

»55. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2021«

OLJČNI LISTI – VIR AKTIVNIH UČINKOVIN

Kemija ali kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

Avtorica: Katja Cundrič

Mentorica: prof. Sanja Cvar

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, 2021

Povzetek

Oljčno olje je vsestransko živilo, katerega zdravilni učinki so že dolgo znani. Raziskave kažejo, da bi tudi oljčni listi, ki so odpadki obrezovanja oljčnih nasadov, lahko bili dober vir aktivnih učinkovin, ki bi jih lahko uporabili v kozmetičnih ali farmacevtskih preparatih.

V raziskovalni nalogi sem se osredotočila na polifenole, ki jim pripisujemo antioksidativne lastnosti. Oljčne liste sem ekstrahirala s tremi različnimi topili v Soxhletovem aparatu. Vsebnost polifenolov v ekstraktih sem določila spektrofotometrično s Folin-Ciocalteujevim reagentom. Preučila sem koncentracijo ekstrahiranih polifenolov v različnih topilih, jo primerjala z energijo potrebno za ekstrakcijo in ceno topil ter s tem določila najprimernejše topilo.

Ključne besede:

Oljčni listi, polifenoli, Soxhletova ekstrakcija, UV-VIS spektrofotometrija, učinkovitost topil

Zahvala

Zahvala gre gospe mentorici, ki mi je neprestano stala ob strani in mi nudila pomoč. Hvala vam za ves trud in čas, ki ste mi ju posvetili. Veliko mi pomeni.

Kazalo vsebine

1. UVOD	6
1.1 Hipoteza.....	7
1.2 Raziskovalna vprašanja	7
1.3 Raziskovalna metoda dela	7
2. TEORETIČNI DEL	8
2.1 Antioksidanti	8
2.2 Polifenoli	9
2.2.1 Polifenoli kot aktivna učinkovina	10
2.3 Soxhletova ekstrakcija	11
2.4 UV-VIS spektrofotometrija	11
3. PRAKTIČNI DEL	13
3.1 Pripomočki in kemikalije.....	13
3.2 Predstavitev postopka	14
3.2.1 Priprava raztopin in reagentov	14
3.3 Umeritvena premica z galno kislino.....	14
3.4 Topila.....	15
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	17
4.1 Vodni ekstrakti	17
4.1.1 Merjenje absorbance	17
4.1.2 Računanje koncentracije polifenolov.....	18
4.2 Ekstrakti z acetonom	19
4.2.1 Merjenje absorbance	19
4.2.2 Računanje koncentracije polifenolov.....	20
4.3 Ekstrakti z etanolom	21
4.3.1 Merjenje absorbance	21
4.3.2 Računanje koncentracije polifenolov.....	21
4.4 Oljčni listi kot potencialni vir polifenolov	22
4.5 Najprimernejše število ciklov	23

4.6	Najprimernejše topilo	24
5.	DRUŽBENA ODGOVORNOST	27
6.	ZAKLJUČEK	28
7.	VIRI IN LITERATURA	29
7.1	Viri.....	29

Kazalo slik

Slika 1:	Oljčni listi (vir: lasten)	7
Slika 2:	Kemijska struktura fenola (Wikipedija, 2021).....	10
Slika 3:	Kemijska struktura oleuropeina, enega izmed glavnih polifenolov v oljčnih listih (Internetchemie, 2021)	10
Slika 4:	Aparat za Soxhletovo ekstrakcijo (Luque de Castro & Garcia Ayuso, 2000)	11

Kazalo grafov

Graf 1:	Umeritvena premica z galno kislino, merjena pri 766nm (vir: lasten)	15
Graf 2:	Absorbanca vzorcev vodnih ekstraktov, merjena pri 766nm (vir: lasten).....	18
Graf 3:	Absorbanca vzorcev ekstraktov z acetonom, merjena pri 766nm (vir: lasten).....	20
Graf 4:	Absorbanca vzorcev ekstraktov z etanolom, merjena pri 766nm (vir: lasten)	21

Kazalo tabel

Tabela 1:	Primerjava struktur in fizikalnih lastnosti vode, acetona in etanola (Engineering ToolBox, 2021)	16
Tabela 2:	Koncentracija polifenolov v vodnih ekstraktih (vir: lasten).....	19
Tabela 3:	Koncentracija polifenolov v ekstraktih z acetonom (vir: lasten)	20
Tabela 4:	Koncentracija polifenolov v ekstraktih z etanolom (vir: lasten)	22
Tabela 5:	Primerjava učinkovitosti vode, acetona in etanola kot topila za Soxhletovo ekstrakcijo polifenolov (vir: lasten).....	25

1. UVOD

Človeško telo se vsakodnevno srečuje s precejšnjo količino prostih radikalov, ki predstavljajo potencialno grožnjo za razvoj bolezni in drugih težav. Nastajajo v oksidacijskih procesih, ki so del presnove, lahko pa jih zaužijemo tudi s hrano (Manzin, 2010).

Neželeno učinke telo prepreči s številnimi obrambnimi mehanizmi, poleg tega pa koristijo tudi nekateri vitamini in antioksidanti, ki jih pridobimo s hrano. Težko je dokazati, da antioksidanti bistveno pripomorejo pri teh procesih, saj jih je od delovanja drugih snovi težko ločiti. Kljub temu pa nekatere študije kažejo, da uživanje rastlinskih antioksidantov zmanjšuje možnost oksidativnih poškodb celic in nastanek nekaterih bolezni (Prehrana.si, 2016).

Podobno tudi sredozemski način prehranjevanja velja za manj rizičnega za pojav rakavih in drugih obolenj. Vsebuje namreč veliko vitaminov in fenolnih spojin, ki so vrsta antioksidantov. Sredozemsko hrano sestavlja veliko sadja, zelenjave, rib in oljčnega olja. Slednje predstavlja potencialni vir naravnih antioksidantov, ki bi jih med drugim lahko uporabljali namesto umetnih v farmacevtski, kozmetični in živilski industriji (Manzin, 2010).

Pri proizvodnji oljčnega olja dobimo tudi stranski produkt – oljčne liste. Trenutno predstavljajo 10% industrijsko pridelanih produktov iz oljk. Uporabni so zaradi nizke cene in bogatosti s polifenoli, zaradi česar jih uporabljajo kot prehranske dodatke. Predstavljajo privlačen vir naravnih antioksidantov, ki veljajo za bolj varne od umetnih. Na žalost njihova učinkovitost ni tako zanesljiva, prav tako pa lahko spremenijo okus in vonj izdelka. Kljub temu je za oljčne liste vedno več zanimanja, saj so poceni, obnovljiv in bogat vir naravnih antioksidantov (Manzin, 2010).

Preden bi jih lahko uporabili, je potrebno opraviti še veliko raziskav glede ekstrahiranja antioksidantov iz njih in varnosti pri uporabi (Manzin, 2010). Prav na to se bom osredotočila v raziskovalni nalogi.



Slika 1: Oljčni listi (vir: lasten)

1.1 Hipoteza

1. Oljčni listi so potencialni vir polifenolov.
2. Koncentracija polifenolov v ekstraktu narašča s številom ciklov Soxhletove ekstrakcije do neke zgornje meje. Predvidevamo, da zadošča 6 ciklov.

1.2 Raziskovalna vprašanja

1. Ali oljčni listi vsebujejo polifenole in ali so njihov potencialni vir?
2. Pri kolikšnem številu ciklov je ekstrakcija najbolj učinkovita, če upoštevamo razmerje med koncentracijo ekstrahiranih polifenolov in porabo časa ter energije?
3. Katero topilo, voda, aceton ali etanol, je najprimernejše, če upoštevamo razmerje med koncentracijo ekstrahiranih polifenolov, porabo časa in energije ter ceno?

