

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja

Grgić, Jovana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:937747>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Jovana Grgić

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG OTPADA
PRIMJENOM VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Jovana Grgić

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG OTPADA
PRIMJENOM VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Optimizacija i projektiranje industrijskih procesa
Tema rada je prihvaćena na VII redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 30. svibnja 2019.
Mentor: prof. dr. sc. *Stela Jokić*
Pomoć pri izradi: *Marija Banožić*, mag.ing.preh.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja *Jovana Grgić, 3895/14*

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem s obzirom da ovaj tip ekstrakcije na duhanskom otpadu još uvijek nije istražen. Postupak ekstrakcije duhanskog otpada (duhanska prašina, duhansko rebro i refabrikat) proveden je pri različitim procesnim uvjetima: omjer tekuće/kruto (300:1, 500:1, 700:1 mL/g), frekvencija (40, 70, 100 Hz), vrijeme (15, 30, 45 min) kako bi se ispitaio utjecaj uvjeta na sadržaj fenolnih komponenti te antioksidacijska aktivnost ekstrakata. Osim toga, tijekom procesa praćene su promjene temperature, pH vrijednosti i elektrovodljivosti. Na osnovu eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa optimiran je proces ekstrakcije. Značenje predloženog istraživanja ogleda se u maksimalnom iskorištavanju nusproizvoda biljnog podrijetla, a u cilju dobivanja ekstrakata koji se mogu implementirati u druge proizvode i procese. Time je proces prerade duhana zaokružen i ne stvara se velika količina otpada koja predstavlja ogromno financijsko i ekološko opterećenje.

Ključne riječi: duhanski otpad, ekstrakcija, visokonaponsko električno pražnjenje, optimizacija, metoda odzivnih površina

Rad sadrži: 70 stranice
18 slika
14 tablica
0 priloga
115 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

1. izv. prof. dr. sc. <i>Đurđica Ačkar</i>	predsjednik
2. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>	član-mentor
3. doc. dr. sc. <i>Antun Jozinović</i>	član
4. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i>	zamjena člana

Datum obrane: 30. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Process Design and Construction Materials
Franje Kuhača 20, HR-31 000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Course title: Process Design and Optimisation
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VII held on May 30th 2019.
Mentor: *Stela Jokić*, PhD, full prof.
Technical assistance: *Marija Banožić*, MSc

High-Voltage Electric Discharge Extraction of Bioactive Compounds From Tobacco Waste

Jovana Grgić 3895/14

Summary:

The objective of this study was to investigate the efficiency of high voltage electric discharge assisted extraction of bioactive compounds from tobacco waste due to the fact that this type of extraction on tobacco waste has not been researched yet. Tobacco waste (dust, midrib and scrap) were subjected to an extraction process under various different experimental conditions: liquid-to-solid ratio (300:1, 500:1, 700:1 mL/g), frequency (40, 70, 100 Hz) and treatment time (15, 30, 45 min) in order to study the effect of these conditions on the content of phenolic compounds and the corresponding antioxidant activity of extracts. Temperature change and change of pH value and electrical conductivity of samples after high-voltage electric discharge treatment were also observed. The optimal conditions for the extraction were determined by Response Surface Methodology using the Box-Behnken design. The merit of the proposed research is reflected in the maximum utilization of the by-product of plant origin, in order to obtain extracts that can be implemented in other products and processes. Thus, the process of tobacco processing is rounded up and amount of waste, which is a huge financial and ecological problem, is reduced.

Key words: tobacco waste, extraction, high-voltage electric discharge, optimization, response surface methodology

Thesis contains: 70 Pages
18 Figures
14 Tables
0 Supplement
115 References

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Đurđica Ačkar</i> , PhD, associate prof. | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Antun Jozinović</i> , PhD, assistant prof. | member |
| 4. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, full prof. | stand in |

Defense date: September 30, 2019.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. DUHAN	4
2.1.1. Botanička, tehnološka i industrijska klasifikacija duhana	4
2.1.2. Kvaliteta duhanske sirovine	6
2.1.3. Svjetska proizvodnja duhana i njezin utjecaj na okoliš.....	7
2.2. DUHANSKI OTPAD.....	9
2.2.1. Bioaktivne komponente prisutne u duhanskom otpadu	10
2.2.2. Klorogenska kiselina.....	12
2.3. EKSTRAKCIJA	15
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem.....	15
2.3.1.1. UVJETI EKSTRAKCIJE/ KRITIČNI PROCESNI PARAMETRI	17
2.4. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE	21
2.4.1. Box-Behnken plan pokusa.....	24
3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. ZADATAK	27
3.2. MATERIJALI	27
3.2.1. Kemikalije i uređaji.....	28
3.3. METODE	29
3.3.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem.....	29
3.3.2. Praćenje promjene temperature, elektroprovodljivosti i pH vrijednosti suspenzije	30
3.3.1. Određivanje ukupnih fenola	31
3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	31
3.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	32
3.3.4. Optimiranje procesa ekstrakcije duhanskog otpada primjenom RSM-a	33
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	35
4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA PROMJENU TEMPERATURE, pH VRIJEDNOSTI, ELEKTROPROVODLJIVOSTI, ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST TE EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLA I KLOGROGENSKE KISELINE U DUHANSKOM OTPADU	36
4.2. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE U CILJU POSTIZANJA MAKSIMALNOG SADRŽAJA KLOGROGENSKE KISELINE	42
5. ZAKLJUČAK	50
6. LITERATURA	53

POPIS OZNAKA I SIMBOLA

OZNAKE

E- jakost električnog polja [kV/cm]

V- napon [kV]

d- razmak između elektroda [cm]

$\Delta\sigma$ - promjena električna provodljivost [$\mu\text{S}/\text{min}$]

ΔT - promjena temperature [$^{\circ}\text{C}$]

ΔpH - promjena pH vrijednosti

t-vrijeme [min]

f -frekvencija [Hz]

SIMBOLI

GJ – gigadžula

Mt- megatona

Z- indeks elektroprovodljivosti

y- modelom predviđena odzivna funkcija

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

c_p - broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

k - broj faktora

ε - rezidual

R^2 - koeficijent determinacije

KRATICE

VNEP visokonaponsko električno pražnjenje (engl. High-Voltage Electric Discharge, HVED)

BBD Box-Behnken plan pokus

PBD Plackett-Burmanov plan pokusa (engl. Plackett-Burman Design)

CCD centralno kompozitni plan pokusa (engl. Central-Composite Design)

FFD faktorijalni plan pokusa (engl. Full Factorial Design)

RSM metoda odzivne površine (engl. Response Surface Methodology)

SFE ekstrakcija superkritičnim fluidom (engl. Supercritical Fluid Extraction)

MAE ekstrakcija mikrovalovima (engl. Microwave Assisted Extraction)

UAE ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. Ultrasound Assisted Extraction)

PEF ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (engl. Pulsed Electric Field)

ANOVA analiza varijance (engl. Analysis of Variance)

RSM metoda odzivnih površina (engl. Response Surface Methodology)

GAE galna kiselina (engl. Gallic Acid)

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performanse Liquid Chromatography)

DPPH 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil

AOA antioksidativna aktivnost (engl. Anti-Oxidant Activity)

CGA klorogenska kiselina (engl. Chlorogenic Acid)

LOD granica detekcije (engl. Limit of Detection)

LOQ granica kvantifikacije (engl. Limit of Quantification)

1. UVOD

Duhan je jedna od ekonomski najvažnijih industrijskih biljaka. Najvrjedniji dio ove biljke su listovi. Listovi, koji nisu zadovoljili klasifikaciju prema važećim standardima, rebro lista, stabljika i korijen smatraju se otpadom. Duhanski otpad nastaje u svim procesima, od uzgoja, prilikom obrade i prerade duhana, tijekom proizvodnje duhanskih proizvoda kao i njihovim konzumiranjem. Tijekom proizvodnog procesa nastane više od 20 % duhanskog otpada (Zhang i sur., 2012.) čije zbrinjavanje je obično prepušteno duhanskim tvrtkama. Poznato je da duhanski otpad još uvijek sadrži visoke razine nikotina, koji je visoko topljiv u vodi, zbog čega se duhanski otpad ne može odlagati zajedno sa gradskim otpadom, već se mora uništiti pod posebnim uvjetima. Osnovni cilj istraživanja u području upravljanja duhanskim otpadom je, prije svega, skretanje pažnje javnosti na mogućnosti dobivanja proizvoda koji imaju uporabnu vrijednost. Duhanski otpad se može nakon postupka denikotinizacije koristiti kao dobar insekticid. Organski ostatak bez nikotina može biti briketiran, upotrijebljen kao gorivo ili kao organski otpad za kompostiranje. Nadalje, pokazalo se da je duhanski otpad bogat izvor visokovrijednih komponenti. Pored nikotina i solanesola, duhanski otpad predstavlja značajan izvor polifenola među kojima dominiraju klorogenske kiseline čime duhanski otpad postaje potencijalno vrijedna sirovina u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Cilj ovog rada bio je provesti ekstrakciju potpomognutu visokonaponskim električnim pražnjenjem na trima uzorcima duhanskog otpada (duhanskoj prašini, duhanskom rebro i refabrikatu) i pritom pratiti promjenu temperature, pH vrijednosti i elektrovodljivosti. Nadalje, cilj je bio identificirati klorogensku kiselinu u dobivenim ekstraktima te definirati optimalne parametre za provedbu ekstrakcije kako bi se dobile maksimalne količine klorogenske kiseline.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. DUHAN

2.1.1. Botanička, tehnološka i industrijska klasifikacija duhana

Duhan je ime biljke koja pripada carstvu *Plantae*, diviziji *Magnoliophyta*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Solanales*, porodici *Solanaceae* te rodu *Nicotiana* koji obuhvaća sedamdesetak do sada poznatih vrsta, no za kulturu su od značaja samo dvije, *tabacum* (obični duhan) i *rustica* („krdža“).

Također, duhan je ime sušenog i obrađenog lišća te biljke i nekih produkata koji se dobivaju njegovom preradom ili točnije “Duhan su listovi kultivirane biljne vrste *Nicotiana tabacum* L. u svim oblicima i stupnjevima uzgoja, obrade i pakiranja koji ne služe krajnjoj potrošnji” (Zakon o duhanu , NN 32/19, članak 2., 2019.).

Nicotiana tabacum L. (**Slika 1**) je jednogodišnja zeljasta biljka koja se uzgaja radi listova koji su poslije sušenja i fermentacije/oplemenjivanja glavna sirovina za izradu duhanskih proizvoda.



Slika 1 Građa biljke *Nicotiane Tabacum* (Web 1)

Sazrijevanje listova odvija se u insercijama¹ (podbir, nadpodbir, srednje lišće, podovršak i ovršak) te počinje od donjeg dijela stabljike i ide postupno prema vrhu te se tim redom

¹ Insercije ili grupe. Svaka insercija sadrži određen broj listova koji se skidaju u već naglašenom zreom stanju. Žućkasto zelena boja na vrhovima i rubovima lista indikator je zriobe, znak da se list može ubrati i spremiti na sušenje.

obavlja i berba listova. Najkrupnije lišće je ono koje se razvija u srednjem dijelu stabljike, na koje otpada 45 % listova od ukupne berbe, dok idući prema vrhu i osnovi veličina listova se smanjuje (Gadžo i sur., 2011.).

U trgovini duhanom stvoren je velik broj podjela duhana u robne tipove. Jedna od takvih podjela uvjetovana je geografskim podrijetlom duhana pa razlikujemo tipove kao što su Virginia, Burley, Maryland, Prilep, Jaka...

Tehnološka klasifikacija duhana se određuje prema načinu sušenja duhanske sirovine. Sušenje obuhvaća dvije kvalitativno različite faze: štavljenje/žućenje i isušivanje. U fazi štavljenja lišće još živi, ali fiziološki gladuje i stoga vene. U njemu se odvija niz fizioloških procesa kojima je krajnji rezultat hidrolitički raspad glukozida, ugljikohidrata i proteina. Glukozidi se pri tom raspadaju na šećere i polifenole. Složeni ugljikohidrati (škrob, dekstrin, lignin) pretvaraju se u jednostavnije (maltozu, saharozu, glukozu) od kojih se jedan dio oksidira u ugljični dioksid i vodu. Hidrolitičkom razgradnjom proteina nastaju polipeptidi, peptidi, aminokiseline i amidi (Frankenburg, 1946.). Od alkaloida u duhanu, nikotin se razgrađuje 30 %. Klorofil se razlaže raspadanjem bjelančevina kloroplasta te list dobiva žutu boju jer postaje vidljiva boja karotena i ksantofila koju je prekrivala boja klorofila. Kad lišće požuti, štavljenje se prekida drugom fazom, fazom isušivanja ili sušenja u užem smislu.

Prema načinu sušenja razlikujemo četiri tipa duhana od kojih je najzastupljeniji tzv. *flue-cured* duhan koji se suši toplim zrakom u sušnicama i služi prvenstveno za pravljenje cigareta. Zatim slijedi tzv. *air-cured* duhan koji se suši prirodnim zrakom bez direktnog izlaganja suncu gdje razlikujemo svijetle tipove (Virginia, Burley i Maryland) koji služe kao sirovina za cigarete, tamne za žvakanje, šmrkanje ili kao mješavina za lulu, a cigarni tip služi za punjenje i omatanje cigara. Orijentalni i poluorijentalni tipovi duhana se dobivaju sušenjem na suncu (*sun-cured* duhani), dok duhani sušeni iznad otvorene vatre (*fire-cured*) su intezivne boje i mirisa i stoga najmanje zastupljeni kao sirovina u duhanskoj industriji. Prema uporabi u duhanskoj industriji svi tipovi duhana su podijeljeni u: duhane za pušenje (duhani za cigare, za cigarete i za lule), duhane za žvakanje i duhane za šmrkanje. Prethodno spomenuta industrijska klasifikacija duhana se zasniva na njegovoj uporabnoj vrijednosti te kvaliteti duhanske sirovine.

2.1.2. Kvaliteta duhanske sirovine

Kvaliteta duhanske sirovine ili njezinih mješavina i prerađevina iskazuje se indeksima kvalitete od kojih se najviše upotrebljava Šmukov broj (engl. Schmuck number) koji predstavlja odnos monosaharida (fruktoza, glukoza) i proteina u duhanu. Što je njegova numerička vrijednost veća ($>1,2$), kvaliteta duhana je bolja jer ukoliko je udio proteina u duhanu veći od udjela monosaharida duhan slabije gori, neugodnog je mirisa, osjeća se gorak okus i izaziva podražaj na kašalj. Nadalje, udio ugljikohidrata, koji pozitivno djeluju na kvalitetu duhana jer pri pušenju daju organske kiseline, aldehide, ketone i fenole koji poboljšavaju aromu dima, u kvalitetnim duhanima je oko 10 % (Mendell i sur., 1984.). Pozitivnim sastojcima smatraju se polifenoli te smole i eterična ulja koja također poboljšavaju aromatičnost duhana, dok mineralne tvari (K, Ca, Mg, Na, Mn, P i dr.) poboljšavaju sagorljivost i ravnomjernost sagorijevanja duhana (Gadžo, 2011.). Pored bjelančevina, u ocjeni kvalitete cigaretnog duhana, najvažniji alkaloid u duhanu - nikotin se također smatra negativnim sastojkom (ukoliko mu je udio veći od 1,5 %).

Udio svih prethodno spomenutih kemijskih spojeva (**Tablica 1**) uvjetovan je sortama duhana, insercijama, vremenom berbe, faktorima tla i klime, odabranim i primijenjenim agrotehničkim mjerama, stupnjem oštećenosti lista te je promjenjiv i prilikom obrade (sušenja i fermentacije) i prerade (faza kondicioniranja) duhanskog lista.

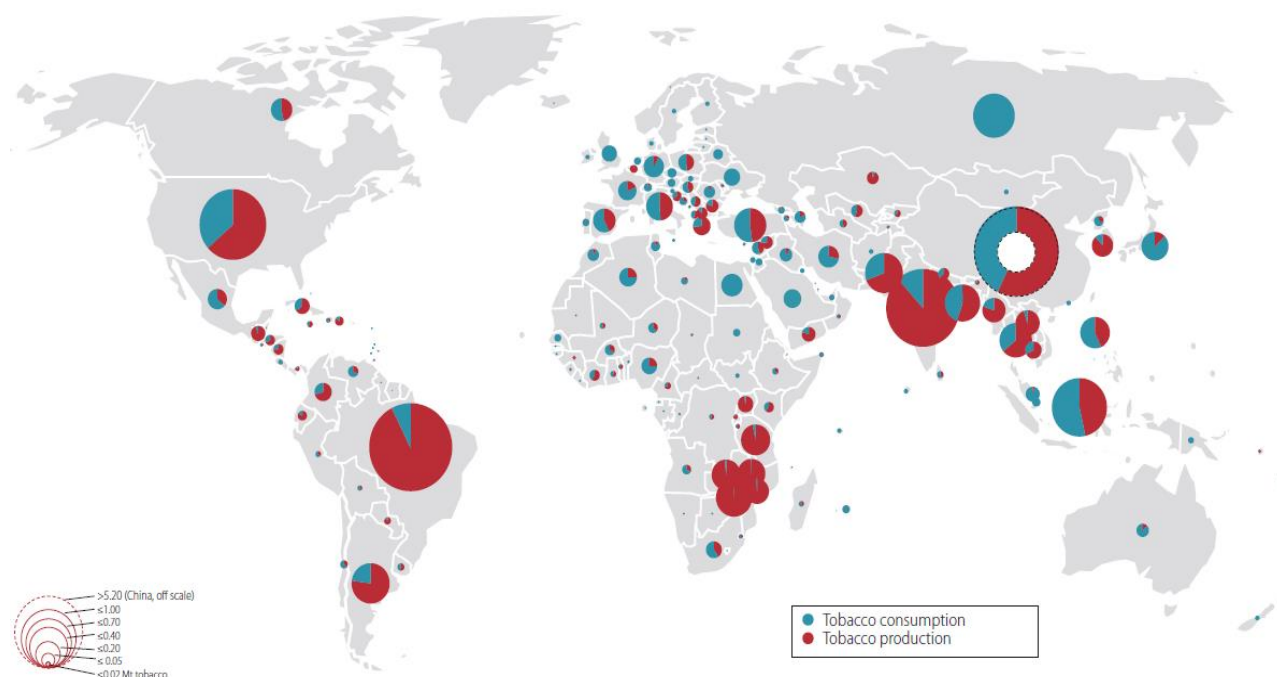
Tablica 1 Prosječan kemijski sastav srednjeg lišća nekih sorti duhana nakon obrade sušenjem (Horvat i Krpan, 1969.)

