová, J., Lichtnerová, H., Lenková, M., Kovarovič, J., Chalas, M. (2017) 'The content of total polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity in selected varieties of quince (*Cydonia Oblonga* Mill.)', *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 11(1), str.77-81.
- Chiplunkar, P.P., Zhao, X., Tomke, P.D., Noro, J., Xu, B., Wang, Q., Silva, C., Pratap, A.P., Cavaco-Paulo, A. (2018) 'Ultrasound-assisted lipase catalyzed hydrolysis of aspirin methyl ester', *Ultrasonics Sonochemistry*, 40(A), str.587-593.
- Cvijetko Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) 'Metode priprave eutektičkih otapala', *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 11(3-4), str.164-168.
- da Silva, F.F.M, Ferreira, D.A., Monte, F.J.Q., de Mattos, M.C., Lemos, T.L.G. (2016) 'The orange peel as biocatalyst for the hydrolysis of esters', *Industrial Crops and Products*, 84, str. 22-27.
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013) 'Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L.', *Analytical Chemistry*, 85(13), str.6272-6278.
- Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013) 'Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(4), str.379-385.
- Fan, Y., Li, Q. (2022) 'An efficient extraction method for essential oil from *Angelica sinensis* radix by natural deep eutectic solvents-assisted microwave hydrodistillation', *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100792.
- Ganea, M., Cozma, A., Bota, S. (2018) 'Study of hydrolysis of acetylsalicylic acid', *Annals of the University of Oradea, Fascicle: Environmental Protection*, 30, str. 191-196.
- Genaro-Mattos, T.C., Mauricio, Â.Q., Rettori, D., Alonso, A., Hermes-Lima, M. (2015) 'Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation— A Chemical Approach', *PLoS ONE*, 10(11), 0142402.
- Gorzynski Smith J. (2011) *Organic Chemistry*. 3 izdanje. New York: McGraw-Hill.
- Gašo-Sokač, D., Nujić, M., Bušić V., Habuda-Stanić, M. (2014) 'Biocatalytic reductions by plant tissue-Green alternative to alcohol production', *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 6(1), str.51-60.
- Hayyan, A., Mjalli, F.S., Alnashef, I.M., Al-Wahaibi, T., Al-Wahaibi, Y.M., Hashim, M.A. (2012) 'Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties', *Thermochimica Acta*, 541, str.70-75.
- Hanan E., Sharma V., Ahmad F.J. (2020) 'Nutritional Composition, Phytochemistry and Medicinal Use of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) with Emphasis on its Processed and

- Fortified Food Products', *Journal of Food Processing & Technology*, 11(6), str. 831-844.
- Herrera-Rocha, K.M., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infant, J.A., González-Laredo, R.F., Larrosa-Pérez, M., Moreno-Jiménez, M.R. (2022) 'Phenolic Acids and Flavonoids in Acetonic Extract from Quince (*Cydonia oblonga* Mill.): Nutraceuticals with Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential', *Molecules*, 27(8), str. 2462-2476.
- Jašić, M., Galali, Y., Šubarić, D., Lončarić, A., Jozinović, A., Miličević, B. (2021) 'Biološki aktivne komponente u nusproizvodima prehrambene industrije', Šubarić, D., Miličević, B. (3.) *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*, Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi, str.25-56.
- Jukić, M., Đaković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Kovač, V., Vorkapić-Furač, J. (2005) 'Dominantni trendovi "zelene" kemije', *Kemija u industriji*, 54(5), str.255-272.
- Ketnawa, S., Chaiwut P., Rawdkuen S. (2011) 'Extraction of bromelain from pineapple peels', *Food Science and Technology International*, 17(4), str. 395-402.
- Khatun, M.N., Saeid, A., Mozumder, R., Ahmed, M. (2023) 'Extraction, purification and characterization of papain enzyme from papaya', *Food Research*, 7(2), str. 241-247.
- Kibler, K.M., Reinhart, D., Hawkins, C., Mohaghegh Motlagh, A., Wright, J. (2018) 'Food waste and the food-energy-water nexus: A review of food waste management alternatives', *Waste Management*, 74(2), str.52-62.
- Mojo, T., Sutrisno Marfuah, S. (2024) 'Chemical Content and Pharmacology of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Fruit Peel: A Review', *E3S Web of Conferences*, 481, 06002.
- Ňorbová, M., Vollmannová, A., Fedorková, S., Musilová, J., Lidiková, J. (2024) 'The forgotten fruit (*Cydonia oblonga* Mill.) and its chemical composition: a review', *European Food Research and Technology*, 250(8), str. 2093-2102.