1.3 Raziskovalna metoda dela

Koncentracijo polifenolov v oljčnih listih lahko določimo s pomočjo Soxhletove ekstrakcije z različnimi topili in s spektrofotometrično analizo obdelanih ekstraktov. Tem namreč dodamo reagente, ki s polifenoli tvorijo obarvane spojine, zato je intenziteta barve premo sorazmerna s koncentracijo polifenolov. To izračunamo s pomočjo umeritvene premice, za katero uporabimo galno kislino, ki ima primerljivo strukturo in oksidativni potencial kot polifenoli.

2. TEORETIČNI DEL

2.1 Antioksidanti

Antioksidanti so snovi, ki zavirajo oksidacijske procese. V teh nastajajo prosti radikali, ki so stranski produkti presnove kisika oz. celičnega dihanja (Allott & Mindorff, 2014). Prosti radikali so delci z vsaj enim samskim elektronom, ki je vzrok za njihovo visoko reaktivnost in za poškodbe celičnih struktur s katerimi reagirajo. Naše telo je ustvarilo precej mehanizmov, ki zavirajo nastajanje prostih radikalov. Stanje, ko se ravnovesje med količino prostih radikalov in učinkovitostjo antioksidativnih obrambnih sistemov poruši, imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti pomagajo preprečevati takšno stanje z lovljenjem prostih radikalov in s popraviom ali odstranjevanjem poškodovanih biomolekul (Manzin, 2010). Prosti radikali namreč zaradi svoje reaktivnosti sprožajo številne neželene kemijske reakcije in s tem poškodujejo celice, kar pa lahko vodi do nastanka številnih bolezni kot so rakaste tvorbe, diabetes, infarkt in vnetne bolezni (npr. artritis), hkrati pa pospešujejo staranje (Allott & Mindorff, 2014). Antioksidanti preprečujejo nastanek teh bolezni, saj omogočajo pravilno delovanje popravljalnih mehanizmov in uravnavanje apoptoze (programirane celične smrti). S tem se zmanjša tveganje za nastanek mutacij in rakastih tkiv (Manzin, 2010).

Število prostih radikalov se lahko poveča, če je organizem izpostavljen stresu, sevanju, nekaterim kemikalijam, cigaretam, alkoholu, izpušnim plinom, zapečeni oziroma zakajeni hrani in težkim kovinam (Manzin, 2010).

V organizmih lahko najdemo dve vrsti antioksidantov: endogene, ki jih tvori organizem, in eksogene, ki jih zaužijemo s hrano. Zaradi tega je pomembno uživanje uravnotežene prehrane, bogate z antioksidanti, ki omogoča pridobitev oz. izgradnjo obeh vrst antioksidantov. Eksogeni antioksidanti so lahko naravnega ali umetnega izvora – proizvedeni s strani živih organizmov ali umetno po načrtih človeka. Naravni antioksidanti so večinoma bolj zaželeni, saj potrošniki verjamejo v kakovost naravnih proizvodov, prav tako pa zaradi njihovega izvora testiranje ni potrebno in so avtomatsko uvrščeni med varne proizvode. Pomanjkanje preverjanja varnosti je hkrati njihova slaba stran, prav tako pa lahko spremenijo barvo in okus izdelka, h kateremu so dodani (Manzin, 2010).

Med antioksidante spadajo vitamin C, vitamin E in karoteni, ki jih naše telo samo pretvori v vitamin A (Prehrana.si, 2016).

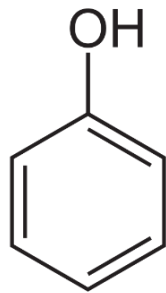
Vlogo antioksidantov pri preprečevanju bolezni je težko natančno ovrednotiti, saj jih je zelo teko ločiti od vitaminov in drugih koristnih snovi, ki jih najdemo v sadju in zelenjavi. Kljub temu so laboratorijske raziskave in nekatere intervencijske študije pokazale, da redno uživanje rastlinskih antioksidantov zmanjšuje možnost oksidativnih poškodb celic in nastanek nekaterih bolezni (Prehrana.si, 2016).

2.2 Polifenoli

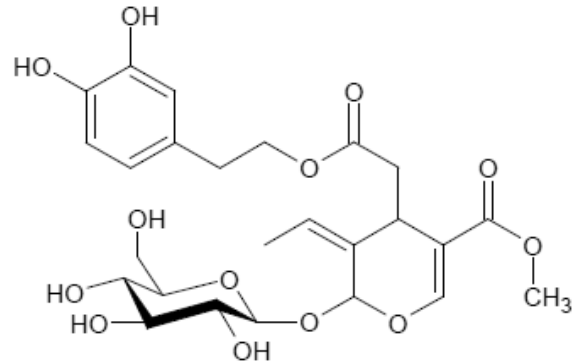
Fenol je aromatska organska spojina s formulo C_6H_5OH , ki ima en aromatski obroč in eno hidroksilno skupino (glej sliko 2) (Bylikin, et al., 2014). Polifenoli spadajo med fenolne spojine z vsaj enim aromatskim obročem in eno ali več hidroksilnih skupin, ki so direktno vezane na obroč. Njihovo število pomembno vpliva na antioksidacijsko učinkovitost spojine. V naravi so bolj pogoste spojine z več skupinami, kar je vzrok za predpono poli- (Manzin, 2010). Polifenoli so v naravi prisotni v skoraj vseh rastlinah in celo v nekaterih vrstah insektov (Prehrana.si, 2016). Njihova funkcija v rastlinah je povezana z rastjo in razvojem, zaščito pred škodljivimi vplivi sončnih žarkov ter zaščito pred virusi, bakterijami, kvasovkami in rastlinojedimi organizmi med katere spada tudi človek. Imajo namreč trpek ali grenek okus, poleg tega pa lahko v večjih količinah škodijo, saj v velikih koncentracijah delujejo kot prooksidanti. Rastline jih zato ne kopičijo v citoplazmi celic, ampak v vakuolah ali tkivih brez živih celic. Evolucijsko se je pri nas in drugih rastlinojedih živalih razvila sinteza beljakovin v slini, ki preprečujejo škodljive učinke in nam omogočajo prehrano z rastlinami, ki vsebujejo polifenole (Manzin, 2010). V naravi so ti najbolj pogosta oblika antioksidantov in so pogosto del naše prehrane, saj se v velikih količinah nahajajo v sadju, zelenjavi, kavi, zelenem in črnem čaju, rdečem vinu, čokoladi, nekaterih oreških, začimbah, olivah in olivnem olju (Prehrana.si, 2016). V zadnjem je največji delež polifenola oleuropeina, katerega strukturo lahko vidimo na sliki 3. Njegova koncentracija v listih je odvisna od vrste oljke, letnega časa in drugih spremenljivk. Ima grenek priokus, v preteklosti se je uporabljal kot zdravilo proti mrzlici, povišani temperaturi in drugim obolenjem, saj zanj velja, da ima antioksidativne, antimikrobne, protivnetne in protivirusne učinke (Barber, 2015).

Fenolne spojine preprečujejo oksidativni stres na tri načine: z vezavo kationov, inhibicijo encimskih sistemov in lovljenjem prostih radikalov (Barber, 2015). Antioksidativni učinki polifenolov so bili v zadnjih letih predmet številnih študij, ki so pokazale, da imajo pozitivni

vpliv na preprečevanje rakavih obolenj, srčno-žilnih bolezni in osteoporoze. V novejših raziskavah pa so odkrili tudi varovalni učinek pred nevrodegenerativnimi boleznimi (Alzheimerjevo boleznijo idr.) in diabetesom. Večina dosedanjih raziskav je učinek polifenolov dokazala na laboratorijskih živalih, zato vpliv polifenolov pri ljudeh še ni dovolj raziskan, da bi jih Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) uvrstila med živila, ki zmanjšujejo tveganja za razvoj teh bolezni (Prehrana.si, 2016).