%	Jaka	Prilep	Otelja	Ravnjak
Topljivi šećeri	14,2	16,00	9,41	7,25
Polifenoli	11,09	5,43	5,10	5,49
Bjelančevine	5,68	6,25	7,25	8,00
Nikotin	0,34	0,90	1,27	2,50
Mineralne tvari	10,53	10,62	12,42	13,04
Vlaga	5,12	4,00	6,64	6,40

2.1.3. Svjetska proizvodnja duhana i njezin utjecaj na okoliš

Industrija duhana je jedna od brzorastućih i najprofitabilnijih industrija u svijetu. U razdoblju od 2003. do 2017. godine ostvareno je povećanje profita u iznosu od 26,5 %, a samo u 2017. godini ukupni profit od prodaje duhanskih proizvoda iznosio je gotovo 700 milijardi \$ (Euromonitor International, 2018).

Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (**Slika 2**) Kina, Brazil i Indija su najveći proizvođači duhana. Kina je ujedno i najveći potrošač, a slijede je Indonezija, Rusija i SAD.



Slika 2 Svjetska proizvodnja i konzumacija cigareta u 2014. g. (Zafeiridou i sur., 2018.)

Svake godine 6 trilijuna cigareta je proizvedeno i 5,8 trilijuna konzumirano od strane milijardu pušača diljem svijeta (Eriksen i sur., 2015.). Iako su štetne posljedice po zdravlje čovjeka ustanovljene, činjenice o utjecaju duhanske industrije i pušenja na okoliš su zanemarivane. Da bi se razumio sveobuhvatan utjecaj proizvodnje i konzumacije cigareta na okoliš, mora se u obzir uzeti kompletan proizvodni i distribucijski lanac.

Štetan utjecaj na okoliš započinje već s uzgojem duhana. Uzgoj duhana zahtijeva velike obradive površine koje su do 2012. godine iznosile 4,3 milijuna hektara (WHO, 2017.) i ogromne količine vode za navodnjavanje te se duhan često uzgaja na poljoprivrednim zemljištima bez izmjene sa drugim poljoprivrednim kulturama čime se tlo iscrpljuje te

postaje neotporno na različite nametnike i uzročnike bolesti (Leppan i sur., 2014.). Stoga duhan, kao mono-usjev, zahtijeva upotrebu velikih količina insekticida, herbicida, fungicida i regulatora rasta za suzbijanje nametnika i bolesti (Almeida, 2005; Arcury i sur., 2006.). Biljka duhana apsorbira više N, P i S od drugih usjeva čime zahtijeva veću uporabu gnojiva, a povrh toga uobičajena je agrotehnička mjera otkidanje ("topping") vrška stabljike biljke duhana čime se sprječava formiranje sjemena i njegovo rasipanje po tlu s ciljem jačanja listova i povišenja sadržaja nikotina. Primjena takve mjere dodatno crpi hranjive tvari iz tla i dovodi do njegove degradacije (Chhabra, 2006.).

Nadalje, uzgoj duhana kao i njegovo sušenje i pakiranje uzročnici su deforestacije jer krčenjem šuma osigurava se neophodno zemljište za uzgoj, drvo je potrebno za gorenje i sušenje tzv. *air-cured* duhana, osnovna je sirovina za proizvodnju omota za cigarete te primarne i sekundarne ambalaže (Geist, 1999.).

Prema godišnjim službenim izvješćima vodećih svjetskih duhanskih kompanija ², koja su često nepouzdana i netransparentna, ukupna potrošnja energije za proizvodnju 6 trilijuna cigareta godišnje iznosila je 62 milijuna GJ (Zafeiridou, 2018.) što bi bilo jednako utrošku energije za proizvodnju 2 milijuna automobila (WHO, 2017.). Emisije CO₂ tijekom uzgoja duhana, sušenja, primarne obrade, proizvodnje i transporta doprinose efektu staklenika (Novotny i sur., 2015.).

Pored velikih količina vode upotrijebljenih za navodnjavanje u iznosu od 22 000 Mt godišnje za proizvodnju 6 milijuna cigareta (Zafeiridou i sur., 2018), gdje 99,8 % procjeđujući se završi u tlu sa svim kemikalijama kojima je duhan tretiran, značajne količine vode troše se i prilikom obrade i proizvodnje cigareta. Hidrocikloni koji služe za prikupljanje duhanske prašine iz zraka prilikom primarne obrade duhana te proces proizvodnje rekonstituiranog duhana imaju najveći udio u stvaranju otpadne vode duhanske industrije (EPA, 2006.). Također, Američka agencija za zaštitu okoliša navodi da veći udarac za okoliš predstavlja otpadna voda koja nastaje prilikom proizvodnje rekonstruiranog duhana nego sam duhanski otpad koji sve više pronalazi primjenu u raznim industrijskim granama.

² China National Tobacco Corporation (43 %), Phillip Morris International (14 %), British American Tobacco (12 %), Japan Tobacco (8 %) i Imperial (4 %) koje skupa čine 81 % globalnog tržišta. (Euromonitor International, 2018.)

2.2. DUHANSKI OTPAD

Prema pravilniku o katalogu otpada (NN 90/15), duhanski otpad je klasificiran kao poljoprivedno-industrijski otpad te je u Katalogu otpada označen brojem 02 03 04. U literaturi se mogu pronaći različiti podaci o količini duhanskog otpada koja nastaje prilikom procesa prerade duhana.³ Yang i sur. (2017.) navode da duhanska industrija proizvodi 20% krutog, neupotrebljivog duhanskog otpada. Prema Zhu i sur. (2010.) 30 % osušenog lišća i stabljika duhana ne zadovoljava mikrobiološke kriterije te se prilikom proizvodnje odbacuje i spaljuje.

Proces primarne obrade duhana je kompleksan i uključuje niz koraka⁴ gdje se koristi toplina i vlaga kako bi proizvod bio mekan i savitljiv i time spriječio lom duhanskog lista. Duhanski list je sastavljen od srednje žile ili glavnog rebra od kojeg se granaju sekundarna rebra što sve čini nervaturu plojke/lamine (tkiva između rebra). Fizikalna i kemijska svojstva te uporabna vrijednost plojke i rebra su potpuno različita. Postupak odvajanja rebra od lista naziva se išiljavanje/stripsiranje čime nastaje plojka bez rebra/strips i nusproizvodi: duhansko rebro (engl. midrib), refabrikat (engl. crumbs) i duhanska prašina (engl. dust), tj. čestice veličine do 0,5 mm (Slika 3).



Slika 3 Osušeni duhanski list prije i poslije išiljavanja; a) strips b) duhansko rebro c) duhanska prašina d) refabrikat (Web 2)

³ Prerada duhana obuhvaća primarnu obradu duhana te proces proizvodnje duhanskih proizvoda-cigareta.

⁴ Primarna obrada duhana uključuje pet faza: miješanje/ blendiranje lista duhana, išiljavanje/stripsiranje, kondicioniranje išiljenog duhana/redrying, pakiranje i kontrolu kvalitete.

Svi nusproizvodi duhanskog lista pronalaze upotrebu u proizvodnji duhanskih proizvoda, najčešće kao sastavnice rekonstituiranog duhana/duhanske folije, međutim na taj način se reciklira samo 40% duhanskog otpada (Li i sur., 2011.).

Ostatak duhanskog otpada se spaljuje ili završi na odlagalištima. Oba načina zbrinjavanja duhanskog otpada doprinose zagađenju okoliša te predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje prvenstveno zbog visokog sadržaja toksičnog nikotina. Jedan od načina odgovornog i učinkovitog zbrinjavanja duhanskog otpada jeste njegovo kompostiranje pri čemu dolazi do biorazgradnje nikotina, nastajanja dušika, fosfora koji zajedno sa ugljikom, u potrebnom omjeru, su neophodni za rast mikroorganizama presudnih za nastajanje organskog gnojiva u konačnici (Civilini i sur., 1997.; Zhu i sur., 2010.). Nadalje, ekstrahirani nikotin iz stabljike duhana primjenjuje se kao ekološki prihvatljiv insekticid, bioinsekticid. Prisutan u duhanskoj prašini nalazi primjenu kao sedativ za ribe tijekom njihovog pakiranja i transporta (Dinesh i sur.), a u industriji akvakulture učinkovit je molluskicid za suzbijanje puževa (Kuhn i sur., 2014.). Prema Zhu i sur. (2010.), 5% duhanskog otpada čine stabljike koje pronalaze primjenu i u građevinskoj i drvenoj industriji kao sastavnice iverice doprinoseći njezinoj čvrstoći i krutosti te otpornosti na termite zahvaljujući nikotinu sadržanom u samoj stabljici (Acda i sur., 2013.). Stabljike se smatraju i jeftinim i lako dostupnim adsorbentom sa sposobnošću vezivanja iona olova u postupku pročišćavanja otpadnih voda (Li i sur., 2008.).

2.2.1. Bioaktivne komponente prisutne u duhanskom otpadu

Duhanski otpad se odlikuje kompleksnim kemijskim sastavom. U taj sastav spadaju i bioaktivne komponente, produkti sekundarnog metabolizma biljke koje joj ne trebaju za primarne potrebe rasta i reprodukcije već za zaštitu i obranu od abiotičkih i biotičkih čimbenika stresa, dok za ljudski organizam imaju funkcionalnu vrijednost djelujući u smislu liječenja bolesti ili preventive. Dosadašnja istraživanja su pokazala da bioaktivne komponente mogu imati komplementarne i preklapajuće mehanizme djelovanja:

- antioksidativna aktivnost i vezanje slobodnih radikala,
- regulacija ekspresije gena kod stanične proliferacije, diferencijacije onkogeni i tumor supresor gena,

- indukcija zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze,
- modulacija enzimskih aktivnosti u detoksikaciji, oksidaciji i redukciji,
- stimulacija imunološkog sustava,
- regulacija hormonalnog metabolizma,
- antibakterijski i antivirusni učinci (Liu, 2004).

Tablica 2 Bioaktivne komponente prisutne u duhanskom otpadu

Bioaktivna komponenta	Bioaktivnost	Literatura
flavonoid RUTIN	antikancerogena	Lin i sur., 2012.
	redukcija veličine tumora kod leukemije	
	smanjenje broja metastaza	Martinez Conesa i sur., 2005.
	antikoagulantna	Chan i sur., 2009.
	antiastmatična	Jung i sur., 2007.
	antidepresivna	Machado i sur., 2008.
	antihipertenzivna	Kim i sur., 2009.
	analgetična i antinociceptivna	Selvaraj i sur., 2014.
	antioksidativna	Yang i sur., 2008.
	opoidna/sedativna	Hernández-Leon i sur., 2015.
	antihiperkolesterolna	da Silva i sur., 2001.
	antibakterijska	Dubey i sur., 2013.
alkaloid NIKOTIN	antifugalna	Johann i sur., 2011.
	neuroprotektivna	Kumari i sur., 2005.
aciklički triseskviterpenski alkohol SOLANESOL	protuupalna	Lakhan i sur., 2011.
	neuroprotektivna	Mehan i sur., 2018.
	antimikrobiološka	Li i sur., 2010.
	antikancerogena	Qin i sur., 2017.
	antioksidativna	Huang i sur., 2008.
diterpenski alkohol SKLAREOL	protuupalna	Yao i sur., 2017.
	antikancerogena	
derivat cimetine kiseline KLOROGENSKA KISELINA	induciranje apoptoze stanica raka	Saxena i sur., 2013.
	antioksidativna	
	antidijabetička i hipoglikemijska	Meng i sur., 2013.
	antioksidativna	Jiang i sur., 2000.
derivat cimetine kiseline KAFEINSKA KISELINA	antikancerogena	Jiang i sur., 2001.
	antioksidativna	Jung i sur., 2006.
	antiapoptotička	Khanduja i sur., 2006.
derivat kumarina SKOPOLETIN	antidepresivna	Takeda i sur., 2002.
	antioksidativna i protuupalna	Fylaktakidou i sur., 2001.
derivat skopoletina SKOPOLIN		

Iz **Tablice 2** vidljivo je da sve najznačajnije bioaktivne komponente prisutne u duhanskom otpadu posjeduju antioksidacijsku aktivnost koja se ogleda u njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala, aktiviranja antioksidacijskih enzima (Elliott i sur., 1992.) i inhibiranja oksidaza (Cos i sur., 1998.) čime se nastoje oduprijeti oksidacijskom stresu. Oksidativni stres definira se kao pomak ravnoteže u oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije, a ako govorimo o biološkim sustavima, oksidativni stres možemo opisati prekomjernim stvaranjem slobodnih radikala pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže između nastalih slobodnih radikala i staničnih mehanizama koji su odgovorni da iste uklone što u konačnici rezultira oštećenjem stanice (Dagnon i sur., 2018.). Pored rutina, flavonoida iz skupine polifenolnih spojeva za koje je općepoznato antioksidativno djelovanje (Kazazić i sur., 2004.), u duhanskom otpadu identificirane su i fenolne kiseline: galna, protokatehinska, salicilna, vanilinska, siringinska, p-kumarna, ferulinska, cimetna i sinapska kiselina te kafeinska i klorogenska kiselina (Popova i sur., 2015.) koja zajedno s rutinom čini 75-95% ukupnih polifenolnih spojeva sadržanih u listu duhana (Yang i sur., 2005.) čime duhanski otpad postaje vrijedan izvor ovih komponenti. Nadalje, duhanski otpad iznimno je bogat i solanesolom, koji sudjeluje u sintezi koenzima Q10. Solanesol se teško sintetizira zbog svoje složene kemijske strukture, sastavljene od dugačkih ugljikovodičnih lanaca, pa je zbog toga duhanski otpad idealan za njegovu ekstrakciju (Taylor i sur., 2011., Yan i sur., 2015.). U duhanu je izolirano i identificirano 40 vrsta alkaloida, a kao glavni alkaloid ističe se nikotin s udjelom od 95 % u ukupnom sadržaju alkaloida. Nornikotin, miozmin, nikotirin, kotinin te anabazin i anatabin su nenikotinske alkaloidi duhanskog otpada, koje zbog kemijske strukture sličie nikotinu, aktiviraju nikotinske acetilkolinske receptorima te, kao i nikotin, se primjenjuju u liječenju različitih neurodegenerativnih bolesti (Clemens i sur., 2009.).

2.2.2. Klorogenska kiselina

Među polifenolnim spojevima zastupljenim u duhanskim nusproduktima, klorogenska kiselina (engl. Chlorogenic Acid, CGA) se ističe kao glavna fenolna komponenta (Zhao i sur., 2010.), a pored klorogenske kiseline (IUPAC nomenklatura 5-o-kafeoilkina kiselina, 5-

CQA), u duhanskom otpadu izolirane su neoklorogenska (3-CQA) i kriptoklorogenska kiselina (4-CQA) (Wang i sur., 2010.).