- Oliveira, A.O., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valetao, P., Seabra, R.M., Silva, B.M. (2007) 'Phenolic Profile of *Cydonia oblonga* Miller Leaves', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), str. 7926-7930.
- Onah, J.O. (2004) 'The kinetics of hydrolysis of acetylsalicylic acid (Aspirin) in different polar media', *Global journal of pure and applied science*, 10(2), str. 297-300.
- Othman, S., Anibarro-Ortega, M., Dias, M.I., Ćirić, I., Mandim, F., Soković, M., Ferreira, I.C.F.R., Pinela, J., Barros, L. (2022) 'Valorization of quince peel into functional food ingredients: A path towards "zero waste" and sustainable food systems', *Heliyon*, 8(10), 11042.
- Ozturk, B., Parkinson, C., Gonzalez-Miquel, M. (2018) 'Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents', *Separation and Purification Technology*, 206, str. 1-13.
- Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014) 'Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century', *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), str. 1063-1071.
- Panić, M., Radović, M., Maros, I., Jurinjak Tušek, A., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2021) 'Development of environmentally friendly lipase-catalysed kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate using aqueous natural deep eutectic solvents', *Process Biochemistry*, 102, str. 1-9.

- Parfitt, J., Barthel, M., Macnaughton, S. (2010) 'Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050', *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365(1554), str. 3065-3081.
- Patel, B. A. (2021) *Electrochemistry for Bioanalysis*. 1 izdanje. Brighton: Elsevier.
- Percevault, L., Limanton, E., Nicolas, P., Paquin, L., Lagrost, C. (2021) 'Electrochemical Determination and Antioxidant Capacity Modulation of Polyphenols in Deep Eutectic Solvents', *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(2), str. 776-784.
- Piljac, I. (2010) *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*. Zagreb: Media Print Tiskara Hrastić.
- Radović, M., Panić, M., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2021) 'Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti', *Kemija u industriji*, 70(9-10), str. 551-562.
- Shabani, E., Zappi, D., Berisha, L., Dini, D., Antonelli, M.L., Sadun, C. (2020) 'Deep eutectic solvents (DES) as green extraction media for antioxidants electrochemical quantification in extra-virginoliveoils', *Talanta*, 215, 120880.
- Silva, V., Silva, A., Riberio, J., Aires, A., Carvalho, R., Amaral, J.S., Barros, L., Igrejas, G., Poeta, P. (2023) 'Screening of Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities in Pomegranate, Quince, and Persimmon Leaf, Peel, and Seed: Valorization of Autumn Fruits By-Products for a One Health Perspective', *Antibiotics*, 12(7), 1086.
- Soomro, A.H., Shaikh, N., Miano, T.F., Marri, A., Khaskheli, S.G., Kumar, D. (2021) 'Food waste management strategies in food supply chain', *International Journal of Ecosystems and Ecology Science*, 11(4), str. 759-766.
- Wang J. (2000) *Analytical electrochemistry*. 2 izdanje. New York: Wiley-VCH.
- Warner, J.C., Cannon, A.S., Dye, K.M. (2004) 'Green chemistry', *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7-8), str. 775-799.
- Zainal-Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A., Jayakumar, N.S. (2017) 'New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review', *Analytica Chimica Acta*, 979, str. 1-23.
- Zhou, G., Marathe, G.K., Hartiala, J., Hazen, S.L., Allayee, H., Wilson Tang, W.H., McIntyre, T.M. (2013) 'Aspirin Hydrolysis in Plasma Is a Variable Function of Butyrylcholinesterase and Platelet-activating Factor Acetylhydrolase 1b2 (PAFAH1b2)', *Journal of Biological Chemistry*, 288(17), str. 11940–11948.
- Zhuang, B., Dou, L.-L., Li, P., Liu, E.-H. (2017) 'Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, str. 214-219.
- WEB 1: <https://www.nature-and-garden.com/wp-content/uploads/sites/4/2022/10/quince-benefits.jpg> (datum pristupa: 16.8.2024.).
- WEB 2: <http://struna.ihjj.hr/naziv/diferencijalna-pulsna-voltampermetrija/3497/> (datum pristupa: 2.9.2024.).
- WEB 3: <https://www.ibm.com/docs/hr/cognos-analytics/12.0.0?topic=terms-r2> (datum pristupa: 7.10.2024.).