Slika 2: Kemijska struktura fenola (Wikipedija, 2021)



Slika 3: Kemijska struktura oleuropeina, enega izmed glavnih polifenolov v oljčnih listih (Internetchemie, 2021)

2.2.1 Polifenoli kot aktivna učinkovina

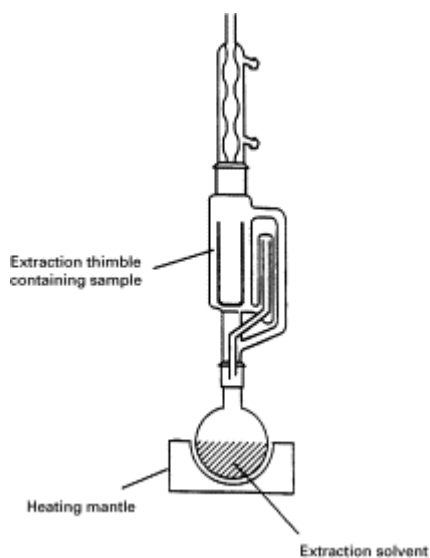
Aktivne učinkovine, znane tudi kot zdravilne učinkovine, so vse snovi ali mešanice snovi, ki med proizvodnjo zdravil postanejo aktivna sestavina zdravila, ki deluje farmakološko, imunološko ali presnovno in katerega namen je vzpostavitev ali izboljšanje fizioloških funkcij ali določanje diagnoze (Slovenska poslovna točka, 2020).

Polifenoli zaradi svoje antioksidativne funkcije spadajo med aktivne učinkovine. Najdemo jih namreč v prehranskih dodatkih in zdravilih, katerih namen je izboljšanje fizioloških funkcij oz. bolj specifično, preprečevanje oksidativnega stresa.

Prav tako imajo visok oksidativni potencial. To je vrednost, s katero izrazimo količino energije, ki je potrebna za odstranitev ali dodajanje elektronov nekemu elementu ali spojini (Eyclopedia.com, 2019). Pomen tega je ključen, saj nam pove zmožnost spojine da oksidira namesto drugih bolj pomembnih snovi v telesu.

2.3 Soxhletova ekstrakcija

Soxhletova ekstrakcija je ena najstarejših metod ekstrakcije trdnih vzorcev in jo poznamo tudi kot ponavljajočo trdno-tekočo ekstrakcijo. Vzorec damo v filtrirni papir, ki bo zadržal trdne delce in prepustil topilo z ekstrahirano snovjo. Filtrirni papir z vzorcem vstavimo v Soxhletov ekstraktor (glej sliko 4) in podenj postavimo topilo v bučki, ki jo začnemo segreti. Ko topilo zavre, se začnejo dvigovati hlapi, ki se kondenzirajo v kondenzatorju in nato stečejo v filtrirni papir s trdno snovjo. Učinkovina se začne raztapljati v toplim topilu in ko topilo doseže sifonsko cevko, steče nazaj v bučko in s seboj prinese tudi raztopljeno učinkovino. Ta proces se ponavlja dokler ne presodimo, da je večina učinkovine ekstrahirana (Luque de Castro & Garcia Ayuso, 2000). Soxhletova ekstrakcija lahko poteka brez neprestanega nadzora, a navadno traja več ur in porabi veliko količino topila, prav tako pa jo moramo spremljati, če želimo določiti točno število ciklov.



Slika 4: Aparat za Soxhletovo ekstrakcijo (Luque de Castro & Garcia Ayuso, 2000)

2.4 UV-VIS spektrofotometrija

UV-VIS spektrofotometrija, oziroma ultravijolična-vidna spektrofotometrija, je metoda, pri kateri detektorji merijo prehod fotonov skozi vzorec. Večinoma se jo uporablja za kvantitativno analizo atomov in molekul. (Britannica Library, 2021). Naprava za merjenje se imenuje spektrofotometer, ki pošlje snop svetlobe skozi vzorec v kiveti in izmeri absorbanco (količino in valovno dolžino svetlobe, ki jo raztopina zadrži) in transmittanco (količino svetlobe in njeno valovno dolžino, ki preide skozi raztopino).

Njune vrednosti izračuna po spodnjih enačbah, kjer A pomeni absorbanco, T trasmitanco, P količino svetlobe, ki jo raztopina prepusti, in P_0 količino svetlobe, ki jo prepusti raztopina, s katero smo umerili spektrofotometer:

$$T = P / P_0$$

$$A = - \log (T)$$

Valovna dolžina oz. barva, ki jo raztopina absorbira je ravno nasprotna tisti, ki jo ljudje zaznamo s prostim očesom, saj vidimo le svetlobo, ki je uspela prepotovati skozi snov ali se z nje odbila. (TutorVista.com, 2019).

Svetlobo sestavljajo fotoni, ki imajo določeno količino energije, ki jo lahko oddajo molekulam raztopine. (TutorVista.com, 2019). Te jo absorbirajo, pri čemer se valenčni elektroni snovi v vzorcu premaknejo na višjo nezasedeno orbitalo (Britannica Library, 2021).

Valovna dolžina in količina absorbirane svetlobe sta odvisni od molekularne strukture snovi in njene koncentracije (Sousa, 2009). To opisuje Beer-Lambertov zakon, ki pravi, da je absorbanca odvisna od valovne dolžine, vrste raztopine, debeline kivete z raztopino in koncentracije iskane snovi. Posledično je absorbanca premo sorazmerna s koncentracijo. V enačbi A predstavlja absorbanco, ϵ absorpcijski koeficient, l debelino in c koncentracijo:

$$A = \epsilon \times l \times c$$

Na podlagi tega bi koncentracijo lahko izračunali, a vrednosti absorpcijskega koeficienta ne poznamo. Druga možnost izračunov je s pomočjo umeritvene premice. (TutorVista.com, 2019)

3. PRAKTIČNI DEL

3.1 Pripomočki in kemikalije

- Soxhletov aparat
- Grelnik
- Vrelno steklo
- UV-VIS Spektrofotometer (Vernier) in pripadajoče kivete
- Računalnik in program Logger Pro
- Tehtnica (Kern EW, $\pm 0,01$ g)
- Analizna tehtnica (Kern ABJ, $\pm 0,0001$ g)
- Polnilne pipete (2,5 mL $\pm 0,010$ mL; 5 mL $\pm 0,03$ mL; 10 mL $\pm 0,04$ mL; 20 mL $\pm 0,05$ mL)
- Merilne pipete (5 mL)
- Avtomatska pipeta (100 μ L $\pm 1,00$ μ L)
- Steklena kapalka
- Merilni valj (25 mL)
- Merilne bučke (100 mL $\pm 0,250$ mL; 50 mL $\pm 0,060$ mL)
- Čaše
- Filtrirni papir
- Stekljeni liji
- Epruvete in stojalo za epruvete
- Terilnica in pestilo
- Deionizirana voda (šolski laboratorij)
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3 , MERCK-ALKALOID)
- Folin-Ciocalteujev reagent (p.a., Merck KGaA)
- Galna kislina ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, p.a. Merck)
- Aceton (Honeywell, UN1090)
- Etanol (Honeywell, UN1170)

3.2 Predstavitev postopka

V eksperimentalnem delu raziskovalne naloge sem se osredotočila na določanje koncentracije polifenolov v ekstraktih oljčnih listov z različnimi topili. Pri tem sem uporabila Soxhletovo ekstrakcijo in UV-VIS spektrofotometrijo. Obe metodi sem izbrala na podlagi priporočila mentorice, enostavnosti metod in opreme, ki je na voljo v šolskem laboratoriju.