Klorogenske kiseline (engl. Chlorogenic Acids, CGAs) su mono-, di-, tri- i/ili miješani esteri hidroksicimetnih kiselina (kafeinske, ferulične i p-kumarinske kiseline) i (-)-kina kiselina (Belitz i sur., 2004.). CGAs predstavljaju grupu polifenolnih spojeva čije funkcionalne karakteristike su uvjetovane brojem i položajem pojedinih acilnih skupina CGAs (Clifford, 2000). Istraživanja *in vitro* pokazala su da CGA smanjuje pretilost, poboljšava osjetljivost na inzulin zbog čega se može primijeniti za prevenciju i liječenje dijabetesa tipa 2 (Ma i sur., 2015.) Nadalje, dugotrajna primjena CGA djeluje antinociceptivno te ublažava simptome dijabetičke neuropatije (Bagdas i sur., 2014.). Također, CGA pokazuje antiagregacijsko djelovanje te smanjuje stvaranje ugrušaka čime prevenira kardiovaskularne bolesti (Fuentes i sur., 2014.). Istraživanja *in vivo* pokazuju da CGA smanjuje sistolički i dijastolički krvni tlak te se može primjenjivati za prevenciju hipertenzije (Onakpoya i sur., 2015.). Zatim, ustanovljeno je da CGA smanjuje oštećenja humanih HaCaT stanica uzrokovanih UVB zračenjem te na taj način sprječava oštećenja stanica i stanične DNA (Cha i sur., 2014.). Zbog brojnih bioloških učinaka i potencijalne primjene, interes za pronalaženjem prirodnih izvora i najučinkovitijih metoda za ekstrakciju CGA, kao bioaktivne komponente je u stalnom porastu. No, pronalazak najučinkovitije metode za ekstrakciju je otežan jer su CGAs podložne promjenama temperature što rezultira unutarmolekularnom izomerizacijom, transesterifikacijom, ali i degradacijom klorogenskih kiselina (Farah i sur., 2005.; Jaiswal i sur., 2012; Xue i sur., 2016.). Zbog nestabilnosti i sličnosti struktura CGAs, na tržištu postoji jako malo dostupnih komercijalnih CGAs standarda (Wianowska i Gil, 2018.). Komercijalni izvori CGAs su *Lonicera japonica Thunb* i *Eucommia ulmoides Oliver*, međutim oni su ograničeni i skupi (Li i sur., 2005.). Nadalje, na tržištu je puno suplemenata CGA koja je izolirana iz zelenih zrna kave, no neobrađena zrna su prije svega glavna i jedina sirovina u proizvodnji kave. Stoga duhanski otpad, sa ekonomskog stajališta trebamo promatrati kao najisplativijim izvorom iznimno bogatim ovom vrijednom bioaktivnom komponentom.

2.2.3. Ostale bioaktivne komponente prisutne u duhanskom otpadu

Duhanski otpad je također bogat organskim kiselinama. Glavna uloga organskih kiselina je da podupiru kiselinsko-baznu ravnotežu ljudskog tijela na nužnoj i zdravoj razini. Značajan

dio kiselina je kompleksiran kao soli s nikotinom, amonijakom i anorganskim anionima kalcija, kalija i natrija. Pored limunske, oksalne i malonske kiseline, duhanski otpad sadrži najviše jabučne kiseline koja zajedno s limunskom ima antikancerogeno djelovanje jer smanjuje opasnost od stvaranja nitrozamina.

Dokazano je da duhanski list, a time i duhanski otpad, sadrži velike količine aminokiselina, uključujući visoke razine esencijalnih aminokiselina (Binzel i sur., 1985.; Rao i sur., 2007.). Međutim, veću antioksidativnu aktivnost pokazuju enzimski hidrolizirani proteini, peptidi, nego pojedinačne aminokiseline (Taylor i sur., 1980.).

Jing i sur. (2016.) su u duhanskom otpadu identificirali glukuronsku, galakturonsku kiselinu, te jednostavne šećere manozu, ramnozu, glukozu, galaktozu, arabinozu koje su gradivne jedinice polisaharida, za koje je dokazano da imaju inhibitorno djelovanje protiv HIV virusa, herpes simplex virusa, virusa gripe i virusa hepatitisa (Liu i sur., 2015.). Osim antivirusnog djelovanja, polisaharidima se pripisuje antitumorno, antioksidativno i antipatogeno djelovanje (Ru i sur., 2012.).

Nadalje, Popova i sur. (2019.) su postigli optimalnu viskoznost kozmetičkih gelova upotrebom resinoida duhana i time omogućili upotrebu duhana i u kozmetičkoj industriji.

Iz prethodno navedenog, dolazimo do zaključka da je duhanski otpad bogat izvor sekundarnih metabolita koji se danas nalaze u fokusu moderne farmaceutske, nutraceutske i kozmetičke industrije. Ono što predstavlja izazov jeste karakterizacija, optimiranje i evaluiranje djelovanja biomolekula izoliranih iz duhanskog otpada kao sastojaka za razvoj novih proizvoda. Zbog složenosti kemijske strukture bioaktivnih komponenata i njihove interakcije sa brojnim drugim kemijskim spojevima, procjena mehanizma njihovog djelovanja koja je važna za analizu biološke aktivnosti, izrazito je težak i izazovan zadatak. No, kako su farmaceutska industrija i sektor proizvodnje medicinskih pripravaka i dodataka prehrani koji se prodaju bez recepta, suočeni sa problemom zasićenja tržišta, neupitan je pronalazak inovativnih rješenja i razvoj proizvoda sa dodanom vrijednošću.

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija se definira kao proces izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. S obzirom na agregatno stanje dviju faza razlikujemo ekstrakciju: čvrsto-tekuće (izluživanje) i tekuće-tekuće. Princip ekstrakcije sadržan je u pojavi molekulske difuzije koju karakterizira izjednačavanje koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni dodir (Lovrić, 2011.).

Konvencionalne metode ekstrakcije poput destilacije, hladnog prešanja i ekstrakcije otapalima su posljednjih desetljeća bile široko primjenjivane u raznim granama industrije prvenstveno zbog lakoće i jednostavnosti njihovog provođenja. Međutim, njihovo provođenje je dugotrajno i pri visokim temperaturama što dovodi do degradacije termolabilnih komponenti, te zahtijeva upotrebu velikih količina otapala i energije.

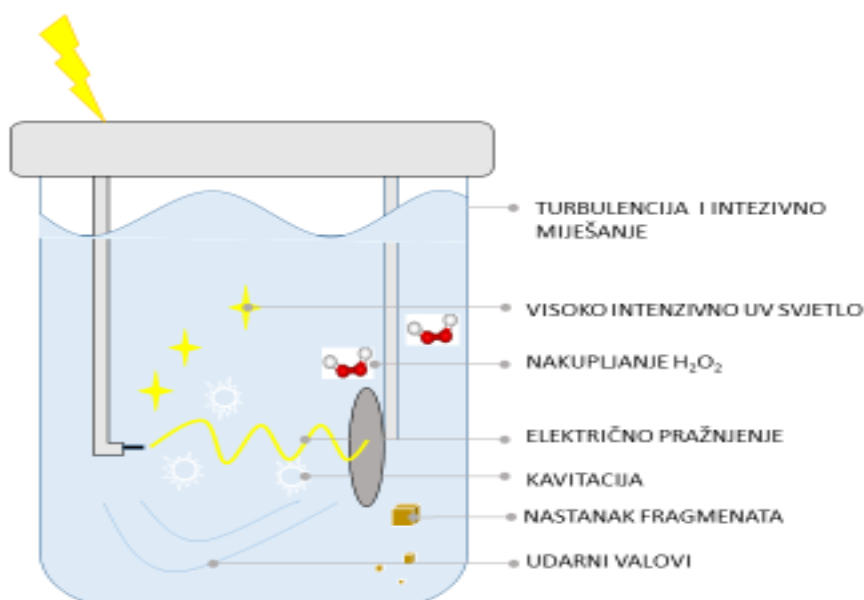
Ekstrakcija superkričnim fluidom/ima (Supercritical Fluid Extraction–SFE), ekstrakcija mikrovalovima (Microwave Assisted Extraction-MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (Ultrasound Assisted Extraction-UAE), ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem (Pulsed Electric Field-PEF) te ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (High-voltage Electric Discharge-HVED) su nekonvencionalne, inovativne metode koje su brže, učinkovitije, zahtijevaju manju upotrebu otapala i energije te su s toga ekološki prihvatljivije te postupno zamjenjuju konvencionalne metode (Devgun i sur., 2012.).

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem

Visokonaponsko električno pražnjenje (VNEP) netopljinska je metoda koja nalazi široku primjenu u prehrambenoj industriji. U cilju očuvanja mikrobiološke sigurnosti hrane i produljenja trajanja proizvoda uz očuvanje bioaktivnih komponenti, VNEP se primjenjuje u prehrambenoj industriji za inaktivaciju mikroorganizama i enzima kao i za uklanjanje toksina te sterilizaciju ambalaže i dezinfekciju vode. Najznačajnija karakteristika VNEP-a je provedba pri niskim temperaturama što je čini prikladnom za ekstrakciju termodegradibilnih bioaktivnih komponenti. Prema Li i sur. (2019.), sustavi za ekstrakciju potpomognutu

visokonaponskim električnim pražnjenjem mogu biti cirkulirajući, kontinuirani i diskontinuirani /šaržni ("batch") sustavi. Zatim, prema Dalvi-Isfahanu i sur. (2016.), ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem može se odvijati u plinovitom mediju ili tekućem mediju. Ekstrakcija u tekućem mediju koja se odvija diskontinuirano bila je predmet svih dosadašnjih istraživanja te će u daljnjem tekstu biti riječi samo o ovom načinu provedbe ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem.

Sistem za šaržno provođenje ekstrakcije sastoji se od reaktora/komore unutar koje se nalaze dvije elektrode, različite konfiguracije, na određenoj udaljenosti. Jedna elektroda je u obliku diska/ploče, a druga je u obliku igle i ona je spojena na vanjski izvor napona te je pozitivno nabijena.



Slika 4 Visokonaponsko električno pražnjenje između dvije elektrode u otopini (adaptirano prema Rajha i sur., 2015.)

Kada su izlazni napon i njegova pulsna frekvencija dovoljno visoki, dolazi do električnog pražnjenja u mediju (vodi) zato što je električno polje visoke jakosti koncentrirano u jednoj elektrodi (igličastoj). Električno pražnjenje obuhvaća nekoliko sekundarnih fenomena pojednostavljeno prikazanih na **Slici 4**. Između elektroda stvara se plazma kanal koji uzrokuje brzu preraspodjelu fluida/otopine/suspencije koja ga okružuje. Preraspodjela dovodi do stvaranja udarnih valova koji se radijalno šire medijem prouzrokujući turbulencije

i intenzivno miješanje sadržaja reaktora. Udarni valovi udaraju o stijenke reaktora (tlakom do 100 bara), odbijaju se pri čemu se formiraju refrakcijski valovi koji su odgovorni za nastajanje kavitacijskih mjehurića ispunjenih plinom. Mjehurići ekspandiraju te implodiraju, a njihovim urušavanjem nastaju sekundarni udari. Nastala plazma emitira visoko UV zračenje koje dovodi do fotodisocijacije medija/vode te nastajanja hidroksilnih radikala. Svi nabrojani fenomeni dovode do fragmentacije tretiranog materijala na makroskopskoj razini. Udarni i refrakcijski valovi mehanički razaraju stanične membrane, turbulencije ubrzavaju proces izlaska biomolekula iz stanica biološkog materijala podvrgnutog ekstrakciji te dovode do intenzivnog miješanja sadržaja reaktora čime doprinose prijenosu mase. UV zrake, valne duljine od 200-400 nm djeluju mutageno na stanice biološkog materijala, a hidroksilni radikali dovode do oksidacijskog stresa stanica (Boussetta i Vorobiev, 2014.; Rajha i sur., 2015.).

Koliko će učinkovito biti visokonaponsko električno pražnjenje, sa svim pratećim sekundarnim fenomenima, ovisi prvenstveno o tome koju biološki aktivnu komponentu želimo ekstrahirati i gdje se ona unutar stanice nalazi, a u skladu s materijalom kojeg tretiramo, odabrat ćemo uvjete ekstrakcije.

2.3.1.1. UVJETI EKSTRAKCIJE/ KRITIČNI PROCESNI PARAMETRI

Učinkovitost/uspješnost ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem ovisi o mnogim procesnim parametrima. Napon, frekvencija i jakost električnog polja, elektroprovodljivost medija, trajanja električnog pražnjenja, koncentracija otopine odnosno omjer tekuće:kruto, odabir otapala te protok/brzina protjecanja otopine ključni su parametri procesa.

○ **Jakost električnog polja**

Jakost električnog polja matematički se opisuje jednadžbom (1):

$$E = \frac{V}{d}$$

(1)

gdje je E -jakost električnog polja [kV/cm], V -napon [kV], a d -razmak između elektroda [cm]. Iz jednadžbe (1) jasno je vidljivo da što je vrijednost napona viša, a udaljenost između elektroda manja, jakost električnog polja je veća, dolazi do električnog pražnjenja i pratećih sekundarnih fenomena koji razaraju stanicu i omogućuju izlazak unutarstaničnih komponenti. Tu činjenicu potvrđuju Almohammed i sur. (2017.) koji su ekstrahirali pektin iz šećerne repe te zaključili da je iskorištenje/prinos pektina ekstahiranog iz šećerne repe bio je veći kada se impulsni napon povećao s 30kV na 40kV, pri čemu je udaljenost između elektroda ostala ista, 0,5 cm. Osim što veća jakost električnog polja povećava prinos traženih komponenti, ona utječe i na njihovu strukturu i antioksidacijsku aktivnost. Ju i sur. (2018.) istraživali su utjecaj jakosti električnog polja na antioksidacijsku aktivnost polisaharida ekstrahiranih iz alge *Gracilaria lemaneiformis*. Zaključili su da kako jakost polja raste, od 50 kV/cm do 80 kV/cm, raste i antioksidacijska aktivnost ekstrahiranih polisaharida, a kada je jakost uspostavljenog električnog polja iznosila 80 kV/cm, ekstrahirani polisaharidi imali su najveću aktivnost hvatanja DPPH radikala. Međutim, ako je jakost električnog polja prevelika uslijed previsokog napona konstantne frekvencije, prinos komponenti je smanjen jer dolazi do njihove oksidacije uzrokovane slobodnim radikalima generiranim tijekom intenzivnog električnog pražnjenja. Moubarik i sur. (2010.) su uzeli energiju za varijablu, a napon, frekvencija i jakost el. polja bili su parametri postupka ekstrakcije komponenti iz komorača. Kako je energija rasla (0 – 50 kJ/kg), rastao je prinos komponenti do 99 %. Kada je input energije bio iznad 50 kJ/kg, prinos nije bio veći od 74%.

○ Trajanje HVED-a

Duže vrijeme trajanja električnog pražnjenja (do kojeg dolazi uslijed nastajanja električnog polja visoke jakosti) ima za posljedicu učinkovitije razaranje stanične strukture te fragmentiranje komponenata (Rajha i sur., 2015.). No, ako je trajanje predugo, prinos komponenti je smanjen zbog radikala nastalih uslijed UV zračenja iniciranog el. pražnjenjem. Brianceau i sur. (2016.) navode da input energije veći od 100 kJ/kg dovodi do degradacije fenolnih komponenti, dok Rajha i sur.(2015.) tvrde da pri inputu energije čak višem od 600 kJ/kg ekstrahirani polifenoli vinove loze pokazuju stabilnost unatoč velikoj koncentraciji hidroksilnih radikala. Nadalje, iako su elektrode izrađene od nehrđajućeg čelika, uslijed dužeg trajanja HVED-a može doći do migracije metalnih iona koji mogu utjecati na elektroprovodljivost otopine/suspenzije i time nam dati krivu predodžbu o stupnju

oštećenja biološkog materijala. Što je stupanj oštećenja biološkog materijala veći, omogućen je veći izlazak unutarstaničnih komponenti koje onda mijenjaju ionski sastav, a time i elektroprovodljivost suspenzije (Boussetta i Vorobiev, 2014.).

- **Koncentracija otopine (omjer otapala i uzorka)**

Veća količina otapala u odnosu na uzorak znači da više otapala može ući u stanicu i dovesti do permeacije bioaktivnih komponenti. Upotrebom većeg omjera otapala i uzorka molekularna difuzija između dvije faze poboljšana je, a ekstrakcija je uspješnija (Xi i sur., 2017.). Barba i sur. (2015.) su proveli tretman VNEPom na uzorku pogače uljane repice u kojem se nalazila ciljana komponenta, izotiocijanati. Omjer otapala i uzorka bio je 20:1 te 5:1. Prinos izotiocijanata pri omjeru 20:1 bio je veći, no kasnijom DPPH analizom isti izotiocijanati pokazali su slabiju antioksidativnu aktivnost.

- **Odabir otapala**

Voda je dobro, jeftino otapalo koje otapa većinu organskih spojeva i stoga ima široku primjenu. No, flavonoidi su slabo topljivi u vodi, stoga dodatak organskog otapala poboljšava njihovu topljivost (Cui i sur., 2018.). Nadalje, električno pražnjenje može biti otežano ako je koncentracija etanola previsoka jer ona smanjuje elektroprovodljivost otopine/suspenzije (Zhu i sur., 2014.). Yan i sur. (2018.), tvrde da voda sa udjelom etanola od 25% predstavlja optimalno otapalo za ekstrakciju flavonoida iz ljuske kikirikija. pH vrijednost otopine utječe na proces ekstrakcije pa Mylonaki i sur. (2008.) ističu da je topljivost polifenola veća ako je pH vrijednost viša.

- **Protok**

Kod diskontinuirane ekstrakcije imamo statičan fluid, stoga je protok bitan parametar samo kod cirkulirajuće i kontinuirane ekstrakcije. Veći protok dovodi do tanjeg laminarnog sloja čime je omogućen veći prijenos mase između tretiranog materijala i medija te većeg prinosa ciljane komponente (Psillakis i Kalogerakis, 2001.). Međutim, protok veći od optimalnog, smanjuje prinos, zato što linearna brzina otopine je toliko visoka da granični sloj obje faze ne može postići ravnotežu ekstrakcije (Li i sur., 2019.).