Za merjenje koncentracije polifenolov v ekstraktih je te potrebno pravilno obdelati. Dodati moramo reagente, ki s polifenoli tvorijo obarvane spojine in s tem omogočajo, da izmerimo absorbanco vzorcev ter preko nje izračunamo koncentracijo. Vsakemu ekstraktu sem zato dodala raztopino natrijevega karbonata in razredčen Folin-Ciocalteujev reagent, ki je ekstrakte obarval svetlo modro.

Za računanje koncentracije polifenolov sem naredila umeritveno premico, saj zaradi nepoznavanja absorpcijskega koeficienta preprost izračun ni mogoč. Pripravila sem jo na podlagi galne kisline, ki ima podobno strukturo in oksidativni potencial kot polifenoli.

3.2.1 Priprava raztopin in reagentov

Za eksperimentalni del raziskovalne naloge sem si morala pripraviti več raztopin in reagentov:

- **7,5 % raztopina natrijevega karbonata**

V čašo sem stehtala 7,50 g trdnega natrijevega karbonata in dolila 92,50 mL deionizirane vode.

- **Razredčen Folin-Ciocalteujev reagent**

5,0 mL Folin-Ciocalteujevega reagenta sem odpipetirala v 50 mL bučko in dopolnila z deionizirano vodo do oznake.

- **Galna kislina**

V 100 mL bučko sem dala 100,3 mg trdne galne kisline in dolila etanol do oznake.

3.3 Umeritvena premica z galno kislino

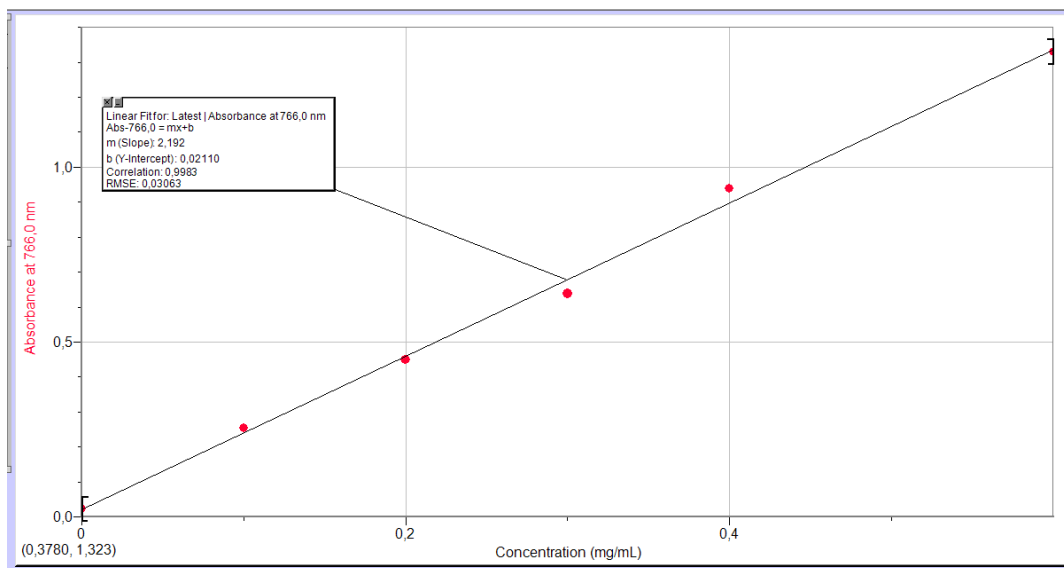
Pripravila sem raztopine, ki so vsebovale naslednje koncentracije galne kisline: 0,60 mg/mL, 0,40 mg/mL, 0,30 mg/mL, 0,20 mg/mL in 0,10 mg/mL. 50 µL vsake koncentracije sem z

avtomatsko pipeto prenesla v epruvete. Dodala sem 2,5 mL razredčenega Folin-Ciocalteujevega reagenta in 2,0 mL 7,5 % raztopine natrijevega karbonata, v navedenem zaporedju, ki je pomembno za pravilen potek reakcije. Vzorce sem 15 minut inkubirala v vodi s temperaturo 45 °C. Na računalniku sem zagnala program Logger Pro, priključila spektrofotometer in ga kalibrirala z deionizirano vodo. Nato sem vstavila najtemnejši ekstrakt in odčitala valovno dolžino pri kateri je absorbanca največja. Najvišja točka je bila pri 766 nm, zato sem to valovno dolžino uporabila za določanje absorbance različno koncentriranih raztopin galne kisline in kasneje absorbance ekstraktov oljčni listov v različnih topilih.

Dobljene podatke o absorbanci sem s pomočjo programa Logger Pro postavila v graf in določila premico, ki se točkam najbolj prilega. Dobila sem njeno enačbo:

$$A = 2,192 c(GA) + 0,02110$$

kjer je $c(GA)$ koncentracija galne kisline, v nadaljevanju pa bom to enačbo lahko uporabila za izračun koncentracije polifenolov v ekstraktih z izmerjeno absorbanco.

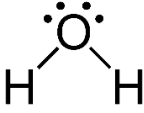
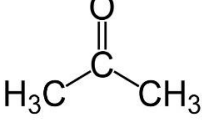
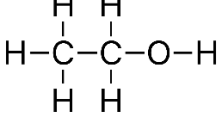


Graf 1: Umeritvena premica z galno kislino, merjena pri 766nm (vir: lasten)

3.4 Topila

Ekstrakcijo polifenolov iz oljčnih listov sem ponovila trikrat, s tremi različnimi topili. Polifenoli so polarne organske spojine, zato sem izbrala tri polarna topila, ki so enostavno dostopna, hkrati pa imajo dovolj nizka vrelišča, da za ekstrakcijo ne potrebujemo velikih količin energije. Natančni podatki so podani v tabeli 1.

Tabela 1: Primerjava struktur in fizikalnih lastnosti vode, acetona in etanola (Engineering ToolBox, 2021)

Topilo	Deionizirana voda	Aceton	Etanol
Strukturna formula			
Vrelišče (°C)	100	56	78
Izparilna toplota (kJ/kg)	2256	518	846
Specifična toplota (kJ/(kg K))	4,18	2,15	2,46

Med ekstrakcijo sem po vsakem ciklu odvzela 2 mL ekstrakta in jim določila vsebnost polifenolov. Na podlagi tega sem kasneje lahko določila najprimernejše topilo, s primerjavo koncentracije polifenolov in energije oz. časa potrebnega za ekstrakcijo. Ta dva pojma sta neposredno povezana med seboj in z vreliščem, specifično toploto in izparilno toploto topil, saj nekatera potrebujejo več časa in energije, da spremenijo agregatno stanje.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Vodni ekstrakti

4.1.1 Merjenje absorbance

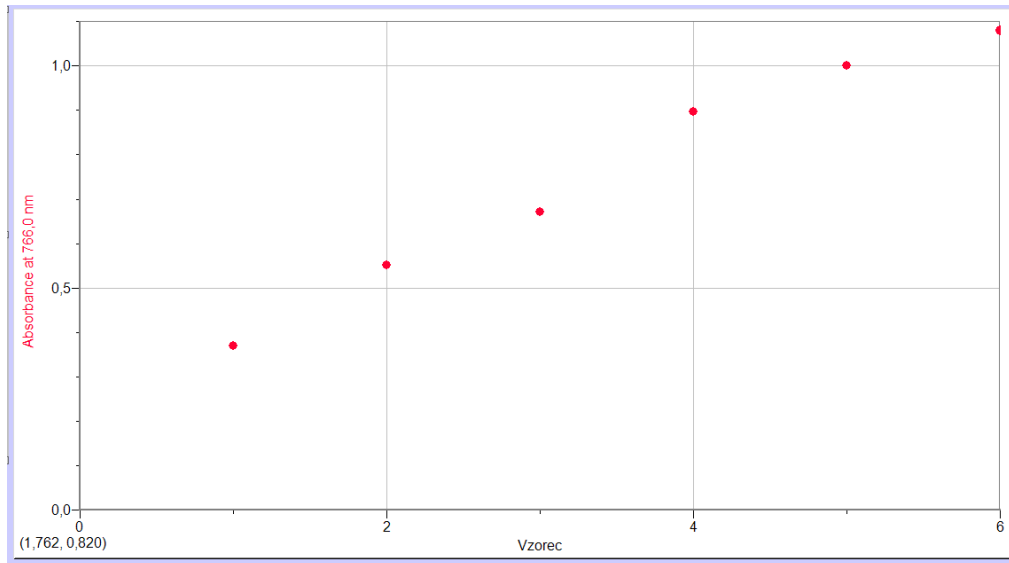
Da sem lahko pripravila vodne ekstrakte oljčnih listov, sem te morala najprej na drobno narezati in stehtati (to mi je kasneje omogočilo izračun mase listov, potrebne za pridobitev 1 grama polifenolov). Želela sem uporabiti okoli 10 g listov za ekstrakcijo z vsakim topilom in sem jih za vodne ekstrakte odtehtala 10,25 grama. Pripravila sem Soxhletov aparat za ekstrakcijo in podenj postavila grelnik. Narezane liste sem v filtru vstavila v aparat, v bučko nalila 150 mL deionizirane vode in dodala vrelo steklo. Po koncu vsakega cikla sem odvzela približno 2 mL ekstrakta in ga shranila v epruvete. Z vsakim odvzemom sem nekoliko zmanjšala koncentracijo polifenolov v naslednjem ekstraktu, a lahko to zaradi izredno majhnih količin zanemarimo. Izvedla sem šest ciklov Soxhletove ekstrakcije, pridobila šest ekstraktov in prenehala z ekstrakcijo, saj sem predvidevala, da v nadaljnjih ciklih koncentracija polifenolov ne bo več močno naraščala.

Odvzela sem 50 μ L vsakega izmed ekstraktov, jih prenesla v čisto epruveto in dodala 2,5 mL razredčenega Folin-Ciocalteuvega reagenta in 2,0 mL 7,5 % raztopine natrijevega karbonata, v navedenem zaporedju. Ekstrakti, ki so bili pred tem rjavi, so se obarvali zelo intenzivno modro. Ugotovila sem da, da bi v nadaljevanju postopka absorbanca bila previsoka in rezultati posledično nenatančni, zato sem postopek ponovila.

Postopek sem ponovila, tokrat sem odvzela 10 μ L vsakega izmed ekstraktov. Po dodatku reagentov so se obarvali svetlo modro. 15 minut sem jih inkubirala v vodni kopeli s temperaturo okoli 45°C, pri čemer se je barva okrepila. Med inkubacijo sem na računalniku pognala program Logger Pro, priključila spektrofotometer in ga kalibrirala z deionizirano vodo. Nato sem vsem šestim obdelanim ekstraktom izmerila absorbanco. Kljub manjši količini ekstrakta je ta še zmeraj presegala pričakovane vrednosti, kar bi lahko vplivalo na natančnost rezultatov, zato sem se odločila postopek ponoviti še enkrat.

Tokrat sem ekstrakte razredčila v razmerju 1 : 5. 20 μ L ekstrakta sem s pomočjo mikropipete razredčila z 80 μ L deionizirane vode. Od nastale mešanice sem odvzela 10 μ L in jih dala v čiste epruvete. Po ustaljenem postopku sem dodala reagente in vzorce inkubirala, pri čemer se je

njihova blede modra barva potemnila. Vsem šestim vzorcem sem izmerila absorbanco, kar prikazuje graf 2 v nadaljevanju.¹



Graf 2: Absorbanca vzorcev vodnih ekstraktov, merjena pri 766nm (vir: lasten)

4.1.2 Računanje koncentracije polifenolov

Koncentracijo polifenolov sem izračunala na podlagi umeritvene premice z galno kislino. Njeno enačbo sem preoblikovala v naslednjo obliko:

$$c(\text{polifenoli}) = c(\text{GA}) = \frac{A - 0,02110}{2,192}$$

Dobila sem podatke, ki so razvidni iz tabele 2.

¹ V nadaljevanju raziskovalne naloge zaradi boljše berljivosti uporabljam besedo ekstrakti v navezovanju na nerazredčene ekstrakte in besedo vzorci za razredčene ekstrakte.

Tabela 2: Koncentracija polifenolov v vodnih ekstraktih (vir: lasten)

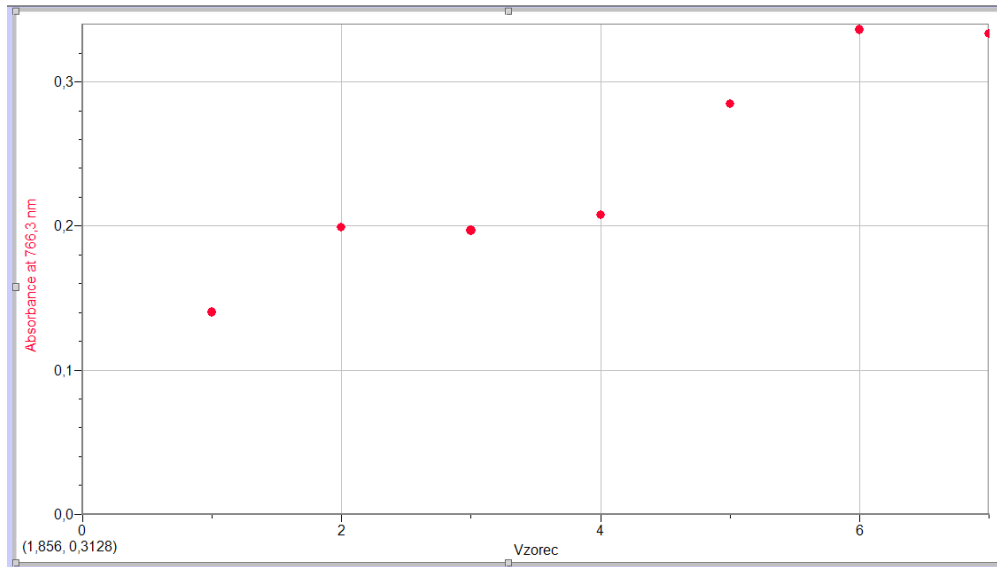
Ekstrakt	Absorbanca pri 766 nm	Koncentracija v vzorcu (mg/mL)	Koncentracija v ekstraktu (mg/mL)
1	0,3700	0,1592	0,7958
2	0,5510	0,2417	1,2087
3	0,6710	0,2965	1,4824
4	0,8960	0,3991	1,9957
5	1,0000	0,4466	2,2329
6	1,0790	0,4826	2,4131

Kot po pričakovanjih se koncentracija polifenolov v vzorcih veča s številom ciklov. Največja razlika v koncentraciji ekstrahiranih polifenolov je med ciklom 3 in 4, med naslednjimi pa se začne zmanjševati. Tak trend kaže na to, da se učinkovitost ekstrakcije po vrhuncu skozi čas zmanjšuje dokler ne postane neučinkovita, a ker sem poskus prekinila po šestih ciklih, tega ne morem reči z gotovostjo. Prav tako ne morem določiti točnega števila ciklov, pri katerih je razmerje med koncentracijo ekstrahiranih polifenolov in časom še smiselno. Ekstrakcijo sem prekinila, saj je dolžina ciklov ekstrahiranja z vodo zaradi relativno visokega vrelišča precej dolga in sem predvidevala, da v naslednjih ciklih koncentracija polifenolov ne bo več bistveno narasla.