○ PREDNOSTI I NEDOSTACI

Uspoređujući je s konvencionalnim i nekolicinom nekonvencionalnih metoda ekstrakcije, ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem ima sljedeće prednosti:

- tretiranje električnim pražnjenjem može rezultirati višim prinosom ciljanih komponenti uz kraće vrijeme tretiranja i manji utrošak energije u odnosu na konvencionalne ekstrakcije (Boussetta i Vorobiev, 2014.),
- učinkovitost razaranja stanica je izrazito velika; ako uzmemo vrijednost indeksa elektroprovodljivosti Z [$\mu\text{S}/\text{cm}$] koji služi za procjenu stanične dezintegracije i usporedimo s vrijednostima dobivenim UAE i PEF ekstrakcijom, ekstrakcija potpomognuta HVED-om je učinkovitija (Barba i sur., 2015.; Boussetta i Vorobiev, 2014.; Rajha i sur., 2015.),
- manja upotreba otapala u odnosu na konvencionalne metode,
- niska procesna temperatura i neznatno povišenje temperature otopine/suspenzije nakon ekstrakcije u odnosu na PWE (engl. Pressurized Water Extraction) ekstrakciju (Parniakov i sur., 2014.; Rajha i sur., 2015.)

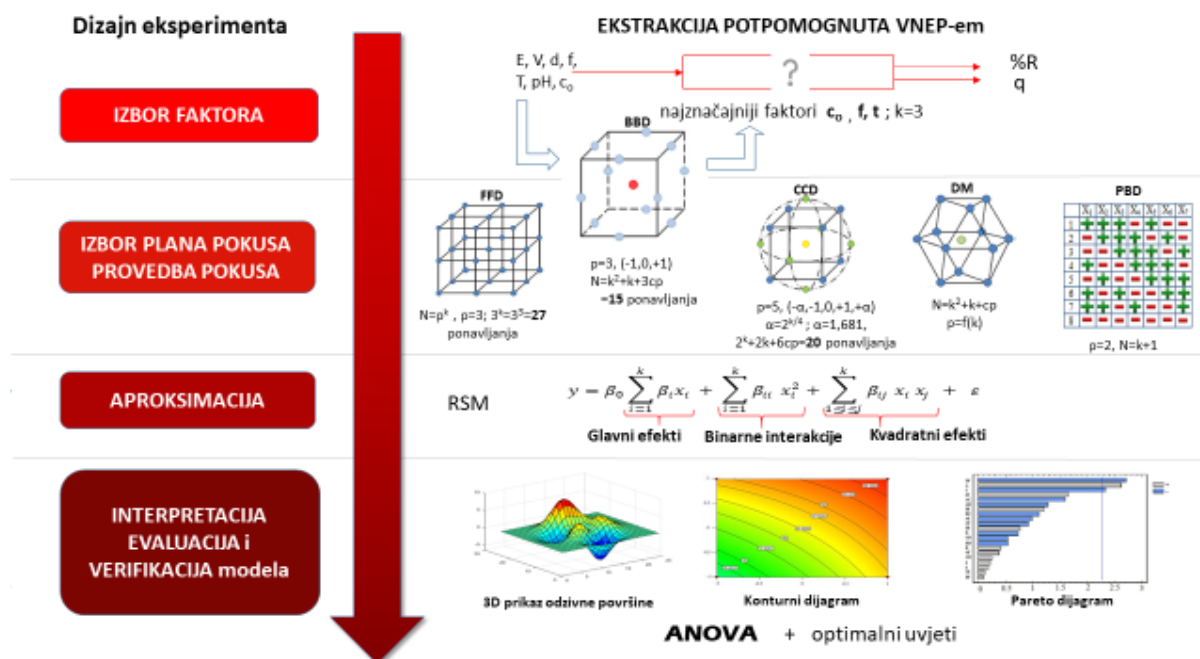
Nedostaci

- metoda je neselektivna, djeluje i na stanične zidove i membrane, pa dolazi do istjecanja različitih unutarstaničnih komponenti dok PEF ekstrakcija djeluje samo na membrane (Boussetta i sur., 2009.),
- zbog električnog pražnjenja visokog napona, nastaje veliki broj slobodnih radikala koji dovode do oksidativnog razaranja staničnih membrana, ali i do oksidacije ciljanih komponenti čime se smanjuje njihov prinos (Li i sur., 2019.),
- nastaju fragmenti malih dimenzija čime je otežano razdvajanje otapala od ekstrakta,
- dosadašnja istraživanja vezana za ekstrakciju potpomognutu HVED-om provedena su u laboratorijskom mjerilu i pilot postrojenjima, no za industrijsku primjenu nije dostatno samo primijeniti pravila uvećanja za bitne parametre procesa, pogotovo ne za energiju (Boussetta i sur., 2012.).

2.4. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

Optimizacija je neizbježan korak u svakoj analitičkoj tehnici i industrijskom procesu koji podrazumijeva podešavanje procesa preko skupa odabranih parametara, uz uvažavanje svih relevantnih procesnih ograničenja s ciljem postizanja maksimalne učinkovitosti uz minimalni eksperimentalni i financijski angažman (Banga i Seider, 1996.).

Za određivanje optimalnih uvjeta procesa primjenjuju se tzv. multivarijabilne (višefaktorne) statističke analize koje, za razliku od jednovarijabilnih ("one factor at the time"), uključuju interaktivne efekte među ispitivanim varijablama, a jedna od najčešće primjenjivanih je metoda odzivnih površina (eng. Response Surface Methodology, RSM) (Czitrom, 1999.). RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika koje se baziraju na usklađivanju polinomnih jednadžbi sa eksperimentalnim podacima dobivenih iz pravilno planiranih eksperimenata, a koje moraju opisati ponašanje skupa podataka u cilju statističkog predviđanja (Baš i Boyacı, 2007).



Slika 5 Faze procesa optimizacije primjenom RSM-a (adaptirano prema Witek-Krowiak i sur., 2014.)

Kao što je vidljivo na **Slici 5** početni korak u planiranju procesa/eksperimenta predstavlja izbor faktora/ulaznih varijabli/nezavisno promjenjivih⁵ gdje je prvo potrebno napraviti *screening* eksperimenta kako bi se grubo ispitaio utjecaj više parametara i među njima odabrali oni sa glavnim utjecajem na promatrani proces. U tu svrhu može se primijeniti Plackett-Burmanov plan pokusa (engl. PBD) (Witek-Krowiak i sur.,2014.). Kako se svi parametri ne mogu testirati na istom nivou ili u istom opsegu, regresijska analiza se može izvršiti tek nakon tzv. kodiranja parametara odnosno njihovih realnih vrijednosti. Nakon toga, na red dolazi izbor plana pokusa/eksperimentalnog dizajna⁶ koji će se koristiti za proces optimizacije, kao i eksperimentalne domene⁷ nezavisnih varijabli. Provedbom pokusa određenim dizajnom eksperimenata dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, tzv. odzivna ploha opisana odzivnom funkcijom koja prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Svakoju funkciji moguće je pridružiti odgovarajući polinom i proračunati koeficijente jednadžbe. Odabir dizajna eksperimenata ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Što se tiče eksperimentalnih dizajna koji se koriste za optimizaciju, obično su to 3^k faktorijalni dizajni (eng. Full-Factorial Design, FFD) ili neke od modifikacija sa smanjenim brojem eksperimenata. Upotreba 3^k faktorijalnog dizajna je ograničena velikim brojem eksperimenata s obzirom da ukupan broj eksperimenata (*N*) eksponencijalno raste sa brojem faktora (*N*=3^k). Kao alternativa 3k faktorijalnom dizajnu su se pojavili dizajni sa smanjenim brojem eksperimenata, a najčešće se koriste Box-Behnkenov plan pokusa (engl. Box-Behnken Design, BBD) i centralno-kompozitni plan pokusa (engl. Central Composite Design, CCD). Nakon provedbe eksperimenata i izmjerenih vrijednosti odziva⁸ na red dolazi aproksimacija rezultata odgovarajućim polinomnim modelima. Budući da je najčešće neophodno naći kritične točke (minimum, maksimum ili pregib), obično se koriste polinomi sa kvadratnim članovima (Ferreira i sur., 2007.):

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

⁵ Faktori ili nezavisne varijable su eksperimentalne varijable koje se mogu mijenjati nezavisno jedna od druge (pH, temperatura, koncentracija reagensa, vrijeme trajanja procesa, frekvencija itd.)

⁶ Eksperimentalni dizajn predstavlja skup eksperimenata koji je definiran matricom sastavljenom od različitih nivoa kombinacija ispitivanih varijabli koje se moraju eksperimentalno primijeniti u cilju dobivanja odgovora tj. odziva.

⁷ Domena eksperimenta je polje istraživanja u kome se eksperiment realizira, a definiran je minimalnom i maksimalnom vrijednošću eksperimentalnih varijabli.

⁸ Odzivi ili zavisno promjenjive (zavisne varijable) predstavljaju praćene izlazne vrijednosti procesa (npr. prinos ekstrahiranih komponenti).

gdje je y odziv, k broj varijabli, x_i i x_j su kodirane nezavisne varijable, ε rezidual⁹, a β_0 , β_i , β_{ij} regresijski koeficijenti za odsječak, linearne, kvadratne parametre te parametre interakcije.

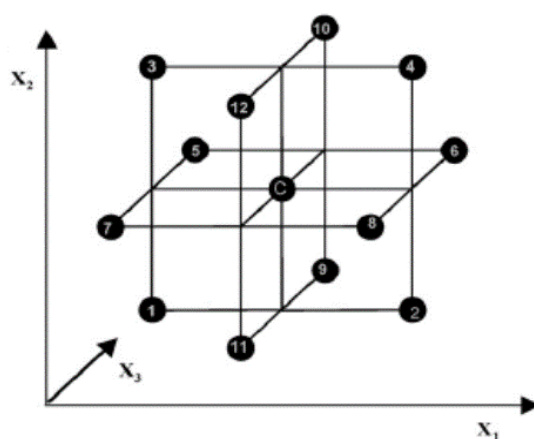
U cilju određivanja regresijskih koeficijenata u jednadžbi (2), koristi se metoda najmanjih kvadrata. Definiranjem regresijskih koeficijenata se generira matematički model koji može predvidjeti ponašanje ispitivanog odziva u okviru eksperimentalne domene. Zatim je neophodno evaluirati model odnosno provjeriti slaganje matematičkog modela i eksperimentalnih rezultata. Izabrani matematički model bi trebao na prikladan način opisivati odnos između faktora i odziva, odnosno između nezavisno promjenjivih i zavisno promjenjivih varijabli tako da je neophodno izvršiti provjeru njegove prikladnosti, procjenu točnosti predviđanja kao i utvrđivanje značajnosti individualnih i kombiniranih utjecaja ispitivanih faktora. Pouzdano rješenje ovog problema predstavlja primjena analize varijance (ANOVA) kojom se definiraju reziduali modela koji potječu od greške mjerenja i od neprikladnosti samog modela (Bezerra i sur., 2008). Fischerovim testom provjerava se slaganje matematičkog modela sa eksperimentalnim podacima i analizira stupanj značajnosti faktora odnosno određuje p-vrijednost koja mora biti statistički značajna ($p < 0,05$). "Lack of fit" testom ispituje se može li eksperimentalna greška predstavljati objašnjenje neusklađenosti odziva eksperimentom dobivenih i odziva predviđenih matematičkim modelom (Baş i Boyaci, 2007.; Bezerra i sur., 2008). Postotak ukupnih varijacija koje je moguće objasniti predloženim matematičkim modelom sadržan je u koeficijentu determinacije R^2 i korigiranom koeficijentu determinacije R^2_{adj} . Potrebno ih je odrediti zbog pojave varijacija u podacima bez obzira na statističku značajnost primijenjenog modela. Navedeni koeficijenti imaju vrijednost približno jedan ako je matematički model optimalno izabran (Nwabueze i Maduebibisi, 2010.). Nakon što je utvrđeno slaganje modela sa eksperimentalnim vrijednostima, neophodno je izvršiti verifikaciju modela. To se utvrđuje izvođenjem eksperimenata pri predviđenim uvjetima i uspoređivanjem vrijednosti eksperimentalno dobivenih i predviđenih vrijednosti odziva. RSM ima nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike optimizacije. Naime, ova tehnika omogućava dobivanje

⁹ Rezidual ili ostatak je razlika između izračunatog i eksperimentalnog rezultata za određeni skup uvjeta. Dobar matematički model koji odgovara eksperimentalnim podacima trebao bi imati nizak nivo reziduala.

velike količine informacija iz relativno malog broja eksperimenata, dok je kod tradicionalnih tehnika neophodno izvršiti veliki broj eksperimenata kako bi se opisalo ponašanje sustava (Baš i Boyacı, 2007.). Osim toga, RSM omogućava definiranje utjecaja interakcije ispitivanih parametara na odziv, što je pogotovo interesantno za kemijske i biokemijske procese gdje sinergizam ili antagonizam određenih faktora može imati veliki utjecaj na odziv. S druge strane, ova tehnika posjeduje određene nedostatke, a glavni nedostatak RSM je ograničenost matematičkog modela na ispitivanu eksperimentalnu domenu. Osim toga, kod RSM se uglavnom koristi polinom drugog reda, a veliki broj kemijskih procesa se ponaša po nekoj drugoj matematičkoj funkciji. Ovaj problem se donekle može riješiti odgovarajućim transformacijama odziva (logaritmiranje, korjenovanje, itd.), ali se za opisivanje ovisnosti i dalje koristi kvadratni polinom (Baš i Boyacı, 2007.).

2.4.1. Box-Behnken plan pokusa

Box-Behnkenov plan pokusa je alat za multivarijabilnu optimizaciju koji spada u skupinu nezavisnih kvadratnih planova pokusa i koji nije baziran na punom ili djelomičnom faktorskom planu pokusa, tj. ne sadrži točke na vrhovima pokusa. U ovom planu pokusa kombinacije nivoa faktora sačinjavaju glavna stanja pokusa, koja su na polovicama bridova eksperimentalnog prostora, uz centralnu točku. Ovakav plan pokusa može se smatrati rotabilnim, (Slika 6) ili vrlo blizu tome, s naglaskom da se koriste 3 nivoa svakog faktora (Ferreira i sur., 2007.).



Slika 6 Struktura Box-Behnkenovog plana pokusa (Ferreira i sur.,2007.)

Glavne karakteristike Box-Behnken plana pokusa su (Ferreira i sur., 2007.):

- Broj eksperimenata se određuje prema jednadžbi (3)

$$N=2k(k-1)+cp, \quad (3)$$

gdje je k broj faktora, a cp broj ponavljanja u centralnoj točki

- Nezavisne varijable moraju biti raspoređene na tri nivoa (-1, 0, 1) sa jednakim rastojanjem između njih (**Tablica 3**)

Tablica 3 Nivoi kodiranih nezavisnih varijabli za Box-Behnkenov plan pokusa (Ferreira i sur., 2007.)

Eksperiment	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
	0	0	0

- Ekonomičan je, budući da za $k = 3$ zahtijeva svega 13 eksperimenata,
- Iako se može izvesti iz kocke, on je u svojoj prirodi sferičan, pa dio kubične domene nije pokriven rezultirajućim modelom stoga je potrebno izbjegavati ekstrapolaciju u ovom dijelu,
- BBD ne sadrži kombinacije parametara u kojima svi faktori imaju svoje maksimalne ili minimalne nivoe čime se izbjegavaju ekstremni uvjeti eksperimentiranja pri kojima može doći do znatnih odstupanja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovoga rada realiziran je na Katedri za tehnologiju ugljikohidrata, Katedri za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode te na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek, a u sklopu projekta "Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla" (HRZZ-UIP-2017-05-9909).

3.1. ZADATAK

- Pripraviti suspenzije tri tipa duhanskog otpada (duhanska prašina, duhansko rebro i refabrikat) u destiliranoj vodi različitih omjera tekuće - kruto (300:1, 500:1, 700:1),
- Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provesti ekstrakciju suspenzija na uređaju za visokonaponsko električno pražnjenje, pri frekvenciji od 40, 70 i 100 Hz i u trajanju od 15, 30 i 45 min te pritom pratiti promjenu temperature, elektroprovodljivosti i pH vrijednosti suspenzija
- Odrediti sadržaj ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima,
- Odrediti antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata,
- Odrediti sadržaj klorogenske kiseline u dobivenim ekstraktima,
- Ispitati utjecaj procesnih uvjeta ekstrakcije (omjer tekuće:kruto, frekvencija i trajanje ekstrakcije) na sadržaj ukupnih fenola, antioksidativnu aktivnost ekstrakata te sadržaj klorogenske kiseline,
- Provesti optimizaciju procesa ekstrakcije uz primjenu programa *Design Expert*[®], metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

3.2. MATERIJALI

Duhanski otpad (**Slika 7**) korišten u ovom radu ustupila je tvornica za preradu duhana „Fabrika duhana Sarajevo“ (Sarajevo, Bosna i Hercegovina). Uzorci su prikupljeni u prosincu 2018. godine i čuvani na tamnom i hladnom mjestu do analiza.



Slika 7 Duhanski otpad

3.2.1. Kemikalije i uređaji

Kemikalije

- Folin-Ciocalteu reagens¹⁰ (Sigma-Aldrich, SAD),
- 20 %-tna otopina NaCO_3 ¹¹ (J.T.Baker, SAD),
- Metanol (Sigma-Aldrich, SAD),
- DPPH¹² (Sigma-Aldrich, SAD).
- Standard klorogenske kiseline (čistoće 96,63 %) – Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Njemačka)
- 0,1 % fosforna kiselina

Uređaji

- Tehnička vaga (Kern, Njemačka),
- Magnetska miješalica (Unistirer 7 LLG Labware, Njemačka),
- Uređaj za visokonaponsko električno pražnjenje (Osijek, Hrvatska),
- pH metar (Mettler Toledo, Švicarska),
- Konduktometar (Hanna instruments, Italija),
- Inkubator (Memmert GmbH, Njemačka),

¹⁰ Folin-Ciocalteuov reagens je smjesa fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline.