4.2 Ekstrakti z acetonom

4.2.1 Merjenje absorbance

Oljčne liste sem za acetonske ekstrakte obdelala z istim postopkom, le da sem namesto deionizirane vode v bučko Soxhletovega aparata dala 150 mL acetona. Masa oljčnih listov za ekstrakcijo je bila 10,20 grama. Tudi tokrat sem ekstrakte razredčila v razmerju 1:5, od tega odvzela 10 µL vzorca in po istem vrtnem redu dodala Folin-Ciocalteujev reagent in 7,5 % raztopino natrijevega karbonata. Do te točke so bili vzorci intenzivno zelene barve, saj se v acetonu klorofil bolje raztaplja kakor v vodi. Po dodatku reagentov so spremenili barvo v zelo blede modro, ki je pridobila na intenziteti šele po inkubaciji. Spektrofotometer sem kalibrirala z deionizirano vodo in nato izmerila absorbanco vseh vzorcev, kar prikazuje graf 3. Tokrat sem pridobila 7 vzorcev, saj ima aceton nižje vrelišče in je čas ekstrakcije krajši.



Graf 3: Absorbanca vzorcev ekstraktov z acetonom, merjena pri 766nm (vir: lasten)

4.2.2 Računanje koncentracije polifenolov

Iz absorbanca sem po enačbi umeritvene premice izračunala naslednje koncentracije, ki so razvidne iz Tabele 3.

Tabela 3: Koncentracija polifenolov v ekstraktih z acetonom (vir: lasten)

Ekstrakt	Absorbanca pri 766 nm	Koncentracija v vzorcu (mg/mL)	Koncentracija v ekstraktu (mg/mL)
1	0,1400	0,0542	0,2712
2	0,1990	0,0812	0,4058
3	0,1970	0,0802	0,4012
4	0,2080	0,0853	0,4263
5	0,2850	0,1204	0,6020
6	0,3360	0,1437	0,7183
7	0,3340	0,1423	0,7137

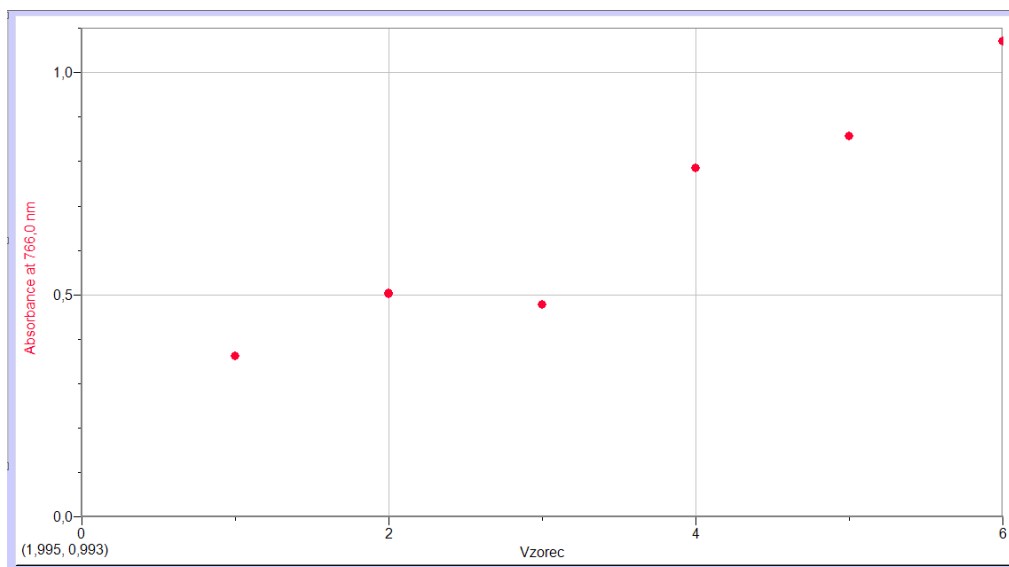
Tudi v tem primeru se koncentracija polifenolov v vzorcih veča s številom ciklov, a z nekaj odstopanji. Vzorca 3 in 7 imata nižjo koncentracijo polifenolov kot vzorci pred njima, vzorec 4 pa ima vrednost le nekoliko večjo od prejšnjega. Razlog za to bi bila lahko visoka hlapnost acetona in ne dovolj natančno tesnjenje zamaškov na epruvetah z vzorci.

Med ekstrakti z acetonom je največja razlika v koncentraciji ekstrahiranih polifenolov med ciklom 4 in 5, med naslednjimi pa se le nekoliko zmanjša. Na podlagi tega ne morem določiti najprimernejšega števila ciklov, saj bi lahko koncentracija v katerem izmed kasnejših ciklov ponovno skokovito narasla. Kljub temu menim, da je za eksperimentalno delo dovolj šest ciklov, saj nato ekstrakcija postane preveč potratna.

4.3 Ekstrakti z etanolom

4.3.1 Merjenje absorbance

Ponovno sem uporabila isti postopek, v bučko Soxhletovega aparata pa sem tokrat prelila 150 mL etanola in odtehtala 10,20 gramov narezanih oljčnih listov za ekstrakcijo. Ekstrakte sem razredčila v istem razmerju in jih obdelala. Tudi tokrat je bil čisti ekstrakt intenzivno zelene barve zaradi raztopljenega klorofila, po obdelavi pa se je obarval modro in pridobil intenziteto obarvanosti med inkubacijo. Spektrofotometer sem umerila z deionizirano vodo in izmerila absorbance vzorcev, ki so razvidne iz grafa 4.



Graf 4: Absorbanca vzorcev ekstraktov z etanolom, merjena pri 766nm (vir: lasten)

4.3.2 Računanje koncentracije polifenolov

Iz pridobljenih podatkov sem izračunala koncentracije, ki so razvidne iz spodnje tabele 4.

Tabela 4: Koncentracija polifenolov v ekstraktih z etanolom (vir: lasten)

Ekstrakt	Absorbanca pri 766 nm	Koncentracija v vzorcu (mg/mL)	Koncentracija v ekstraktu (mg/mL)
1	0,3610	0,1551	0,7753
2	0,5020	0,2194	1,0969
3	0,4780	0,2084	1,0422
4	0,7850	0,3485	1,7425
5	0,8560	0,3809	1,9044
6	1,0700	0,4785	2,3926

Ponovno lahko opazimo naraščanje koncentracije polifenolov v ekstraktih v sorazmerju s številom ciklov. Pojavijo se odstopanja, ki jih pripisujem napaki ali nenatančnosti v izvajanju postopka, a trend ostaja. Razlika v koncentraciji med petim in šestim ciklom je še zmeraj velika, zato ne morem predvidevati, da se učinkovitost ekstrakcije zmanjšuje.

4.4 Oljčni listi kot potencialni vir polifenolov

Hipoteza 1: Oljčni listi so potencialni vir polifenolov.

Raziskovalno vprašanje 1: Ali oljčni listi vsebujejo polifenole in ali so njihov potencialni vir?

Moja raziskava je potrdila prisotnost polifenolov v oljčnih listih in mi omogočila določitev njihovih koncentracij v ekstraktih. S tem sem pokazala, da so oljčni listi potencialni vir naravnih antioksidantov oziroma polifenolov. Vprašanje za prihodnje raziskave bi lahko bilo ali so oljčni listi tudi primeren nadomestek za oljčno olje kot vir polifenolov. Za to bi morala primerjati podatke o vsebnosti polifenolov v oljčnih listih in plodovih oljke oziroma oljčnem olju. Pri tem bi lahko primerjala podatke, ki sem jih pridobila z eksperimentalnim delom in podatke, ki bi jih pridobila sekundarno. A zaradi razlike v viru, ki vodi do primerjave podatkov o plodovih in listih različnih oljk, ki so po možnosti obdelani po različnih postopkih, dobljena primerjava ne bi bila zanesljiva. To me pripelje do druge možnosti za primerjavo, ki vključuje nadaljnje raziskovanje na tem področju, kjer bi samostojno izmerila vsebnost polifenolov v oljčnih plodovih in pridobila bolj primerljive podatke. S tem bi se namreč izognila vplivu drugih spremenljivk na vsebnost polifenolov v ekstraktih oljčnih listov in plodov oziroma olja.