¹¹ Otopljeno 200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 1 litri vode kuhanjem.

¹² 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil

- Spektrofotometar (Shimadzu UV-1280, Japan i Thermospectronic Helios γ , SAD),
- HPLC uređaj (Agilent Technologies, SAD).

3.3. METODE

3.3.1. Ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem

Pripravljene su suspenzije duhanskog otpada (duhanska prašina, duhansko rebro i refabrikat) u destiliranoj vodi različitih omjera tekuće-kruto (300:1, 500:1, 700:1). Suspenzije su homogenizirane na magnetskoj miješalici, a potom tretirane visokonaponskim električnim pražnjenjem pri 40, 70, 100 Hz u trajanju od 15, 30 i 45 min. Tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem odnosno postupak ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem proveden je uz pomoć uređaja za visokonaponsko električno pražnjenje (**Slika 8**) koji je, u suradnji s firmom Inganiare CPTS1, konstruiran na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu.

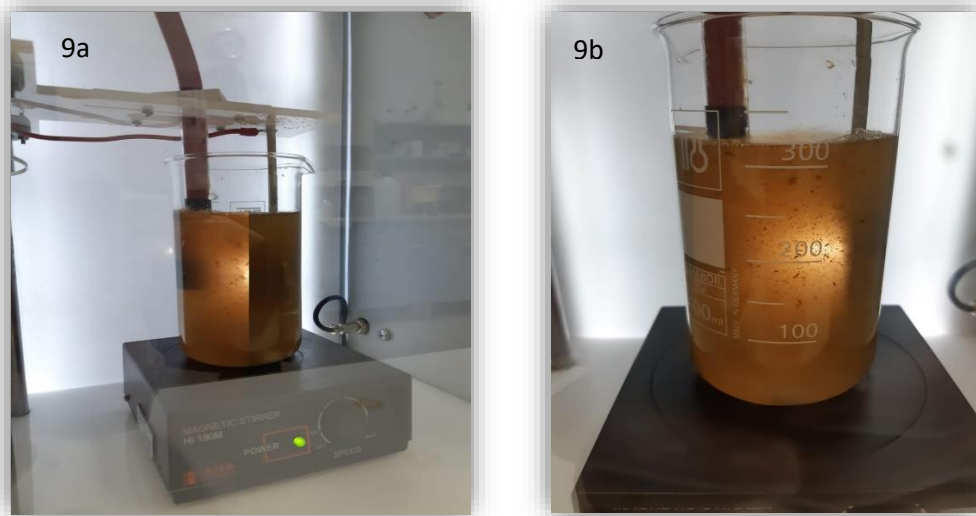


Slika 8 Uređaj za visokonaponsko električno pražnjenje

Uređaj za VNEP sastoji se od:

- **Visokonaponskog generatora** koji je izvor visokog istosmjernog napona od 30 kV te maksimalne snage od 120 W i maksimalnog iznosa struje od 10 mA,
- **Spremnika energije/kondenzatora** u kojem se energija skladišti, a potom prazni u obliku izboja (**Slika 9**) unutar komore,
- **Visokonaponske sklopke** koja osigurava pražnjenje spremnika u određenom intervalu čija frekvencija može iznositi od 10-100 Hz,

- **Komore** za „pin-to-plate“ tretiranje uzorka, unutar koje se nalazi magnetska miješalica na koju se stavlja staklena posuda s uzorkom i u koju su uronjene elektrode na konstantom razmaku od 1 cm,
- **Upravljačkog sklopa** za automatsko upravljanje te **upravljača** pomoću kojega možemo upravljati uređajem sa sigurne udaljenosti, a sastoji se od tipki za pokretanje i zaustavljanje te tipki za podešavanje frekvencije i vremena trajanja tretmana (ekstrakcije),



Slika 9 Električno pražnjenje u obliku izboja

3.3.2. Praćenje promjene temperature, elektroprovodljivosti i pH vrijednosti suspenzije

Prije i poslije provedbe ekstrakcije, svakoj suspenziji izmjerena je, uz pomoć konduktometra (**Slika 10**), temperatura i elektroprovodljivost te pH vrijednost, uz pomoć pH metra (**Slika 11**). Na taj način su praćene promjene temperature ΔT , promjene elektroprovodljivosti $\Delta \sigma$ i promjene pH vrijednosti suspenzije u ovisnosti o zadanim procesnim parametrima (omjer tekuće- kruto, frekvencija f , vrijeme t).



Slika 10 Konduktometar



Slika 11 pH metar

3.3.1. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određivani su metodom po Folin-Ciocalteu. Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Fenolne grupe oksidiraju se do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Nereducirani Folin-Ciocalteu reagens je žute boje dok reducirani ima stabilnu plavu boju. Intenzitet obojenja mjereno je određivanjem apsorbancije pri 765 nm u odnosu na slijepu probu.

POSTUPAK: U Eppendorf epruvete je dodano 20 μL uzorka razrijeđenog na 10 mg/mL te dodano 100 μL Folinovog reagensa, 300 μL 20%-tnog Na_2CO_3 , zatim 1580 μL mQ vode. Slijepa proba je pripremljena na gore opisani način, a umjesto uzorka sadržavala je ultračistu vodu.

Uzorci su termostimirani 30 min na 40°C nakon čega je mjerena apsorbancija spektrofotometrom na 765 nm. Rezultati su izračunati prema kalibracijskim krivuljama masenog udjela galne kiseline i ukupnih fenola, te izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po litri ekstrakta. Mjerenja su u svakom uzorku izvršena tri puta.

3.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištena je DPPH metoda koja se temelji na određivanju reducirajuće sposobnosti antioksidanasa (polifenola) prema DPPH radikalu.

Sposobnost hvatanja slobodnih radikala se određuje mjerenjem pada apsorbanције pri 515 – 528 nm. DPPH radikal je tamno ljubičaste boje i jedan je od rijetkih dušikovih radikala koji je stabilan zbog delokalizacije slobodnog elektrona kroz molekulu. Kada otopini DPPH radikala dodamo antioksidans dolazi do gubitka tamnoljubičaste boje otopine, uslijed čega iz slobodnog radikala nastaje reducirani oblik odnosno difenilpikrilhidrazin koji je žute boje.

POSTUPAK: 1,2 mL uzorka koncentracije 250 µg/mL pomiješano je s 0,5 mL svježe otopine DPPH (0,2 mM). Nakon 30 minuta stajanja uzorka u mraku, izmjerena je apsorbanција pri $\lambda = 517$ nm i određena vezujuća aktivnost DDPH, prema izrazu (4):

$$\%DDPH \text{ aktivnost} = \frac{(A_{DPPH} + A_b) - A_s}{A_{DPPH}} \cdot 100 \quad (4)$$

gdje su A_{DPPH} – apsorbanција kontrole (umjesto uzorka, dodan je metanol), A_b – apsorbanција uzorka, gdje je umjesto DPPH dodan metanol, A_s – apsorbanција uzorka pomiješanog s otopinom DPPH. Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja.

3.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Sadržaj polifenola određen je pomoću HPLC-a. HPLC uređaj (Slika 12) sadrži rezervoar mobilne faze, kvarternu pumpu, injektor, kolonu (korištena je kolona Zorbax Eclipse Plus C18, veličine čestica 10 mm x 4.6 mm, 5 µm), detektor (DAD) te jedinicu za obradu podataka.



Slika 12 HPLC uređaj

Sadržaj polifenola određen je modificiranom metodom opisanom u Wang i sur. (2010.), pri sljedećim uvjetima:

- mobilna faza: 0,1 % fosforna kiselina / metanol (55:45, v/v);
- injektirani volumen 20 μ l;
- brzina protoka 0,5 mL / min;
- vrijeme analize 10 min;
- analiza je praćena na 210 nm na DAD detektoru.

Nakon odjeljivanja polifenola u ekstraktima duhanskog otpada, provedena je identifikacija klorogenske kiseline. Identifikacija klorogenske kiseline provedena je osnovi usporedbe vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardom klorogenske kiseline čistoće 96,63 %. Validacija je provedena ispitivanjem odabranih izvedbenih značajki metode: linearnosti, preciznosti i točnosti. Injektiranjem pripremljenih otopina standarda klorogenske kiseline koncentracije 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 mg/L dobiveni su kromatogrami temeljem kojih se matematički linearnom regresijom dobila jednadžba pravca, te je izračunat koeficijent korelacije koji iznosi $R^2 = 0,99940$ čija vrijednost potvrđuje da je metoda linearna u cijelom području ispitivanih koncentracija. Granica detekcije klorogenske kiseline (eng. Limit of Detection, LOD) bila je 0,00036 mg/L, granica kvantifikacije (eng. Limit of Quantification, LOQ) bila je 0,0012 mg/L, a retencijsko vrijeme spoja 2,564 min.

3.3.4. Optimiranje procesa ekstrakcije duhanskog otpada primjenom RSM-a

U ovom radu korišten je Box-Behnkenov plan pokusa za procjenu utjecaja procesnih uvjeta na sadržaj ukupnih fenola, antioksidacijsku aktivnost ekstrakata te sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktima. Za potrebe ovog istraživanja odabrane su tri različite nezavisne varijable: vrijeme trajanja ekstrakcije (X_1), frekvencija (X_2) i koncentracija (X_3). Nezavisne varijable u kodiranom i nekodiranom obliku prikazane su u **Tablici 4**.

Tablica 4 Nekodirane i kodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM-u

Nezavisne varijable	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
Vrijeme ekstrakcije [min]	x_1	15	30	45
Frekvencija [Hz]	x_2	40	70	100
Omjer tekuće : kruto [mL/g]	x_3	300	500	700

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je sedamnaest eksperimenata ekstrakcije. Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani sa matematičkim modelom (2) odzivnih površina tj. polinomom drugog reda.

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa *Design-Expert*[®], v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Prednost ovog programa je što može raditi s kodiranim i nekodiranim varijablama.

4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA PROMJENU TEMPERATURE, pH VRIJEDNOSTI, ELEKTROPROVODLJIVOSTI, ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST TE EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLA I KLOGROGENSKE KISELINE U DUHANSKOM OTPADU

Tablica 5 Srednje vrijednosti promatranih odziva (ΔT , ΔpH , $\Delta \sigma$, DPPH, ukupni fenoli i CGA) pri ispitivanju različitih procesnih parametara (omjer tekuće-kruće, f i t) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica) u uzorcima **refabrikata**

br. eksperimenta	omjer tekuće - kruće [mL/g]	frekvencija f [Hz]	vrijeme t [min]	promjena temperature	promjena pH	promjena el. vodljivosti	DPPH [%]	ukupni fenoli [mg GAE/L]	klorogenska kiselina [$\mu\text{g/mL}$]
				ΔT [C°]	ΔpH	$\Delta \sigma$ [$\mu\text{S/min}$]			
1	700	40	30	9,6	0,50	12,0	53,54	52,13	3,66
2	300	40	30	10,2	-0,02	22,0	49,28	58,54	2,69
3	300	100	30	16,7	0,06	19,0	59,41	82,13	1,54
4	500	40	45	15,1	0,14	20,0	58,62	87,26	3,33
5	700	70	45	18,2	0,23	20,0	50,68	58,54	2,93
6	500	100	45	22,0	-0,06	23,0	53,68	76,49	2,23
7	500	70	30	14,4	0,20	20,0	50,27	68,28	2,81
8	500	100	15	9,0	-0,04	17,0	52,49	67,00	2,28
9	500	70	30	15,0	0,04	10,0	49,90	55,46	2,63
10	500	70	30	15,4	-0,06	15,0	50,82	50,33	2,32
11	500	40	15	6,0	0,09	16,0	54,84	58,79	3,38
12	500	70	30	16,0	0,07	18,0	52,15	60,08	2,54
13	700	100	30	14,3	-0,89	28,0	52,83	70,59	3,28
14	300	70	45	20,8	0,06	22,0	52,59	74,18	2,88
15	500	70	30	15,5	-0,05	19,0	63,50	46,74	2,45
16	700	70	15	7,6	0,22	16,0	50,58	59,82	3,41
17	300	70	15	8,2	-0,16	15,0	51,53	79,56	2,84

eksperimentalna matrica;

najviša vrijednost;

najniža vrijednost;

Tablica 6 Srednje vrijednosti promatranih odziva ($\Delta T, \Delta pH, \Delta \sigma$, DPPH, ukupni fenoli i CGA) pri ispitivanju različitih procesnih parametara (omjer tekuće i kruto, f i t) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim planom pokusa (eksperimentalna matrica) u uzorcima **duhanske prašine**

Br. eksperimenta	omjer tekuće-kruto [mL/g]	frekvencija f [Hz]	vrijeme t [min]	promjena temp. ΔT [C°]	promjena pH ΔpH	promj. el.vodljivosti $\Delta \sigma$ [$\mu S/min$]	DPPH [%]	ukupni fenoli [mgGAE/L]	klorogenska kiselina [$\mu g/mL$]
1	700	40	30	11,5	0,45	20,0	48,83	68,79	2,36
2	300	40	30	11,5	0,41	24,0	44,75	96,49	2,38
3	300	100	30	17,8	0,30	20,0	46,19	70,08	2,43
4	500	40	45	16,2	0,70	23,0	53,00	85,97	2,14
5	700	70	45	18,7	0,50	24,2	48,32	72,13	2,45
6	500	100	45	19,3	0,65	38,0	39,40	104,18	1,97
7	500	70	30	15,9	0,51	35,0	49,38	64,18	2,10
8	500	100	15	10,5	0,21	25,0	49,90	130,08	2,31
9	500	70	30	14,9	0,41	60,0	50,38	87,51	2,06
10	500	70	30	15,6	0,22	32,0	56,10	92,38	2,08
11	500	40	15	7,0	0,21	17,0	50,02	82,64	2,38
12	500	70	30	14,5	0,44	25,0	51,71	91,11	2,11
13	700	100	30	13,9	0,30	45,0	48,35	108,03	2,43
14	300	70	45	20,1	0,47	53,0	46,43	94,44	2,41
15	500	70	30	17,2	0,56	9,0	41,05	104,95	1,90
16	700	70	15	0,2	0,12	34,0	47,91	112,64	2,96
17	300	70	15	8,3	-0,03	31,0	47,29	103,67	2,90

eksperimentalna matrica;

najviša vrijednost;

najniža vrijednost;

Tablica 7 Srednje vrijednosti promatranih odziva ($\Delta T, \Delta pH, \Delta \sigma$, DPPH, ukupni fenoli i CGA) pri ispitivanju različitih procesnih parametara (omjer tekuće i kruto, f i t) u različitim kombinacijama definiranim Box-Behnkenovim dizajnom (eksperimentalna matrica) u uzorcima **duhanskog rebra**

Br. eksperimenta	omjer tekuće-kruto [mL/g]	frekvencija f [Hz]	vrijeme t [min]	promjena temp. ΔT [C°]	promjena pH ΔpH	promj. el.vodljivosti $\Delta \sigma$ [$\mu S/min$]	DPPH [%]	ukupni fenoli [mgGAE/L]	klorogenska kiselina [$\mu g/mL$]
1	700	40	30	14,5	0,10	149	49,39	41,21	3,14
2	300	40	30	13,9	0,00	97	45,29	28,79	2,48
3	300	100	30	15,5	0,24	64	45,67	42,13	2,51
4	500	40	45	15,6	0,23	41	48,71	54,18	3,38
5	700	70	45	19,3	0,24	55	47,19	38,03	2,65
6	500	100	45	19,3	0,22	73	47,58	25,97	2,30
7	500	70	30	15,5	0,26	87	49,20	38,79	2,77
8	500	100	15	8,1	-0,01	93	65,24	31,36	2,48
9	500	70	30	15,9	-0,02	39	49,77	33,15	2,53
10	500	70	30	15,7	0,04	55	47,15	36,49	2,37
11	500	40	15	5,7	0,33	54	47,72	29,05	2,44
12	500	70	30	15,3	-0,09	76	50,00	34,44	2,39
13	700	100	30	15,0	-0,02	62	47,38	29,05	2,55
14	300	70	45	21,0	0,29	82	51,40	33,92	2,53
15	500	70	30	16,5	0,28	42	50,27	32,90	2,60
16	700	70	15	7,1	0,11	25	49,89	27,77	2,53
17	300	70	15	7,6	0,14	86	48,25	24,18	2,35

eksperimentalna matrica;

najviša vrijednost;

najniža vrijednost;

U okviru rada provedeno je sedamnaest eksperimenata sa različitim kombinacijama procesnih uvjeta definiranim Box-Behnkenovim planom pokusa. Sva mjerenja obavljena su u tri ponavljanja, a podaci u tablicama su predstavljani kao aritmetička sredina. Praćen je utjecaj omjera tekuće-kruto (300:1, 500:1, 700:1 ml/g), frekvencije (40, 70, 100 Hz) i vremena trajanja ekstrakcije (15, 30, 45 min) na promjenu temperature, pH i elektrovodljivosti suspenzije. Nadalje, praćen je utjecaj procesnih parametara na antioksidacijsku aktivnost (mjerenu DPPH metodom), sadržaj ekstrahiranih ukupnih fenola (izraženih u mg ekvivalenta GAE/ L) i klorogenske kiseline (identificirane i kvantificirane HPLC-om) u uzorcima duhanskog otpada. Rezultati su prikazani u **Tablicama 5, 6 i 7**.

Promjena temperature je varirala od 0,2 do 22°C, a maksimalne vrijednosti su iznosile 20,1°C (za prašinu), 21°C (za rebro) i 22°C (za refabrikat) i to pri ekstrakciji u trajanju od 45 min. Iz navedenog može se zaključiti da tip duhanskog otpada nema utjecaja na temperaturu, no vrijeme ekstrakcije značajno utječe i to na način da uslijed duljeg izlaganja uzoraka električnom praženju dolazi do potpunog razaranja stanične stjenke i degradacije termolabilnih komponenti.

Uspoređujući sadržaj ukupnih fenola i klorogenske kiseline u refabrikatu i duhanskoj prašini, nije uočena značajna korelacija između promatranih veličina, dok je u duhanskom rebro, pri istim procesnim uvjetima, izmjerena maksimalna vrijednost ukupnih fenola i klorogenske kiseline što se može objasniti činjenicom da je klorogenska kiselina dominantna fenolna komponenta u ukupnim fenolima (Zhao i sur., 2010.) i da porastom njihovog sadržaja raste i sadržaj klorogenske kiseline.

Najviše vrijednosti ukupnih fenola izmjerene su u ekstraktima duhanske prašine (64,18 - 130,08 mg GAE/L), zatim u ekstraktima refabrikata (50,33 - 87,26 mgGAE/L), a najmanje ekstrahiranih ukupnih fenola ima u uzorcima duhanskog rebra (24,18-54,18 mgGAE/L).

Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazali su ekstrakti duhanskog rebra (45,29 – 65,24 %), zatim ekstrakti refabrikata (49,28 -63,59 %), dok je najmanji postotak inhibicije DPPH radikala izmjeren u ekstraktima duhanske prašine (41,05–56,19 %). Na osnovu prethodnih podataka možemo zaključiti da jedino u slučaju refabrikata

postoji korelacija između sadržaja ukupnih fenola i radikalne odnosno antioksidativne aktivnosti ekstrakata. No, ova korelacija nije nužna jer na sadržaj ukupnih fenola i na antioksidativnu aktivnost, osim procesnih parametra, utječe i izbor metoda za njihovo određivanje (Kähkönen i sur., 1999; Huang i sur., 2005.) te činjenica da fenoli za ostvarenje svoje biološke aktivnosti (antioksidativne) i funkcije moraju biti distribuirani i zadržani u biološkim tekućinama i stanicama (Denev i sur., 2012.).

Prema podacima iz **Tablica 5, 6 i 7**, sadržaj klorogenske kiseline kreće se u rasponu od 1,54-3,66 µg/mL. Navedeni rezultati su znatno nižih vrijednosti u odnosu na 3,64-804,2 µg/mL koje su Banožić i sur. (2019.) dobili provodeći ekstrakciju klorogenske kiseline iz duhanskog otpada potpomognutu ultrazvukom.

Do sada, duhanski otpad nije bio predmet istraživanja koje je uključivalo primjenu ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem. Nadalje, malo je radova u kojima je biljni materijal tretiran visokonaponskim električnim pražnjenjem, ne pri istim, već sličnim uvjetima. Iako je u većini slučajeva ekstrakcija provedena šaržno, ona se odvijala pri nižim vrijednostima procesnih parametara te se u malo slučajeva koristila voda kao otapalo (Rajha i sur., 2014.; Brianceau i sur., 2016.). Barba i sur. (2015.) su ekstrahirali ukupne fenole iz pogače uljane repice, pri uvjetima: 20:1, f=0,5 Hz, E=80 kJ/kg, čiji sadržaj je iznosio 559,17 mgGAE/100g_{s.tv.} što je približno vrijednostima dobivenim u ovom radu.

Tablica 8 Procesni uvjeti (omjer tekuće-kruto, frekvencija i vrijeme) pri kojima tri različita tipa duhanskog otpada (prašina, rebro i refabrikat) imaju najveću antioksidacijsku aktivnost

TIP DUHANSKOG OTPADA	max.vrijednosti DPPH[%]	PROCESNI UVJETI		
		tekuće:kruto [mL/g]	frekvencija [Hz]	Vrijeme [min]
1. PRAŠINA	130,08	500	100	15
2. REFABRIKAT	87,26	500	40	45
3. REBRO	54,18	500	40	45

Tablica 9 Procesni uvjeti (omjer tekuće- kruto, frekvencija i vrijeme) pri kojima je u tri različita tipa duhanskog otpada (prašina, rebro i refabrikat) izmjeren najveći sadržaj ukupnih fenola

TIP	UKUPNI FENOLI	PROCESNI UVJETI		
		tekuće:kruto	frekvencija	vrijeme

DUHANSKOG OTPADA		mg GAE/ L	[mL/g]	[Hz]	[min]
1.	REBRO	65,24	500	100	15
2.	REFABRIKAT	63,50	500	40	45
3.	PRAŠINA	56,1	500	100	15

Tablica 10 Procesni uvjeti (omjer tekuće- kruto, frekvencija i vrijeme) pri kojima je u tri različita tipa duhanskog otpada (prašina, rebro i refabrikat) izmjeren najveći sadržaj klorogenske kiseline

TIP DUHANSKOG OTPADA	CGA [μg/mL]	PROCESNI UVJETI		
		tekuće:kruto [mL/g]	frekvencija [Hz]	vrijeme [min]
1. REFABRIKAT	3,66	700	40	30
2. REBRO	3,38	500	40	45
3. PRAŠINA	2,96	700	70	15

Prema podacima u **Tablici 8**, neovisno o tipu duhanskog otpada, primijenjenoj frekvenciji i vremenu trajanja procesa ekstrakcije, najveći postotak inhibicije DPPH radikala izmjeren je u ekstraktima u kojima je omjer vode i uzorka 500:1. Pri tom omjeru najveći je i sadržaj ukupnih fenola, u sva tri tipa duhanskog otpada. U **Tablici 9** uočava se zanimljiv podatak za ekstrakt refabrikata. Pri identičnim procesnim uvjetima (omjer 500:1, $f=40$ Hz i $t=45$ min) u ekstraktu refabrikata izmjeren je najveći sadržaj ukupnih fenola te najveća antioksidacijska aktivnost. Pri najmanjem omjeru 300:1 nije izmjerena najveća vrijednost TP i AOA u sva tri tipa duhanskog otpada. Jokić i sur. (2019.) ovu pojavu objašnjavaju činjenicom da pri većim razrjeđenjima više otapala može prodrijeti u biljne stanice, otopiti veći sadržaj unutarstaničnih komponenti koje, uslijed gradijenta koncentracije, istječu van stanice. Najvišu AOA pokazao je ekstrakt prašine, dok je u rebro ekstrahirano najviše fenola. Najizraženiji utjecaj na prinos TP i AOA ekstrakata (pri omjeru 500:1) pokazuju najniža (40 Hz) i najviša frekvencija (100Hz) te najkraće (15 min) i najdulje vrijeme (45 min) trajanja ekstrakcije. Pri srednjim vrijednostima frekvencije (70 Hz) i vremena (30 min) nije izmjerena niti jedna maksimalna vrijednost TP i AOA. Možemo zaključiti da, neovisno o uvjetima ekstrakcije, tip duhanskog otpada značajno utječe na antioksidativnu aktivnost. Uspoređujući tri tipa duhanskog otpada, refabrikat je dokazano najbolji za ekstrakciju klorogenske kiseline (**Tablica 10**) što potvrđuju i rezultati dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom (Banožić i sur., 2018.) i ekstrakcijom koja primjenjuje subkritičnu vodu kao otapalo (Jokić i sur., 2019.)

4.2. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE U CILJU POSTIZANJA MAKSIMALNOG SADRŽAJA KLOROGENSKE KISELINE

Primjenom RSM-a analiziran je utjecaj tri nezavisna procesna parametra (x_1 -omjer tekuće:kruto, x_2 -frekvencija, x_3 -vrijeme) na sadržaj ekstrahirane klorogenske kiseline. Značajnost modela određena je analizom varijance (ANOVA). Rezultati ANOVE za predloženi model, kao i parametri koji opisuju primjenjivost predloženog matematičkog modela: koeficijent determinacije R^2 , f -vrijednosti, p -vrijednosti prikazane su u **Tablicama 11, 12, 13**.

Tablica 11 Analiza varijance modela za predviđanje sadržaja klorogenske kiseline u refabrikatu

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode D_f	Varijanca MS	f -vrijednost	p -vrijednost
Model	3,8700	9	0,430	3,99	0,0408
x_1 - omjer tekuće:kruto	1,3900	1	1,390	12,88	0,0089
x_2 -frekvencija	1,7400	1	1,740	16,15	0,0051
x_3 -vrijeme	0,0360	1	0,036	0,34	0,5789
x_1x_2	0,1482	1	0,150	1,38	0,2790
x_1x_3	0,0676	1	0,068	0,63	0,4541
x_2x_3	0,0000	1	0,000	0,00	1,0000
x_1^2	0,2200	1	0,220	2,00	0,2000
x_2^2	0,0011	1	0,001	0,01	0,9219
x_3^2	0,2400	1	0,240	2,23	0,1790
Ostatak	0,7500	7	0,110		
Nedostatak modela	0,6200	3	0,210	6,00	0,0581
Pogreška	0,1370	4	0,034		
Ukupno	4,6200	16			
R^2	0,8369				

vrlo značajan podatak $p < 0,01$
značajan podatak $0,01 < p < 0,05$
neznačajan podatak $p > 0,05$

Procjena značajnosti procesnih parametara i njihovih međusobnih interakcija provjerena je kroz p -vrijednosti, pri čemu vrijednosti manje od 0,05 ukazuju na statističku značajnost. Vrijednosti *Lack of fit* testa (f -vrijednosti) veće od 0,05 ukazuju da odstupanje od predviđenog modela nije statistički značajno. Za refabrikat je jedini statistički vrlo značajan faktor frekvencija, dok f -vrijednost kvadratnog člana istog faktora ukazuje na nedostatak modela (**Tablica 11**).

Tablica 12 Analiza varijance modela za predviđanje sadržaja klorogenske kiseline u duhanskoj prašini

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode D_f	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,280	9	1,28	14,33	0,0010
x_1 - omjer tekuće:kruto	$8,0 \times 10^{-4}$	1	$8,0 \times 10^{-4}$	0,08	0,7850
x_2 -frekvencija	$1,80 \times 10^{-3}$	1	$1,80 \times 10^{-3}$	0,18	0,6834
x_3 -vrijeme	0,310	1	0,31	31,36	0,0008
x_1x_2	$1,00 \times 10^{-4}$	1	$1,00 \times 10^{-4}$	0,01	0,9230
x_1x_3	$1,000 \times 10^{-4}$	1	$1,000 \times 10^{-4}$	0,01	0,9230
x_2x_3	$2,50 \times 10^{-3}$	1	$2,50 \times 10^{-3}$	0,25	0,6316
x_1^2	0,730	1	0,73	72,88	0,0001
x_2^2	0,018	1	0,02	1,79	0,2230
x_3^2	0,190	1	0,19	19,56	0,0031
Ostatak	0,070	7	$9,950 \times 10^{-3}$		
Nedostatak modela	0,040	3	0,01	6,00	0,2860
Pogreška	0,030	4	$7,400 \times 10^{-3}$		
Ukupno	1,350	16			
R^2	0,9485				

vrlo značajan podatak $p < 0,01$
značajan podatak $0,01 < p < 0,05$
neznačajan podatak $p > 0,05$

Za prašinu najznačajniji faktor, sa najmanjom p -vrijednosti ($p=0,0001$) i najvećom f -vrijednošću ($f=72,88$) je kvadratni član omjera tekuće-kruto, dok su vrijeme i kvadratni član vremena također statistički vrlo značajni faktori (**Tablica 12**). Frekvencija kao i njezina interakcija s vremenom imaju statistički značajan utjecaj na sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktu rebra. Sve f -vrijednosti nisu statistički značajne osim f -vrijednosti za interakciju omjera i vremena (**Tablica 13**). p -vrijednost svih regresijskih modela je bila ispod 0,05, što ukazuje na to da je veza između faktora i odziva statistički značajna. Nadalje, gotovo sve f -vrijednosti u **Tablicama 11, 12 i 13** nisu statistički značajne što potvrđuje pouzdanost i reproduktivnost predloženog modela. Koeficijent determinacije R^2 je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka te u idealnom slučaju iznosi 1. Joglekar i May (1987.) navode da je model primjenjiv ukoliko je vrijednost koeficijenta determinacije najmanje 0,80. U ovom istraživanju, vrijednosti $R^2= 0,8369$; $R^2= 0,9485$; $R^2= 0,8546$ za refabrikat, prašinu i rebro sugeriraju da je model prikladan i da se 83,69 %, 94,85 % i 85,46 % varijacija vrijednosti odziva može objasniti modelom.

Tablica 13 Analiza varijance modela za predviđanje sadržaja klorogenske kiseline u duhanskom rebru

Izvor Varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode D_f	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	1,080	9	0,12	4,57	0,0288
x_1 - omjer tekuće:kruto	0,130	1	0,13	4,78	0,0650
x_2 -frekvencija	0,320	1	0,32	12,25	0,0100
x_3 -vrijeme	0,140	1	0,14	5,37	0,0535
x_1x_2	0,096	1	0,10	3,68	0,0967
x_1x_3	0,009	1	$9,0 \times 10^{-4}$	0,03	0,8580
x_2x_3	0,310	1	0,31	12,00	0,0105
x_1^2	$9,47 \times 10^{-6}$	1	$9,474 \times 10^{-6}$	$3,625 \times 10^{-4}$	0,9853
x_2^2	0,078	1	0,08	3,00	0,1268
x_3^2	$1,441 \times 10^{-3}$	1	$1,441 \times 10^{-3}$	0,06	0,8211
Ostatak	0,180	7	0,03		
Nedostatak modela	0,075	3	0,03	0,93	0,5032
Pogreška	0,110	4	0,03		
Ukupno	1,260	16			
R^2	0,8546				

vrlo značajan podatak $p < 0,01$
značajan podatak $0,01 < p < 0,05$
neznačajan podatak $p > 0,05$

Primjenom višestruke nelinearne regresijske analize eksperimentalnih podataka dobivene su kvadratne polinomne jednadžbe kojima se opisuju utjecaji faktora na sadržaj klorogenske kiseline u tri tipa duhanskog otpada.

$$\text{Klorogenska kiselina (refabrikat)} = 2,55 + 0,416X_1 - 0,466X_2 - 0,067X_3 + 0,23X_1^2 + 0,016X_2^2 + 0,24X_3^2 + 0,19 X_1X_2 - 0,13 X_1X_3 - 5,61 \times 10^{-17} X_2X_3 \quad (5)$$

$$\text{Klorogenska kiselina (prašina)} = 2,05 + 0,01X_1 - 0,015X_2 - 0,20X_3 + 0,41X_1^2 - 0,065X_2^2 + 0,22X_3^2 + 5X_10^{-3}X_1X_2 - 5X_10^{-3}X_1X_3 - 0,025X_2X_3 \quad (6)$$

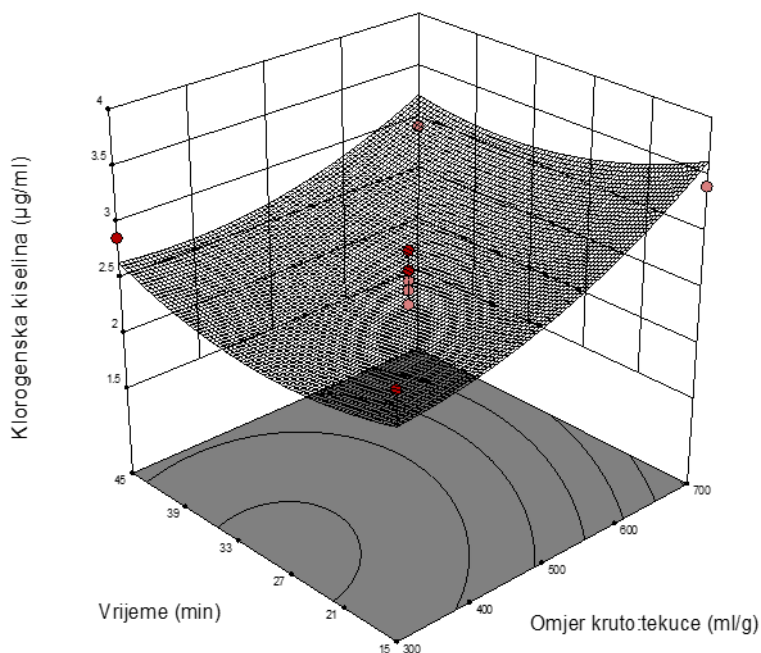
$$\text{Klorogenska kiselina (rebro)} = 2,53 + 0,13X_1 - 0,20X_2 + 0,13X_3 + 1,5 \times 10^{-3}X_1^2 + 0,014X_2^2 + 0,018X_3^2 - 0,16X_1X_2 - 0,15X_1X_3 - 0,28X_2X_3 \quad (7)$$

Apsolutna vrijednost koeficijenta nekog od članova polinoma direktno ukazuje na veličinu utjecaja tog člana na odziv, dok pozitivan ili negativan predznak koeficijenta govori o tome

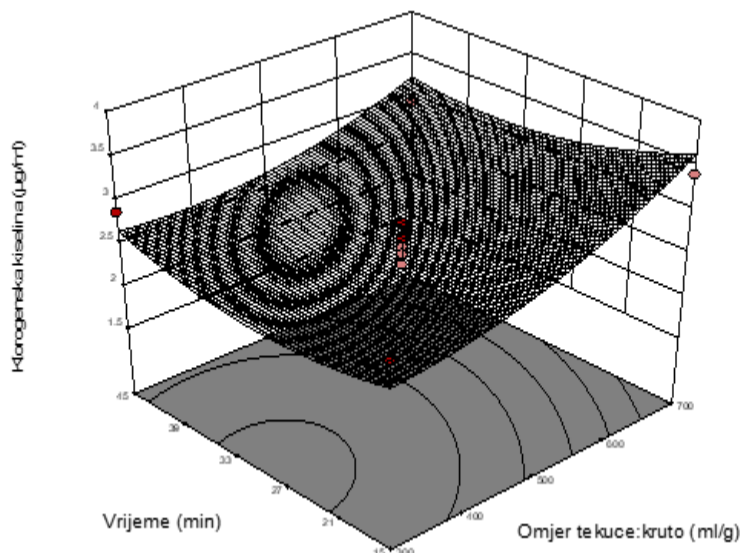
povećava li se vrijednost odziva ili smanjuje (Xu i sur., 2017). Naime, što je vrijednost koeficijenta člana polinoma veća to je i njegov utjecaj na odziv veći, dok pozitivan predznak koeficijenta označava da se porastom vrijednosti faktora, povećava i vrijednost odziva.