Dodaten dejavnik, ki bi lahko vplival na nenatančnost rezultatov je uporaba Folin-Ciocalteujevega reagenta za obarvanje ekstraktov. Takšna metoda je praktična in pogosto uporabljena, a velikokrat kritizirana, saj so pridobljeni rezultati odvisni od vrste fenolnih spojin, ki so prisotne v vzorcu. Na verodostojnost rezultatov lahko vplivajo tudi reducirajoče substance v ekstraktu kot so reducirajoči sladkorji, aminokisljine, organske kisline in ostali reducenti (Manzin, 2010).

Dodatne raziskave bi potrdile, da so oljčni listi potencialni vir polifenolov in bi lahko vodile do spremembe njihovega vira. To bi doprineslo k potencialno cenejšemu in vsekakor bolj ekonomičnemu pridobivanju. Oljčni listi so namreč rastlinski odpad po obrezovanju oljčnih nasadov. Trenutno pridobivanje polifenolov temelji na oljčnem olju, ki poleg antioksidantov vsebuje tudi druge koristne snovi, ki jih med predelavo ne izkoristijo. Uporaba oljčnih listov kot vir polifenolov bi torej temeljila na rastlinskem odpadku, ki je neprimerno cenejši, in omogočila boljšo porabo vseh koristnih snovi v oljčnem olju.

4.5 Najprimernejše število ciklov

Hipoteza 2: Koncentracija polifenolov v ekstraktu narašča s številom ciklov Soxhletove ekstrakcije do neke zgornje meje. Predvidevamo, da zadošča 6 ciklov.

Raziskovalno vprašanje 2: Pri kolikšnem številu ciklov je ekstrakcija najbolj učinkovita, če upoštevamo razmerje med koncentracijo ekstrahiranih polifenolov in porabo časa ter energije?

Na to vprašanje ne morem odgovoriti zgolj na podlagi dobljenih podatkov. Opravila sem zgolj šest ciklov ekstrakcije z vodo in etanolom in sedem z acetonom. Po tem številu sem ocenila, da sem pridobila dovolj podatkov za izvedbo osnovnega dela svoje raziskovalne naloge – določiti ali oljčni listi vsebujejo polifenole in ali ti predstavljajo potencialni vir polifenolov.

Vprašanje o najprimernejšem številu ciklov ostaja neodgovorjeno in nudi možno smer raziskovanja v prihodnosti. Med analiziranjem pridobljenih podatkov vodnih ekstraktov sem opazila postopno zmanjševanje razlike v koncentraciji polifenolov med ekstrakti, kar bi lahko kazalo na to, da učinkovitost ekstrakcije pada z večanjem števila ciklov. V primeru, da bi nadaljevala z meritvami, bi pričakovala trendno krivuljo, pri kateri bi se večanje koncentracije postopoma manjšalo in se bi ta na neki vrednosti ustalila.

4.6 Najprimernejše topilo

Raziskovalno vprašanje 3: Katero topilo, voda, aceton ali etanol, je najprimernejše, če upoštevamo razmerje med koncentracijo ekstrahiranih polifenolov, porabo časa in energije ter ceno?

Pri določanju najprimernejšega topila za ekstrakcijo polifenolov sem upoštevala tri glavne dejavnike: količino polifenolov, ki smo jo uspeli ekstrahirati s tem topilom, hitrost in porabo energije za ekstrakcijo in ceno ekstrakcije.

Iz podatkov v tabelah 2, 3 in 4 je razvidno, da sem po 6 ciklih uspela ekstrahirati največje koncentracije polifenolov z uporabo vode in etanola, pri čemer so koncentracije v vodnih ekstraktih le nekoliko višje.

Takšna razlika je posledica različne strukture topil. Etanol in voda sta protični topila, saj vsebujeta kovalentno vez med kisikom in vodikom, zaradi česar lahko tvorita vodikove vezi in oddajata protone. Polifenoli prav tako vsebujejo vez med kisikom in vodikom in so po strukturi bolj podobni vodi in etanolu kot acetonu, ki ne spada med protična topila. Iz teh razlogov so etanol, voda in polifenoli bolj polarni in si med seboj bolj podobni in je koncentracija ekstrahiranih polifenolov v teh dveh topilih višja.

Naslednja dejavnika sta ekonomičnost ekstrakcije in cena. Odločila sem se, da je najboljši način primerjave topil izračun njihove učinkovitosti in primerjava dobljenih številčnih podatkov. V račun sem vzela energijo, potrebno za en cikel Soxhletove ekstrakcije, ki sem jo določila na podlagi vrelišča, specifične in izparilne toplote topil. Prištela sem ceno energije oz. elektrike, ceno in količino topila ter ceno energije potrebne za sušenje ekstraktov. Izgube sem zanemarila. Podatke sem nato preračunala za šest ciklov Soxhletove ekstrakcije in jih primerjala s koncentracijo ekstrahiranih polifenolov po šestih ciklih. Na podlagi tega sem določila količino in ceno topila, potrebnega za ekstrakcijo enega grama polifenolov. Isto sem ponovila za ceno energije ter preračunala maso listov, ki je potrebna za pridobitev 1 g polifenolov. Na koncu sem zapisala skupno ceno ekstrakcije, ki odraža učinkovitost ekstrahiranja z določenim topilom. Pridobljeni številčni podatki so predstavljeni v tabeli 5.

Tabela 5: Primerjava učinkovitosti vode, acetona in etanola kot topila za Soxhletovo ekstrakcijo polifenolov (vir: lasten)

Topilo	Voda	Aceton	Etanol
Energija potrebna za en cikel Soxhletove ekstrakcije (kJ/kg topila)	2590	595	989
Cena topila (€/L)	0,00081 (Mariborski vodovod, 2020)	28 ²	34 ² (z davki/trošarino)
Cena elektrike za negospodinjstva (EUR/kWh) (Statistični urad Republike Slovenije, 2021)	0,09 (0,000025 EUR/kJ)	0,09 (0,000025 EUR/kJ)	0,09 (0,000025 EUR/kJ)
Koncentracija polifenolov po šestih ciklih Soxhletove ekstrakcije (mg/mL)	2,4131	0,7183	2,3926
Količina topila potrebnega za ekstrakcijo 1,00 g polifenolov (mL)	414,4	1392	418,0
Cena topila za ekstrakcijo 1,00 g polifenolov (EUR)	0,00034	38,98	14,21
Cena elektrike za ekstrakcijo in pridelavo 1,00 g	0,19	0,11	0,06

² Približke cen sem določila s primerjavo treh spletnih trgovin s kemikalijami: Mikro+Polo, Sigma-Aldrich in Fluka

suhega ekstrakta polifenolov (EUR)			
Masa listov potrebna za ekstrakcijo 1,00 g polifenolov (g)	28,3	94,7	28,4
Skupna cena ekstrakcije 1,00 g polifenolov (EUR)	0,19	39,10	14,27

Voda ima izmed vseh treh topil najvišje vrelišče, nato sledi etanol in zadnji, z najnižjim vreliščem, je aceton (glej tabelo 1). Posledično voda potrebuje največ časa in energije za en cikel Soxhletove ekstrakcije, aceton pa najmanj. A zaradi nizkih koncentracij ekstrahiranih polifenolov v acetonu, bi ekstrakcija z njim potrebovala več ciklov, da bi dosegli podobno koncentracijo polifenolov kot v vodnih ali etanolnih ekstraktih. Možno je tudi, da večjih koncentracij ekstrahiranih polifenolov z acetonom sploh ne bi bilo možno doseči. Zaradi tega lahko zaključim, da je aceton najmanj primerno topilo.

Odločitev med vodo in etanolom ni tako enoznačna. Izračun cene za merilo učinkovitosti se mi je zdel najprimernejši, saj na denarju temelji celotna družba in še posebej proizvodnja. Predvidevam, da v industrijski ekstrakciji ne bi uporabljali destilirane ali deionizirane vode, zato sem za približek cene uporabila podatke za vodovodno vodo. Ta je v primerjavi z drugimi topili neprimerno cenejša, kar se pozna pri končnem izračunu cene. Voda je v tem pogledu najučinkovitejše topilo, a ekstrakcija z njo traja neprimerno dlje. Poleg tega nisem upoštevala možnosti ponovne uporabe topil, kar bi izredno zmanjšalo ceno ekstrakcije in v tem primeru bi etanol lahko bil najbolj učinkovito topilo. Vsekakor bi bila ekstrakcija z njim manj časovno potratna, večji problem pa bi še zmeraj predstavljala cena, saj vključuje tudi trošarino.

Voda bi torej bila najprimernejše topilo, če čas ekstrakcije ne bi igral pomembne vloge, etanol pa bi prevladal v primeru, da bi ga lahko uporabili večkrat zapored.

Hkrati se moramo zavedati, da sem eksperimente izvedla zgolj enkrat, zato so podatki lahko nezanesljivi. Celoten postopek bi bilo potrebno ponoviti še vsaj enkrat, idealno pa bi bilo, da bi imela podatke iz petih ponovitev. Kaj takega ni bilo možno, saj nam je pandemija onemogočila vstop v šolo za kar nekaj časa.

5. DRUŽBENA ODGOVORNOST

V današnji družbi vedno bolj zagnano iščemo podatke in nasvete o zdravi prehrani in zdravem življenjskem slogu. Za takšnega velja tudi sredozemski način življenja in tamkajšnja prehrana, ki vsebuje med drugim veliko oljčnega olja. To velja za zdravo in polno vitaminov in fenolnih spojin, ki naj bi pomagale preprečevati rakava obolenja in druge bolezni. Zato jih marsikdo uživa kot prehranski dodatek, kljub temu da uradno niso na seznamu živil, ki bi pomagale pri preventivi. Poleg tega so polifenoli ena izmed sestavin različnih kozmetičnih in farmacevtskih pripravkov.

Prehranski dodatki z vsebnostjo polifenolov so pogosto pridobljeni iz oljčnega olja, ki je precej drago. V raziskovalni nalogi sem pokazala, da bi namesto iz oljčnega olja polifenole lahko ekstrahirali iz oljčnih listov, ki so stranski produkt pridelave olja in posledično veliko cenejši. Prehranski dodatki s polifenoli iz oljčnih listov so enako kvalitetni, a hkrati cenejši. S tem bi postali dostopni več ljudem, hkrati pa bi zanje porabili odpadne oljčne liste in oljčno olje raje uporabili nepredelano in s tem zaužili tudi druge koristne snovi, ki jih vsebuje.

Poleg tega, bi uporaba odpadnih oljčnih listov predstavljala začetek krožnega gospodarstva in bolj ekonomične uporabe naravnih virov polifenolov.

6. ZAKLJUČEK

Glavni namen te naloge je bilo dokazati, da oljčni listi vsebujejo polifenole in so njihov potencialni vir, kar navaja hipoteza 1. Polifenole sem iz oljčnih listov ekstrahirala s Soxhletovo ekstrakcijo in tremi različnimi topili. Polifenoli so se v različnih koncentracijah pojavili v vseh treh, kar nedvoumno potrди mojo hipotezo.

Višje koncentracije so vsebovali vodni in etanolni ekstrakti, zato sta ti dve topili primernejši kot aceton, saj je ekstrakcija z njima bolj učinkovita. Največjo učinkovitost dosežemo z uporabo etanola, saj cikli Soxhletove ekstrakcije z njim potekajo hitreje. Kljub temu bi v primeru večje proizvodnje polifenolov z ekstrakcijo morali upoštevati tudi ceno topil, kar pomeni, da bi bila voda bolj primerno topilo.

Sčasoma bi ekstrakcija polifenolov iz oljčnih listov lahko nadomestila ekstrakcijo iz oljčnega olja, saj listi predstavljajo cenejši vir polifenolov. Ali bi bili primeren nadomestek za oljčno olje, bi bilo potrebno natančneje raziskati, kar je poleg določanja najbolj učinkovitega števila ciklov v Soxhletovi ekstrakciji potencialna tema za prihodnje raziskovalne naloge.

7. VIRI IN LITERATURA

7.1 Viri

- Allott, A. & Mindorff, D., 2014. *Biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Barber, S., 2015. *Spektrofotometrične metode za določanje antioksidativnosti spojin, namenjenih obdelavi tekstilnih materialov*. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo.
- Britannica Library, 2021. *Chemical analysis*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://library-eb-co-uk.evirilook.sik.si/levels/adult/article/chemical-analysis/110403#80797.toc> [Uporabljeno: 15. februar 2021].
- Bylikin, S., Horner, G., Murphy, B. & Tarcy, D., 2014. *Chemistry*. Oxford: Oxford University Press.
- Encyclopedia.com, 2019. *Oxidation potential*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/oxidation-potential#mlaTab0> [Uporabljeno: 21. februar 2021].
- Engineering ToolBox, 2021. *Fluids - Latent Heat of Evaporation*. [Spletna stran]. Dostopno na: https://www.engineeringtoolbox.com/fluids-evaporation-latent-heat-d_147.html [Uporabljeno: 20. marec 2021].
- Engineering ToolBox, 2021. *Specific Heat of some Liquids and Fluids*. [Spletna stran]. Dostopno na: https://www.engineeringtoolbox.com/specific-heat-fluids-d_151.html [Uporabljeno: 20. marec 2021].
- Internetchemie, 2021. *Oleuropein*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://www.internetchemie.info/chemie-lexikon/stoffe/o/oleuropein.php> [Uporabljeno: 21. februar 2021].
- Luque de Castro, M. D. & Garcia Ayuso, L. E., 2000. *Soxhlet extraction*, Cordoba: Academic Press.
- Manzin, V., 2010. *Vsebnost fenolnih spojin in antioksidativna učinkovitost ekstraktov listov in plodov oljke (Olea europaea L.)*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

- Mariborski vodovod, 2020. *Cenik oskrbe s pitno vodo*. [Spletna stran]. Dostopno na: https://www.mb-vodovod.si/wp-content/uploads/2017/Ceniki/cenik_maribor.pdf [Uporabljeno: 20. marec 2021].
- Prehrana.si, 2016. *Antioksidanti*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://prehrana.si/clanek/181-antioksidanti> [Uporabljeno: 1. maj 2020].
- Slovenska poslovna točka, 2020. *Proizvodnja zdravilnih učinkovin*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://spot.gov.si/sl/dejavnosti-in-poklici/dejavnosti/proizvodnja-zdravilnih-ucinkovin/> [Uporabljeno: 21. februar 2021].
- Sousa, S. R., 2009. *UV-VIS Spectroscopy - Chemical Analysis*. [pdf dokument]. Dostopno na: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/UV-VIS%20Spectroscopy%20for%20Chemical%20Analysis_012109.pdf [Uporabljeno: 21. februar 2021].
- Statistični urad Republike Slovenije, 2021. *Cene energentov*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://www.stat.si/StatWeb/Field/Index/5/30> [Uporabljeno: 20. marec 2021].
- TutorVista.com, 2019. *UV visible spectrophotometer*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://chemistry.tutorvista.com/inorganic-chemistry/uv-visible-spectrophotometer.html> [Uporabljeno: 6. februar 2019].
- Wikipedija, 2021. *Fenol*. [Spletna stran]. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Fenol> [Uporabljeno: 14. februar 2021].