Frekvencija ima veći utjecaj na povećanje sadržaja klorogenske kiseline od omjera tekuće-kruto što je potvrđeno vrijednostima koeficijenata ovih faktora u regresijskim jednadžbama (5), (6) i (7). Međutim, promatrane vrijednosti koeficijenata članova polinoma s pozitivnim predznakom ukazuju da porastom omjer tekuće-kruto raste sadržaj klorogenske kiseline.

No, najbolji način da se prikaže utjecaj procesnih uvjeta na sadržaj klorogenske kiseline unutar ispitivanog područja jesu odzivne površine odnosno 3D dijagrami. 3D su geometrijska interpretacija regresijskih jednadžbi, pri čemu je vizualiziran utjecaj procesnih uvjeta na sadržaj klorogenske kiseline.

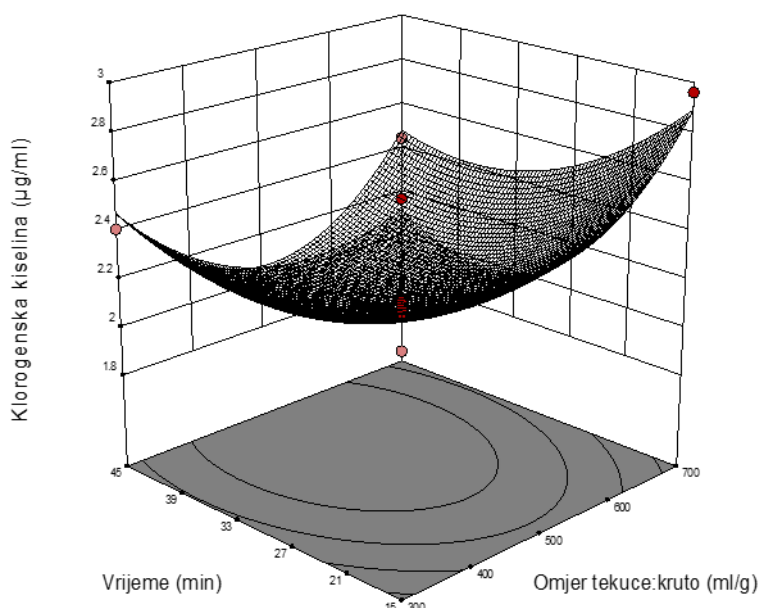


Slika 13 Odzivna površina u funkciji omjera tekuće-kruto i vremena na sadržaj klorogenske kiseline u refabrikatu

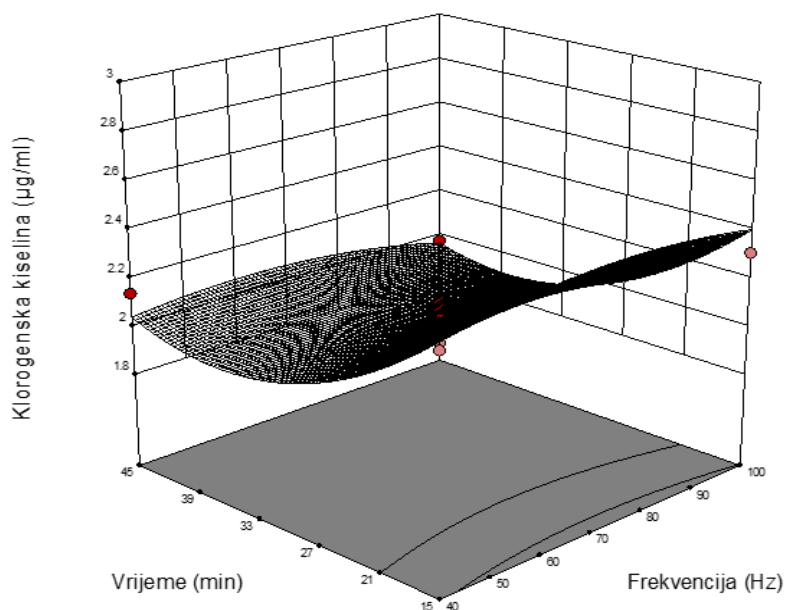


Slika 14 Odzivna površina u funkciji omjera tekuće-kruto i vremena ekstrakcije na sadržaj klorogenske kiseline u refabrikatu

Analizom **Slike 13** može se zaključiti da se sadržaj klorogenske kiseline i vrijednosti frekvencije odnose obrnuto proporcionalno, dok je omjer tekuće-kruto (mL/g) tek od 500:1 do 700:1 ima statistički značajan utjecaj na prinos klorogenske kiseline. Analizom **Slike 14** uočava se da porast omjera tekuće-kruto pozitivno utječe na sadržaj klorogenske kiseline, što su utvrdili i Banožić i sur. (2019.) dok se porastom ekstrakcijskog vremena do približno 30 min smanjuje sadržaj klorogenske kiseline, nakon čega ponovo raste te doseže najveću vrijednost pri najdužem trajanju ekstrakcije.



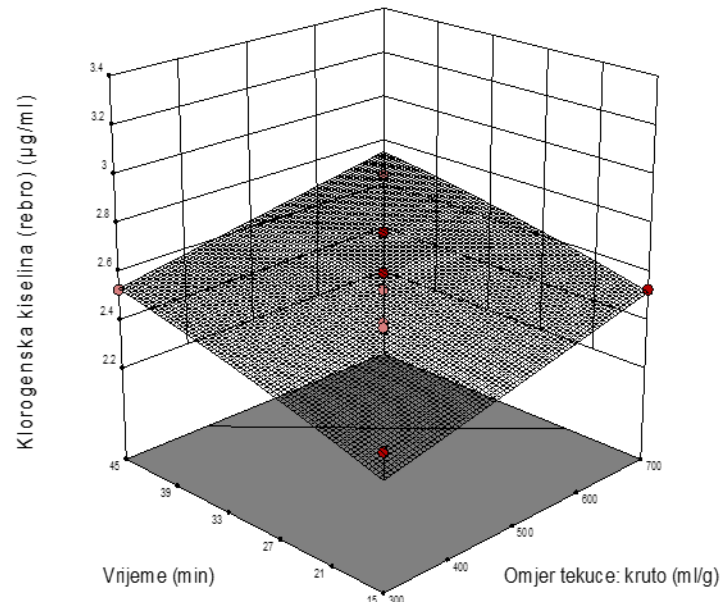
Slika 15 Odzivna površina u funkciji omjera tekuće-kruto i vremena na sadržaj klorogenske kiseline u duhanskoj prašini



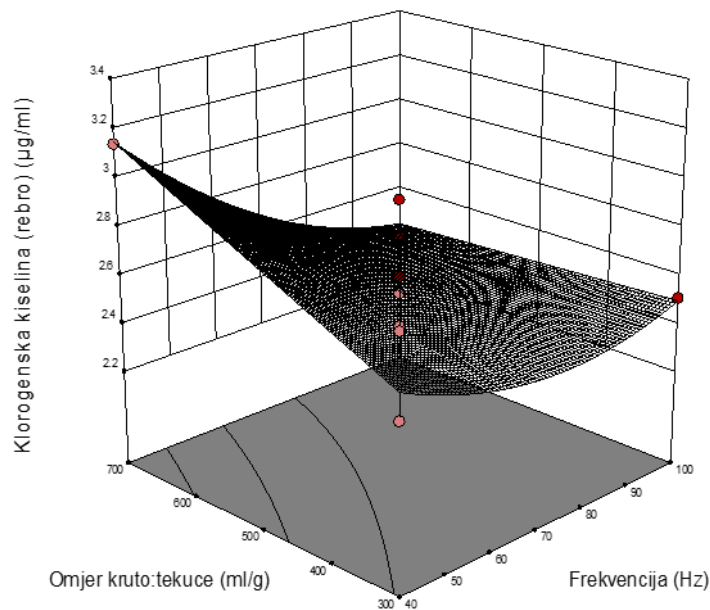
Slika 16 Odzivna površina u funkciji frekvencije i vremena na sadržaj klorogenske kiseline u duhanskoj prašini

Analizom **Slike 15** može se zaključiti da pri najnižim vrijednostima omjera i vremena imamo i najmanji sadržaj klorogenske kiseline. Kako omjer tekuće-kruto raste do vrijednosti 500:1, sadržaj se smanjuje. Omjeri veći od 500:1 pozitivno utječu na sadržaj klorogenske kiseline čiji porast se uočava tek nakon 30 min, a do tada vrijeme i sadržaj klorogenske kiseline se odnose obrnuto proporcionalno.

Na **Slici 16** frekvencija gotovo da nema nikakvog značajnog utjecaja na sadržaj klorogenske kiseline, dok omjeri tekuće-kruto veći i manji od 500:1 pozitivno utječu na sadržaj klorogenske kiseline.



Slika 17 Odzivna površina u funkciji omjera tekuće-kruto i vremena na sadržaj klorogenske kiseline u duhanskom rebru



Slika 18 Odzivna površina u funkciji frekvencije i omjera tekuće-kruto na sadržaj klorogenske kiseline u duhanskom rebru

Uz porast omjera tekuće-kruto raste i sadržaj klorogenske kiseline u ekstraktima, a pri frekvenciji većoj i manjoj od 70 Hz može se uočiti porast sadržaja klorogenske kiseline (**Slika 17**). Porast omjera tekuće-kruto kao i povećanje vremena trajanja ekstrakcije rezultiraju povišenjem sadržaja klorogenske kiseline (**Slika 18**).

Posljednji korak RSM-a je optimizacija. Za optimiranje procesa najčešće se primjenjuje metoda temeljena na konceptu željene funkcije (eng. *Desirability function*, D). Optimiranje se provodi tako da se promatrani odzivi (y) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću od 0 do 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, dok 1 predstavlja najbolju vrijednost za promatrani odziv. Iako je dobiveno više mogućih rješenja (kombinacija ispitivanih varijabli), odabrani su procesni uvjeti kod kojih je poželjnost D, kao kriterij za optimalno provođenje procesa bio bliže vrijednosti 1. Prema predloženim modelima, optimalni uvjeti ekstrakcije duhanskog otpada koji daju ekstrakt sa maksimalnim sadržajem klorogenske kiseline prikazani su u **Tablici 14**.

Tablica 14 Optimalni uvjeti pri kojima se dobiva maksimalan sadržaj klorogenske kiseline u refabrikatu, duhanskoj prašini i rebro

Tip duhanskog otpada	Optimalni uvjeti				
	Omjer tekuće-kruto [mL/g]	Frekvencija [Hz]	Vrijeme [min]	Predviđena vrijednost CGA	D vrijednost
Refabrikat	692	41	16,3	3,83	1
Duhanska prašina	700	73	15,0	2,89	0,937
Duhansko rebro	689	40	41,0	3,41	1

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

- Variranjem procesnih parametara: omjera tekuće-kruto (300:1, 500:1, 700:1 mg/L), frekvencije (40, 70, 100 Hz) i vremena trajanja ekstrakcije (15, 30, 45 min) na ispitivane odzive (ΔT , ΔpH , $\Delta \sigma$, antioksidacijska aktivnost, ukupni fenoli i sadržaj klorogenske kiseline), vrijednosti ispitivanih veličina u velikoj mjeri ovise o uvjetima ekstrakcije te se nalaze u sljedećim rasponima: REFABRIKAT-ukupni fenoli 50,33-87,26 mgGAE/L, antioksidativna aktivnost 49,28 – 63,59 %; PRAŠINA-ukupni fenoli 64,18 – 130,08 mgGAE/L , antioksidativna aktivnost 41,05–56,19 %; REBRO-ukupni fenoli 24,18 - 54,18 mgGAE/L, antioksidativna aktivnost 45,29 – 65,24 %,
- Neovisno o vrijednosti primjenjene frekvencije i vremena trajanja ekstrakcije, pri omjeru tekuće: kruto 500:1 najveće su vrijednosti sadržaja ukupnih fenola, antioksidativne aktivnosti i sadržaja klorogenske kiseline,
- Ekstrakcijski proces u trajanju od 15 i 45 min ima najveći utjecaj na sadržaj ciljanih odziva što se može objasniti činjenicom da kraće vrijeme izlaganja uzorka električnom pražnjenju ne rezultira degradacijom komponenti, dok dulje izlaganje uzorka visokonaponskom električnom pražnjenju (i pratećim sekundarnim fenomenima) intenzivira pucanje staničnih zidova biljnog materijala i oslobađanje ekstraktivnih komponenti,
- Svi predloženi modeli (za tri tipa duhanskog otpada) su statistički značajni, sa značajnim vrijednostima statističkih parametara (R^2 , p - i f - vrijednost) što ukazuje na primjenjivost predloženih modela,
- Procesni uvjeti predloženi optimizacijom RSM-om za REFABRIKAT ($D=1$) su 692:1; 41 Hz; 16,3 min; PRAŠINA ($D=0,937$) 700:1, 73 Hz i 15 min, a za REBRO ($D=1$) 689:1, 40Hz, 41 min,
- RSM metoda pokazala se vrlo učinkovitom u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije,
- Inovativna tehnika ekstrakcije potpomognute visokonaponskim električnim pražnjenjem pokazala se pogodnom za ekstrakciju klorogenske kiseline iz duhanskog otpada,

- Duhanski otpad može se smatrati potencijalnim etnofarmakološkim izvorom za proizvodnju klorogenske kiseline, čime dobiva novu uporabnu vrijednost, a opterećenje na okoliš je smanjeno.

6. LITERATURA

Acda MN i Cabangon RJ: Termite resistance and physico-mechanical properties of particleboard using waste tobacco stalk and wood particles. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 354-358, 2013.

Almeida G: Tobacco: Modern servitude and human rights violations. *The British Medical Journal* 63: 45-53, 2005.

Almohammed F, Koubaa M, Khelfa A, Nakaya M, Mhemdi H, Vorobiev E: Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges. *Food and Bioprocess Processing* 103: 95-103, 2017.

Arcury T i Quandt S: Health and social impacts of tobacco production. *Journal of Agromedicine* 11: 71–81, 2006.

Bagdas D, Ozboluk HY, Cinkilic N, Gurun MS: Antinociceptive effect of chlorogenic acid in rats with painful diabetic neuropathy. *Journal of Medicinal Food* 17: 730-732, 2014.

Banga JR i Seider WD: Global optimization of chemical processes using stochastic algorithms. U *State of the Art in Global Optimization* (563-583), Springer-Verlag New York Inc., New York, 1996.

Banožić M, Banjari I, Jakovljević M, Šubarić D, Tomas S, Babić J, Jokić S: Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Some Bioactive Compounds from Tobacco Waste. *Molecules*, 24(8): 1611, 2018.

Barba FJ, Boussetta N, Vorobiev E: Emerging Technologies for the recovery of isothiocyanates, protein and phenolic compounds from rapeseed and rape-seed press-cake: Effect of high-voltage electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 31: 61-72, 2015.

Baş D i Boyacı IH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78(3): 836–845, 2007.

Belitz H D, Grosch W, Schieberle P: Coffee, Tea, Cocoa. U *Food Chemistry* (939-951), Springer; Berlin, Heidelberg, New York, Hong Kong, London, Milan, Paris, Tokyo, 2004.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaliera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977, 2008.

Binzel ML, Hasegawa PM, Handa AK, Bressan RA: Adaptation of tobacco cells to NaCl, *Plant Physiology* 79: 118-125, 1985.

Boussetta N, Lebovka, N, Vorobiev E, Adenier H, Bedel-Cloutour C, Lanoiselle JL: Electrically assisted extraction of soluble matter from chardonnay grapeskins for polyphenol recovery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(4): 1491–1497, 2009.

Boussetta N, Vorobiev E, Reess T, De Ferron A, Pecastain, L, Ruscassi R, Lanoiselle JL: Scale-up of high voltage electrical discharges for polyphenol extraction from grape pomace: Effect

of the dynamic shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 16: 129–136, 2012.

Boussetta N, Vorobiev E: Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie* 17: 197-203, 2014.

Brianceau S, Turk M, Vitrac X i Vorobiev E: High voltage electric discharges assisted extraction of phenolic compounds from grape stems: Effect of processing parameters on flavan-3-ols, flavonols and stilbenes recovery. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 35: 67–74, 2016.

Cha J W, Piao MJ, Kim KC, Yao CW, Zheng J, Kim SM, Hyun CL, Ahn YS, Hyun JW: The polyphenol chlorogenic acid attenuates UVB-mediated oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. *Biomolecules & Therapeutics* 22: 136-142, 2014.

Chan E, Chen X, Hegde A: Effect of rutin on warfarin anticoagulation and pharmacokinetics of warfarin enantiomers in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61: 451-8, 2009.

Chhabra A, Geist H, Houthon RA, Harberl H, Braimoh AK, Vlek PLG: Multiple Impacts of Land-Use/Cover Change. U *Land-use and landcover change: local processes and global impacts* (71-116), Springer, Berlin, 2006.

https://www.researchgate.net/publication/226134641_Multiple_Impacts_of_Land-Use_Cover_Change (9.8.2019.)

Civilini M, Domenis C, Sebastianutto, de Bertoldi Marco: Nicotine Decontamination of Tobacco Agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms. *Waste Management & Research* 15: 349-358, 1997.

Clemens KJ, Caillé S, Stinus L, Cador M: The addition of five minor tobacco alkaloids increases nicotine-induced hyperactivity, sensitization and intravenous self-administration in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacol* 12: 1355–66, 2009.

Clifford MN: Chlorogenic acids and other cinnamates—Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(3): 362–372, 1999.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vander-Berghe V. Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* 61: 43-62, 1998.

Cui Q, Liu J-Z, Wang L-T, Kang Y-F, Meng Y, Jiao J, Fu Y-J: Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production* 184: 826–835, 2018.

Czitrom V: One factor at a time versus designed experiments, *The American Statistician* 53: 126–131, 1999.

Da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, González-Gallego J, Erdtmann B: *Food and Chemical Toxicology* 40(7): 941-947, 2001.

Dagnon S, Bojilov D, Docheva M, Edreva A: The Relationship between Main Polyphenol Components and Free Radical Scavenging Activity of Selected Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 10(3): 131-138, 2018.

Dalvi-Isfahan M, Hamdami N, Le-Bail A, Xanthakis E: The principles of high-voltage electric field and its application in food processing: A review. *Food Research International* 89: 48-62, 2016.

Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek M, Vasicek O, Nedelcheva P, Blazheva D, Toshkova R, Gardeva E, Yossifova L, Hyrsi P, Vojtek L: Biological activities of selected polyphenol-rich related immunity and gastrointestinal health, *Food Chemistry* 157: 37-44, 2014.

Devgun M, Nanda A, Ansari SH: Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of heartwood of *Pterocarpus Marsupium Roxb.* *Drug Research* 69(3): 475-485, 2012.

Dinesh R, Prakash C, Poojary N, Kantharajan G, Abraham S: Tobacco (*Nicotiana tabacum*) - A novel and futuristic sedative for fish transport in India. *International Journal of Fisheries and Aquatic studies* 5(3): 369-371, 2017.

Dubey S, Ganeshpurkar A, Shrivastava A, Bansal D, Dubey N: Rutin exerts antiulcer effect by inhibiting the gastric proton pump. *Indian Journal of Pharmacology* 45(4): 415-417, 2013.

Elliott AJ, Scheiber SA, Thomas C, Pardini RS. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochemistry & Pharmacology* 44: 16-38, 1992.

Farah A, De Paulis T, Trugo LC, Martin PR: Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1505-1513, 2005.

Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandao GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta* 597: 179-186, 2007.

Frankenburg WG: Chemical changes in the harvested tobacco leaf. *Advance enzymology* 6: 39-87, 1946.

Fuentes E, Caballero J, Alarcon M, Rojas A, Palomo I: Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation. *PLOS One* 9: 1-13, 2014.

Fylaktakidou KC, Gautam DR, Hadjipavlou-Litina DJ: Reactions of 4-methylchromene-2,7,8-trione with phosphonium ylides. Synthesis and evaluation of fused 1,3-dioxolocoumarins as antioxidants and antiinflammatories. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*: 3073-9, 2001.

Gadžo D, Đikić M, Mijić A: Ostale biljke za industrijsku preradu-DUHAN. U *Industrijsko bilje* (183- 207), Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, 2011.

Geist H: Soil mining and societal responses: the case of tobacco in eastern Miombo Highlands. U *Coping with changing environments: social dimensions of endangered ecosystems in the developing world* (119-148), Aldershot, UK & Brookfield, Ashgate, 1999.

Hernandez-Leon A, Fernández-Guasti A, González-Trujano ME: Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *European Journal of Pain Supplements* 20: 274-83, 2015.

Horvat J i Krpan J: Duhan (Duvan). U *Hrvatskoj tehničkoj enciklopediji*, 3.svezak, (473-480). LZ Miroslav Krleža, Zagreb, 1969.

Huang D, Ou B, Prior RL: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–56, 2005.

Huang W, Li Z, Niu H: Wang J, Qin Y: Bioactivity of solanesol extracted from tobacco leaves with carbon dioxide–ethanol fluids. *Biochemistry Engineering Journal* 42: 92–96, 2008.

Jaiswal R, Matei MF, Golon A: Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. *Food Functional*, 3: 976–984, 2012.

Jiang Y, Satoh K, Kusama K, Takayama E: Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. *Phytomedicine* 7(6): 483-91, 2001.

Jiang Y, Satoh K, Kusama K, Watanabe S, Sakagami H: Interaction between chlorogenic acid and antioxidants. *Anticancer Research* 20 (4): 2473-6, 2000.

Jing Y, Gao Y, Wang W, Cheng Y, Lu P, Ma C, Zhang Y: Optimization of the extraction of polysaccharides from tobacco waste and their biological activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 91: 188-197, 2016.

Johann S, Mendes BG, Missau FC, Rezende MA, Pizzollati MG: Antifungal activity of five species of Polygala. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 1065–1075, 2011.

Jokić S, Gagić T, Knez Ž, Banožić M, Škerget M: Separation of active compounds from tobacco waste using subcritical water extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* 153: 1-8, 2019.

Ju T, Xi J, Deng Y: Optimization of Circulating Extraction of Polysaccharides from *Gracilaria Lemniformis* Using Pulsed Electrical Discharge. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 7: 69-81, 2018.

Jung CH, Lee JY, Cho CH, Kim CJ: Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Archive of Pharmacal Research* 30(12): 1599–1607, 2007.

Jung UJ, Lee MK, Park YB, Jeon SM, Choi MS: Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318(2): 476-83, 2006.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55: 279-290, 2004.

Khanduja KL, Avti PK, Kumar S, Mittal N, Sohi KK, Pathak CM: Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760(2): 283-9, 2006.

Kim DW, Hwang IK, Lim SS, Yoo KY, Li H, Kim YS, Kwon DY, Moon WK, Kim DW, Won MH: Germinated Buckwheat extract decreases blood pressure and nitrotyrosine immunoreactivity in aortic endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research* 23(7): 993–998, 2009.

Kuhn DD, Smith SA, Mainous ME, Taylor DP: A novel molluscicide for aquaculture applications. *Aquacultural Engineering* 63: 25-31, 2014.

Kuhnert N, Karaköse H, Jaiswal R: Analysis of Chlorogenic Acids and Other Hydroxycinnamates in Food, Plants, and Pharmacokinetic Studies. U *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods* (461-506), CRC Press, Boca Raton, 2012.

Kumari V, Postma P: Nicotine use in schizophrenia: the self medication hypotheses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29(6): 1021-34, 2005.

Lakhan SE, Kirchgessner A: Anti-inflammatory effects of nicotine in obesity and ulcerative colitis. *Journal of Translational Medicine* 9: 129-135, 2011.

Leppan W, Lecours N, Buckles D: *Tobacco control and tobacco farming: separating myth from reality*. Ottawa, International Development Research Centre (IDRC), 2014.

Li H, Chen B, Yao S: Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides Oliv.* (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry* 12: 295–300, 2005.

Li J, Chase HA: Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Journal of Natural Products Report* 27: 1493–1510, 2010.

Li W, Zhang L, Penga J, Li N, Zhang S, Goua S: Tobacco stems as a low cost adsorbent for the removal of Pb (II) from wastewater: Equilibrium and kinetic studies. *Industrial Crops and Products* 28 (3): 294-302, 2008.

Li Z, Fan Y, Xi J: Recent advances in high voltage electric discharge extraction of bioactive ingredients from plant materials: *Food chemistry* 277: 246-260, 2019.

Lin JP, Yang J, Lin JJ, Lai KC, Lu HF, Ma CY, Sai-Chuen Wu R, Wu KC, Chueh FS, Gibson Wood W, Chung JG: Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environmental Toxicology* 27(8): 480–484, 2012.

Liu R: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134: 3479-3485, 2004.

Lovrić T: Procesi ekstrakcije u prehrambenoj industriji. U *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva* (299-303), Hinus, Zagreb, 2003.

Ma Y, Gao M, Lio D: Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Pharma Research* 32: 1200-1209, 2015.

- Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Santos AR, Pizzolatti MG, Brighente IM, Rodrigues AL: Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology* 10: 163-8, 2008.
- Martínez Conesa C, Vicente Ortega V, Yáñez Gascón MJ, Alcaraz Baños M, Canteras Jordana M, Benavente-García O, Castillo J: Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(17): 6791–6797, 2005.
- Mehan S, Monga V, Rani M, Dudi R, Ghimire K: Neuroprotective effect of solanesol against 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like behavioral, biochemical, and cellular alterations: Restoration of coenzyme-Q10-mediated mitochondrial dysfunction. *Journal of Indian Pharmacology* 50 (6): 309-319, 2018.
- Mendell S, Bourlas EC, De Bardeleben MZ: Factors influencing tobacco leaf quality: an investigation of the literature. *Beitrage zur Tabakforschung Int* 12 (3): 153–167, 1984.
- Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y: Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 45: 323-343, 2013.
- Moubarik A, El-Belghiti, Vorobiev E: Kinetic model of solute aqueous extraction from fennel (*Foeniculum vulgare*) treated by pulsed electric field, electrical discharges and ultrasonic irradiation. *Food and Bioprocess Technology* 89(4): 356-361, 2010.
- MPŠ, Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva RH: *Zakon o duhanu*. Narodne novine 32/19, 2019.
- Mylonaki S, Kiassos E, Makris DP, Kefalas P: Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392: 977–985, 2008.
- MZOP, Ministarstvo zaštite okoliša i prirode: Pravilnik o katalogu otpada. Narodne novine 90/15, 2015.
- Novotny T, Bialous S, Burt L, Curti, C, da Costa V, Iqtida, S, Liu Y, Pujari S, d'Espaignet E: The environmental and health impacts of tobacco agriculture, cigarette manufacture and consumption. *Environmental Science & Technology* 26: 25-27, 2015.
- Nwabueze TU i Maduebibisi OI: Residence time distribution (RTD) in a single screw extrusion of African Breadfruit mixtures. *Food and Bioprocess Technology* 3, 135-145, 2010.
- Onakpoya IJ, Spencer EA, Thompson MJ, Heneghan CJ. The effect of chlorogenic acid on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Human Hypertension* 29: 77-81, 2015.
- Parniakov O, Barba FJ, Grimi N, Lebovka N, Vorobiev E: Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high added value compounds from papaya peels. *Food Research International* 65: 337–343, 2014.

Popova V, Gochev V, Girova T, Iliev I, Ivanova T, Stoyanova A: Extraction Products from Tobacco – Aroma and Bioactive Compounds and Activities. *Current Bioactive Compounds* 11: 31-37, 2015.

Popova V, Tumbarski Y, Ivanova T, Hadjikinova R, Stoyanova A: Tobacco resinoid (*Nicotiana tabacum* L.) as an active ingredient of cosmetic gels. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 9 (9): 111-118, 2019.

Psillakis E i Kalogerakis N: Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *Journal of Chromatography A* 907 (1–2): 211–219, 2001.

Qin B, Liu L, Wu X, Liang F, Hou T, Pan Y, Song S: mPEGylated solanesol micelles as redox-responsive nanocarriers with synergistic anticancer effect. *Acta Biomaterialia* 64: 211-222, 2017.

Rajha H N, Boussetta N, Louka N, Maroun R G, Vorobiev E: Electrical, mechanical, and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenolextraction from vine shoots. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 31: 60–66, 2015.

Rao G, Zhao M, Lin W, Wang H: Antioxidative Activity of Tobacco Leaf Protein Hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology* 45(1): 80-84, 2007.

Ru QM, Wang LJ, Li WM, Wang JL, Ding YT. *In vitro* antioxidant properties of flavonoids and polysaccharides extract from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Molecules* 17: 11281-91, 2012.

Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A: Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(6): 27-41, 2013.

Selvaraj G, Kaliampurthi S, Thirungnasambandam R, Vivekanandan L, Balasubramanian T: Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. *Biomedical and Environmental Science* 27(4): 295–299, 2014.

Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T: Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology* 449 (3): 261-7, 2002.

Taylor MA, Fraser PD: Solanesol: Added value from Solanaceous waste. *Phytochemistry* 72: 1323–1327, 2011.

Taylor MJ i Richardson T: Antioxidant activity of cysteineand protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidizedby haemoglobin. *Journal of Food Science* 45: 1223–1227, 1980.

Wang J, Lu D, Zhao H, Jiang B, Wang J, Ling X, Chai H, Ouyang P: Discrimination and classification of tobacco wastes by identification and quantification of polyphenols with LC–MS/MS. *Journal of the Serbian Chemical Society* 75: 875–891, 2010.

Web 2: autor nepoznat, http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/ratarstvo/duhan/dorada-duhana/ (pristupljeno 2.8.2019.)

Web 1: autor nepoznat, <https://www.sinchisinchi.com/the-sacred-tobacco/> (pristupljeno 28.07.2019.)

Wianowska D i Gil M: Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochemistry Reviews* 18: 273-302, 2018.

Witek-Krowiak A, Chojnacka K, Podstawczyk D, Dawiec A, Pokomeda K: Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology* 160 : 150-60, 2014.

Xu M, Shao Q, Ye S, Li S, Wu M, Ding M, Li Y : Simultaneous Extraction and Identification of Phenolic Compounds in *Anoectochilus roxburghii* Using Microwave-Assisted Extraction Combined with UPLC-Q-TOF-MS/MS and Their Antioxidant Activities. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-11, 2017.

Xue M, Shi H, Zhang J :Stability and degradation of caffeoylquinic acids under different storage conditions studied by high-performance liquid chromatography with photo diode array detection and high-performance liquid chromatography with electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Molecules* 21:948–961, 2016.

Yan LG, Deng Y, Ju T, Wu K, Xi J .Continuous high voltage electrical discharge extraction of flavonoids from peanut shells based on “annular gap type” treatment chamber. *Food Chemistry* 256: 350-357, 2018.

Yan N, Liu Y, Gong D, Du Y, Zhang H, Zhang Z: Solanesol: A review of its resources, derivatives, bioactivities, medicinal applications, and biosynthesis. *Phytochemistry* 14: 403–417, 2015.

Yang H, Zhou J, Wang Y, Yang C, Duan F, Luo Z: Study on the contents of chlorogenic acid and rutin in the different genotype of flue-cured tobacco leaves. *Journal of Plant Sciences and Agricultural Research* 1: 187-191, 2005.

Yao X, Lu B, Lü C, Bai Q, Yan D, Wu Y, Hong Z, Xu H: Solanesol induces the expression of heme oxygenase-1 via p38 and Akt and suppresses the production of proinflammatory cytokines in RAW264.7 cells. *Food and Function* 8: 132-141, 2017.

Zafeiridou M, Hopkinson N S, Voulvoulis: Cigarette Smoking: An assessment of tobacco’s global environmental footprint across its entire supply chain. *Environmental Science and Technology*: 1-27 2018.

Zhang XZ, Gao HJ, Zhang LF, Liu DH, Ye XQ. Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 39:162-169, 2012.

Zhao W, Chen Y, Li S, Dai K, Chen Y, Yang S: Separation and purification of chlorogenic acid from tobacco by-products by polyamide and silicagel column chromatography. *African Journal of Biotechnology*, 14: 1731-1736, 2015.

Zhu JL, Tang L, Liu XL: Effect of swine manure on hightemperature compost maturity of tobacco fine waste. *Journal of Agro-Environment Science* 29: 779–784, 2010.

Zhu L, He ZH, Gao HZ, Tan FL, Yue XG, Chang JS: Research on theinfluence of conductivity to pulsed arc electrohydraulic discharge in water. *Journal of Electrostatics*, 72 (1):53–58, 2014.

Zhu W, Chen L, Wang B, Wang Z: Online Detection in the Separation Process of Tobacco Leaf Stems as Biomass Byproducts Basedon Low Energy X-Ray Imaging. *China Agriculture Almanac* 17: 96-99, 2017.